



HAL
open science

Etude de déterminants moléculaires de *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* impliqués dans la colonisation de son hôte *Phaseolus vulgaris*

Arnaud Darsonval

► **To cite this version:**

Arnaud Darsonval. Etude de déterminants moléculaires de *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* impliqués dans la colonisation de son hôte *Phaseolus vulgaris*. Autre. Université d'Angers, 2008. Français. NNT: . tel-00348013

HAL Id: tel-00348013

<https://theses.hal.science/tel-00348013>

Submitted on 17 Dec 2008

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.

**ÉTUDE DE DETERMINANTS MOLECULAIRES DE
XANTHOMONAS FUSCANS SUBSP. *FUSCANS* IMPLIQUES
DANS LA COLONISATION DE SON HOTE *PHASEOLUS*
*VULGARIS***

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Sciences Agronomiques

ÉCOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue publiquement

Le 8 avril 2008

À Angers

Par Arnaud Darsonval

Devant le jury :

Rapporteur : Marie-Anne BARNY, Chargée de Recherches, INRA, Paris
Rapporteur : Valérie VERDIER, Directrice de Recherches, IRD, Montpellier
Examineur : Philippe SIMONEAU, Professeur, Université d'Angers
Examineur : Emmanuelle LAUBER, Chargée de Recherches, CNRS, Toulouse
Examineur : Marie-Agnès JACQUES, Chargée de Recherches, INRA, Angers
Directeur de thèse : Charles MANCEAU, Ingénieur de Recherches, INRA, Angers

« Simplicité, humilité, honnêteté, générosité »

un certain 26 mai 2007...

REMERCIEMENTS

Je pensais que c'était fini, et que j'avais fait le plus dur, et voilà le moment qui va finalement être encore plus difficile à rédiger tellement il me tient à cœur...

J'espère que cet écrit aura contribué à faire avancer la recherche, il va aussi me permettre de remercier à jamais des gens qui comptent infiniment pour moi.

Comment n'oublier personne, je pense que c'est impossible, je tiens donc tout d'abord à remercier toutes les personnes que j'ai oubliées dans ces remerciements, elles se reconnaîtront !

Je tiens à remercier le jury pour avoir accepté d'assister et contribuer à ce travail de thèse.

Merci Charles Manceau pour m'avoir accueilli au sein de l'UMR PaVé et d'avoir été disponible quand j'en avais besoin.

Un immense **Merci** Marie-Agnès Jacques (madame +) et Armelle Darrasse (nan vraiment je ne vois pas quel surnom je pourrais te donner mémelle), merci à toutes les deux, un binôme complémentaire, toujours axé sur la rigueur et la bonne humeur, il y a un temps pour tout. Vous m'avez beaucoup apporté, et j'espère que ça n'a pas été trop dur pour vous de replonger dans « l'épreuve » de la thèse. Toutes ces études n'auraient pas été possibles sans l'aide précieuse, efficace et le soutien de Christine Bureau. Un énorme « Merci » Christine pour tout ! Merci Karine Durand pour ton aide et les bons moments passés au labo, merci aussi à Sandrine Houdault.

Merci à tous les stagiaires : Sandra, Guillaume, John, Anne-Laure, Antoine, Charles, Nelly, Jennifer, Matthieu, Adeline, Caroline, Samuel Fabien et Karen qui sont passés au sein du labo donner un coup de main et un coup de fraîcheur pour nous rappeler que l'on vieillit !

Un petit tour à l'UMR PaVé et par étage SVP, je suis désolé, mais je crois définitivement que je ne me suis fâché avec personne (ah si, ah non je peux pas le dire), ça risque donc d'être un peu long, mais ça me fait plaisir :

Je commencerais par remercier Paul (honneur au retraité), toutes ces plantes que tu élevais avec autant d'amour, et que l'on faisait mourir inlassablement, je m'en excuse encore et te remercie pour ces milliers de haricots et ces discussions d'un passionné.

Joel, merci aussi pour ces discussions et ton soutien, j'espère qu'on se verra très prochainement dans ta résidence secondaire ! Sylvain récemment arrivé, je suis désolé mais je ne pourrai pas exterminer toutes ces nouvelles plantes que tu sèmeras, mais ne t'inquiète pas d'autres s'en chargeront !

Chantal (la retraitée) et Jaqueline, vous m'avez été d'une grande aide, merci à toutes les deux.

Martine, un humour comme je les aime (c'était bien de l'humour ?), j'ai apprécié nos joutes verbales au café, le premier qui touchait ne gagnait pas forcément, un sens inné de

la répartie, tu verras que j'avais raison, les stagiaires ne partent pas tous sans donner de nouvelles !

Merci aussi à Natacha, Jacky, Valérie, Catherine (alias *Sativum*) Pascale, Frédérique, Perrine, Sophie, Emilie, ah non tu n'es plus là, ah si sur msn, ouf j'ai eu peur ! Pierre, sans commentaire, enfin si, tu es parti de ce bâtiment, je parlerais donc de toi plus tard, quand je remercierai les amis !

Bérénice, aspirante au poste de suppléant es café du mercredi matin, et qui sait peut être plus, c'est tout le mal que je te souhaite.

Merci Bruno LeCam pour ces discussions souvent extra-scientifiques, ce qui ne fait pas de mal !! et les bons moments passés grâce à la rencontre du Professeur Chang et Monsieur Mohamed.

Après ces quelques marches, je tiens maintenant à remercier Elisabeth pour tout ce qu'elle a fait pour moi, tu me répondrais sûrement pas grand chose, et que tu es là pour ça. Seulement tu as toujours été disponible quand j'en avais besoin, tu fais un travail quotidien, dans l'ombre de ce monde qui parle parfois trop de « facteur d'impact » et qui oublie de te dire Merci...

Merci Marie Noelle Brisset, et Monsieur Paulin, c'est avec beaucoup de plaisir que je vous reverrais dans le futur (dites-moi que c'est réciproque SVP !). Maintenant que je pars, je peux me permettre aussi de vous dire M. Paulin que vous êtes une de mes idoles. Il y a un côté « Johnny Hallyday » chez vous qui ne m'aura pas échappé !
Je tiens aussi à remercier Roland, Sophie et Chrystelle car c'était toujours un plaisir de vous croiser et discuter avec vous.

Thomas, Isabelle, Ahmed et Nadia comme tout thésard un emploi du temps assez pris qui nous aura sûrement empêché de mieux nous connaître, mais on se recroisera peut-être !

Merci Tristan Boureau, Stéphane Poussier, d'un grand soutien vous m'avez été, et j'espère vous revoir également dans d'autres circonstances.

Merci à Solange, Michel, Sophie, Marion, Chrystelle, Alain 🍏[©], et Martial PC[©]. Un étage que j'ai cotoyé avec énormément de plaisir pendant quatre ans, au hasard des rencontres à chaque recoin de ces longs couloirs, en voisin de paillassse, ou à la pause café.

Et si on sortait un peu du bâtiment...

Je vais faire un petit tour à la fac aussi, pour remercier Philippe Simoneau, Thomas Guillemette et Pascal Poupard, qui m'ont donné l'occasion d'enseigner ce qui reste une chance et un superbe souvenir. Merci aussi à Bruno Hamon qui m'a aidé lors de la préparation des T.P. et pour les matchs que tu as remportés haut la main avec Asuaceb. Ceci me permet aussi d'avoir une pensée pour le squash corpo et chef Pascal, ASUA et en particulièrement l'équipe Asuaceb, merci pour ces soirées riches en « pression(s) » !

Cette thèse n'aurait pas été possible si je n'avais pas rencontré Pascal Poupard, Cyril Crusson et Aline Vinck. Ma première expérience de recherche au SRPV, entre la fac, Angers et Carquefou... de très bons souvenirs, merci à vous.

Un grand merci à Philippe Rott, Matthieu Arlat, Emmanuelle Lauber et les « filles de Toulouse » : Servane et Alice. Votre aide, votre encadrement, votre soutien m'ont permis de me recentrer et de partager d'excellents souvenirs avec vous.

Je souhaite remercier aussi toute mon équipe d'accueil de DEA. La team « pois » de Rennes avec Bernard Tivoli, Alex Schoeny, Chrotophe LeMay, Biquet fire, Caro, Anne mais aussi tous les gens que j'ai rencontré là bas et que je croise ou que je croiserais encore avec un immense plaisir ! J'ai régulièrement de vos nouvelles, et je ne vous lâcherais pas comme ça !

Et si on sortait un peu de la pathologie végétale...

Merci Do, Toine, Laurence, Lolo, Alex, Luis, Mathilde, Agnès, Mimi, Arnaud, Jess, Pierre, Math, Jo, Steph, Etienne, Céline, Dam, Syl, Cyril, Mag, Badou, Vivien, Mélanie, Ben, Fred, Karine, Rominou et tout ceux que je ne cite pas ici faute de place ! Je ne peux pas vous dire tout le bien que je pense de vous ici, peut être n'arriverais-je jamais à vous le dire d'ailleurs ! Si ces derniers mois ont été long, c'est surtout et essentiellement dû au fait que je ne pouvais pas vous voir autant que je l'aurais souhaité ! Vous comptez énormément pour moi.

Je tiens aussi à remercier mes sponsors : Le BDC (avec Mani (M. Blackberry), Arash (M. Duvel), Basse (M. Basse), Mathias (M. 1 coca et 2 cafés SVP) et Amir (M. Le Géographe)) ; Chez Rémi (le meilleur et le plus convivial restaurant avec en plus la meilleure cave à vins d'Angers, et bientôt le Cercle Rouge (venez nombreux !! c'est rue des 2 Haies) ; l'ex-Arrosoir (merci à Fred et Damien) ; pizza tempo et le speed burger ; le jorky-ball et le squash du lac de maine ; la playstation ; apple 🍏 ... il faut que je me remette à tout ça !

Ma plus grande pensée ira à toute ma famille qui a supporté mes humeurs et ma fatigue en cette fin de thèse. Un Merci plus particulier à Astrid, pour les sacrifices faits mais surtout pour tout le temps qu'il nous reste à passer ensemble et profiter de tous les instants.

Ma dernière pensée ira à Jean-Victor, Aurélien et Gisèle...

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION **8**

CHAPITRE 1	10
ETAPES ET ELEMENTS CLES DE LA COLONISATION D'UNE PLANTE PAR UNE BACTERIE PHYTOPATHOGENE	10
1. COLONISATION DE LA SPERMOSPHERE	10
1.1 Colonisation des semences et écologie de la spermosphère	10
1.2 Colonisation de la plantule	13
2. COLONISATION DE LA PHYLLOSPHERE	14
2.1 Ecologie de la phyllosphère et pressions de sélection exercées sur les bactéries épiphytes	14
2.2 Colonisation de la phyllosphère	16
3. ROLE DES BIOFILMS LORS DE LA COLONISATION DE L'HOTE	18
3.1 Définition et caractéristiques générales	18
3.2 Rôle de protection contre les stress environnementaux	19
3.3 Disponibilité en nutriments et coopération métabolique	20
3.4 Principe de la formation de biofilms	21
4. DISPERSION ET DISSEMINATION DES BACTERIES	22
5. TRANSMISSION DES BACTERIES AUX SEMENCES ET AUTRES MODES DE SURVIE DES BACTERIES PHYTOPATHOGENES	23
5.1 Transmission des bactéries aux semences	23
5.2 Les moyens de survie des bactéries : futures sources d'inoculum	24
CHAPITRE 2	26
DETERMINISME GENETIQUE DE LA COLONISATION DE L'HOTE PAR UNE BACTERIE PHYTOPATHOGENE	26
1. CHIMIOTACTISME, MOBILITE ET ADHESION : MECANISMES PRELIMINAIRES A LA COLONISATION DE L'HOTE	26
1.1 Chimiotactisme et système flagellaire	26
1.2 Pili de type 4 ou adhésines fibrillaires	28
1.3 Adhésines non-fibrillaires	31
2. ENZYMES DE DEGRADATION DE LA PAROI CELLULAIRE	32
3. SYSTEMES D'ACQUISITION DU FER ET DU SUCRE	33
3.1 Système d'acquisition du fer	33
3.2 Systèmes d'acquisition du sucre	34
4. SYNTHÈSE DE LA MATRICE D'EXOPOLYSACCHARIDES	34
5. SYSTEMES DE REGULATION	35
5.1 Le Quorum Sensing	35
5.2 Système <i>rpf</i>	36
5.3 Système <i>pig</i>	37
6. GENES <i>HRP</i> ET FONCTIONS ASSOCIEES	38
6.1 Découverte des gènes <i>hrp</i> , système de sécrétion de type 3	39
6.2 Organisation des gènes <i>hrp</i>	40
6.3 Structure et rôle du système de sécrétion de type 3	41
6.4 Fonctionnement et régulation du SST3	42
7. EFFECTEURS DU SYSTEME DE SECRETION DE TYPE 3	44
7.1 Harpines	44
7.2 Protéines Avr et autres effecteurs	45
CHAPITRE 3	51
LE MODELE D'ETUDE : <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> - <i>XANTHOMONAS FUSCANS</i> SUBSP. <i>FUSCANS</i>	51
1. L'HOTE : LE HARICOT	51
1.1 Biologie, taxonomie et domestication	51
1.2 Importance économique	51

1.3 Principales maladies du haricot	52
2. LA GRAISSE COMMUNE DU HARICOT	52
2.1 Aire de répartition géographique	52
2.2 Importance économique	53
2.3 Symptomatologie	53
2.4 Méthodes de lutte	54
3. L'AGENT CAUSAL : <i>XANTHOMONAS FUSCANS</i> SUBSP. <i>FUSCANS</i>	56
3.1 Taxonomie et diversité génétique	56
3.2 Morphologie et physiologie	57
3.3 Caractéristiques du génome des <i>Xanthomonas spp.</i>	58
4. CYCLE BIOLOGIQUE ET EPIDEMIOLOGIE	59
4.1 Survie de l'agent pathogène et sources d'inoculum	59
4.2 Colonisation de la plante	60
4.3 Processus infectieux	61
4.4 Dispersion de la bactérie et de la maladie	62
4.5 Transmission de la bactérie aux semences de haricot	62

ENJEU ET OBJECTIFS DE LA THESE 64

RESULTATS 66

PARTIE 1	67
ROLE DU SYSTEME DE SECRETION DE TYPE 3 ET DE QUELQUES EFFECTEURS DANS LES ETAPES CLES DE LA COLONISATION D'UNE PLANTE PAR UNE BACTERIE PHYTOPATHOGENE	67
1. TYPE III SECRETION SYSTEM OF <i>XANTHOMONAS FUSCANS</i> SUBSP. <i>FUSCANS</i> IS INVOLVED IN PHYLLOSHERE COLONIZATION PROCESS AND IN TRANSMISSION TO SEEDS OF SUSCEPTIBLE BEAN	68
1.1 Abstract	69
1.2 Introduction	70
1.3 Materials and methods	71
1.4 Results	75
1.5 Discussion	80
1.6 References	84
2. DONNEES COMPLEMENTAIRES	89
2.1 Identification d'homologues des gènes <i>hrcN</i> , <i>hrpF</i> , <i>avrBs2</i> et <i>avrBs3</i> chez <i>X. fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i> CFBP4834-R	89
2.2 Vérification de la construction des mutants 4834HRCN, 4834HRPF, 4834AVRBS2 et 4834AVRBS3	90
2.3 Test du pouvoir pathogène et réaction hypersensible	91
2.4 Caractérisation complémentaire du mutant 4834HRPG	91
2.5 Rôle des gènes <i>hrcN</i> , <i>hrpF</i> et <i>avr</i> lors de la colonisation de la phyllosphère	91
2.6 Rôle de gènes <i>hrp</i> et <i>avr</i> lors de la transmission aux semences	92
2.7 Discussion et conclusion	93
PARTIE 2	96
ETUDE DE DETERMINANTS MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS L'ADHESION, L'AGREGATION ET LA REGULATION DE <i>X. FUSCANS</i> SUBSP. <i>FUSCANS</i> LORS DE LA COLONISATION DU HARICOT	96
1. ADHESION, EPIPHYTIC FITNESS AND TRANSMISSION TO SEEDS OF <i>XANTHOMONAS FUSCANS</i> SUBSP. <i>FUSCANS</i> ON BEAN	98
1.1 Abstract	99
1.2 Introduction	100
1.3 Results	102
1.4 Discussion	104
1.5 Materials and Methods	106
1.6 Literature Cited	113
2. DONNEES COMPLEMENTAIRES	120

2.1 Données référencées mais non présentées dans l'article 2	120
2.2 Identification et mutation de <i>fliN</i> , de l' <i>orf3</i> du cluster <i>pig</i> et de <i>rpfB</i> chez <i>X. fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i> CFBP4834-R	121
2.3 Impact de mutations dans les systèmes flagellaire, <i>pig</i> et <i>rpf</i> lors de la colonisation de l'hôte par <i>X. fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i> CFBP4834-R	123
2.4 Discussion et conclusion	125
PARTIE 3	128
PROCESSUS DE COLONISATION DES PLANTULES DE HARICOT, A PARTIR DE GRAINES CONTAMINEES, PAR DES BACTERIES PATHOGENES DES PLANTES OU NON PATHOGENES	128
1. EARLY COLONIZATION PROCESS OF BEAN SEEDLINGS BY PLANT PATHOGENIC AND NON-PATHOGENIC BACTERIA	130
1.1 Abstract	131
1.2 Introduction	132
1.3 Results	134
1.4 Discussion	135
1.5 Materials and Methods	138
1.6 Literature Cited	141

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 146

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	147
1. ETUDE DE COMPORTEMENTS BACTERIENS DE REFERENCE LORS DES DIFFERENTES ETAPES DE COLONISATION DU HARICOT	147
2. ROLE DES DIFFERENTS DETERMINANTS MOLECULAIRES CIBLES DANS LA COLONISATION DE LA SPERMOSPHERE ET DE LA PHYLLOSHERE	149
3. DETERMINISME DE LA TRANSMISSION DES BACTERIES AUX GRAINES	153
4. RECHERCHE D'AUTRES DETERMINANTS MOLECULAIRES	154
4.1 par hybridation suppressive soustractive	154
4.2 par l'analyse du protéome	155
4.3 par des études de transcriptomique	155
4.4 grâce au séquençage du génome de <i>X. fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i> CFBP4834-R	156

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 159

Introduction

La partie introductive de cette thèse vise à faire l'état de l'art quant aux connaissances des mécanismes de colonisation d'une plante par une bactérie phytopathogène.

Le premier chapitre a pour objectif de présenter les différentes étapes et facteurs clés de la colonisation d'une plante hôte par des bactéries phytopathogènes. Dans le cas des bactéries transmises par les semences, la colonisation de l'hôte débute par l'exploitation de l'environnement de la semence en germination avant de coloniser la plantule et les organes aériens de la plante. La transmission de la bactérie aux semences est l'étape finale du cycle qui assure la dispersion et la pérennité de l'agent pathogène.

Le deuxième chapitre introductif présente des déterminants moléculaires des bactéries phytopathogènes impliqués dans les mécanismes biologiques, physiques et épidémiques lors de la colonisation d'une plante hôte. L'augmentation exponentielle du nombre de données de séquences génomiques et leur analyse a permis l'identification de nombreux gènes et diverses fonctions qui leur sont associées lors de l'interaction entre une plante et un agent pathogène.

Le troisième chapitre concerne la présentation de notre modèle d'étude *X. fuscans* subsp. *fuscans* / *Phaseolus vulgaris*. *X. fuscans* subsp. *fuscans* (Schaad *et al.*, 2005) (anciennement appelé *X. axonopodis* pv. *phaseoli* variant *fuscans* (Vauterin *et al.*, 1995; Vauterin *et al.*, 2000) est responsable comme *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Vauterin *et al.*, 1995; Vauterin *et al.*, 2000) de la gousse commune du haricot.

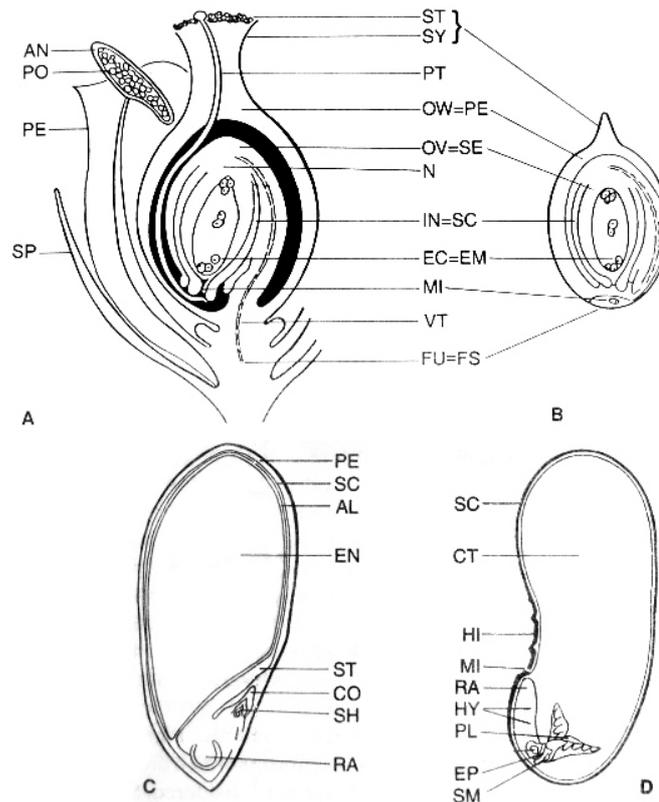


Figure 1 : Représentation schématique de l'anatomie comparée d'une fleur, d'un fruit et de graines. Coupes longitudinales d'une fleur de dicotylédones (A), d'un fruit (B), d'une graine de monocotylédones (blé) (C) et de dicotylédones (haricot) (D). AN, anthère ; PO, pollen ; PE, pétale ; SP, sépale ; ST, stigma ; SY, style ; PT, tube pollinique ; OW(PE), paroi de l'ovaire (péricarpe) ; (OV)SE, ovule (graine) ; N, nucelle ; IN(SC), tégument de la graine ; EC(EM), cellule œuf (embryon de la plante) ; MI, micropyle ; VT, vaisseau vasculaire ; FU(FS), funicule (cicatrice du funicule : hile) ; AL, couche à aleurone ; EN, endosperme ; ST, scutellum ; CO, coléoptile ; SH, tige ; RA, radicule ; CT, cotylédon ; HI, hile ; HY, hypocotyle ; PL, plumule ou tige ; EP, épicotyle ; SM, méristème de la tige.

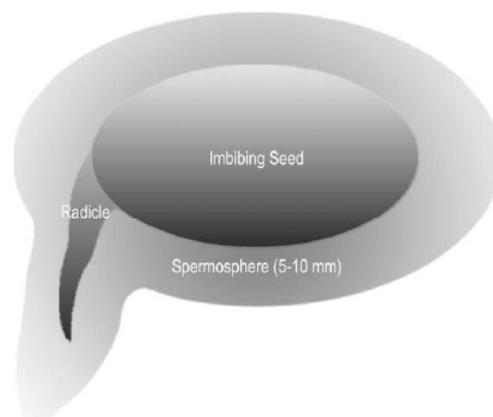


Figure 2 : Représentation schématique de la spermosphère (d'après Nelson, 2004). La spermosphère correspond à la zone de forte activité microbienne autour d'une graine en germination.

Chapitre 1

Etapes et éléments clés de la colonisation d'une plante par une bactérie phytopathogène

1. Colonisation de la spermosphère

1.1 Colonisation des semences et écologie de la spermosphère

En agriculture, les semences sont des graines, ou par extension d'autres organes de reproduction (bulbes, tubercules...), choisies pour être semées (Maude, 1996). La graine est un organe, le plus souvent de résistance, qui assure la reproduction des végétaux supérieurs. Elle provient exclusivement de l'évolution de l'ovule après fécondation (Côme *et al.*, 1982) (figure 1).

Les semences représentent un habitat de survie et une importante réserve nutritive pour les bactéries phytopathogènes (Gambodgi, 1983; Gitaitis et Walcott, 2007). Elles peuvent héberger des communautés bactériennes très diverses aussi bien à leur surface que dans leurs espaces internes (Kremer, 1987; Randhawa *et al.*, 1987; Cottyn *et al.*, 2001). Le génotype de la plante joue un rôle important dans la composition de cette flore bactérienne indigène présente au niveau de la semence en germination et dans son environnement proche (Simon *et al.*, 2001). Parmi les bactéries pouvant coloniser les semences d'orge on retrouve des espèces du genre *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pantoea* et *Pseudomonas* (Normander et Prosser, 2000), alors que les semences de coton peuvent être colonisées par des bactéries du genre *Xanthomonas*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Paracoccus*, *Curtobacterium*, *Micrococcus*, *Agrobacterium* et *Paenibacillus* (McKellar et Nelson, 2003).

Cette zone de forte activité microbienne qui se situe autour d'une graine en germination a été définie comme la spermosphère (figure 2) (Verona, 1958). La spermosphère est reconnue aujourd'hui comme un site dynamique d'interactions microbiennes, largement gouverné par la nature et le flux de nutriments libérés lors de la germination de la graine. La germination de la semence entraîne une prolifération de ses microorganismes grâce au relargage de nutriments dans la spermosphère (Nelson, 2004). Les graines sont colonisées par les bactéries indigènes dans les heures qui suivent le semis (Simon *et al.*, 2001). Les tailles de leurs populations peuvent atteindre 10^5 à 10^7 bactéries par semences dans les 12h après le semis (McKellar et Nelson, 2003).

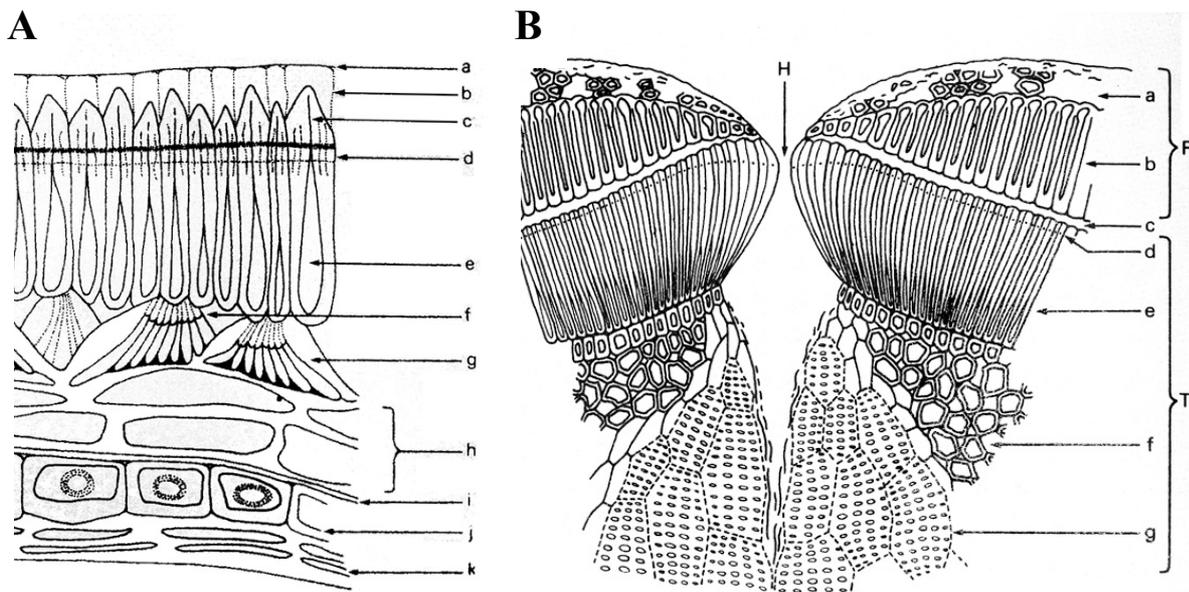


Figure 3 : Représentation schématique d'une coupe transversale de la structure des téguments d'une graine de légumineuse : *Melilotus alba* (A) et d'une coupe transversale du hile d'une graine de *Lupinus arboreus* (B) (d'après Côme *et al.*, 1982).

(A) Une assise épidermique externe est formée de cellules très allongées, appelées cellules de Malpighi. Ces cellules sont recouvertes d'une couche sous-cuticulaire amorphe, surmontée par une cuticule. Des cellules en forme de colonnes ou de piliers constituent l'assise sous-épidermique. La zone interne, d'épaisseur variable, reste parenchymateuse. a : cuticule, b : couche sous-cuticulaire, c : sommet des cellules de Malpighi, d : ligne lumineuse, e : lumière des cellules de Malpighi, f : espace intercellulaire, g : cellules en piliers, h : assise interne parenchymateuse, i : espace entre le tégument et l'albumen, j : couche d'albumen à aleurones, k : couches internes d'albumen. **(B)** On retrouve les mêmes formations que la figure 3A, recouvertes par des tissus dérivés du funicule. H : ouverture du hile ; F : tissus dérivés du funicule ; T : tégument de la graine ; a : cellules parenchymateuses ; b : cellules en palissade ; c : cuticule ; d : ligne lumineuse ; e : cellules de Malpighi ; f : cellules internes étoilées ; g : tissus conducteurs.

1.1.1 Topographie et colonisation des semences

Les agents pathogènes peuvent être présents à la surface des semences. Le tégument de certaines semences de céréales, de pois, de crucifères, présente un aspect lisse et intact à l'œil nu, mais la microscopie électronique montre que ce tissu est fissuré formant de nombreux microhabitats protecteurs pour ces agents pathogènes. D'autres semences ont un aspect nettement plus rugueux et sculpté comme les semences de céleri, de carotte ou de laitue largement favorable à l'adhésion des bactéries (Maude, 1996). Le tégument est une structure assez fine qui protège les tissus internes et, par la même occasion, les agents pathogènes. Les bactéries se retrouvent généralement dans les tissus du tégument de la graine, au niveau des espaces intercellulaires du parenchyme (figure 3). Il est rare que les microorganismes pénètrent plus profondément au sein des tissus de la graine sauf lors d'infection sévère où l'agent pathogène peut alors atteindre les tissus de l'embryon (Maude, 1996).

En pratique, la survie et la multiplication de l'agent pathogène sont intimement liées à la survie de la semence hôte et de son environnement proche, la spermosphère. Les conditions de conservation des semences affectent la survie des agents pathogènes selon la nature de ces microorganismes et leur localisation sur ou dans les tissus de la graine (Maude, 1996).

1.1.2 Modification de la spermosphère pendant la germination de la graine

Il est important d'identifier les nombreux facteurs qui caractérisent la spermosphère afin de mieux comprendre les interactions entre plantes et microorganismes autour d'une graine en germination. Ces facteurs peuvent être des propriétés génétiques de la graine mais aussi de très nombreux autres facteurs allant de la température à l'humidité du sol mais aussi de l'environnement biotique spécifique qui entoure la graine. Finalement tous ces facteurs influencent la germination de la graine, en commençant par l'imbibition passive de la graine par l'eau et en finissant par l'excroissance de la radicule et du tégument de la graine. Quand une graine est semée dans le sol, son taux de germination est déterminé par ses capacités à capter l'eau (Bewley, 1997). De telles caractéristiques d'hydratation affectent directement le relargage de sources carbonées lors de la germination de la graine. Cette source d'énergie représente la force motrice essentielle à l'interaction au sein de la spermosphère entre plante et microorganismes mais aussi à l'interaction des microorganismes entre eux. Les différents modes de germination, hypogée ou épigée, influencent aussi le relargage et le dépôt des sources carbonées au niveau de la spermosphère et donc du développement des microorganismes. Lors de la germination épigée (cas du haricot), les cotylédons et le tégument de la graine

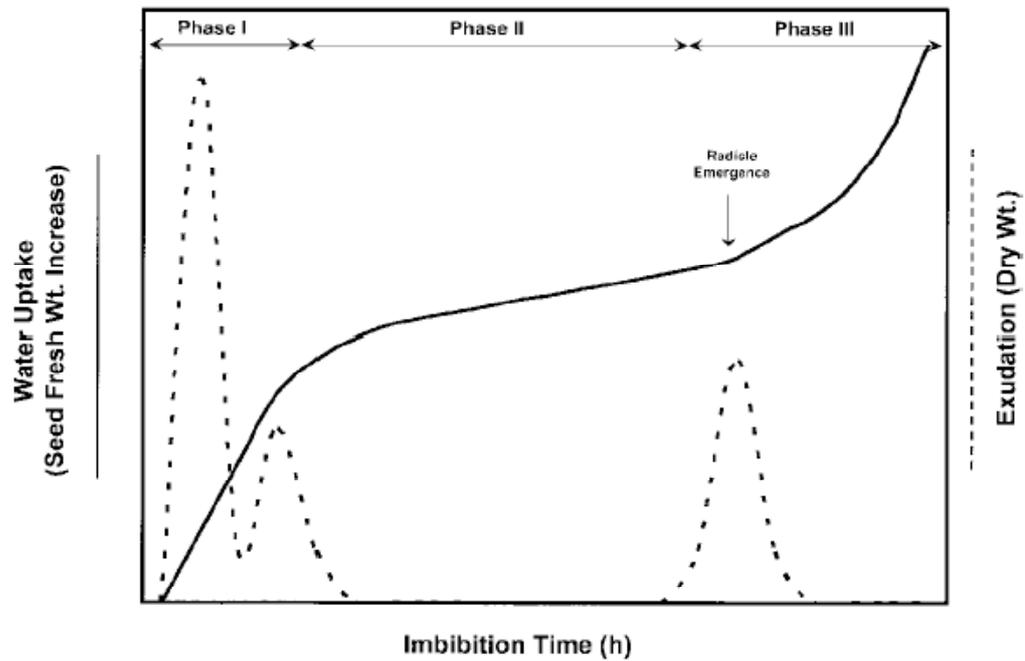


Figure 4 : Relation entre l'imbibition de la graine et le relargage de nutriments en fonction du temps (d'après, Nelson 2004). Phase I : Imbibition de la graine ; Phase II : Augmentation de l'activité métabolique de la graine, phase de germination au sens strict ; Phase III : Fin de la germination, développement de la plantule.

sont expulsés hors du sol modifiant de façon notable l'environnement de la graine qui devient inaccessible aux microorganismes du sol, contrairement au cas de la germination hypogée (cas du maïs), où la graine reste dans le sol accessible à de nombreux microorganismes. Nous allons maintenant présenter quelques un des critères physiques et biochimiques les plus importants qui précèdent l'émergence de la radicule et le développement de la plantule qui établiront la nature et les propriétés de la spermosphère (Nelson, 2004).

1.1.3 Imbibition de la graine et le relargage de nutriments

Trois phases distinctes composent la germination des graines et influent sur le relargage des nutriments, source d'énergie pour les microorganismes. La première phase correspond à l'hydratation de la graine, aussi connue sous le nom d'imbibition (figure 4). C'est un processus strictement physique qui permet à la graine de capter l'eau environnante (Bewley, 1997). L'imbibition est dépendante de facteurs extrinsèques comme la surface et le temps de contact entre la graine et l'eau. La quantité d'eau absorbée par la graine peut atteindre jusqu'à 150% de la masse de la graine. Généralement les graines contenant de fortes concentrations de protéines (comme les graines de légumineuses) peuvent absorber l'eau plus rapidement et gonfler plus que les graines disposant d'une plus grande teneur en amidon et en lipides. Ce gonflement résulte de l'afflux rapide d'eau qui entraîne des pressions hydrostatiques internes très importantes excédant souvent plusieurs MPa. Cela ne mène pas seulement à la rupture du tégument de la graine, mais aussi au relargage de substances internes de la graine, constituant les exsudats (Powell et Matthews, 1978; Powell et Matthews, 1981). La production la plus importante d'exsudats intervient dans les minutes et les heures qui suivent l'imbibition (Simon *et al.*, 1973; Simon et Mathavan, 1986), suivi par une augmentation secondaire autour de 6 h (Simon et Raja Harun, 1972). L'imbibition et la production d'exsudats cessent entre 8 et 12 h après le début de l'imbibition (Powell et Matthews, 1981; Bewley, 1997). Pour les graines de la plupart d'espèces de plantes, la majeure partie des exsudats est produite dans les 12 premières heures qui suivent le semis. Ensuite, les graines entrent dans la deuxième phase de germination pendant laquelle des événements métaboliques majeurs ont lieu qui préparent la graine pour l'expansion et l'apparition de la radicule (figure 4) (Bewley, 1997). Pendant cette période, de nouvelles mitochondries, des ARNm ainsi que des protéines sont synthétisés afin de soutenir le métabolisme lors de l'expansion de la radicule. Cette expansion et protrusion de la radicule à travers le tégument de la graine marquent la fin de la germination au sens propre et le début du développement de la plantule, phase 3 (figure 4). Cette troisième phase est également accompagnée par un autre relargage de métabolites et de molécules de bas poids moléculaire. Ces nutriments proviennent

Tableau 1 : Différents composés identifiés dans les exsudats de semences de nombreuses espèces végétales (d'après Nelson, 2004).

Composés
Sucres
Arabinose, cellobiose, deoxyribose, fructose, galactose, glucose, glycerol, lactose, maltose, mannitol, mannose, raffinose, rhamnose, ribose, sorbose, stachyose, sucrose, trehalose, xylose
Acides aminés
α -alanine, β -alanine, α -aminoadipic acid, α - γ -glutamylalanine, α -aminobutyric acid, γ -aminobutyric acid, asparagine, arginine, aspartic acid, citrulline, cysteic acid, cystathionin, cysteine, cystine, α,ϵ -diaminopimelic acid, dihydroxyphenylalanine, glutamine, glutamic acid, α - γ -glutamylalanine, glycine, histidine, homocysteic acid, homocystine, isoasparagine, isoleucine, isoxazolin-5-one, leucine, lysine, methionine, ornithine, phenylalanine, pipecolic acid, proline, β -pyrazolylalanine, serine, threonine, tryptophan, tyrosine, uracil-alanines, valine
Acides organiques aliphatiques
Acetic acid, aconitic acid, aminocyclopropane-1-carboxylic acid, citric acid, fumaric acid, glycolic acid, α -ketoglutaric acid, lactic acid, malic acid, malonic acid, oxalic acid, succinic acid, tartaric acid
Acides organiques aromatiques
Caffeic acid, chlorogenic acid, trans-cinnamic acid, p-coumeric acid, 3,4-dihydroxybenzaldehyde, ferulic acid, gentisic acid, p-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, salicylic acid, syringic acid, vanillic acid
Acides gras et autres lipides
Azaleic acid, linoleic acid, myristic acid, oleic acid, palmitic acid, 4-(2,2,4-trimethylpentyl)-phenol, 5-(12-heptadecenyl)-resorcinol
Flavonoïdes et autres composés phénoliques
Apigenin, catechin, chrysoeriol, cyanidin, daidzein, delphinidin, dihydroxyflavonols, 4',7-dihydroxyflavone, flavonols, flavones, genistein, kaempferol, luteolin, luteolin-7-O-glucoside, malvidin, myricetin, naringenin, petunidin, phenolic acids, proanthocyanidins, quercetin aglycone, quercetin-3-O-galactoside, 7-O- α -L-rhamnopyranosyl-4'-O-rutinosylapigenin, stachydrine, trigonelline, condensed tannins
Volatiles
Acetone, acetaldehyde, ethane, ethanol, ethylene, formaldehyde, formic acid, hydrogen cyanide, methane, methanol, propionaldehyde, propylene,
Autres composés divers
Canavanine, various enzymes, lepidimoic acid, lepidimoide, nucleoside diphosphate kinase, unknown proteins, vicilin

essentiellement des réserves de la graine nécessaires à sa germination et son développement en l'absence de photosynthèse (Nelson, 2004).

Le processus d'imbibition est donc largement responsable de la diffusion des molécules situées en réserve dans la graine qui sont alors relarguées dans la spermosphère grâce aux pressions hydrostatiques. De nombreuses molécules ont été identifiées et parfois quantifiées au sein de ces exsudats. Ils sont largement composés de sucres, d'acides aminés, d'acides organiques, de composés phénoliques et volatiles (tableau 1) (Nelson, 2004).

1.1.4 Rôle du chimiotactisme dans la spermosphère

La spermosphère apparaît comme un habitat riche en source d'énergie mais également extrêmement compétitif. L'acquisition rapide des substrats est essentielle à l'établissement et à l'activité de chacun des microorganismes. Le chimiotactisme est un trait microbien important afin d'optimiser l'accession aux ressources d'autant plus dans le cas des bactéries qui ne se déplacent pas plus vite que 2 centimètres en 24 h (Begonia et Kremer, 1999).

Des études portant sur des espèces de *Bacillus* et de *Pseudomonas* ont permis d'identifier des molécules particulièrement attractives provenant des exsudats de la graine. La souche B153-2-2 de *Bacillus megaterium* est attirée par les exsudats des semences de soja qui sont essentiellement composés d'alanine, d'asparagine, de glutamine, de malate, de sérine et de thréonine (Zheng et Sinclair, 1996). En revanche *B. megaterium* n'est pas attiré par la présence de sucres (Barbour *et al.*, 1991). Des études plus anciennes sur *Pseudomonas fluorescens* et *P. putida* soutiennent les résultats obtenus avec *B. megaterium* : ces deux espèces ont montré une réponse positive aux exsudats des graines de soja (Scher *et al.*, 1985) et de tomate (Gamliel et Katan, 1992), en raison de la présence d'acides aminés et non des sucres. Le chimiotactisme dépend de la composition des exsudats des graines et permet aux bactéries d'exploiter les ressources disponibles et de coloniser ces graines en germination (Zheng et Sinclair, 2000).

1.2 Colonisation de la plantule

Après une survie plus ou moins longue au niveau des semences dormantes, la germination entraîne une multiplication des agents pathogènes. Certains microorganismes ne seront pas capables de contaminer la plante en germination. Ils resteront alors en contact avec le tégument de la graine et disparaîtront rapidement (Maude, 1996). Les bactéries rhizosphériques se maintiennent préférentiellement au niveau des racines sans se déplacer vers les organes aériens de la plante lorsqu'ils se forment (Hirano et Upper,

Tableau 2 : Composition des communautés bactériennes identifiées dans la phyllosphère du seigle (*Lolium perenne*) et de l'olivier (*Olea europea*) (d'après Hirano et Upper, 2000).

Plantes et membres de communautés bactériennes hébergées	Abondance relative (%)
Seigle	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	20.12
<i>Xanthomonas campestris</i>	19.64
"Coryneform bacteria"	8.37
Yellow chromogens.....	4.83
<i>Flexibacter</i> spp.....	4.66
<i>Listeria</i> spp.	4.02
Pink chromogens.....	3.86
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1.77
Other gram-negative rods	1.61
<i>Klebsiella</i> spp.....	0.96
<i>Acinetobacter</i> spp.	0.96
<i>Erwinia herbicola</i>	0.80
<i>Pseudomonas</i> spp.....	0.64
<i>Staphylococcus</i> spp.	0.64
<i>Bacillus</i> spp.	0.32
<i>Micrococcus luteus</i>	0.32
Orange chromogens.....	0.32
Unidentified isolates	26.57
Olivier	
<i>Pseudomonas syringae</i>	51.0
<i>Xanthomonas campestris</i>	6.7
<i>Erwinia herbicola</i>	6.0
<i>Acetobacter acetii</i>	4.7
<i>Gluconobacter oxydans</i>	4.3
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3.9
<i>Bacillus megaterium</i>	3.8
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	3.1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.8
<i>Curtobacterium plantarum</i>	2.2
<i>Micrococcus luteus</i>	2.2
<i>Arthrobacter globiformis</i>	1.4
<i>Klebsiella planticola</i>	1.2
<i>Streptococcus faecium</i>	1.2
<i>Clavibacter</i> sp.	0.98
<i>Micrococcus</i> sp.....	0.82
<i>Serratia marcescens</i>	0.81
<i>Bacillus subtilis</i>	0.57
<i>Cellulomonas flavigena</i>	0.4
<i>Erwinia</i> sp.....	0.37
<i>Zymomonas mobilis</i>	0.3
<i>Bacillus</i> sp.....	0.29
<i>Alcaligenes faecalis</i>	0.27
<i>Erwinia carotovora</i>	0.08
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.04

2000). Les *P. syringae* sont capables de se développer rapidement sur la plantule et coloniser ensuite les feuilles en formation (Hirano *et al.*, 1997). De tels agents pathogènes transmis par les semences peuvent se développer en association avec la plante, aussi bien au niveau du sol qu'au niveau des parties aériennes. Chez le haricot, le taux de transmission de *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* des graines aux plantules est inférieur pour des graines présentant des symptômes (très contaminées) par rapport à des graines contaminées mais sans symptôme (Taylor *et al.*, 1979). En effet, une charge bactérienne très importante entraîne l'avortement des plantules. Cependant une charge minimale est également nécessaire à la colonisation des plantules. Il a été montré qu'au moins 10^2 UFC de *X. fuscans* subsp. *fuscans* par semence sont nécessaires pour que cette bactérie colonise les plantules de haricot (Darrasse *et al.*, 2007).

Lors de la germination de la semence contaminée, les bactéries colonisent l'hypocotyle de manière superficielle et pénètrent éventuellement dans le système vasculaire ou les parenchymes à partir des cotylédons (Maude, 1996). Ces voies sont générales aux pathogènes bactériens aériens qu'ils soient nécrotrophes ou vasculaires.

2. Colonisation de la phyllosphère

2.1 Ecologie de la phyllosphère et pressions de sélection exercées sur les bactéries épiphytes

Les bactéries sont naturellement très abondantes (10^6 - 10^7 cellules/cm²) dans la phyllosphère. Certaines communautés bactériennes de la phyllosphère comprennent plus de 80 espèces bactériennes, pathogènes ou non (tableau 2) (Jacques et Morris, 1995; Beattie et Lindow, 1999). On désigne sous le terme phyllosphère la feuille mais aussi l'ensemble de l'environnement qui lui est soumis (Beattie et Lindow, 1995). Le terme « épiphytes » (ou phyllobactéries) désigne les bactéries capables de survivre et de se multiplier dans la phyllosphère et plus particulièrement sur la surface foliaire ou phylloplan (Hirano et Upper, 2000). Cependant, l'altération importante, rapide et répétée des conditions environnementales à la surface de la feuille en fait un habitat particulièrement hostile et sélectif pour les populations bactériennes (Hirano et Upper, 2000; Yang *et al.*, 2001).

2.1.1 Topographie de la surface foliaire

Les caractéristiques topographiques de la surface foliaire en font un environnement très irrégulier à l'échelle d'une bactérie. Le contact feuille/bactérie se fait par l'intermédiaire de la cuticule (composée de cutine et de cires) limitant la diffusion des

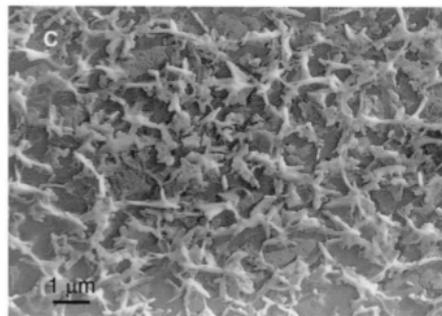
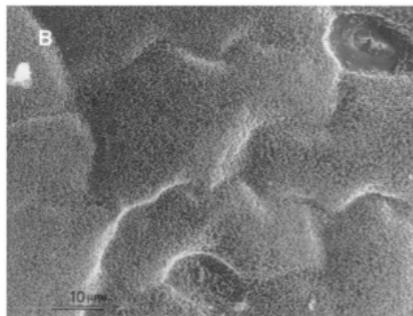
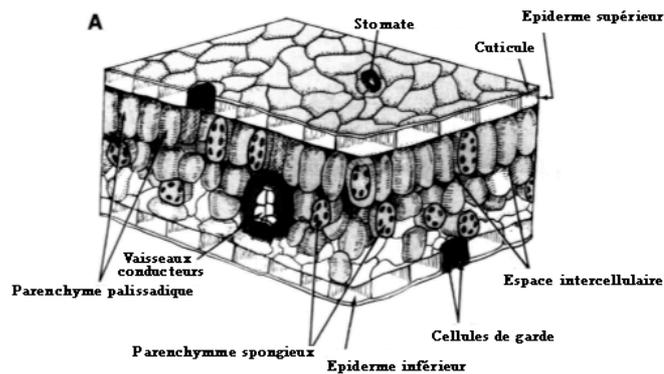


Figure 5 : Anatomie d'une feuille et observations microscopiques des surfaces foliaires de pois et de maïs (d'après Hirano et Upper, 2000). Représentation schématique d'une feuille, les bactéries colonisent l'épiderme puis les espaces inter-cellulaires (A). Photographie de la topographie de la surface foliaire de *Pisum sativum* observée au microscope électronique à balayage (B). Photographie de la topographie de la surface foliaire de *Zea mays* observée au microscope électronique à balayage (C).

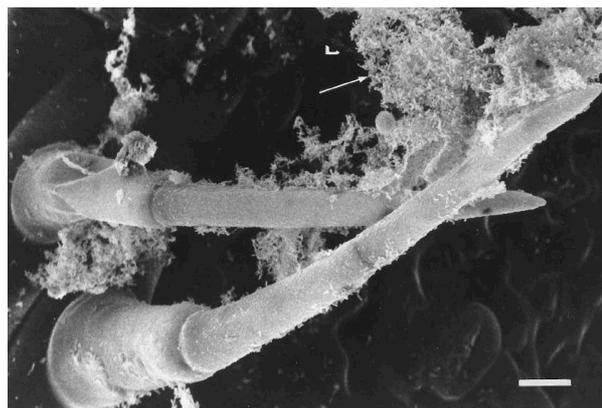


Figure 6 : Photographie de trichomes à la surface foliaire de tomate observée au microscope électronique à balayage (d'après Ojanen-Reuhs *et al.*, 1997). Colonisation d'une feuille de tomate par *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. La flèche indique la localisation préférentielle des massifs bactériens au niveau des trichomes.

nutriments et de l'eau vers la surface foliaire. La cuticule présente de nombreuses dépressions tout au long du limbe (figure 5). Sa structure, sa composition et sa densité variant énormément (selon l'âge de la feuille entre autre), elles agissent sur l'établissement et le maintien des populations bactériennes sur le phylloplan (Lindow et Brandl, 2003). La topographie est de plus marquée par la présence de trichomes, stomates ou glandes formant des microniches (figure 6) (Hirano et Upper, 2000; Jacques *et al.*, 2005).

Les bactéries ne peuvent pas pénétrer directement dans les espaces intercellulaires et les tissus internes de la plante, elles doivent passer à travers les blessures ou les ouvertures naturelles de la plante. L'entrée au sein de l'hôte est un point critique pour la réussite d'une infection (Underwood *et al.*, 2007). Les stomates sont des pores microscopiques situés au niveau de l'épiderme des parties aériennes des plantes terrestres. Ils sont très nombreux et représentent la voie principale d'entrée des bactéries phytopathogènes. D'autres ouvertures naturelles peuvent jouer un rôle comme les hydathodes au niveau des marges des feuilles, les nectaires au niveau des fleurs, les lenticelles au niveau des tiges et des fruits (Huang, 1986). La contamination des plantes à travers ces ouvertures naturelles a souvent été associée à un mécanisme passif, mais des études récentes tendent à démontrer que l'entrée des bactéries dans les tissus de la plante est un processus complexe et dynamique (Melotto *et al.*, 2006).

2.1.2 Facteurs physiques et environnementaux

Les bactéries phytopathogènes présentes à la surface des feuilles sont exposées à des conditions extrêmes comme la dessiccation, les hautes températures et les rayonnements ultraviolets (UV) du soleil (Lindow et Brandl, 2003). Concernant les rayonnements solaires, ce sont surtout les courtes longueurs d'ondes, les UVB (290-300 nm), qui provoquent le plus de dommages au niveau de l'ADN et d'autres constituants de la cellule bactérienne (Sundin et Jacobs, 1999; Jacobs et Sundin, 2001; Jacobs *et al.*, 2005; Gunasekera et Paul, 2007). Certaines bactéries peuvent échapper à l'exposition directe de ces rayonnements UV, mais beaucoup d'autres y sont exposées partiellement ou en totalité au cours de leur cycle de vie. Les bactéries épiphytes font partie de celles-ci et nécessitent une adaptation intense à ces contraintes afin de survivre dans cet environnement hostile (Hirano et Upper, 2000). Ces adaptations peuvent être des stratégies d'évitement ou de tolérance développées par les bactéries en réponse aux stress. Ces stratégies vont être développées plus loin dans ce chapitre.

D'autres facteurs physiques et environnementaux comme l'humidité relative subissent des variations importantes au cours du temps (à l'échelle de la minute) (figure 7) (Hirano et Upper, 2000; Montesinos *et al.*, 2002; Lindow et Brandl, 2003). La couche

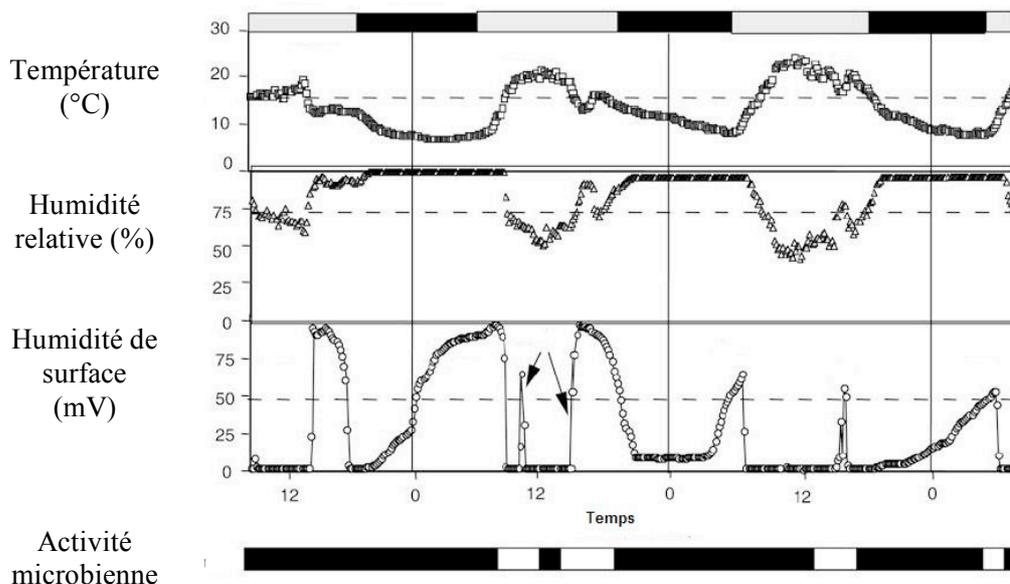


Figure 7 : Dynamiques de la température (C°), de l'humidité relative (%) et de l'humidité de surface (mV) au niveau de la surface foliaire du Poirier au cours de la journée (d'après Montesinos *et al.*, 2002). L'activité microbienne est fonction d'une température supérieure à 15°C et d'une humidité de surface supérieure à 50 mV, et est représentée par une bande horizontale blanche située en bas de la figure.

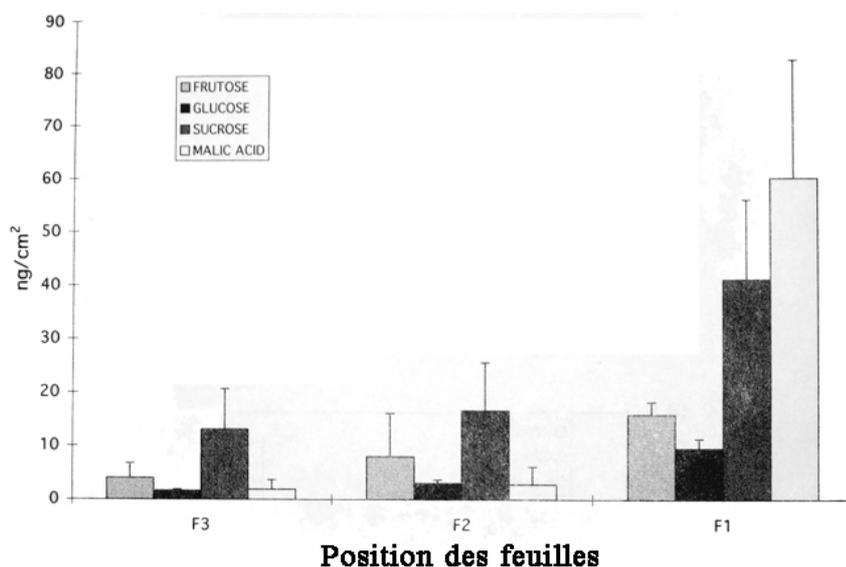


Figure 8 : Quantité de sucres et d'acide malique (ng/cm²) collectée à la surface inférieure des feuilles de *Nicotiana plumbaginifolia* en fonction de l'âge et de la position des feuilles (d'après Derridj, 1996). Les feuilles sont divisées en trois groupes de trois feuilles (F1, F2, F3), F1 étant les feuilles les plus âgées.

laminaire entourant les feuilles est caractérisée par une humidité relative largement supérieure à celle de l'atmosphère, cette couche piégeant l'humidité émise par les stomates et diminuant le stress hydrique auquel les bactéries sont exposées (Beattie et Lindow, 1999; Lindow et Brandl, 2003). Elle peut cependant être altérée par les vents, exposant les bactéries épiphytes à l'humidité relative extrême de l'atmosphère. La quantité d'eau libre présente alors d'importantes variations sur de courtes périodes. Les bactéries épiphytes doivent donc être capables de gérer ces phases de stress hydrique et osmotique (Hirano et Upper, 2000).

2.1.3 Disponibilité en nutriments

La disponibilité en nutriments carbonés (en particulier les sucres simples : fructose, sucrose et glucose) est un déterminant majeur de la survie bactérienne. Bien que secondaires, les composés azotés sont de même extrêmement rares et donc limitants pour la croissance des populations (Brandl et Mandrell, 2002; Lindow et Brandl, 2003). Les bactéries ont souvent une capacité limitée à utiliser une large gamme de nutriments (Brandl et Mandrell, 2002). La composition et la quantité de nutriments (carbohydrates, acides organiques et aminés) varient selon l'espèce végétale, l'âge et le statut physiologique de la feuille ainsi que par la présence ou non de dommages au niveau des tissus de la plante (Derridj, 1996; Yang *et al.*, 2001). La surface inférieure des feuilles les plus âgées de *Nicotiana plumbaginifolia* présentent plus de nutriments que les feuilles les plus jeunes (figure 8) (Derridj, 1996).

2.2 Colonisation de la phyllosphère

La feuille est un environnement hostile, sujet à de nombreux stress, qui ne présente pas beaucoup de ressources pour les bactéries qui les colonisent. Néanmoins, la surface foliaire peut supporter le développement de nombreuses populations bactériennes adaptées à cet environnement. Des bactéries à Gram négatif appartenant aux genres *Xanthomonas* et *Pseudomonas* sont communément décrites comme membres de la phyllosphère (tableau 2) (Yang *et al.*, 2001; Krimm *et al.*, 2005), alors que les bactéries du genre *Rhizobium* ou *Azospirillum* qui sont d'excellents colonisateurs des racines sont absents de la surface foliaire (Jurkevitch et Shapira, 2000). Deux stratégies sont déployées par les bactéries pour survivre et se multiplier dans la phyllosphère : des stratégies de tolérance (capacité à tolérer l'exposition directe aux rayonnements UV, à la dessiccation,...) et/ou d'évitement (capacité à coloniser et exploiter des sites protégés de ces stress). Ces stratégies passent par la mise en place de traits spécifiques chez les bactéries épiphytes (Beattie et Lindow, 1999). L'installation puis la multiplication pour

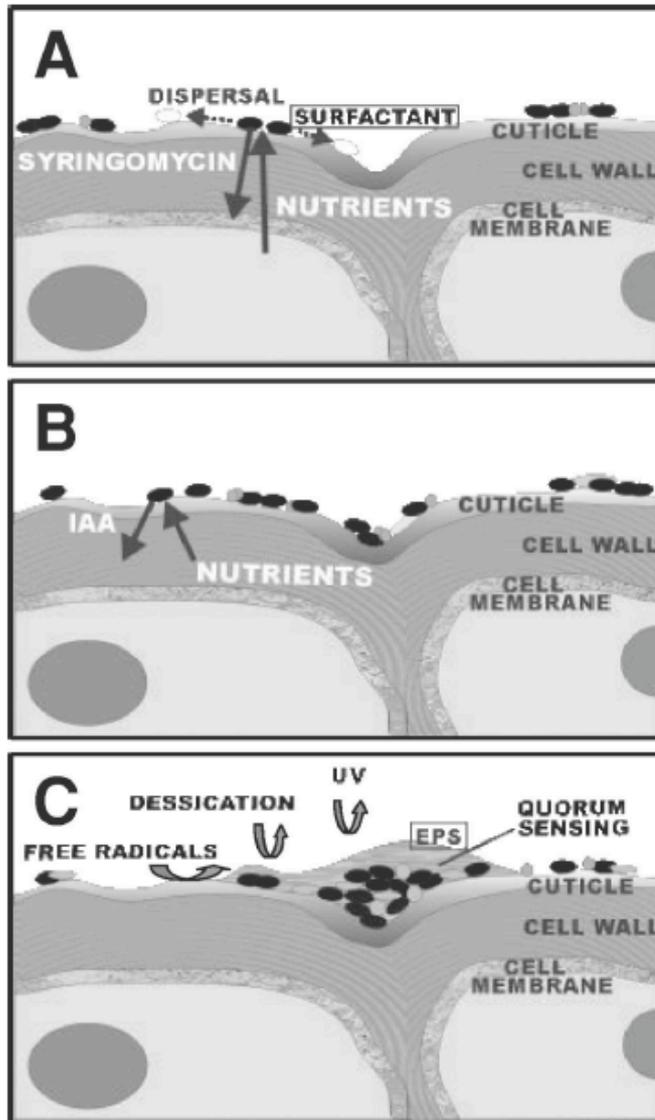


Figure 9 : Représentation schématique de différentes hypothèses de la modification des habitats bactériens dans la phyllosphère (d'après Lindow et Brandl, 2003). (A) Relargage de nutriments de la plante et dissémination des bactéries suite à la production de syringomycine qui peut agir comme une phytotoxine et un surfactant ; (B) Relargage de saccharides provenant de la paroi des cellules végétales suite à la sécrétion d'auxine par les bactéries ; (C) Protection face aux stress environnementaux suite à la production d'EPS et la formation d'agrégats bactériens.

atteindre un seuil de populations épiphytes est un préalable à l'apparition de la maladie (Lindow, 1983; Rouse *et al.*, 1985).

2.2.1 Stratégies d'évitement

Il a été fréquemment observé que les bactéries épiphytes ne colonisent pas uniformément la surface foliaire mais forment de petits groupes (ou microcolonies) pouvant être assimilés à des biofilms sur une surface très limitée du limbe (Leben, 1988; Andrews et Harris, 2001; Monier et Lindow, 2004). Les cellules bactériennes se multiplient et survivent dans des sites spécifiques où les stress environnementaux peuvent être évités et en particulier à la face inférieure de la feuille, à la base des trichomes, au niveau des stomates, au niveau des dépressions cuticulaires, ou à proximité des hydathodes (Beattie et Lindow, 1999; Lindow et Brandl, 2003; Underwood *et al.*, 2007). Les ressources limitant la croissance bactérienne étant inégalement réparties à la surface des feuilles, la répartition de ces microcolonies correspond à celle des nutriments. Le relargage de nutriments ainsi que la présence d'eau sont par exemple plus importants à la base des trichomes (Beattie et Lindow, 1999; Brandl et Mandrell, 2002; Krimm *et al.*, 2005).

2.2.2 Stratégies de tolérance

L'agrégation en structures de type biofilms permet aux bactéries de tamponner leur environnement et *in fine* de mieux résister aux stress (Morris *et al.*, 1997; Jacques *et al.*, 2005). Ces structures sont caractérisées par un revêtement d'exopolysaccharides (EPS) produits par les bactéries et formant une matrice complexe (figure 9). Cette matrice permet l'ancrage des cellules bactériennes à la surface foliaire mais offre surtout une protection contre la dessiccation, les rayonnements UV, les molécules antibiotiques (enzymes lytiques, formes actives d'oxygène) et de nombreux autres facteurs. La sécrétion de ces EPS est une des composantes essentielles de la formation de biofilms par les bactéries épiphytes (Lindow et Brandl, 2003; Jacques *et al.*, 2005). Les bactéries du genre *Xanthomonas* produisent un EPS spécifique, le xanthane, dont la production est strictement nécessaire à la survie épiphyte chez *X. citri* subsp. *citri* (Dunger et Relling, 2007).

La production de certaines molécules pouvant augmenter la perméabilité de la cuticule jusqu'à 50% et améliorer la disponibilité en nutriments a été observée chez de nombreuses espèces (Krimm *et al.*, 2005) :

- les surfactants (comme la tolaasine chez les bactéries du genre *Pseudomonas*) permettent la formation d'un film aqueux ainsi que la solubilisation et la diffusion

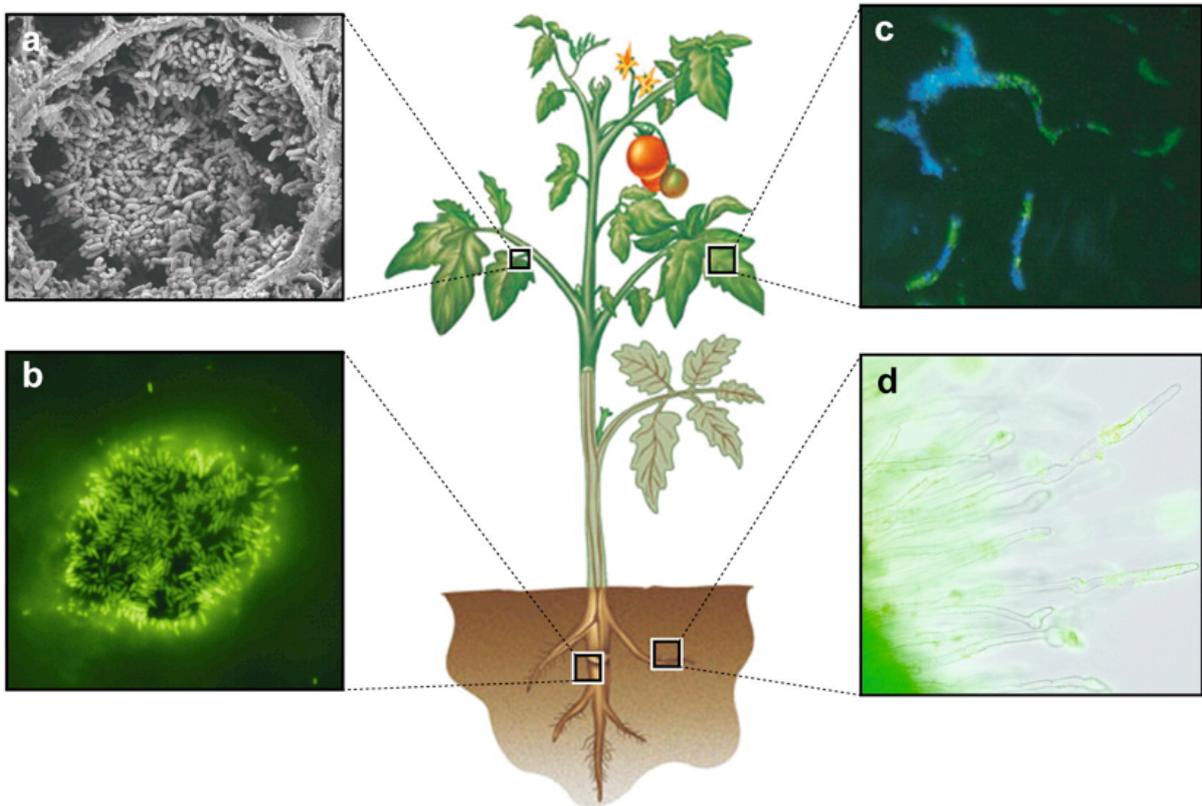


Figure 10 : Biofilms microbiens à la surface (épiphyte) et à l'intérieur (endophyte) d'une plante (d'après Danhorn et Fuqua, 2007). (a) Photographie de biofilms de *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* observés au microscope électronique à transmission dans les vaisseaux du xylème de maïs ; (b) Photographie de microcolonies d'*Agrobacterium tumefaciens* observées au microscope à fluorescence ; (c) Photographie d'une feuille de haricot observée au microscope à fluorescence présentant des agrégats multi-espèces avec *Pseudomonas syringae* et *Pantoea agglomerans* exprimant la GFP et CFP ; (d) Photographie de *Sinorhizobium meliloti* exprimant la GFP observée au microscope optique et à fluorescence.

des nutriments et l'amélioration des déplacements des bactéries vers des sites plus riches en nutriments (Hirano et Upper, 2000; Lindow et Brandl, 2003),

- les toxines (comme la syringomycine chez *Pseudomonas syringae*) augmentent le transfert d'ions aux travers des membranes plasmiques des cellules de l'hôte par la formation de pores (figure 9) (Lindow et Brandl, 2003),
- la biosynthèse d'hormones de croissance végétales comme l'acide 3-indole acétique chez *Erwinia herbicola*, permet la destruction des parois cellulaires à de très faibles concentrations et stimule le relargage des mono- et oligosaccharides des parois cellulaires de l'hôte (figure 9) (Lindow et Brandl, 2003),
- la production de sidérophores permettant de chélater l'ion Fe^{3+} , nécessaire à la croissance bactérienne mais très peu biodisponible. Les sidérophores sont des composants de faible poids moléculaire excrétés par les bactéries et qui ont une grande affinité pour le Fe^{3+} . Après couplage, un système spécifique d'absorption des complexes Fer-sidérophores permet l'acquisition du fer (Lindow et Brandl, 2003).

Ces adaptations concernent aussi l'acquisition de processus physiologiques spécifiques comme la synthèse de pigments (Sundin et Jacobs, 1999; Hirano et Upper, 2000; Gunasekera et Paul, 2007). La majorité des bactéries isolées dans la phyllosphère sont pigmentées (40%) contrairement à celles du sol chez qui la pigmentation est très rare. Les bactéries peuvent protéger leurs fonctions vitales en filtrant ces rayonnements UV à l'aide de pigments comme la mélanine, les caroténoïdes (Sundin et Jacobs, 1999; Jacobs *et al.*, 2005) ou la xanthomonadine chez les bactéries du genre *Xanthomonas* (Poplawsky *et al.*, 2000).

3. Rôle des biofilms lors de la colonisation de l'hôte

Dans la plupart des environnements, l'association avec une surface dans une structure de type biofilm est le principal mode de vie microbien (figure 10) (Danhorn et Fuqua, 2007). Environ 70% des bactéries présentes sur les feuilles sont organisées en biofilms, ce qui sous-entend une implication majeure de ce phénomène dans la survie dans la phyllosphère. La phase planctonique apparaît alors comme un simple moyen de translocation d'une surface à une autre (Monier et Lindow, 2003; Monier et Lindow, 2004; Jacques *et al.*, 2005; Pizarro-Cerda et Cossart, 2006; Danhorn et Fuqua, 2007).

3.1 Définition et caractéristiques générales

Les biofilms bactériens peuvent être comparés à des sociétés microbiennes ayant leurs propres systèmes de défense et de communication. Ils sont définis comme des

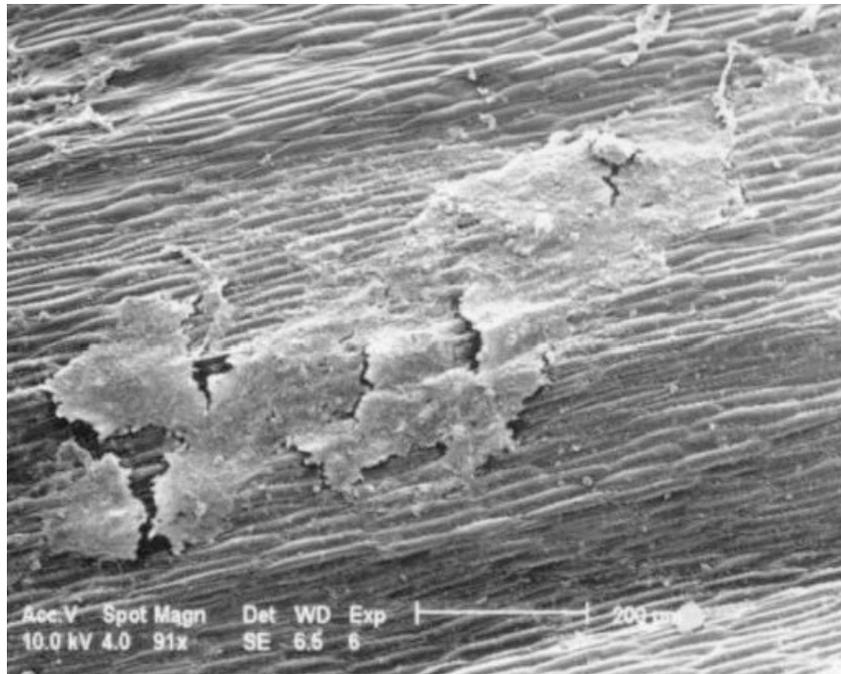


Figure 11 : Photographie d'un biofilm bactérien observé sur feuille d'endive au microscope électronique à balayage (d'après Morris *et al.*, 1997).

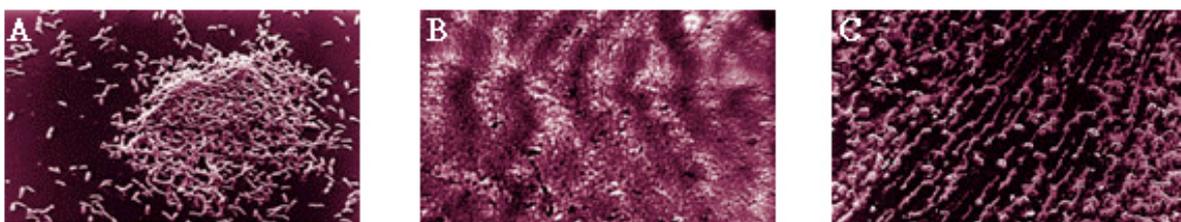


Figure 12 : Observation de la structure des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* soumis à des vitesses de flux d'intensités différentes (d'après Hall-Stoodley *et al.*, 2004). (A) Biofilm avec une structure 3D de type « champignon » soumis à un flux de $0,03 \text{ m s}^{-1}$, (B et C) structure ondulée, discontinue soumis à un flux de 1 m s^{-1} .

agrégats structurés de cellules bactériennes entourés d'une matrice d'exopolysaccharides (EPS) abondante produite par les bactéries elles-mêmes, les bactéries étant adhérentes les unes aux autres ou avec une surface biotique ou inerte (Costerton *et al.*, 1999; Dow *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2004).

Les biofilms associés aux plantes sont le plus souvent des communautés multi-espèces. Ils se composent de nombreux morphotypes rassemblant bactéries, champignons filamenteux, levures et particules inertes (Morris *et al.*, 1997). Dans ces biofilms, les bactéries sont réparties selon leurs préférences pour un microenvironnement particulier et selon les relations symbiotiques établies entre espèces (Harrison *et al.*, 2005; Watnick and Kolter 2000). Ils ont une épaisseur de plusieurs dizaines de μm (25 μm sur feuille d'endive) et une longueur pouvant atteindre 1 mm (30 à 445 μm sur feuille d'endive) (figure 11) (Morris *et al.*, 1997). Comme les biofilms observés en milieux aquatiques, les agrégats observés dans la phyllosphère sont caractérisés par une importante densité de cellules (10^4 à 10^5 cellules. g^{-1} chez *P. syringae*) (Morris *et al.*, 1997; Monier et Lindow, 2003).

Les biofilms présentent enfin une structure complexe au niveau architectural (Costerton *et al.*, 1999; Watnick et Kolter, 2000; Walker *et al.*, 2004). Cette structure est affectée par : les propriétés de la surface, la disponibilité en nutriments, la composition en espèces microbiennes et les conditions hydrodynamiques (figure 12) (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). La matrice d'EPS qui compose les biofilms peut présenter une densité variable ce qui entraîne la création de canaux interstitiels qui font partie intégrante de la structure du biofilm. La grande variabilité de la localisation spatiale des agrégats résulte de facteurs environnementaux et biologiques tels que la présence ou l'absence de microsites favorables à la croissance bactérienne. Elle reflète plus particulièrement l'hétérogénéité de la disponibilité en eau et en nutriments. *Pseudomonas syringae* forme par exemple préférentiellement des agrégats à la base des trichomes glandulaires offrant des conditions optimales pour la croissance microbienne en raison de leur capacité à retenir l'eau et à sécréter divers composés (sucres, protéines, métabolites secondaires, mucilages) (Monier et Lindow, 2003).

3.2 Rôle de protection contre les stress environnementaux

Les biofilms microbiens constituent un mode de croissance protégé permettant la survie dans un environnement hostile tel que la phyllosphère (Morris *et al.*, 1997; Jacques *et al.*, 2005). Les bactéries planctoniques sont exposées à des agents létaux dans l'environnement : biocides et molécules antimicrobiennes produits par les compétiteurs bactériens et fongiques et les systèmes de défenses de l'hôte (Monier et Lindow, 2003; Monier et Lindow, 2004). La formation d'un biofilm confère aux bactéries une résistance

accrue aux molécules antimicrobiennes (Costerton *et al.*, 1999; Watnick et Kolter, 2000; Walker *et al.*, 2004).

Le premier mécanisme de cette résistance aux antibiotiques vient de l'incapacité des agents à pénétrer en profondeur dans le biofilm. La matrice d'EPS est chargée négativement, elle réduit l'entrée de substances chargées positivement comme les ions métalliques et certains antibiotiques (Sutherland, 2001). Les substances polymériques qui forment la matrice du biofilm diminuent en plus la vitesse et la capacité de diffusion des solutés en général (Costerton *et al.*, 1999; Watnick et Kolter, 2000). La seconde hypothèse a pour origine l'hétérogénéité spatiale des états physiologiques des bactéries dans le biofilm. Les bactéries des couches externes ont un accès plus important aux nutriments et à l'oxygène que celles localisées au centre du biofilm, cette localisation externe leur confère ainsi des capacités de croissance plus rapide. De nombreux antibiotiques affectent seulement les cellules qui ont une croissance importante alors que les bactéries du centre du biofilm qui ont une croissance plus lente sont protégées (Costerton *et al.*, 1999; Watnick et Kolter, 2000; Harrison *et al.*, 2005).

La formation de biofilm offre de plus une protection contre les prédateurs et les stress environnementaux caractéristiques de la phyllosphère (rayonnements UV, dessiccation) (Harrison *et al.*, 2005). Les populations épiphytes organisées en biofilms de l'espèce *X. fuscans* subsp. *fuscans* ne subissent pas de dommages lors d'une exposition à la dessiccation ou à des variations de températures contrairement aux populations planctoniques (Jacques *et al.*, 2005). C'est également le cas pour *P. syringae* pv. *syringae* (Monier et Lindow, 2003). La tolérance aux stress environnementaux serait due d'une part à la présence de la matrice protectrice d'EPS et d'autre part au fait que les agrégats soient formés sur des sites où les nutriments carbonés sont abondants, ce qui permet d'augmenter les taux d'activité métabolique, les cellules plus actives étant plus tolérantes aux stress (Watnick et Kolter, 2000; Monier et Lindow, 2003).

3.3 Disponibilité en nutriments et coopération métabolique

La matrice d'EPS, chargée électrostatiquement, sert de piège aux particules de nutriments et minéraux, augmentant la disponibilité de ces substances nécessaires à la croissance bactérienne (Harrison *et al.*, 2005). De plus, les canaux traversant le biofilm, équivalents à un système circulatoire, augmentent la disponibilité en nutriments et en oxygène et sont le siège d'un courant d'eau. De plus, ils contribuent à diminuer les concentrations en métabolites toxiques (Davey et O'Toole G, 2000). Le fait que les biofilms soient le plus souvent multi-espèces favorise les interactions synergiques entre les individus et mène à l'établissement de relations de syntrophisme entre espèces (relation

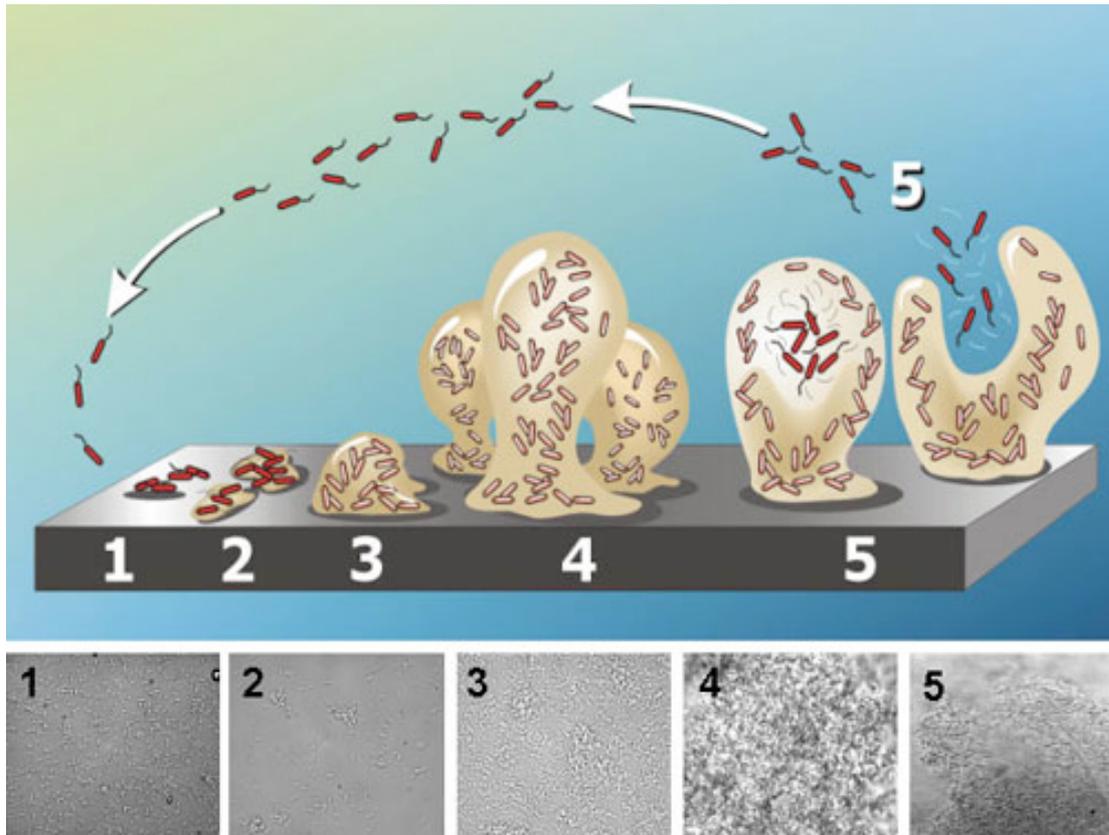


Figure 13 : Représentation des cinq étapes de développement d'un biofilm (d'après Stoodley *et al.*, 2002). Etape 1 : Attachement initial des cellules aux surfaces ; Etape 2 : Production d'EPS favorisant l'attachement irréversible des bactéries ; Etape 3 : développement précoce du biofilm ; Etape 4 : Maturation du biofilm ; Etape 5 : Dispersion de cellules isolés du biofilm mature. Les photographies représentent chaque étape du développement d'un biofilm sur une lame de verre observées au microscope électronique à transmission chez *Pseudomonas aeruginosa*.

établie entre deux types bactériens métaboliquement différents dépendant l'un de l'autre pour l'utilisation de certaines substances). En effet, la proximité physique des cellules bactériennes favorise le partage des produits du métabolisme et donc la survie des populations (Davey et O'Toole, 2000; Harrison *et al.*, 2005).

3.4 Principe de la formation de biofilms

La formation d'un biofilm mono ou multi-espèces est un processus très régulé et complexe nécessitant un comportement collectif de coordination, d'interaction et de communication (Keller et Surette, 2006; Latasa *et al.*, 2006; West *et al.*, 2006; Danhorn et Fuqua, 2007). Les concepts généraux et les bases génétiques de la formation d'un biofilm ont été décrits chez des organismes modèles tels que *P. aeruginosa* (Costerton *et al.*, 1999; Davey et O'Toole G, 2000). Nous allons d'abord nous intéresser aux concepts généraux de la formation d'un biofilm dans cette partie. Les déterminants génétiques seront exposés dans le chapitre suivant.

Tout d'abord, les bactéries se déplacent sur la surface à la recherche d'un site favorable à leur association soit directement avec la surface soit avec d'autres bactéries précédemment installées (Davey et O'Toole, 2000; Mattick, 2002; Kaiser, 2007). Cette phase se poursuit par transition de l'état planctonique vers l'état agrégé. Les facteurs responsables de ce changement varient beaucoup selon les organismes. Chez *P. aeruginosa* il s'agit en particulier de conditions favorables à la croissance telles que la disponibilité en oxygène, en fer, le pH ou la température (Costerton *et al.*, 1999; Davey et O'Toole G, 2000).

Les biofilms se forment alors en cinq étapes (figure 13) (Davey et O'Toole, 2000; Watnick et Kolter, 2000). Lors de la première étape, les bactéries s'attachent à la surface foliaire ou aux cellules bactériennes préalablement fixées (Craig *et al.*, 2004; Pizarro-Cerda et Cossart, 2006). L'adhésion des bactéries entre elles devient ensuite stable lors de la seconde étape et des microcolonies se forment lors d'une troisième étape. Cet environnement facilite les interactions entre les cellules permettant le développement de voies de signalisation ainsi que la mobilité chimiotactique (Stoodley *et al.*, 2002; Keller et Surette, 2006) Enfin, le biofilm mature (étape 4). Les bactéries se multiplient, forment de nouvelles microcolonies et vont produire des exopolysaccharides afin de stabiliser la structure qui devient tridimensionnelle (Watnick et Kolter, 2000). La synthèse des EPS est importante pour assurer l'intégrité structurale du biofilm par différents mécanismes tel que l'interaction avec des composants de la surface cellulaire bactérienne comme les glycoprotéines ou d'autres polysaccharides (Davey et O'Toole, 2000; Dow *et al.*, 2003). La matrice d'EPS associée aux biofilms permet la formation d'une barrière physique qui

protège les bactéries contre différents stress (chimiques, biologiques et environnementaux) (Danhorn et Fuqua, 2007). Ensuite, les bactéries peuvent, après une certaine période, se détacher du biofilm (étape 5). Ce retour à une phase planctonique est nécessaire à la colonisation de l'organisme entier. La dispersion du biofilm permet à certaines bactéries de se multiplier et envahir de nouvelles niches écologiques.

4. Dispersion et dissémination des bactéries

Comme nous l'avons précisé précédemment, les feuilles sont des habitats exceptionnellement ouverts. Elles sont exposées à l'atmosphère ce qui leur laisse des opportunités importantes pour l'immigration et l'émigration des bactéries au niveau de la phyllosphère (Kinkel, 1997).

Localement, l'eau de pluie et l'eau d'irrigation sont les éléments majeurs pour la dissémination des agents pathogènes à la surface des feuilles d'une même plante et entre des plantes voisines au sein d'un champ (Hirano et Upper, 2000). Ainsi, il a été observé au champ que le développement rapide de la nervation noire des Brassicacées était en corrélation avec le nombre de jours de pluie (Kocks *et al.*, 1999). Les bactéries peuvent être transportées par le vent dans les aérosols ou les particules ballistiques produits lorsque les gouttes de pluie heurtent les parties malades des plantes contenant les populations bactériennes (Williams, 1980; Kuan *et al.*, 1986; Butterworth et McCartney, 1991; Morris *et al.*, 2004). Cependant, lors d'épisodes pluvieux importants, cette contribution de la pluie à la dispersion des bactéries reste faible au niveau des tailles des populations bactériennes. En effet, la plupart des bactéries sont alors lessivées des feuilles vers le sol (Lindemann *et al.*, 1982; Hirano *et al.*, 1994).

Les rafales de vent peuvent également disperser *X. campestris* pv. *campestris* en favorisant les contacts entre les feuilles contaminées, à l'instar des épidémies causées par d'autres *Xanthomonas* épiphytes pathogènes du bananier, du manguier ou de l'oignon, émergeant consécutivement à des cyclones (Roumagnac *et al.*, 2004).

Les bactéries peuvent être transportées dans l'atmosphère jusque dans les nuages et parfois jusqu'à plusieurs kilomètres d'altitude (Lighthart, 1997; Hamilton et Lenton, 1998; Morris *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 2007). Les nuages captent les bactéries et les disséminent lors d'épisodes pluvieux. Ils peuvent ainsi disséminer des agents pathogènes sur de longues distances comme cela a été montré pour *Pseudomonas syringae* (Lindemann *et al.*, 1982).

Des insectes ou d'autres organismes peuvent aussi être des vecteurs de maladie comme cela a été démontré pour la bactérie phytopathogène *Xylella fastidiosa* (Garcia *et al.*, 1997) mais aussi pour de nombreuses autres bactéries (Lighthart *et al.*, 2000; Sela *et*

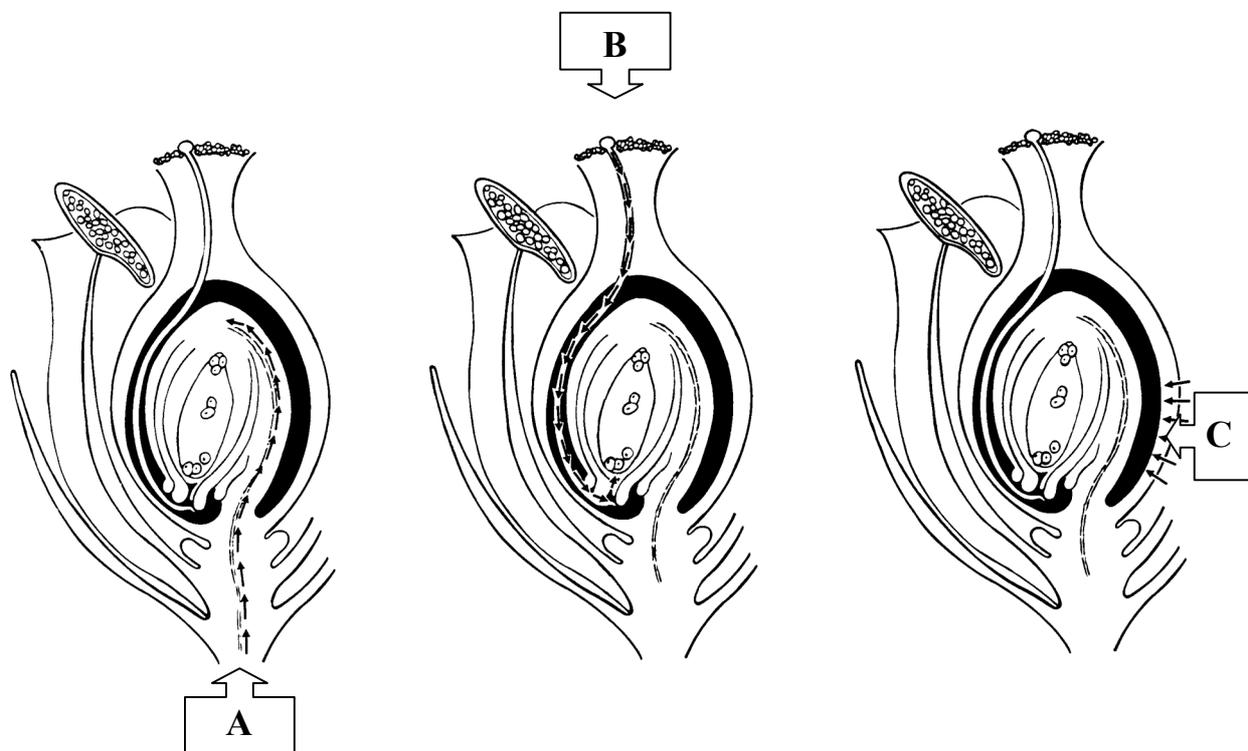


Figure 14 : Les différentes voies de transmission des agents pathogènes à la semence (d'après Maude, 1996). Cas général des différentes voies de transmission des agents pathogènes aux semences. A : transmission via le xylème de la plante mère. B : transmission via le stigmate jusqu'à l'embryon. C : transmission par pénétration des tissus externes de l'ovule.

al., 2005; Sproston *et al.*, 2005). *X. fuscans* subsp. *fuscans* peut être transmis au haricot par trois espèces de coléoptères (*Cerotoma ruficornis* Oliv., *Diaprepes abbreviatus* L. et *Chalcodeinus ececinus* Boheman) ainsi que deux espèces d'hémiptères (*Nezara viridula* L. et *Empoasca* sp.) (Kaiser et Vakili, 1978).

L'utilisation de semences contaminées dans le cas des bactéries transmises par les semences peut permettre une dissémination de ces bactéries sur de très grandes distances. Ces bactéries sont pathogènes des cultures sur lesquelles elles se développent mais n'occasionnent pas forcément de symptômes sur les graines (Gambodji, 1983; Gitaitis et Walcott, 2007). Ainsi *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, originaire d'Amérique, a pu se répandre sur tous les continents par le biais des semences de haricot contaminées (Bradbury, 1986; Vidaver, 1993). Tout autre matériel végétal contaminé permet également une dissémination des agents pathogènes. Des citronniers contaminés par *X. citri* subsp. *citri* ont été répandus dans des zones de production de citronnier à l'échelle mondiale. *X. citri* subsp. *citri* qui est originaire d'Asie a été retrouvé en Afrique du Sud et aux Etats-Unis (Stall et Seymour, 1983).

5. Transmission des bactéries aux semences et autres modes de survie des bactéries phytopathogènes

5.1 Transmission des bactéries aux semences

La semence représente l'unité de départ mais aussi la finalité de nombreuses cultures. Les infections bactériennes se développant au cours de la croissance de la plante peuvent affecter les fleurs et finalement les semences. Cette localisation est déterminante pour la survie de l'agent pathogène (Maude, 1996). De manière générale, un agent pathogène peut contaminer une semence par une ou plusieurs voies (figure 14) (Maude, 1996).

La première possibilité est une contamination via les tissus conducteurs de la plante mère. Ainsi *X. axonopodis* pv. *phaseoli* peut se transmettre aux semences après infiltration du pédicelle (Aggour *et al.*, 1989).

La deuxième possibilité est une contamination via le stigmate de la fleur. Il s'agit d'une infection indirecte par l'intermédiaire du style de la plante. Ceci a notamment été démontré pour le soja (Kaufman et Leben, 1974) et la pastèque (Walcott *et al.*, 2003). L'inoculation des fleurs de soja par *P. syringae* subsp. *glycinea* a entraîné une forte contamination des semences en l'absence de symptôme sur les fruits (Kaufman et Leben, 1974). Ceci a également été montré pour *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. En effet, 98% des fruits sont asymptomatiques après inoculation des fleurs de pastèque avec 10^7 à 10^9

UFC mL⁻¹ et d'*A. avenae* subsp. *citrulli*, cette bactérie étant alors détectée dans 44% des lots de semences analysés (Walcott *et al.*, 2003).

La troisième voie de contamination des semences s'effectue par contact entre les téguments de la graine et des fruits qui présentent des symptômes ou des pailles contaminées lors des étapes de récolte et stockage (Weller et Saettler, 1980). Cette contamination a donc lieu en présence d'un fort inoculum qui est associé à la présence de symptômes sur les plantes (Weller et Saettler, 1980).

Des fortes densités bactériennes ne sont cependant pas indispensables à la transmission des bactéries aux semences. Des expérimentations ont été effectuées au champ afin d'étudier la transmission de *X. fuscans* subsp. *fuscans* aux semences de haricot à partir de lots de semences contaminés artificiellement. Les semences contaminées avec des inoculums faiblement concentrés (de 10² à 10⁴ UFC par semence) peuvent être à l'origine d'une colonisation de la phyllosphère et permettre la transmission de l'agent pathogène aux graines en l'absence de tout symptôme macroscopique (Darrasse *et al.*, 2007).

5.2 Les moyens de survie des bactéries : futures sources d'inoculum

Pendant des décennies, l'agriculture des Etats-Unis s'est fondée sur la production de graines apparemment saines car produites dans les états où le climat frais et sec devait limiter le développement des maladies bactériennes au sein des cultures (Maude, 1996). Des résurgences continues et inexplicables de maladies ont néanmoins laissé supposer que les graines produites dans ces secteurs pouvaient tout de même être infectées par des bactéries phytopathogènes. Un exemple emblématique est la pourriture noire des crucifères provoquée par *X. campestris* pv. *campestris* (Schaad et Dianese, 1981). Les bactéries sont capables de persister dans l'environnement et de contaminer ultérieurement les nouvelles cultures de la plante hôte. Plusieurs sources d'inoculum peuvent être à l'origine de ces contaminations.

5.2.1 Les semences contaminées

De nombreuses bactéries du genre *Xanthomonas* sont des agents pathogènes associés aux semences de leurs plantes hôtes. *X. campestris* pv. *campestris* a été détecté dans des lots commerciaux de semences datant de plus de trois ans mettant ainsi en évidence l'importance de cette source d'inoculum et de la capacité de survie de cette bactérie (Schaad et Dianese, 1981; Schultz et Gabrielson, 1986). *X. axonopodis* pv. *phaseoli* et *X. fuscans* subsp. *fuscans* ont été isolés de semences de haricot âgées de plus

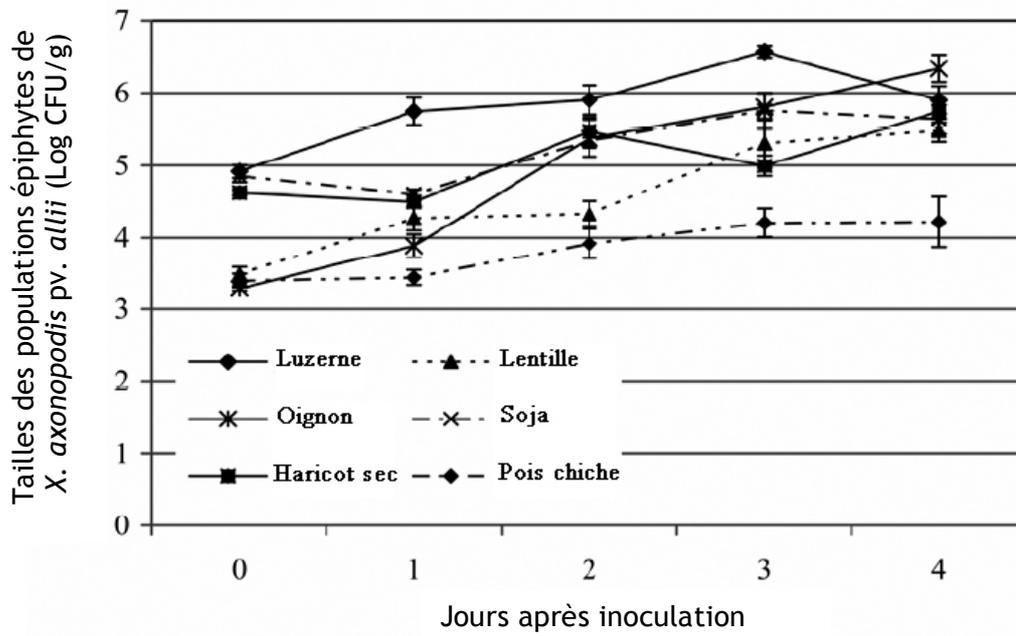


Figure 15 : Dynamiques des populations épiphytes de *X. axonopodis* pv. *allii* souche R-0177 sur des plantes hôtes alternatives (luzerne, soja, haricot sec, lentille, soja, pois chiche) et sur sa plante hôte sensible, l'oignon (d'après Gent *et al.*, 2005).

de 15 ans (Schuster et Coyne, 1974). Les agents pathogènes transmis par les semences sont capables de se multiplier sur la graine dès lors qu'elle germera.

5.2.2 Les résidus de culture

Les résidus de culture sont souvent désignés comme une importante source d'inoculum. Après la récolte, l'agent pathogène se maintient dans des débris végétaux qui permet la conservation de l'inoculum à plus ou moins long terme selon les agents pathogènes et les conditions environnementales. Ainsi *X. axonopodis* pv. *phaseoli* peut se maintenir dans les débris végétaux d'une culture à une autre en climat tropical et subtropical (Arnaud-Santana *et al.*, 1991) mais pas plus de trois mois dans le Michigan (Saettler et Cafati, 1986). En milieu tropical, son maintien dépendrait du temps de décomposition des débris végétaux (Fininsa et Tefera, 2001). Il a été montré que *X. campestris* pv. *campestris* peut survivre dans les résidus de culture pendant plus de 500 jours ; durant cette période, cet inoculum est toujours susceptible de provoquer des épidémies (Schultz et Gabrielson, 1986).

5.2.3 Les hôtes alternatifs

X. campestris pv. *campestris* a été détecté sur des hôtes alternatifs de la famille des Brassicacées (Schaad, 1980). Ces hôtes ne présentent que très rarement des symptômes et sont naturellement infectés même à des distances de plus de 30 km des foyers potentiels représentés par les champs de production de semences de Brassicacées (Schaad et Dianese, 1981). Certains de ces hôtes sont pérennes et représentent une source d'inoculum importante (Gitaitis et Walcott, 2007). *X. axonopodis* pv. *allii* est également capable de se maintenir sur des hôtes alternatifs comme le pois chiche, la luzerne, le haricot, la lentille et le soja à des tailles de populations aussi élevées (environ 10^5 UFC g⁻¹) que la souche sauvage sur son hôte l'oignon (figure 15) (Gent *et al.*, 2005).

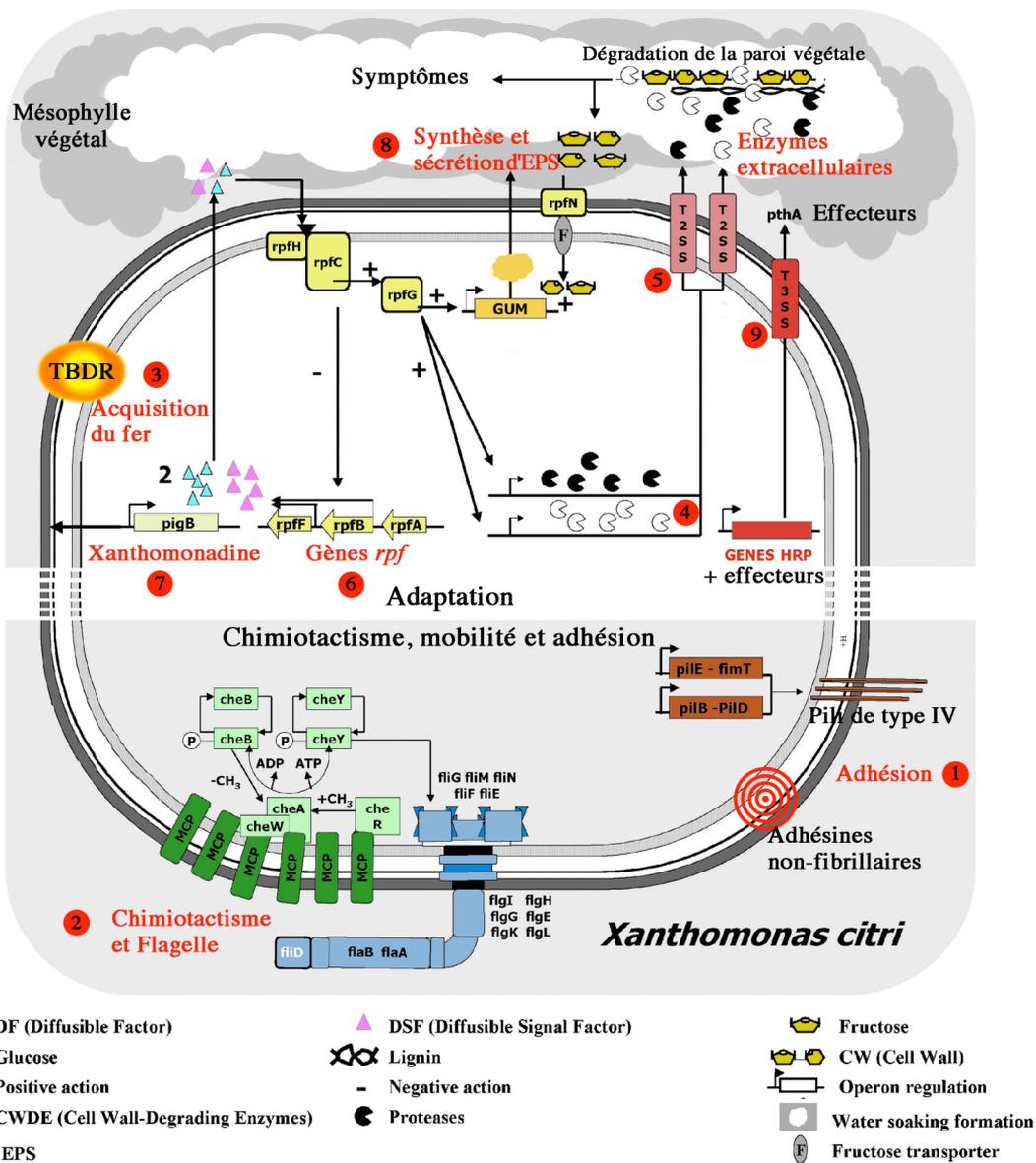


Figure 16 : Schéma récapitulatif des principaux facteurs de virulence chez *X. citri* (d'après Moreira *et al.*, 2004). (1) systèmes d'adhésion ; (2) flagelle et système de chimiotactisme ; (3) système TonB-dépendant d'acquisition du fer ; (4) enzymes de dégradation de la paroi cellulaire végétale et métabolisme associé ; (5) SST2, système de sécrétion de type 2 ; (6) gènes *rpf*, régulateurs des facteurs du pouvoir pathogène ; (7) synthèse de xanthomonadine ; (8) gènes de biosynthèse du xanthane ; (9) SST3, système de sécrétion de type 3.

Chapitre 2

Déterminisme génétique de la colonisation de l'hôte par une bactérie phytopathogène

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que la colonisation d'une plante faisait appel à de nombreuses étapes obligatoires telles que la survie, la multiplication, la dispersion et finalement la transmission des agents pathogènes. Face aux attaques des agents pathogènes au cours de leur cycle de développement, les plantes ont développé une panoplie de mécanismes de défense s'opposant à l'entrée et à la multiplication de ces microorganismes. De leur côté, les bactéries phytopathogènes qui ont établi des relations de longue date avec leurs hôtes ont également mis en place des stratégies dans le but de coloniser la plante hôte. Ces forces évolutives ont permis à l'agent pathogène de développer un ensemble de mécanismes dont nous allons présenter les principaux déterminants moléculaires en nous centrant autant que possible sur les bactéries du genre *Xanthomonas* (figure 16).

1. Chimiotactisme, mobilité et adhésion : mécanismes préliminaires à la colonisation de l'hôte

Après avoir été transmis à un hôte approprié, l'agent pathogène doit être capable de se déplacer et se fixer afin de coloniser les tissus de l'hôte. Dans ce contexte, la colonisation signifie l'établissement d'un site de multiplication en surface ou à l'intérieur de la plante. Il est nécessaire pour la bactérie de se déplacer et d'interagir avec des surfaces variées pour parvenir par chimiotactisme au voisinage de l'hôte végétal (Shen *et al.*, 2001) et atteindre ses sites cibles de pénétration (hydathodes, stomates, blessures).

1.1 Chimiotactisme et système flagellaire

Les chémorécepteurs et les gènes de biosynthèse du flagelle sont organisés en quatre clusters répartis sur 150 kb chez *X. campestris* pv. *campestris* et *X. citri* subsp. *citri* (figure 16) (da Silva *et al.*, 2002). Un de ces clusters possède plusieurs copies quasi-identiques et répétées en tandem du gène *tsr* codant la protéine de chimiotactisme Mcp (*Methyl-accepting chemotaxis protein*). Les protéines Mcp sont impliquées dans la perception et le transfert de signaux chimiotactiques à la bactérie en réponse à la présence de sérine, d'alanine ou de glycine (Moreira *et al.*, 2004). Ces répétitions

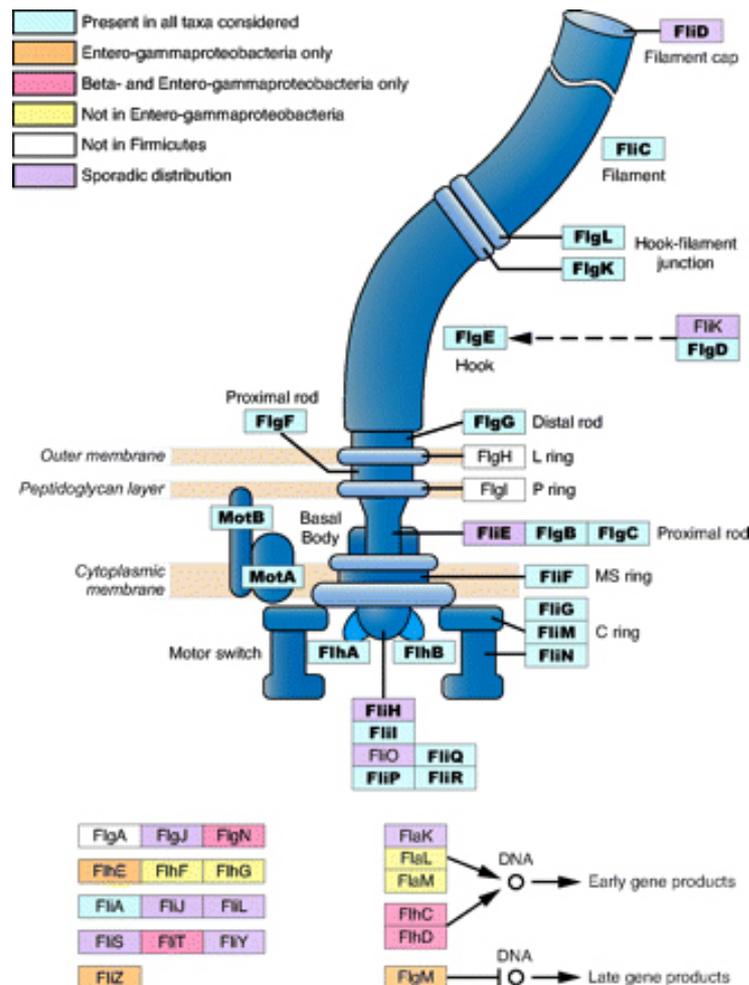


Figure 17 : Organisation du système flagellaire et distribution des protéines flagellaires parmi les espèces bactériennes qui possèdent un système flagellaire (d'après Liu et Ochman, 2007). Les protéines qui constituent le « core » du flagelle sont notées en gras.

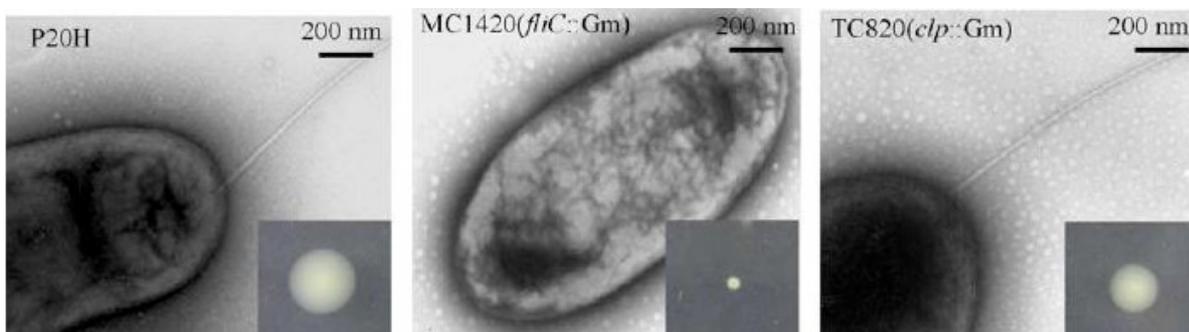


Figure 18 : Observation de flagelles chez *X. campestris* pv. *campestris* (d'après Lee et al., 2003). La souche sauvage P20H comporte un flagelle polaire en microscopie électronique à transmission. Le mutant *fliC*⁻ est dépourvu de flagelle. Le mutant *clp*⁻ porte, comme la souche sauvage, un flagelle polaire.

suggèrent un rôle prépondérant du chimiotactisme chez ces deux *Xanthomonas*, d'autant plus que d'autres copies du gène *mcp* sont dispersées dans leurs génomes (da Silva *et al.*, 2002). *X. campestris* pv. *campestris* a besoin de se déplacer à la surface des feuilles pour gagner les sites d'infection et coloniser le xylème. Cette mobilité nécessaire à l'infection est assurée par le flagelle (Rudolph, 1993). Chez *X. oryzae* pv. *oryzae*, un opéron flagellaire composé de quatre ORFs a été caractérisé et le gène *flhF* est impliqué dans le chimiotactisme (Shen *et al.*, 2001). *X. oryzae* pv. *oryzae* est attiré par chimiotactisme vers les gouttes de guttation afin d'accéder aux sites d'infection pour la bactérie, avant sa pénétration dans les tissus de la plante-hôte (Shen et Ronald, 2002). Les protéines Che constituent une chaîne bien connue de transduction du signal chimiotactique jusqu'au flagelle par le contrôleur de rotation du flagelle (pour revue Aizawa *et al.*, 2000; pour revue Bren et Eisenbach, 2000; Kaiser, 2007).

Les flagelles se présentent sous la forme d'un long filament hélicoïdal ancré au niveau de la membrane cellulaire par un crochet flexible et un corps basal (figure 17) (Liu et Ochman, 2007). Le filament flagellaire est un tube composé d'environ 20 000 copies d'une unique protéine, la flagelline, polymérisée en une hélice complexe (Tans-Kerten *et al.*, 2001; Tans-Kersten *et al.*, 2004). La biosynthèse des flagelles chez les bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* implique plus de 40 gènes liés dans une cascade de régulation complexe. Les mutations au niveau de ces différents gènes se traduisent la plupart du temps par une absence de flagelle et donc de mobilité (Jyot *et al.*, 2002). Le gène majeur de la voie de biosynthèse des flagelles est le gène *fliC*, identifié chez diverses espèces bactériennes (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Ralstonia solanacearum*) (Tans-Kerten *et al.*, 2001; Capdevila *et al.*, 2004). Les mutants *fliC* de *Erwinia amylovora*, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* et *P. fluorescens* ne synthétisent pas de flagelline et sont donc dépourvus de flagelle. Ces mutants non-mobiles présentent une survie épiphyte réduite et une capacité réduite à causer une infection (Tans-Kerten *et al.*, 2001; Capdevila *et al.*, 2004). Le gène *fliC* a pu être identifié chez différentes espèces du genre *Xanthomonas* comme *X. campestris* pv. *campestris* et *X. citri* subsp. *citri* au sein d'un cluster de 17 gènes impliqués dans la synthèse de flagelles (Lee *et al.*, 2003).

Chez *X. campestris* pv. *campestris*, la production du flagelle est régulée positivement par le facteur de transcription Clp (cyclic AMP-receptor protein-like protein) (Lee *et al.*, 2003). Clp est un homologue de Crp (Cyclic AMP receptor protein) et régule comme Crp l'expression de nombreux gènes. Chez les mutants *clp*, le taux de flagelline est fortement diminué. L'activité du promoteur du gène *fliC* est en effet réduite de 2 à 5 fois chez ces mutants. Un mutant *fliC* ne présente pas de flagelle ce qui entraîne une réduction de sa mobilité (figure 18) (Lee *et al.*, 2003). Un site de liaison à Clp en amont de

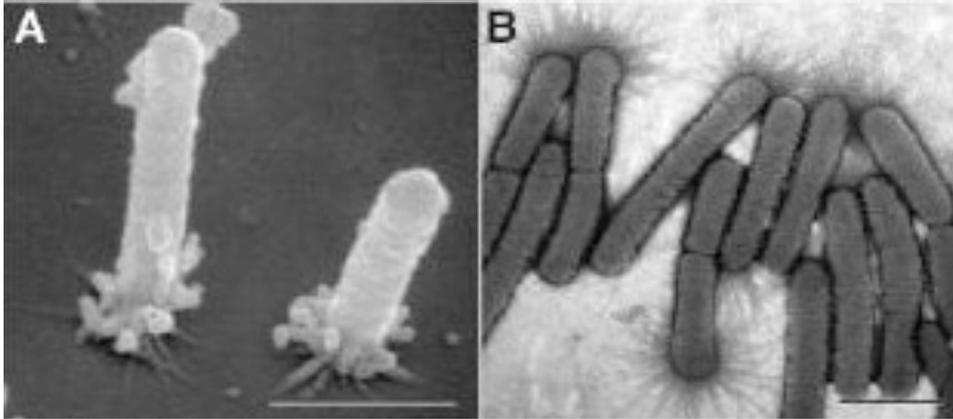


Figure 19 : Pili de type 4 polaires observés chez une souche sauvage de *Xylella fastidiosa* en microscopie électronique à balayage (d'après Meng et Li, 2005).

ce gène suggère que la régulation des gènes flagellaires est similaire chez *X. campestris* et *P. aeruginosa* où elle implique *Vfr* (homologue de Crp) et *fleQ* (Hu *et al.*, 2005). Le gène *fleQ* est un activateur transcriptionnel de type NifA/NtrC σ^{54} -dépendant situé au plus haut niveau de la voie de régulation de la biosynthèse de flagelles chez *P. aeruginosa* et joue un rôle important dans la synthèse et la sécrétion des flagellines (Arora *et al.*, 1997; Jyot *et al.*, 2002; Capdevila *et al.*, 2004). De nombreux homologues ont été identifiés chez *Vibrio cholerae* et *Caulobacter crescentus* par exemple (Arora *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2003). Les mutants *fleQ* ne montrent pas de flagelles ni de taux détectables de flagelline (Arora *et al.*, 1997; Capdevila *et al.*, 2004). Le régulateur *fleQ* régule positivement de nombreux gènes flagellaires tels que *flhH*, impliqué dans la localisation de l'appareil flagellaire ou *fleSR* codant pour un système senseur-régulateur impliqué dans la synthèse de la flagelline (Arora *et al.*, 1997).

1.2 Pili de type 4 ou adhésines fibrillaires

La biosynthèse de pili de type 4 ou TFP (Type Four Pili) est l'un des facteurs essentiels à la formation de biofilms chez les bactéries épiphytes, ces structures permettant l'attachement des bactéries à la surface foliaire et entre-elles afin de former des microcolonies (figure 19) (Mattick, 2002; Craig *et al.*, 2004; Rosenblueth et Martinez-Romero, 2006). *P. aeruginosa* présente de nombreux TFP sous la forme de filaments de 6 nm de diamètre émergeant à l'un des pôles de la cellule (Skerker et Berg, 2001; Kang *et al.*, 2002; Shi et Sun, 2002). Le mouvement des cellules appelé « twitching motility » est réalisé par l'alternance de phases d'extension, d'accrochage à la surface et de rétraction du pili faisant avancer la cellule de façon saccadée à une vitesse de plus de 0.2 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (Skerker et Berg, 2001; Shi et Sun, 2002; Carbonnelle *et al.*, 2006; Kaiser, 2007). Le même mécanisme permet l'attachement des bactéries à la surface et entre-elles. Les TFP sont formés par assemblage de sous-unités d'une protéine unique : la piline. La partie distale du pilus agit comme une adhésine non-spécifique (Skerker et Berg, 2001; Shi et Sun, 2002; Craig *et al.*, 2004). La région C-terminale de la sous-unité de piline au niveau de l'extrémité du pilus peut se lier à certains composés membranaires comme les glycosphingolipides (Skerker et Berg, 2001).

Plus de 40 gènes ont été identifiés comme ayant un rôle dans la biosynthèse et le fonctionnement des TFP chez *Pseudomonas aeruginosa* (Huang *et al.*, 2003). Il s'agit de gènes codant :

- la piline (protéine structurale majeure des pili),
- des protéines structurales mineures formant la base ou l'extrémité du pilus,
- des protéines nécessaires à l'assemblage et à l'extraction du pilus

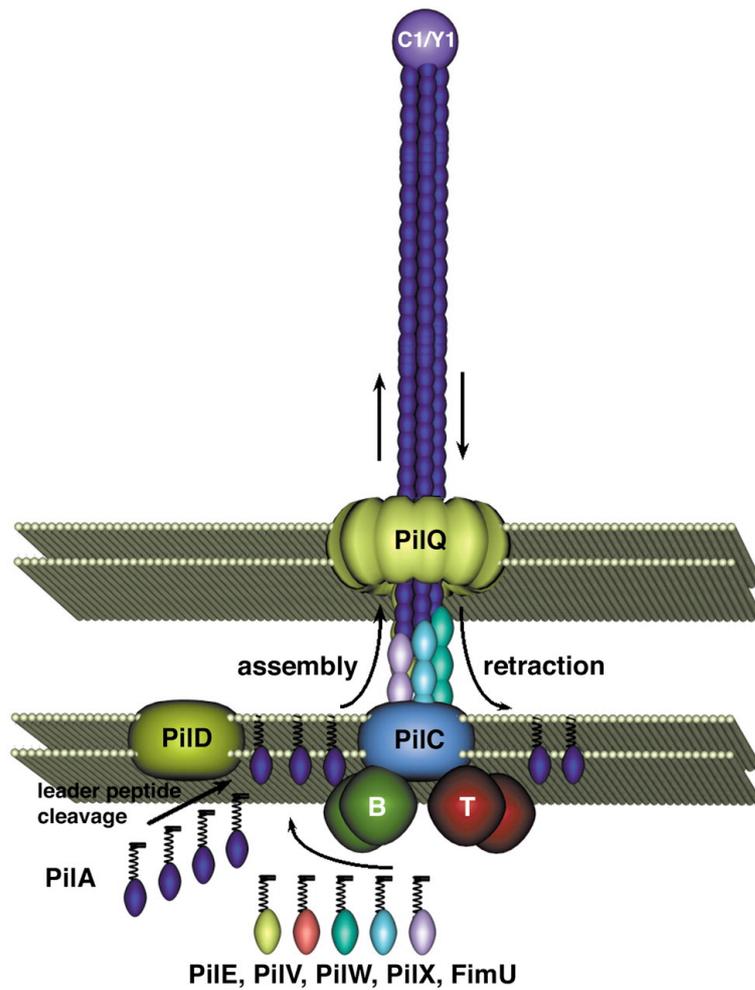


Figure 20 : Modèle de l'organisation du pili de type 4 (d'après Mattick, 2002). La protéine PilA est assemblée sur la base des protéines mineures PilE, PilV, PilW, PilX, et FimU. Les protéines PilC et PilB permettent au pili de traverser la membrane interne de la bactérie. Le passage de la membrane externe est réalisé grâce à un pore composé de la protéine PilQ.

Les pili sont formés par l'assemblage de sous-unités protéiques de piline. La structure des pilines est très conservée chez un grand nombre d'espèces bactériennes, plus particulièrement au niveau N-terminal. Celle-ci est caractérisée par un domaine de clivage formé par les cinq premiers acides aminés (Collyn *et al.*, 2002; Shi et Sun, 2002). Les études biochimiques et génétiques concernant la biosynthèse des TFP ont surtout porté sur l'espèce modèle *P. aeruginosa*. La voie de biosynthèse des TFP est identique chez de nombreuses espèces bactériennes (Brunings et Gabriel, 2003). Les pilines sont synthétisées sous une forme précurseur ou prépiline. La prépiline est clivée au niveau de la séquence signal N-terminale par une peptidase/N-méthyltransferase et un groupement méthyle est ajouté au premier acide aminé permettant la formation de la molécule mature de piline. Avant polymérisation, les molécules de piline sont ancrées à la membrane interne via la région N-terminale hydrophobe. Les pilines sont alors polymérisées en présence de protéines spécifiques telles que PilB et PilC chez *P. aeruginosa* (Shi et Sun, 2002). Les filaments sont enfin extraits via un pore de la membrane cellulaire externe constitué par la protéine PilQ, homologue aux sécrétines du système général de sécrétion (Shi et Sun, 2002; Brunings et Gabriel, 2003; Meng *et al.*, 2005). Des études ont permis de montrer que de nombreux gènes de cette voie de synthèse sont conservés chez des espèces telles que *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *V. vulnificus*, *Burkholderia pseudomallei* et *Xylella fastidiosa*. Chez ces différentes espèces, l'opéron *pilABCD*, plus particulièrement, est organisé d'une façon similaire (Paranjpye et Strom, 2005).

Les gènes clés de la voie de biosynthèse des TFP sont les gènes *pilA*, codant la piline et *pilD* codant l'enzyme de clivage permettant le passage de la forme immature à la forme mature de la piline (figure 20) (Mattick, 2002). Chez les mutants *pilA*⁻, où aucun pili n'est produit, on observe une diminution très importante de la formation de biofilms (Skerker et Berg, 2001; Paranjpye et Strom, 2005). En effet, la délétion du gène *pilA* chez *B. pseudomallei* par exemple diminue l'adhérence des mutants aux cellules de l'hôte ainsi que leur virulence. Un gène *pilA* fonctionnel est donc nécessaire à l'adhésion des cellules bactériennes entre elles et sur la surface de l'hôte (Mattick, 2002; Kaiser, 2007). L'expression du gène *pilA* est soumise à une régulation par un facteur σ^{54} , permettant la fixation spécifique de l'ARN polymérase au niveau du promoteur du gène. En effet, la séquence *pilA* est caractérisée par la présence d'un domaine de fixation du promoteur σ^{54} RpoN-dépendant en amont de la séquence codante (Paranjpye et Strom, 2005; da Silva Neto *et al.*, 2007). Le gène *pilD*, codant la peptidase/N-méthyltransférase permettant la formation de la molécule finale de piline, est essentiel à la synthèse des TFP. Une mutation au niveau de ce gène cause chez les différentes espèces étudiées une perte de la

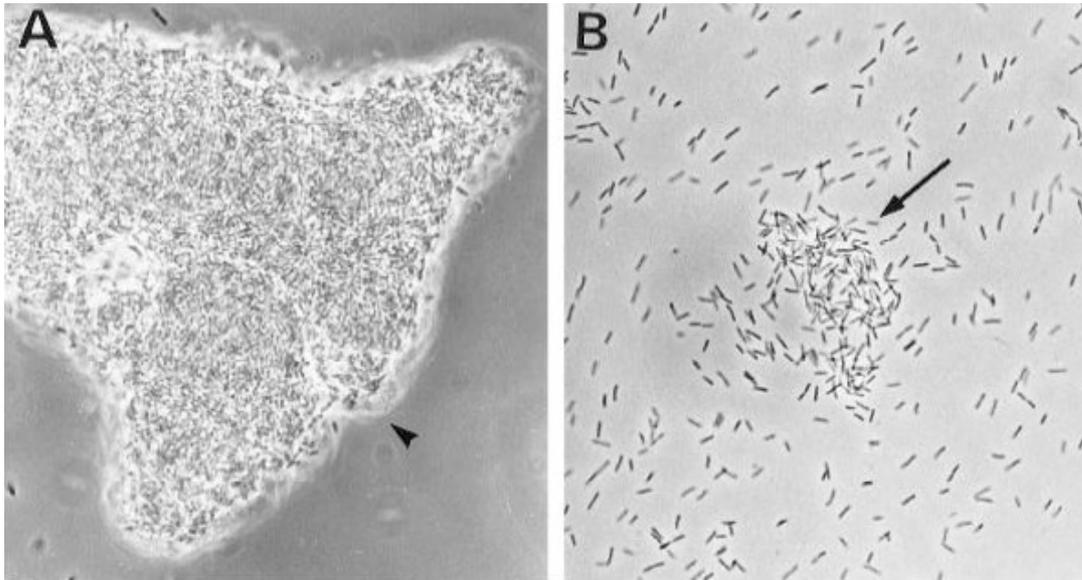


Figure 21 : Formation d'agrégats chez les souches sauvages (A) et les mutants *fimA*⁻ (B) de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (d'après Ojanen-Reuhs *et al.*, 1997). Les souches mutantes restent planctoniques contrairement aux souches sauvages.

synthèse des TFP et une diminution significative de l'adhérence des cellules à la surface de l'hôte (Paranjpye et Strom, 2005).

De nombreux autres gènes participent à la biogenèse des TFP. Le gène *pilT* n'est pas requis pour la synthèse des TFP. Les mutants *pilT* présentent des pili mais ne sont pas capables de se mouvoir. La protéine PilT est nécessaire pour générer la force de rétraction du pilus et donc le mouvement (Shi et Sun, 2002; Kaiser, 2007). La protéine PilB permet la translocation et l'assemblage des sous-unités de piline (Meng *et al.*, 2005). Elle comporte en effet un domaine de liaison aux nucléotides caractéristiques des protéines transporteurs de type ABC permettant le transport de molécules au travers des membranes cellulaires (Paranjpye et Strom, 2005). Chez *Xylella fastidiosa*, la mutation des gènes *pilB* et *pilQ* se traduit par une absence de TFP et de motilité de type « twitching motility ». Les mutants ne peuvent donc pas former de microcolonies (Meng *et al.*, 2005; Carbonnelle *et al.*, 2006; da Silva Neto *et al.*, 2007; Kaiser, 2007).

Un gène homologue au gène *pilA* a été identifié chez certaines espèces de bactéries du genre *Xanthomonas* telles que *X. citri*, *X. hyacinthi* et *X. axonopodis*. Il existe quatre clusters de gènes et deux gènes isolés impliqués dans la biosynthèse des TFP chez *X. citri*. Deux gènes d'un de ces clusters codent des protéines FimA (Brunings et Gabriel, 2003). La séquence des deux gènes *fimA* est homologue à celle du gène *pilA* (55 à 61% d'homologie) (van Doorn *et al.*, 2001; Brunings et Gabriel, 2003). Le gène *fimA* code la sous-unité structurale de piline FimA chez les bactéries du genre *Xanthomonas*. L'expression du gène *fimA* chez *E. coli* entraîne la production de sous-unités de piline de 17 kDa. Les parties C-terminale et centrale de la protéine sont très variables même entre différents pathovars de *Xanthomonas* cependant la partie N-terminale est très conservée (Ojanen-Reuhs *et al.*, 1997; van Doorn *et al.*, 2001). Chez *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (figure 21), le gène *fimA* est impliqué dans la formation d'agrégats cellulaires compacts (ou microcolonies) *in vitro* et *in planta*. Les mutants *fimA* restent quant à eux sous forme planctonique et ne colonisent que très peu les trichomes démontrant que l'adhésion à ces structures nécessite un gène *fimA* fonctionnel. La complémentation des mutants par transfert de plasmides permet de restaurer la formation de biofilms. Le gène *fimA* chez les *Xanthomonas spp.* est donc primordial pour la synthèse de TFP, la formation de biofilm et la survie épiphyte de ces bactéries dans la phyllosphère (Ojanen-Reuhs *et al.*, 1997). Le % de G+C du gène *fimA* (56%) est significativement inférieur à celui du génome complet des *Xanthomonas* ce qui montre que le gène a pu être acquis par transfert horizontal (van Doorn *et al.*, 2001). La présence, en amont de *fimA*, du promoteur RpoN-dépendant σ^{54} , identifié comme étant un régulateur de la transcription du gène *pilA* chez *P. aeruginosa* et *X. fastidiosa* (da Silva

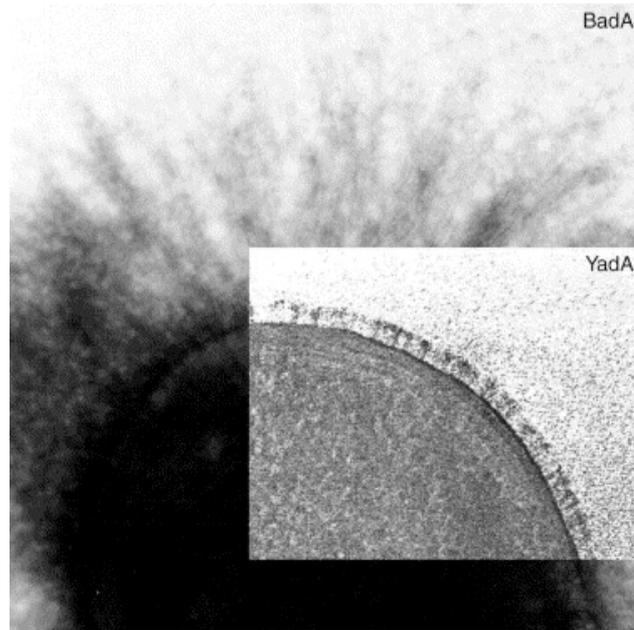


Figure 22 : Sécrétion de type autotransporteur observée en microscopie électronique à transmission (d'après Cotter *et al.*, 2005). Les autotransporteurs conventionnels (tels que BadA) sont clivés à la surface de la bactérie, ce qui n'est pas le cas des autotransporteurs trimériques (tels que YadA).

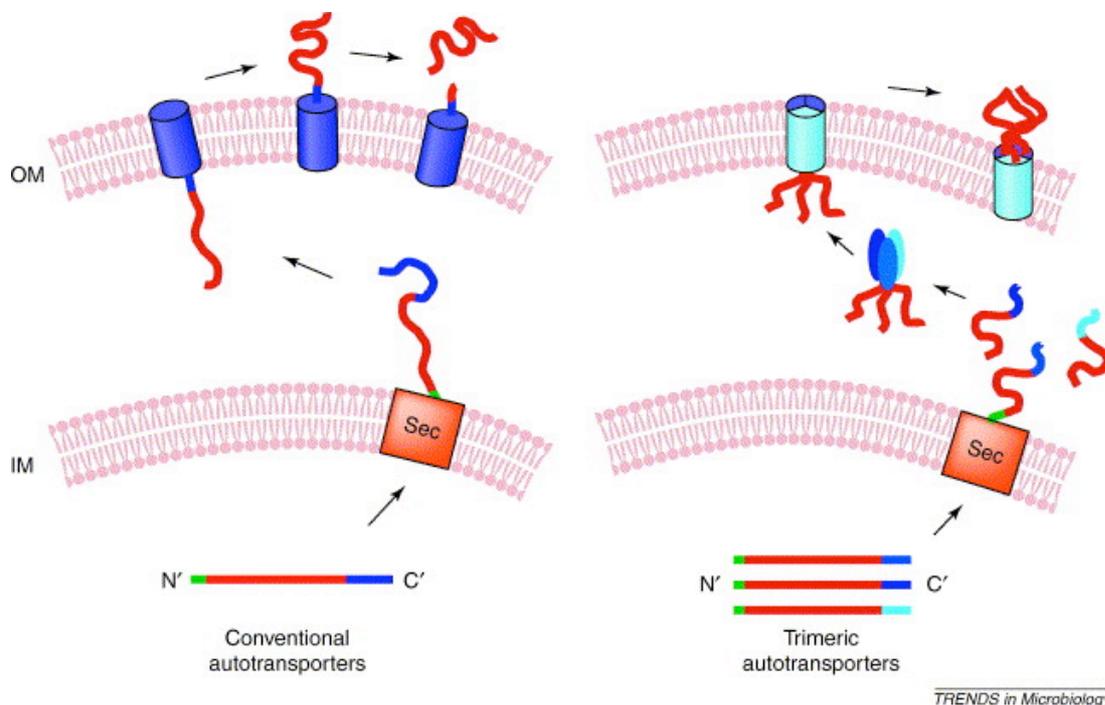


Figure 23 : Schémas illustrant la sécrétion de type autotransporteur (d'après Cotter *et al.*, 2005). Les autotransporteurs conventionnels (à gauche) sont clivés à la surface de la bactérie, ce qui n'est pas le cas des autotransporteurs trimériques (à droite).

Neto *et al.*, 2007), montre que la régulation de l'expression de ces deux gènes se fait selon les mêmes mécanismes.

1.3 Adhésines non-fibrillaires

Les protéines d'adhésion non-fibrillaires ont largement été décrites chez les bactéries humaines et animales car elles jouent un rôle dans la virulence de ces organismes (Linke *et al.*, 2006; Pizarro-Cerda et Cossart, 2006). Ces protéines appartiennent à une famille très large de mono- ou d'oligomères de protéines de surface. Les adhésines de type autotransporteurs sont les plus grands représentants de cette famille. Ce sont des protéines localisées à la surface de la bactérie (figure 22). Elles sont sécrétées dans le milieu extracellulaire à travers la double membrane des bactéries à Gram- via le système de sécrétion de type 5 également dénommé autotransporteur (figure 23) (Van Sluys *et al.*, 2002; Pizarro-Cerda et Cossart, 2006). Les séquences protéiques des autotransporteurs divergent entre les bactéries, mais de nombreux domaines structuraux sont conservés. Ces molécules disposent d'un peptide leader au niveau du domaine N-terminal pour la sécrétion à travers la membrane interne, d'un domaine C-terminal qui forme un pore dans la membrane externe au travers duquel le domaine passager passe au niveau de la surface cellulaire (Henderson *et al.*, 2004). Chez *Yersinia enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis*, YadA apparaît appartient à une nouvelle sous-famille d'autotransporteurs trimériques, chez lequel trois sous-unités sont nécessaires à la formation d'un pore fonctionnel (Cotter *et al.*, 2005; Linke *et al.*, 2006). Chez *X. fastidiosa*, trois adhésines putatives présentent de fortes homologues avec les protéines Hsf et Hia d'*Haemophilus influenza* dont le rôle dans l'adhésion a été décrit (Barenkamp et St Geme, 1996; Simpson *et al.*, 2000). Chez *X. campestris* pv. *campestris*, *X. citri* subsp. *citri* et *X. oryzae* pv. *oryzae*, des gènes homologues ont également été identifiés et nommés *xadA* (da Silva *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005). Ces protéines de surface favorisent l'attachement et l'agrégation des bactéries à la surface des plantes, dans le xylème ou encore à l'intérieur de l'insecte vecteur dans le cas de *X. fastidiosa*, contribuant à la virulence de ces bactéries (Feil *et al.*, 2007). Des mutations dans le gène *xadA* chez *X. oryzae* pv. *oryzae* entraînent une diminution significative de l'agressivité des mutants après injection dans les feuilles ou inoculation épiphyte sur des plantes (Ray *et al.*, 2002).

Le système de sécrétion bipartite permet également d'exporter de grandes exoprotéines ayant un rôle dans l'adhésion (Mazar et Cotter, 2006). Ce sont des hémagglutinines ou hémolysines (Fha) qui ont été identifiées d'abord chez *Bordetella pertussis* puis chez *X. fastidiosa*, *Ralstonia solanacearum* et différents *Xanthomonas* spp. Les gènes codant ces protéines sont en nombre variable chez ces différents agents

Tableau 3 : Enzymes de dégradation de la paroi végétale de *X. campestris* pv. *campestris* (d'après da Silva *et al.*, 2002).

Activité enzymatique	Nombre	Nom	Numéro de l'ORF
Enzymes Pectinolytiques	9	Polygalacturonases (PG)	XCC2266
			XCC3459
		Pectates lyases (PL)	XCC0122
			XCC0644
			XCC0645
		Pectine méthylestérases (PME)	XCC2815
			XCC0121
			XCC2265
			Rhamnogalaturonane acétyl estérase
Enzymes Cellulolytiques	18	Cellulases	XCC0026
			XCC0027
			XCC0028
			XCC1752
			XCC2387
			XCC3380
			XCC3381
			XCC3521
			XCC3535
			Cellobiosidases
		XCC3534	
		Beta-glucosidases	XCC1090
			XCC1250
			XCC1775
			XCC2892
XCC4106			
XCC1404			
XCC3814			
Enzymes Hémicellulolytiques	13	Xylanases	XCC0144
			XCC0857
			XCC3038
			XCC4115
			XCC4118
		Xylosidases/arabinosidases	XCC0149
			XCC1178
			XCC1755
			XCC2398
			XCC3975
			XCC4064
			XCC4105
			XCC4122
Nombre total = 40			

pathogènes (Van Sluys *et al.*, 2002). Fha est le produit des régions N- et C- terminales du précurseur FhaB. FhaB est reconnue et sécrétée par FhaC, la protéine responsable de la formation du pore au niveau de la membrane externe de la bactérie (Mazar et Cotter, 2006). Il a été montré que Fha fonctionne comme une protéine d'attachement multifonctionnelle ayant un rôle de médiateur dans l'adhésion à plusieurs ligands.

X. fastidiosa produit plusieurs hémagglutinines qui permettent le contact et l'agrégation entre les cellules. Des mutants de ces protéines ne peuvent pas s'agréger et forment alors une monocouche dans les vaisseaux du xylème plutôt que des biofilms multicouches comme la souche sauvage. La fonction d'agrégation des hémagglutinines aurait pour but de limiter la prolifération de l'agent pathogène et ainsi les dommages causés à la plante. Des mutants de ces protéines sont plus agressifs, vraisemblablement à cause d'une diffusion accrue au sein de la plante et un taux de croissance plus important (Guilhabert et Kirkpatrick, 2005). Cette relation entre la dispersion et l'agressivité est également connue chez d'autres pathogènes vasculaires tels que *P. stewartii* subsp. *stewartii* ou *X. campestris* pv. *campestris* après mutation d'une protéine fibrillaire (FimA) indispensable à la formation de biofilms (Mattick, 2002; Meng *et al.*, 2005).

2. Enzymes de dégradation de la paroi cellulaire

La paroi primaire des cellules végétales est composée essentiellement de pectine et de cellulose. Ces polymères représentent une réserve de substrats énergétiques considérable pour les bactéries phytopathogènes, mais ils ne sont pas directement utilisables sous leurs formes complexes. Ils doivent être catabolisés en molécules plus simples grâce à plusieurs enzymes hydrolytiques sécrétées par les bactéries phytopathogènes. Ces enzymes ont un rôle essentiel de dégradation des polysaccharides (cellulose, hémicellulose et pectine) et de la lignine qui composent les parois cellulaires des végétaux. De nombreux gènes codent pour ces enzymes de dégradation extracellulaires et ont été mis en évidence chez toutes les bactéries à Gram- récemment séquencées (Van Sluys *et al.*, 2002).

X. citri subsp. *citri* possède six gènes codant des enzymes pectinolytiques et 12 gènes codant des enzymes dégradant la cellulose et l'hémicellulose (da Silva *et al.*, 2002), tandis que *X. fastidiosa* en possède un et quatre gènes respectivement (Simpson *et al.*, 2000). Cette abondance d'enzymes dégradant les parois cellulaires ainsi que la présence de deux copies du SST2 qui est impliqué dans la sécrétion de ces enzymes peut expliquer la destruction tissulaire qui suit les symptômes de taches humides et d'hyperplasie suite à l'infection par *X. citri* subsp. *citri*, ce qui n'est pas observé lors de l'infection par *X. fastidiosa*. *X. campestris* pv. *campestris* (tableau 3) possède encore plus de gènes

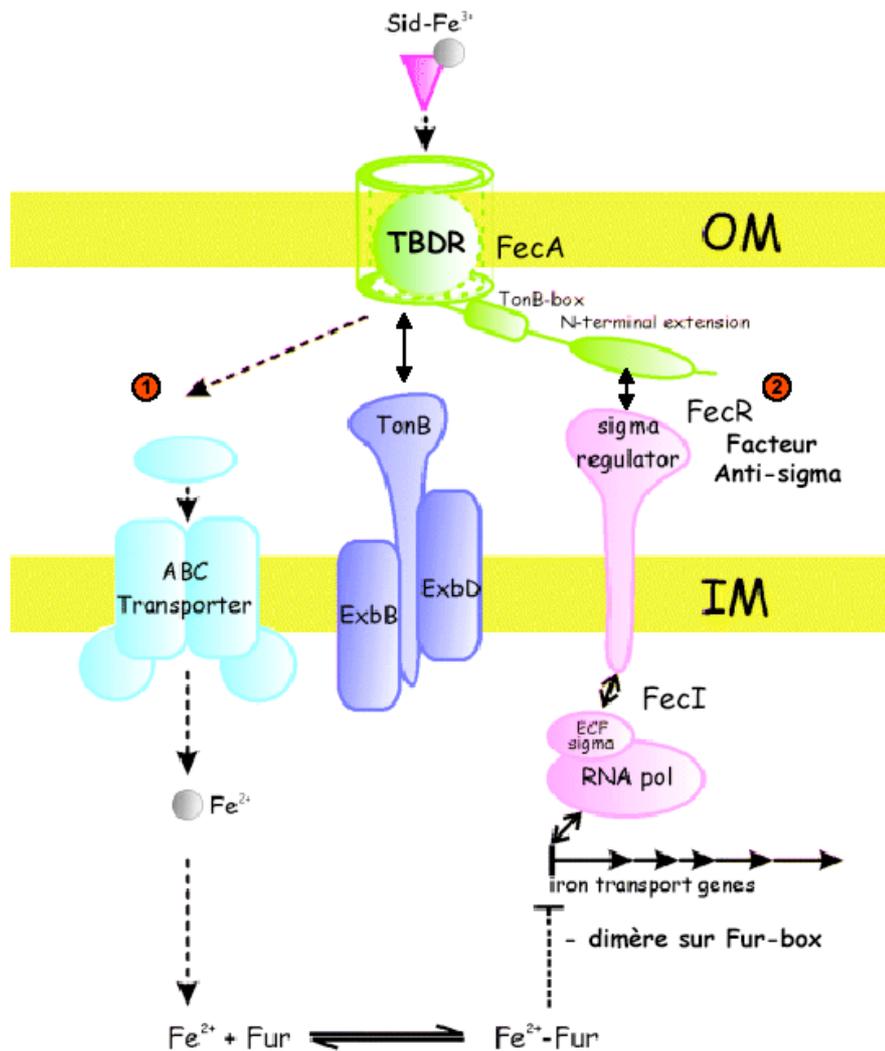


Figure 24 : Système de transport du complexe sidérophore- Fe^{3+} par les récepteurs TonB-dépendants (TBDR) (d'après Schalk *et al.*, 2004). Le complexe sidérophore- Fe^{3+} du milieu extracellulaire est reconnu par un récepteur TonB-dépendant, qui a deux fonctions. Tout d'abord, le transporteur TonB-dépendant transporte le complexe sidérophore- Fe^{3+} dans le périplasma, le complexe est ensuite transporté dans le cytoplasme par un transporteur ABC. Puis, le récepteur TonB-dépendant régule l'induction de la transcription des gènes de consommation du fer. Le processus suivant est initié par la liaison du complexe sidérophore- Fe^{3+} au transporteur TonB-dépendant, et implique plusieurs composants : l'extension N-terminale au récepteur TonB-dépendant, la protéine sigma-régulatrice de la membrane interne et le facteur sigma ECF cytoplasmique. Les fonctions de transport et d'induction nécessitent la transduction d'énergie par le complexe TonB/ExbB/ExbD dans la membrane interne. Le complexe sidérophore- Fe^{3+} lié au récepteur TonB-dépendant est connu pour interagir avec la protéine TonB via son motif TonB-box. Quand le niveau de fer intracellulaire est haut, le répresseur transcriptionnel Fur se lie aux ions ferreux Fe^{2+} . Le complexe Fur- Fe^{2+} réprime la transcription des gènes de consommation du fer.

codant des enzymes dépolymérisantes que *X. citri* subsp. *citri*, cela pourrait expliquer le fait que *X. campestris* pv. *campestris* provoque beaucoup plus de symptômes de pourriture sur ses hôtes que *X. citri* subsp. *citri* (da Silva *et al.*, 2002).

3. Systèmes d'acquisition du fer et du sucre

3.1 Système d'acquisition du fer

Le fer ferrique (Fe^{3+}) est indispensable à toute forme de vie en général et à la vie des bactéries phytopathogènes en particulier. Cependant, du fait de sa faible solubilité en aérobiose et à pH 7, le Fe^{3+} n'est que faiblement biodisponible (Braun et Killmann, 1999). Cette faible disponibilité a imposé aux bactéries de développer des systèmes de captation du Fe^{3+} extrêmement efficaces pour solubiliser et acquérir ce métal nécessaire à leur métabolisme. Ainsi, les bactéries à Gram- synthétisent des composés complexant le fer, appelés sidérophores, qui sont sécrétés et lient le Fe^{3+} extracellulaire avec une haute affinité. Les complexes Fe^{3+} /sidérophores sont ensuite transportés dans la cellule, *via* des systèmes de transport spécifiques, où le fer est relargué sous forme réduite Fe^{2+} pour être incorporé aux centres réactionnels de protéines ou servir de cofacteur de réactions enzymatiques (Braun et Killmann, 1999). La capture des complexes Fe^{3+} /sidérophores se fait par l'entremise d'un processus énergétique impliquant des récepteurs/transporteurs de la membrane externe et les protéines TonB, ExbB et ExbD localisés dans la membrane cytoplasmique (figure 24). La protéine TonB transmet la force motrice de la membrane cytoplasmique au récepteur qui est dit TonB-dépendant (TBDR) (Schalk *et al.*, 2004). L'analyse du génome de *X. campestris* pv. *campestris* a permis d'identifier 72 TBDRs *in silico* (Meyer, 2005; Blanvillain *et al.*, 2007). Les gènes d'acquisition du fer sont régulés par la protéine régulatrice Fur (*Ferric-Uptake Regulator*). Fur est un répresseur pouvant se lier à l'ADN et utilisant le Fe^{2+} intracellulaire comme corépresseur. La protéine Fur a été isolée chez divers *Xanthomonas* (Loprasert *et al.*, 1999). En situation de carence en fer, le Fe^{2+} se dissocie de la protéine Fur, libérant le promoteur ce qui permet la transcription des gènes impliqués dans la transport du fer (Hantke, 2005). L'analyse du génome de *X. fastidiosa* a également révélé l'existence des gènes codant des récepteurs pour plusieurs sidérophores et les protéines TonB, ExbB, ExbD et Fur (Simpson *et al.*, 2000; Bhattacharyya *et al.*, 2002). En intervenant dans le métabolisme des bactéries, le fer a donc un rôle indirect dans le pouvoir pathogène, mais il peut aussi être un déterminant direct de la virulence (Ratledge et Dover, 2000; Blanvillain *et al.*, 2007).

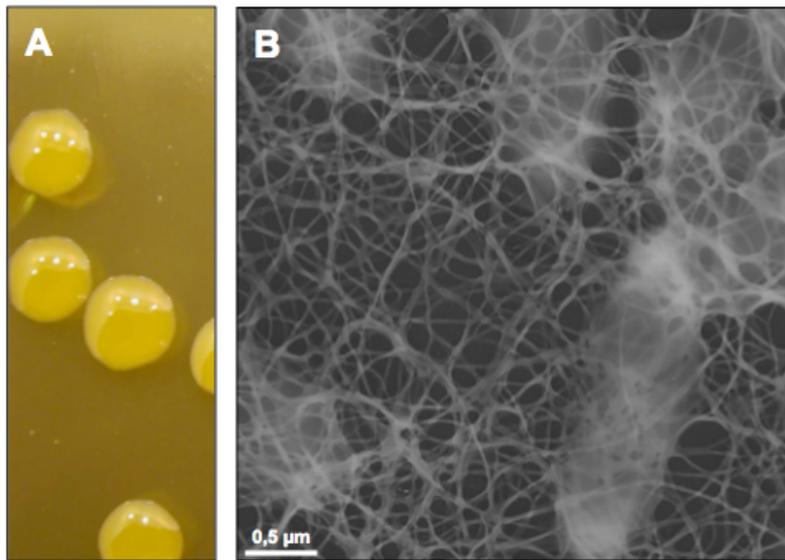


Figure 25 : *X. campestris* pv. *campestris*, souche LMG568 (ATCC33913), enchâssée dans sa matrice exopolysaccharidique (d'après Meyer, 2005). (A) Colonies muqueuses sur milieu gélosé riche en sucres. (B) Vue du réseau de xanthane en microscopie électronique à transmission (grossissement x25 000) (photographie : J. Vasse).

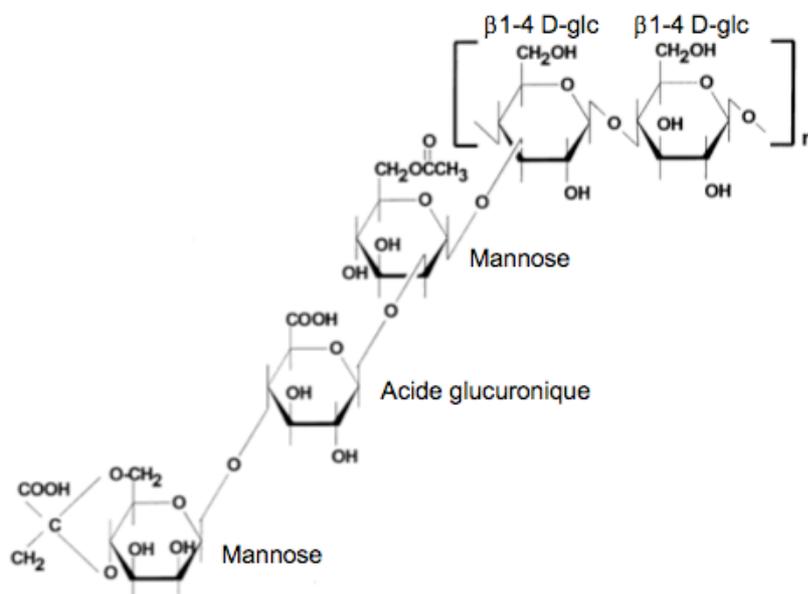


Figure 26 : Organisation de l'unité répétée de xanthane (d'après Katzen *et al.*, 1998). Le xanthane est constitué d'une unité répétée pentasaccharidique substituée de façon variable. Cette unité est formée d'un squelette disaccharidique de β 1-4 D-glucose sur lequel est branché en β 1-3 une chaîne trisaccharidique [mannose (β 1-4) acide gucuronique (α 1-2) mannose]. Les résidus mannose peuvent être acétylés ou pyruvylés.

3.2 Systèmes d'acquisition du sucre

L'acquisition de sucre passe par la dégradation de la paroi végétale fournissant une ressource énergétique importante pour le métabolisme bactérien. Pour capter ces sucres de l'environnement, les bactéries utilisent un système PTS (*sugar PhosphoTransferase System*) couplant une phosphoprotéine énergétique et une enzyme spécifique d'un sucre (Reizer *et al.*, 1999). *X. citri* subsp. *citri* et *X. campestris* pv. *campestris* possèdent un système PTS spécifique du glucose et un système PTS spécifique du fructose (da Silva *et al.*, 2002). Chez *X. citri* subsp. *citri*, *rpfN*, premier gène en aval du « cluster » PTS du fructose ; est impliqué dans la régulation des déterminants du pouvoir pathogène (Tang *et al.*, 1990). Ce gène code une porine de la membrane externe, similaire à OprB de *Pseudomonas aeruginosa* intervenant dans l'acquisition de carbohydrates, principalement du fructose (Wylie et Worobec, 1995). En complément de ces systèmes, *X. citri* subsp. *citri* pourrait internaliser des oligogalacturonides *via* des transporteurs spécifiques codés par *exuT* et *kdgT* (Moreira *et al.*, 2004). Chez *Erwinia chrysanthemi*, ces protéines ExuT et KdgT transportent les produits de dégradation de la pectine (acide galacturonique et acide cétodésoxyuronique) à l'intérieur de la cellule bactérienne. Une fois dans la bactérie, ces sucres sont catabolisés puis convertis en énergie ou utilisés dans le métabolisme ou comme inducteurs des enzymes de dégradation de la pectine (Pel) (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996). Chez *X. campestris* pv. *campestris*, un TBDR transporte le sucrose avec une très forte affinité. Ce TBDR interagit avec un transporteur situé dans la membrane interne, une amylosucrase, et un régulateur pour pouvoir utiliser le saccharose (Blanvillain *et al.*, 2007).

4. Synthèse de la matrice d'exopolysaccharides

Les EPSs produits par les bactéries du genre *Xanthomonas* sont appelés xanthane (figure 25). Il s'agit de polymères d'unités pentasaccharidiques répétées assemblées par addition séquentielle de glucose-1-phosphate, glucose, mannose, acide glucuronique et de mannose (figure 26) (Katzen *et al.*, 1998; Vojnov *et al.*, 2001). L'assemblage des unités pentasaccharidiques, la polymérisation et l'export du xanthane sont dirigés par un cluster de 12 gènes (16 kb) appelé *xpsI* ou *gum* (*gumB* à *M*) (figure 27). Les mutants *gumD* n'accumulent aucun des intermédiaires de la voie de biosynthèse du xanthane. Le gène *gumD* code en effet la glycosyltransférase I, première enzyme de cette voie de biosynthèse dont l'activité enzymatique est localisée au niveau C-terminal (Katzen *et al.*, 1998; Vojnov *et al.*, 2001).

La synthèse de xanthane est importante pour assurer l'intégrité structurale du biofilm par différents mécanismes tels que l'interaction avec des composants de la surface

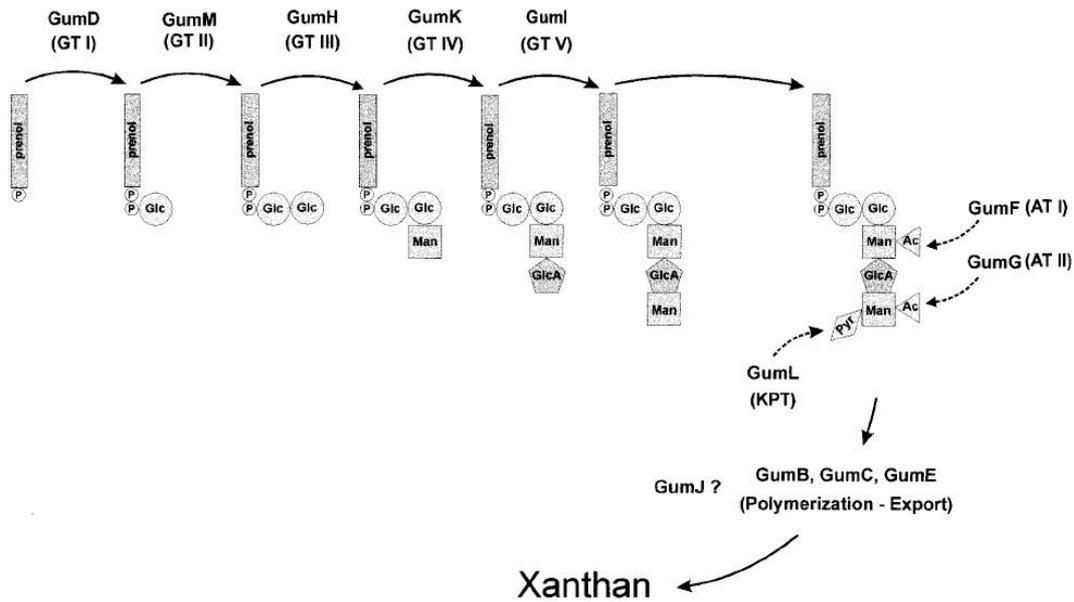


Figure 27 : Voie de biosynthèse du xanthane contrôlée par l'expression des gènes du cluster *gum* chez *X. campestris pv. campestris* (Katzen *et al.*, 1998). Glc, glucose ; Man, mannose; GlcA, acide glucuronique ; Ac, groupement acétyle ; Pyr, groupement pyruvyle. Chaque protéine est suivi par sa fonction entre parenthèse : GT, glycosyltransférase; AT, acétyltransférase; KPT, ketal pyruvate transférase.

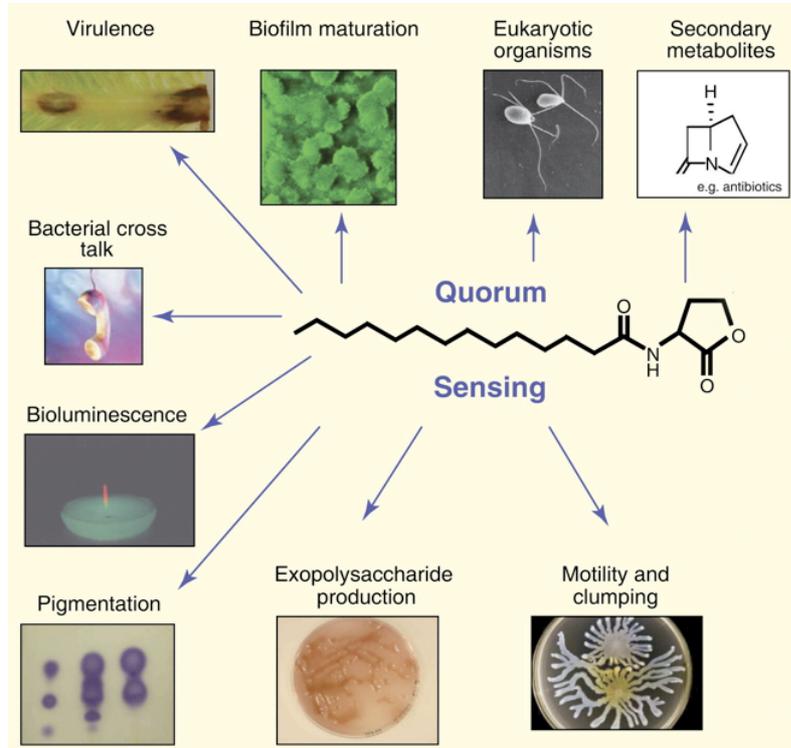


Figure 28 : Fonctions régulées par quorum sensing observées chez de nombreux organismes procaryotes et eucaryotes (d'après Diggle, 2007).

cellulaire bactérienne comme les glycoprotéines ou d'autres polysaccharides (Davey et O'Toole, 2000; Dow *et al.*, 2003). Chez *X. oryzae* pv. *oryzae*, les EPSs ont été associés à la virulence en favorisant l'adhésion à la surface des feuilles de l'hôte (Dharmapuri et Sonti, 1999). Il a aussi été montré que les xanthanes de *X. campestris* pv. *campestris* ont un rôle dans l'adsorption de la bactérie sur des surfaces végétales hydrophiles (Hsu *et al.*, 2004).

La production de xanthane étant un processus très demandeur d'énergie, de nombreux gènes sont impliqués dans sa régulation (Vojnov *et al.*, 2001). L'étude de mutants a permis de mettre en évidence l'existence d'au moins deux systèmes régulant la production de xanthane chez les *Xanthomonas* (Poplawsky et Chun, 1998; Poplawsky *et al.*, 1998). Il s'agit des systèmes *rpf* et *pig* fonctionnant tous deux par un mécanisme de régulation de type quorum sensing (QS) (Diggle *et al.*, 2007).

5. Systèmes de régulation

5.1 Le Quorum Sensing

Le QS est un mécanisme de communication bactérien de cellule à cellule permettant aux bactéries d'agir de manière coordonnée, tirant avantage du groupe pour survivre, se multiplier et coloniser un hôte (Keller et Surette, 2006; West *et al.*, 2006; Diggle *et al.*, 2007). Ce phénomène inter- ou intraspécifique implique la sécrétion et l'échange de molécules de signalisation extracellulaires entre les membres d'une population confinée (Sperandio, 2004). Les bactéries phytopathogènes peuvent utiliser les signaux pour réguler par QS une large gamme de comportements comme la mobilité, la résistance à la lumière UV, la synthèse d'EPS, la production d'exoenzymes mais aussi la bioluminescence, le transfert horizontal d'ADN, et la formation de biofilms (figure 28) (Diggle *et al.*, 2007).

La régulation par QS nécessite deux éléments principaux :

- une molécule signal,
- un régulateur transcriptionnel.

Les N-Acyl-homosérines lactones (N-AHLs) sont les molécules signal les plus couramment rencontrées. Le rôle de facteurs diffusibles tels que les N-AHLs de faible poids moléculaire dans la régulation de différents processus physiologiques clés de la virulence a été mis en évidence chez de nombreux genres bactériens pathogènes (Poplawsky et Chun, 1997; Poplawsky *et al.*, 1998; Newman *et al.*, 2004). A une certaine concentration bactérienne, la molécule signal atteint un niveau seuil et se lie au régulateur transcriptionnel qui active ou réprime l'expression de gènes cibles. La transcription des molécules de QS est dite « densité-dépendante », elle n'est en effet activée que

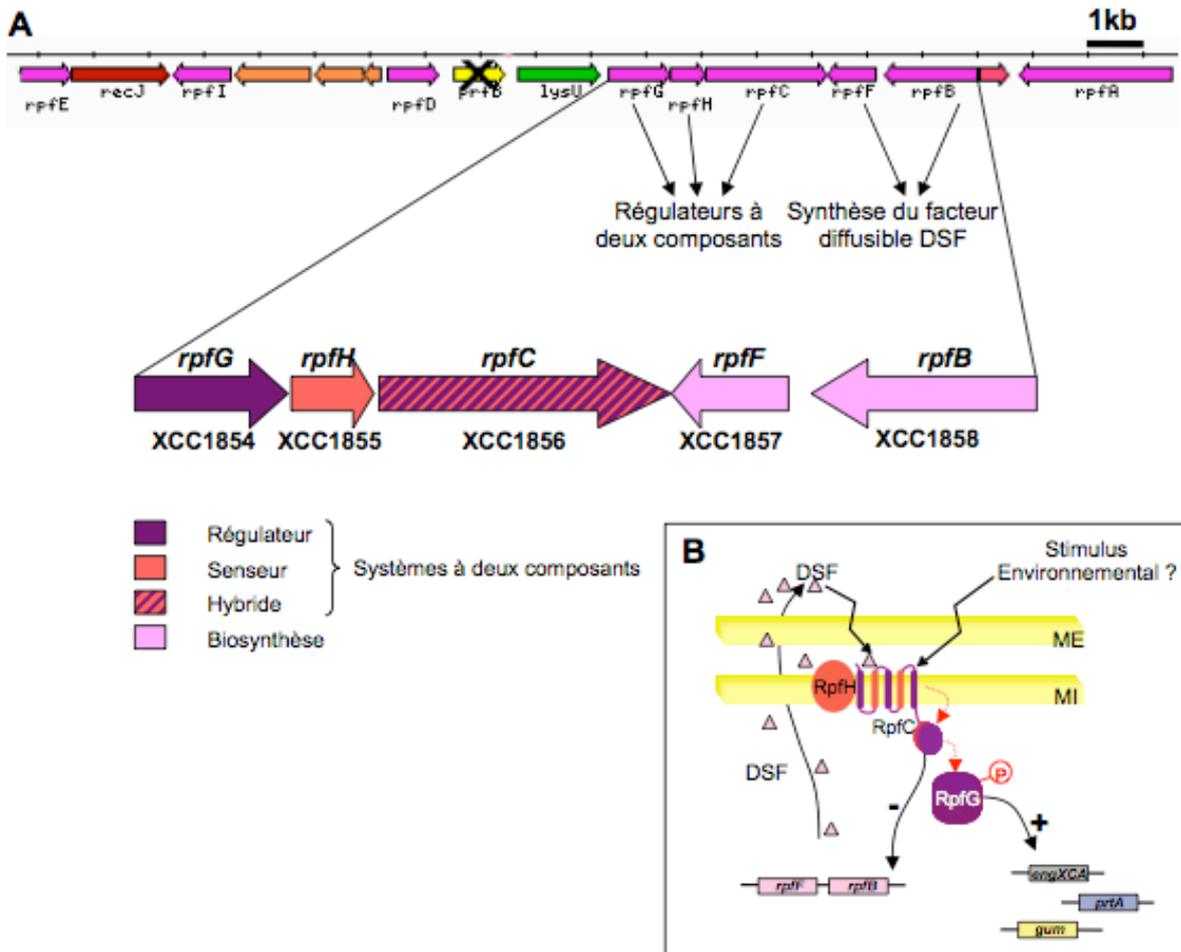


Figure 29 : Région *rpf* de *X. campestris* pv. *campestris* (d'après da Silva *et al.*, 2002) et modèle d'activation de la synthèse de facteurs de virulence par le DSF (d'après Crossman et Dow, 2004). (A) Cette région mesure 22,1 kb. Les deux gènes *rpfB* et *rpfF* dirigent la production du DSF qui est une petite molécule régulatrice diffusible. L'opéron *rpfGHC* code pour un système régulateur à deux composants impliqué dans la perception du DSF et la transduction du signal. Les numéros des ORF (*Open Reading Frame*) dans le génome de *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 sont indiqués. (B) La perception de DSF, et peut-être aussi d'un facteur environnemental, se fait au niveau du domaine senseur de RpfC qui possède cinq hélices transmembranaires et induit son autophosphorylation. L'autophosphorylation de RpfC déclenche une cascade de phosphorylations (flèches pointillées rouges). RpfG phosphorylée régule positivement l'expression de gènes requis pour la virulence (endoglucanase : *engXCA*, protéase : *prtA*, biosynthèse d'exopolysaccharides : gènes *gum*). RpfC régule négativement *rpfF* et *rpfB* impliqués dans la biosynthèse du DSF.

rpf, regulators of pathogenicity factors ; DSF, Diffusible Signal Factor ; ME, membrane externe ; MI, membrane interne.

lorsqu'une densité limite de cellules est atteinte (Keller et Surette, 2006; Diggle *et al.*, 2007).

Les bactéries du genre *Xanthomonas* utilisent des facteurs diffusibles de nature chimique différente des précédentes et ayant un certain nombre de spécificités. Deux de ces facteurs, DF (Diffusible Factor) et DSF (Diffusible Signaling Factor), ont été identifiés chez de nombreuses souches de *Xanthomonas* dont *X. campestris* pv. *campestris*, *X. fuscans* subsp. *fuscans* et *X. axonopodis* pv. *manihotis* (Dow *et al.*, 2000; Jacques *et al.*, 2005). Le facteur diffusible DSF ne se comporte pas comme un auto-inducteur contrairement à certaines N-AHLs, il est produit tout au long de la croissance (Crossman et Dow, 2004). Deux loci sont impliqués dans la synthèse et la régulation des facteurs diffusibles DF et DSF : *pig* identifié chez la souche B24 de *X. campestris* pv. *campestris* et *rpf* identifié chez la souche 8004 de *X. campestris* pv. *campestris*, respectivement (Poplawsky *et al.*, 1998).

5.2 Système *rpf*

La région *rpf* (Regulation of Pathogenicity Factors) (22,1 kb) est formée de 7 unités transcriptionnelles (*rpfA* à *rpfG*) (figure 29). L'opéron *rpf*, et plus particulièrement les gènes *rpfF* et *rpfB*, gouverne la production du facteur diffusible DSF régulant la production d'enzymes extracellulaires (protéases, endoglucanases et polygalacturonases liases) et de xanthane chez les bactéries du genre *Xanthomonas* telles que *X. citri* subsp. *citri* et *X. campestris* pv. *campestris* (Poplawsky *et al.*, 1998; Dow *et al.*, 2003; Fouhy *et al.*, 2006). Les mutants altérés dans les gènes *rpfF* et *rpfB* sont caractérisés par une diminution importante de la production de DSF (de 70 à 80%), d'enzymes extracellulaires et de xanthane (de 30 à 50%) et ne peuvent donc pas former de biofilms (Newman *et al.*, 2004). La synthèse de xanthane peut être au moins partiellement restaurée chez les mutants altérés dans les gènes *rpfF* ou *rpfB* par ajout de DSF dans le milieu ou par complémentation génique intracellulaire (Poplawsky et Chun, 1998). La perception de DSF et la transduction du signal impliqueraient un système de régulation à deux composantes codé par l'opéron *rpfGHC* adjacent (Crossman et Dow, 2004). RpfC est un senseur complexe de type histidine kinase comportant des domaines senseur et régulateur confondus et un domaine dit HPt (Phosphotransfert d'Histidine) au niveau C-terminal permettant une autophosphorylation. RpfG est une protéine de type phosphohydrolase métal-dépendante contenant un domaine pouvant s'associer avec le domaine régulateur de RpfC (Crossman et Dow, 2004). La protéine RpfC agit comme répresseur des gènes *rpfB* et *rpfF* et donc de la production de DSF alors que RpfG est un activateur impliquant le renversement partiel de la répression RpfC-dépendante. L'un des signaux

environnementaux perçus par RfpC est la molécule DSF elle-même (Slater *et al.*, 2000; Crossman et Dow, 2004). Le modèle de régulation serait alors le suivant :

- perception et reconnaissance de DSF par RpfC entraînant son autophosphorylation,
- activation de RpfG par phosphorelais via le domaine HPt de RpfC,
- transduction du signal par RpfG et activation de la production de DSF.

Le gène *rpfF* semble réguler de façon positive la production de xanthane par l'activation de la transcription de l'opéron *gum* dont il est le promoteur. L'ajout de DSF exogène dans le milieu augmente de façon significative l'expression de l'opéron *gum* (Katzen *et al.*, 1998; Vojnov *et al.*, 2001; Crossman et Dow, 2004). L'expression du gène *gumD* est fortement diminuée (de 50 à 75%) chez les mutants altérés dans un gène du cluster *rpf*, démontrant que la production de xanthane et l'expression de l'opéron *gum* sont liées.

La dispersion des biofilms semble être elle aussi sous le contrôle du cluster *rpf*. Dans des milieux de culture riches, les mutants altérés dans les gènes *rpfF*, *rpfG* et *rpfC* sont agrégés, contrairement aux individus sauvages, l'ajout de DSF exogène dans le milieu entraînant la dispersion de ces agrégats (Dow *et al.*, 2003). Une enzyme de type endo- β -(1,4)-mannanase (ManA) a été identifiée, elle permet aux bactéries de revenir à un mode de vie planctonique en réponse à DSF (Crossman et Dow, 2004). L'interaction de la matrice d'EPSs avec les cellules bactériennes (et donc la formation d'un biofilm) n'est efficace que si les composants de la paroi cellulaire possèdent un squelette de type β -(1,4)-mannane. La formation de biofilms sous-entend donc l'inactivation de cette enzyme. Le système *rpf*/DSF aurait donc un rôle tant dans la formation que dans la dispersion des biofilms, étape indispensable à la colonisation endophyte de l'hôte (Dow *et al.*, 2003; Crossman et Dow, 2004; Fouhy *et al.*, 2006; Diggle *et al.*, 2007).

5.3 Système *pig*

La région *pig* (18,6 kb) identifiée chez *X. campestris* pv. *campestris* se compose de 7 unités transcriptionnelles (*pigABCDEFG*) (Poplawsky et Chun, 1997; Poplawsky *et al.*, 1998; Poplawsky *et al.*, 2000). L'*orf3* du cluster *pigB* (2.3 kb) est impliqué, chez les *Xanthomonas*, dans la synthèse du facteur diffusible DF régulant la production de xanthane et de xanthomonadine (Poplawsky et Chun, 1998; Poplawsky *et al.*, 1998). En effet, l'introduction de ce gène chez des bactéries telles que les *Pseudomonas* sp. leur confère la capacité à produire la xanthomonadine (Poplawsky et Chun, 1997). L'organisation et la composition de cette région *pig* ont également été étudiées chez *X. oryzae* pv. *oryzae* qui a permis l'identification de 14 orfs dont au moins cinq d'entre elles sont indispensables à

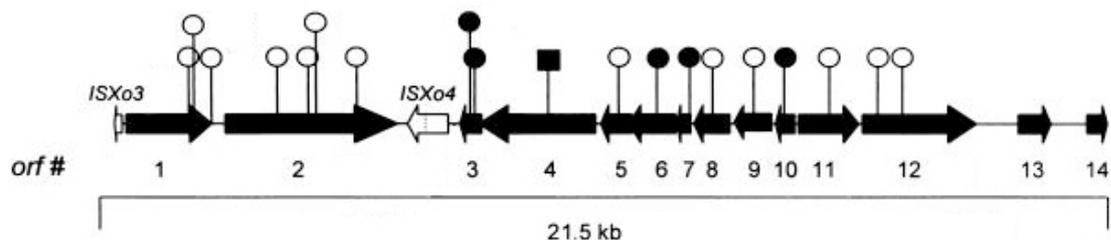


Figure 30 : Organisation du cluster *pig* chez *X. oryzae* pv. *oryzae* (d'après Goel *et al.*, 2002). Les flèches noires représentent les 14 *orfs* identifiées dans une région de 20,30 kb. La direction des flèches indique l'orientation des gènes. Les flèches blanches représentent deux ISs, ISXo3 et ISXo4. Des mutants ont été construits. Les cercles situés au-dessus des *orf* indiquent une mutation par insertion. Seules les mutations indiquées par un cercle plein noir ont empêché la synthèse de xanthomonadine chez le mutant concerné. Une mutation de l'*orf4* affecte le transport du pigment vers la membrane externe mais ne modifie pas le phénotype des colonies.

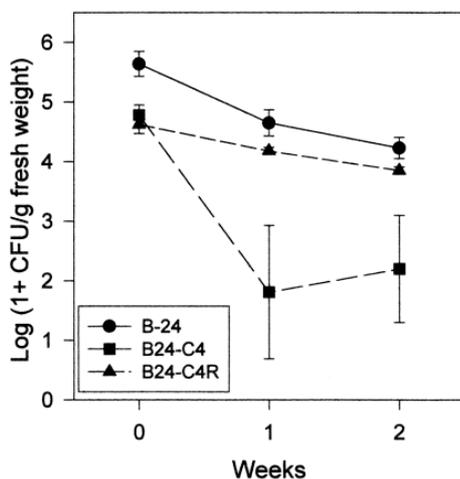


Figure 31 : Survie épiphyte de *X. campestris* pv. *campestris* (B-24), d'un mutant altéré dans sa capacité à produire de la xanthomonadine (B24-C4), et d'un mutant restauré dans cette fonction (B24-C4R) (d'après Poplawsky *et al.*, 2000).

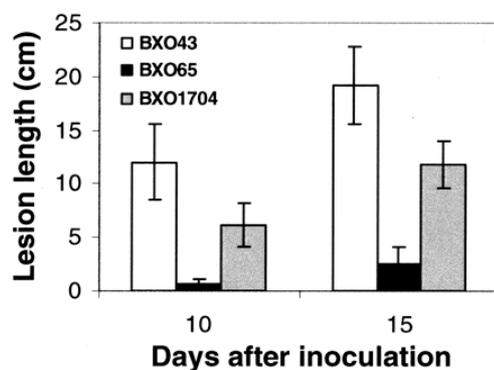


Figure 32 : Tailles des lésions observées 10 à 15 jours après inoculation des feuilles de riz sensible (cultivar Taichung Native-1) avec les souches de *X. oryzae* pv. *oryzae* (BXO43), d'un mutant déficient dans sa capacité à produire la xanthomonadine (BXO65) et du mutant restauré dans sa fonction (BXO1704) (d'après Goel *et al.*, 2001).

la synthèse de xanthomonadine (*orf3*, *orf4*, *orf6*, *orf7* et *orf10*)(figure 30) (Goel *et al.*, 2002)

L'étude de la séquence nommé *pigB* chez la souche B24 de *X. campestris* pv. *campestris* (Poplawsky *et al.*, 2005) a permis d'isoler deux ORFs (Open Reading Frame) : *xanB1* (codant une protéine de type réductase/halogenase) et *xanB2* (codant une protéine de type deoxygénase ptéridine-dépendante). Les enzymes de type desoxygénases ptéridine-dépendantes ont pour fonction l'oxydation d'un hydroxyle en groupement cétone dans différentes voies métaboliques. DF a une structure de type butyrolactone avec des groupements cétones en C1 et C7. Le rôle de *xanB2* serait l'oxydation du C7 d'un précurseur de DF entraînant la production d'un groupement cétone et la formation de la molécule DF finale. Cette étape serait importante pour permettre la reconnaissance du signal et donc l'induction de la production d'EPSs (Poplawsky *et al.*, 2005).

Les mutants altérés dans leurs capacités à produire de la xanthomonadine chez *X. campestris* pv. *campestris* présentent, *in planta*, une survie limitée au niveau de la phyllosphère se traduisant par des populations de tailles largement inférieures aux populations de souches sauvages et aux populations mutantes complémentées (figure 31). La xanthomonadine est donc nécessaire au maintien des populations épiphytes (Poplawsky et Chun, 1998; Poplawsky *et al.*, 2000). Chez *X. oryzae* pv. *oryzae*, un mutant déficient dans sa capacité à produire de la xanthomonadine est moins agressif sur les feuilles de riz (figure 32) (Goel *et al.*, 2001).

Pendant, chez les mutants *pig⁻*, les productions de xanthane et de xanthomonadine peuvent être restaurées par complémentation intracellulaire (introduction d'un plasmide contenant un système *pig* fonctionnel), ou extracellulaire (par croissance à proximité de souches mutées au niveau d'une autre unité transcriptionnelle ou non mutée ou par ajout du facteur diffusible DF dans le milieu) (Poplawsky et Chun, 1997; Poplawsky *et al.*, 1998; Poplawsky *et al.*, 2000). DF agit donc comme un signal pour l'initiation de la production de xanthane. L'inactivation transcriptionnelle du gène *pigB* a pour conséquence une diminution importante de la synthèse de DF et par voie de conséquence de la production de xanthane et de xanthomonadine chez les souches mutantes (Poplawsky et Chun, 1997).

6. Gènes *hrp* et fonctions associées

Les interactions entre une plante et un agent phytopathogène sont soit compatibles soit incompatibles (Vivian et Arnold, 2000). L'incompatibilité se manifeste par une réaction hypersensible (HR) qui a comme conséquence de limiter sévèrement le développement de l'agent pathogène. Celui-ci, par l'intermédiaire de ses éliciteurs ou

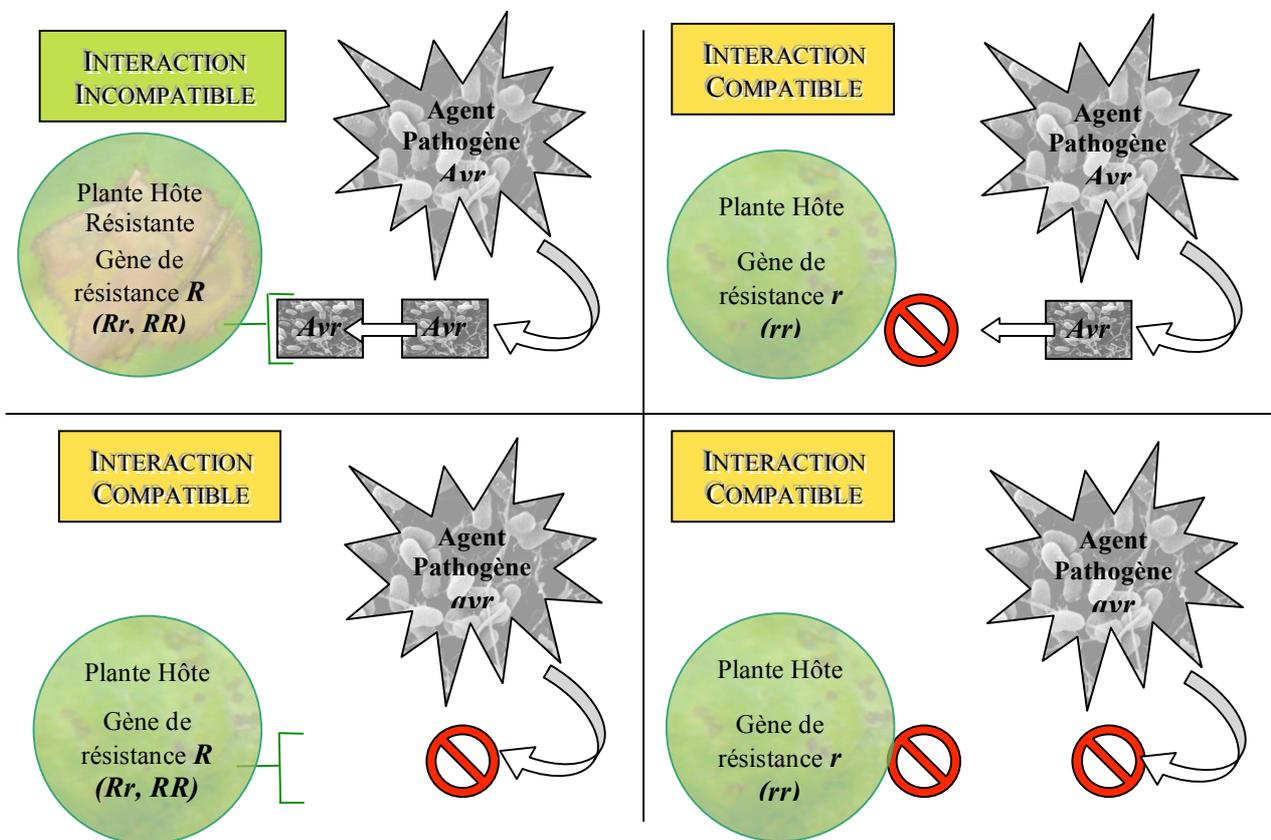


Figure 33: Modèle génétique de l'interaction gène pour gène (d'après Flor, 1971). Cette figure représente les modalités d'interaction entre les gènes de résistance de la plante et les gènes d'avirulence de l'agent pathogène. R , gène de résistance allèle dominant ; r , gène de résistance allèle récessif ; Avr , gène d'avirulence allèle dominant ; avr , gène d'avirulence allèle récessif ; Compatible = maladie ; Incompatible = résistance.

PAMPS (Pathogen-Associated Molecular Patterns) est détecté par les PRRs (Pattern Recognition Receptors) de la plante ce qui déclenche les réactions de défense se matérialisant par la mort des cellules autour du site d'infection en quelques heures seulement (Goodman et Novacky, 1994). Phénotypiquement la mort des cellules (nécrose) est localisée. Il est admis que la nécrose circonscrit l'agent pathogène et entrave sa dissémination dans la plante (Lam *et al.*, 2001).

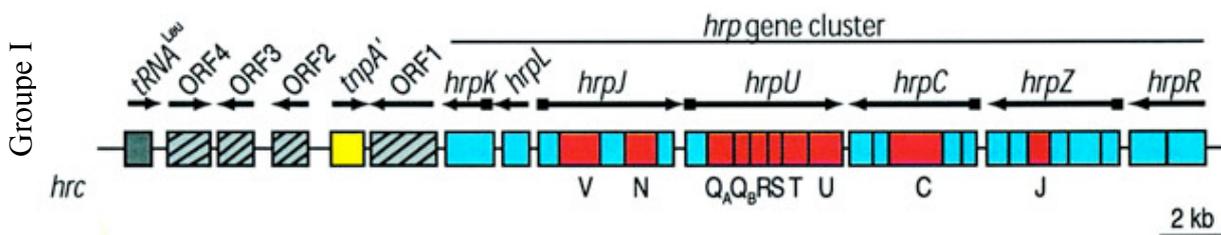
On parle d'incompatibilité de base dans le cas d'une interaction agent pathogène/plante non hôte et d'incompatibilité spécifique dans le cas d'une interaction agent pathogène/plante hôte résistante. Dans ce dernier cas, l'agent pathogène est qualifié d'avirulent. Seule l'interaction entre un agent pathogène et une plante hôte sensible constitue une réaction compatible. L'agent pathogène peut surmonter les défenses de la plante hôte, et finalement engendrer les symptômes de la maladie à travers la production de toxines, d'enzymes extracellulaires et/ou d'autres facteurs (Goodman et Novacky, 1994).

Concernant les bactéries phytopathogènes, des gènes impliqués dans ces interactions compatibles et incompatibles ont été identifiés et désignés sous le terme de gènes *hrp* (pour « hypersensitive reaction and pathogenicity ») et gènes *avr* (avirulence). Les gènes *hrp* déterminent l'issue de l'interaction plante / bactérie, tandis que les gènes *avr* déterminent sa spécificité (Cornelis, 2006; Gurlebeck *et al.*, 2006). La résistance à travers la réaction d'hypersensibilité est le résultat d'une interaction « gène pour gène », pour laquelle un gène *avr* (de l'agent pathogène) correspond à un gène de résistance « *R* » (de la plante) (figure 33) (Flor, 1971). L'interaction directe ou indirecte entre les produits de ces deux gènes conduit à la résistance. L'absence ou l'altération de l'un ou l'autre des gènes conduit au développement de la maladie.

6.1 Découverte des gènes *hrp*, système de sécrétion de type 3

Les gènes *hrp* qui codent le système de sécrétion de type 3 (SST3) ont été découvert chez *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Lindgren *et al.*, 1986). Des mutants dans les gènes *hrp* sont incapables d'induire la réaction hypersensible sur plantes hôtes résistantes ou sur plantes non-hôtes, et sont également incapables de déclencher la maladie sur plantes sensibles (Lindgren, 1997). L'expression des gènes *hrp*, induite *in planta*, permet la mise en place du SST3. Ce SST3 a été identifié chez de nombreuses bactéries phytopathogènes (*Xanthomonas* sp., *Ralstonia* sp., *Pseudomonas* sp., *Erwinia* sp., *Pantoea* sp.), et chez des bactéries pathogènes de l'homme et des animaux (*Salmonella* sp., *Yersinia* sp., *Shigella* sp., *Burkholderia* sp., *Escherichia coli*). Il a également été mis en évidence chez des bactéries non-pathogènes du genre *Pseudomonas* et des bactéries

P. syringae pv. *tomato* DC300



X. axonopodis pv. *vesicatoria*

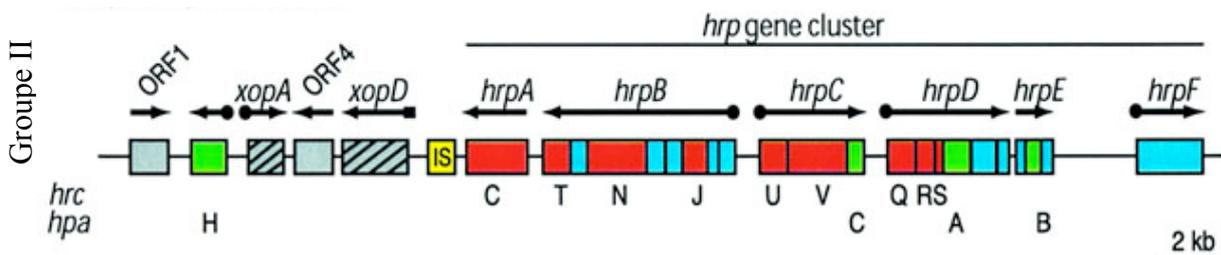


Figure 34 : Représentation schématique des deux types de régions *hrp* rencontrés chez les bactéries phytopathogènes (d'après Buttner et Bonas, 2003). Les régions contiennent les gènes *hrp*, *hrc* et *hpa* (représentés respectivement en bleu, rouge et vert). Les flèches indiquent le sens de la transcription. Des ronds noirs et des carrés noirs se réfèrent respectivement à la présence de boîtes PIP et de boîte *hrp*. Les boîtes hachurées correspondent aux gènes à faible teneur en G + C %. Les boîtes jaunes correspondent à des éléments génétiques mobiles.

symbiotiques du genre *Rhizobium* (He *et al.*, 2004; Cornelis, 2006; Desveaux *et al.*, 2006; Grant *et al.*, 2006).

6.2 Organisation des gènes *hrp*

En règle générale, les gènes *hrp* sont chromosomiques chez les bactéries du genre *Xanthomonas*, *Erwinia* et *Pseudomonas*, mais ils sont portés par un mégaplasme chez les bactéries du genre *Ralstonia* (Boucher *et al.*, 2001). Ils sont regroupés dans une région (de 22 à 35 kb) contenant plus de 20 gènes organisés en 6 à 8 opérons. Parmi ces gènes *hrp*, neuf ont été renommés *hrc* (*hrp conserved*) car ils sont conservés chez toutes les bactéries phytopathogènes qui les possèdent, mais aussi chez certaines bactéries pathogènes des animaux (Bogdanove *et al.*, 1996). Les produits de certains gènes *hrp* sont sécrétés par le SST3 et dirigent le transfert de protéines de virulence bactériennes (effecteurs de type 3) dans les cellules de la plante hôte (Buttner et Bonas, 2003; Desveaux *et al.*, 2006; Grant *et al.*, 2006). Le terme d'effecteur de type 3 a été proposé afin d'englober toutes les protéines qui transitent vers la plante via le système *hrp*, où ils fonctionnent en tant qu'éliciteurs ou facteurs de virulence (van Dijk *et al.*, 1999). Alfano et Collmer (1997) ont classé les bactéries phytopathogènes en deux groupes (figure 34), en se basant sur des similarités de structure et de régulation d'expression des gènes *hrp* :

- groupe I : *E. amylovora* et *P. syringae* (SST3 - Famille Hrp1 ; Cornelis, 2006),
- groupe II : *R. solanacearum* et *Xanthomonas spp.* (SST3 - Famille Hrp2 ; Cornelis, 2006).

Ces deux groupes se différencient principalement par leur système de régulation (Alfano et Collmer, 1997; Lindgren, 1997). Les gènes *hrp* du groupe I sont activés par le facteur sigma HrpL, alors que les gènes *hrp* du groupe II sont activés par un régulateur transcriptionnel de la famille AraC, HrpB pour *R. solanacearum* et HrpX pour *X. campestris* (Wei et Beer, 1995; Wengelnik et Bonas, 1996).

Les gènes *hrp/hrc* sont regroupés dans des îlots du pouvoir pathogène chez certaines bactéries phytopathogènes (Kim *et al.*, 2003). Ces îlots sont caractérisés par la présence de nombreux gènes associés au pouvoir pathogène, un pourcentage C+G plus bas par rapport au reste du génome et ils sont bordés par des éléments génétiques mobiles (IS) et des ARNt (Brunings et Gabriel, 2003; Brunings et Gabriel, 2003). Le séquençage des génomes de *Ralstonia solanacearum*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. citri* subsp. *citri* et *P. syringae* pv. *tomato* établit la présence de ces îlots (Lavie *et al.*, 2004). Les séquences en amont et en aval de cette région montrent des variabilités entre les différentes espèces de *Xanthomonas spp.* (Buttner et Bonas, 2003).

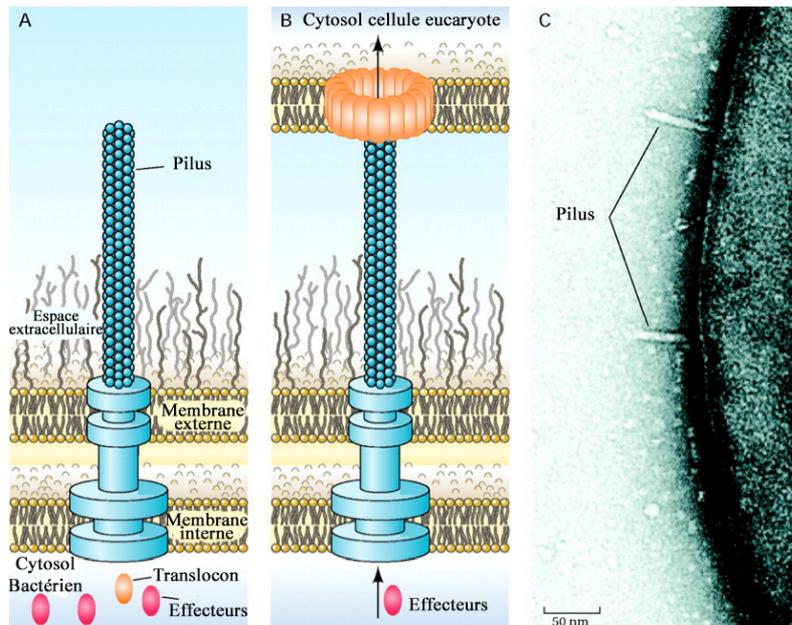


Figure 35 : Pilus du système de sécrétion de type 3 (d'après Troisfontaines et Cornelis 2005). (A) Injectisome au repos. Les deux anneaux forment le corp basal du SST3 sont représentés ainsi que le pilus avançant à l'extérieur de la bactérie. Les effecteurs et le translocon sont stockés au sein du cytosol de la bactérie. (B) Injectisome en action. Le translocon forme un pore dans la membrane de la cellule cible et les effecteurs peuvent alors être transféré dans le cytosol de cette cellule cible. (C) Photographie de la surface d'une cellule de *Yersinia enterocolitica* et ses pilus observés au microscope électronique.

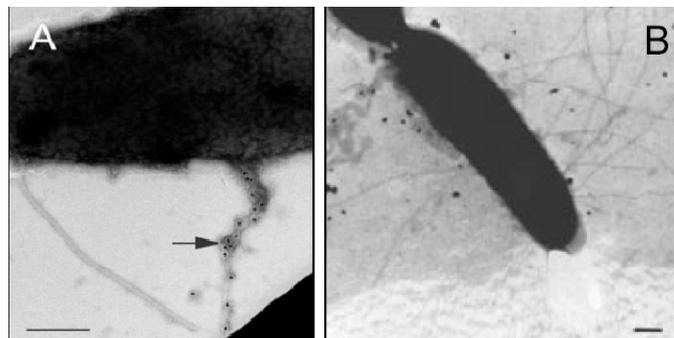


Figure 36 : Photographie en microscopie électronique des pili *hrp* de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (d'après Weber *et al.*, 2005). (A) Marquage du pilus *hrp* avec un anticorps anti-HrpE marqué à l'or. La structure non marquée est un flagelle. Les points noirs dans le pilus *hrp* sont des particules d'or de 10 nm de diamètre. (B) Détection des pili *hrp* dans un mutant *hrpF* démontrant que sa synthèse ne dépend pas du translocon. La détection du pilus se fait par coloration négative de la bactérie à l'acide phosphotungstique 2% après culture sur la grille de microscopie en milieu minimum. Barre d'échelle = 200 nm.

6.3 Structure et rôle du système de sécrétion de type 3

Le SST3 est spécialisé dans la sécrétion de protéines dans le cytosol de la cellule de la plante grâce notamment à une structure filamenteuse extracellulaire, le pilus (figure 35) (Hueck, 1998; Vivian et Arnold, 2000; Troisfontaines et Cornelis, 2005; Cornelis, 2006). Ce pilus a été identifié chez plusieurs bactéries pathogènes des plantes dont *P. syringae* pv. *tomato*, *E. amylovora*, *R. solanacearum* et *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. La protéine majeure constitutive de ce pilus est codée par *hrpE* chez *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (figure 36) (Weber *et al.*, 2005; Weber et Koebnik, 2006; Weber et Koebnik, 2006). Le pilus a un diamètre d'environ 6 à 8 nm (Van Gijsegem *et al.*, 2000) et peut s'étendre de plusieurs micromètres (Romantschuk *et al.*, 1991). Il sert de conduit pour sécréter les protéines effectrices dans la cellule végétale (Brown *et al.*, 2001). Récemment les opérons *hrpE* et *hrpD* ont été décrits chez *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Weber *et al.*, 2007). L'opéron *hrpD* contient les gènes *hrcQ*, *hrcR*, *hrcS* et *hpaA*, tandis que *hrcD*, *hrpD6* et *hrpE* appartiennent à l'opéron *hrpE*. Le site de début de la transcription de l'opéron *hrpE* a été repéré et présente un promoteur en amont de *hrcD* qui contient une boîte PIP (« Plant-Inducible Promoter »). Les structures secondaires des ARNm sont conservées dans la région intergénique entre *hrpD6* et *hrpE* suggérant qu'il existe une régulation post-transcriptionnelle d'*hrpE* (Weber *et al.*, 2007).

Un autre élément est requis pour la sécrétion des effecteurs dans la cellule hôte, il s'agit du translocon. Celui-ci est sécrété à l'extrémité du pilus et forme une structure telle un canal au niveau de la membrane plasmique de l'hôte. Il permettrait le transfert des effecteurs dans le cytoplasme de la cellule (Wei *et al.*, 2000). Le gène *hrpF* de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* est le premier gène connu codant le translocon. Des études révèlent que HrpF n'est pas nécessaire pour la sécrétion *in vitro* mais qu'il est indispensable pour une interaction avec la plante. Les mutants affectés dans le gène *hrpF* ne sont pas capables de croître, de causer des symptômes sur plantes sensibles ou d'induire une HR sur plante résistante (Buttner et Bonas, 2002). Les mutants *hrpF* sécrètent les protéines *via* le SST3 dans le milieu de culture, mais ne peuvent plus transloquer les protéines dans les cellules végétales (Rossier *et al.*, 2000). De plus, HrpF peut former des pores dans des bicouches lipidiques artificielles, ce qui est congruent avec un rôle de translocateur (Buttner *et al.*, 2002). Il a été montré récemment chez *X. oryzae* pv. *oryzicola* qu'un mutant dans le gène *hrpF* était incapable de produire une HR sur tabac et des symptômes sur des plants de riz adultes alors qu'il était toujours capable de produire des symptômes de type « water-soaking » sur des plantules de riz (Zou *et al.*, 2006).

D'autres gènes du « core » du système comme les protéines HrcS, HrcT et HrcR, participent à la formation du SST3 chez *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* et ils sont essentiels pour la sécrétion de protéines *in vitro* (Rossier *et al.*, 2000). Il en est de même pour HrcJ chez *P. syringae* pv. *syringae* (Deng et Huang, 1999). La protéine HrpB2 est elle aussi requise dans la sécrétion via le SST3 et impliquée dans la colonisation (Rossier *et al.*, 1999). Chez *P. syringae* pv. *syringae*, le système de SST3 est nécessaire à la multiplication et probablement à la survie de l'agent pathogène sur son hôte le haricot (Hirano *et al.*, 1997; Hirano *et al.*, 1999). Des mutants de *P. syringae* pv. *syringae* affectés dans les gènes *hrcC* et *hrpJ* sont altérés dans leurs capacités à coloniser non seulement la surface foliaire mais aussi les espaces intercellulaires (Deng et Huang, 1999).

Les gènes *hpa* (*hrp-associated*) contribuent à l'interaction avec la plante hôte (Buttner et Bonas, 2002) et peuvent jouer un rôle dans le pouvoir pathogène comme cela a été montré pour *hpaB* chez *X. oryzae* pv. *oryzae* ou *hpaR* chez *X. campestris* pv. *campestris* (Wei *et al.*, 2007). L'analyse de la région de *hpaB-hrpF* a montré qu'elle comprend des gènes codant un nouveau facteur de virulence HpaE, un effecteur XopF1, et deux protéines de fonctions inconnues, HpaD et HpaI (Buttner *et al.*, 2007). Les analyses de transcription ont montré que ces gènes sont co-exprimés avec les gènes *hrp* et que *hpaD*, *hpaI*, et *xopF1* forment un nouvel opéron. Des analyses *in vitro* et *in vivo* ont révélé qu'un fonctionnement efficace du SST3 et de la translocation de XopF1 étaient dépendants d'une protéine chaperone HpaB et de HpaH, laquelle contribue spécifiquement à la sécrétion d'un certain nombre d'effecteurs (Buttner *et al.*, 2007). Il semble donc que la sécrétion efficace d'effecteurs chez *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* exige la contribution de plusieurs protéines Hpa.

6.4 Fonctionnement et régulation du SST3

Le SST3 est un système *sec* - indépendant, c'est-à-dire que la sécrétion des protéines par l'appareil est réalisée sans que celles-ci ne présentent un signal d'exportation en N-terminal comme c'est le cas pour les SST2 et 4 dits *sec* - dépendant. Cependant, il a été proposé qu'un signal de sécrétion soit localisé dans les 15 premiers codons de l'ARN messager codant pour les protéines sécrétées (Hueck, 1998). L'activation du système de sécrétion nécessite un contact de la bactérie avec la cellule végétale et il n'est pas spécifique d'un agent pathogène pour une plante hôte donnée. Ce sont les effecteurs transportés par cette structure qui leur confère une spécificité d'hôte (Brunings et Gabriel, 2003).

La sécrétion de nombreuses protéines effectrices requiert l'intervention de protéines chaperonnes. Ces protéines chaperonnes confèrent une stabilité de conformation

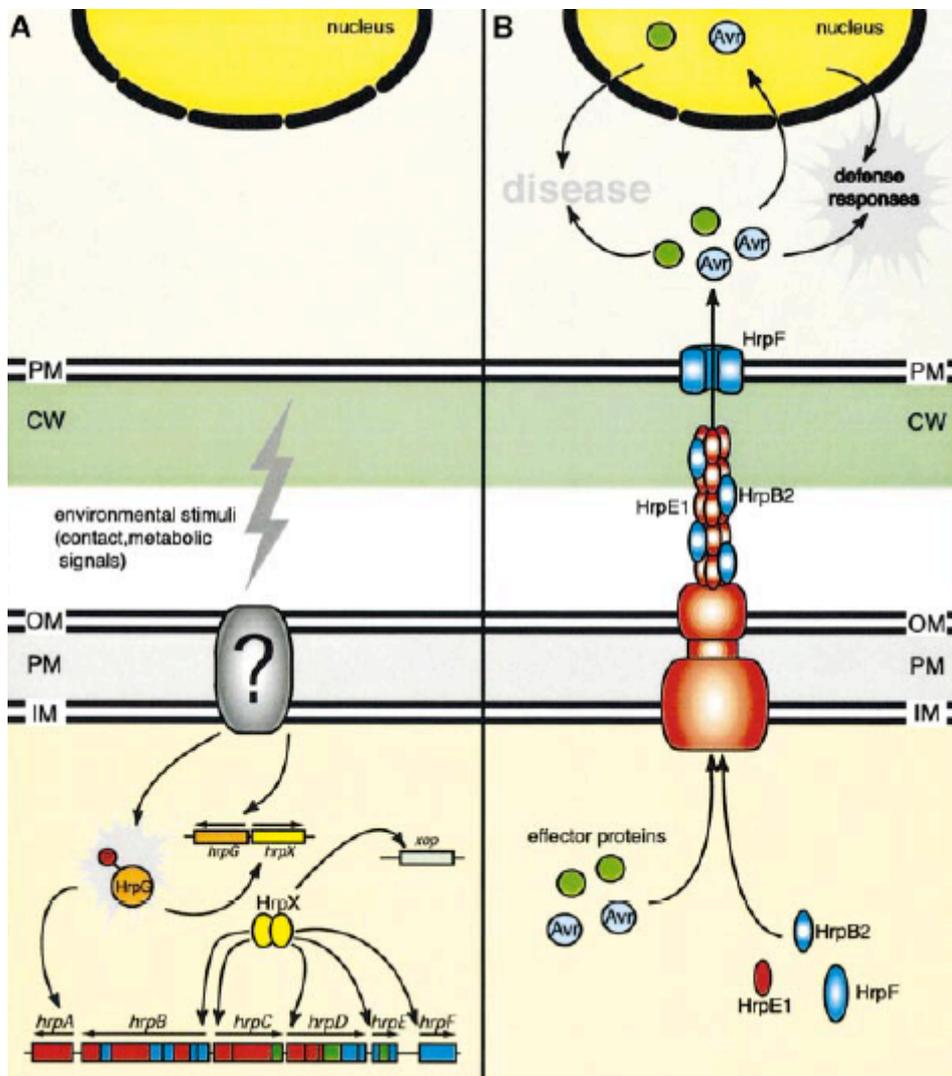


Figure 37 : Modèle de régulation concernant le gène *hrp* et le système de sécrétion de type 3 chez *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (d'après Büttner et Bonas, 2002). CW : paroi cellulaire; IM : membrane interne ; OM : membrane externe ; PM : membrane plasmique.

des effecteurs, préservant ainsi leurs fonctions biochimiques (Hueck, 1998). Les protéines chaperonnes étaient encore récemment peu connues chez les bactéries pathogènes de plantes mais leur présence est de plus en plus fréquemment signalée (Buttner *et al.*, 2007). Ainsi, Wehling et ses collaborateurs ont démontré que la protéine HopPtoV de *P. syringae* pv. *tomato* est sécrétée dans la cellule hôte via le SST3 de manière dépendante de la protéine chaperonne ShcV (Wehling *et al.*, 2004).

Les protéines impliquées dans la régulation des gènes *hrp* varient suivant les différents groupes d'agents pathogènes. Chez *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, l'expression des gènes *hrp* est contrôlée par HrpX, un activateur transcriptionnel de la famille AraC, lui-même activé par HrpG, activateur transcriptionnel de la famille OmpR d'un système régulateur à deux composantes (Wengelnik *et al.*, 1996; Noel *et al.*, 2001). Les deux gènes *hrpG* et *hrpX*, proches l'un à l'autre et situés à l'extérieur de la région *hrp*, ont des régions promotrices différentes. Un système de réception/transduction de signal non encore caractérisé (figure 37), situé au niveau de l'enveloppe de la bactérie transmet un signal à HrpG sous l'influence de stimuli environnementaux. HrpG active alors l'expression de *hrpA* et, via HrpX, l'expression de *hrpB-hrpF*. Les régions promotrices de *hrpB*, *hrpC*, *hrpD* et *hrpF* contiennent une boîte PIP (TTTCG-N15-TTTCG) qui correspondrait au site de fixation de la protéine HrpX (Wengelnik *et al.*, 1996; Koebnik *et al.*, 2006). De plus, l'expression de tous les gènes *hrp* étant supprimée pour les mutants *hrpG*, il est admis que HrpG est une protéine de réponse régulatrice, mais également la première protéine impliquée dans la cascade de régulation pour l'activation des gènes *hrp* comme cela a été mis en évidence chez *R. solanacearum* (Wengelnik *et al.*, 1996)

Des boîtes PIP ont également été identifiées chez *X. campestris* pv. *campestris* et *X. citri* subsp. *citri* dans les promoteurs des gènes *hrp* et de gènes codant des protéines présentant des homologies de séquences avec des enzymes de dégradation de la paroi végétale, des protéases et un récepteur de Fer (da Silva *et al.*, 2002). Ainsi, on compte respectivement 17 et 20 gènes potentiellement régulés par HrpX chez *X. campestris* pv. *campestris* et *X. citri* subsp. *citri* (da Silva *et al.*, 2002).

Chez *R. solanacearum*, la régulation des gènes *hrp* se fait via HrpG et HrpB, respectivement homologues à HrpG et HrpX de *Xanthomonas* (Genin *et al.*, 1992; Brito *et al.*, 1999). L'étude du génome a révélé un motif particulier, la boîte *hrpII* (TTTCG-N₁₆-TTTCG), responsable de l'activation du SST3 et de gènes effecteurs par HrpB (Cunnac *et al.*, 2004). De plus, il a été montré que les gènes *hrp* pouvaient être activés spécifiquement par la protéine de la membrane externe PrhA (*Plant regulator of hrp genes*) suite à un contact avec la plante (Marenda *et al.*, 1998). Cette protéine semble être au sommet de la cascade de régulation conduisant à l'expression des gènes *hrp*. PrhA présente des

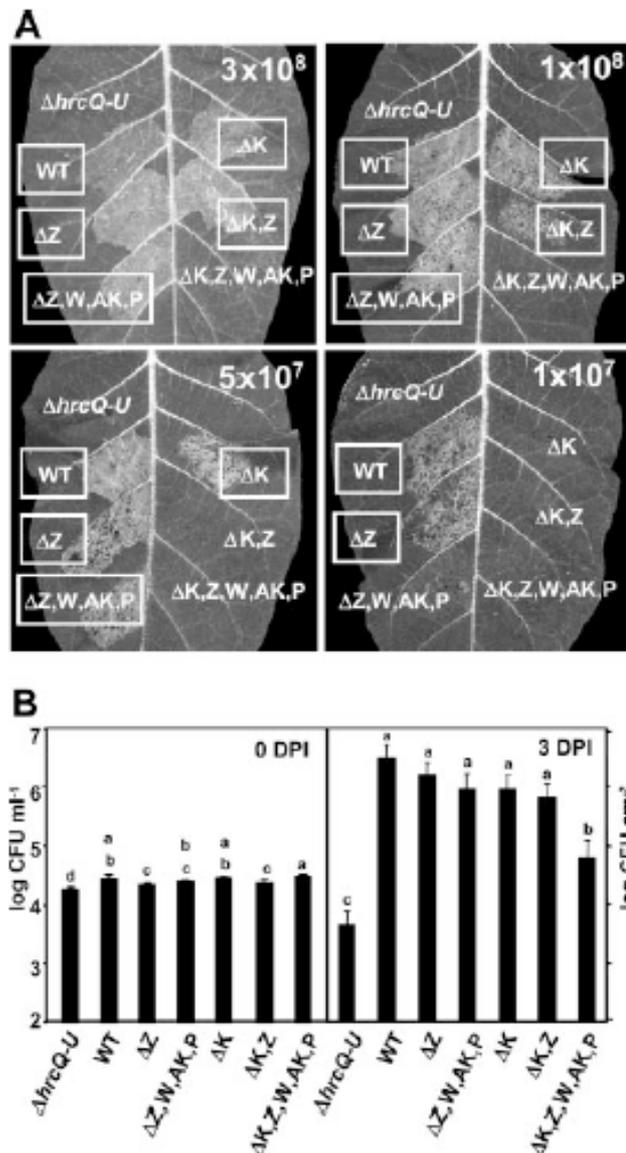


Figure 38 : Combinaison de mutations des gènes *hrpZ1*, *hrpW1*, *hopAK1* et *hopP1* chez *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (d'après Kvitko *et al.*, 2007). (A) Elicitation de la HR 24h après infiltration des feuilles de tabac. Les souches sont infiltrées avec quatre concentrations différentes (3×10^8 UFC mL⁻¹, 1×10^8 UFC mL⁻¹, 5×10^7 UFC mL⁻¹, 1×10^7 UFC mL⁻¹). Les souches qui engendrent une HR sont encadrées. (B) Quantification des tailles des populations bactériennes après inoculation de feuilles de tomates.

similarités de séquence avec les récepteurs de sidérophores TonB-dépendants et pourrait agir comme un senseur d'une molécule non-diffusible, originaire de la paroi de la cellule végétale (Aldon *et al.*, 2000; Brito *et al.*, 2002). Un gène *prhA* a été identifié pour la première fois chez un *Xanthomonas*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, où il joue un rôle essentiel quant au phénotype associé aux gènes *hrp*. Il se situe à l'extérieur des régions *hrp* impliquées dans la sécrétion et dans la régulation du SST3 (Zou *et al.*, 2006). Un mutant *prhA*⁻ est incapable d'induire une HR sur tabac et n'est pas capable d'engendrer des symptômes sur des plants de riz adultes (Zou *et al.*, 2006).

7. Effecteurs du système de sécrétion de type 3

7.1 Harpines

La première harpine HrpN a été isolée chez *E. amylovora*. Depuis d'autres harpines ont été identifiées chez de nombreuses bactéries phytopathogènes qui possèdent un SST3. Parmi ces harpines identifiées, on peut citer PopA (Arlat *et al.*, 1994) et RSc2775/Brg6 (Cunnac *et al.*, 2004) de *R. solanacearum* ou la famille Hpa1/HpaG chez *Xanthomonas* spp. (Zhu *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003). Les harpines partagent des caractéristiques communes. Ce sont des protéines riches en glycine et en acides aminés hydrophiles. Elles ne possèdent pas de résidus cystéine. De plus, elles sont stables à la chaleur, ce qui suggère qu'elles n'ont pas d'activité enzymatique (Wei *et al.*, 1992).

Les harpines ne sont pas impliquées dans la structure de l'appareil de sécrétion. Elles sont dirigées vers la paroi externe des cellules de l'hôte et participent au transport des effecteurs de type 3 dans les cellules de la plante hôte (Vivian et Arnold, 2000). Ce sont des éliciteurs de mécanismes non spécifiques de défense de la plante dépendants du cluster *hrp* pour leur sécrétion (Huang *et al.*, 1995). La harpine HrpN purifiée d'*E. amylovora* induit différentes voies de signalisation qui interviendraient dans les étapes précoces de développement de l'interaction compatible (*Malus* spp.) ou incompatible non-hôte (*Arabidopsis thaliana*) (Reboutier *et al.*, 2007). Les harpines ont la capacité d'éliciter une HR lorsqu'elles sont inoculées individuellement à la surface des plantes (Galan et Collmer, 1999). Chez *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, quatre protéines possèdent les caractéristiques des harpines, HrpZ1, HrpW1, HopAK1 et HopP1 (Kvitko *et al.*, 2007). Elles participent au transfert des effecteurs de type 3 dans les cellules de la plante hôte mais aucune de ces quatre harpines n'est indispensable au transfert de ces effecteurs. Néanmoins, la mutation cumulée des quatre harpines réduit significativement la capacité de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 à induire la HR sur tabac (Figure 38) ainsi que sa multiplication sur plante hôte (Kvitko *et al.*, 2007).

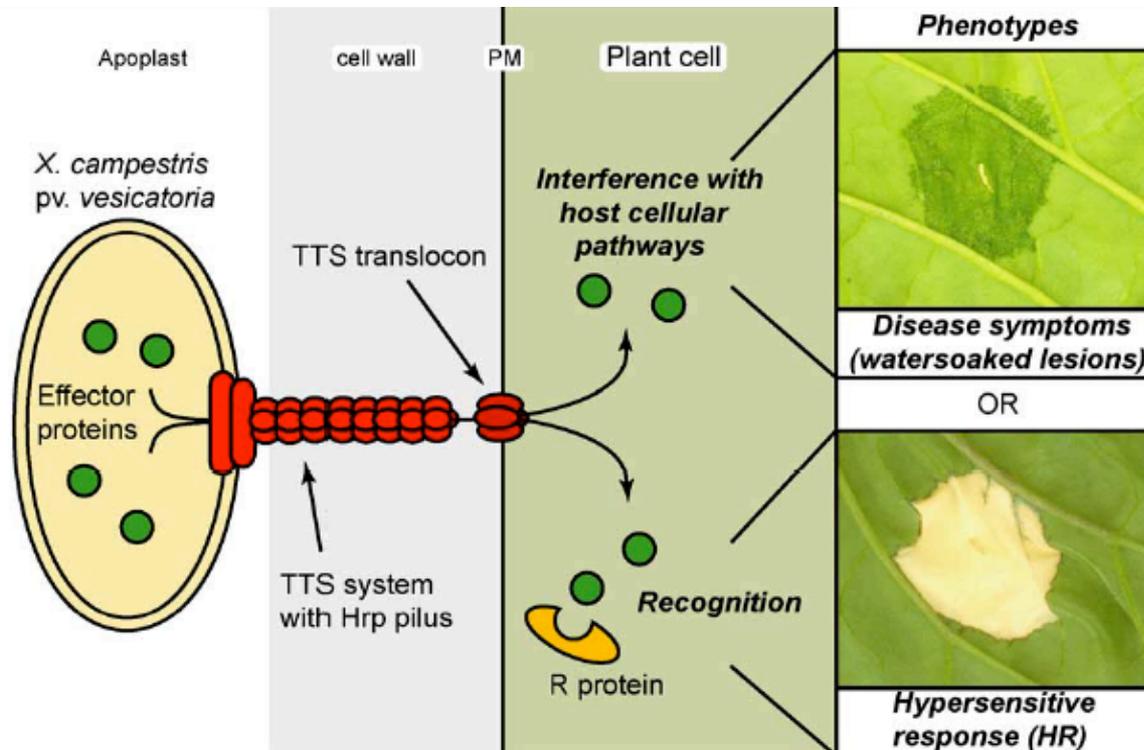


Figure 39 : Modèle représentant l'interaction de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* avec des plantes hôtes sensibles et résistantes (d'après Büttner *et al.*, 2003). Le SST3 de la bactérie traverse les deux membranes bactériennes ainsi que la paroi cellulaire de la plante. Dès le contact avec la cellule hôte, les protéines effectrices sont libérées à travers le SST3 dans le cytosol de la plante hôte. Chez les plantes sensibles, les protéines effectrices interfèrent avec les mécanismes de la plante hôte, aboutissant finalement à l'apparition des symptômes de la maladie (tâches humides...). Chez les plantes résistantes, les protéines effectrices sont reconnues par les protéines R induisant la réaction d'hypersensibilité. Les photographies des plantes ont été prises trois jours après inoculation. La source d'inoculum était composée d'une culture dense de bactéries déposées sur les feuilles de poivrons sensibles et résistants. PM : membrane plasmique ; TTS : sécrétion de type 3.

7.2 Protéines Avr et autres effecteurs

7.2.1 Découverte des gènes d'avirulence

Le gène *avrA* est le premier gène *avr* qui a été isolé chez *P. syringae* pv. *glycinea*, (Staskawicz *et al.*, 1984). Les protéines Avr induisent une réaction d'hypersensibilité chez l'hôte résistant. L'obtention d'une telle réaction incompatible rend l'agent pathogène avirulent, d'où le nom donné à ces protéines. En l'absence d'un gène *avr* ou alors du gène *R* correspondant chez la plante, il n'y a pas de reconnaissance de l'agent pathogène par la plante permettant au processus infectieux de se poursuivre (figure 39). Les protéines Avr sont donc impliquées dans le contrôle de la spécificité parasitaire de la bactérie.

Les gènes *avr* ont longtemps été considérés comme ayant uniquement un impact négatif sur la capacité de l'agent pathogène à infecter une plante hôte. Mais la fonction primaire de ces gènes n'est certainement pas d'induire leur reconnaissance par la plante hôte, sinon de tels gènes n'auraient pas persisté dans les populations d'agents pathogènes car ils ne présenteraient aucun avantage sélectif. Il a ensuite clairement été mis en évidence que les gènes *avr* ont une fonction double, aussi bien au niveau de l'avirulence que de la virulence (White *et al.*, 2000). Aujourd'hui de nombreux gènes *avr* sont connus en tant que facteurs de virulence engagés dans la médiation de l'interaction plante-pathogène (Guttman *et al.*, 2002; Roden *et al.*, 2004).

7.2.2 Identification des effecteurs de type 3, prédiction *in silico*

L'identification des protéines d'avirulence des agents pathogènes a d'abord été basée sur leur reconnaissance par les protéines de résistance des plantes suite à des études de translocation et des observations *in vivo* (Guttman *et al.*, 2002; Roden *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2005). L'identification de nouveaux effecteurs a été limitée par la disponibilité de plantes hôtes (mutants ou variants naturels) résistantes aux bactéries. Des criblages à l'échelle génomique, des criblages génétiques et bioinformatiques chez *P. syringae* (Boch *et al.*, 2002; Fouts *et al.*, 2002) et analyses par cDNA-AFLP chez *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Noel *et al.*, 2001) ont alors été réalisés afin d'identifier des gènes bactériens régulés par le SST3. Aujourd'hui, les données issues des séquençages des génomes bactériens ont permis d'identifier un très grand nombre d'effecteurs de type 3. La disponibilité des séquences des génomes de *P. syringae* (Buell *et al.*, 2003), *R. solanacearum* (Salanoubat *et al.*, 2002), *X. citri* subsp. *citri* et *X. campestris* pv. *campestris* (da Silva *et al.*, 2002) a permis le développement d'algorithmes informatiques pour identifier des substrats du SST3. Les critères recherchés sont l'orthologie avec des effecteurs du SST3 connus, la présence d'éléments promoteurs *hrp*-dépendants impliquant

Tableau 4 : Exemples de fonctions connues ou prédites d'effecteurs type 3 (d'après Grant *et al.*, 2006)

Fonction	Organisme	Effecteur type III	Ancien nom	
Papain cystéine protéases (YopT-like)	<i>P. syringae</i>	HopC1	HopPtoC	
		HopN1	HopPtoN	
		HopAR1	AvrPphB	
Staphopain cystéine protéases	<i>P. syringae</i>	AvrRpt2	AvrRpt2	
Ubiquitine-like SUMO protéases (C48)	<i>X. campestris</i>	XopD	XopD	
YopJ-like SUMO protéases (C55)	<i>P. syringae</i>	HopZ2	AvrPpiG	
		AvrXv4	AvrXv4	
	<i>X. campestris</i>	AvrBsT	AvrBsT	
		AvrRxv	AvrRxv	
		<i>R. solanacearum</i>	PopP1	PopP1
			PopP2	PopP2
Tyrosine phosphatases	<i>P. syringae</i>	HopAO1	HopPtoD2	
Facteurs transcriptionnels	<i>Xanthomonas spp.</i>	Famille	Famille	
		AvrBs3/PthA	AvrBs3/PthA	
Glycérophosphoryle diester phosphodiesterase	<i>X. a. pv. vesicatoria</i>	AvrBs2	AvrBs2	
Syringolide synthase	<i>P. syringae</i>	AvrD	AvrD	

une régulation avec le régulon *hrp* (Fouts *et al.*, 2002; Zwiesler-Vollick *et al.*, 2002; Cunnac *et al.*, 2004) et/ou des motifs peptidiques N-terminaux caractéristiques d'exportation (Guttman *et al.*, 2002; Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2005).

De nombreux autres effecteurs ont alors été identifiés et ont été appelés Hop (Hrp outer proteins) chez *Pseudomonas* (Alfano et Collmer, 1997), Xop (*Xanthomonas* outer proteins) chez *Xanthomonas* (Noel *et al.*, 2001) ou Pop (*Pseudomonas* outer proteins) chez *Ralstonia solanacearum* (Arlat *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 2006). Ces protéines peuvent avoir des caractéristiques de protéines eucaryotes telles des séquences d'adressage nucléaire fonctionnelle (AvrBs3, PopB) ou des motifs d'interaction protéine-protéine avec des répétitions riches en leucine (PopC) (Van den Ackerveken *et al.*, 1996; Gueneron *et al.*, 2000), évoquant des rôles possibles dans la cellule hôte.

Le séquençage des génomes de *P. syringae*, *R. solanacearum* et *Xanthomonas spp.* a ainsi permis l'identification de plus d'une centaine d'effecteurs potentiels du SST3 (Puhler *et al.*, 2004; Grant *et al.*, 2006). Par exemple, une cinquantaine d'effecteurs potentiels ont été identifiés dans le génome de la souche GMI1000 de *R. solanacearum* (Salanoubat *et al.*, 2002). Vingt gènes d'effecteurs potentiels du SST3 ont été identifiés dans les génomes de *X. campestris* pv. *campestris* (souche ATCC33913) et *X. citri* subsp. *citri* (souche 306) (da Silva *et al.*, 2002). Le séquençage de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 85-10 a permis d'identifier 14 effecteurs déjà connus mais aussi XopC dont un homologue est présent chez *Ralstonia solanacearum* mais pas chez d'autres génomes bactériens du genre *Xanthomonas* (Thieme *et al.*, 2005). La faible teneur en G+C% ainsi que l'absence d'homologue chez les bactéries du genre *Xanthomonas* suggère qu'il s'agit d'une acquisition par transfert horizontal (Noel *et al.*, 2003). Les effecteurs uniques tels que XopC semblent importants pour la spécificité d'hôte tandis que d'autres effecteurs présents chez plusieurs espèces bactériennes comme XopQ laisse supposer qu'ils ont un rôle plus général dans la virulence (Roden *et al.*, 2004; Rohmer *et al.*, 2004).

7.2.3 Fonctions des effecteurs de type 3

Les effecteurs sont nombreux ce qui n'est pas le cas des produits des gènes de résistance connus qui leurs sont associés chez les différentes espèces de plantes (Dangl et Jones, 2001). Cela suggère que les plantes utilisent des mécanismes semblables pour détecter une large gamme d'effecteurs afin de se défendre et d'éviter le développement de l'agent pathogène. Pourtant, bien que la séquence en acides aminés puisse varier considérablement chez les différents effecteurs, certains d'entre eux sont homologues et ont été regroupés en famille avec de nombreuses fonctions connues ou prédites (tableau 4) (Grant *et al.*, 2006).

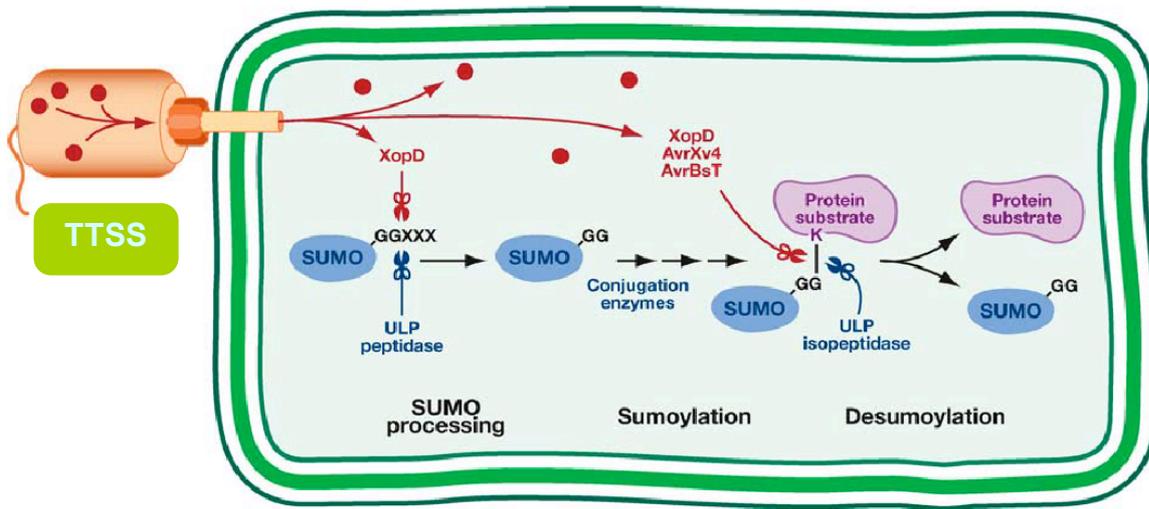


Figure 40 : Mode d'action des effecteurs de type III de la famille cystéine protéase (d'après Mudgett *et al.*, 2005). Les effecteurs tels que XopD, AvrBsT et AvrXv4 semblent être identiques à l'Ulp peptidase de la levure qui coupe la liaison entre la protéine cible et la protéine SUMO.

a. Les effecteurs supprimeurs des mécanismes de défense des plantes

Certains des effecteurs, comme par exemple AvrPtoB de *P. syringae* pv. *tomato*, peuvent inhiber la mort programmée de la cellule végétale en intervenant dans la suppression de la voie de défense déclenchée par l'intermédiaire du gène de résistance *pto* (Abramovitch et Martin, 2005). Cette inhibition pourra donc supprimer la réponse de type HR de la plante hôte.

De plus en plus de données suggèrent aussi que les bactéries phytopathogènes modulent les voies de défense utilisant l'éthylène, l'acide jasmonique et l'acide salicylique pour coloniser leurs hôtes. La production de la coronatine par *P. syringae* pv. *tomato* couplée à des effecteurs de type 3 (HopPtoK, AvrPphE, AvrB, AvrRpt2, AvrPphB), activent la voie de l'acide jasmonique elle-même antagoniste de la voie de l'acide salicylique ayant pour conséquence d'inhiber ou de retarder le développement des mécanismes de défense de la plante (Zhao *et al.*, 2003; He *et al.*, 2004).

Les mécanismes de défense liés à la paroi des cellules de l'hôte (formation de papille, dépôt de callose) constituent d'autres cibles d'action des effecteurs de type 3. Il a ainsi été montré que le gène *avrPto* de *P. syringae* pv. *tomato* intervient dans la prévention du dépôt de callose au niveau de la paroi cellulaire de la plante hôte (Hauck *et al.*, 2003). D'autres effecteurs qui semblent avoir le même rôle sont HopPtoM et AvrE de *P. syringae* pv. *tomato* et aussi DspA/E d'*E. amylovora* (DebRoy *et al.*, 2004).

b. Les effecteurs de la famille des cystéines protéases

Basé sur l'analyse de séquences, d'autres effecteurs de type 3 ont été classés en quatre familles : la famille AvrRxx/YopJ (C55) (Orth *et al.*, 2000), la famille XopD (C48) (Hotson *et al.*, 2003), la famille HopAR1/YopT (C58) (Shao *et al.*, 2002) et la famille AvrRpt2 (C70) (Mudgett et Staskawicz, 1999). Les membres de la famille AvrRxx/YopJ ont été identifiés chez les mammifères et les pathogènes des plantes et jouent un rôle important dans l'interaction avec l'hôte (Noel *et al.*, 2001; Lavie *et al.*, 2002; Deng *et al.*, 2003; Deslandes *et al.*, 2003; Noel *et al.*, 2003). Tous les membres de cette famille contiennent un domaine catalytique conservé qui est nécessaire à l'induction d'une HR (Orth *et al.*, 2000; Hotson *et al.*, 2003; Roden *et al.*, 2004). Chez *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, les protéines XopD, AvrXv4 et AvrBsT sont des protéases à cystéine qui déstabilisent par désumoylation les protéines végétales conjuguées aux protéines Sumo (figure 40) (Astua-Monge *et al.*, 2000; Hotson *et al.*, 2003; Roden *et al.*, 2004). Le fait qu'un agent pathogène délivre un ensemble de protéines avec des fonctions semblables dans la cellule de la plante hôte tout en se localisant dans différents compartiments serait

Tableau 5 : Membres de la famille AvrBs3 répertoriés dans le genre *Xanthomonas* (d'après Schornack *et al.*, 2006).

Nom de la souche Nom des gènes	Numero d'accession - GenBank	Structure des répétitions	Gène de Résistance	Plante hôte
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>				
AvrBs3	X16130, CAA34257	17.5×34	Bs3	Poivron
AvrBs4	X68781, CAA48680	17.5×34	Bs4	Tomate
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>				
AvrXa3	AY129298, NC_006834, AAN01357	8.5×34	Xa3	Riz
AvrXa5	AY377126, AAQ79773	5.5×34	Xa5	Riz
AvrXa7	AF262933, AAF98332, AAF98343	25.5×34	Xa7	Riz
AvrXa10	U50552, AAA92974	15.5×34	Xa10	Riz
AvrXa27	AY986494, AAY54168	16.5×34	Xa27	Riz
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>				
Avr/pth3	AY875712, AAW59492	15.5×34		
Avr/pth13	AY875711, AAW59491	5.5×34		
Avr/pth14	AY875713, AAW59493	19.5×34		
<i>X. campestris</i> pv. <i>armoraciae</i>				
Hax2	AY993937	21.5×35		
Hax3	AY993938	11.5×34	Bs4	Tomate
Hax4	AY993939	14.5×34	Bs4	Tomate
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>				
Avrb6	L06634, AAB00675	13.5×34	B1	Coton
PthN	AF016221, AAB69865	13.5×34		
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>				
Apl1	AB021363, BAA37119	17.5×34		
Apl2	AB021364, BAA37120	15.5×34		
Apl3	AB021365, BAA37121	23.5×34		
PthA	U28802, AAC43587	17.5×34		
PthA1	XACa0022, AAM39226	16.5×34		
PthA2	XACa0039, AAM39243	15.5×34		
PthA3	XACb0015, AAM39261	15.5×34		
PthA4	XACb0065, AAM39311	17.5×34		
PthB	AY228335, AAO72098	17.5×34		
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>				
pTHB	AF012325, AAD01494	12.5×34		

* la structure des répétitions correspond au nombre de répétitions du motif de 34 acides aminés répétés.

probablement une manière très efficace d'attaquer un éventail de protéines végétales en imitant différentes protéases des protéines Sumo de la plante (Gurlebeck *et al.*, 2006).

c. Autres effecteurs ayant une activité enzymatique

Le gène *avrBs2* est un gène d'avirulence pour lequel un rôle dans l'agressivité a été démontré (White *et al.*, 2000). Les poivrons qui possèdent le gène de résistance *Bs2* ont montré pendant plusieurs années un fort degré de résistance (Minsavage *et al.*, 1990). Une mutation spontanée ou induite du gène *avrBs2* provoque une diminution de la valeur adaptative des bactéries chez les plantes résistantes mais aussi chez les plantes sensibles (Kearney et Staskawicz, 1990; Gassmann *et al.*, 2000; Wichmann et Bergelson, 2004). Ceci a également été montré chez d'autres *Xanthomonas spp.*, comme *X. alfalfae* subsp. *alfalfae*. Le gène *avrBs2* code une protéine proche des enzymes impliquées dans la synthèse ou l'hydrolyse des liaisons phosphodiester. Il coderait une agrocinopine synthase ou une glycerol phospho-diesterase ayant une fonction enzymatique impliquée dans le pouvoir pathogène des souches portant ce gène (White *et al.*, 2000).

d. Les effecteurs de la famille des activateurs transcriptionnels

La famille AvrBs3 est la famille d'effecteurs la plus représentée dans le genre *Xanthomonas* (tableau 5) (Cunnac *et al.*, 2004a; Cunnac *et al.*, 2004b; Schornack *et al.*, 2006). Elle a été nommée suite à l'isolement du premier gène *avrBs3* chez *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Bonas *et al.*, 1989). Il est à noter que pour un agent pathogène donné, le nombre de gènes appartenant à cette famille peut être très variable. Les souches de *X. oryzae* pv. *oryzae* et *X. citri* subsp. *citri* possèdent respectivement 5 et 9 de ces protéines tandis que les souches de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* possèdent 1, 2 ou aucun homologues d'AvrBs3 (Lee *et al.*, 2005; Thieme *et al.*, 2005).

Les membres de la famille AvrBs3 ont en commun (figure 41) :

- la capacité à induire la HR chez les plantes hôtes résistantes,
- la capacité à accentuer les symptômes comme les tâches humides ou à induire les chancres,
- une homologie de séquence très forte (entre 90 et 97% d'homologie partagée entre les membres de cette famille chez les bactéries du genre *Xanthomonas*),
- la présence de signaux de localisation nucléaire (NLS) ainsi qu'un domaine d'activation transcriptionnel au niveau C terminal (AAD) (Yang et Gabriel, 1995).

Le gène *avrBs3* de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* code pour une protéine de 122 kDa, caractérisée dans son domaine central par 17,5 répétitions de 102 pb, soit 34 acides

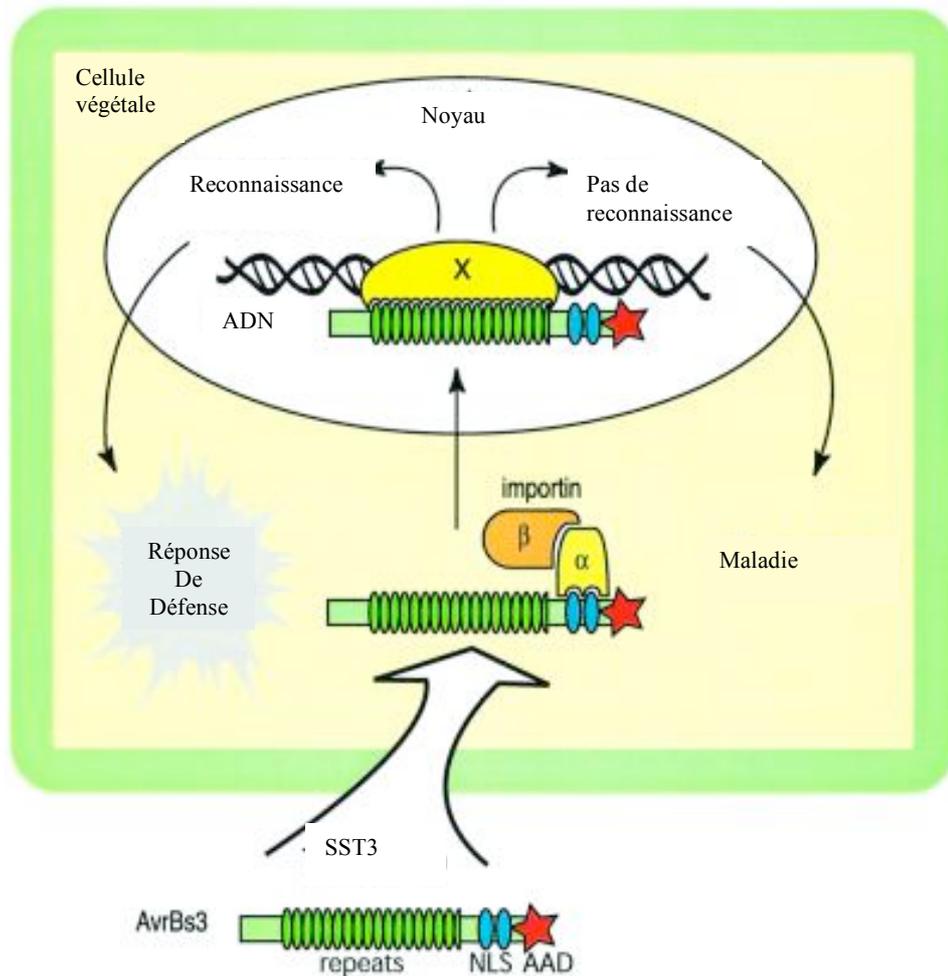


Figure 41 : Modèle de l'activité de virulence ou d'avirulence d'AvrBs3 chez *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (d'après Büttner et Bonas, 2002). Les principales caractéristiques d'AvrBs3 résident dans ses 17,5 répétitions de 34 acides aminés, ses deux signaux de localisation nucléaire (NLS_s) représentés en bleu et son domaine d'activation transcriptionnelle (AAD) en rouge. Le transfert d'AvrBs3 dans la cellule hôte est réalisé par l'intermédiaire du SST3. Dans la cellule de la plante, les NLS_s se lient à l'importine α . La protéine AvrBs3 est ensuite transportée dans le noyau de la plante grâce au complexe formé par l'importine α et l'importine β . L'interaction directe ou indirecte d'AvrBs3 avec l'ADN de la plante conduit à la modulation de la transcription. Il en résulte une hypertrophie, symptôme de la maladie, chez les plantes sensibles. Dans les plantes résistantes, des réponses de défense sont induites par la reconnaissance d'AvrBs3 par la protéine de résistance Bs3.

aminés (Bonas *et al.*, 1989). En fait, le nombre de répétitions des acides aminés varie de 5,5 (AvrXa5) à 28,5 (PthXo3) et les différences existantes entre les membres de la famille AvrBs3 sont restreintes principalement à ce domaine central (Yang et Gabriel, 1995; Zhu *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2000; Lahaye et Bonas, 2001; Yang et White, 2004). Les répétitions identiques et en tandem sont présentes chez tous les membres de cette famille, ce qui suggère que cette famille s'est sûrement agrandie par des événements de recombinaisons (Yang et Gabriel, 1995; Yang et White, 2004). Hax2 de *X. campestris* pv. *armoraciae* (Kay *et al.*, 2005) et Brg11 de *R. solanacearum* sont distincts de tous les autres membres de la famille car leurs répétitions sont constitués de 35 acides aminés. Ces deux gènes ont été isolés de bactéries pathogènes sur *Arabidopsis* (Deslandes *et al.*, 1998; Kay *et al.*, 2005) laissant supposer qu'il existe une corrélation entre le nombre de répétitions et la gamme d'hôte de la bactérie.

La région du domaine central d'AvrBs3 est essentielle à la reconnaissance par les gènes de résistance des plantes. Le nombre de répétitions du domaine central implique d'ailleurs la spécificité des protéines R de l'hôte (Herbers *et al.*, 1992). En effet, l'étude de l'interaction entre des protéines R et deux membres de la famille AvrBs3 de *Xanthomonas* a permis de mettre en évidence la spécificité de reconnaissance de la plante hôte. Les protéines AvrBs3 et AvrBs4 ont des séquences en acides aminées identiques à 97%. Malgré leurs similitudes apparentes, les protéines AvrBs3 et AvrBs4 sont détectées par le système de reconnaissance de leur hôte spécifique, respectivement le poivron et la tomate (Ballvora *et al.*, 2001). De plus, la délétion d'unités répétées et d'échange de domaine entre les différents homologues d'*avrBs3* ont confirmé que la spécificité d'hôte est gouvernée par ces régions répétées (Yang *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2000).

Des études ont été menées sur des bactéries du genre *Xanthomonas* (*X. axonopodis* pv. *malvacearum*, *X. oryzae* pv. *oryzae*) contenant de multiples copies d'*avrBs3*. Ainsi *X. oryzae* pv. *oryzae* contient plus de 14 copies de gènes de la famille AvrBs3, incluant *avrXa5*, *avrXa7* et *avrXa10*, lesquels ont été identifiés comme possédant une fonction d'virulence. L'inactivation des gènes *avrXa7* et *avrXa5* réduit l'agressivité du pathogène *X. oryzae* pv. *oryzae*, tandis que l'inactivation d'*avrXa10* n'affecte en rien son agressivité (Bai *et al.*, 2000). AvrBs3 est une des rares protéines Avr pour laquelle il a été démontré un rôle dans la formation des symptômes (Swarup *et al.*, 1992). Chez les plantes hôtes sensibles, AvrBs3 entraîne une hypertrophie et un élargissement des cellules du mésophile (Marois *et al.*, 2002). Etant donné que l'induction de l'hypertrophie dépend des signaux de localisation nucléaire (NLS) et du domaine acide activateur (AAD), il a été émis l'hypothèse qu'AvrBs3 agit comme un facteur de transcription dans le noyau des cellules

de l'hôte. Des études de mutations sur des membres de la famille AvrBs3 ont révélé que les NLS ainsi que le AAD avaient non seulement un rôle crucial concernant la virulence mais également concernant l'avirulence (Yang et Gabriel, 1995; Van den Ackerveken *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2000). Une série de délétion sur la zone concernée entraîne une incapacité de la cellule hôte à induire la réaction d'hypersensibilité. Par ailleurs, chez *X. axonopodis* pv. *malvacearum*, une souche contenant le gène *avrb6* induit plus de symptômes sur son hôte, le coton, que la même souche délétée de ce gène (Swarup *et al.*, 1992). Les gènes *pthA* et *avrXa10* sont respectivement nécessaires à la multiplication intercellulaire pour *X. citri* subsp. *citri* et *X. oryzae* pv. *oryzae* sur *Citrus* et riz (Leach *et al.*, 2001). Par contre, la croissance *in planta* de *X. axonopodis* pv. *malvacearum* ne dépend pas des gènes *avrBs3*. Il a également été démontré que certains gènes d'avirulence ont un coût dans le pouvoir pathogène de la bactérie lorsqu'ils s'expriment (O'Garro *et al.*, 1997).

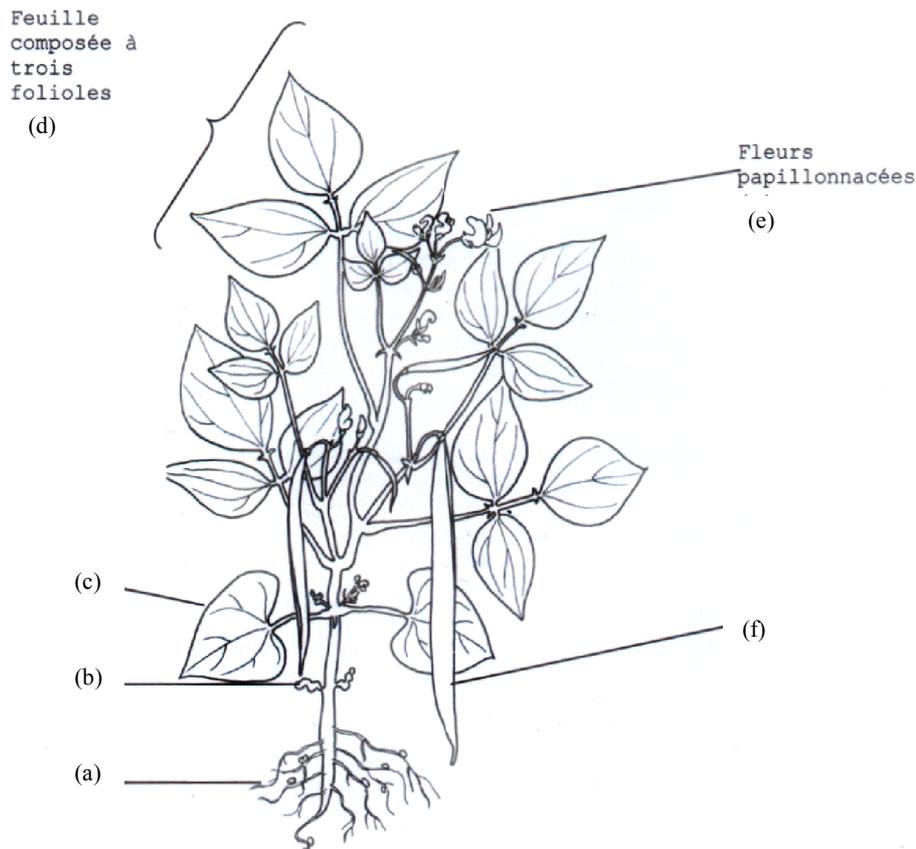


Figure 42 : Caractéristiques morphologiques du haricot (D'après Messiaen, 1975). a) racines, b) cotylédons, c) cataphylle, d) feuille trifoliolée, e) fleur, f) gousse.

Tableau 6 : Les stades de développement du haricot commun *Phaseolus vulgaris* (D'après Michael, 1994).

Stades	Description
V1	Emergence : de l'apparition des cotylédons en surface du sol à l'expansion des cataphylles
V2	Cataphylles : de la complète expansion des cataphylles à l'expansion de la première feuille trifoliée
V3	Première feuille trifoliolée : de la complète expansion de la première feuille trifoliée à l'expansion de la troisième feuille trifoliée
V4	Troisième feuille trifoliolée : de la complète expansion de la troisième feuille trifoliée à l'apparition du premier bouton floral ou racème
R5	Préfloraison : de l'apparition du premier bouton floral ou racème à l'ouverture de la première fleur
R6	Floraison : de l'ouverture de la première fleur à l'expansion de l'ovaire après fertilisation
R7	Développement de la gousse : de l'expansion de l'ovaire à l'élongation de la gousse jusqu'à sa taille maximale, avant la prise de poids par la graine
R8	Remplissage de la gousse : du début de la prise de poids et croissance de la graine au développement de la coloration des graines et début de la sénescence des feuilles
R9	Maturité : du début de la sénescence à la sénescence totale et abaissement du taux d'humidité de la graine à 15%

Chapitre 3

Le modèle d'étude : *Phaseolus vulgaris* - *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*

1. L'hôte : le haricot

1.1 Biologie, taxonomie et domestication

Le haricot commun est une dicotylédone appartenant à l'ordre des Fabales, à la famille des *Fabaceae*, à la sous-famille des *Faboideae*, à la tribu des *Phaseolae* et au genre *Phaseolus*. Le genre *Phaseolus* est originaire d'Amérique latine et comprend plus de 30 espèces (Michael, 1994). Seulement cinq d'entre-elles sont domestiquées : *Phaseolus acutifolius* A. Gray (tepariy bean), *P. coccineus* L. (scarlet runner bean), *P. lunatus* L. (lima bean), *P. polyanthus* Greenman (year-long bean) et *P. vulgaris* L. (common bean). Parmi ces espèces domestiquées, le haricot commun (*P. vulgaris*) est l'espèce la plus cultivée (plus de 85 % de la production du haricot) dans le monde (Singh, 2001).

A l'état sauvage, le haricot est une liane tropicale, autogame, à gousses déhiscentes, à petites graines non dormantes (Broughton *et al.*, 2003). Par sélection, le haricot est progressivement devenu un buisson (figure 42) au développement bien caractérisé (tableau 6). Cette domestication a consisté à raccourcir la plante par diminution du nombre et de la taille des entrenoeuds mais également par transformation du bourgeon terminal végétatif en bourgeon floral. La taille de la graine, la diminution de la déhiscence des gousses et la germination simultanée des graines a également été l'objet des plus anciennes sélections.

1.2 Importance économique

Le haricot constitue une source protéique importante pour l'alimentation humaine et sa culture est répandue sur l'ensemble des continents (Fouilloux et Bannerot, 2004). Cette plante est cultivée pour ses gousses que l'on consomme entières, ou pour ses graines que l'on consomme mures ou immatures, à l'état sec, frais ou en conserve. Le haricot sec représente la base principale du régime alimentaire de plus de 300 millions de personnes à travers le monde. Bon marché, il est de loin le légume le plus consommé (Broughton *et al.*, 2003). Dans de nombreux pays d'Amérique latine et d'Afrique, le haricot est considéré comme la « viande du pauvre ». Sa proportion en protéines est le double de celle de beaucoup de céréales, il est riche en micro-éléments essentiels comme le fer et

Tableau 7 : Principales maladies du haricot (d'après <http://www.eppo.org>).

Maladie	Agent causal	Type d'agent pathogène	Symptômes
Graisse à halo	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	bactérie	Sur feuilles : taches nécrotiques entourées d'un halo vert clair. Sur gousses : taches d'aspect huileux prenant tardivement une teinte brunâtre.
Graisse commune	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> et <i>X. fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i>	bactérie	Sur feuilles : taches nécrotiques entourées d'un halo clair. Sur gousses : taches d'aspect huileux prenant tardivement une teinte brun-orangé.
Maladie des taches brunes	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	bactérie	Sur feuilles : taches brunes nécrotiques entourées d'un petit halo de chlorose. Sur gousses : taches d'aspect huileux prenant tardivement une teinte brunâtre.
Flétrissement bactérien	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	bactérie	Sur feuilles : flétrissement de feuilles ou de parties de feuilles et possible lésions nécrotiques jaune doré. Sur gousses : les lésions sont plus visibles sur gousses matures avec des symptômes de couleur vert olive, contrastant avec la couleur jaune normale.
Mosaïque commune		virus	Gaufrage vert foncé des feuilles. La taille des plantes est réduite, la floraison perturbée et les gousses se tordent.
Mosaïque jaune		virus	Taches jaunes et diffuses sur feuilles. Les feuilles jaunissent et s'enroulent, les gousses se déforment.
Anthracnose	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	champignon	Taches rosées, brunissant et se nécrosant au centre, avec des auréoles brune et orange.
Fusariose	<i>Fusarium solani</i>	champignon	La surface de la racine prend une coloration brun foncé et entraîne un dépérissement des racines.
Pourriture grise	<i>Botrytis cinerea</i>	champignon	Moisissures grises.
Rouille	<i>Uromyces appendiculatus</i>	champignon	Petites pustules brun-orange devenant noirâtres à la face inférieure des feuilles.

l'acide folique (l'une des vitamines B). Le haricot représente également une source de revenu importante pour les fermiers les plus pauvres. Plus de 40% de la récolte de haricots africains arrive sur le marché, générant une recette annuelle de plus d'un quart de million de dollars américains (Broughton *et al.*, 2003).

En 2005, la production mondiale de haricot est estimée à 13,5 millions de tonnes. L'Asie et l'Amérique se partagent les deux tiers de cette production. En 2005, la France a produit 450000 tonnes de haricots verts à écosser pour une superficie de 39 000 hectares (FAO, 2005).

1.3 Principales maladies du haricot

Le haricot est attaqué par un certain nombre d'agents pathogènes bactériens, viraux, ou fongiques et par plusieurs insectes (tableau 7). Les dégâts les plus importants économiquement et les plus souvent rencontrés sont dûs aux champignons *Colletotrichum lindemuthianum*, agent de l'antracnose, *Fusarium solani* provoquant la fusariose et *Botrytis cinerea* causant la pourriture grise. De même, certains virus ravagent les cultures de haricot comme le virus de la mosaïque jaune du haricot et le virus de la mosaïque du haricot. *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* est responsable de la graisse à halo, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* est responsable de la maladie des taches brunes tandis que *X. axonopodis* pv. *phaseoli* et *X. fuscans* subsp. *fuscans* sont responsables de la graisse commune. Ces maladies sont considérées comme les principales bactérioses du haricot.

2. La graisse commune du haricot

2.1 Aire de répartition géographique

La graisse commune est la bactériose la plus dévastatrice du haricot. *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Vauterin *et al.*, 1995; Vauterin *et al.*, 2000) et *X. fuscans* subsp. *fuscans* (Schaad *et al.*, 2005) sont les agents bactériens à l'origine de la graisse commune du haricot. Cette maladie est présente dans le monde entier et occasionne des dommages considérables pour les producteurs. Bien qu'elle soit originaire d'Amérique, la bactérie s'est répandue sur tous les continents par le biais des semences contaminées (Bradbury, 1986; Vidaver, 1993). La maladie se développe préférentiellement dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées. Seules les régions désertiques ou tropicales sèches sont exemptes de la maladie. Toutefois, cette maladie n'est pas présente de façon uniforme dans les différentes zones de production du haricot. Par exemple, dans la zone « Europe » de l'OEPP (Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des

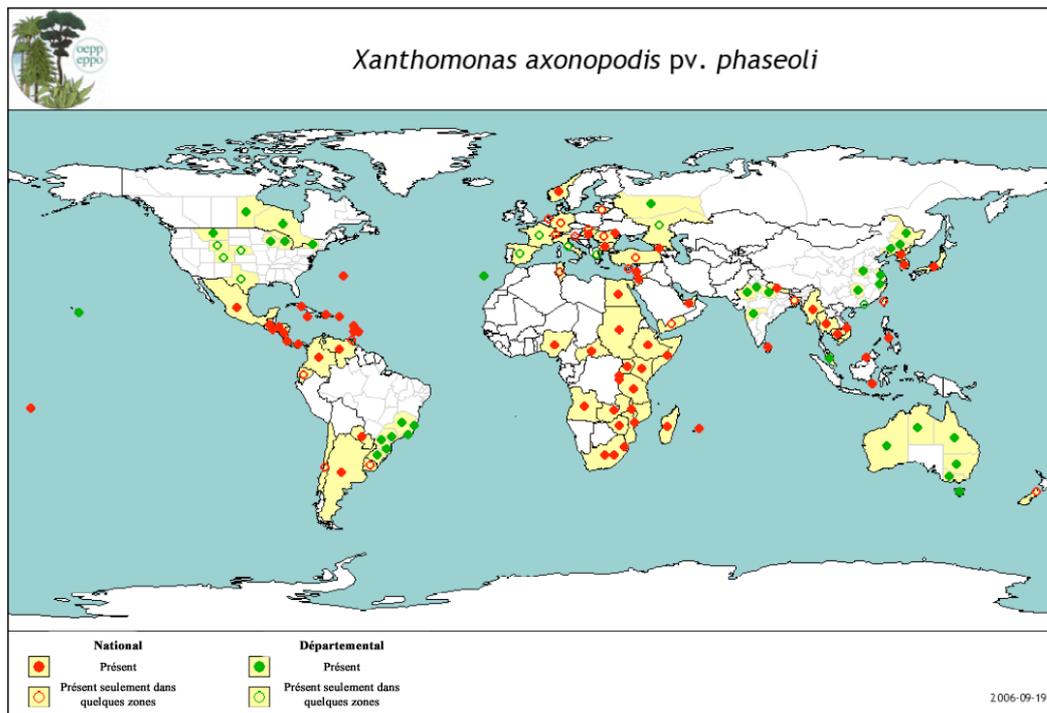


Figure 43 : Carte de la distribution mondiale de l'agent causal de la graisse commune du haricot, *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. La dispersion globale de la bactérie à l'échelle nationale (rouge) ou départementale (vert) est présentée par un losange rempli alors que la présence de la bactérie seulement dans certaines régions de chaque pays est représentée par un losange vide. Les deux agents pathogènes responsables de la graisse commune étaient alors regroupés dans le même pathovar *phaseoli* de l'espèce *X. axonopodis*. D'après l'Organisation Européenne et Méditerranéenne de Protection des Plantes (OEPP), 2006.

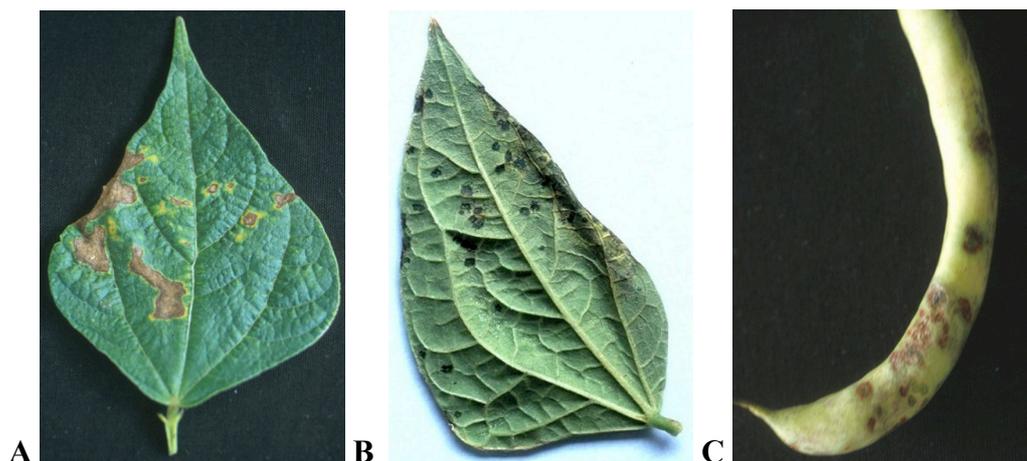


Figure 44 : Symptômes typiques de la graisse commune du haricot observés sur différents organes. A) Nécroses entourées d'un halo jaune sur la face supérieure d'un foliole. B) Taches huileuses sur la face inférieure d'un foliole. C) Taches huileuses et nécroses sur gousse (Photos INRA).

Plantes), La bactérie est largement répandue en Bulgarie, Espagne, Hongrie, Liban; mais elle n'est qu'établie localement en Allemagne, France, Grèce, Italie, Pays-Bas, Portugal, Roumanie, Russie (européenne), Slovaquie, Slovénie, Suisse, Turquie et ex-Yougoslavie (<http://www.eppo.org>) (figure 43).

2.2 Importance économique

La maladie peut affecter toutes les parties aériennes du haricot. Si les conditions sont favorables à son développement, la graisse commune peut se montrer très destructrice et provoquer des baisses de rendement pouvant atteindre 45 % et également affecter la qualité de la production (Yu *et al.*, 1998; Mahuku *et al.*, 2006). À titre d'exemple, en 1967, lorsque l'état du Michigan a subi une forte épidémie de graisse commune sur le haricot, 75% des 263 000 hectares plantés étaient infectés et la perte de rendement était estimée entre 10% et 20% (Gilbertson et Maxwell, 1992). La baisse du rendement s'explique par une diminution de l'activité photosynthétique. En effet, la surface foliaire étant affecté par de nombreuses nécroses, l'activité photosynthétique baisse et engendre une réduction du nombre et de la qualité des gousses et des graines. De plus, les symptômes provoqués par la bactérie rendent les gousses impropres à la vente en frais ou à la conservation, suscitant ainsi des déficits budgétaires considérables pour les producteurs.

De par son importance économique et son relatif confinement à certaines zones en Europe, l'agent responsable de la graisse commune (à l'époque nommé *X. axonopodis* pv. *phaseoli*) a été inscrit en 2000 sur la liste des organismes de quarantaine (II/A2) dans la directive européenne 2000/29/CE reprise dans le droit français par l'arrêté du 22 novembre 2002 (Arrêté du 22 novembre 2002 relatif aux exigences sanitaires des végétaux, produits végétaux et autres objets - JO du 6 décembre 2002). Dans le respect de cette législation, des mesures prophylactiques ont été instaurées pour la qualité sanitaire des lots de semences. Ainsi, un lot de 30000 semences ne doit pas présenter de contamination par *X. axonopodis* pv. *phaseoli* et *X. fuscans* pv. *fuscans* pour être commercialisé (Laurent, 1990).

2.3 Symptomatologie

La graisse commune est une maladie des parties aériennes de la plante et concerne à la fois les feuilles, les tiges, les gousses et les graines (figure 44). Les premiers symptômes apparaissent 4 à 10 jours après l'inoculation. Ils se traduisent d'abord par de petites taches huileuses sur les faces inférieures des feuilles et sur les tiges. Ces spots coalescent et évoluent en nécroses souvent accompagnées sur les feuilles d'un halo jaune

(Gilbertson et Maxwell, 1992). Des exsudats peuvent apparaître au niveau des feuilles, ce qui fournit de l'inoculum pour une dispersion secondaire (Vidaver, 1993). Les lésions sur tige sont toujours plus petites que sur les feuilles et aucune chlorose n'est observée (Zaumeyer et Thomas, 1957). Les gousses présentent des taches circulaires d'aspect huileux. Par la suite, les taches évoluent en lésions de couleur sombre (Zaumeyer et Thomas, 1957). Les graines peuvent être contaminées et présenter ou non des symptômes (Vidaver, 1993). Des graines contaminées peuvent être trouvées dans des gousses ne présentant aucun symptôme mais portées par des plantes malades (Saettler et Cafati, 1986).

2.4 Méthodes de lutte

2.4.1 Lutte prophylactique

La lutte contre les bactérioses en général et contre la graisse commune du haricot en particulier requiert un ensemble de mesures basées essentiellement sur la prévention. Il existe néanmoins plusieurs stratégies pour lutter contre cette maladie, la plus efficace étant l'utilisation de graines certifiées (Zaumeyer et Thomas, 1957). En amont de la production, la sélection sanitaire des semences est primordiale et représente le principal moyen d'éviter la propagation de l'agent pathogène (Darrasse *et al.*, 2007). La sélection sanitaire consiste en un tri des semences selon leur état sanitaire et peut être couplées à des méthodes permettant la production de semences les plus saines possible. Pour produire des semences indemnes de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *X. fuscans* subsp. *fuscans* et *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, des zones de production ont été créées dans des régions relativement épargnées par la maladie. D'abord aux Etats-Unis (Gilbertson et Maxwell, 1992), puis en France dans le Loir-et-Cher et le Maine-et-Loire (de Boisgrollier, 1993). En France, ces zones sont dites « hors graisse ». Ces zones se caractérisent notamment par des conditions climatiques et/ou des pratiques culturales limitant l'introduction et le développement de la bactérie (Schaad, 1980; Laurent, 1990). Dans ces zones, les parcelles sont semées avec des semences certifiées, et un suivi de culture est opéré afin de détecter toutes apparitions de symptômes. Les semences récoltées sont analysées selon un échantillonnage de 30000 graines et si une contamination est détectée le lot de semence est déclassé en haricot de consommation. La méthode officielle d'analyse des lots de semences pour la recherche de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* et *X. fuscans* subsp. *fuscans* fait appel à des isollements sur milieu sélectif, suivis par la vérification du pouvoir pathogène pour les souches à la morphologie suspecte (International Seed Testing Association, 2007). Des tests moléculaires de détection de l'agent pathogène existent (Audy *et al.*, 1994; Audy *et al.*, 1996; Manceau et Horvais, 1998) mais ne sont pas reconnus officiellement.

Cette lutte s'accompagne d'autres mesures prophylactiques. Elles consistent en une approche de lutte intégrée incluant l'utilisation de semences certifiées non contaminées, la rotation culturale, la destruction des réservoirs d'inoculum (adventices, repousses, résidus de récolte) (Gilbertson et Maxwell, 1992). Des expériences de désinfection de semences menées par Burke (rapportées par Zaumeyer, 1930) montre qu'un traitement des graines à 80°C pendant 35 min peut abaisser le taux de contamination de 23,6% à 0,2%. Kreitlow obtient des résultats similaires par une désinfection externe des semences (rapportées par Zaumeyer and Thomas, 1957). Enfin, d'autres auteurs préconisent l'éradication complète des plantes non-hôtes aux alentours de la culture pour limiter la survie de la bactérie en condition épiphyte (Bowman *et al.*, 1993).

2.4.2 Lutte génétique

Plusieurs cartes génétiques saturées de nombreux QTLs (Quantitative Trait Loci) liés à la résistance contre cette maladie ont été construites (Yu *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2000; Kelly *et al.*, 2003; Miklas *et al.*, 2003; Mutlu *et al.*, 2005). Les données issues de ces études révèlent une variabilité de la résistance à la graisse commune dans les différents pools de gènes du haricot : un niveau faible ou intermédiaire de résistance chez *P. vulgaris* et *P. coccineus* et un niveau plus élevé chez *P. acutifolius* (Yu *et al.*, 1998; Singh, 2001). La première lignée génétique, XAN 159, hautement résistante à la graisse commune a été obtenue en 1984 par Thomas et Waines à l'issue d'un croisement entre *P. vulgaris* et *P. acutifolius*. Plusieurs marqueurs moléculaires liés à des QTLs de résistance à la graisse commune ont par la suite été identifiés sur cette lignée résistante de haricot (Yu *et al.*, 2000). D'autres lignés génétiques résistantes, comme ICB-3, ICB-6, ICB-8 et ICB-10, ont été obtenues à partir de *P. coccineus*. Une autre lignée génétique, PR9443-4, a montré une résistance vis-à-vis de trois souches différentes de *X. fuscans* subsp. *fuscans* dans les conditions de serre. La résistance à la graisse commune dans les feuilles et les gousses du haricot a également été identifiée dans le cultivar Pomjor 17 (Beaver *et al.*, 2003).

La résistance à la graisse commune est souvent polygénique avec une héritabilité quantitative. Mais, dans certains cas comme celui de *P. acutifolius*, une résistance monogénique hôte-spécifique a également été observée. Cette source de résistance a été exploitée par le Centre international de l'agriculture tropicale (CIAT) pour développer les lignées résistances VAX 1-6 dans l'objectif de rassembler tous les gènes impliqués dans la résistance à la graisse commune et ensuite de les transférer dans les variétés commerciales (Mahuku *et al.*, 2006).

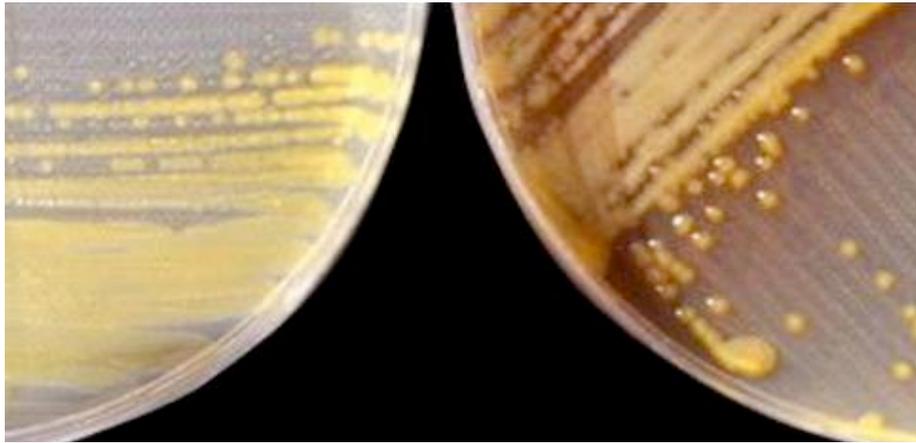


Figure 45 : Colonies de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (gauche) et de *X. fuscans* subsp. *fuscans* (droite) observées sur milieu de culture (photo INRA).

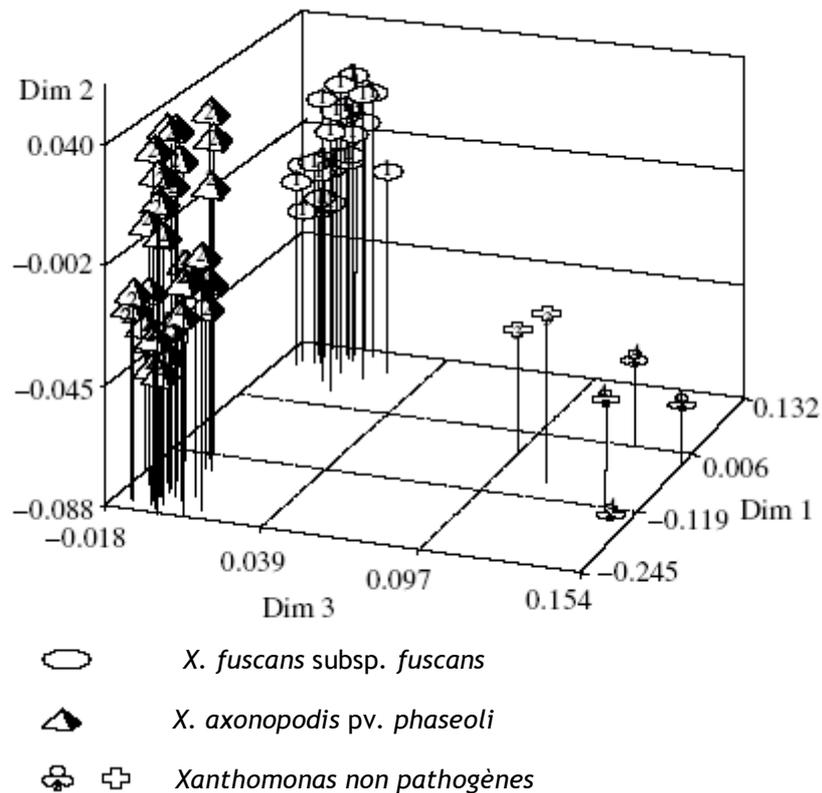


Figure 46 : Diagramme 3D de l'analyse en correspondance multiple (MCA) des données issues de PCR-RFLP d'ADN ribosomique 16S de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* et de *X. fuscans* subsp. *fuscans* (d'après Mahuku *et al.*, 2006).

2.4.3 Lutte chimique

La lutte chimique à l'aide de composés cupriques et l'utilisation d'antibiotiques tels que la streptomycine ont été utilisés avec des résultats variables et ne permettent pas un contrôle efficace (Saettler et Cafati, 1986). Il s'agit de produits coûteux dont l'utilisation astreignante ne permet qu'une lutte préventive qui ne peut en aucun cas éradiquer la maladie. De plus, l'utilisation d'antibiotiques en production végétale est interdite dans certains pays dont la France. Enfin, une utilisation massive de ces produits antibiotiques ou à base de cuivre peut entraîner la sélection de souches résistantes comme cela a été observé pour *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Kearney *et al.*, 1988).

3. L'agent causal : *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*

3.1 Taxonomie et diversité génétique

En 1897, pour la première fois, Smith décrit et nomme le microorganisme responsable de la graisse commune du haricot *Bacillus phaseoli* (Bradbury, 1986). A la suite d'études plus précises, cette bactérie a changé plusieurs fois de nom. En effet, elle est transférée en 1905 dans le genre *Bacterium*. Vingt ans plus tard, la bactérie est classée dans le genre *Phytomonas* par Bergey et ses associés (Bradbury, 1986). En 1939, le genre *Xanthomonas*, regroupant les bactéries à coloration Gram-négative, mobiles par un flagelle polaire et produisant un pigment jaune, est créé par Dowson (Bradbury, 1986). La bactérie est alors nommée *Xanthomonas phaseoli*. En 1974, Dye et Lelliot divisent le genre *Xanthomonas* en cinq espèces qui sont elles-mêmes fragmentées en pathovars (selon leur spectre d'hôtes les symptômes engendrés) en 1978 ; *Xanthomonas phaseoli* devient alors *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Young *et al.*, 1978). Vauterin et ses collaborateurs (1995, 2000) entreprennent des études taxonomiques sur le genre *Xanthomonas* basés notamment sur des homologues ADN/ADN. Ils proposent alors de grouper les souches responsables de la graisse commune du haricot dans le pathovar *phaseoli* au sein de l'espèce *axonopodis* (Vauterin *et al.*, 1995; Vauterin *et al.*, 2000).

En 1924, des souches produisant un pigment brun (nommé *fuscans*) en présence de tyrosine (figure 45) sur milieu de culture ont été isolées du haricot montrant des symptômes typiques de graisse commune de haricot en Europe (Burkholder, 1930). Ces souches ont été nommées *X. axonopodis* pv. *phaseoli* variant *fuscans*. *X. axonopodis* pv. *phaseoli* et son variant *fuscans* possèdent la même gamme d'hôtes et engendrent les mêmes symptômes mais les souches du variant *fuscans* sont généralement plus agressives que les souches non-*fuscans* sur *P. vulgaris* (Chan et Goodwin, 1999; Jacques *et al.*, 2005; Mahuku *et al.*, 2006). L'analyse des séquences d'ADN ribosomique a révélé que *X.*

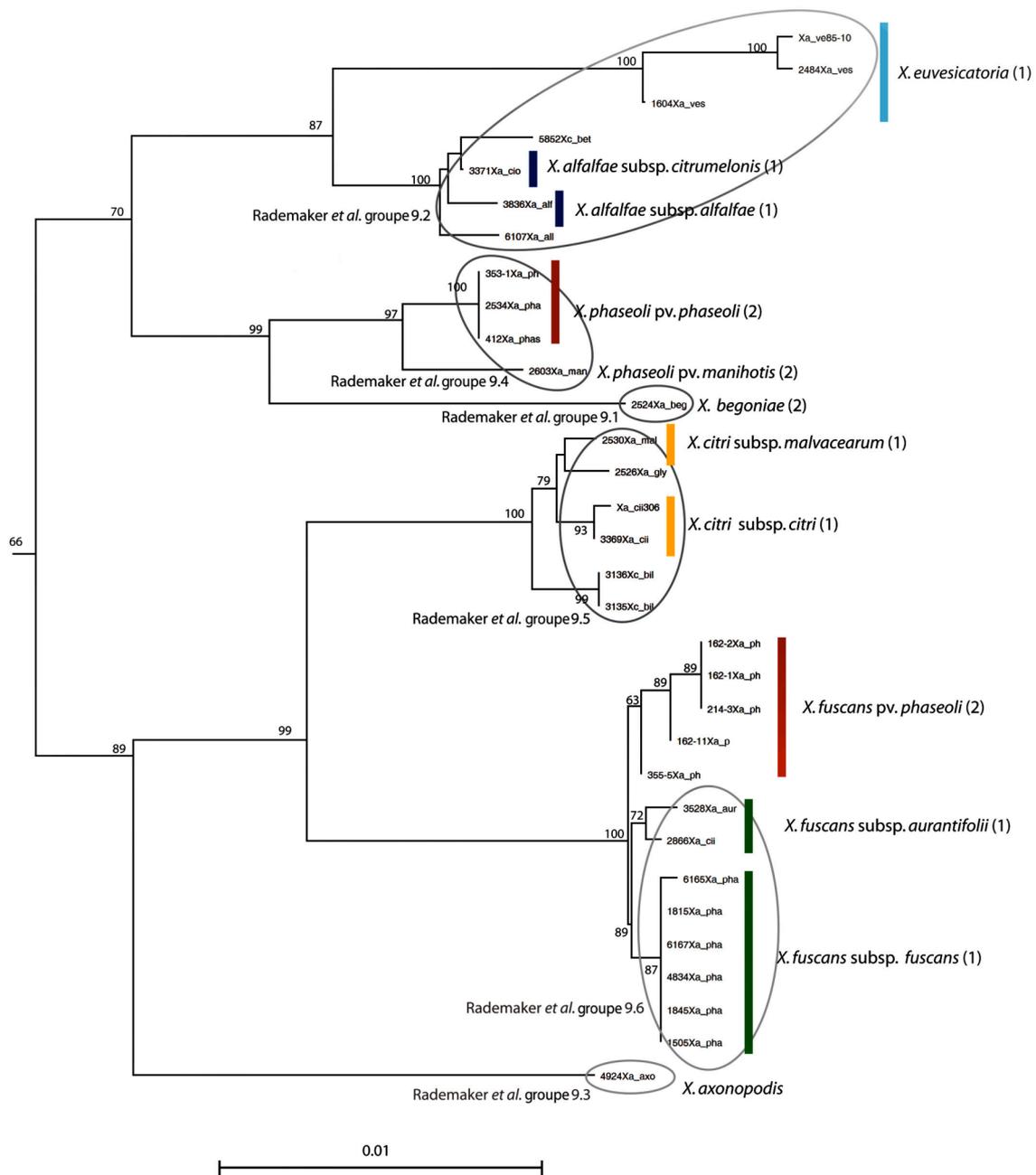


Figure 47 : Dendrogramme construit par Neighbor-Joining à partir des données concaténées de séquences partielles de quatre gènes de ménage (*atpD*, *dnaK*, *efp* et *gyrB*) illustrant les relations phylogénétiques de souches de *X. axonopodis*. Les valeurs de bootstrap (>60) après 1000 simulations sont représentées sur cette figure. Les groupes établis par Rademaker *et al.* (2005) sont représentés sur cette figure. (1) Nouvelles espèces proposées par Jones *et al.* (2004) et Schaad *et al.* (2005) ; (2) nouvelles espèces proposées par Fargier (2007).

axonopodis pv. *phaseoli* et son variant *fuscans* sont génétiquement distincts, mais plus proches l'un de l'autre que des autres pathovars de l'espèce *axonopodis* (Mkandawire *et al.*, 2004). Une étude récente de la diversité génétique par PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et rep-PCR (repetitive extragenic palindromic PCR) des souches de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* et *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* montre que les souches non-*fuscans* sont plus diversifiées que celles du variant *fuscans* (figure 46) (Mahuku *et al.*, 2006).

En 2005, sur la base de travaux d'hybridation ADN/ADN, Schaad et ses collaborateurs proposent de créer pour le variant *fuscans* une sous-espèce *fuscans* dans une nouvelle espèce *fuscans* totalement séparée des souches non-*fuscans* (Schaad *et al.*, 2005). Les souches *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* s'appellent désormais *X. fuscans* subsp. *fuscans*. Plus récemment, sur les bases d'une étude de phylogénie de quatre gènes de ménage, Fargier (2007) a proposé une nouvelle nomenclature. Cette étude propose de classer les souches *fuscans* dans le pathovar *fuscans* au sein de l'espèce *fuscans*, et certaines souches non-*fuscans* dans le pathovar *phaseoli* de l'espèce *fuscans*, les autres souches non-*fuscans* étant regroupées dans le pathovar *phaseoli* d'une nouvelle espèce *phaseoli* (figure 47) (Fargier, 2007). Ces changements récents n'ayant pas encore été validés par le comité ad hoc de taxonomie, je me suis conformé à la taxonomie valide de Schaad *et al.* (2005) dans ce manuscrit.

3.2 Morphologie et physiologie

Comme toutes les bactéries du genre *Xanthomonas*, *X. fuscans* subsp. *fuscans* est un bacille à Gram négatif de 0,2 à 0,6 µm de large et de 0,8 à 2 µm de long. Elles se retrouvent le plus souvent seules ou par paires, occasionnellement en chaînette. Leur métabolisme respiratoire est aérobie stricte (Lepoivre, 2003).

Les bactéries du genre *Xanthomonas* sont catalase positive, oxidase négative ou faiblement positive. Elles ne produisent pas d'inclusion de poly β-hydroxybutyrate, ne réduisent pas les nitrates, ni ne dénitrifient. Les bactéries sont mobiles par un flagelle polaire (Saddler et Bradbury, 2005). Les *Xanthomonas* sont riches en acides gras et les lipides comptent pour 20% du poids de la bactérie. Trois acides gras 11 :0 iso, 11 :0 iso 3OH et 13 :0 iso 3OH sont caractéristiques du genre et ne sont pas détectés chez d'autres bactéries phytopathogènes (Yang *et al.*, 1993).

Cultivées sur des milieux standards, pendant trois jours à 28°C, les bactéries donnent naissance à des colonies jaunes, convexes, butyreuses et rondes (Bradbury, 1986). Ces cellules bactériennes sont recouvertes d'exopolysaccharides, constitués essentiellement de xanthane (Rudolph, 1993) qui confère cet aspect muqueux à la colonie.

Tableau 8 : Caractéristiques des génomes séquencés de souches appartenant au genre *Xanthomonas*.

bactéries souches	<i>X. citri</i>	<i>X. a. pv.</i>	<i>X. oryzae pv.</i>	<i>X. oryzae pv.</i>	<i>X. oryzae pv.</i>	<i>X. oryzae pv.</i>	<i>X. campestris</i>	<i>X. campestris</i>	<i>X. campestris</i>
	subsp. <i>citri</i>	<i>vesicatoria</i>	<i>oryzae</i>	<i>oryzae</i>	<i>oryzicola</i>	<i>oryzicola</i>	<i>pv. campestris</i>	<i>pv. campestris</i>	<i>pv. arnoraciae</i>
	306	85-10	MAFF311018	KACC10331	BLS256	ATCC33913	8004	756C	Taxon ID: 316273 (ref. TIGR)
Ref. de la séquence (ncbi)	NC_003919	NC_007508	NC_007705	NC_006834	-	NC_003902	NC_007086	NC_007086	
Longueur (pb)	5 175 554	5 178 466	4 940 217	4 941 439	4 831 739	5 076 188	5 148 708	5 148 708	4 941 214
GC %	64%	64%	63%	63%	64%	63%	64%	64%	65%
Régions codantes potentielles	85%	87%	83%	79%	86%	84%	84%	84%	85%
Séquences codantes potentielles	4312	4487	4372	4637	4626	4181	4273	4273	4534
ARNs de structure	62	58	59	60	60	61	61	61	64
Séquence d'insertion	108	58	386	207	ND	109	115	115	ND
Publications	(a)	(b)	(c)	(d)	(f)	(a)	(e)	(e)	(f)
Plasmide	pXAC33, pXAC64		0	0	ND	0	0	0	ND
		pXCV2, pXCV19, pXCV38, pXCV183							

(a) da Silva *et al.*, 2002; (b) Thieme *et al.*, 2005; (c) Ochiai *et al.*, 2005; (d) Lee *et al.*, 2005; (e) Qian *et al.*, 2005; (f) En cours d'annotation

Le xanthane est un composé protégeant les bactéries des températures élevées et des rayons ultra-violet (Wilkinson 1958 ; Roberson and Firestone, 1992). La production d'EPS est associée à l'agressivité chez *X. campestris* (Daniels *et al.*, 1984; Poplawsky et Chun, 1998). Les *Xanthomonas* produisent un pigment caractéristique jaune foncé de la famille des caroténoïdes, la xanthomonadine (Swings *et al.*, 1993). Ce pigment est insoluble sur milieu gélosé général. La xanthomonadine est nécessaire pour la survie épiphyte de la bactérie (cf. Chapitres 1 et 2) (Poplawsky *et al.*, 2000). En plus de ce pigment jaune, le variant *fuscans* synthétise son pigment brun diffusible dans les milieux gélosés généraux contenant de la tyrosine.

3.3 Caractéristiques du génome des *Xanthomonas spp.*

Actuellement, les génomes de six bactéries appartenant au genre *Xanthomonas* sont séquencés et publiés : *X. citri* subsp. *citri* 306 (da Silva *et al.*, 2002), *X. campestris* pv. *campestris* ATCC 33913 (da Silva *et al.*, 2002), *X. campestris* pv. *campestris* 8004 (Qian *et al.*, 2005), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 85-10 (Thieme *et al.*, 2005), *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC10331 (Lee *et al.*, 2005) et *X. oryzae* pv. *oryzae* MAFF311018 (tableau 8) (Ochiai *et al.*, 2005). Six autres génomes ont été séquencés et sont en cours d'annotation : *X. oryzae* pv. *oryzicola* BLS256, *X. campestris* pv. *campestris* B100, *X. campestris* pv. *armoraciae* 756C, *X. albilineans* GPE PC73, *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* B 11122 et C 10535.

Le génome des bactéries du genre *Xanthomonas* est généralement composé d'un chromosome unique circulaire, dont le pourcentage en G + C varie entre 63 et 69,7% (Saddler et Bradbury, 2005). Le G + C% de *X. citri* subsp. *citri* et *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* qui sont proches phylogénétiquement de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* et *X. fuscans* subsp. *fuscans* (Vauterin *et al.*, 1995), est compris entre 65 et 67,6% (da Silva *et al.*, 2002; Thieme *et al.*, 2005). Par ailleurs, des plasmides n'ont été identifiés que chez *X. citri* pv. *citri* souche 306 et *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* souche 85-10 (tableau 7). Des plasmides ont aussi été identifiés chez des souches de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Lazo et Gabriel, 1987).

Les deux souches de *X. campestris* pv. *campestris* (8004 et ATCC33913) ont un génome très conservé (Qian *et al.*, 2005). Plusieurs réarrangements significatifs ont été observés, ils seraient dûs à des événements de recombinaison (Qian *et al.*, 2005). L'un de ces réarrangements correspond à une inversion d'une partie du génome. Par ailleurs, Qian *et al.* (2005) et da Silva *et al.* (2002) mettent également en évidence la présence d'un grand nombre d'éléments transposables distribués le long du génome, 115 chez *X. campestris* pv. *campestris* 8004 et 109 chez ATCC 33913.

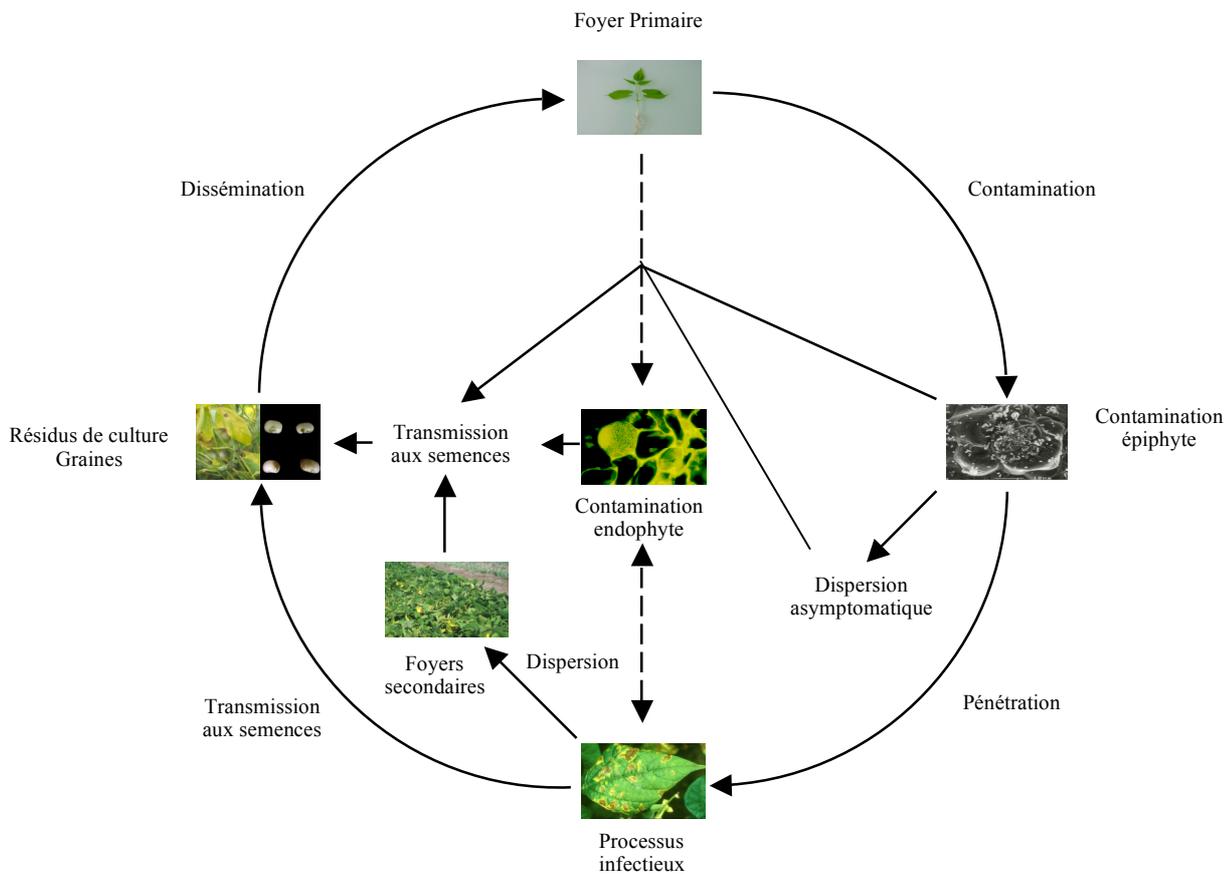


Figure 48 : Cycle épidémique de la grasse commune du haricot (d'après Jacques *et al.*, 2005).

Une séquence d'insertion nommée *ISXax1* a été identifiée très récemment chez *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *X. fuscans* subsp. *fuscans* et *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, bactéries proches phylogénétiquement (Vauterin *et al.*, 2000; Alavi *et al.*, 2007). Ceci suggère que cette IS était déjà présente chez les souches de *X. axonopodis* (Vauterin *et al.*, 2000) avant la spécialisation d'hôte. Cependant, cette IS n'est pas présente chez les autres pathovars de *X. axonopodis* tels que les pathovars *aurantifolii*, *citrumelo*, *dieffenbachiae* ou encore *manihotis*, qui appartiennent pourtant aux mêmes groupes d'homologie ADN-ADN, AFLP ou rep-PCR (Rademaker *et al.*, 2000; Vauterin *et al.*, 2000). Par conséquent, l'*ISXax1* pourrait avoir été perdue chez certains pathovars de l'espèce *X. axonopodis* au cours de l'évolution. Une autre explication pourrait être que seuls *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *X. fuscans* subsp. *fuscans* et *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* aient acquis l'*ISXax1* d'une espèce bactérienne non apparentée par transfert horizontal et que cette IS ait alors été transmise par transfert vertical chez *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *X. fuscans* subsp. *fuscans* et *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Alavi *et al.*, 2007).

4. Cycle biologique et épidémiologie

Le cycle épidémiologique de la graisse commune du haricot peut se diviser en différentes étapes (figure 48) :

4.1 Survie de l'agent pathogène et sources d'inoculum

La principale source d'inoculum est la semence contaminée (Weller et Saettler, 1980) puisqu'elle assure à la fois la dissémination et la survie de la bactérie entre deux cultures successives de l'hôte. Les bactéries peuvent survivre dans une semence bien au-delà de sa faculté germinative. Les plantes issues des semences contaminées vont constituer les foyers primaires de la maladie. Une contamination artificielle de 10^3 à 10^4 UFC sur une semence serait nécessaire à l'infestation de la plantule (Weller et Saettler, 1980). Pour des contaminations naturelles, des populations de *X. fuscans* subsp. *fuscans* de 10^2 UFC/graine sont suffisantes pour conduire à la contamination de la plantule permettant *in fine* la contamination des graines produites (Darrasse *et al.*, 2007)

Dans les régions tempérées, la bactérie pourrait survivre aux conditions hivernales sur/dans des plantes hôtes alternatives cultivées ou adventices, qu'elles soient pérennes ou annuelles (Cafati et Saettler, 1980), ou encore sur/dans des résidus de culture contaminés secs et non enfouis (Rudolph, 1993). En effet, *X. fuscans* subsp. *fuscans* peut survivre de manière épiphyte ou en tant que pathogène sur d'autres espèces telles que *Calopogonium* sp., *Lablab purpureus*, *Macroptilium lathyroides*, *P. lunatus*, *Pisum sativum*, *Pueraria* sp., *Strophostyles helvola*, *Vigna aconitifolia*, *V. angularis*, *V. mungo*, *V.*

radiata, *V. umbellata* (<http://www.eppo.org>). Après inoculation, *X. fuscans* subsp. *fuscans* se maintient également sur *Amaranthus retroflexus*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Beta vulgaris*, *Chenopodium album*, *Echinochloa crus-galli*, *Glycine max*, *Helianthus annuus*, *Lupinus polyphyllus*, *Phaseolus acutifolius*, *P. coccineus*, *Solanum nigrum*, *Zea mais* (<http://www.eppo.org>).

La survie sur/dans les débris végétaux contaminés est très efficace en zone tropicale (Fininsa et Tefera, 2001). Lorsque plusieurs cultures se succèdent relativement rapidement dans l'année, comme c'est souvent le cas dans les pays tropicaux, les bactéries se transmettent alors facilement entre cultures dans le temps et l'espace (Fininsa et Yuen, 2002). L'enfouissement des débris végétaux limite de façon notoire la survie de l'inoculum. La compétition trophique avec les autres organismes telluriques est sûrement trop importante pour que *X. a. pv. phaseoli* et *X. fuscans* subsp. *fuscans* puissent survivre (Gilbertson et Maxwell, 1992).

4.2 Colonisation de la plante

Il existe deux types de colonisation de la plante par la bactérie : épiphyte (à la surface de la plante) et endophyte (à l'intérieur de la plante). *X. fuscans* subsp. *fuscans* peut à la fois survivre à la surface des feuilles et de manière endophyte (Jacques *et al.*, 2005). Indépendamment de la localisation de la bactérie sur l'hôte, la colonisation peut se faire en l'absence de symptôme sur l'hôte. Elle est alors qualifiée d'asymptomatique.

4.2.1 Colonisation épiphyte

Une des phases les plus importantes du cycle de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* et *X. fuscans* subsp. *fuscans* sur leur hôte est la multiplication épiphyte de la bactérie (Cafati et Saettler, 1980). En effet, il s'agit de sa voie privilégiée de colonisation, contrairement à *X. campestris* pv. *campestris* par exemple qui est avant tout un pathogène vasculaire (McElhaney *et al.*, 1998).

Récemment, il a été montré qu'une souche non-*fuscans* de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* pouvaient se maintenir sur des plantes non-hôtes comme l'oignon en l'absence de symptômes avec des tailles de populations non négligeables comprises entre 10^2 et 10^4 UFC g^{-1} (Gent *et al.*, 2005). *X. fuscans* subsp. *fuscans* est aussi capable de coloniser la phyllosphère de son hôte sensible en l'absence de tout symptôme macroscopique (Darrasse *et al.*, 2007). La bactérie se comporte en épiphyte, c'est-à-dire qu'elle se multiplie à la surface des feuilles (Rudolph, 1993). Cette phase épiphyte nécessite l'exploitation de la structure foliaire et le développement de stratégie de tolérance et/ou d'évitement aux stress environnementaux (cf. chapitre 1). Les sites dit « épiphytes » sont ceux situés à la

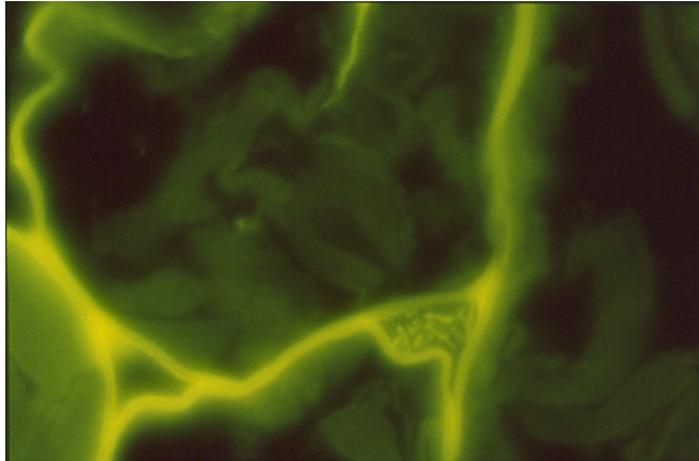


Figure 49 : Localisation *X. fuscans* subsp. *fuscans* exprimant la GFP dans les espaces intercellulaires du parenchyme cortical d'un hypocotyle de haricot (photo INRA).

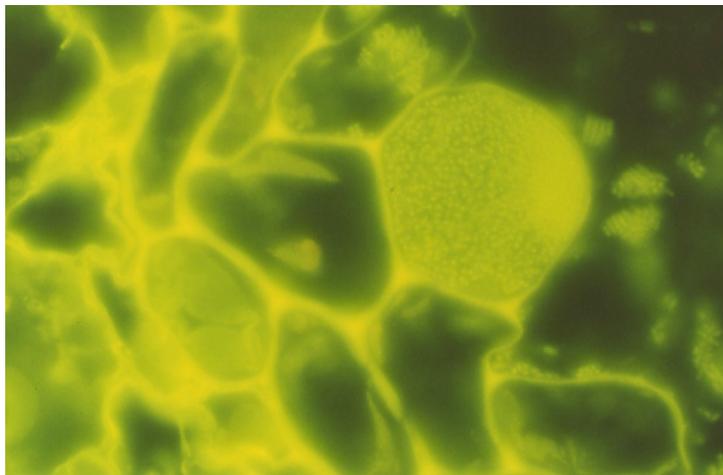


Figure 50 : Colonisation des vaisseaux du xylème par *X. fuscans* subsp. *fuscans* exprimant la GFP dans l'hypocotyle du haricot (photo INRA).

base des trichomes, au voisinage des stomates, le long des nervures et dans les dépressions de la cuticule (Beattie et Lindow, 1999; Jacques *et al.*, 2005). Divers facteurs et stress influent sur la multiplication épiphyte, tels l'humidité et les UV (Jacques *et al.*, 2005). Chez *X. fuscans* subsp. *fuscans*, il a été montré que le temps de doublement de la population augmente avec l'augmentation de la température (Weller et Saettler, 1980). Une des stratégies de survie bactérienne dans de nombreux écosystèmes consiste en la formation de structures appelées biofilms. Jacques et collaborateurs (2005) ont montré que chez *X. fuscans* subsp. *fuscans*, les cellules agrégées en biofilms forment des populations plus stables que les populations solitaires, notamment en cas de stress.

4.2.2 Colonisation endophyte

Les bactéries du genre *Xanthomonas* ne possèdent pas de mécanisme actif pour pénétrer dans les tissus de l'hôte. Elles pénètrent dans la plante par des blessures causées notamment par les outils, les insectes ou le vent (Vidaver, 1993) ou par des ouvertures naturelles telles que les stomates ou les hydathodes (Rudolph, 1993; Von Bodman *et al.*, 2003; Melotto *et al.*, 2006; Pizarro-Cerda et Cossart, 2006; Underwood *et al.*, 2007). Lorsque les bactéries colonisent les parenchymes, la colonisation est dite endophyte. Elle est dite vasculaire lorsque les bactéries colonisent le système vasculaire de la plante (Rudolph, 1993; Vidaver, 1993). *X. axonopodis* pv. *phaseoli* et *X. fuscans* subsp. *fuscans* peuvent également coloniser la plante de manière endophyte, au niveau des espaces intercellulaires (figure 49) et également au niveau des vaisseaux du xylème (figure 50) (Zaumeyer et Thomas, 1957).

4.3 Processus infectieux

Suite aux colonisations épiphyte et endophyte, dans le cas où les conditions sont favorables à la multiplication bactérienne, le processus infectieux s'enclenche pour être rapidement suivi par l'apparition de symptômes. Dans le cas contraire, un développement et une dispersion asymptomatiques des bactéries auront probablement lieu. En effet, les bactéries du genre *Xanthomonas* peuvent réaliser un cycle entier sans passage en phase pathogène (Stall *et al.*, 1993; Jacques *et al.*, 2005; Darrasse *et al.*, 2007). Les plantes contaminées de cette manière constituent alors autant de sources d'inoculum, menant parfois à une colonisation asymptomatique de proche en proche. Pour qu'il y ait apparition de symptômes, il faut dépasser un certain seuil populationnel, qui correspond à 5×10^6 CFU/cm² de tissu foliaire. Cette condition implique une période de latence entre le début de l'infection et les premiers symptômes (Weller et Saettler, 1980; Jacques *et al.*, 2005).

En général, les symptômes apparaissent après la phase de développement végétatif, au début du stade reproductif.

Ensuite, *X. fuscans* subsp. *fuscans* peut envahir les espaces intercellulaires, en causant une dissolution progressive de la lamelle moyenne qui aboutit à l'apparition de symptômes (Rudolph, 1993). Ces produits de dégradation sont utilisés par la bactérie comme source de carbone. L'apparition des symptômes correspond à un encombrement des espaces intercellulaires par les EPSs de la bactérie. Des taches d'aspect huileux sont alors visibles (Vidaver, 1993). L'apparition d'un halo jaune autour des taches correspond à la destruction de la chlorophylle par la bactérie. De plus, la multiplication des bactéries exerce une pression physique sur les organes infectés, les bactéries peuvent alors être expulsées vers l'extérieur des organes sous forme d'exsudats bactériens (Rudolph, 1993). En ce qui concerne l'invasion de la tige, elle peut se faire de trois manières : soit via les stomates de l'hypocotyle, soit à travers le système vasculaire de la feuille, ou encore depuis les cotylédons (Zaumeyer et Thomas, 1975 *in* Vidaver, 1993).

4.4 Dispersion de la bactérie et de la maladie

Il est généralement admis que la dispersion de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* et *X. fuscans* subsp. *fuscans* à l'échelle d'une plante peut être réalisée soit par la multiplication en surface des populations qui colonisent les espaces vierges grâce aux contacts entre feuilles, aux mouvements laminaires de l'eau et du vent, soit par une progression des cellules bactériennes dans les espaces intercellulaires mais aussi par une entrée de l'agent pathogène dans les tissus vasculaires (Rudolph, 1993). Les bactéries déjà présentes sur la plante peuvent être transportées vers d'autres parties de la plante ou vers d'autres plantes, constituant ainsi des inoculums secondaires. La dispersion peut être asymptomatique ou se faire à partir de plantes présentant des symptômes (Weller et Saettler, 1980; Darrasse *et al.*, 2007). Dans ce dernier cas, la réserve d'inoculum est plus abondante. Enfin la dispersion à longue distance est assurée par la commercialisation ou l'échange de semences contaminées. La gousse commune du haricot est l'une des phytobactérioses transmises par les semences les plus préjudiciables (Stall *et al.*, 1993).

4.5 Transmission de la bactérie aux semences de haricot

La transmission à la semence est une étape importante dans la survie et la dissémination des bactéries pathogènes des plantes. C'est une étape clé dans le cycle épidémique de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* et *X. fuscans* subsp. *fuscans* (figure 49). *X. axonopodis* pv. *phaseoli* et *X. fuscans* subsp. *fuscans* sont des pathogènes transmis par les semences, c'est-à-dire que ce sont des organismes qui survivent dans les semences de sa

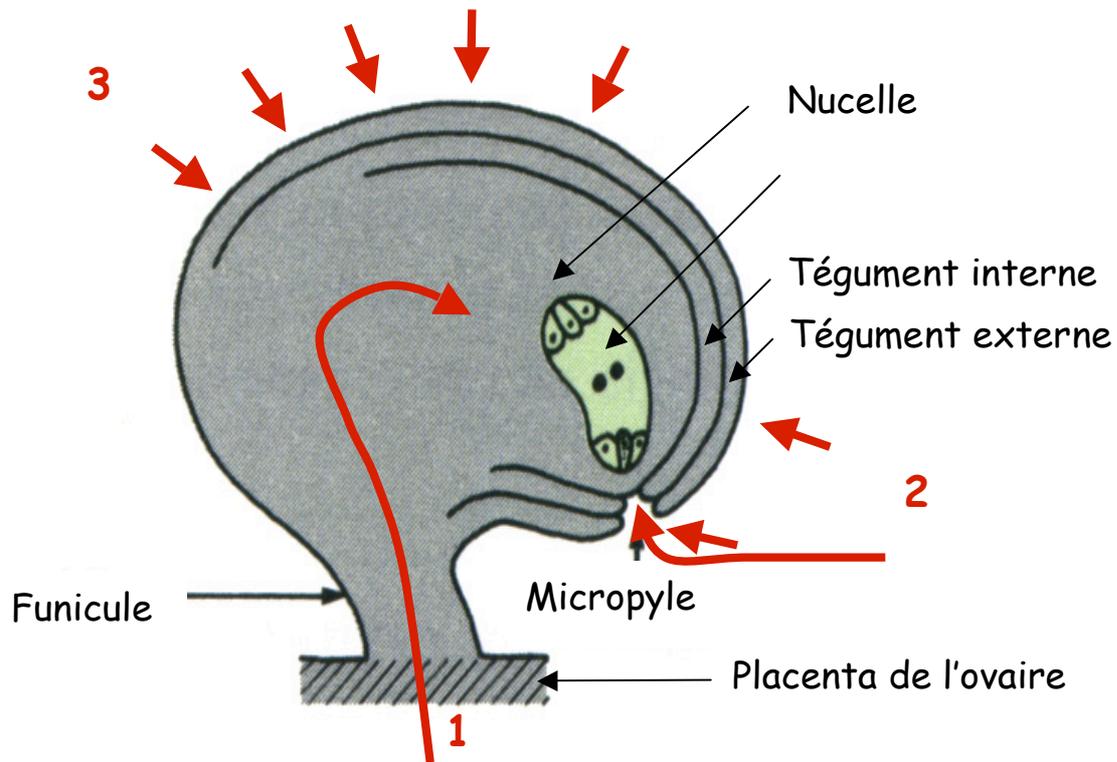


Figure 51 : Les différentes voies de transmission d'une bactérie à un ovule de type campylotrope (d'après Côme, 1982 et Maude, 1996). 1 : transmission via le xylème de la plante mère ; 2 : transmission via le stigmate ; 3 : transmission par les téguments de la gousse.

plante hôte et qui peut ainsi contaminer la génération suivante. Classiquement, il a été décrit qu'un agent pathogène pouvait contaminer les graines par différentes voies (figure 51) (cf. Chapitre 1) (Maude, 1996). Chez le haricot, les bactéries peuvent se transmettre par contact entre la gousse et les graines en présence de symptômes ou lors des opérations de battage (Zaumeyer et Thomas, 1957). La transmission peut se faire à travers le système vasculaire de la plante-mère via le funicule et le hyle sur la graine (Gilbertson et Maxwell, 1992), ou bien par l'intermédiaire de la fleur via le stigmate et le micropyle. L'importance relative de ces différentes voies de contamination n'est pas connue.

Enjeu et
objectifs de la
thèse

Nous avons vu dans la synthèse bibliographique de ce manuscrit qu'en l'absence de lutte chimique efficace et autorisée, la lutte contre les phyto bactérioses est principalement limitée à l'application de méthodes prophylactiques générales. Ces méthodes, en particulier celles focalisées sur l'étape de transmission par la semence (sélection sanitaire) permettent de limiter la dispersion des agents pathogènes et leur incidence mais sont toutefois coûteuses et non entièrement satisfaisantes puisqu'elles conduisent à l'élimination des lots contaminés. La proposition de nouvelles méthodes de lutte passe par une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans les différentes étapes de colonisation de l'hôte (Gitaitis et Walcott, 2007). Trois étapes apparaissent cruciales pour la réussite de la colonisation de l'hôte, il s'agit de (i) la contamination de la plantule à partir de la graine contaminée, (ii) la colonisation de la phyllosphère pour l'établissement de l'inoculum permettant sa dispersion et *in fine* (iii) la transmission des bactéries à la semence.

Les objectifs de cette thèse ont été d'identifier et de caractériser des déterminants moléculaires impliqués dans la colonisation précoce de l'hôte pouvant aboutir à une transmission asymptomatique de *X. fuscans* subsp. *fuscans* à la graine du haricot.

Pour atteindre cet objectif, nous avons suivi une démarche avec *a priori*. L'hypothèse testée est celle d'une interaction étroite entre l'agent pathogène et son hôte à toutes les étapes de la colonisation et y compris en l'absence de développement de symptôme. Les gènes candidats sont de deux types principaux : il s'agit des gènes codant le SST3 (de type *hrp2*) et ses effecteurs (système situé au cœur de la communication moléculaire entre l'agent pathogène et son hôte), et de différents gènes impliqués dans l'adhésion aux surfaces et la formation de biofilms (structure clé dans la colonisation des milieux par les bactéries). Après avoir construit des mutants pour chacun des gènes candidats, nous avons caractérisé leur comportement lors des trois étapes clés précédemment identifiées. Les résultats obtenus lors des étapes de colonisation de la phyllosphère et de transmission à la semence sont présentés dans les deux premiers chapitres de résultats, tout d'abord en ce qui concerne le SST3 et ses effecteurs (premier chapitre), puis pour les facteurs d'adhésion et d'agrégation (second chapitre). Enfin, tous les résultats concernant la colonisation de la spermosphère sont regroupés dans un troisième chapitre de résultats.

Résultats

Partie 1

Rôle du système de sécrétion de type 3 et de quelques effecteurs dans les étapes clés de la colonisation d'une plante par une bactérie phytopathogène

Le SST3 est un système situé au cœur de la communication entre les bactéries phytopathogènes et leurs hôtes. Il permet la livraison dans la cellule hôte d'effecteurs ayant un rôle double. Ils contribuent au pouvoir pathogène mais aussi à la survie des pathogènes ; ce qui finalement traduit leur implication dans la fitness de l'agent pathogène. Aussi, nous avons voulu mesurer la contribution de ce SST3 et de quelques effecteurs dans la colonisation de l'hôte sensible dans des conditions ne se limitant pas à la survie de l'agent pathogène mais ne permettant pas pour autant le développement de symptôme.

La dispersion du pathogène est une étape critique dans le cycle des maladies. Or, il nous est apparu que la transmission à la graine, élément majeur de la dispersion des phytopathogènes bactériens, était une étape dont le déterminisme était particulièrement méconnu. Aussi, nous avons étudié le comportement des souches mutées dans le SST3 et ses effecteurs à la fois lors des étapes de colonisation de la phyllosphère mais aussi lors de la transmission à la graine.

Ces travaux sont présentés ci-après sous la forme d'un article intitulé « Type III secretion system of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* is involved in phyllosphere colonization process and in transmission to seeds of susceptible bean » soumis pour publication dans la revue « Applied and Environmental Microbiology ».

Des données complémentaires ont été ajoutées à cet article et concernent les résultats non présentés (data not shown) dans ce premier article ainsi que l'identification des gènes *hrpF* et *hrcN*, et deux effecteurs de type 3, *avrBs2* et *avrBs3* chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R. La mutation de ces quatre gènes a permis d'étudier leur rôle lors des étapes clés de la colonisation du haricot. Les matériels et méthodes des expérimentations mises en place sont conformes à ceux décrits dans l'article. Les résultats et la discussion issus de ces données complémentaires sont exposés à la suite de l'article.

1. Type III secretion system of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* is involved in phyllosphere colonization process and in transmission to seeds of susceptible bean

A. Darsonval, A. Darrasse, D. Meyer¹, M. Demarty², K. Durand, C. Bureau, C. Manceau and
M.-A. Jacques*

Authors' affiliations: UMR077 PaVé, INRA, 42, rue George Morel, F-49071 Beaucouzé, France

Actual addresses: ¹Department of Plant Pathology, Iowa State University, 420 Bessey Hall, Ames (IA), 50011, USA. ²UQAM, department des sciences biologiques, case postale 8888, Succursale centre ville, Montréal, H3C 3P8, Canada.

Submitted on the 22th December 2007

Correspondent footnote: Mailing address: UMR077 PaVé, INRA, 42, rue George Morel, BP 60057, F-49071 Beaucouzé cedex, France Phone: (33)-241-22-57-07. Fax: (33)-241-22-57-05. Email: Marie-Agnes.Jacques@angers.inra.fr

1.1 Abstract

Understanding the survival, multiplication and transmission to seeds of plant-pathogenic bacteria is central to study their pathogenesis. We hypothesized that the type III secretion system (T3SS), encoded by *hrp* genes, could have a role in host colonization by plant-pathogenic bacteria. The seed-borne pathogen *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* causes common bacterial blight of bean. Directed-mutagenesis in strain CFBP4834-R of *X. fuscans* subsp. *fuscans* and bacterial population sizes monitoring on bean leaves showed that strains with mutations in the *hrp* regulatory genes, *hrpG* and *hrpX*, were impaired in their phyllospheric growth as in the null interaction with *Escherichia coli* C600 and bean. In the compatible interaction, CFBP4834-R reached high phyllospheric population sizes and was transmitted to seeds at high frequencies with high densities. Strains with mutations in structural *hrp* genes maintained the same constant epiphytic population sizes (1×10^5 CFU g⁻¹ of fresh weight) as in the incompatible interaction with *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 and the bean. Low frequencies of transmission to seeds and low bacterial concentrations were recorded for CFBP4834-R *hrp* mutants and for ATCC33913, whereas *E. coli* C600 was not transmitted. Moreover, unlike the wild-type strain, strains with mutations in *hrp* genes did not transmit to seeds by vascular pathway. Transmission to seeds by floral structures remained possible for both. This study revealed the involvement of *X. fuscans* subsp. *fuscans* T3SS in phyllospheric multiplication and systemic colonization of bean leading to transmission to seeds. Our findings suggest a major contribution for *hrp* regulatory genes in host colonization processes.

1.2 Introduction

The phyllosphere (*i.e.* the environment of leaf surfaces, (21)) provides important niches for microbes such as fungi and bacteria with diverse lifestyles including epiphytes, saprophytes and pathogens. While colonizing leaves, microorganisms are exposed to a harsh environment submitted to multiple stresses including desiccation, UV irradiation and nutrient limitation (4, 27). *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* (38) and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (42, 43) are causal agents of common bacterial blight of bean (*Phaseolus vulgaris* L) (44). During colonization of bean phyllosphere, *X. fuscans* subsp. *fuscans* forms aggregates (biofilms) that protect it from stresses and maintain population sizes (22). Under conditions of low relative humidity (RH) that limit bacterial multiplication, *X. fuscans* subsp. *fuscans* can achieve a complete biological cycle on its susceptible host, from the sown seed to the harvested seed, without causing any macroscopic symptoms (11). Consequently, such an asymptomatic pathogenic life cycle is of great pathogenic and ecological importance. It could provide discrete inoculum for future outbreaks of common bacterial blight of bean and a means of survival for the bacteria under conditions that are not favorable for its multiplication.

Pathogen transmission is one of the most important parameter for fitness (14, 29). It combines the ability to survive outside the host prior to infection, multiplication on the host, dispersion and transmission to new ecological niches including host seeds. Three seed infection pathways are described for seed borne pathogens (28). Seeds can be internally contaminated via the host xylem, as occurs for viruses, some fungi and a few bacteria. This can result in the contamination of the seeds often through the hilum (1). Seeds may also become infested via the stigma, where bacteria move through the stylar tissues to the embryo; this was recently demonstrated for bacterial fruit blotch of watermelon (45). An external infection occurs via flowers and fruits as a consequence of contact of the seed with bacterial populations on symptomatic tissue, or during threshing with residues carrying large bacterial populations (48). The molecular determinants involved in active mechanisms of bacterial transmission to seeds in the absence of symptoms remain unknown.

The *hrp* genes are one of the major pathogenicity determinants of most plant pathogenic bacteria. These genes form a cluster, conserved in plant and animal pathogenic bacteria, that encodes proteins which form a molecular syringe, the type III secretion apparatus (18, 35). This type III secretion system (T3SS) allows the secretion and the injection of bacterial virulence proteins, called effectors, directly in the host cell

Table 1. Strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Relevant genotype or characteristics	Source or reference
Plasmids		
pVO155	Derivative plasmid of pUC19 containing the promoterless <i>gus</i> (<i>uidA</i>) gene; Km ^R , Amp ^R	(34)
pRK600	Cm ^R , <i>traRK2</i> , <i>oriColE1</i>	(16)
pIJ3225	<i>hrp</i> cluster of <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> cloned in pLAFR1	(3)
Strains		
CFBP4834-R	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i> CFBP4834-R wild-type strain; Rif ^R	(22)
ATCC33913	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC33913 wild-type strain; Rif ^R	(10)
85.10	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> wild type strain; Rif ^R	(6)
306	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> wild type strain	(10)
K12	<i>Escherichia coli</i> wild type strain	(12)
DH5α	<i>E. coli</i> F,Φ980 <i>dlacZ</i> :M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> ,:(<i>lacZYA-argF</i>)U169	(19)
C600	<i>E. coli</i> C600 wild-type strain; Rif ^R	(32)
Mutants		
4834HRCJ	CFBP4834-R <i>hrcJ</i> (420)*::pVO155; Rif ^R , Km ^R	This study
4834HRCR	CFBP4834-R <i>hrcR</i> (320)*::pVO155; Rif ^R , Km ^R	This study
4834HRCT	CFBP4834-R <i>hrcT</i> (799)*::pVO155; Rif ^R , Km ^R	This study
4834HRCV	CFBP4834-R <i>hrcV</i> (1501)*::pVO155; Rif ^R , Km ^R	This study
4834HRPB2	CFBP4834-R <i>hrpB2</i> (298)*::pVO155; Rif ^R , Km ^R	This study
4834HRPG	CFBP4834-R <i>hrpG</i> (625)*::pVO155; Rif ^R , Km ^R	This study
4834HRPX	CFBP4834-R <i>hrpX</i> (459)*::pVO155; Rif ^R , Km ^R	This study
33913HRCU	ATCC33913 <i>hrcU</i> ::pVO155; Rif ^R , Km ^R	Gift from M. Arlat
33913HRPX	ATCC33913 <i>hrpX</i> ::pVO155; Rif ^R , Km ^R	Gift from M. Arlat

*: indicate the position from the start codon of pVO155 insertion in the target gene in *Xac* 306.

cytoplasm. Surprisingly, it has been shown that this T3SS is also necessary for leaf-associated colonization of bean by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (20). No similar studies have been undertaken for other pathogens with epiphytic growth phase and for other steps of host colonization such as transmission to seeds.

The work present herein aims to characterize the *hrp* cluster of *X. fuscans* subsp. *fuscans* and to determine the role of *hrp* genes in the survival and the multiplication of this bacterium in bean phyllosphere and in the transmission to bean seeds.

1.3 Materials and methods

Bacterial strains, plasmids and growth conditions. The bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table 1. Xanthomonad strains were grown at 28°C in 10% TSA medium (1.7 g L⁻¹ tryptone, 0.3 g L⁻¹ soybean peptone, 0.25 g L⁻¹ glucose, 0.5 g L⁻¹ NaCl, 0.5 g L⁻¹ K₂HPO₄ and 15 g L⁻¹ agar) supplemented with the appropriate antibiotics. *Escherichia coli* cells were cultivated at 37°C in Luria Bertani medium (10 g L⁻¹ tryptone, 5 g L⁻¹ yeast extract, 5 g L⁻¹ NaCl, 15 g L⁻¹ agar) and for *in planta* studies on 100% TSA medium (17 g L⁻¹ tryptone, 3 g L⁻¹ soybean peptone, 2.5 g L⁻¹ glucose, 5 g L⁻¹ NaCl, 5 g L⁻¹ K₂HPO₄ and 15 g L⁻¹ agar) supplemented with rifampicin. Antibiotics were used at the following final concentrations: rifampicin (R): 50 mg L⁻¹; kanamycin (Km): 25 mg L⁻¹; rifampicin (Rif): 50 mg L⁻¹ and chloramphenicol (Cm): 12.5 mg L⁻¹. For *in planta* studies media were supplemented with 50 mg L⁻¹ cycloheximide and 10 mg L⁻¹ propiconazole to inhibit fungal growth. To prepare inocula, strains were grown 48 h in appropriate media supplemented with appropriate antibiotics. Bacterial cells were suspended in sterile distilled water. Suspensions were calibrated to 1×10⁸ CFU mL⁻¹ and adjusted to the desired final concentrations with sterile distilled water.

Molecular biology techniques. Chromosomal DNA was extracted with the Nucleospin[®] tissue kit (Macherey-Nagel Hoerd, France). Plasmid preps were performed with the Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification Systems (Promega). Restriction enzymes, DNA ligase and GoTaq[®] DNA polymerase (Promega) were used according to the manufacturer's recommendations. Polymerase chain reactions (PCR) were done in 20 µL volumes containing 200 µM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 µM of each primer, 0.4 U µL⁻¹ GoTaq polymerase (final concentrations) and 4 µL of a boiled bacterial suspension (1×10⁷ CFU mL⁻¹). PCR conditions were 5 min at 94°C followed by 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 60°C and 1 min at 72°C and ended with 7 min at 72°C. Southern hybridizations were performed

Table 2. PCR primers used in this study to construct and validate mutations in *hrp* genes of *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R.

Target gene	PCR primer code ^a	Nucleotide sequence ^b	Relevant characteristic	PCR fragment size
<i>hrcJ</i>	HrcJ-F	GGACTAGTCCTGCTGCATGCGGGCGTGGA	<i>SpeI</i> site	335 bp
	HrcJ-R	CCGCTCGAGCGGAAAGCGGGTCGTTGTTGG	<i>XhoI</i> site	
	HrcJ-ext-F	CATGACGCTCATTCTCTCTGT	To be used with ProR	891 bp
<i>hrcR</i>	HrcR-F	GGACTAGTCCGCTGGTGGTCATCATGCTGG	<i>SpeI</i> site	293 bp
	HrcR-R2	CCGCTCGAGCGGTGTTTGAGGAGGAATTGC	<i>XhoI</i> site	
	HrcR-ext-R	TCACCGATAGCTCAGAACCAGG	To be used with ProF	756 bp
<i>hrcT</i>	HrcT-F	GGACTAGTCCCTCGCAGGGCGTGTGCTG	<i>SpeI</i> site	329 bp
	HrcT-R2	CCGCTCGAGCGGGTCATCTGCACATTGTTGTA	<i>XhoI</i> site	
	HrcT-ext-R	CGTTGGCGGCATCGTGAAT	To be used with ProF	850 bp
<i>hrcV</i>	HrcV-F	CGGGATCCCGATTTCGCAAAAACGCCCTGATT	<i>Bam</i> HI site	454 bp
	HrcV-R	GGTCTAGAGCCAGCAGACGCCGCAACACAT	<i>XbaI</i> site	
	HrcV-ext-F	TGGCCAACGAGAACGAGACAAG	To be used with ProR	789 bp
<i>hrpB2</i>	HrpB2-F	GGACTAGTCCATGACGCTCATTCTCTCTGT	<i>SpeI</i> site	357 bp
	HrpB2-R	CCGCTCGAGCGGGCATCAACTTGATCTGCT	<i>XhoI</i> site	
	HrcB2-ext-R	GGAAAGCGGGTCGTTGTTGG	To be used with ProF	896 bp
<i>hrpG</i>	HrpG-F	GGACTAGTCCTGCGAGCTGCTGATCTTCGAT	<i>SpeI</i> site	467 bp
	HrpG-R	CCGCTCGAGCGGTTGTAGATGTGCTGCTCCATGGT	<i>XhoI</i> site	
	HrpG-ext-F	CACCAACCAGCATCCTGCTC	To be used with ProR	1680 bp
<i>hrpX</i>	HrpX-F	GGACTAGTCCGCCTACAGCTACATGATCACCAA	<i>SpeI</i> site	206 bp
	HrpX-R2	CCGCTCGAGCGGCTTCGGCCAGCAGTTCGT	<i>XhoI</i> site	
	HrpX-ext-R	TTACCGCTGCAAGGTCTCCATCGG	To be used with ProF	446 bp
	ProR	TTCACGGGTTGGGTTTCTACA	pV0155 primer	
	ProF	GAGATCCCCAGCCCGCCTAATG	pV0155 primer	

^a: For each target gene the two first primers indicated were designed to construct the mutation. The third primer that needs to be used with ProF or ProR was designed for the validation of the mutation and for the specific identification of mutated strain.

^b: Underlined sequences indicate the relevant restriction site.

using gene and vector-specific PCR fragments as probes. Probes were labeled using the PCR Digoxigenin (DIG) labeling mix (Roche Applied Science, France). Genomic DNA was digested by *Bam*HI and transferred to nylon membrane Hybond N⁺ (Amersham) according to supplier's instructions. Blots were hybridized for 16 h at 42 °C in 50% formamide, 5X SSC 20% SDS, 2% blocking reagent and 0.1% N-lauryl-sarcosine, followed by washes in 2X Chloride/Sodium Citrate (SSC), 0.1% Sodium Dodecylsulfate (SDS) and 0.1X SSC, 0.1 % SDS at 68 °C. The probes were detected using the Fab fragments of an Anti-digoxigenin antibody conjugated with alkaline phosphatase (Anti-DIG-AP) and Nitro-Blue Tetrazolium Chloride/5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt (NBT/BCIP) solution according to the supplier's instructions (Roche Applied Science, France).

Construction of *hrp* gene disruptions in *X. fuscans* subsp. *fuscans*. For specific inactivation of CFBP4834-R genes, a plasmid-integration mutagenesis strategy was used as previously described (34). For each target gene, primers were designed based on the consensus sequence from sequenced genomes of xanthomonads. Sequences of oligonucleotide primers are listed in Table 2. The PCR fragment was ligated into the suicide vector pVO155 (34) and this construction was introduced into *E. coli* DH5 α . PCR fragments cloned into the pVO155 were sequenced to verify their identity. Plasmid was transferred into the strain CFBP4834-R by triparental mating (17) using the mobilizing *E. coli* K12 (pRK600) (16).

Disruption of each target gene was verified by PCR using one primer in the plasmid (proR or proF) and a second primer in the genome outside the recombinant region (Table 2) and Southern blotting using the recombinant fragment as a specific probe. Single insertion was confirmed by Southern blot using a vector-specific probe (Table 2).

For the phenotypic characterization of the mutants, the *in vitro* growth rate of each *hrp* mutant was compared to that of the wild type strain CFBP4834-R. Growth curves were established by growing strains at an initial concentration of 1×10^7 CFU mL⁻¹ in 100-well honeycomb microtiter plates (Thermo Electron, France) in 10% TSB (1.7 g L⁻¹ tryptone, 0.3 g L⁻¹ soybean peptone, 0.25 g L⁻¹ glucose, 0.5 g L⁻¹ NaCl, 0.5 g L⁻¹ K₂HPO₄). Plates were incubated at 28 °C with continuous shaking (120 rpm) over a period of 2 to 3 days. Growth measurements were monitored automatically every 2 h by optical density measurements at 600 nm using the Bioscreen C instrument (Labsystems, Helsinki, Finland). Non-inoculated wells were used as aseptic controls. The experiment was repeated three times for each strain.

The stability of the constructions was verified *in vitro* by testing the kanamycin resistance of the bacteria. Liquid cultures at initial concentration of 1×10^6 CFU mL⁻¹ of

each strain were cultured in 10% TSB without antibiotic selection pressure at 28°C under constant agitation (120 rpm), 24h later they were 10 times-diluted and grown up again, this step was repeated during four days. Finally bacterial populations were plated on selective (10% TSA supplemented with rifamycin and kanamycin) and non-selective media (10% TSA) and population sizes were compared. Three independent cultures of every strain were analyzed and the experiment was repeated three times. The stability of the mutation was also verified *in planta* by comparison of the bacterial population sizes on selective and non-selective media the day of inoculation and at the last sampling date. To confirm stability of the construction vs. antibiotic resistance acquisition and to check cross-contamination among treatments the identity of ten colonies per plant that developed on the non-selective medium was verified by PCR using specific primers (Table 2).

A functional complementation experiment of our 4834HRCT mutant was conducted by providing *in trans* the pIJ3225 plasmid, which is a pLAFR1 carrying the *hrp* cluster of *X. campestris* pv. *campestris* strain 8004 on a 29.200 bp *EcoRI*-*EcoRI* DNA fragment (3).

Plant material. *In planta* experiments were conducted with susceptible common bean (*P. vulgaris* cv. Flavert) and pepper (*Capsicum annuum*, cv. ECW10R). Seeds were sown in 10×10×18 cm pots (1 seed per pot) containing soil substrate (Neuhaus humin substrat S NF 11-44-551, Proveg, La Rochelle, France). Peppers and beans were grown in growth chambers under 16 h of light at 25°C (28°C for pathogenicity tests) and 8 h of darkness at 20°C (22°C for pathogenicity tests) and under high (95%) relative humidity (RH). For experiments on phyllosphere colonization and transmission to seeds RH was decreased to 50% from two days after inoculation. Plants were watered three times per week and supplemented with 0.3 g L⁻¹ NPK (18/14/18) once a week. Plant inoculations were carried out under quarantine at UMR PaVé, Centre INRA, Beaucouzé, France.

Pathogenicity and hypersensitivity tests. Pathogenicity tests on bean were performed by grazing the surface of a young trifoliolate leaf with cotton gauze soaked in a suspension calibrated at 1×10⁷ CFU mL⁻¹. One leaf per plant and three plants per strain were inoculated. Symptoms were recorded daily during 11 days following inoculation. These tests were repeated at least three times for every bacterial strain.

Hypersensitivity (HR) tests were performed on pepper by infiltrating bacterial suspensions adjusted to 1×10⁸ CFU mL⁻¹ into leaves of three-week old plants. Presence or absence of a necrosis localized at the point of inoculation was scored two days after inoculation. Every strain was infiltrated three times on a plant and three plants were inoculated per strain.

Dynamics of bacterial population sizes on bean leaves. Plants at the first trifoliolate stage (31) were spray-inoculated until runoff with bacterial suspensions at 1×10^6 CFU mL⁻¹ and with sterile distilled water for control. For every strain, the first trifoliolate leaf of five plants was collected 3 hours, and 1, 4 and 11 days after inoculation. Each leaf was weighed and ground individually (Stomacher 80; Seward, London, United Kingdom) for 2 min at maximum power in 5 mL of distilled water. Every sample and appropriate dilutions were spiral plated (Spiral Biotech, Bethesda, MD) on selective medium to enumerate the inoculated strain. Samples from control plants were plated on 100% TSA to quantify bacterial indigenous population sizes. Primary leaves were imprinted on appropriate media with appropriate antibiotics at every sampling date. To avoid cross-contaminations, plants receiving a similar treatment were grouped in growth chamber and were separated by polypropylene walls from other treatments. In each experiment, treatments were randomly distributed and experiments were repeated at least three times.

Inoculations of beans at flower bud stage and analyses of bacterial transmission to seeds. Beans at the flower bud stage (31) were spray-inoculated until runoff with bacterial suspensions at 1×10^5 CFU mL⁻¹. Bacterial population sizes were quantified in flower buds from five plants 3 hours after spray-inoculation and in seeds from 10 plants per experiment six weeks after inoculation. The same experimental design as for phyllosphere colonization experiments was used. Samples (flower buds or seeds) were bulked per plant. Bulks of flower buds were weighed and ground (Stomacher 80; Seward, London, United Kingdom) for 2 min at maximum power in 5 mL of distilled water. Asymptomatic pods were carefully opened to extract seeds without any exogenous contamination. For that, in a sterile environment using gloves, every pod was dissected with a sterile scalpel taking care not to touch the seeds. Once the pod was opened, seeds were detached one by one from the pod using sterile forceps. By this method, seeds never enter in contact with the external surface of the pod nor with any contaminated material. Seeds were weighed and soaked overnight at 4°C in 2 ml of sterile distilled water per g of seeds (5.56 seeds g⁻¹). Samples were then vigorously shaken. To quantify population sizes of strains with mutations in *hrp* genes and to look for reversion events aliquots of 500 µL of samples were spread-plated and appropriate dilutions were spiral-plated on 10% TSA-R or 10% TSA-R-Km medium. For every sample, the identity of ten colonies grown on 10% TSA-R was confirmed by PCR with appropriate primers (Table 2). For other strains aliquots of 500 µL of samples and appropriate dilutions were plated on appropriate medium to quantify bacterial population sizes.

To compare the occurrence of the vascular and the floral pathways in bacterial transmission to seeds two different inoculation methods were used. On a first set of plants direct flower bud inoculation was performed by depositing 20 μL of a 1×10^6 CFU mL^{-1} inoculum per flower bud on three groups of flower buds per plant taking every possible precaution to avoid dispersion of the inoculum on leaves. After inoculum drying, inoculated flower buds were enclosed in transparent cellophane bags to avoid any subsequent contamination of leaf by contact with inoculated flowers. On a second set of plants, three groups of flower buds per plant were protected with transparent cellophane bags before plants were inoculated by spraying the phyllosphere with a 1×10^5 CFU mL^{-1} inoculum. Three hours after inoculations bacterial population sizes were quantified on leaves bulked per plant when flower buds were inoculated by depositing drops of inoculum, and on the third trifoliolate leaf for spray inoculated plants. Bacterial population sizes were also quantified in inoculated and protected flower buds. At harvest (six weeks after inoculation) bacterial population sizes were quantified in pods and seeds. Ten plants per strain and per treatment were analyzed the day of inoculation and 30 plants per strain and per treatment at harvest. Sample analyses were performed as described above; pods were analyzed as leaves.

Dynamics of population sizes of CFBP4834-R and 4834HRCV were determined in reproductive organs of plants inoculated by depositing 20 μL of a 1×10^6 CFU mL^{-1} inoculum per flower bud. Flower buds and pods were sampled 3 hours, 1, 2, 3, 4, 15, 28 and 35 days after inoculation on 5 plants per strain and per sampling date. Sample analyses were performed as described above.

Statistical analyses. Statistical analyses were performed using Statbox Pro software (Grimmer Logiciels, Optima France). Log-transformed data were analyzed with Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. Comparisons of transmission frequencies were based on a Pearson's χ^2 test. To compare paired population sizes quantified on selective and non-selective media Wilcoxon's signed-ranks test for two groups was used (39).

1.4 Results

Bacterial colonization of the bean phyllosphere and transmission to bean seeds are function of the type of interaction. In order to characterize the role of *hrp* genes in the survival and the multiplication of *X. fuscans* subsp. *fuscans* in bean phyllosphere we first determined standard bacterial behaviors by their dynamics of bacterial population

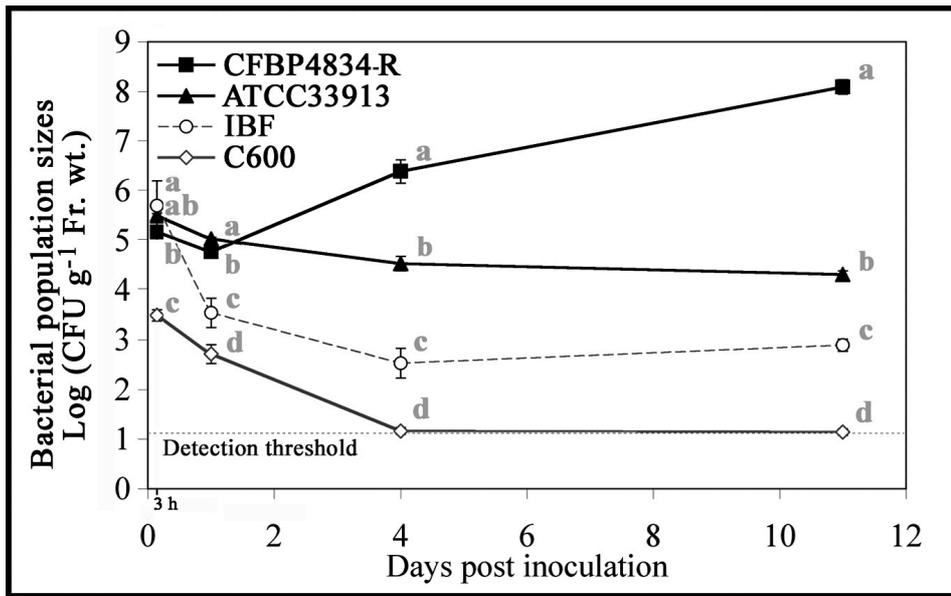


Figure 1: Colonization of bean by wild type strains *X. fuscans* subsp. *fuscans* (CFBP4834-R), *X. campestris* pv. *campestris* (ATCC33913) and *E. coli* C600 and indigenous bacterial flora (IBF). Bacterial population sizes were determined on bean leaves sampled 3 h, 1, 4 and 11 days after spray-inoculation (1×10^6 CFU mL⁻¹). Mean and SEM were calculated on five leaves per sampling date. Mean population sizes followed by different letters are significantly ($p < 0.05$) different on the basis of the Mann-Whitney test.

Table 3. Frequencies of bacterial transmission to bean seeds and mean bacterial population sizes after spray-inoculation (1×10^5 CFU mL⁻¹) of bean at the flower bud stage.

Strains	Frequencies ^a	Mean bacterial population sizes on contaminated harvests (Log CFU g ⁻¹ Fr. wt.) (SEM)
CFBP4834-R	0.87	6.63 (0.33)
ATCC33913	0.23*	1.91 (0.47)
C600	0*	Nd ^b
4834HRCJ	0.17*	2.18 (0.72)
4834HRCR	0.40*	1.71 (0.24)
4834HRCT	0.17*	0.96 (0.14)
4834HRCV	0.37*	2.29 (0.39)
4834HRPB2	0.27*	1.81 (0.28)
4834HRPG	0.07*	1.85 (0.38)
4834HRPX	0.07*	1.31 (0.17)
33913HRCU	0.13*	1.15 (0.27)
33913HRPX	0.23*	1.70 (0.53)

^a: a total of 30 plants were analysed.

^b: not determined.

* indicate significant different values with the wild type CFBP4834-R according to a χ^2 test

sizes in null (*E. coli* C600), compatible (*X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R) and incompatible (*X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913) interactions. Despite the same initial inoculum concentrations (1×10^6 CFU mL⁻¹), *E. coli* C600 population sizes quantified in leaves three hours after inoculation were about 0.01 fold those of CFBP4834-R and ATCC33913 (Fig. 1) showing that *E. coli* C600 was impaired in its adhesion to bean leaves. Moreover, *E. coli* C600 was not able to multiply in the phyllosphere and was not recovered after a few days. Only *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R was able to multiply on bean leaves and reached high population sizes around 1×10^8 CFU g⁻¹ of fresh weight 11 days after bacteria were inoculated. Throughout the experiment, population sizes of *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 remained stable at 1×10^5 CFU g⁻¹ of fresh weight and were significantly ($p < 0.05$) higher than that of the indigenous bacteria flora. No symptoms were observed on any aerial parts of beans during experiments.

X. fuscans subsp. *fuscans* CFBP4834-R, *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 and *E. coli* C600 were also separately inoculated on beans at the flower bud stage to determine their transmission rate to the new generation of seeds. No seeds of the 30 inoculated plants were contaminated with *E. coli* C600 (Table 3). *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R was transmitted to the seeds at high frequency, whereas *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 frequency of transmission to seeds was significantly ($p < 0.05$) lower with much lower population sizes on contaminated seeds than for *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R. Thus three different behaviors were recorded: (i) in the null interaction no bacterial survival and no bacterial transmission to seeds, (ii) in the incompatible interaction bacterial survival in the phyllosphere and bacterial transmission to seeds at low frequencies and associated with low population sizes, whereas (iii) in the compatible interaction bacterial multiplication on leaves and bacterial transmission to seeds at high frequencies and high bacterial population sizes.

Characterization of the T3SS of *X. fuscans* subsp. *fuscans* strain CFBP4834-R. As *X. fuscans* subsp. *fuscans* genome is not yet sequenced, specific primers of *hrp* genes were designed based on consensus sequences obtained by comparison of *hrp* cluster sequences of *X. citri* subsp. *citri* strain 306 (10), *X. axonopodis* pv. *glycines* strain 8ra (23), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* strain 85-10 (40), *X. oryzae* pv. *oryzae* strain KACC10331 (24) and *X. campestris* pv. *campestris* strain ATCC33913 (36). This allowed the identification and the sequencing of a complete set of *hrp* genes in CFBP4834-R (NCBI accession numbers: EU215387, EU215388, EU215389). Sequence analysis of Hrp proteins of CFBP4834-R showed that they were more similar to the Hrp proteins of *X. citri* subsp. *citri* (strain 306) and *X. axonopodis* pv. *glycines* (strain 8ra) than to those of *X. axonopodis* pv.

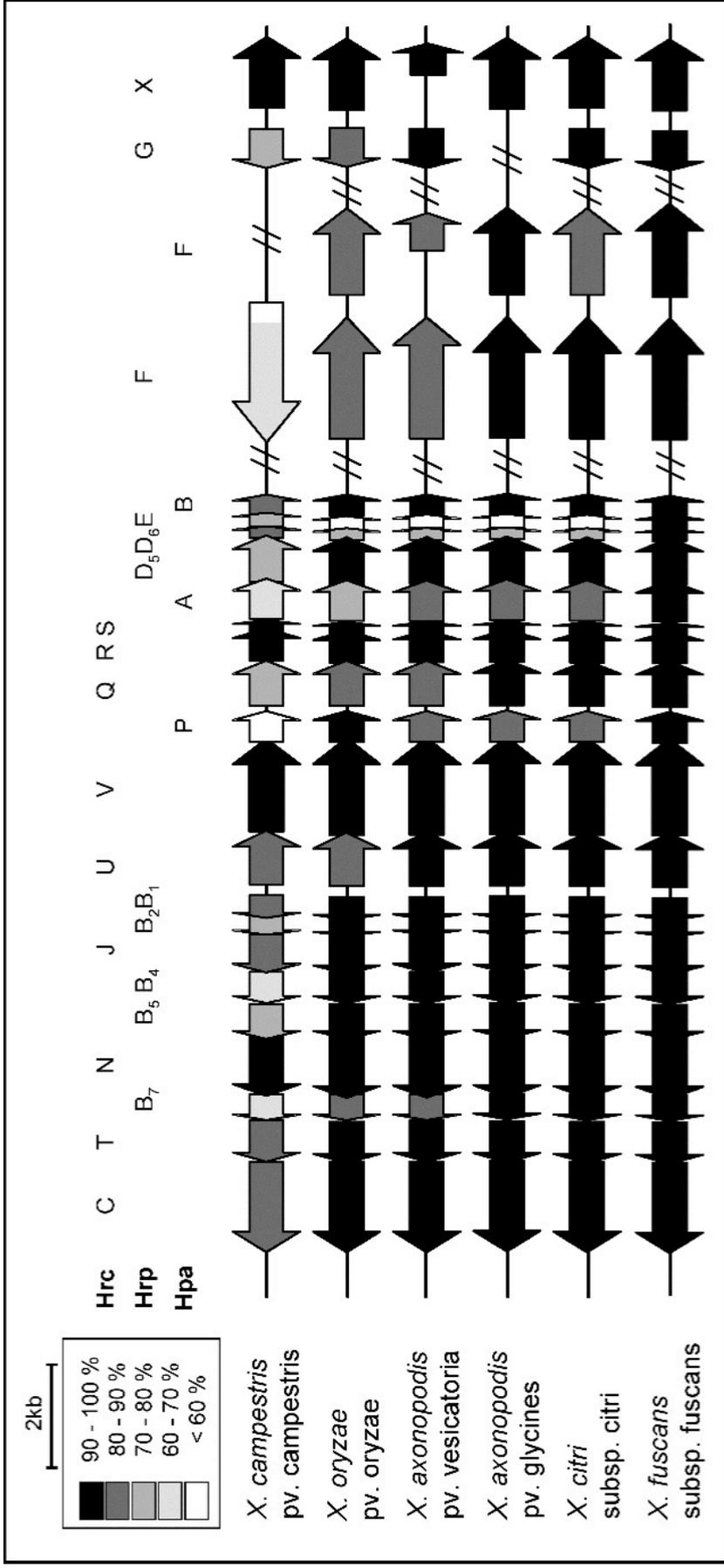


Figure 2: Schematic overview of the *hrp* genes from different sequenced xanthomonads in comparison with *X. fuscans* subsp. *fuscans* *hrp* genes. Genes of the following strains are shown: *X. campestris* pv. *campestris* strain ATCC33913 (10), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* strain 85-10 (40), *X. citri* subsp. *citri* strain 306 (10), *X. axonopodis* pv. *glycines* strain 8ra (23), *X. oryzae* pv. *oryzae* strain KACC10331 (24) and *X. fuscans* subsp. *fuscans* strain CFBP4834-R. Arrows indicate size, position and orientation of the *hrp*, *hrc*, and *hpa* genes. The identity (%) of each protein sequence with its homologous in *X. fuscans* subsp. *fuscans* is presented with a black/grey color scale. *X. fuscans* subsp. *fuscans* amino acid sequences were compared using the NCBI Blast website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> with default parameters.

vesicatoria (strain 85-10) than to those of *X. campestris* pv. *campestris* (strain ATCC33913) (Fig. 2). On the contrary, the sequence of the surface-exposed domain of the pilin HrpE was more closely related to that of *X. campestris* pv. *campestris* (strain ATCC33913) than to that of *X. citri* subsp. *citri* (strain 306).

In order to evaluate the role of the T3SS both in colonization processes in the absence of symptoms and in transmission to seeds of *X. fuscans* subsp. *fuscans* in bean, we constructed strains with mutations in *hrpB2*, *hrcJ*, *hrcR*, *hrcT*, *hrcV*, *hrpG* and *hrpX* genes (Table 1). PCR amplifications using specific primers (Table 2) confirmed that pV0155 unique insertions were at the correct positions. Southern blot hybridizations confirmed the single plasmid insertion event. Population sizes of each strain with mutations enumerated on non-selective medium were not ($p > 0.05$) higher than those enumerated on selective medium showing that all constructions were stable both *in vitro* and *in planta*. Growth rates of the wild type CFBP4834-R and of every strain with mutation in *hrp* genes were similar in 10% TSB, indicating that the mutation of a given *hrp* gene did not impair the *in vitro* growth of the corresponding strain. Furthermore, no reversion was observed *in vitro* after 54 generations without selection pressure (data not shown).

When inoculated onto bean plants, none of the strains with mutations in *hrp* genes was able to cause any water-soaked symptoms as compared to the wild type strain (data not shown). Moreover, following infiltrations into resistant pepper leaves carrying the *BsT* and *Bs1* resistance genes, none of the strains with mutations in *hrp* genes induced an HR, the typical necrotic lesion associated with plant resistance. In contrast, the wild type strain ATCC33913 of *X. campestris* pv. *campestris* carrying *avrBs1* gene (10) induced the expected classical HR and the wild type strain CFBP4834-R of *X. fuscans* subsp. *fuscans* showed the same weak spotty HR as described by Escolar and colleagues (13). Pathogenicity of the 4834HRCT strain with mutation in *hrcT* gene was restored by complementation (data not shown). Altogether, these results showed that *X. fuscans* subsp. *fuscans* strain CFBP4834-R had a functional T3SS.

Impact of mutations in *hrp* genes of CFBP4834-R on bacterial multiplication and bacterial survival in the phyllosphere. Individual inoculation of strains with mutations in *hrp* genes and wild type strain resulted in three different behaviors during the asymptomatic colonization of the bean phyllosphere (Fig. 3). First, in the compatible interaction CFBP4834-R population sizes increased from the first day after inoculation and reached 1×10^8 CFU g^{-1} of fresh weight 11 days after inoculation. Mean CFBP4834-R population sizes the 11th day after inoculation were significantly higher ($p < 0.05$) than those determined the first day after inoculation. Second, strains (4834HRPB2, 4834HRCJ,

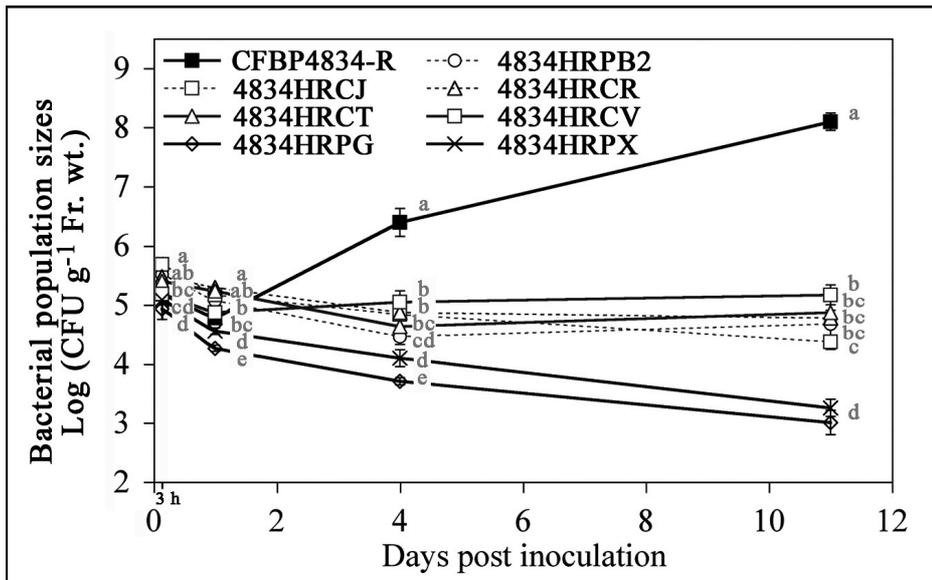


Figure 3: Colonization of bean by *X. fuscans* subsp. *fuscans* strain CFBP4834-R and strains with mutations in *hrp* genes. Bacterial population sizes were determined on bean leaves sampled 3 h, 1, 4 and 11 days after spray-inoculation (1×10^6 CFU mL⁻¹). Mean and SEM were calculated on five leaves per sampling date. Mean population sizes followed by different letters are significantly ($p < 0.05$) different on the basis of Mann-Whitney test.

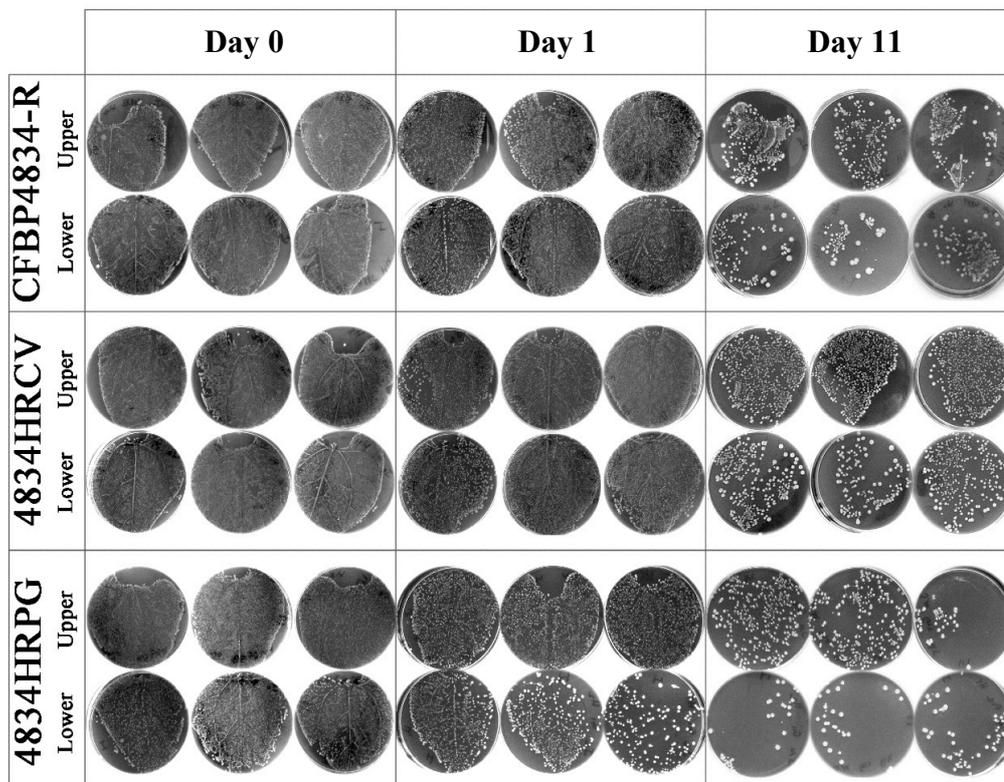


Figure 4: Imprinting of bean leaves (upper and lower surfaces) during phyllosphere colonization by *X. fuscans* subsp. *fuscans* strain CFBP4834-R and strains mutated in *hrcV* genes (4834HRCV) and *hrpG* (4834HRPG) after spray-inoculation (1×10^6 CFU mL⁻¹). Three leaves per strain and per sampling date are presented.

4834HRCR, 4834HRCT, 4834HRCV) with mutations in structural *hrp* genes (*hrpB2*, *hrcJ*, *hrcR*, *hrcT*, *hrcV*) were not able to multiply efficiently throughout the experiment and their population sizes stabilized at 1×10^5 CFU g⁻¹ of fresh weight, as observed previously in the incompatible interaction for ATCC33913 (Fig. 1). For these strains, their mean population sizes the 11th day after inoculation were not significantly ($p > 0.05$) higher than those determined the first day after inoculation. To gain insight into the milieu colonized by the strains we imprinted the surface of leaves on agar medium. Imprinting of leaves inoculated by strain 4834HRCV with mutation in *hrcV* gene (Fig. 4) did not show any substantial differences in surface populations compared to leaves inoculated the wild type strain CFBP4834-R. Surface populations illustrated by number of colonies seemed sometimes even higher than what was observed for the wild type strain. Similar results were obtained for other strains with mutations in structural *hrp* genes. Third, behavior of strains (4834HRPX and 4834HRPG) with mutations in the regulatory *hrp* genes (*hrpX* and *hrpG*) was the most affected with a decrease of their population sizes throughout the experiment. Their mean population sizes determined the first day after inoculation were significantly ($p > 0.05$) higher than those determined the 11th day after inoculation. Imprinting of leaves inoculated by strain 4834HRPG, with mutation in *hrpG* gene, (Fig. 4) showed lower number of colonies on leaves compared to wild type strain CFBP4834-R and strains with mutations in structural *hrp* genes (Fig. 4).

Dynamics of bacterial population sizes of two strains of *X. campestris* pv. *campestris*, one with a mutation in a structural *hrp* gene (*hrcU*) and a second in a regulatory *hrp* gene (*hrpX*), were quantified in the bean phyllosphere in comparison with the wild type strain ATCC33913. Strains of *X. campestris* pv. *campestris* with mutations in *hrp* genes behaved similarly as their parental strain in the bean phyllosphere throughout the 11 days of the experiment. Their population sizes were not significantly different ($p < 0.05$) from each other and from those of ATCC33913 at any sampling date. This absence of differences among population sizes indicated that a functional T3SS did not play any role in *X. campestris* pv. *campestris* survival in non-host phyllosphere.

Strains with mutations in *hrp* genes are impaired in their transmission to bean seeds. Transmission rates of each strain of *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R with mutations in *hrp* genes to the bean seeds were significantly ($p < 0.05$) altered compared to the transmission of the wild type strain (Table 3). Transmission rates of strains with mutations in *hrp* genes ranged from 0.07 to 0.40 while transmission rate of CFBP4834-R was 0.87. The strains with mutations in *hrp* genes also showed significantly ($p < 0.05$) lower population sizes on contaminated seeds (around 1×10^2 CFU g⁻¹ of fresh weight) than the

wild type strain CFBP4834-R (4.3×10^7 CFU g⁻¹ of fresh weight). Strains (4834HRPG and 4834HRPX) with mutations in regulatory genes (*hrpG* and *hrpX*) appeared to be the most altered in their ability to be transmitted to the bean seeds with very low frequencies (0.07 for each) and low final population sizes on seeds. CFBP4834-R strains with mutations in *hrp* genes were transmitted to bean seeds at similar frequencies as *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 in the incompatible interaction with bean. ATCC33913 strains with mutation in *hrp* genes were transmitted to bean seeds at similar frequencies (around 0.20) as their parental strain. This result indicates that in this incompatible interaction a functional T3SS is not required for transmission to seeds.

Analysis of pathways used by CFBP4834-R and strains with mutations in *hrp* genes for transmission to seed. To monitor the bacterial transmission to seeds by the vascular pathway reproductive organs were protected before spray inoculation of leaves. Using this inoculation method only wild type strain CFBP4834-R of *X. fuscans* subsp. *fuscans* was able to transmit to pods and seeds with high frequencies (0.85 and 0.63, respectively) whereas none of 4834HRPG, 4834HRCT and 4834HRCV strains were able to transmit to pods or seeds. Mean CFBP4834-R population sizes on contaminated pods were 4.47×10^3 CFU g⁻¹ (SEM: 3.08 CFU g⁻¹) of fresh weight and on contaminated seeds 158 CFU g⁻¹ (SEM: 2.07 CFU g⁻¹) of fresh weight.

To monitor bacterial transmission to seeds by the floral pathway, inoculum was deposited directly in flower buds. These experiments showed that CFBP4834-R was also able to transmit to both pods and seeds with high frequencies (0.9). CFBP4834-R strains with mutations in regulatory *hrp* gene (4834HRPG) and in structural *hrp* genes (4834HRCT and 4834HRCV) showed important transmission rates to pods with frequencies of 0.67, 0.52 and 0.89, respectively. These strains could transmit to seeds with lower frequency (0.1, 0.2, and 0.04, respectively) than CFBP4834-R. In our asymptomatic conditions, transmission to seeds by the way of a contact with pod symptoms was obviously abolished and great care was taken to avoid any seed contamination with pod tissue while collecting seeds.

Lower bacterial transmission to pods is not a consequence of a lower initial colonization of the strains with mutations in *hrp* gene in flowers compared to CFBP4834-R. The dynamic of flower contamination following flower bud inoculation was similar ($p > 0.05$) for CFBP4834-R and 4834HRCV strain until the fourth day after inoculation. Precisely, mean population sizes of CFBP4834-R were 2.33×10^5 , 4.05×10^5 , 3.58×10^6 , 1.43×10^6 CFU g⁻¹ of fresh weight and of 4834HRCV 2.16×10^5 , 1.63×10^6 , 3.48×10^6 , 3.16×10^5 CFU g⁻¹ of fresh weight, every day after inoculation respectively. On the 15th, 28th and 35th days after

inoculation population sizes were significantly ($p < 0.05$) lower on pods colonized by 4834HRCV (2.26×10^4 , 2.29×10^4 , 1.28×10^5 CFU g⁻¹ of fresh weight) than on pods colonized by CFBP4834-R (1.94×10^7 , 2.77×10^7 , 3.51×10^8 CFU g⁻¹ of fresh weight). Populations were three orders of magnitude lower for the strain with mutation in *hrcV* gene than for the wild type at each sampling date.

1.5 Discussion

In this paper, we showed that a classical pathogenicity determinant, the T3SS encoded by the *hrp* gene cluster is involved in *X. fuscans* subsp. *fuscans* early and late colonization processes but not in its survival on its host. The T3SS is also required for high a frequency of pathogen transmission to the seeds. However, low bacterial transmission rates to seeds are independent of a functional T3SS as is bacterial survival on non-host plants. Previous studies have demonstrated that alteration of T3SS in other bacterial pathogens abolishes pathogenicity (8, 23, 26, 50) and *in planta* multiplication (7, 26). Our experimental approach focused on the measurement of phyllosphere colonization processes and transmission to seeds of wild type and strains with mutations in *hrp* genes of *X. fuscans* subsp. *fuscans* in low RH conditions with low initial bacterial population sizes (below 1×10^6 CFU g⁻¹ of fresh weight). These conditions do not favor disease expression for *X. fuscans* subsp. *fuscans* (22) and were used to reproduce the most commonly observed situation under temperate climate for a bacterial plant pathogen, *i.e.* asymptomatic colonization of the host. Indeed, the interactions between a susceptible host and a virulent plant pathogenic bacterium may only rarely result in disease symptoms (21). We show here that the absence of disease manifestation does not compromise host colonization by *X. fuscans* subsp. *fuscans* including the phyllosphere and the reproductive organs. *X. fuscans* subsp. *fuscans* behavior is not restricted to survival; it is therefore different from that of *X. campestris* pv. *campestris* on bean in these environmental conditions.

During bean phyllosphere colonization, *X. fuscans* subsp. *fuscans* colonizes both external and internal compartments of the plant (22, 49). It is probable that efficient asymptomatic bean colonization by *X. fuscans* subsp. *fuscans* was mainly due to an endophytic colonization. Indeed, we observed with leaf imprinting that the number of colonies of *X. fuscans* subsp. *fuscans* on the leaf surface decreased in the days following spray inoculation whereas *X. fuscans* subsp. *fuscans* total population sizes significantly increased, suggesting an important endophytic colonization. Endophytic colonization of the

leaf parenchyma may be particularly well supported by the presence of more nutrients in the internal compartment of leaves than on the leaf surface (30).

Strains with alterations in the T3SS were impaired in leaf colonization. Leaf imprinting showed that similar numbers of colonies were recovered from the surface of the leaf for strains with mutations in structural *hrp* genes and the wild type strain whereas strains with mutation in *hrp* genes established total phyllosphere population sizes that were 1000 fold smaller than those of the wild type strain. This means that the decrease probably concerned mainly the endophytic compartment. Interestingly, similar conclusions were obtained for other phytopathogens like *P. syringae* and *Erwinia amylovora*. *P. syringae* pv. *tomato hrp* mutants are impaired in the endophytic colonization of their host (7). Furthermore, it has been shown that structural *hrp* genes are induced inside leaf tissue and not on the leaf surface (9) and that the elicitor of *hrp* genes via PrhA in *Ralstonia solanacearum* is a non-diffusible plant cell wall component (2).

We demonstrated that *X. fuscans* pv. *fuscans* strains deficient in the regulatory genes *hrpG* and *hrpX* were more affected than strains deficient in the T3SS structural genes in their colonization capacities, suggesting that HrpG and HrpX regulate additional genes beyond T3SS in *X. fuscans* subsp. *fuscans*. Moreover, population size of 4834HRPG, strain mutated in *hrpG* gene, was slightly but significantly lower than that of the wild type 3 h after leaf inoculations suggesting that strain was impaired in leaf adhesion. This could have impacted its potential for later leaf colonization. Interestingly, we also showed that this strain (4834HRPG) was also hyper motile (data not shown). It has been shown in *Ralstonia solanacearum* that HrpG positively regulates genes involved in attachment and protection response functions (41). The authors proposed that HrpG serves as a molecular switch between saprophytic and pathogenic lifestyles (41). Indeed, there is an opposite regulation in the phytopathogenic bacteria *Erwinia amylovora* between the virulence-associated T3SS and the flagellar system (9). Moreover, it was also demonstrated that nutrient acquisition in *X. campestris* pv. *campestris* could involve plant carbohydrate scavenging by TonB-dependent receptors and that some TBDRs could be under the regulation of *hrpG* gene but also are independent of a functional T3SS (5). It is therefore tempting to hypothesize that nutrient acquisition during saprophytic development of these plant pathogenic bacteria is dependent on HrpG regulation but also independent of a functional T3SS. Surprisingly, *X. fuscans* subsp. *fuscans* strains deficient in the regulatory genes *hrpG* and *hrpX* were still able to transmit to seeds. This perhaps links to the very different chemical and physical natures of these two environments (phyllosphere and flower buds). This is also coherent with other reports dealing with the pleiotropic phenotype of strains with mutations in *hrp* regulatory genes (33, 41).

We confirmed that *X. fuscans* subsp. *fuscans* *hrp* genes translated sequences shared strong homology with Hrp proteins of other *X. axonopodis* pathovars *sensu* Vauterin and colleagues (22, 43). The percentage of identity corroborated the predicted phylogeny of xanthomonads, namely that *X. fuscans* subsp. *fuscans* was more closely related to *X. citri* subsp. *citri* and *X. axonopodis* pv. *glycines* than to *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* and more closely related to the species *X. oryzae* pv. *oryzae* than to the species *X. campestris* pv. *campestris* (37, 42). However, the Hrp pilus subunit, HrpE, seemed to have evolved differently than other Hrp proteins. We found that the surface-exposed domain of the *X. fuscans* pv. *fuscans* HrpE was more closely related to that of *X. campestris* pv. *campestris* than to that of *X. citri* subsp. *citri*. A structure in three domains is proposed for HrpE: (i) a domain containing the T3S signal in the N-terminus, (ii) a surface-exposed domain and (iii) a polymerization domain in the C-terminus (46). Weber and Koebnik (47) showed that the C-terminus is subjected to purifying selection and the surface-exposed domain to positive selection, corresponding to an evolutionary adaptation of this surface structure to avoid recognition by the plant defense system (47). Curiously, we found a poor homology (30%) with that of *X. axonopodis* pv. *phaseoli* which is also a bean pathogen and was until recently considered belonging to same species and pathovar (22, 43).

Both from ecological and agricultural perspectives, transmission of a pathogen to the next generations of its host is a major critical step. We are not aware of any other study designed to look explicitly at the loss of a major class of pathogenicity determinants on the transmission of a pathogen to the seeds of its host. One pathway for bacterial transmission to seeds (i.e. seed pollution) was suppressed in our experimental approach by avoiding contact of seeds with symptoms (environmental conditions did not allow symptom development) or contaminated pod tissue (delicate extraction of seeds from pods). The two remaining pathways for bacterial transmission to seeds are the vascular pathway in which bacteria colonize reproductive organs through the vascular system and the floral pathway in which bacteria colonize the pistil and the ovary (28) to finally reach and contaminate the seeds. We found that alteration of T3SS drastically decreased transmission to seeds by *X. fuscans* subsp. *fuscans*. This could be the result of low bacterial population sizes of strains with mutations in *hrp* genes but also to transmission pathways not available for such strains limiting contamination of seeds. Our experiments of leaf inoculation associated with a protection of flower buds showed that strains with mutations in *hrp* genes were completely unable to use the vascular pathway for transmission to seeds. For the wild type strain, vascular transmission to seeds was responsible for the contamination of seeds for more than 50% of the plants. By direct flower bud inoculations, *X. fuscans* subsp. *fuscans* *hrp* strains with mutations in *hrp* genes could transmit to seeds

through the stylar tissues. Floral transmission to seeds via the stylar tissue was demonstrated for *Acidovorax avenae* ssp. *citrulli* in watermelon blossoms (25) and for a bacterial biocontrol agent (15). Floral transmission to seeds is however less efficient for strains with mutations in *hrp* genes than for the wild type strain. This was not a consequence of a low bacterial installation on flower buds as population sizes remained similar for the wild type strain and 4834HRCV during at least four days following inoculation of flower buds.

According to our results, we propose different stages to describe colonization of aerial plant parts by bacteria. First, bacteria adhere on plant surface after arrival. This step was not possible for *E. coli* on bean leaves, based on the 100 fold smaller population sizes for *E. coli* immediately following inoculation. Second, bacteria survive in the phyllosphere. This survival is certainly limited to the surface of the leaf. Indeed, based on the comparison of the population sizes quantified in the phyllosphere and the number of colonies found on the leaf surface by leaf imprinting for *X. campestris* pv. *campestris*, strains mutated in structural *hrp* genes and the wild type strain of *X. fuscans* subsp. *fuscans* we conclude that the survival of *X. campestris* pv. *campestris* and of strains mutated in structural *hrp* genes was mainly restricted to the leaf surface. This basic epiphytic competence requires the master *hrp* regulators (HrpG and HrpX) but not a functional T3SS. Strains of *X. fuscans* subsp. *fuscans* with mutations in *hrp* structural genes and *X. campestris* pv. *campestris* are able to colonize new organs (data not shown) and contaminate reproductive organs like flowers and seeds. Frequencies of such events and associated population sizes are however low. Third, in the case of a compatible interaction, an increase in bacterial population sizes colonizing the host is dependent on a functional T3SS even in the absence of symptoms. This colonization is mainly endophytic and leads to an efficient transmission of the pathogen to the seeds.

Altogether, the results reported in this study indicate that *hrp* genes are implicated in early and late stages of host phyllosphere colonization by *X. fuscans* subsp. *fuscans* and in transmission to host seeds. This new finding opens questions about the genes regulated by the master regulators HrpG and HrpX and about the physical role of T3SS in these processes.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant from Conseil Régional des Pays de la Loire. We are grateful to M. Arlat and E. Lauber for providing strains and mutagenesis protocol. We thank J. Benard and P. Horeau for plant production, S. Domecyn, J. Menat and N. Sommerlatt for assistance; G. Beattie and T. Boureau for critical review of the manuscript.

1.6 References

1. Agarwal, V. K., and J. B. Sinclair. 1987. Principles of seed pathology, vol. 1. CRC Press Inc, Boca Raton, FL.
2. Aldon, D., B. Brito, C. Boucher, and S. Genin. 2000. A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. EMBO J. **19**:2304-2314.
3. Arlat, M., C. L. Gough, C. E. Barber, C. Boucher, and M. J. Daniels. 1991. *Xanthomonas campestris* contains a cluster of *hrp* genes related to the larger *hrp* cluster of *Pseudomonas solanacearum*. Mol. Plant Microbe Interact. **4**:593-601.
4. Beattie, G. A., and S. E. Lindow. 1995. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. Annu. Rev. Phytopathol. **33**:145-172.
5. Blanvillain, S., D. Meyer, A. Boulanger, M. Lautier, C. Guynet, N. Denance, J. Vasse, E. Lauber, and M. Arlat. 2007. Plant carbohydrate scavenging through TonB-dependent receptors: a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. PLoS ONE **2**:doi:10.1371/journal.pone.0000247.
6. Bonas, U., R. E. Stall, and B. Staskawicz. 1989. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Mol. Gen. Genet. **218**:127-136.
7. Boureau, T., J. Routtu, E. Roine, S. Taira, and M. Romantschuk. 2002. Localization of *hrpA*-induced *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in infected tomato leaves. Mol. Plant Pathol. **3**:451-460.
8. Buttner, D., and U. Bonas. 2002. Getting across bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. EMBO J. **21**:5313-5322.
9. Cesbron, S., J. P. Paulin, M. Tharaud, M. A. Barny, and M. N. Brisset. 2006. The alternative sigma factor HrpL negatively modulates the flagellar system in the phytopathogenic bacterium *Erwinia amylovora* under *hrp*-inducing conditions. FEMS Microbiol. Lett. **257**:221-227.
10. da Silva, A. C., J. A. Ferro, F. C. Reinach, C. S. Farah, L. R. Furlan, R. B. Quaggio, C. B. Monteiro-Vitorello, M. A. Van Sluys, N. F. Almeida, L. M. Alves, A. M. do Amaral, M. C. Bertolini, L. E. Camargo, G. Camarotte, F. Cannavan, J. Cardozo, F. Chambergo, L. P. Ciapina, R. M. Cicarelli, L. L. Coutinho, J. R. Cursino-Santos, H. El-Dorry, J. B. Faria, A. J. Ferreira, R. C. Ferreira, M. I. Ferro, E. F. Formighieri, M. C. Franco, C. C. Greggio, A. Gruber, A. M. Katsuyama, L. T. Kishi, R. P. Leite, E. G. Lemos, M. V. Lemos, E. C. Locali, M. A. Machado, A. M. Madeira, N. M. Martinez-Rossi, E. C. Martins, J. Meidanis, C. F. Menck, C. Y.

- Miyaki, D. H. Moon, L. M. Moreira, M. T. Novo, V. K. Okura, M. C. Oliveira, V. R. Oliveira, H. A. Pereira, A. Rossi, J. A. Sena, C. Silva, R. F. de Souza, L. A. Spinola, M. A. Takita, R. E. Tamura, E. C. Teixeira, R. I. Tezza, M. Trindade dos Santos, D. Truffi, S. M. Tsai, F. F. White, J. C. Setubal, and J. P. Kitajima. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**:459-463.
11. Darrasse, A., C. Bureau, R. Samson, C. Morris, and M.-A. Jacques. 2007. Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**:203-215.
 12. Devoret, R., and M. Blanco. 1970. Mutants of *Escherichia coli* K12 (λ)+ non-inducible by thymine deprivation. *Mol. Gen. Genet.* **107**:272-280.
 13. Escolar, L., G. Van Den Ackerveken, S. Pieplow, O. Rossier, and U. Bonas. 2001. Type III secretion and *in planta* recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT. *Mol. Plant Pathol.* **2**:287-296.
 14. Fenton, A., J. P. Fairbairn, R. Norman, and P. J. Hudson. 2002. Parasite transmission: reconciling theory and reality. *J. Anim. Ecol.* **71**:893-905.
 15. Fessehaie, A., and R. R. Walcott. 2005. Biological control to protect watermelon blossoms and seed from infection by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytopathology* **95**:413-419.
 16. Finan, T. M., B. Kunkel, G. F. De Vos, and E. R. Signer. 1986. Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *J. Bacteriol.* **167**:66-72.
 17. Glazebrook, J., and G. C. Walker. 1991. Genetic techniques in *Rhizobium meliloti*. *Method. Enzymol.* **204**:398-418.
 18. Gurlebeck, D., F. Thieme, and U. Bonas. 2006. Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J. Plant Physiol.* **163**:233-255.
 19. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
 20. Hirano, S. S., A. O. Charkowski, A. Collmer, D. K. Willis, and C. D. Upper. 1999. Role of the Hrp type III protein secretion system in growth of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a on host plants in the field. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:9851-9856.

21. Hirano, S. S., and C. D. Upper. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* - a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:624-653.
22. Jacques, M. A., K. Josi, A. Darrasse, and R. Samson. 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.
23. Kim, J. G., B. K. Park, C. H. Yoo, E. Jeon, J. Oh, and I. Hwang. 2003. Characterization of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Hrp pathogenicity island. *J. Bacteriol.* **185**:3155-3166.
24. Lee, B. M., Y. J. Park, D. S. Park, H. W. Kang, J. G. Kim, E. S. Song, I. C. Park, U. H. Yoon, J. H. Hahn, B. S. Koo, G. B. Lee, H. Kim, H. S. Park, K. O. Yoon, J. H. Kim, C. H. Jung, N. H. Koh, J. S. Seo, and S. J. Go. 2005. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Res.* **33**:577-586.
25. Lessl, J. T., A. Fessehaie, and R. R. Walcott. 2007. Colonization of female watermelon blossoms by *Acidovorax avenae* ssp. *citrulli* and the relationship between blossom inoculum dosage and seed infestation. *J. Phytopathol.* **155**:114-121.
26. Lindgren, P. B., R. C. Peet, and N. J. Panopoulos. 1986. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "*phaseolicola*" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. *J. Bacteriol.* **168**:512-522.
27. Lindow, S. E., and M. T. Brandl. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1875-1883.
28. Maude, R. B. 1996. Seedborne diseases and their control *Principles & Practice*. CAB International, Oxon, UK.
29. McCallum, H., N. Barlow, and J. Hone. 2001. How should pathogen transmission be modelled? *Trends Ecol. Evol.* **16**:295-300.
30. Mercier, J., and S. E. Lindow. 2000. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:369-374.
31. Michael, T. E. 1994. The bean plant., p. 1-4. *In* R. Hall (ed.), *Compendium of bean diseases*. APS Press, Saint Paul.
32. O'Brien, A. D., J. W. Newland, S. F. Miller, R. K. Holmes, H. W. Smith, and S. B. Formal. 1984. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* **226**:694-696.
33. Occhialini, A., S. Cunnac, N. Reymond, S. Genin, and C. Boucher. 2005. Genome-wide analysis of gene expression in *Ralstonia solanacearum* reveals that the *hrpB*

- gene acts as a regulatory switch controlling multiple virulence pathways. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**:938-949.
34. Oke, V., and S. R. Long. 1999. Bacterial genes induced within the nodule during the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Mol. Microbiol.* **32**:837-849.
 35. Puhler, A., M. Arlat, A. Becker, M. Gottfert, J. P. Morrissey, and F. O'Gara. 2004. What can bacterial genome research teach us about bacteria-plant interactions? *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**:137-147.
 36. Qian, W., Y. Jia, S. X. Ren, Y. Q. He, J. X. Feng, L. F. Lu, Q. Sun, G. Ying, D. J. Tang, H. Tang, W. Wu, P. Hao, L. Wang, B. L. Jiang, S. Zeng, W. Y. Gu, G. Lu, L. Rong, Y. Tian, Z. Yao, G. Fu, B. Chen, R. Fang, B. Qiang, Z. Chen, G. P. Zhao, J. L. Tang, and C. He. 2005. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res.* **15**:757-767.
 37. Rademaker, J. L. W., F. J. Louws, M. H. Schultz, U. Rossbach, L. Vauterin, J. Swings, and F. J. de Bruijn. 2005. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology* **95**:1098-1111.
 38. Schaad, N. W., E. Postnikova, G. H. Lacy, A. Sechler, I. Agarkova, P. E. Stromberg, V. K. Stromberg, and A. K. Vidaver. 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**:494-518.
 39. Sokal, R. R., and F. J. Rohlf. 1969. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research.* W. H. Freeman & Co., San Francisco, Calif.
 40. Thieme, F., R. Koebnik, T. Bekel, C. Berger, J. Boch, D. Buttner, C. Caldana, L. Gaigalat, A. Goesmann, S. Kay, O. Kirchner, C. Lanz, B. Linke, A. C. McHardy, F. Meyer, G. Mittenhuber, D. H. Nies, U. Niesbach-Klosgen, T. Patschkowski, C. Ruckert, O. Rupp, S. Schneiker, S. C. Schuster, F. J. Vorholter, E. Weber, A. Puhler, U. Bonas, D. Bartels, and O. Kaiser. 2005. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv.

- vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. J. Bacteriol. **187**:7254-7266.
41. Valls, M., S. Genin, and C. Boucher. 2006. Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. PLoS Pathog. **2**:doi:10.1371/journal.ppat.0020082.
 42. Vauterin, L., B. Hoste, K. Kersters, and J. Swings. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. Int. J. Syst. Bacteriol. **45**:472-489.
 43. Vauterin, L., J. Rademaker, and J. Swings. 2000. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. Phytopathology **90**:677-682.
 44. Vidaver, A. K. 1993. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: cause of common bacterial blight of bean., p. 40-44. In J. G. Swings and E. L. Civerolo (ed.), *Xanthomonas*. Chapman & Hall, London.
 45. Walcott, R. R., R. D. Gitaitis, and A. C. Castro. 2003. Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Phytopathology **93**:528-534.
 46. Weber, E., and R. Koebnik. 2006. Domain structure of HrpE, the Hrp pilus subunit of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. J. Bacteriol. **187**:6175-6186.
 47. Weber, E., and R. Koebnik. 2006. Positive selection of the Hrp pilin HrpE of the plant pathogen *Xanthomonas*. J. Bacteriol. **188**:1405-1410.
 48. Weller, D. M., and A. W. Saettler. 1980. Evaluation of seedborne *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* as primary inocula in bean blights. Phytopathology **70**:148-152.
 49. Zaumeyer, W. J. 1930. The bacterial blight of beans caused by *Bacterium phaseoli*. Technical Bulletin 186. United States Department of Agriculture.
 50. Zou, L. F., X. P. Wang, Y. Xiang, B. Zhang, Y. R. Li, Y. L. Xiao, J. S. Wang, A. R. Walmsley, and G. Y. Chen. 2006. Elucidation of the *hrp* clusters of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* that control the hypersensitive response in nonhost tobacco and pathogenicity in susceptible host rice. Appl. Environ. Microbiol. **72**:6212-6224.

Tableau 4 : Amorces utilisées pour l'identification puis la mutation d'orthologues des gènes *hrcN*, *hrpF*, *avrBs1*, *avrBs2* et *avrBs3* chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R. Les amorces en gras sont celles qui ont été utilisées pour la mutagenèse dirigée des gènes correspondant chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R.

Gène cible	Taille du gène (pb)	Nom de l'amorce	Séquence nucléotidique des amorces	Position des amorces (pb)
<i>hrcN</i>	1329	<i>hrcN</i> -F	AAGAGCACCTTGATGGGAATGTT	537
		<i>hrcN</i> -R	GGGACGATCTGGCTCATCAC	1111
<i>hrpF</i>	2475	<i>hrpF</i> -F	CCGCTCGAGCGGGATCGTTTCGACCTTGAATGC	512
		<i>hrpF</i> -R	GGACTAGTCCCTTCTTGTAGCCGGTGATCGAG	1558
<i>avrBs1</i>	1338	<i>AvrBs1</i> -F	GGACTAGTCCAATAAATCCACGCTGCATGACA	472
		<i>AvrBs1</i> -R	CCGCTCGAGCGGTGGGCCAAGCCATGATAGTT	1083
<i>avrBs2</i>	2145	<i>AvrBs2</i> -F	GGACTAGTCCTGCCGGTGTGATGCACGA	944
		<i>AvrBs2</i> -R	CCGCTCGAGCGGTGATCGGTCAACAGGCTTTC	1782
<i>avrBs3</i>	3381	<i>AvrBs3</i> -F1	GGACTAGTCCCCCCTCACCTGCGTTCT	176
		<i>AvrBs3</i> -R1	CCGCTCGAGCGGGCCACGTTTTGCAATCTTGAG	801
		<i>AvrBs3</i> -F2	GGACTAGTCCCTCAAGATTGCAAAACGTGGC	801
		<i>AvrBs3</i> -R2	CCGCTCGAGCGGGAGATAACTGGGCAACAATGCTCT	2543
		<i>AvrBs3</i> -F3	GGACTAGTCCAGAGCATTGTTGCCAGTTATCTC	2543
<i>AvrBs3</i> -R3	CCGCTCGAGCGGGTTCGGTGACGCCACTCT	2875		

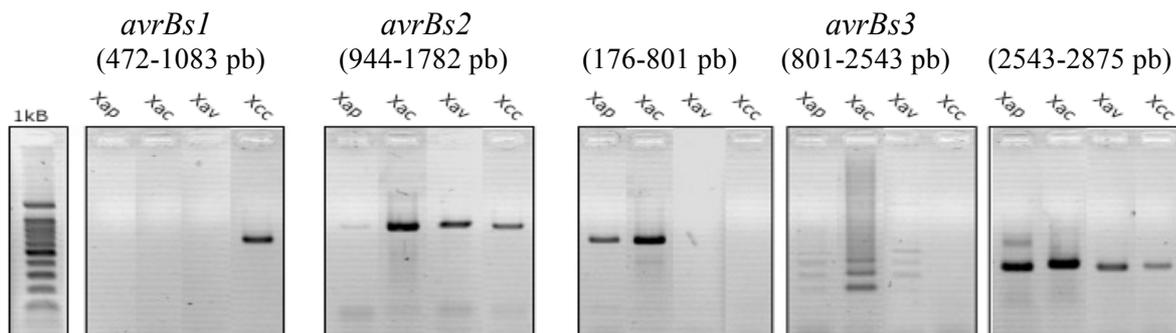


Figure 5 : Photographie de Gels d'agarose présentant les résultats des amplifications PCR obtenus avec les amorces dessinées dans les gènes *avrBs1*, *avrBs2* et *avrBs3* chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R (*Xap*), *X. citri* subsp. *citri* 306 (*Xac*), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 85-10 (*Xav*) et enfin *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 (*Xcc*).

Tableau 5 : Résumé des résultats obtenus par Southern Blot pour l'identification d'effecteurs de type 3 (*avrBs1*, *avrBs2*, *avrBs3*) chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R (*Xap*), *X. citri* subsp. *citri* 306 (*Xac*), *X. a. pv. vesicatoria* 85-10 (*Xav*) et enfin *X. c. pv. campestris* ATCC33913 (*Xcc*). Les sondes ont été obtenues à partir des amorces *AvrBs1*-F/R, *AvrBs2*-F/R, *AvrBs3*-F1/R1.

Souche	Nombre de bandes obtenues		
	<i>avrBs1</i>	<i>avrBs2</i>	<i>avrBs3</i>
<i>Xcc</i> ATCC33913	1	1	0
<i>Xav</i> 85-10	0	1	1
<i>Xac</i> 306	0	1	4
<i>Xap</i> CFBP4834-R	0	1	2

2. Données complémentaires

2.1 Identification d'homologues des gènes *hrcN*, *hrpF*, *avrBs2* et *avrBs3* chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R

Après avoir recherché les séquences des gènes *hrcN*, *hrpF*, *avrBs1*, *avrBs2* et *avrBs3* dans les bases de données (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>), nous avons défini des amorces (tableau 4) dans les zones consensus après alignement d'au moins deux séquences d'espèces bactériennes phylogénétiquement proches (soit *X. citri* subsp. *citri* 306, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 85-10 ou *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33915). *In silico*, elles ont permis, à l'aide du logiciel AmplifX 1.1[®] (Apple), d'amplifier sur le génome de *X. citri* subsp. *citri* 306 des fragments de 574 pb pour le gène *hrcN*, 1046 pb pour *hrpF*, 611 pb pour *avrBs1*, 838 pb pour *avrBs2*, et respectivement 625, 1742, 332 pb à partir des positions 176, 801, 2543 pb pour le gène *avrBs3*.

Les homologues des gènes *hrcN* et *hrpF* ont été identifiés par PCR chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R et par le séquençage de chacun des deux gènes. Les homologues protéiques obtenues avec le programme BlastX sont présentées dans l'article 1 (figure 2).

Les amorces nous ont permis d'amplifier par PCR chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R des homologues des gènes *avrBs2* et *avrBs3* mais pas d'homologue du gène *avrBs1* (figure 5). Le gène *avrBs1* a pu être amplifié uniquement chez *X. campestris* pv. *campestris*. Le gène *avrBs2* a pu être amplifié chez les quatre souches testées (*X. citri* subsp. *citri*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. campestris* pv. *campestris* et *X. fuscans* subsp. *fuscans*). Enfin, les amorces définies pour l'amplification du début (176-801 pb) et de la fin (2543-2875 pb) du gène *avrBs3* montrent qu'au moins un homologue de ce gène semble bien présent chez *X. fuscans* subsp. *fuscans*, *X. citri* subsp. *citri* et *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. L'utilisation d'amorces dessinées dans la partie centrale (801-2543 pb) du gène conduit à l'obtention de bandes multiples.

Les amorces dessinées dans chacun des trois gènes *avr* ont été utilisées pour construire des sondes marquées à la digoxigénine. Des hybridations par Southern blot ont été effectuées avec ces sondes sur de l'ADN génomique digéré par *BamHI* de chacune des souches testées. Les hybridations ont permis de confirmer les résultats obtenus par PCR mais aussi de détecter le nombre de copies des gènes ciblés chez les différentes souches étudiées (tableau 5). Une seule copie du gène *avrBs1* a été détectée et ce uniquement chez *X. campestris* pv. *campestris*. Une seule copie du gène *avrBs2* est présente chez chacune des quatre souches testées. Enfin deux copies d'homologues de la famille *avrBs3*

ont été identifiées chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R, quatre copies chez *X. citri* subsp. *citri* 306 et une seule copie chez *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 85-10.

Les fragments amplifiés des gènes identifiés chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R ont été séquencés et analysés par le programme BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) (tableau 6). L'homologue du gène *avrBs2* ciblé correspond bien au gène décrit chez de nombreuses espèces du genre *Xanthomonas*. Les 800 pb séquencés chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R présentent une forte homologie (>90 %) avec les gènes *avrBs2* de *X. citri* subsp. *citri* 306 et *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 85-10. Enfin le séquençage d'un homologue du gène *avrBs3* présente de fortes homologies avec les gènes *pthB*, *pthC*, *pthA(1,2,3,4)* de différentes espèces du genre *Xanthomonas* qui sont phylogénétiquement proches. Ces gènes appartiennent bien à la famille AvrBs3 des effecteurs de type 3.

2.2 Vérification de la construction des mutants 4834HRCN, 4834HRPF, 4834AVRBS2 et 4834AVRBS3

Quatre mutants ont été obtenus chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R par mutagenèse dirigée : 4834HRCN, 4834HRPF, 4834AVRBS2 et 4834AVRBS3. Les constructions de ces mutants ont été vérifiées selon la démarche en quatre étapes décrite dans l'article 1. La vérification par amplification PCR sur colonie en utilisant des combinaisons d'amorces spécifiques du vecteur (proF et proR) et du gène (Ext-F et Ext-R) (figure 6) a permis de confirmer la bonne intégration du plasmide dans le gène d'intérêt et dans la bonne orientation. L'hybridation de l'ADN des mutants avec une sonde spécifique du vecteur et une sonde correspondant au produit PCR nous a permis de vérifier que la détection positive par PCR des mutants, correspondait dans tous les cas, à l'insertion unique et dans sa totalité du plasmide pVO155+insert dans le génome de *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R. Concernant les homologues du gène *avrBs3*, un seul des deux gènes a été muté chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R. Les croissances sur milieux non sélectifs permettant la succession de plus de 50 générations, suivies des dénombrements sur milieux sélectifs et non-sélectifs ont montré que les tailles des populations obtenues sur milieu sélectif sont plus élevées ou équivalentes à celles obtenues sur milieu non-sélectif (tableau 7). Les mutants sont donc stables et la pression de sélection (la kanamycine) confère à ces mutants un avantage sélectif pour la culture *in vitro*. La mesure de la croissance *in vitro* de *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R et des mutants 4834HRCN, 4834HRPF, 4834AVRBS2 et 4834AVRBS3 montre qu'elles sont tout à fait similaires (figure 7).

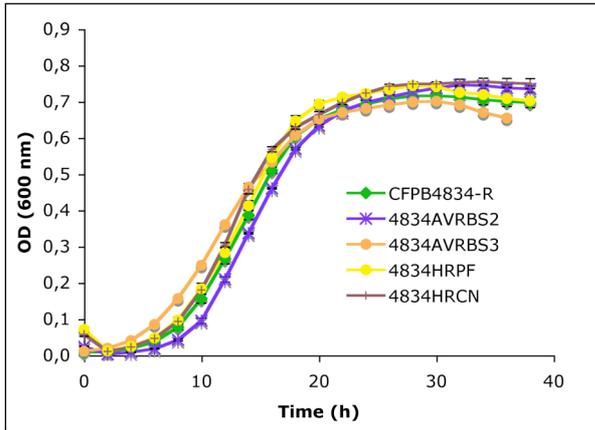


Figure 7 : Suivi des croissances *in vitro* de la souche sauvage *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R et des mutants 4834HRCN, 4834HRPF, 4834AVRBS2 et 4834AVRBS3.

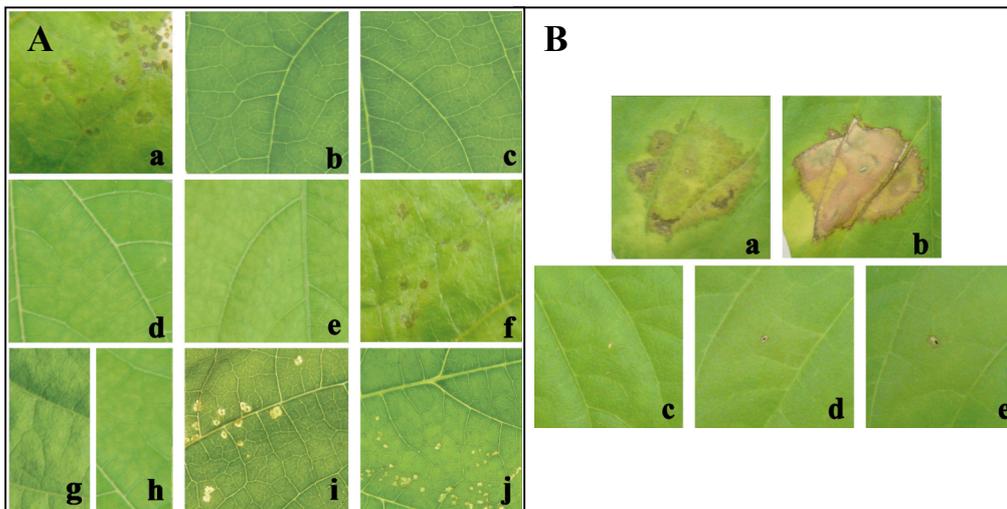


Figure 8 : Phénotypes observés après inoculation de feuilles de haricot et infiltration de feuilles de poivrons avec différentes souches bactériennes. (A) Symptômes observés sur feuilles de haricot 11 jours après inoculation à partir d'un inoculum calibré à 1×10^7 CFU mL^{-1} . (B) Test d'hypersensibilité observé sur poivrons ECW-10R deux jours après infiltration d'une suspension bactérienne calibrée à 1×10^8 CFU mL^{-1} . Les souches inoculées sont : *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R (a), *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 (b), Eau (c), 4834HRPG (d), 4834HRCT (e), 4834HRCT complémenté avec le plasmide pIJ3225 (f), 4834HRPF (g), 4834HRCN (h), 4834AVRBS2 (i) et 4834AVRBS3 (j).

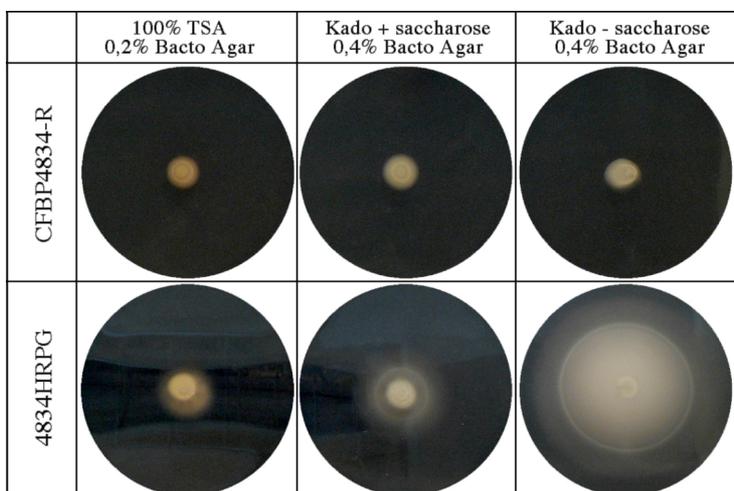


Figure 9 : Photographies de la mobilité des souches CFBP4834-R et 4834HRPG sur trois milieux différents : 100% TSA, Kado avec saccharose et Kado sans saccharose.

2.3 Test du pouvoir pathogène et réaction hypersensible

Aucun des mutants *hrp* testés n'a provoqué de symptôme sur feuilles de haricot (figure 8A), tout comme le témoin négatif eau et *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913. Le mutant 4834HRCT complémenté avec le plasmide pIJ3225 et les mutants 4834AVRBS2 et 4834AVRBS3 provoquent des symptômes sur la plante hôte sensible, le haricot, tout comme la souche sauvage *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R.

Les souches sauvages *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R et *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 ont provoqué une réaction hypersensible après infiltration des feuilles de poivron ECW-10R alors que les mutants 4834HRPG et 4834HRCT testés n'ont provoqué aucune réaction sur les feuilles de poivron, comme le témoin négatif eau (figure 8B).

2.4 Caractérisation complémentaire du mutant 4834HRPG

La mobilité de *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R et du mutant 4834HRPG a été testé sur trois milieux différant dans leur composition en agar et en éléments nutritifs. Un milieu 100% TSA (cf. composition article 1) est réalisé avec 0,2% de Bacto Agar, et un milieu Kado (extrait de levure 2 g L⁻¹, Casmino acide 8 g L⁻¹, K₂HPO₄ 2 g L⁻¹, MgSO₄ 0,2 g L⁻¹) avec 0,4 % de Bacto Agar, additionné ou non de saccharose (10 g L⁻¹). Chacun des milieux est inoculé avec une goutte de 10 µL de chacune des deux souches calibrées à 1x10⁸ UFC mL⁻¹, la mobilité est observée après 5 jours d'incubation à 28 °C.

Aucun des milieux testés n'a permis de montrer une quelconque mobilité de *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R (figure 9). Le mutant 4834HRPG est mobile sur tous les milieux. C'est sur un milieu Kado sans saccharose que le mutant est le plus mobile.

2.5 Rôle des gènes *hrcN*, *hrpF* et *avr* lors de la colonisation de la phyllosphère

2.5.1 Colonisation de la première feuille trifoliolée

Après une diminution de la taille des populations dans les 24 h suivant l'inoculation, *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R et les mutants 4834AVRBS2, 4834AVRBS3 montrent une importante augmentation de leurs tailles de populations entre le 1^{er} et le 11^{ème} jour (figure 10). Les mutants *avrBs2* et *avrBs3* ne sont donc pas altérés dans leurs capacités à coloniser la phyllosphère.

Le profil de la courbe obtenue pour le mutant 4834HRPF dans la phyllosphère du haricot est tout à fait similaire à celui observé pour le mutant 4834HRCV. Par contre, le mutant 4834HRCN a un comportement assez différent qui, dans sa première étape, peut

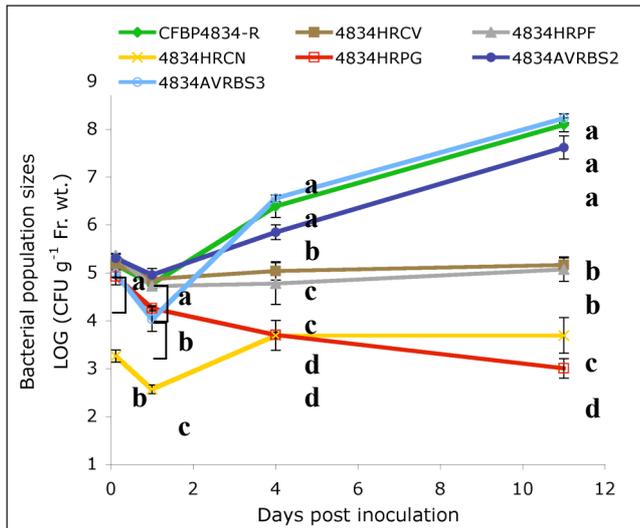


Figure 10 : Dynamique des tailles des populations de la souche sauvage et des mutants 4834HRCN, 4834HRCV, 4834HRPF, 4834HRPG, 4834AVRBS2 et 4834AVRBS3 sur la première feuille trifoliolée du haricot. A chaque date de prélèvement, cinq échantillons sont analysés. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard.

Souche	Taille des populations (Log UFC g ⁻¹)	SEM
CFBP4834-R	3,58	0,50
ATCC33913	3,72	0,13
C600	nd	nd
4834HrpF	3,35	0,73
4834HrcN	2,18*	0,53
4834HrpB2	2,98	0,29
4834HrcJ	2,99	0,15
4834HrcR	3,92	0,11
4834HrcT	3,35	0,29
4834HrcV	4,11	0,25
4834HrpG	2,10*	0,30
4834HrpX	2,06*	0,31
4834AvrBs2	4,70	0,70
4834AvrBs3	3,89	0,75

Tableau 8 : Tailles des populations sur organes néoformés onze jours après l'inoculation de *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFB4834-R *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913, *E. coli* C600 et les mutants 4834HRPF, 4834HRCN, 4834HrpB2, 4834HrcJ, 4834HrcR, 4834HrcS, 4834HrcT, 4834HRCV, 4834HrpG, 4834HrpX, 4834AvrBs2 et 4834AvrBs3. Les valeurs correspondent aux moyennes de cinq échantillons.

nd : non détecté; * p<0,05 selon le test de Mann-Whitney

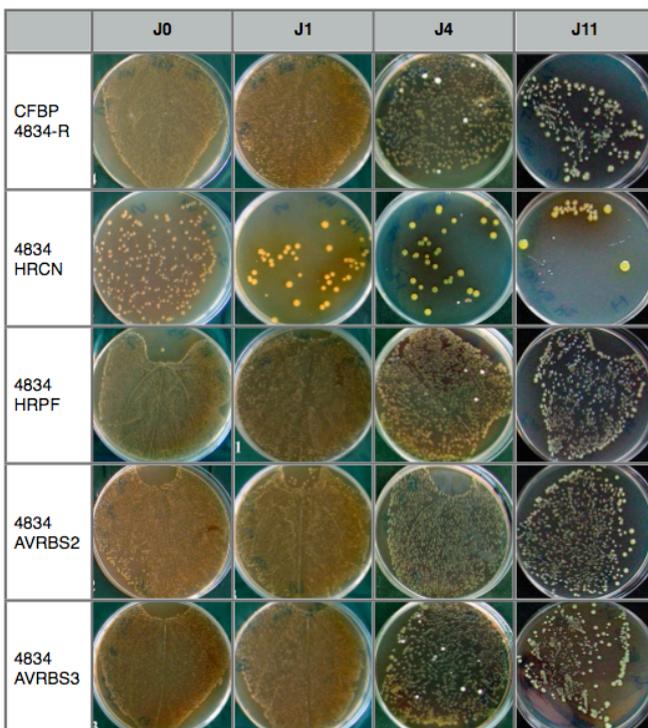


Figure 11 : Empreintes de la face supérieure de cataphylles inoculées avec la souche sauvage *X. fuscans* subsp. *fuscans*, CFB4834-R et ses mutants 4834HRCN, 4834HRPF, 4834AVRBS2 et 4834AVRBS3. Les empreintes ont été réalisées le jour de l'inoculation (J0), 1 (J1), 4 (J4) et 11 jours (J11) après cette inoculation.

être rapproché de celui de *E. coli* C600. Ces deux souches s'installent difficilement dans la phyllosphère alors que l'inoculum utilisé est de concentration similaire à celui des autres souches (1×10^6 UFC mL⁻¹). Les tailles de population de 4834HRCN se stabilisent autour de $4,5 \times 10^3$ UFC mL⁻¹ dès 4 jours suivant l'inoculation, taille significativement supérieure à celle de 4834HRPG 11 jours après l'inoculation. Les tailles des populations des mutants 4834HRCV et 4834HRPF se stabilisent vers 1×10^5 UFC mL⁻¹ (figure 10). Le comportement de 4834HRPF est proche de celui obtenu pour les différents mutants *hrp* de structure (4834HRPB2, 4834HRCJ, 4834HRCR, 4834HRCT et 4834HRCV).

2.5.2 Dispersion vers les organes néoformés

La dispersion au sein de la phyllosphère a été étudiée sur la troisième feuille trifoliolée absente lors de l'inoculation. Excepté *E. coli* C600 qui est incapable de se disperser vers les organes néoformés, toutes les souches étudiées ont été capables de se disperser dans la phyllosphère du haricot puisqu'ils ont pu être détectés dans ces organes néoformés (tableau 8). Les mutants altérés dans les gènes *hrpG*, *hrpX* et *hrcN* présentent les tailles de populations les plus faibles sur ces organes. Toutes les autres souches ont des tailles de populations non significativement différentes de celles de la souche sauvage *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R.

2.5.3 Empreintes des populations épiphytes

Les empreintes des cataphylles des haricots inoculés avec *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R sont similaires à celles obtenues après inoculation des mutants 4834AVRBS2, 4834AVRBS3 et 4834HRPF (figure 11), alors que les tailles des populations de 4834HRPF quantifiées dans la phyllosphère sont bien inférieures à celles de CFBP4834-R, 4834AVRBS2 et 4834AVRBS3 (figure 10). Enfin, de façon également répétable, les empreintes des cataphylles de haricots inoculés avec le mutant 4834HRCN présentent peu de colonies de cette souche.

2.6 Rôle de gènes *hrp* et *avr* lors de la transmission aux semences

L'efficacité de la transmission des bactéries aux semences dépend de gènes *hrc/hrp* fonctionnels (tableau 9). La fréquence de transmission des mutants 4834HRCN et 4834HRPF est significativement plus basse que celle de la souche sauvage dans les graines de haricot. Les tailles des populations de ces différents mutants quantifiés dans les lots de graines contaminés sont également plus faibles que celles obtenues pour la souche sauvage.

La mutation des gènes *avrBs2* et *avrBs3* n'entraîne pas de modification dans la fréquence de transmission de *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R aux graines du haricot

Tableau 9 : Tailles des populations de *X. fuscans* subsp. *fuscans*, CFBP4834-R et ses mutants 4834HRCV, 4834HRPF, 4834HRCN, 4834AVRBS2 et 4834AVRBS3 sur graines récoltées et fréquences de contamination. L'étude de la transmission des mutants a été effectuée lors de trois essais séparés (A, B et C).

Essai	Souches	Moyenne (SEM) des tailles de populations des lots de graines contaminées (Log UFC g ⁻¹)	Fréquence des plantes dont la descendance est contaminée
A	CFBP4834-R	6,63 (1,23)	26/30
	4834HRPF	3,48 (0,48)	19/30*
	4834HRCN	2,11 (0,48)	12/30*
B	CFBP4834-R	6,89 (0,49)	15/18
	4834AVRBS2	5,41 (0,55)	12/18
C	CFBP4834-R	6,36 (0,52)	17/20
	4834AVRBS3	6,93 (0,42)	15/20

* différences significatives avec CFBP4834-R selon le test du Khi² de Pearson

et les tailles de populations bactériennes quantifiées dans les lots de semences contaminés sont similaires (tableau 9).

2.7 Discussion et conclusion

Ces données complémentaires ont permis d'identifier deux effecteurs de type 3 chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R : AvrBs2 et AvrBs3. Les amplifications PCR et l'hybridation par Southern blot ont permis d'identifier une copie du gène *avrBs2* chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R ainsi que, conformément à la littérature (da Silva *et al.*, 2002; Thieme *et al.*, 2005), chez *X. citri* subsp. *citri* 306, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 85-10 et *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33915 qui nous ont servi de témoins. Nous avons aussi identifié un homologue d'un gène de la famille AvrBs3 chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R dont le séquençage de 625 pb révèle 89% d'homologie nucléotidique avec les quatre gènes *pthA1*, *pthA2*, *pthA3* et *pthA4* de *X. citri* subsp. *citri* 306. La sonde utilisée pour l'hybridation a d'ailleurs permis d'identifier quatre copies du gène ciblé chez *X. citri* subsp. *citri* 306. Une seule copie du gène *avrBs3* a été identifiée chez *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 85-10 ce qui est conforme aux données publiées (Schornack *et al.*, 2006). D'après nos résultats d'hybridation, *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R posséderait deux copies de ce gène (paralogues). Il est difficile de donner plus de précision concernant l'identité de ce gène *avrBs3* car certaines bactéries du genre *Xanthomonas* possèdent plusieurs paralogues dans leur génome qui diffèrent principalement par le nombre de répétitions d'un même motif dans leur domaine central (Schornack *et al.*, 2006). Le nombre de ces répétitions est important, puisque la modification du nombre de répétitions peut induire une modification de la gamme d'hôte de la souche de *Xanthomonas* utilisée (Herbers *et al.*, 1992; Yang et Gabriel, 1995). Les amplifications multiples du milieu du gène *avrBs3* (801-2543 pb) chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R indiquent que cette zone contient des motifs répétés qui ont gênés le séquençage de la partie centrale de ce gène.

La mutation des gènes d'avrulence *avrBs2* et *avrBs3* chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R ne semble pas handicaper la bactérie pour coloniser la phyllosphère du haricot, se disperser vers des organes néoformés et se transmettre aux semences. Des études antérieures ont pourtant montré que le gène *pthA/avrBs3* est impliqué dans l'expression de symptômes sur *citrus* et que le gène *avrBs2* de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* est un gène très important pour la production de symptômes et le développement de la maladie (Kearney et Staskawicz, 1990; Wichmann et Bergelson, 2004; Wichmann *et al.*, 2005). De nombreux gènes *avr* semblent avoir un rôle dans l'agressivité (Kearney et

Staskawicz, 1990; Vera Cruz *et al.*, 2000; Leach *et al.*, 2001) et également de façon plus globale dans la fitness des souches (Abramovitch *et al.*, 2003). La présence de plusieurs gènes d'avirulence dans un génome bactérien (Yang *et al.*; Schornack *et al.*, 2006) peut aboutir à des effets cumulatifs, mais aussi à des interactions plus complexes (Jackson *et al.*, 1999). De ce fait, la contribution d'un seul gène *avr* peut être difficile à estimer. Chez *X. campestris* pv. *malavacearum* les gènes d'avirulence contribuent de façon additive à la production de symptômes sur coton (Yang *et al.*, 1996). Toutefois, Wichmann et ses collaborateurs (2004) ont effectué des mutations individuelles et cumulatives des gènes *avrBs1*, *avrBs2*, *avrBs3* et *avrBs4* chez *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* et ont étudié le comportement des mutants sur poivron en condition naturelle. La survie épiphyte et le pouvoir pathogène sont affectés dans les différents mutants mais pas de façon plus importante dans la souche cumulant les mutations dans les quatre gènes.

In planta, les mutations des gènes *hrcN* et *hrpF* affectent la multiplication des bactéries au niveau de la phyllosphère ainsi que leur transmission aux semences du haricot. Ces résultats viennent corroborer les résultats présentés dans l'article. Le mutant 4834HRCN est le plus affecté dans les étapes précoces de colonisation de la phyllosphère, comportement similaire à celui observé pour *E. coli* lors de la colonisation du haricot. Ce mutant reste tout de même capable de survivre comme un mutant de structure du SST3 mais avec des tailles de populations plus faibles, proches de celles observées pour un mutant de régulation du système *hrp*. Le gène *hrcN* code pour le système ATPase qui fournit l'énergie au SST3 (Fenselau *et al.*, 1992; Bogdanove *et al.*, 1996; Pozidis *et al.*, 2003) qui apparaît donc très important dans les étapes de colonisation de la plante hôte. La fréquence de transmission de ce mutant aux semences est similaire à celles observés pour les mutants de structure du SST3. Le mutant 4834HRPF est le mutant du SST3 qui se transmet le mieux aux semences du haricot même si cette transmission reste significativement moins fréquente que celle obtenue pour la souche sauvage *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R. Il a été montré que HrpF est le translocon, protéine située à l'interface entre la plante et la bactérie et qui permet le passage des effecteurs de type 3 au travers de la membrane plasmique de la cellule hôte (cf. figure 35, chapitre 2 de l'introduction générale) (Buttner *et al.*, 2002). Le fait que ce mutant soit moins altéré que les autres mutants *hrp* de structure pourrait donc être dû au maintien d'une activité de sécrétion chez ce mutant permettant à certains effecteurs d'exercer une activité à l'extérieur des cellules hôtes (Buttner et Bonas, 2002).

Dans la phyllosphère, pour des tailles de populations bien inférieures à celles de la souche sauvage, les empreintes des cataphylles qui ont été inoculées avec le mutant du gène *hrpF* sont semblables à celles inoculées avec la souche sauvage. Il apparaîtrait donc

qu'une partie des cellules de la souche sauvage ne doit plus être localisée en surface mais au niveau de sites protégés, ou bien internalisée. Les mutants qui présentent des populations de surfaces importantes par rapport à leurs populations totales dans la phyllosphère pourraient être affectées dans leur mobilité et pourraient ne pas parvenir à atteindre des sites protégés au niveau des feuilles ou à s'internaliser. Néanmoins, nous avons montré que tous les mutants altérés dans un gène *hrp/hrc* testés sont capables de se disperser vers des organes néoformés, absent le jour de l'inoculation des plantes de haricot. Logiquement, la dispersion des mutants les plus affectés dans la colonisation de la phyllosphère, le mutant dans le gène *hrcN* et les mutants des gènes de régulation *hrpG* et *hrpX* (cf. article 1) sont les plus altérés au niveau des tailles de populations retrouvées sur ces organes néoformés. Cette dispersion pourrait n'être qu'une dispersion passive qui ne ferait pas appel aux mécanismes liés à la mobilité des bactéries, mais pourrait dépendre plus de l'existence d'un film d'eau à la surface végétale, au moins ponctuellement suite aux changements de conditions environnementales jour/nuit ou pourrait être liée aux mouvements d'air existant dans les enceintes de confinement. La croissance indéterminée du haricot (Michael, 1994) pourrait permettre la transmission des bactéries par simple contact de la feuille néoformée en expansion avec les feuilles déjà contaminées.

Partie 2

Etude de déterminants moléculaires impliqués dans l'adhésion, l'agrégation et la régulation de *X. fuscans* subsp. *fuscans* lors de la colonisation du haricot

Dans les résultats précédents, nous avons montré que la colonisation asymptomatique du haricot était liée à une multiplication de *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R sur son hôte et dépendait -partiellement- d'un SST3 fonctionnel. En effet, les mutants ne possédant plus de SST3 fonctionnel, sont encore capables de survivre dans la phyllosphère, de s'y disperser et de se transmettre, même faiblement, à la nouvelle génération. Des mécanismes complémentaires sont donc impliqués dans la colonisation de la phyllosphère du haricot et la transmission à la graine. De plus, nous avons montré que les mutants (4834HRPG et 4834HRPX) dans les gènes de régulation du SSTT, *hrpG* et *hrpX*, ont une survie plus difficile et une fréquence de transmission aux graines plus basse que celles obtenues pour les mutants de sécrétion (4834HRPB2, 4834HRCJ, 4834HRCR, 4834HRCT, 4834HRCV). Or, il a été montré dans d'autres modèles, que le régulateur du SST3, HrpG, régulait également d'autres fonctions telles que la mobilité et l'adhésion et la production d'exopolysaccharides (Hikichi *et al.*, 2007 ; Valls *et al.*, 2006). Ainsi, la mutation des gènes *hrpG* et *hrpX* a pu avoir un effet pléiotrope expliquant cette différence de comportement des mutants de régulation par rapport aux mutants de sécrétion.

Nous avons voulu vérifier dans cette deuxième partie des résultats l'implication des mécanismes d'adhésion de *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R lors des étapes clés de colonisation asymptomatique du haricot. Nous avons identifié des adhésines répertoriées dans des souches appartenant à des espèces proches, dans le génome de *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R. Des mutants de ces gènes ont été construits afin d'étudier leurs rôles lors de l'adhésion des bactéries aux surfaces abiotique et biotique et lors des étapes clés de la colonisation asymptomatique du haricot. Ces travaux sont présentés ci-après sous la forme d'un article intitulé « Adhesion, epiphytic fitness and transmission to seeds of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* on bean » qui sera prochainement soumis pour publication. Nous avons suivi les recommandations aux auteurs de la revue « Molecular Plant-Microbe interactions ».

Des données complémentaires font suite à cet article et concernent les données référencées mais non présentées dans cet article (data not shown) ainsi que l'étude du rôle de mécanismes impliqués dans la mobilité flagellaire (système *fli*) et la régulation de la synthèse d'exopolysaccharides (systèmes *pig* et *rpf*) dans la colonisation du haricot. Pour cela, des mutants ciblés dans les gènes *fliN*, *orf3* du cluster *pig* et *rpfB* ont été construits par mutagenèse dirigée par simple crossing-over puis caractérisés *in vitro* et *in planta*.

1. Adhesion, epiphytic fitness and transmission to seeds of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* on bean

A. Darsonval, A. Darrasse, K. Durand, C. Bureau, S. Cesbron and M.-A. Jacques*

Authors' affiliations: UMR077 PaVé, INRA, 42, rue George Morel, F-49071 Beaucouzé, France

Correspondent footnote: Mailing address: UMR077 PaVé, INRA, 42, rue George Morel, BP 60057, F-49071 Beaucouzé cedex, France Phone: (33)-241-22-57-07. Fax: (33)-241-22-57-05. Email: Marie-Agnes.Jacques@angers.inra.fr

1.1 Abstract

Deciphering the bacterial molecular determinants of survival, colonisation and dispersion of plant pathogenic bacteria on their host is fundamental to conceptualize new control methods. We evaluated the role of bacterial attachment and biofilm formation in leaf colonization processes and transmission to seeds. *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* is responsible for the common bacterial blight of bean, a seed transmitted disease. Mutants were constructed in the six identified adhesin genes (*pilA*, *fhab1*, *fhaB2*, *xadA1*, *xadA2* and *yapH2*) in *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R strain. Mutants were tested for their capacities of adhesion and biofilm formation on abiotic (polypropylene) and biotic (seed and leaf) surfaces, phyllosphere colonization, transmission to seeds and severity on bean. All mutants were altered in their abilities to adhere to polypropylene or seeds. The *pilA* gene is involved in CFBP4834-R adhesion and transmission to seeds, and its mutation lead to a lower aggressiveness on bean. The *yapH2* gene is required for adhesion to seeds, leaves and abiotic surfaces but not for CFBP4834-R *in planta* transmission to seeds and aggressiveness on leaves. CFBP4834-R transmission to seeds by floral structures did not required adhesins. All mutants except the mutant in *yapH2* gene were altered in the vascular pathway of transmission to seeds. In conclusion, we found complementary roles for adhesins in the various processes leading to bean phyllosphere colonisation and transmission of *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R to seeds.

Additional keywords: autotransporter, fimbrial, non-fimbrial, two-partner secretion system, type IV pili, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*.

1.2 Introduction

Adhesion to host tissues is essential for successful infection by many microbial pathogens (Cao et al. 2001). Its role in virulence was demonstrated for plant pathogens (Astua-Monge et al. 2005; Feil et al. 2007; Matthysse and McMahan 1998; Ojanen-Reuhs et al. 1997; Rosenblueth and Martinez-Romero 2006) and for animal bacterial pathogens (Barak et al. 2005; Gorski et al. 2003). The bacterial surface structures important for adhesion covered a broad group of different fimbrial and non-fimbrial structures commonly known as adhesins (Barnhart and Chapman 2006; Hultgren et al. 1993; Klemm and Schembri 2000; Latasa et al. 2006). The fimbrial proteins include the type IV pili that deserve much interest (Craig et al. 2004). The type IV pili are polymeric assemblies of the protein pilin expressed by many Gram-negative bacteria (Craig et al. 2004; Pizarro-Cerda and Cossart 2006). Unlike other types of pili, type IV pili not only participate in adhesion to host cells (Carbonnelle et al. 2006; Finlay and Falkow 1997; Mattick 2002; Tobe and Sasakawa 2002), but are also involved in a surprising number of functions (Merz et al. 2000), including bacterial aggregation, microcolony formation and more complex biological functions such as DNA transformation and a form of surface translocation known as twitching motility (Kaiser 2007; Merz et al. 2000). The non-fimbrial adhesins are widely represented in α -, β - and γ -proteobacteria and contain different classes of proteins implied in bacterial attachment (Gerlach and Hensel 2007; Pizarro-Cerda and Cossart 2006). These proteins belong to the autotransporter family containing the trimeric autotransporters (ex: XadA and YadA proteins) (Cotter et al. 2005; Koretke et al. 2006) and to the two-partner secretion system as do filamentous hemagglutinins (ex: FhaB and YapH proteins) (Mazar and Cotter 2006).

A comparison of the sequenced genomes of plant pathogenic xanthomonads (da Silva et al. 2002; Lee et al. 2005; Thieme et al. 2005) reveals the presence of numerous genes coding surface adhesion structures. This may indicate a general importance of these proteins to *Xanthomonas* pathogenicity (da Silva et al. 2002). *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* have genes for type IV fimbrial pili, several other proteins which could act as non-fimbrial adhesins (Astua-Monge et al. 2005; Thieme et al. 2005), such as homologs of the *Yersinia* proteins YapH and YadA (Hoiczky et al. 2000) and others filamentous hemagglutinin proteins (Astua-Monge et al. 2005). YadA mediates adherence to epithelial cells and autoagglutination (Hoiczky et al. 2000). Homologs of YadA have been found in several plant and animal pathogenic bacteria (Nummelin et al. 2004), e.g., in *X. oryzae* pv. *oryzae*, where XadA was shown to be an

Table 1. PCR primers used in this study to construct and validate mutations in *pilA*, *fhaB1*, *fhaB2*, *xadA1*, *xadA2*, *yapH2* genes of *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R.

Target gene (NCBI-GenelD)	PCR primer code	Nucleotide sequence ^{ab}	Relevant characteristic	PCR fragment size
<i>pilA</i> (3729506)	PilA1-F	<u>CCGAATTCTCGATGGACCGGTGCGTA</u> TCTAT	<i>EcoRI</i> site	604 bp
	PilA1-R	CTGCGC <u>GCGGCCCGCGGCGCGATGGA</u> CGGAT	<i>NotI</i> site	
	PilA2-F	CGCGGGCCCGGCCTATAACGATTAAC TAAGCCGC	<i>ApaI</i> site	543 bp
	PilA2-R	GTGGAGCTCCACCCACTGCGCCAGAC CTT	<i>SacI</i> site	
	Pil-ext-R	GGAAAGCGGGTCGTTGTTGG	To be used with PilA1-F	
<i>fhaB1</i> (3730164)	FhaB1-F	GTGACTAGTGATCACCTGGACATCGTT TCCG	<i>SpeI</i> site	404 bp
	FhaB1-R	GGGCTCGAGAGCTATCGCAGGAAATG CCGTT	<i>XhoI</i> site	552 bp
	FhaB1-ext-F ^c	GCTTGCCTGTGCTGTGCT	To be used with ProR	
	FhaB1-ext-R ^d	CACCATCGCTGCCAGGTT	To be used with FhaB1-F	
<i>fhaB2</i> (3730165)	FhaB2-F	CGGACTAGTTGTCGAGCGACGCAT TG	<i>SpeI</i> site	563 bp
	FhaB2-R	CTGGCTCGAGAGCGATCACCTTTGCG CTGTTA	<i>XhoI</i> site	2430 bp ^c 2397 bp ^d
	FhaB2-ext-R ^{c, d}	AGCTGGCCATTACTGACAATGCTG	To be used with ProF ^c To be used with FhaB2-F ^d	
<i>xadA1</i> (3730010)	XadA1-F	GGGACTAGTCCATCGGCCCAATAGC CA	<i>SpeI</i> site	377 bp
	XadA1-R	CACCTCGAGCAACTGCGCAACGTTGAC	<i>XhoI</i> site	459 bp
	XadA1-ext-F ^c	AATGCGCAATCGGTGCAAGT	To be used with ProR	
	XadA1-ext-R ^d	CGCTGTCGCCTTCGACATA	To be used with XadA1-F	
<i>xadA2</i> (3730011)	XadA2-F	CTCACTAGTTGGGAAATACGCAGGGG AGA	<i>SpeI</i> site	474 bp
	XadA2-R	GGCTCGAGCCGTTGGCATCGTAATCA AACAC	<i>XhoI</i> site	
	XadA2-ext-F ^c	ATTTATCTGGAGGCTGGTTCG	To be used with ProR	607 bp
	XadA2-ext-F2 ^d	ACCGGGCCCATCCAGGGCCAGCTA CAACAACGTC	To be used with XadA2- ext-R2	425 bp
	XadA2-ext-R2 ^d	CTGGAGCTCGCGGTGTCGTTGGGGCC ATGCGCATACGC	To be used with XadA2- ext-F2	
<i>yapH2</i> (3730364)	YapH2-F	TGGACTAGTACGCAGCCATTGGCAATT GGG	<i>SpeI</i> site	326 bp
	YapH2-R	CCGCTCGAGTTGAGTGTGGAATTGGT ACCGC	<i>XhoI</i> site	
	YapH2-ext-R ^{c, d}	AAACGCGCCGCTGATGGTGCTGAG	To be used with ProF ^c To be used with YapH2-F ^d	860 bp ^c 738 bp ^d
	ProR	TTCACGGGTTGGGTTTCTACA	pVO155 primer	482 bp
	ProF	GAGATCCCAGCCCGCCTAATG	pVO155 primer	
<i>XCV4203</i> (3730514)	4203-F	CGGACTAGTCACCATCAATGCCGTCAA	<i>SpeI</i> site	355 bp
	4203-R	CTGCCTCGAGACCGGCGAGCGTGATG	<i>XhoI</i> site	
<i>XCV4444</i> (3733315)	4444-F	CTAACTAGTGCACCAATATGGCTGCAG GCG	<i>SpeI</i> site	262 bp
	4444-R	CCACTCGAGTCTTCCAGCGGAAACGT GT	<i>XhoI</i> site	
<i>orf3</i> (19483794)	Orf3-F	TGATACTAGTCCAGGGCAGCATGTGC C		262 bp
	Orf3-R	AGATAGAGCTCGTGCACCTCCACGC		

^a underlined sequences indicates the relevant restriction site.

^b bold sequences indicates stop codon added to the primer.

^c primers used to identify mutants in *in planta* tests.

^d primers used to confirm that no mRNA were transcribed from the mutated gene.

important virulence factor (Ray et al. 2002). Homologs of filamentous hemagglutinin are also present in the plant pathogens *Erwinia chrysanthemi* and *Xylella fastidiosa* and their involvement in attachment and virulence has been demonstrated (Feil et al. 2007; Guilhabert and Kirkpatrick 2005; Kim et al. 1998; Rojas et al. 2002). The presence and the number of genes coding for surface structures in xanthomonads genomes may indicate a general importance of these proteins in xanthomonads lifestyle.

In natural settings, bacteria prefer a sedentary lifestyle in communities to a nomadic existence (Costerton et al. 1999; Danhorn and Fuqua 2007; O'Toole et al. 2000; West et al. 2006). Aggregation and biofilm formation is one strategy used by *X. fuscans* subsp. *fuscans* during colonization of bean phyllosphere to protect it from stresses and maintain inoculum reservoirs (Jacques et al. 2005). *X. fuscans* subsp. *fuscans* (Schaad et al. 2005) and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Vauterin et al. 1995; Vauterin et al. 2000) are causal agents of common bacterial blight of bean (*Phaseolus vulgaris* L) (Vidaver 1993). These seedborne pathogens are transmitted to seeds during cultivation of mother plants by three pathways (Maude 1996). Seeds can be internally contaminated via the host xylem, as occurs for viruses, some fungi and a few bacteria. This can result in the contamination of the seeds often through the hilum. Seeds may also become infested via the stigma, where bacteria move through the stylar tissues to the embryo. An external infection of the seeds occurs via fruits as a consequence of contact of the seed with bacterial populations on symptomatic tissue, or at harvest and during threshing with residues carrying large bacterial populations. We recently showed that the type III secretion system (T3SS) which is a major pathogenicity determinant of plant pathogenic bacteria (Gurlebeck et al. 2006; Puhler et al. 2004) is highly involved in the bean colonization of seeds by *X. fuscans* subsp. *fuscans* (A. Darsonval, *submitted*). However a survival and a discrete transmission of the pathogen to the seeds exist independently of this functional T3SS suggesting that other mechanisms are required (A. Darsonval, *submitted*).

The intent of the present study was to investigate the role of fimbrial and non-fimbrial proteins of *X. fuscans* subsp. *fuscans* in phyllosphere colonization and transmission to the seeds. Here, we report the identification and the characterization of one fimbrial and five non-fimbrial proteins in *X. fuscans* subsp. *fuscans* strain CFBP4834-R and their role in the *in vitro* adhesion and biofilm formation. We also compared their individual contribution in the CFBP4834-R behavior during bean asymptomatic colonization of leaves and transmission to seeds.

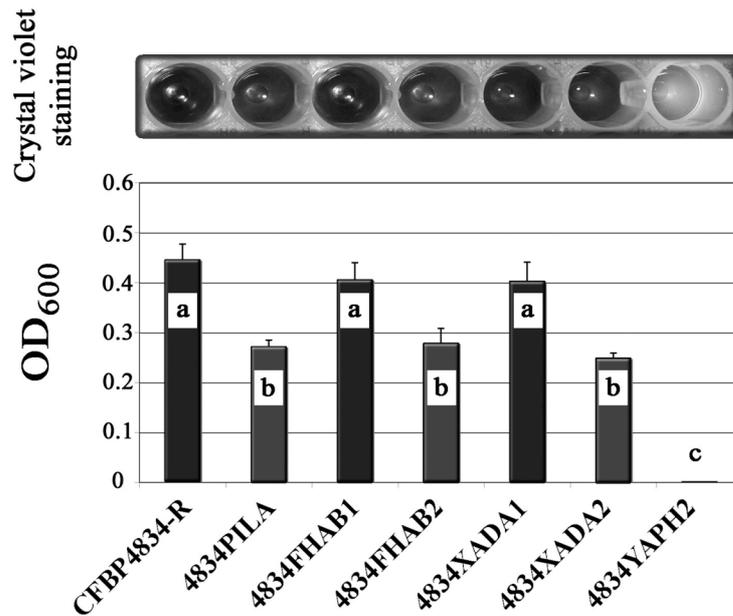


FIG. 1. Quantification of adhesion of *X. fuscans* subsp. *fuscans* strain CFB4834-R and 4834PILA, 4834FHAB1, 4834FHAB2, 4834XADA1, 4834XADA2 and 4834YAPH2 mutants on polypropylene microtiter plates. Crystal violet-stained surface-attached cells were quantified by solubilizing the dye in ethanol and determining the absorbance at 600 nm. Error bars represent the SD. Different letters refers to significantly different values based on a Mann-Whitney test. Three repetitions were monitored with similar results.

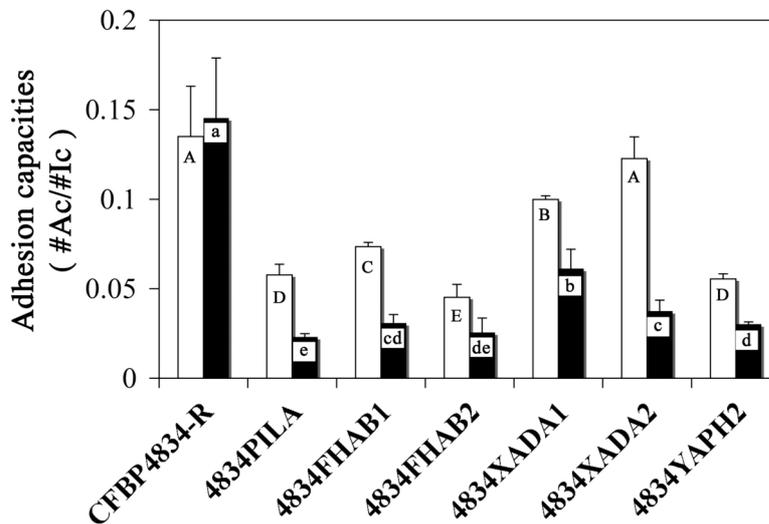


FIG. 2. Quantification of adhesion of *X. fuscans* subsp. *fuscans* strain CFB4834-R and 4834PILA, 4834FHAB1, 4834FHAB2, 4834XADA1, 4834XADA2 and 4834YAPH2 mutants to bean seeds. Bars represent the ratio of the number of attached cells on seeds after 25 min (white) or 2 h (black) of incubation in inoculum (#Ac) versus the total number of inoculated cells (#Ic) and error bars represent the SEM. Each inoculum was calibrated at 1×10^5 CFU/ml. Different letters refer to significantly different values based on a Mann-Whitney test. Three repetitions of the assay were done with similar results.

1.3 Results

Six genes coding adhesins were identified and disrupted in *X. fuscans* subsp. *fuscans*. Among the eight adhesins previously identified in xanthomonads (da Silva et al. 2002; Lee et al. 2005; Qian et al. 2005; Thieme et al. 2005, Szureck et al., 2006) homologues of *pilA*, *fhaB1*, *fhaB2*, *xadA1*, *xadA2* and *yapH2* genes were identified in *X. fuscans* subsp. *fuscans* strain CFBP4834-R by PCR using conserved primers (Table 1). Sequences of *pilA*, *fhaB1*, *fhaB2*, *xadA1*, *xadA2* and *yapH2* shared respectively 92%, 96%, 90%, 97%, 91%, 92% nucleotide homologies with their homologues in *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* strain 85-10 genome. Mutation of the *pilA* gene resulted in a deletion of 30 amino acids from the 1261 bp position to 1351 bp. A stop codon was inserted in place of the 92th amino acid, and the remaining first 91 amino acids did not present any functional domain with the InterProScan program. The plasmid pVO155 containing a recombinant sequence of target gene was inserted in the other adhesin genes by simple crossing-over. PCR amplifications using specific primers (Table 1) confirmed that pVO155 unique insertions were at the correct positions in mutated strains. Southern blot hybridizations confirmed the single plasmid insertion event. Growth rates of the wild type CFBP4834-R and of every strain with mutation in adhesin genes were similar in 10% TSB, indicating that mutations did not impair the *in vitro* growth of the corresponding strain (data not shown). Furthermore, no reversion was observed *in vitro* after more than 50 generations without selection pressure (data not shown) and population sizes of each mutant enumerated from leaf samples on non-selective medium were not significantly ($p > 0.05$) higher than those enumerated on selective medium showing that all constructions were stable both *in vitro* and *in planta* (data not shown). The RT-PCR confirmed that no mRNAs were transcribed from the disrupted genes in strains with mutations in *fhaB1*, *fhaB2*, *xadA1*, *xadA2* and *yapH2* genes (data not shown).

YapH2 is a major determinant of *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R adhesion to abiotic and biotic surfaces. The crystal violet incorporation assay revealed that 4834YAPH2 mutant is totally defected in adhesion to polypropylene (PP) surface (Fig. 1). The capacities of adhesion to PP were also significantly ($p < 0.05$) decreased for three other mutants: 4834PILA, 4834FHAB2 and 4834XADA2. In contrast, the two remaining mutants 4834FHAB1 and 4834XADA1 did not show significant ($p > 0.05$) differences in adhesion to PP compared to the wild-type strain.

Adhesion capacities on biotic surface were significantly altered for the six tested mutants compared to the wild type strain (Fig. 2). This decreased adhesion capacities

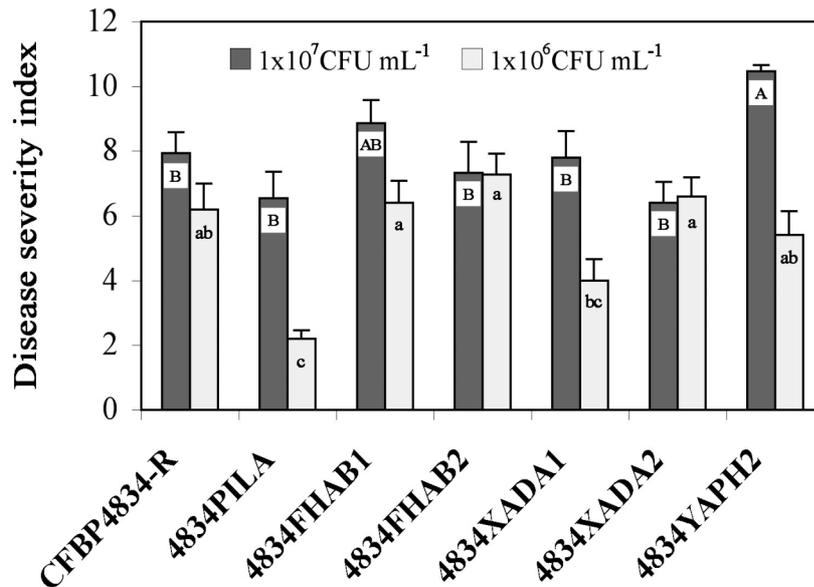


FIG. 3. Severity on bean of wild-type CFBP4834-R, and 4834PILA, 4834FHAB1, 4834FHAB2, 4834XADA1, 4834XADA2 and 4834YAPH2 strains after bathing the first trifoliolate leaf in 1×10^5 CFU/ml and 1×10^6 CFU/ml inoculums. Disease symptoms were scored 11 days after bean inoculation by quantification of symptoms on the three leaflets of each inoculated leaf according to the following scale: no symptoms = 1; 1 to 20 spots = 3; 21 to 40 spots = 6; > 41 spots = 9; leaf death = 11. Mean disease severity indexes and SEM were calculated from the values of five plants per strain. For each inoculum concentration different letters refer to significantly different values based on a Mann-Whitney test. The experiment was repeated three times with similar results.

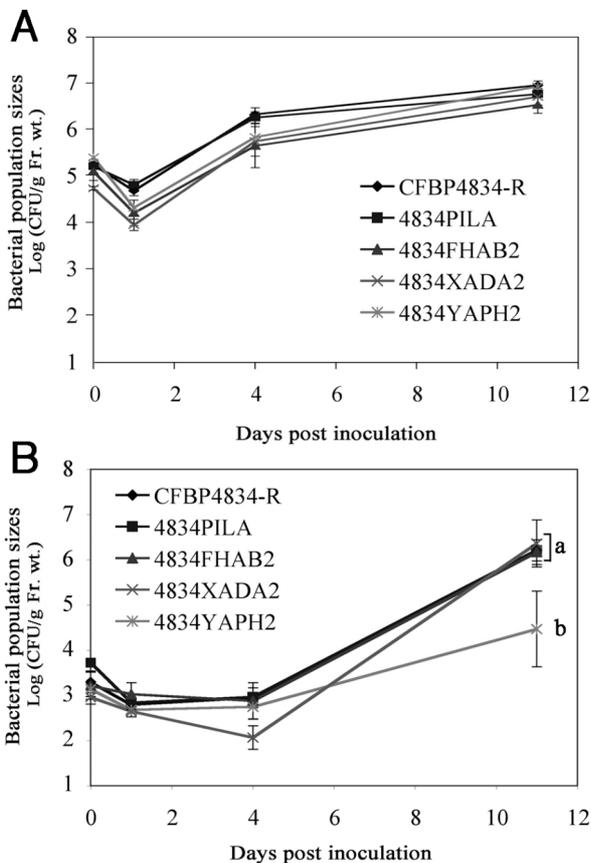


FIG. 4. Colonization of the bean phyllosphere by *X. fuscans* subsp. *fuscans* strain CFBP4834-R and 4834PILA, 4834FHAB2, 4834XADA2 and 4834YAPH2 mutants. Leaves were spray-inoculated (1×10^6 CFU/ml). Five leaves were analyzed by stomaching the day of inoculation after 3 hours drying, one, four and eleven days later. **A**, Mean bacterial population sizes. **B**, Mean bacterial population sizes determined after disinfection of the leaf surface with chloroform vapors (3 min in chloroform-vapor saturated box) at each sampling date. Error bars represent the standard error of the mean. Mean population sizes followed by different letters are significantly ($p < 0.05$) different on the basis of the Mann-Whitney test.

were noticed both after a short (25 min) and a long (2h) contact time between inocula and seeds except for 4834XADA2. For this mutant no significant differences were noticed after a short contact time. Experimental repeats also confirmed that adhesion capacities were lower for every mutant than for the wild-type strain CFBP4834-R after a long contact time.

Mutants in *pilA* and *xadA1* genes are less aggressive on bean than the wild type strain. When inoculated onto bean leaves every mutant tested (4834PILA, 4834FHAB1, 4834FHAB2, 4834XADA1, 4834XADA2 and 4834YAPH2) was able to cause typical water-soaked spots. However, 4834PILA and 4834XADA1 mutants were significantly less aggressive than the wild type strain CFBP4834-R when inoculated at a low concentration (1×10^6 CFU/ml) (Fig. 3). The disease severity of 4834YAPH2 was significantly ($p < 0.05$) higher than that of CFBP4834-R when inoculated at 1×10^7 CFU/ml. No differences were observed for other mutants in comparison to the wild-type strain. No water-soaked spots were recorded on the water inoculated control leaves.

Mutation in *yaph2* gene of *X. fuscans* subsp. *fuscans* alters partially its capacities to colonize bean phyllosphere . Global colonization of the phyllosphere was similar for strains 4834PILA, 4834FHAB2, 4834XADA2, 4834YAPH2 and wild type strain CFBP4834-R, as determined following stomaching of leaves (Fig. 4A). However, after disinfection of the leaf surface with chloroform vapors, analysis of bacterial population sizes showed that phyllospheric population sizes of 4834YAPH2 were significantly ($p < 0.05$) lower than those of the wild type strain and other mutants at eleven days after inoculation (Fig. 4B). These results indicated that 4834YAPH2 was either not able to adhere to leaf surface and form biofilms that could protect cells from chloroform vapors or to colonize the apoplast of the leaf.

Transmission of *X. fuscans* subsp. *fuscans* to bean seeds is altered for mutants in *pilA*, *fhaB1* and *fhaB2* genes. The 4834PILA mutant was the most altered in its ability to transmit to bean seeds with the lowest transmission rate ($p < 0.05$) (Table 2). Transmission rates of 4834FHAB1 and 4834FHAB2 mutants were affected compared to the wild type strain. Transmission rates of 4834XADA1, 4834XADA2 and 4834YAPH2 mutants were similar to higher than that of the wild type strain. Bacterial populations sizes quantified on seeds were not significantly different among the various strains.

Table 2. Transmission rates of the wild type strain CFBP4834-R and selected mutants 4834PILA, 4834FHAB1, 4834FHAB2, 4834XADA1, 4834XADA2 and 4834YAPH2 to bean seeds after spray inoculation (1×10^5 CFU/ml) of plants at the flower bud stage. The rates of plants harbouring contaminated seeds per 50 inoculated plants per strain are indicated followed by the mean bacterial population sizes per g of seeds (and SEM) for plants having contaminated seeds.

Strains	Transmission rates	Bacterial population
		sizes (Log CFU/g seeds) (SEM)
CFBP4834-R	0.68	3.77 (0.45)
4834PILA	0.40*	3.06 (0.48)
4834FHAB1	0.58	4.10 (0.44)
4834FHAB2	0.58	4.43 (0.51)
4834XADA1	0.70	3.77 (0.40)
4834XADA2	0.72	4.29 (0.39)
4834YAPH2	0.75	3.77 (0.42)

* indicate significant different values with the wild type CFBP4834-R according to a χ^2 test

Table 3 Transmission rates (TR) to bean seeds and associated mean population sizes of the wild type CFBP4834-R and 4834PILA, 4834FHAB2, 4834XADA2 and 4834YAPH2 strains by the floral and the vascular pathways. Transmission to seeds by the floral pathway was determined following inoculations of flower buds by depositing 20 μ l of a 1×10^6 CFU/ml inoculum per flower bud on three groups of flower buds per plant. Transmission to seeds by the vascular pathway was determined on three groups of flower buds per plant that were protected with transparent cellophane bags before plants were inoculated by spraying the phyllosphere with a 1×10^5 CFU/ml suspension. Six weeks after inoculation bacterial population sizes were quantified in seeds. Seeds of ten plants per strain and per treatment were analyzed.

Strains	Floral pathway		Vascular pathway	
	TR	Population sizes (CFU/g seeds) (SEM)	TR	Population sizes (CFU/g seeds) (SEM)
CFBP4834-R	0.8	6.06 (0.75)	0.6	1,80 (0.40)
4834PILA	0.9	4.81 (0.83)	0.1	1.34 (nd)
4834FHAB2	0.9	6.79 (0.41)	0.2	0.96 (0.18)
4834XADA2	0.9	6.87 (0.67)	0.5	3.91 (1.15)
4834YAPH2	1	7.06 (0.21)	0.1	0.78 (nd)

nd : not determined

Mutation in *pilA*, *fhaB2*, and *xadA2* genes limits vascular transmission of *X. fuscans* subsp. *fuscans* to bean seeds but not its transmission to seeds by the floral pathway. To monitor bacterial transmission to seeds by the floral pathway, inoculum was deposited directly in flower buds. None of the tested mutants (4834PILA, 4834FHAB2, 4834XADA2 and 4834YAPH2) were impaired in their ability to transmit to seeds by the floral pathway as transmission rates and associated population sizes were similar to those of the wild type strain (Table 3). To quantify bacterial transmission to seeds by the vascular pathway, inoculum was sprayed on leaves while floral structures of plants were protected from any aerial contamination with cellophane bags which remained *in situ* until harvest. Only the wild type strain CFBP4834-R and 4834YAPH2 were able to transmit to seeds by the vascular pathway with high frequencies (0.60 and 0.55, respectively). Frequencies were significantly lower for 4834PILA, 4834FHAB2 and 4834XADA2 with 0.10, 0.20 and 0.10, respectively. When originating from vascular pathway, mean bacterial population sizes were lower on contaminated seeds than on seeds contaminated by the way of the floral structures (Table 3).

1.4 Discussion

To gain insight into the dynamics of *X. fuscans* subsp. *fuscans*-host interactions during colonisation processes we analyzed the role of bacterial surface structures in survival and multiplication on leaves, transmission and adhesion to seeds. *In planta* characterization of mutant behaviour followed the determination of the role of every adhesin in *in vitro* bacterial adhesion, and formation of biofilms. We have shown that while *pilA* gene is required for adhesion and transmission to seeds, *yapH2* is essential for adhesion to seeds, leaves and abiotic surfaces but not for its *in planta* transmission to seeds.

While mutation of *yapH2* gene totally impaired *X. fuscans* subsp. *fuscans* for *in vitro* adhesion to abiotic surface, *pilA*, *fhaB2* and *xadA2* genes contribute only partially to adhesion capacities of *X. fuscans* subsp. *fuscans* to abiotic surface. Our results confirmed a recent study suggesting that the non-fimbrial gene *hxfB* (a filamentous hemagglutinin) of *Xylella fastidiosa* is involved in the adhesion on abiotic glass surfaces (Feil et al. 2007). Adhesion to seeds is however significantly impaired for mutants in every adhesin gene (*fhaB1*, *fhaB2*, *pilA*, *xadA1*, *xadA2* and *yapH2*) indicating that seed adhesion is a more complex phenomenon than adhesion to polypropylene. Interestingly, *xadA2* gene is implicated only in the irreversible adhesion step observed after long contact time between

seeds and bacteria.

Several adhesins of *X. fuscans* subsp. *fuscans* seems to be involved in its pathogenicity on bean. Indeed, we observed that aggressivity of *X. fuscans* subsp. *fuscans* on bean was severely attenuated by the disruption of *pilA*, increased by the disruption of *yapH2* and unmodified for other genes coding adhesins. As previously shown for fimbrial adhesins of *Ralstonia solanacearum*, *X. citri* subsp. *citri* and *X. campestris hyacinthi* (Kang et al. 2002; Ojanen-Reuhs et al. 1997; van Doorn et al. 2001) the type IV pili of *X. fuscans* subsp. *fuscans* contributes to its aggressiveness on its host, as revealed by the the mutation of *pilA* gene. In contrast, mutation in *yapH2* gene in *X. fuscans* subsp. *fuscans* leads to a more aggressive strain. It has previously been shown that *yapH2* gene could act as an antivirulence gene (Foreman-Wykert and Miller 2003). Mutations in such locus result in a hypervirulent phenotype, as measured by a lower lethal dose and a colonization advantage (Foreman-Wykert and Miller 2003). Also, a mutant in the *hxfA* gene (*hecA* orthologue) of *Xyllella fastidiosa* showed more severe symptoms, and earlier grapevine death. *In planta*, this mutant moved faster and reached higher population sizes than the wild type strain (Guilhabert and Kirkpatrick 2005). We were not able to show any substantial involvement of other adhesins in pathogenicity of *X. fuscans* subsp. *fuscans* on bean. This is not in accordance with results obtained on other plants pathogens. The non-fimbrial adhesin XadA is required for optimum virulence in *X. oryzae* pv. *oryzae* (Ray et al. 2002). For *Erwinia chrysanthemi*, Rojas and associates (2002) reported that each mutant in filamentous hemagglutinin HecA have reduced leaf surface attachment and aggregate formation, failed to express macerating enzymes and were avirulent. Furthermore *hecA::Tn7* hemagglutinin mutant was reduced in virulence on *Nicotiana clevelandii* seedlings after inoculation without wounding (Rojas et al. 2002).

YapH2 is the only adhesin of *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R required for a complete phyllosphere colonization process as demonstrated by quantification of phyllospheric populations after surface sterilisation with chloroform vapors. This behavior of the strain 4834YAPH2 mutated in *yapH2* gene could be due to its total incapacity to adhere to surfaces -biotic and abiotic- and form biofilms. This disadvantage for surface colonization could be in turn an advantage as it could allow extensive colonization of vessels leading a high development of symptoms. This hypothesis is supported by data obtained with the pathosystem *X. fastidiosa* and *Vitis vinifera* (Guilhabert and Kirkpatrick 2005). In this case, ability to form *in planta* biofilm leads to the congestion of some rare vessels while for mutants in *rpfF* gene, a high proportion (>80%) of vessels were colonized by large population sizes of planktonic cells able to disperse in vascular system and in consequence to cause symptoms (Newman et al. 2004). It's worth noticeable that strain

Table 4. Strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Relevant genotype and characteristics	Source or reference
Plasmids		
pVO155	Derivative of pUC19 containing the promoterless <i>uidA</i> gene; Km ^R , Amp ^R , Bleo ^R	(Oke and Long 1999)
pRK600	Cm ^R , <i>traRK2</i> , <i>oriColE1</i>	(Finan et al. 1986)
pCM184	Broad-host-range allelic exchange vector	(Marx and Lidstrom 2002)
pCM157	Broad-host-range <i>cre</i> expression vector	(Marx and Lidstrom 2002)
Strains		
CFBP4834-R	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i> CFBP4834-R wild-type strain; Rif ^R	(Jacques et al. 2005)
K12	<i>Escherichia coli</i> wild type strain	(Devoret and Blanco 1970)
DH5 α	<i>E. coli</i> F, Φ 980d <i>lacZ</i> :M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , :(lacZYA-argF)U169	(Hanahan 1983)
Mutants		
4834FHAB1	CFBP4834-R <i>fhb1</i> (505)*::pVO155; Rif ^R , Km ^R	This study
4834FHAB2	CFBP4834-R <i>fhaB2</i> (592)*::pVO155; Rif ^R , Km ^R	This study
4834XADA1	CFBP4834-R <i>xadA1</i> (618)*::pVO155; Rif ^R , Km ^R	This study
4834XADA2	CFBP4834-R <i>xadA2</i> (538)*::pVO155; Rif ^R , Km ^R	This study
4834YAPH2	CFBP4834-R <i>yapH2</i> (356)*::pVO155; Rif ^R , Km ^R	This study
4834PILA	CFBP4834-R Δ <i>pilA</i>	This study

*numbers indicate the position from start codon of pVO155 insertion in the target gene of *X. citri* subsp. *citri* str. 306.

4834YAPH2 of *X. fuscans* subsp. *fuscans* mutated in *yapH2* gene is not impaired in its capacities of transmission to seeds by the vascular pathway, at the opposite of all other strains carrying mutations in adhesin genes.

Dispersion of a pathogen is a major determinant of fitness (Fenton et al. 2002; McCallum et al. 2001). Transmission by host seeds is one of the most efficient means of dispersion for the majority of the plant pathogenic bacteria (Gitaitis and Walcott 2007). However, determinants of this biological process are still poorly understood. Recently, we demonstrated that the type three secretion system of *X. fuscans* subsp. *fuscans* and its master regulators HrpG and HrpX are major determinants of transmission to seeds as they are implicated in vascular colonization of the host by the bacterium (A. Darsonval, *submitted*). Here, we show that PilA fimbrial protein and in a lesser extent FhaB1, FhaB2 are also involved in transmission of *X. fuscans* subsp. *fuscans* to bean seeds by the vascular pathway.

Pathogenic bacteria have evolved an incredibly large and diverse array of adhesion proteins to exploit a variety of host-cell surface component (Pizarro-Cerda and Cossart 2006). The results reported in this study present the individual and complementary contribution of six adhesins of *X. fuscans* subsp. *fuscans* during the colonization of the phyllosphere and the transmission to the seeds. These results are coherent with the idea that xanthomonads hosts a large repertoire of bacterial surface structures necessary to exploit the various environment they have to face in their life. Indeed, we showed that each of the six identified adhesins in *X. fuscans* subsp. *fuscans* was involved in at least one of the various steps of the phyllosphere and the anthosphere colonization during the colonization of its host.

1.5 Materials and Methods

Bacterial strains, plasmids and growth conditions. The bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table 4. Xanthomonad strains were grown at 28°C in 10% TSA medium (1.7 g/l tryptone, 0.3 g/l soybean peptone, 0.25 g/l glucose, 0.5 g/l NaCl, 0.5 g/l K₂HPO₄ and 15 g/l agar), 10% TSB (10% TSA without agar) or in MME minimal medium (10.5 g/l K₂HPO₄, 5.4 g/l KH₂PO₄, 1 g/l (NH₄)₂SO₄ supplemented with glutamate 20mM, MgSO₄ 1mM and casamino acids 0.15 g/l) (Arlat et al. 1991). *Escherichia coli* cells were cultivated at 37°C in Luria Bertani medium (10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl, 15 g/l agar). Media were supplemented with appropriate antibiotics. Antibiotics were used at the following final concentrations: rifamycin (R): 50 mg/l;

kanamycin (Km): 25 mg/l; rifampicin (Rif): 50 mg/l; chloramphenicol (Cm): 12.5 mg/l and tetracyclin (Tet): 10 mg/l. For *in planta* studies media were supplemented with 50 mg/l cycloheximide and 10 mg/l propiconazole to inhibit fungal growth. To prepare inocula, strains were grown 48 h in 10% TSA supplemented with appropriate antibiotics. Bacterial streak cultures were suspended in sterile water by sterile swab to 1×10^8 CFU/ml. Suspensions were adjusted to the desired final concentrations with sterile distilled water.

Plant material. *In planta* experiments were conducted with a variety of common bean (*P. vulgaris* cv. Flavert) susceptible to common bacterial blight. Seeds were provided by Vilmorin and were considered to be free of *X. fuscans* subsp. *fuscans* following the analysis of about 100,000 seeds per lot with standard tests (International Seed Testing Association, 2007). When necessary, seeds were sown in 10×10×18 cm pots (1 seed per pot) containing soil substrate (Neuhaus humin substrat S NF 11-44-551, Proveg, La Rochelle, France). Beans were grown in growth chamber until the first trifoliolate leaf was fully expanded (Michael 1994) or until the flower bud stage (five-week old) (Michael 1994) depending on the experiments. Beans were grown in growth chambers under 16 h of light at 25°C (28°C for pathogenicity tests) and 8 h of darkness at 20°C (22°C for pathogenicity tests) and under high (95%) relative humidity (RH). Before inoculations, plants were incubated under 16 h of light at 25°C and 8 h of darkness at 20°C and 95 % relative humidity (RH). For experiments on phyllosphere colonization and transmission to seeds RH was decreased to 50% from two days after inoculation. Plants were watered three times per week and supplemented with 0.3 g/l NPK (18/14/18) once a week. Plant inoculations were carried out under quarantine at UMR PaVé, Centre INRA, Beaucouzé, France. To avoid cross-contaminations, plants receiving a similar treatment were grouped in growth chamber and were separated by polypropylene curtains from other treatments. Every experiment with plants was repeated at least three times.

Molecular biology techniques. Chromosomal DNA was extracted with the Nucleospin[®] tissue kit (Macherey-Nagel Hoerd, France). Plasmid preps were performed with the Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification Systems (Promega). Restriction enzymes, DNA ligase, GoTaq[®] DNA Polymerase (Promega) were used according to the manufacturer's recommendations. Polymerase chain reactions (PCR) were done in 20 µl volumes containing 200 µM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 µM of each primer (Table 2), 0.4 U/µl GoTaq polymerase, and 4 µl of a boiled bacterial suspension (1×10^7 CFU/ml). PCR conditions were 5 min at 94°C followed by 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 55°C and 1 min at 72°C and ended with 7 min at 72°C. Southern hybridizations were performed using gene and vector-

specific PCR fragments as probes. Probes were labeled using the PCR Digoxigenin DIG labeling mix (Roche Applied Science, France). Genomic DNA was digested by *Bam*HI and transferred to nylon membrane Hybond N⁺ (Amersham) according to supplier's instructions. Blots were hybridized for 16 h at 42°C in 50% formamide, 5X SSC 20% SDS, 2% blocking reagent and 0.1% N-lauryl-sarcosine, followed by washes in 2X SSC, 0.1% SDS and 0.1X SSC, 0.1 % SDS at 68°C. The probes were detected using the Fab fragments of an Anti-digoxigenin antibody conjugated with alkaline phosphatase (Anti-DIG-AP) and Nitro-Blue Tetrazolium Chloride/5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt NBT/BCIP solution according to the supplier's instructions (Roche Applied Science, France).

Total RNA of each strain was isolated by a modification of the method of Piper et al. (1999). A 2 ml late-exponential-phase culture grown in TSA 10% was centrifuged 30 s at 14,000 × g. The pellet was resuspended in of 600 µl of hot (65°C) Trizol (Invitrogen, France) and the mixture was shaken at 65°C for 5 min. After 5 min at room temperature, the cell debris were removed by centrifugation (2,500 × g, 5 min at 15°C) and the supernatant was transferred to a fresh tube. Chloroform (120 µl) was added to 600 µl of the supernatant, and the mixture was vortexed vigorously 30 s. After 2 min at room temperature, the phases were separated by centrifugation at 12,000 × g for 15 min at 4°C, the upper phase (300 µl) was removed to a fresh tube. Isopropyl alcohol (250 µl) was added and the mixture was incubated at room temperature for 10 min. The precipitated RNA was collected by centrifugation at 12,000 × g for 20 min at 4°C. The supernatant was removed, and the pellet was washed with 500 µl of 75% ethanol. A new pellet of RNA was collected by centrifugation at 7,500 × g for 5 min at 4°C and was air-dried to near completion. The RNA was dissolved in 89 µl of sterile double-distilled H₂O, and 10 µg of the preparation were treated with 1 µl of DNase (Ambion, Applied Biosystems, France; 2 U µl⁻¹) to remove contaminating DNA during 1 h at 37°C. The preparation was heated 10 min at 75°C to inactivate the DNase and RNA was ethanol precipitated and resuspended in 50 µl of double-distilled H₂O. Five µg of total RNA was reverse transcribed into cDNA in a 35 µl volume using 15 µl mix of 11mer primers at 10 µM each (Fislage et al. 1997), 8 µl dNTP at 2,5 mM, 0.8 µL RNasin (40 U/µl, Promega, France) and 0.2 µl Reverse Transcriptase (200 U/µl, Promega, France). Reaction mixture was incubated 10 min at 65°C, 5 min at 4°C and 1 h at 42°C. The RNA-cDNA mix was ethanol precipitated, resuspended in double-distilled H₂O and used for PCR reactions.

Mutagenesis techniques to construct *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R mutants in adhesins. Specific primers (Table 2) for each target gene were designed based on consensus sequences obtained by comparison of sequences from *X. citri*

subsp. *citri* strain 306 (da Silva et al. 2002), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* strain 85-10 (Thieme et al. 2005), *X. oryzae* pv. *oryzae* strain KACC10331 (Lee et al. 2005) and *X. campestris* pv. *campestris* strain ATCC33913 (da Silva et al. 2002; Qian et al. 2005) available in the GenBank database. Multiple alignments were performed using ClustalW2 at the EMBL-EBI.

Identification of homologues of these genes was checked by PCR in the CFBP4834-R. CFBP4834-R deletion mutant lacking *pilA* were generated using the allelic exchange vector pCM184 (Marx and Lidstrom 2002). Two DNA fragments (543 and 604 bp) were PCR amplified in *pilA* gene of *X. fuscans* subsp. *fuscans* strain CFBP4834-R using primers described in Table 2. They were cloned in pCM184 in the *Apal-Sacl* and *EcoRI-NotI* cloning sites, respectively. These cloning sites flanked the loxP sites boarding a kanamycin cassette. A marker exchange kanamycin resistant mutant of CFBP4834-R was then generated by triparental mating using the mobilizing *Ec* K12 (pRK600) (Finan et al. 1986). Unmarked deletion 4834PILA mutant was generated using the *cre*-expressing plasmid pCM157. This plasmid provides expression of a Cre recombinase that catalyses *in vivo* excision of DNA regions flanked by co-directional loxP recognition sites (Marx and Lidstrom 2002). The *pilA* region of the mutant was sequenced to validate the deletion. Absence of functional domains in the remaining *pilA* fragment of the mutated strain was analyzed with InterProScan.

For specific inactivation of other genes in CFBP4834-R, a plasmid-integration mutagenesis strategy was used as previously described (Oke and Long 1999). Fragment of each target gene was amplified using specific oligonucleotidic primers (Table 2). The PCR fragment was ligated into the suicide vector pVO155 (Oke and Long 1999) and this construction was introduced into *E. coli* DH5 α . PCR fragments cloned into the pVO155 were sequenced to verify their identity with BlastN (Altschul et al. 1997). Plasmid was transferred into the strain CFBP4834-R by triparental mating (Arlat et al. 1992; Glazebrook and Walker 1991) using the mobilizing *E. coli* K12 (pRK600) (Finan et al. 1986). Disruption of each target gene was verified by (i) PCR using one primer in the plasmid (proR or proF) and a second primer in the genome outside the recombinant region (Table 2), (ii) Southern blotting using the recombinant fragment as a specific probe and a vector-specific probe (Table 2) to confirm single insertion and (iii) RT-PCR to confirm that no mRNA were transcribed from the mutated gene using specifically designed primers (Table 2). Primers (HrpG-F and HrpX-R2, Darsonval, *submitted*) designed in two contiguous genes that belonged to different transcription units *hrpG* and *hrpX* were used to verify the absence of contaminant DNA in each sample. Primers (Table 2) designed in *orf3* of the *pig* locus of *X. oryzae* pv. *oryzae* strain BX01 (Goel et al. 2002) were used as positive control for each

sample as this gene is transcribed in our conditions.

The stability of the constructions was verified *in vitro* by testing the kanamycin resistance of the insertion mutants. Liquid cultures at initial concentration of 1×10^6 CFU/ml of each strain were cultured in 10% TSB without antibiotic selection pressure at 28°C under constant agitation (120 rpm), 24h later they were 10 times-diluted and grown up again, this step was repeated during four days. Finally bacterial populations were plated on selective and non-selective media (10% TSA) and population sizes were compared. Three independent cultures of every strain were analyzed and the experiment was repeated three times. The stability of the mutation was also verified *in planta* by comparison of the bacterial population sizes on selective and non-selective media the day of inoculation and at the last sampling date. To confirm stability of the construction vs. antibiotic resistance acquisition and to check for cross-contamination among treatments the identity of ten colonies per plant that developed on the non-selective medium was verified by PCR using specific primers (Table 1).

To assess that mutations had no impact on *in vitro* growth, growth curves were established for each mutant and the wild type strain CFBP4834-R by growing strains at an initial concentration of 1×10^7 CFU/ml in 100-well honeycomb microtiter plates (Thermo Electron, France) in 10% TSB. Plates were incubated at 28°C with continuous shaking over a period of 30 hours. Growth measurements were monitored automatically every 2 h by optical density measurements at 600 nm using the Bioscreen C instrument (Labsystems, Helsinki, Finland). Non-inoculated wells were used as aseptic controls. The experiment was repeated three times for each strain.

***In vitro* and *in planta* adhesion assays.** Bacterial adhesion under static conditions was quantified by a crystal violet incorporation assay with 96-well polypropylene microtiter plates (Microwell, Nunc, Denmark) using a modification of a previously reported protocol (O'Toole and Kolter 1998). Every well was fulfilled with 200 μ l MME minimal medium per well. Three wells per strain containing each 200 μ l MME minimal medium were inoculated with 1:20 dilutions of an inoculum calibrated at 1×10^7 UFC ml⁻¹ and incubated at 28°C for 3 days. Then supernatants containing planktonic bacteria were transferred into a 96-well plate (Nunclon, Nunc, Denmark) to determine their OD₆₀₀ using the μ Quant™ platewell reader (Bio-Tek Instruments, Inc., USA) as an indication of bacterial growth. To quantify surface-attached bacteria, the 96-well PP microtiter plates were rinsed twice with distilled water, and surface-attached cells were stained for 15 min at room temperature with 200 μ l per well of a 1% (wt:vol) crystal violet (CV) solution. Then supernatants were discarded, the wells were washed thoroughly and repeatedly with distilled water, and finally the dye

incorporated in attached cells was solubilized in 200 μ l of 95% ethanol per well and the OD_{600} were determined in the microplate reader. These tests were repeated at least three times for every bacterial strain.

Bacterial adhesion to bean seeds was tested as previously described (Espinosa-Urgel et al. 2000) with some modifications. To evaluate the adhesion ability of the wild type and mutant strains, series of three independent columns were filled with 12 g of bean seeds and fully saturated with 6 ml of inoculum at 1×10^5 CFU/ml. The contact time between the culture and the seeds was 25 min and 2 hours. After removal of the inoculum, columns were washed twice with 6 ml of distilled water. To quantify bacterial cells adherent to seeds, seeds of each column were soaked overnight at 4°C in 24 ml of sterile distilled water. Every sample was then vigorously shaken, and appropriate dilutions were spiral plated (Spiral Biotech, Bethesda, MD) on selective medium to enumerate bacterial population sizes. These tests were repeated at least three times for every bacterial strain.

Pathogenicity tests. Tests were performed by immersing during 30 s whole trifoliolate leaf of bean at the V3 stage (Michael 1994) into bacterial suspensions calibrated at 1×10^7 and 1×10^6 CFU/ml. One leaf per plant and three plants per strain were inoculated. Symptoms were recorded on the 11th day following inoculation. Symptom development on each inoculated leaflet was individually scored using the following scale: 1: no symptom ; 3: 1 to 20 spots; 6: 21 to 40 spots; 9: > 41 spots, and 11: leaf death.

Sterilization of the leaf surface and dynamics of bacterial population sizes in bean phyllosphere. Plants at the first trifoliolate stage (Michael 1994) were spray-inoculated until runoff with bacterial suspensions at 1×10^6 CFU/ml. The first trifoliolate leaf of five plants was sampled 3 hours, and 1, 4 and 11 days after inoculation. To remove planktonic cells and have access to the adherent and aggregated phyllospheric bacterial populations, a surface sterilization assay was used. One leaflet of each leaf was placed during 3 min in a saturated chloroform vapor box (1 ml of chloroform in 0.37 dm³ closed box) and then its bacterial content was analyzed. The two other leaflets were directly analyzed for their bacterial content. Total bacterial population sizes were quantified by adding 10 ml of distilled water to the leaflets and ground (Stomacher 80; Seward, London, United Kingdom) for 2 min at maximum power. Every sample and appropriate dilutions were spiral plated (Spiral Biotech, Bethesda, MD) on appropriate media to enumerate inoculated strain. Previously, it has been verified after leaf infiltration that conditions used to sterilize leaf surface did not kill internalized bacteria but destroy the totality of bacterial populations freshly sprayed on leaves (data not shown).

Frequencies of transmission to seeds and associated bacterial population sizes.

Beans at the flower bud stage (Michael 1994) were spray-inoculated until runoff with bacterial suspensions at 1×10^5 CFU/ml. Bacterial population sizes were quantified in flower buds from five plants 3 hours after spray-inoculation and in seeds from 50 plants six weeks after inoculation. Samples (flower buds or seeds) were bulked per plant. Bulks of flower buds were weighed and ground (Stomacher 80; Seward, London, United Kingdom) for 2 min at maximum power in 5 ml of distilled water. Seeds were carefully extracted from asymptomatic pods without any exogenous contamination. For that, in a sterile environment using gloves, every pod was dissected with a sterile scalpel taking care not to touch the seeds. Once the pod was opened, seeds were detached one by one from the pod using sterile forceps. By this method, seeds never enter in contact with the external surface of the pod nor with any contaminated material. Seeds were soaked overnight at 4°C in 2 ml of sterile distilled water per g of seeds (5.56 seeds/g). Samples were then weighed and vigorously shaken. To quantify population sizes of mutants and to look for reversion events aliquots of 500 µl of samples and appropriate dilutions were plated on 10% TSA-R or 10% TSA-R-Km medium. For every sample, the identity of ten colonies grown on 10% TSA-R was confirmed by PCR with appropriate primers (Table 1).

To compare the occurrence of the floral and the vascular pathways in bacterial transmission to seeds two different inoculation methods were used. On a first set of plants direct flower bud inoculation was performed by depositing 20 µl of a 1×10^6 CFU/ml inoculum per flower bud on three groups of flower buds per plant taking every possible precaution to avoid dispersion of the inoculum on leaves. After inoculum drying, inoculated flower buds were enclosed in transparent cellophane bags to avoid any subsequent contamination of leaf by contact with inoculated flowers. On a second set of plants, three groups of flower buds per plant were protected with transparent cellophane bags before plants were inoculated by spraying the phyllosphere with a 1×10^5 CFU/ml inoculum. Three hours after inoculations bacterial population sizes were quantified on leaves bulked per plant when flower buds were inoculated by depositing drops of inoculum, and on the third trifoliolate leaf for spray inoculated plants. Bacterial population sizes were also quantified in inoculated and protected flower buds. At harvest (six weeks after inoculation) bacterial population sizes were quantified in seeds extracted from pods as described above. Three plants per strain and per treatment were analyzed the day of inoculation and 10 plants per strain and per treatment at harvest. Sample analyses were performed as described above.

Statistical analyses. Statistical analyses were performed using Statbox Pro software (Grimmer Logiciels, Optima France). Log-transformed data were analyzed with Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. Comparisons of transmission frequencies were based on a Pearson's χ^2 test. To compare paired population sizes quantified on selective and non-selective media Wilcoxon's signed-ranks test for two groups was used (Sokal and Rohlf 1969).

Acknowledgments

This work was supported by grant from Conseil Régional des Pays de la Loire. We are grateful to M. Arlat and E. Lauber for providing strains and mutagenesis protocol. We thank J. Benard and P. Horeau for plant production and K. Goislot for assistance.

1.6 Literature Cited

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, N., and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25.
- Arlat, M., Gough, C.L., Barber, C.E., Boucher, C., and Daniels, M.J. 1991. *Xanthomonas campestris* contains a cluster of *hrp* genes related to the larger *hrp* cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 593-601.
- Arlat, M., Gough, C.L., Zischek, C., Barberis, P.A., Trigalet, A., and Boucher, C. 1992. Transcriptional organization and expression of the large *hrp* gene cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5: 187-193.
- Astua-Monge, G., Freitas-Astua, J., Bacocina, G., Roncoletta, J., Carvalho, S.A., and Machado, M.A. 2005. Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J. Bacteriol.* 187: 1201-1205.
- Barak, J.D., Gorski, P., Naraghi-Arani, P., and Charkowski, A.O. 2005. *Salmonella enterica* virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5685-5691.
- Barnhart, M.M., and Chapman, M.R. 2006. Curli biogenesis and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 60: 131-147.
- Cao, H., Baldini, R.L., and Rahme, L.G. 2001. Common mechanisms for pathogens of plants and animals. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39: 259-284.

- Carbonnelle, E., Helaine, S., Nassif, X., and Pelicic, V. 2006. A systematic genetic analysis in *Neisseria meningitidis* defines the Pil proteins required for assembly, functionality, stabilization and export of type IV pili. *Mol. Microbiol.* 61: 1510-1522.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
- Cotter, S.E., Surana, N.K., and St Geme, J.W., 3rd. 2005. Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* 13: 199-205.
- Craig, L., Pique, M.E., and Tainer, J.A. 2004. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 363-378.
- Darsonval, A., Darrasse, A., Meyer, D., Demarty, M., Durand, K., Bureau, C., Manceau, C., Jacques, M.-A. 2008. Type III secretion system of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* is involved in phyllosphere colonization process and in transmission to seeds of susceptible bean. *Appl. Environ. Microbiol.* Submitted.
- da Silva, A.C., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Monteiro-Vitorello, C.B., Van Sluys, M.A., Almeida, N.F., Alves, L.M., do Amaral, A.M., Bertolini, M.C., Camargo, L.E., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L.P., Cicarelli, R.M., Coutinho, L.L., Cursino-Santos, J.R., El-Dorry, H., Faria, J.B., Ferreira, A.J., Ferreira, R.C., Ferro, M.I., Formighieri, E.F., Franco, M.C., Greggio, C.C., Gruber, A., Katsuyama, A.M., Kishi, L.T., Leite, R.P., Lemos, E.G., Lemos, M.V., Locali, E.C., Machado, M.A., Madeira, A.M., Martinez-Rossi, N.M., Martins, E.C., Meidanis, J., Menck, C.F., Miyaki, C.Y., Moon, D.H., Moreira, L.M., Novo, M.T., Okura, V.K., Oliveira, M.C., Oliveira, V.R., Pereira, H.A., Rossi, A., Sena, J.A., Silva, C., de Souza, R.F., Spinola, L.A., Takita, M.A., Tamura, R.E., Teixeira, E.C., Tezza, R.I., Trindade dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, S.M., White, F.F., Setubal, J.C., and Kitajima, J.P. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417: 459-463.
- Danhorn, T., and Fuqua, C. 2007. Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 61: 401-422.
- Devoret, R., and Blanco, M. 1970. Mutants of *Escherichia coli* K12 (λ)⁺ non-inducible by thymine deprivation. *Mol. Gen. Genet.* 107: 272-280.
- Espinosa-Urgel, M., Salido, A., and Ramos, J.-L. 2000. Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *J. Bacteriol.* 182: 2363-2369.
- Feil, H., Feil, W.S., and Lindow, S.E. 2007. Contribution of fimbrial and afimbrial adhesins of *Xylella fastidiosa* to attachment to surfaces and virulence to grape. *Phytopathology* 97: 318-324.

- Fenton, A., Fairbairn, J.P., Norman, R., and Hudson, P.J. 2002. Parasite transmission: reconciling theory and reality. *J. Anim. Ecol.* 71: 893-905.
- Finan, T.M., Kunkel, B., De Vos, G.F., and Signer, E.R. 1986. Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *J. Bacteriol.* 167: 66-72.
- Finlay, B.B., and Falkow, S. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 136-169.
- Fislage, R., Berceanu, M., Humboldt, Y., Wendt, M., and Oberender, H. 1997. Primer design for a prokaryotic differential display RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 25: 1830-1835.
- Foreman-Wykert, A.K., and Miller, J.F. 2003. Hypervirulence and pathogen fitness. *Trends Microbiol.* 11: 105-108.
- Gerlach, R.G., and Hensel, M. 2007. Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 297: 401-415.
- Gitaitis, R., and Walcott, R. 2007. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45: 371-397.
- Glazebrook, J., and Walker, G.C. 1991. Genetic techniques in *Rhizobium meliloti*. *Method. Enzymol.* 204: 398-418.
- Goel, A.K., Rajagopal, L., Nagesh, N., and Sonti, R.V. 2002. Genetic locus encoding functions involved in biosynthesis and outer membrane localization of xanthomonadin in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Bacteriol.* 184: 3539-3548.
- Gorski, P., Palumbo, J.D., and Mandrell, R.E. 2003. Attachment of *Listeria monocytogenes* to radish tissue is dependent upon temperature and flagellar motility. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 258-266.
- Guilhabert, M.R., and Kirkpatrick, B.C. 2005. Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: hemagglutinin adhesins contribute to *X. fastidiosa* biofilm maturation and colonization and attenuate virulence. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18: 856-868.
- Gurlebeck, D., Thieme, F., and Bonas, U. 2006. Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J. Plant Physiol.* 163: 233-255.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Hoiczky, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M., Lupas, A., and Heesemann, J. 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *Embo J.* 19: 5989-5999.

- Hultgren, S.J., Abraham, S., Caparon, M., Falk, P., St Geme, J.W., 3rd, and Normark, S. 1993. Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell* 73: 887-901.
- Jacques, M.A., Josi, K., Darrasse, A., and 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.
- Kaiser, D. 2007. Bacterial swarming: a re-examination of cell-movement patterns. *Curr. Biol.* 17: 561-570.
- Kang, Y., Liu, H., Genin, S., Schell, M.A., and Denny, T.P. 2002. *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Mol. Microbiol.* 46: 427-437.
- Kim, J.F., Ham, J.H., Bauer, D.W., Collmer, A., and Beer, S.V. 1998. The *hrpC* and *hrpN* operons of *Erwinia chrysanthemi* EC16 are flanked by *plcA* and homologs of hemolysin/adhesin genes and accompanying activator/transporter genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 563-567.
- Klemm, P., and Schembri, M.A. 2000. Bacterial adhesins: function and structure. *Int. J. Med. Microbiol.* 290: 27-35.
- Koretke, K.K., Szczesny, P., Gruber, M., and Lupas, A.N. 2006. Model structure of the prototypical non-fimbrial adhesin YadA of *Yersinia enterocolitica*. *J. Struct. Biol.* 155: 154-161.
- Latasa, C., Solano, C., Penades, J.R., and Lasa, I. 2006. Biofilm-associated proteins. *C. R. Biol.* 329: 849-857.
- Lee, B.M., Park, Y.J., Park, D.S., Kang, H.W., Kim, J.G., Song, E.S., Park, I.C., Yoon, U.H., Hahn, J.H., Koo, B.S., Lee, G.B., Kim, H., Park, H.S., Yoon, K.O., Kim, J.H., Jung, C.H., Koh, N.H., Seo, J.S., and Go, S.J. 2005. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Res.* 33: 577-586.
- Marx, C.J., and Lidstrom, M.E. 2002. Broad-host-range *cre-lox* system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria. *BioTechniques* 33: 1062-1067.
- Matthysse, A.G., and McMahan, S. 1998. Root colonization by *Agrobacterium tumefaciens* is reduced in *cel*, *attB*, *attD* and *attR* mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2341-2345.
- Mattick, J.S. 2002. Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 289-314.
- Maude, R.B. 1996. Seedborne diseases and their control *Principles & Practice*. CAB International, Oxon, UK.
- Mazar, J., and Cotter, P.A. 2006. Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Mol. Microbiol.* 62: 641-654.

- McCallum, H., Barlow, N., and Hone, J. 2001. How should pathogen transmission be modelled? *Trends Ecol. Evol.* 16: 295-300.
- Merz, A.J., So, M., and Sheetz, M.P. 2000. Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* 407: 98-102.
- Michael, T.E. 1994. The bean plant. Pages 1-4 in: *Compendium of bean diseases*. R. Hall, ed. APS Press, Saint Paul.
- Newman, K., Almeida, R.P.P., Purcell, A.H., and Lindow, S.E. 2004. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 1737-1742.
- Nummelin, H., Merckel, M.C., Leo, J.C., Lankinen, H., Skurnik, M., and Goldman, A. 2004. The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. *Embo J.* 23: 701-711.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., and Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 49-79.
- O'Toole, G.A., and Kolter, R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28: 449-461.
- Ojanen-Reuhs, T., Kalkkinen, N., Westerlund-Wikstrom, B., van Doorn, J., Haahtela, K., Nurmiäho-Lassila, E.L., Wengelnik, K., Bonas, U., and Korhonen, T.K. 1997. Characterization of the *fimA* gene encoding bundle-forming fimbriae of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 179: 1280-1290.
- Oke, V., and Long, S.R. 1999. Bacterial genes induced within the nodule during the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Mol. Microbiol.* 32: 837-849.
- Piper, K.R., Von Bodman, S.B., Hwang, I., and Farrand, S.K. 1999. Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by opine regulon in *Agrobacterium*. *Mol. Microbiol.* 32: 1077-1089.
- Pizarro-Cerda, J., and Cossart, P. 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 124: 715-727.
- Puhler, A., Arlat, M., Becker, A., Gottfert, M., Morrissey, J.P., and O'Gara, F. 2004. What can bacterial genome research teach us about bacteria-plant interactions? *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 137-147.
- Qian, W., Jia, Y., Ren, S.X., He, Y.Q., Feng, J.X., Lu, L.F., Sun, Q., Ying, G., Tang, D.J., Tang, H., Wu, W., Hao, P., Wang, L., Jiang, B.L., Zeng, S., Gu, W.Y., Lu, G., Rong, L., Tian, Y., Yao, Z., Fu, G., Chen, B., Fang, R., Qiang, B., Chen, Z., Zhao, G.P., Tang, J.L., and He, C. 2005. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res.* 15: 757-767.

- Ray, S.K., Rajeshwari, R., Sharma, Y., and Sonti, R.V. 2002. A high-molecular-weight outer membrane protein of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* exhibits similarity to non-fimbrial adhesins of animal pathogenic bacteria and is required for optimum virulence. *Mol. Microbiol.* 46: 637-647.
- Rojas, C.M., Ham, J.H., Deng, W.L., Doyle, J.J., and Collmer, A. 2002. HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 13142-13147.
- Rosenblueth, M., and Martinez-Romero, E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19: 827-837.
- Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G.H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P.E., Stromberg, V.K., and Vidaver, A.K. 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 28: 494-518.
- Sokal, R.R., and Rohlf, F.J. 1969. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research.* W. H. Freeman & Co., San Francisco, Calif.
- Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Buttner, D., Caldana, C., Gaigalat, L., Goesmann, A., Kay, S., Kirchner, O., Lanz, C., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Mittenhuber, G., Nies, D.H., Niesbach-Klosgen, U., Patschkowski, T., Ruckert, C., Rupp, O., Schneiker, S., Schuster, S.C., Vorholter, F.J., Weber, E., Puhler, A., Bonas, U., Bartels, D., and Kaiser, O. 2005. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J. Bacteriol.* 187: 7254-7266.
- Tobe, T., and Sasakawa, C. 2002. Species-specific cell adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by type IV bundle-forming pili. *Cell Microbiol* 4: 29-42.
- van Doorn, J., Hollinger, T.C., and Oudega, B. 2001. Analysis of the type IV fimbrial-subunit gene *fimA* of *Xanthomonas hyacinthi*: application in PCR-mediated detection of yellow disease in Hyacinths. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 598-607.

Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., and Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 472-489.

Vauterin, L., Rademaker, J., and Swings, J. 2000. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology* 90: 677-682.

Vidaver, A.K. 1993. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: cause of common bacterial blight of bean. Pages 40-44 in: *Xanthomonas*. J.G. Swings, and E.L. Civerolo, eds. Chapman & Hall, London.

West, S.A., Griffin, A.S., Gardner, A., and Diggle, S.P. 2006. Social evolution theory for microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 597-607.

Author-Recommended Internet Resources

NCBI BLAST webpage:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

EMBL-European Bioinformatics Institute, InterProScan sequence search webpage:

<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>.

EMBL-European Bioinformatics Institute, ClustalW2 webpage:

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>.

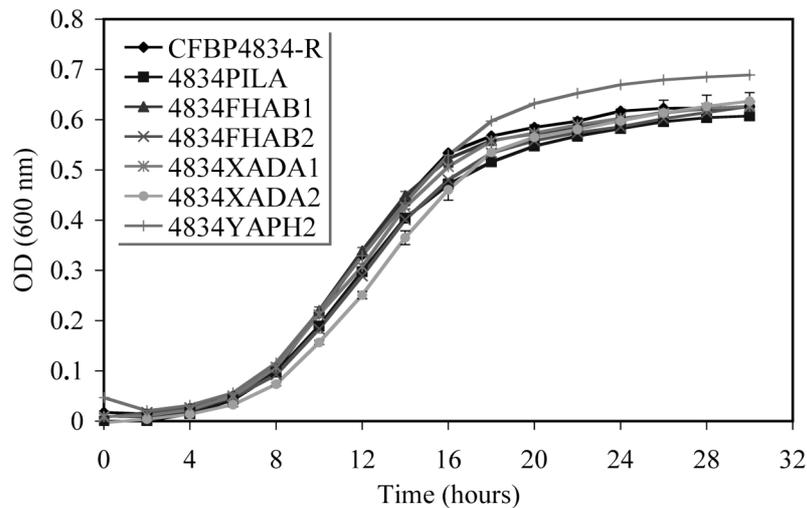


Figure 5 : Croissance *in vitro* des mutants 4834PILA, 4834FHAB1, 4834FHAB2, 4834XADA1, 4834XADA2 et 4834YAPH2 et de la souche sauvage *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R.

Tableau 5 : Comparaison des tailles des populations après cinq jours de culture des souches mutées dans les gènes *fhaB1*, *fhaB2*, *xadA1*, *xadA2*, *yapH2* se développant sur milieu sélectif (10% TSA-R-Km) et sur milieu non-sélectif (10% TSA-R).

Mutants	Moyennes ¹ des tailles des populations (Log UFC mL ⁻¹)		(p.) ²
	10% TSA-R-Km	10% TSA-R	
4834FHAB1	8,47	8,45	0,02
4834FHAB2	9,18	9,17	0,11
4834XADA1	8,86	8,86	0,39
4834XADA2	8,91	8,98	0,34
4834YAPH2	8,40	8,36	0,29

(1) Moyenne calculée sur les 5 répétitions effectuées pour chaque mutant testé

(2) Valeur calculée par un test de Wilcoxon. La différence est significative si $p. < 0,05$.

2. Données complémentaires

2.1 Données référencés mais non présentées dans l'article 2

2.1.1 Suivi des croissances *in vitro* des mutants 4834PILA, 4834FHAB1, 4834FHAB2, 4834XADA1, 4834XADA2, 4834YAPH2 et CFBP4834-R

La croissance *in vitro* des souches mutées dans les gènes *fhaB1*, *fhaB2*, *xadA1*, *xadA2*, *yapH2*, *pilA* en milieu appauvri ont une dynamique de croissance *in vitro* similaires à celle observée pour la souche sauvage *X. fuscans* subsp. *fuscans* (figure 5). Ces mutants ne sont pas affectés dans leur croissance *in vitro* et donc pas dans leur métabolisme primaire.

2.1.2 Test de la stabilité des mutants 4834FHAB1, 4834FHAB2, 4834XADA1, 4834XADA2 et 4834YAPH2 par mesure de la fréquence de réversion

Après 5 jours de croissance, les tailles des populations dénombrées sur milieu sélectif pour les mutants altérés dans les gènes *fhaB2*, *xadA1*, *xadA2*, *yapH2*, ne sont pas significativement différentes des tailles des populations dénombrées sur milieu non-sélectif ($p > 0,05$). Dans le cas du mutant 4834FHAB1, la taille des populations est significativement supérieure sur milieu sélectif ($p < 0,05$) (tableau 5). L'absence d'une croissance plus abondante sur milieu non-sélectif que sur milieu sélectif permet de conclure qu'en l'absence de pression de sélection, la résistance à la kanamycine est maintenue et que les mutations sont stables *in vitro*.

2.1.3 Vérification de la mutation par RT-PCR

Le protocole d'extraction et de transcription reverse utilisé a été adapté d'un protocole optimisé par Sophie Cesbron (comm. pers.) pour l'extraction d'ARN à partir de cellules d'*Erwinia amylovora*, l'agent du feu bactérien des Pommoidés.

Différents couples d'amorces sont utilisés pour les RT-PCR afin de vérifier la mutation de chacun des gènes ciblés (tableau 1 de l'article 2) :

- les amorces spécifiques F/R de chacun des gènes ciblés → les deux amorces sont situées en aval de l'insertion de façon à être fonctionnelles sur l'ADN du mutant mais pas sur l'ADNc-ARN. Si le gène est bien muté, elles ne permettent pas d'amplification en RT-PCR car les ADNc-ARN correspondants ne sont pas synthétisés. Si aucun fragment n'est amplifié à partir de l'ADNc-ARN du mutant,

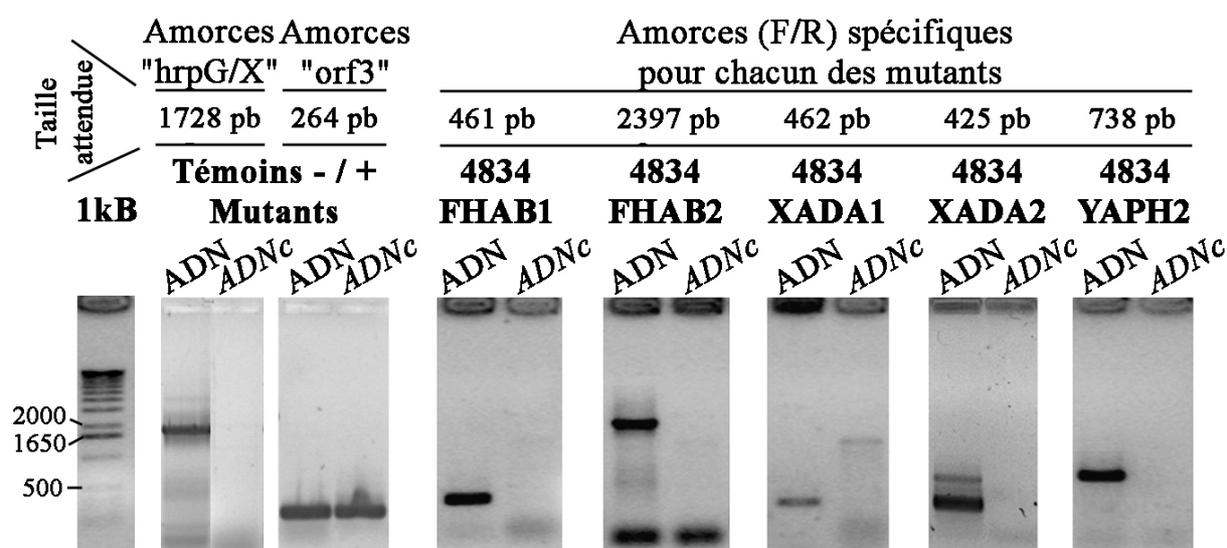


Figure 6 : Validation par RT-PCR de la construction des mutants 4834FHAB1, 4834FHAB2, 4834XADA1, 4834XADA2 et 4834YAPH2 après extraction d'ARN. Photographies de gels d'agarose montrant les résultats des fragments amplifiés ou non à partir de l'ADN et de l'ADNc à l'aide des amorces hrpG-R/hrpX-R2, orf3-F/orf3-R et des amorces spécifiques à chaque mutant. 1kB : marqueur de poids moléculaire (1 kb, Invitrogen). Les témoins - et + sont réalisés pour chacun des échantillons d'ARN extrait.

cela signifie que le gène muté a bien été altéré dans sa transcription, constituant ainsi une validation de la construction du mutant. Les tailles des fragments amplifiés sont détaillées pour chacun des mutants dont les résultats sont présentés dans cette étude.

- hrpG-R/hrpX-R2 → amorces à cheval sur deux gènes différents non organisés en opéron (fragments proches), donc si un fragment est amplifié cela révèle la présence d'ADN contaminant. Taille du fragment : 1728 pb. C'est un témoin négatif de la présence d'ADN contaminant dans l'ARN extrait.
- orf3-F/orf3-R → permettent l'amplification d'un gène constitutif (synthèse de la xanthomonadine). Taille du fragment : 264 pb. C'est un témoin positif de l'extraction d'ARN.

Toutes les amplifications PCR réalisées avec les amorces témoins ont montré le même profil présenté dans la figure 6. Les résultats obtenus avec les amorces hrpG-R/hrpX-R2 confirment l'absence d'ADN contaminant dans l'ARN extrait : aucun fragment n'est amplifié. Le contrôle positif pour ces mêmes amorces indique qu'elles fonctionnent correctement puisqu'un fragment de 1728 pb est amplifié à partir de l'ADN du mutant. Les fragments amplifiés à partir de l'ADN et de l'ADNc-ARN de chacun des mutants ont tous montré un signal d'amplification de 264 pb avec les amorces orf3-R/orf3-F qui servent de témoin positif d'extraction des ARNs (figure 6).

Les résultats obtenus pour les mutants 4834FHAB1, 4834FHAB2, 4834XADA1, 4834XADA2 et 4834YAPH2 avec les amorces spécifiques situées en aval de l'insert de chacun des gènes ciblés sont similaires. Aucun fragment n'est amplifié à partir de l'ADNc du mutant, alors qu'un fragment de la taille attendue est amplifié à partir de leurs ADNs (figure 6). Ce fragment n'est donc pas transcrit et les différents mutants sont bien altérés dans chacun des gènes ciblés.

2.2 Identification et mutation de *fliN*, de l'*orf3* du cluster *pig* et de *rpfB* chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R

2.2.1 Détection de *fliN*, de l'*orf3* du cluster *pig* et de *rpfB* chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R

Le gène *fliN* (cf. figure 17 du chapitre 2 de l'introduction générale) est un élément essentiel du moteur entraînant la rotation du flagelle (Aizawa *et al.*, 2000; Kaiser, 2007). Le gène *fliC* codant pour la flagelline a été recherché par PCR avec des amorces conservées sans succès chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R. Les *orf3*, 6, 7 et 10 (cf. figure 30 du chapitre 2 de l'introduction générale) sont les quatre gènes du cluster *pig*

Tableau 6 : Amorces sens (F) et reverse (R) utilisées pour l'amplification de fragments homologues de *fliN*, de l'*orf3* du cluster *pig* et de *rpfB* chez *X. fuscans* subsp. *fuscans*.

Gène	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce ⁽¹⁾ 5'-3'	Taille attendue de l'amplifiat (pb)
<i>fliN</i>	<i>fliN</i> -F	CAGAAGACTAGTGAATTCGGCGTTTCCAATGGCA	353
	<i>fliN</i> -R	CTCGAGGTTGACGTAGACATCGAGCGGTT	
<i>orf3</i>	<i>orf3</i> -F	TGATACTAGTCCAGGGCAGCATGTGCC	264
	<i>orf3</i> -R	AGATAGAGCTCGTCACCTCCACGC	
<i>rpfB</i>	<i>rpfB</i> -F	CAGGCACTAGTTTGGTTGCAAAGTTATCCG	467
	<i>rpfB</i> -R	CATGGAGCTCAGGCCGGTGGTGATGA	

(1) : en gras, site de restriction *SpeI* dans l'amorce F et *XhoI* dans l'amorce R.

Tableau 7 : Homologies nucléotidiques obtenues après BlastN des séquences des fragments de *fliN*, de l'*orf3* du cluster *pig* et de *rpfB* chez *X. fuscans* subsp. *fuscans*.

<i>X. fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i> CFBP4834-R		<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> str. 306		<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10		<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC33913							
Nom donné au gène	Taille insert séquencé (pb)	Nom du gène	Taille du gène (pb)	Protéines	% homologie	Nom du gène	Taille du gène (pb)	Protéines	% homologie	Nom du gène	Taille du gène (pb)	Protéines	% homologie
<i>fliN</i>	335	FliN ; XAC1946	471	Flagellar motor switch protein	98	FliN ; XCV1990	339	Flagellar motor switch protein	98	FliN ; XCC1918	339	Flagellar motor switch protein	92
<i>orf3</i>	239	XAC4092	537	Phospho-transferase	99	XCV4180	432	Xanthomonadin biosynthesis protein	94	XCC4004	438	Phospho-transferase	82
<i>rpfB</i>	332	Rpfb ; XAC1880	1683	Long-chain fatty-acid-CoA ligase	98	Rpfb ; XCV1921	1683	Long-chain fatty-acid-CoA ligase	98	Rpfb ; XCC1858	1683	Long-chain fatty-acid-CoA ligase	87

Tableau 8 : Comparaison des tailles des populations après cinq jours de culture des souches mutées dans *fliN*, l'*orf3* du cluster *pig* et *rpfB* se développant sur milieu sélectif (10% TSA-R-Km) et sur milieu non-sélectif (10% TSA-R).

Mutants	Moyennes ¹ des tailles des populations (Log UFC mL ⁻¹)		(p.) ²
	10% TSA-R-Km	10% TSA-R	
4834FLIN	8,65	8,65	0,45
4834ORF3	8,40	8,38	0,021
4834RPFB	8,28	8,26	0,054

(1) Moyenne calculée sur les 5 répétitions effectuées pour chaque mutant testé

(2) Valeur calculée par un test de Wilcoxon. La différence est significative si p. < 0,05.

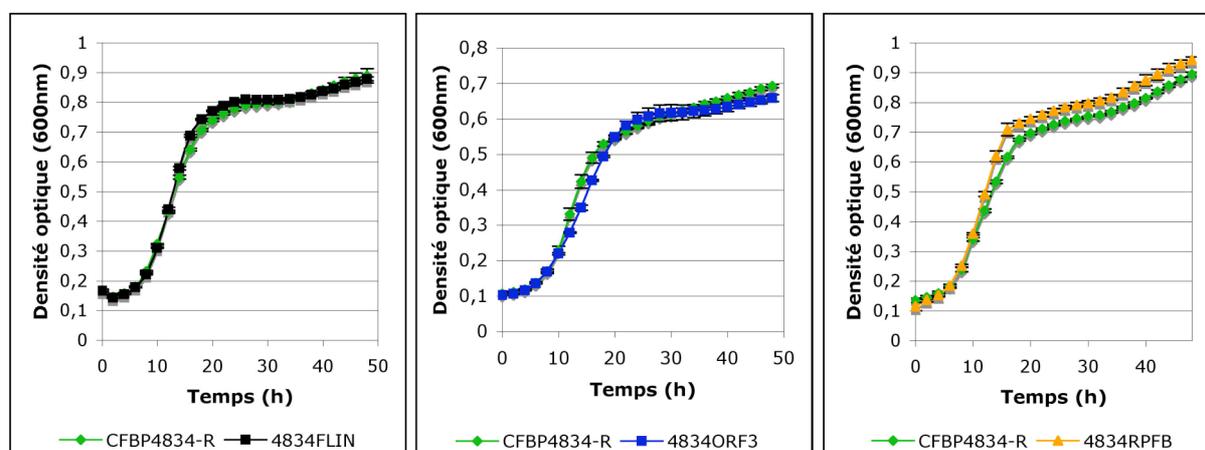


Figure 7 : Croissance *in vitro* des mutants 4834FLIN, 4834ORF3 et 4834RPFB et de la souche sauvage *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R.

identifiés chez *X. oryzae* pv. *oryzae* comme indispensables à la synthèse de xanthomonadine (Goel *et al.*, 2002). Enfin le gène *rpfB* (cf. figure 29 du chapitre 2 de l'introduction générale) est un des gènes essentiels du système *rpf* qui gouverne la production du facteur diffusible DSF et de xanthane chez *X. campestris* pv. *campestris* (Poplawsky *et al.*, 1998; Dow *et al.*, 2003; Fouhy *et al.*, 2006).

La démarche adoptée afin de détecter ces cibles chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R est la même que celle adoptée pour la détection des gènes *hrp* et *avr* (partie 1) et des gènes codant des adhésines (article 2). Ainsi, l'alignement de séquences publiées chez différentes bactéries du genre *Xanthomonas* de *fliN*, de l'*orf3* du cluster *pig* et de *rpfB* a permis de dessiner des couples d'amorces sens et anti-sens dans les zones conservées (tableau 6). Ces amorces ont permis d'amplifier par PCR, des séquences de la taille attendue respectivement 353, 264 et 467 pb pour des homologues de *fliN*, de l'*orf3* du cluster *pig* et de *rpfB* chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R.

Le séquençage des inserts servant à la recombinaison homologue lors de la mutagenèse dirigée a permis de vérifier l'identité de chacun des gènes mutés. Les fragments de *fliN*, de l'*orf3* du cluster *pig* et de *rpfB* de *X. fuscans* subsp. *fuscans* présentent une très forte homologie nucléotidique avec leurs homologues chez *X. citri* subsp. *citri* et *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (respectivement 98, 99, 98% et 98, 94, 98%) (tableau 7). Cette homologie est plus faible pour une espèce plus éloignée phylogénétiquement comme *X. campestris* pv. *campestris* avec des valeurs respectivement de 92, 82 et 87%.

2.2.2 Vérification des constructions des mutants

Les constructions des mutants 4834FLIN, 4834ORF3, et 4834RPF3 ont été vérifiées selon la démarche en quatre étapes décrite dans la partie 1 des résultats. L'intégration du plasmide pVO155+insert chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R a été confirmée par PCR et par Southern blot. Ceci nous a permis de vérifier que la mutation correspondait dans tous les cas, à l'insertion unique et dans sa totalité du plasmide pVO155 dans le génome de *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R. Après 5 jours de croissance (succession de plus de 50 générations), les tailles des populations dénombrées sur milieu sélectif pour les mutants 4834FLIN et 4834RPF3 ne sont pas significativement différentes des tailles des populations dénombrées sur milieu non-sélectif ($p > 0,05$). Dans le cas du mutant 4834ORF3, la taille des populations est significativement mais très faiblement supérieure sur milieu sélectif ($p < 0,05$) (tableau 8). Ce résultat indique qu'en l'absence de pression de sélection, la résistance à la kanamycine est maintenue, mais que la pression de sélection permet un meilleur recouvrement des populations. Les mutations sont donc stables *in vitro*. La croissance *in vitro* des souches de *X. fuscans* subsp. *fuscans* mutées dans les gènes *fliN*,

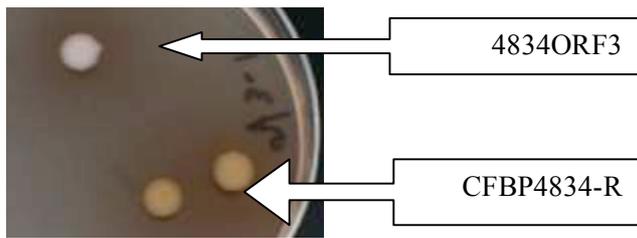


Figure 8 : Photographie de colonies des souches CFBP4834-R et du mutant 4834ORF3 sur TSA 10%. La mutation d'un gène du cluster *pig* : *orf3*, entraîne l'absence de pigmentation jaune (xanthomonadine) chez le mutant 4834ORF3.

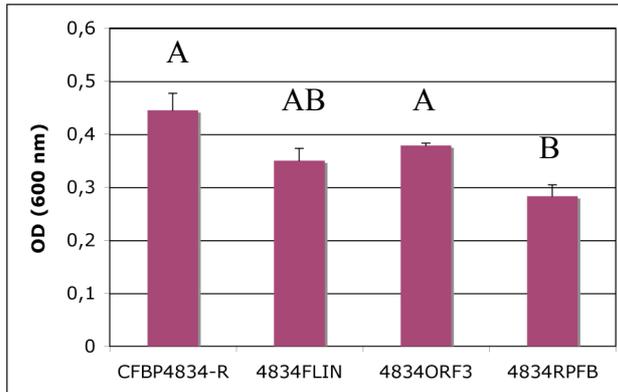


Figure 9 : Capacité d'adhésion de CFBP4834-R et 4834FLIN au polypropylène. Quantification des cellules adhérentes aux plaques de polypropylène par dosage au spectrophotomètre du crystal violet incorporé. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

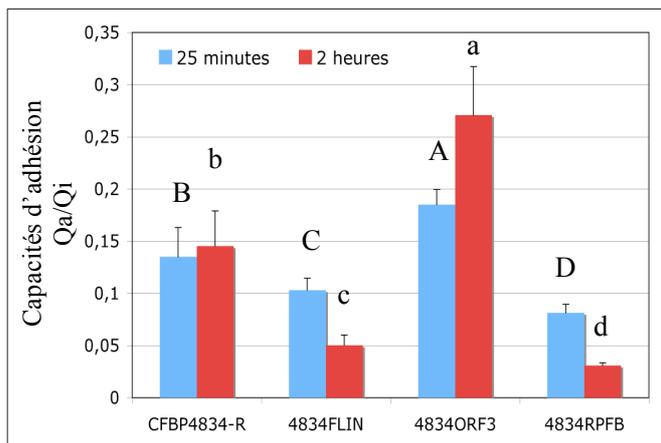


Figure 10 : Capacités d'adhésion des bactéries aux graines de haricot. Rapport entre la quantité de bactéries ayant adhéré aux graines (Q_a) et la quantité de bactéries initialement apportée par l'inoculum (Q_i). Le rapport est calculé après un temps court (25 minutes) ou plus long (2 heures) de contact entre l'inoculum et les graines. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Pour chaque temps de contact, des lettres différentes indiquent des valeurs significativement ($p < 0.05$) différentes sur la base du test non-paramétrique Mann-Whitney.

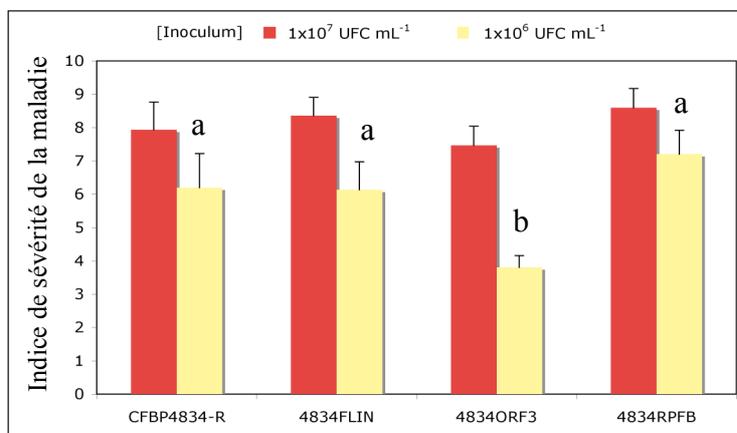


Figure 11 : Notes moyennes de sévérité de la graine commune du haricot 11 jours après l'inoculation par immersion de la première feuille trifoliolée de cinq plantes dans des inoculums de CFBP4834-R et de trois mutants titrant à 1×10^7 ou 1×10^6 UFC mL⁻¹ selon l'échelle de notation : pas de symptôme = 1; 1 à 20 spots = 3; 21 à 40 spots = 6; > 41 spots = 9; mort de la feuille = 11. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard.

orf3 du cluster *pig* et *rpfB* en milieu appauvri est similaire à celle de la souche sauvage CFBP4834-R, pendant 48 h (figure 7). La phase de latence de ces mutants ainsi que de la souche sauvage dure 6 h. La phase stationnaire est atteinte en moyenne 18 h après le début de l'expérimentation. Ces mutants ne sont donc pas affectés dans leur croissance *in vitro*.

Au niveau phénotypique il n'a pas été possible de mettre en évidence *in vitro* de différence de mobilité entre le parent sauvage et la souche 4834FLIN, mutée dans le gène *fliN*. Dans les différents milieux testés : milieu gélosé standard (100% TSA), milieu minimum (MME, Arlat *et al.*, 1991) milieu dit *hrp*-inducteur (XVM2, Wengelnik et Bonas, 1996) associés à différentes concentrations de Bacto Agar (0,2%, 0,4%, 1% et 2%), le parent sauvage et le mutant 4834FLIN étaient peu ou pas mobiles. La mutation de l'*orf3* du cluster *pig* se traduit par contre, comme attendu (Goel *et al.*, 2002), par la perte de la production de xanthomonadine observable visuellement par l'absence de coloration jaune caractéristique (figure 8). Une moindre production d'exopolysaccharides pour la souche 4834RPFB par rapport au parent sauvage est également observable en culture sur milieu gélosé.

2.3 Impact de mutations dans les systèmes flagellaire, *pig* et *rpf* lors de la colonisation de l'hôte par *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R

2.3.1 Capacités d'adhésion aux surfaces biotiques et abiotiques

L'adhésion des bactéries aux plaques de polypropylène est mesurée par la quantification au spectrophotomètre du crystal violet incorporé dans les cellules adhérentes (figure 9). Par rapport au parent sauvage, les mutants 4834FLIN et 4834ORF3 ne sont pas altérés dans leur capacité à adhérer au polypropylène contrairement au mutant 4834RPFB.

L'attachement des bactéries aux graines de haricot après un temps de contact entre graines et inoculum court (25 minutes) ou plus long (2 heures) démontre à nouveau que le mutant 4834RPFB est le plus altéré dans sa capacité à adhérer aux surfaces (figure 10). Le mutant 4834ORF3 présente un rapport entre les bactéries accrochées aux graines et les bactéries apportées par l'inoculum supérieur à celui de la souche sauvage. Les capacités d'adhésion aux semences de ce mutant sont supérieures à celles de *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R. Le mutant 4834FLIN est quant à lui légèrement affecté dans sa capacité à adhérer aux graines par rapport à la souche sauvage *X. fuscans* subsp. *fuscans*

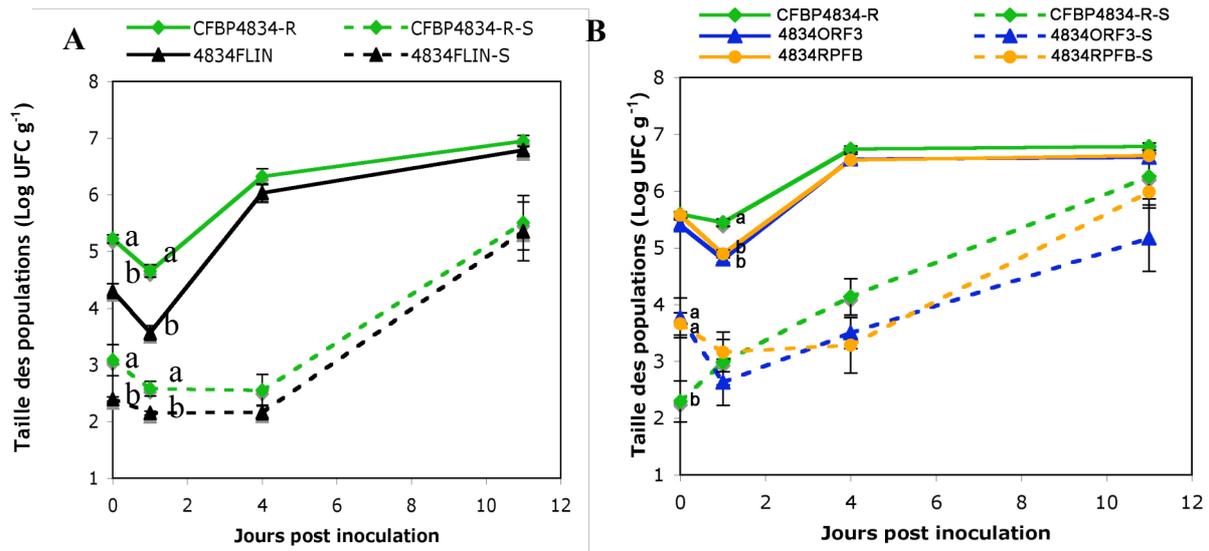


Figure 12 : Dynamique des tailles des populations de la souche sauvage et du mutant 4834FLIN (A) ainsi que les mutants 4834ORF3 et 4834RPFB (B) sur la première feuille trifoliolée du haricot. Les populations totales sont quantifiées après broyage des feuilles pendant 2 min (traits pleins) et après stérilisation de la surface foliaire aux vapeurs de chloroforme (trait pointillés). A chaque prélèvement, cinq échantillons sont analysés. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard.

Tableau 9 : Tailles moyennes des populations solitaires et agrégées après inoculation de la première feuille trifoliolée du haricot pour les souches CFBP4834-R et 4834FLIN (A) et pour les souches CFBP4834-R, 4834ORF3 et 4834RPFB (B). A chaque prélèvement, cinq échantillons sont analysés.

(A) Souches testées	Taille moyenne des populations solitaires (Log UFC g ⁻¹) (SEM)		Taille moyenne des populations agrégées (Log UFC g ⁻¹) (SEM)	
	4 jours après inoculation	11 jours après inoculation	4 jours après inoculation	11 jours après inoculation
CFBP4834-R	5,99 (0,11)	8,34 (0,15)	3,74 (0,20)	4,81 (0,28)
4834FLIN	5,16 (0,37)	6,78 (0,41)	3,70 (0,54)	4,38 (0,24)

(B) Souches testées	Taille moyenne des populations solitaires (Log UFC g ⁻¹) (SEM)		Taille moyenne des populations agrégées (Log UFC g ⁻¹) (SEM)	
	4 jours après inoculation	11 jours après inoculation	4 jours après inoculation	11 jours après inoculation
CFBP4834-R	6,94 (0,1)	7,07 (0,2)	4,24 (0,3)	5,41 (1,04)
4834ORF3	6,76 (0,3)	6,79 (0,4)	4,23 (0,54)	4,81 (0,61)
4834RPFB	6,58 (0,1)	7,20 (0,3)	4,36 (0,66)	5,68 (0,91)

CFBP4834-R. Un temps de contact long entre bactéries et graines accentue les différences observées après un temps de contact plus court (figure 10).

2.3.2 Pouvoir pathogène sur haricot

Onze jours après l'inoculation, l'ensemble des plantes inoculées avec les mutants 4834FLI, 4834ORF3 et 4834RPFB ainsi que la souche sauvage *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R présente des symptômes caractéristiques de la gousse commune du haricot pour les deux concentrations testées. Les plantes inoculées avec de l'eau distillée stérile (témoin négatif) ne présentent aucun symptôme. Alors qu'une forte concentration d'inoculum (1×10^7 UFC mL⁻¹) ne permet pas de distinguer de différences d'agressivité entre les différentes souches testées, un inoculum plus faible (1×10^6 UFC mL⁻¹) montre que le mutant 4834ORF3 est significativement ($p < 0,05$) altéré dans son pouvoir pathogène sur haricot. (figure 11).

2.3.3 Colonisation de la phyllosphère

Dans la phase d'installation dans la phyllosphère (dans les 24 h suivant l'inoculation), les tailles des populations totales du parent sauvage sont significativement supérieures à celle des trois mutants testés (figure 12). Par la suite, les tailles des populations du parent CFBP4834-R et des mutants sont similaires. L'adaptation des bactéries est suivie d'une phase de croissance exponentielle jusqu'au 4^{ème} jour après inoculation, où débute la phase stationnaire. La stérilisation de la surface foliaire par des vapeurs de chloroforme montre que les populations de CFBP4834-R et des mutants sont peu agrégées ou peu internalisées pendant les quatre premiers jours qui suivent l'inoculation (figure 12). Ensuite, les différences des tailles de populations entre feuilles stérilisées et non-stérilisées diminuent montrant que les populations bactériennes deviennent moins accessibles au stérilisant soit parce qu'elles sont agrégées soit parce qu'elles sont internalisées.

Afin de déterminer l'organisation des populations épiphytes, la technique mise au point par Morris *et al.* (1998) et modifiée par Jacques *et al.* (2005) a été utilisée. Les populations épiphytes sont organisées en populations solitaires (ou planctoniques) et agrégées en structures de type biofilm (tableau 9). Les tailles des populations agrégées en structure de type biofilm augmentent au cours du temps de façon similaire pour le parent et les mutants. Les tailles des populations solitaires augmentent entre le 4^{ème} jour et le 11^{ème} jour. Au 4^{ème} jour ainsi qu'au 11^{ème} jour les tailles des populations solitaires sont supérieures aux tailles des populations agrégées pour les souches étudiées.

Tableau 10 : Tailles des populations et fréquences de contamination des semences du haricot par les souches *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R et les mutant 4834FLIN, 4834ORF3 et 4834RPFB.

Souches	Moyennes des tailles des populations (Log CFU g ⁻¹) (SEM)	Nombre de plantes dont les graines sont contaminées
CFBP4834-R	3,39 (0,53)	21/30
4834FLIN	3,42 (0,43)	27/30
4834ORF3	3,58 (0,62)	15/30
4834RPFB	3,79 (0,55)	17/30

2.3.4 Transmission des bactéries aux semences

La capacité des souches à se transmettre aux graines du haricot sur le porte-graine est évaluée par dénombrement des populations sur l'ensemble des graines récoltées à maturité plante à plante sur 30 plantes. Le mutant 4834ORF3 et dans une moindre mesure le mutant 4834RPFB se transmettent moins fréquemment aux graines de haricot que la souche sauvage et le mutant 4834FLIN bien que cette différence ne soit pas significative (tableau 10). Aucune différence significative n'est observée entre les tailles des populations des mutants et de la souche sauvage dans les lots de semences contaminés.

2.4 Discussion et conclusion

Une fois la construction des mutants validée, l'étude *in vitro* des dynamiques des tailles des populations des souches mutées dans *fliN*, *l'orf3* du cluster *pig* et *rpfB* a permis de montrer que, conformément à ce qui était attendu, ces mutants ont un comportement similaire à celui de la souche sauvage *in vitro*. De plus, l'absence d'événements de réversion *in vitro* de ces mutants confirme la stabilité de la construction. Il est à noter, toutefois, que le phénotype attendu pour le mutant 4834FLIN : perte de mobilité flagellaire n'a pu être observé. Il serait important de confirmer, comme cela a été fait pour les souches mutées dans les gènes codant des adhésines, qu'aucun ARNm n'est transcrit à partir du gène muté *fliN*.

Contrairement à ce qui a été montré pour d'autres pathogènes bactériens la mutation d'un gène du cluster *fli* impliqué dans la mobilité flagellaire ne se traduit pas par un coût de fitness notable pour *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R. Ainsi, les souches non-mobiles car mutées dans le gène *fliC* de *Erwinia amylovora*, *P. phaseolicola* et *P. fluorescens*, présentent une survie épiphyte réduite et une capacité réduite à causer l'infection (Tans-Kerten *et al.*, 2001; Capdevila *et al.*, 2004). Malgré l'utilisation de différents couples d'amorces et de différentes conditions d'amplifications par PCR, le gène *fliC* n'a pas pu être amplifié chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R. La souche 4834FLIN de *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R muté dans le gène *fliN* est très peu affectée dans sa capacité à adhérer aux surfaces biotiques et abiotiques. Elle provoque autant de symptômes que la souche sauvage quelle que soit la concentration de l'inoculum. Lors de la colonisation de la phyllosphère, le mutant semble légèrement affecté dans sa phase d'installation sur sa plante hôte, mais ce retard est compensé très rapidement. Finalement, ce mutant est également capable de se transmettre plus fréquemment que la souche sauvage aux graines de haricot.

Les mutants de *X. oryzae* pv. *oryzae* dans l'*orf3* du cluster *pig* sont caractérisés par une absence de pigmentation. En effet, l'*orf3* du cluster *pig* est impliqué dans la synthèse de la xanthomonadine, pigment spécifique des *Xanthomonas*, de couleur jaune (Goel *et al.*, 2002) et la synthèse d'EPS (ou xanthane) via un facteur diffusible : DF (Diffusible Factor) (Poplawsky et Chun, 1998; Poplawsky *et al.*, 1998). Le mutant 4834ORF3 obtenu chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* présente également une absence de pigmentation mettant en évidence le rôle de ce gène dans la synthèse de xanthomonadine chez *X. fuscans* subsp. *fuscans*.

Le mutant 4834ORF3 est altéré dans ses capacités de colonisation du haricot. Il est affecté dans sa capacité à provoquer des symptômes en présence d'un inoculum peu concentré, ces différences disparaissent avec une concentration d'inoculation plus élevée. Ce mutant est également affecté lors de la phase d'installation sur sa plante hôte et se transmet moins efficacement que la souche sauvage aux graines de haricot. Néanmoins un tel mutant possède une capacité d'adhérer aux surfaces biotique et abiotique égale voir supérieure à la souche sauvage.

Le gène *rpfB* est impliqué chez *X. campestris* pv. *campestris* dans la synthèse du facteur diffusible DSF (Diffusible Signaling Factor) régulant la production de xanthane et d'enzymes extracellulaires (Poplawsky *et al.*, 1998; Dow *et al.*, 2003). Le mutant 4834RPFB de *X. fuscans* subsp. *fuscans* est apparu très affecté dans sa capacité à adhérer aux surfaces, mécanisme essentiel dans la formation des biofilms. Les mutants *rpfB* de *X. campestris* pv. *campestris* sont caractérisés principalement par leur incapacité à former des biofilms (Newman *et al.*, 2004). Le pouvoir pathogène de 4834RPFB n'est pas altéré par rapport à celui de son parent mais il est affecté dans sa phase d'installation lors de la colonisation de la phyllosphère. Enfin, le mutant 4834RPFB se transmet moins fréquemment que la souche sauvage aux graines du haricot. Les effets de mutations dans les gènes du cluster *rpf* sur le pouvoir pathogène semblent très variables selon les espèces bactériennes et les gènes considérés. Chez *X. campestris* pv. *campestris* 8004 des mutants dans le gène *rpfE* provoquent moins de symptômes sur navet que la souche sauvage (Dow *et al.*, 2000). Au contraire, les mutants *rpfF* construits chez *X. fastidiosa*, agent pathogène de la vigne, sont caractérisés par une hypervirulence sur plante hôte se traduisant par l'apparition de symptômes significativement plus précoces et plus importants que ceux provoqués par la souche sauvage de *X. fastidiosa* (Newman *et al.*, 2004). En outre, chez *X. campestris* pv. *campestris*, les souches mutées dans le gène *rpfF* montrent une diminution importante de la virulence (Dow *et al.*, 2003).

La mutation de l'orf3 du cluster *pig* chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* ne semble pas altérer de façon durable sa capacité à coloniser la phyllosphère du haricot. Ceci diffère des résultats obtenus chez *X. campestris* pv. *campestris* chez qui la mutation de ce gène diminue la survie épiphyte sur plante hôte (Poplawsky et Chun, 1998; Poplawsky *et al.*, 2000). Cette diminution de la survie épiphyte a pour principale origine l'incapacité des souches mutées dans le cluster *pig* à synthétiser la xanthomonadine et donc à se protéger des dommages dus aux UV. Le spectre des lampes utilisées dans les chambres de culture est adapté pour un développement optimal du haricot mais n'est peut-être pas suffisant pour être létal sur une fraction élevée de la population de la souche 4834ORF3. L'absence de conséquences des mutations dans les gènes des clusters *pig* et *rpf* sur la survie épiphyte de *X. fuscans* subsp. *fuscans* pourrait être, *a contrario*, expliquée par la capacité des souches mutées à mettre en place des stratégies d'évitement leur permettant de s'adapter aux conditions environnementales (Beattie et Lindow, 1999). Il pourrait s'agir, par exemple, d'une internalisation dans des sites protégés de type cavité stomatique. Cette hypothèse est cohérente avec les résultats obtenus lors de la stérilisation de la surface foliaire par des vapeurs de chloroforme. Il apparaît 11 jours après l'inoculation, que les populations bactériennes ne sont plus sensibles à la stérilisation ce qui traduit soit leur agrégation en biofilms soit leur internalisation.

La capacité des mutants *pig* et *rpf* de *X. fuscans* subsp. *fuscans* à former des biofilms *in vivo* ne serait pas altérée. En effet, la dynamique des tailles des populations solitaires et agrégées en biofilm est identique chez les souches mutées dans l'orf3 du cluster *pig*, *rpfB* et la souche sauvage CFBP4834-R. De plus, la taille des populations agrégées est stable au cours du temps chez toutes les souches testées, ce qui correspond aux résultats déjà observés chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* (Jacques *et al.*, 2005). Les clusters *pig* et *rpf* étant tout deux impliqués dans la synthèse du xanthane, une mutation par insertion dans un gène d'un seul de ces clusters pourrait donc ne pas empêcher complètement la synthèse de xanthane et la formation de biofilms.

Partie 3

Processus de colonisation des plantules de haricot, à partir de graines contaminées, par des bactéries pathogènes des plantes ou non pathogènes

Nous avons élucidé dans les deux parties précédentes le rôle de certains mécanismes dans la colonisation de la phyllosphère pour l'établissement d'un inoculum permettant sa dispersion et *in fine* la transmission des bactéries à la graine. Dans le cas des bactéries transmises par les semences, la contamination de la plantule à partir de la graine contaminée représente également une étape clé, point de départ de la colonisation de l'hôte.

Les semences représentent un habitat de survie et une importante réserve nutritive pour les bactéries phytopathogènes (Gambodji, 1983; Gitaitis et Walcott, 2007). La survie et la multiplication de l'agent pathogène sont intimement liées à la survie de la semence et à son environnement proche, la spermosphère. Quelle est la nature des relations entre les bactéries et la semence lors des premières étapes de la germination, avant l'émergence des feuilles vraies ? Nous avons vu précédemment que lors de la colonisation de la phyllosphère et pour une voie au moins de transmission à la graine, une interaction étroite s'établit précocement, et indépendamment de la survenue des symptômes, entre une bactérie phytopathogène et une plante. Nous avons voulu vérifier si de telles interactions se mettaient en place lors de la germination et de la colonisation de la plantule entre l'agent pathogène et son hôte sensible.

Nous avons couplé une étude populationnelle à une analyse des réactions de défense de la plante par la quantification des activités peroxydase et glucanase lors de la germination et du développement des plantules après l'inoculation par infiltration des graines de haricot avec les différents organismes de référence et quelques mutants du SST3. L'étude populationnelle a été engagée dès le début de ma thèse et menée en parallèle des deux autres pendant la première année. Les premiers résultats obtenus ne montraient pas de mise en place d'interactions entre les deux partenaires. Aussi, les efforts se sont concentrés sur les deux autres parties de la thèse. Finalement, le souhait de valoriser ces premiers résultats nous a conduit à reprendre cette étude et à la compléter par l'étude des réactions de défense de la plante.

Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article qui sera amendé et complété avant d'être soumis pour publication dans une revue du type « Molecular Plant-Microbe interactions » dont nous avons suivi les recommandations aux auteurs.

Partie 3

Processus de colonisation des plantules de haricot, à partir de graines contaminées, par des bactéries pathogènes des plantes ou non pathogènes

Nous avons élucidé dans les deux parties précédentes le rôle de certains mécanismes dans la colonisation de la phyllosphère pour l'établissement d'un inoculum permettant sa dispersion et *in fine* la transmission des bactéries à la graine. Dans le cas des bactéries transmises par les semences, la contamination de la plantule à partir de la graine contaminée représente également une étape clé, point de départ de la colonisation de l'hôte.

Les semences représentent un habitat de survie et une importante réserve nutritive pour les bactéries phytopathogènes (Gambodji, 1983; Gitaitis et Walcott, 2007). La survie et la multiplication de l'agent pathogène sont intimement liées à la survie de la semence et à son environnement proche, la spermosphère. Quelle est la nature des relations entre les bactéries et la semence lors des premières étapes de la germination, avant l'émergence des feuilles vraies ? Nous avons vu précédemment que lors de la colonisation de la phyllosphère et pour une voie au moins de transmission à la graine, une interaction étroite s'établit précocement, et indépendamment de la survenue des symptômes, entre une bactérie phytopathogène et une plante. Nous avons voulu vérifier si de telles interactions se mettaient en place lors de la germination et de la colonisation de la plantule entre l'agent pathogène et son hôte sensible.

Nous avons couplé une étude populationnelle à une analyse des réactions de défense de la plante par la quantification des activités peroxydase et glucanase lors de la germination et du développement des plantules après l'inoculation par infiltration des graines de haricot avec les différents organismes de référence et quelques mutants du SST3. L'étude populationnelle a été engagée dès le début de ma thèse et menée en parallèle des deux autres pendant la première année. Les premiers résultats obtenus ne montraient pas de mise en place d'interactions entre les deux partenaires. Aussi, les efforts se sont concentrés sur les deux autres parties de la thèse. Finalement, le souhait de valoriser ces premiers résultats nous a conduit à reprendre cette étude et à la compléter par l'étude des réactions de défense de la plante.

Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article qui sera amendé et complété avant d'être soumis pour publication dans une revue du type « Molecular Plant-Microbe interactions » dont nous avons suivi les recommandations aux auteurs.

1. Early colonization process of bean seedlings by plant pathogenic and non-pathogenic bacteria

A. Darrasse , A. Darsonval, C. Bureau, M.-N. Brisset, T. Boureau and M.-A. Jacques*

Authors' affiliations: UMR077 PaVé, INRA, 42, rue George Morel, F-49071 Beaucouzé, France

Correspondent footnote: Mailing address: UMR077 PaVé, INRA, 42, rue George Morel, BP 60057, F-49071 Beaucouzé cedex, France Phone: (33)-241-22-57-07. Fax: (33)-241-22-57-05. Email: Marie-Agnes.Jacques@angers.inra.fr

1.1 Abstract

Understanding the forces underlying the different steps of the epidemiological cycle is of great interest to control plant diseases. In order to characterize colonization process of seedlings by seedborne bacteria, we analyzed dynamics of bacterial population sizes and induction of bean defense reactions for *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* (compatible interaction) and its mutants in *hrp* genes, *X. campestris* pv. *campestris* (incompatible interaction) and *Escherichia coli* (null interaction). Until 14 days after germination, every type of bacterium was able to multiply on bean seedlings. No defense responses were induced either in the incompatible interaction during seedling colonization or in other situations as indicated by pathogenesis-related (PR) proteins, peroxidase (POX; EC 1.11.1.7) and β -1-3-glucanase (GLU; EC 3.2.1.6) activities. However as from 14 days after germination, differences appeared in primary leaves: only *X. fuscans* subsp. *fuscans* reached high population sizes ($> 10^8$ CFU/ml) and POX activity increased after inoculation with *X. campestris* pv. *campestris*. These results indicated that colonization of seedlings mostly relies on saprophytism and that specific interactions develop later on during phyllosphere colonization.

Keywords: Non-host resistance, Type Three Secretion System (TTSS), *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* variant *fuscans*, common bacterial blight

1.2 Introduction

Interactions between bacteria and plants leading to disease (basic compatibility; Lindgren et al. 1986) are specific and rare events. Indeed plants have developed a lot of defense strategies against pathogens, including non-host resistance (basic incompatibility; Nürnberger and Lipka 2005). In addition to preformed physical or chemical barriers, plant immune system is based on recognition of pathogen associated molecular patterns (PAMPs) that activates defense responses (Nürnberger and Lipka 2005; Jones and Dangl 2006). Several PAMPs of phytopathogenic bacteria have been evidenced like flagellin, LPS, elongation factor (EF-Tu) or harpin (HrpZ) (Gomez-Gomez and Boller 2002; Mishina and Zeier 2007; Nürnberger and Lipka 2005). In response to PAMPs, plants produce various reactive oxygen species, phytoalexins, pathogenesis-related (PR) proteins, cell wall reinforcements and express hypersensitive response, programmed cell death and systemic acquired resistance (SAR) (Nürnberger and Lipka 2005; Mishina and Zeier 2007).

Most of gram negative plant pathogenic bacteria possess a type III secretion system (TTSS) that is necessary for bacterial multiplication in host tissue and for expression of disease symptoms in a compatible interaction (Lindgren et al. 1986). The TTSS allows the delivery of effectors directly in the plant host cytoplasm as it functions as an injectisome anchored in bacterial cell membranes bridged *via* the pilus and the translocon in host cell cytoplasm. Effectors lead to symptom development in compatible interaction (Mudgett 2005; Gürlebeck et al. 2006) as demonstrated for PthA in the development of citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Brunnings and Gabriel 2003). Moreover, some TTSS effectors are likely to contribute to suppress defense reactions of the plant (Jones and Dangl 2006) like for example AvrPto of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in *Arabidopsis thaliana* (Nomura et al. 2005).

Some determinants of bacterial colonization of host phyllosphere prior to -or independent of symptom development have been elucidated; few information is however available for germinating seeds and seedlings. During phyllosphere colonization, TTSS effectors of *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (AvrBS1 to 4) play a key role in epiphytic fitness and bacterial transmission in field (Wichman and Bergelson 2004). TTSS is necessary for colonization of the bean phyllosphere by *P. syringae* pv. *syringae* (Hirano et al. 1999) and by *X. fuscans* subsp. *fuscans* (Darsonval et al. submitted a) but not for its survival (Darsonval et al. submitted a). Pathogenic bacteria have also developed lots of strategies of protection against environmental stresses and lack of nutrients (Beattie and Lindow 1995; Danhorn and Fuqua 2007, Jacques et al. 2005). Germinating seeds release abundant nutrients in the spermosphere that allow the diverse microbial community to multiply

(Nelson 2004). The composition of seed exudates can influence growth dynamics of microorganisms (Nelson 2004) and some tomato genotypes support or not *Bacillus cereus* growth after seed inoculation (Simon et al. 2001). Hirano et al. (1999) reported similar dynamics of population sizes for wild-type *P. syringae* pv. *syringae* and its *hrp* mutants in bean germinating seeds and seedlings in field. Several bacterial determinants important for seedling colonization have been identified in plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs): different membrane and surface proteins of *P. putida* are involved in its attachment to seeds; *P. fluorescens* genes implied in nutrient acquisition, especially utilization of organic acids, are specifically expressed in the rhizosphere (Bloemberg and Lugtenberg 2001).

X. fuscans subsp. *fuscans* (Schaad et al. 2005), formerly *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Vauterin et al. 1995; 2000) is a seedborne bacterium responsible for common bacterial blight of bean (Vidaver 1993). At germination time, seedborne *X. fuscans* subsp. *fuscans* colonizes seedlings and this contamination requires a threshold of *X. fuscans* subsp. *fuscans* population sizes of 10^2 to 10^3 CFU/seed to succeed (Weller and Seattler 1980; Darrasse et al. 2007). The pathogen multiplies in the phyllosphere and colonizes both endo- and epiphytic compartments of the plant (Jacques et al. 2005; Weller and Seattler 1980; Darsonval et al. submitted a). In the phyllosphere *X. fuscans* subsp. *fuscans* is able to aggregate in biofilms that protect it against environmental stresses and constitute a reservoir of inoculum (Jacques et al. 2005). Asymptomatic colonization of the bean phyllosphere by *X. fuscans* subsp. *fuscans* is frequent under temperate climate, often because of low relative humidity that does not favor bacterial multiplication (Jacques et al. 2005; Darrasse et al. 2007). Under these conditions of low RH and with a low seedborne inoculum (under 10^6 CFU/g of fresh weight) *X. fuscans* subsp. *fuscans* is able to colonize its host and transmit to seeds in the absence of symptoms during the entire growing season of bean (Darrasse et al. 2007). Vascular contamination of seeds and bacterial multiplication in the phyllosphere are dependant on a functional TTSS. However a residual contamination of bean seeds occurring by the floral pathway remains possible for *X. fuscans* subsp. *fuscans* mutants altered in TTSS (Darsonval et al. submitted a). Master regulator of the TTSS, HrpG, is involved in *X. fuscans* subsp. *fuscans* survival in the phyllosphere indicating that HrpG-regulated genes are involved in phyllospheric bacterial survival. Furthermore a mutant of *X. fuscans* subsp. *fuscans* in type IV pilus is impaired in its transmission and in its attachment to bean seeds like several other mutants in genes coding non-fimbrial adhesins (Darsonval et al. b).

In this paper we aimed to understand colonization process of germinating bean seeds and seedlings by *X. fuscans* subsp. *fuscans*. We compared dynamics of bacterial

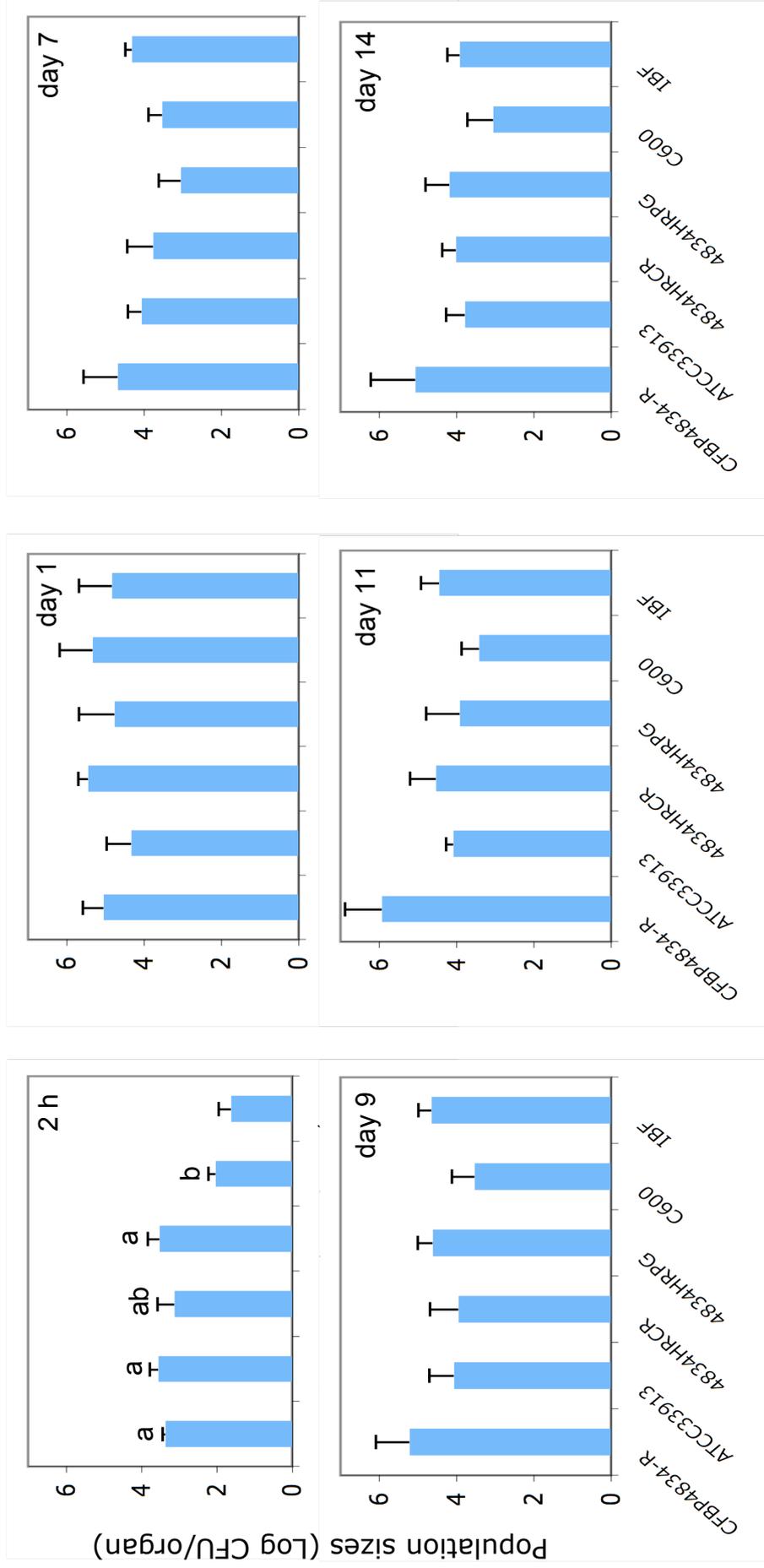


Fig. 1. Bacterial population sizes on bean seedlings after inoculation with different strains. Population sizes were determined on bean seeds and seedlings sampled 2 h, 1, 7, 9, 11 and 14 days after vacuum infiltration of seeds with 1×10^6 CFU/ml suspensions of *X. fuscans* subsp. *fuscans* strains CFBP4834-R, 4834HRCR and 4834HRPG, *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 and *E. coli* C600. Population sizes of indigenous bacterial flora (IBF) were quantified at each sampling date. Mean and SEM were calculated on four repeats. Every repeat was performed with five individuals per sampling date and per treatment. Mean population sizes followed by different letters are significantly ($p < 0.05$) different on the basis of Mann-Whitney test.

population sizes in regard to plant defense reactions developed by the plant during compatible, incompatible and null interactions. Role of TTSS in seedling colonization was examined with the use of mutants in several *hrp* genes and adhesin coding genes previously constructed (Darsonval et al. a and b).

1.3 Results

Bacterial multiplication in the spermosphere depends mainly on saprophytism and does not require TTSS. In order to characterize bacterial molecular determinants of bean seedling colonization, we first determined the colonization behavior of bacteria by their dynamics of bacterial population sizes in compatible (*X. fuscans* subsp. *fuscans* on bean), incompatible (*X. campestris* pv. *campestris* on bean) and null (*Escherichia coli* on bean) interactions. Seeds were inoculated with 1×10^5 CFU/ml inoculum, and two hours later population sizes of the different strains were similar, except those of *E. coli* C600 that were significantly ($p < 0.01$) lower than the others (Fig. 1). Until 14 days after germination, strain CFBP4834-R of *X. fuscans* subsp. *fuscans* did not multiply significantly ($p > 0.05$) better than strain ATCC33913 on bean seedlings (Fig. 1). Surprisingly, multiplication of *E. coli* C600 allowed it to reach population sizes similar to those of *X. fuscans* subsp. *fuscans* and *X. campestris* pv. *campestris* during that time lapse. These behaviors were repeatedly monitored and similar results were also obtained when seeds were inoculated with higher inoculum concentrations (data not shown).

Behavior of strains of *X. fuscans* subsp. *fuscans* mutated in *hrp* genes was also studied. At any time until 14 days after germination, their population sizes were not significantly different ($p > 0.05$) from those of the wild-type CFBP4834-R on bean seedlings (Fig. 1).

Measurements of enzymatic activities reveal that defense responses are not induced in seedlings whatever the type of interaction. In order to verify if the previously observed similar dynamics of population sizes of the different bacterial strains on seedlings were correlated with a lack of defense responses of the plant at this phenological stage, we compared enzymatic activity of two pathogenesis-related (PR) proteins, peroxidase (POX; EC 1.11.1.7) and β -1-3-glucanase (GLU; EC 3.2.1.6), in seedlings. Seeds were inoculated with 1×10^7 CFU/ml *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R, *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 and *E. coli* C600. Mutants (4834HRCR, 4834HRPG and 33913HRCU) of *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R and *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 in

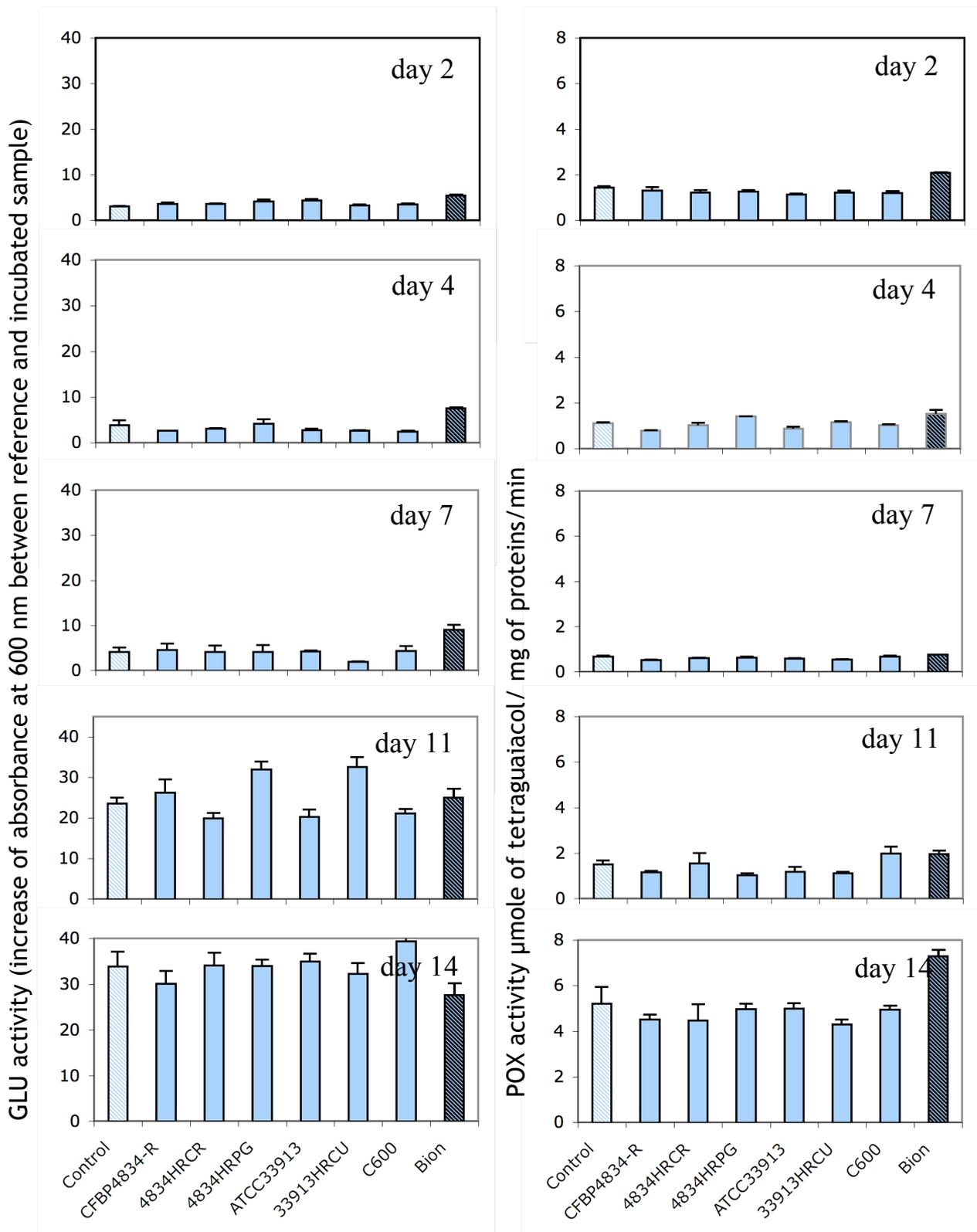


Fig. 2. β -1,3-glucanase (GLU) and peroxidase (POX) activities in protein extracts from bean seedlings and primary leaves after seed infiltration at day 0 with different bacterial strains. Seeds were vacuum infiltrated with distilled water (control), with 1×10^7 CFU/ml inoculums of *X. fuscans* subsp. *fuscans* strains CFBP4834-R, 4834HRCR and 4834HRPG, *X. campestris* pv. *campestris* strains ATCC33913,, and 33913HRCU and *E. coli* C600 and with acidbenzolar-S-methyl (Bion, 40 mg/l) as a positive control. Means and SEM were calculated on two repeats. Each repeat contained two replicates of bulks of 3 to 8 seedlings or bulk of fragments of primary leaves from 3 plants per treatment and per sampling date.

hrp regulatory gene (*hrpG*) and in structural genes (*hrcR* and *hrcU*) were added as were the two controls: acibenzolar-S-methyl and water. No significant ($p>0.05$) differences in POX and GLU activities were observed in seedlings among samples treated with different strains until 14 days after germination (Fig. 2).

When leaves of two weeks-old plants were infiltrated with the different treatments, POX activity, detected two days later, was significantly higher ($p<0.01$) for plants in an incompatible interaction, i.e. faced to *X. campestris* pv. *campestris* than in a compatible interaction i.e. faced to *X. fuscans* subsp. *fuscans* (Fig. 3). In these conditions POX activities of plants inoculated with mutants of *X. campestris* pv. *campestris* and *X. fuscans* subsp. *fuscans* in *hrp* genes were not significantly different ($p>0.05$) from POX activities after inoculation with their respective wild type strains (Fig. 3).

***E. coli* C600 is impaired in its adhesion capacities on bean seeds but not on polypropylene.** To understand why *E. coli* C600 was significantly less abundant on seeds than xanthomonads two hours after inoculation, we tested its adhesion capacities on bean seeds in comparison to different bacterial strains. Adhesion capacities tested in seed columns were not significantly different ($p>0.05$) among a set of strains composed of a mutant of *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R, in adhesin gene (4834YAPH2), *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 and *E. coli* C600 (Fig. 4). However, their adhesion capacities were significantly lower ($p<0.05$) than that of *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R. Mutants of *X. fuscans* subsp. *fuscans* in *hrp* genes were more or less impaired in their adhesion capacities on seeds compared to the wild type strain (Fig. 4).

To confirm that this alteration in *E. coli* C600 adhesion capacities observed on bean seeds was not linked to a general lack in adhesion capacities of this strain we tested its adhesion capacities on polypropylene surface with a crystal violet incorporation assay. Strain *E. coli* C600 adhered significantly ($p>0.05$) more on this material than all other tested strains: *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R and its *hrpG*, *hrcR*, *yapH2* mutants (4834HRPG, 4834HRCR and 4834YAPH2), and *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 (Fig. 5). This test confirmed that *E. coli* C600 was not globally deficient in its adhesion capacities.

1.4 Discussion

In this work we showed that bacteria could colonize germinating seeds and seedlings with similar population sizes whatever the interaction they develop: compatible

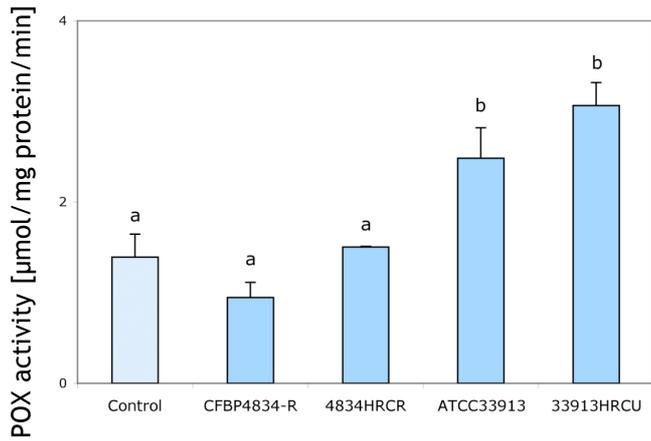


Fig. 3. Peroxidase (POX) activities in protein extracts from bean primary leaves of two weeks-old plants inoculated with different bacterial strains. Inoculums of 1×10^7 CFU/ml of *X. fuscans* subsp. *fuscans* strains CFBP4834-R and 4834HRCR, *X. campestris* pv. *campestris* strains ATCC33913 and 33913HRCU and distilled water as negative control were vacuum infiltrated in primary leaves. POX activities were assayed 2 days after inoculation. Means and SEM were calculated on two repeats. Each repeat contained two replicates of primary leaves per treatment and per sampling date. Means POX activities followed by different letters are significantly ($p < 0.05$) different on the basis of Mann-Whitney test.

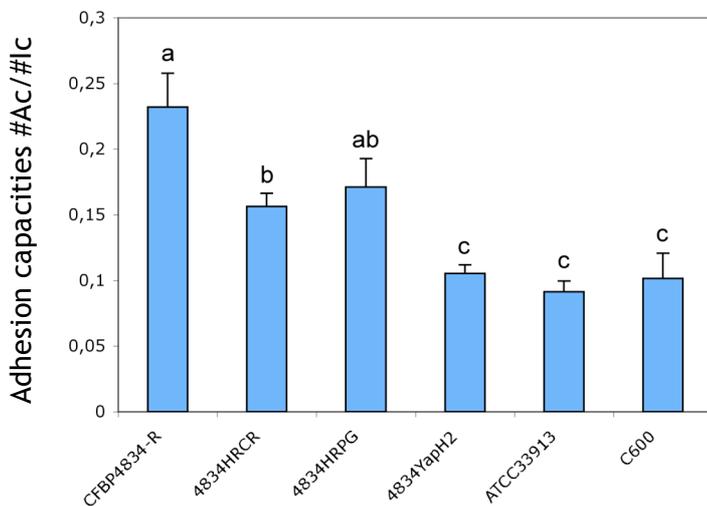


Fig. 4. Adhesion capacities of bacterial strains on bean seeds. *X. fuscans* subsp. *fuscans* strains CFB4834-R, 4834HRCR, 4834HRPG and 4834YAPH2, *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 and *E. coli* C600 suspensions at 1×10^5 CFU/ml were incubated during 2 h with bean seeds. Bars represent the ratio of the number of attached cells on seeds (#Ac) versus the number of inoculated cells (#Ic). Mean and SEM were calculated on three samples per treatment. Mean population sizes followed by different letters are significantly ($p < 0.05$) different on the basis of Mann-Whitney test.

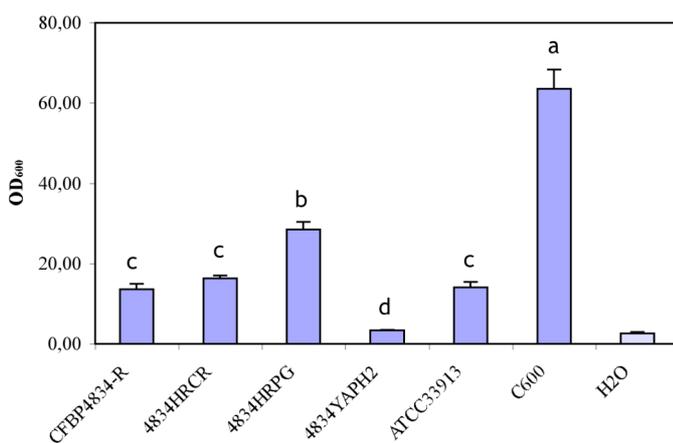


Fig. 5. Adhesion capacities of bacterial strains on polypropylene surface. *X. fuscans* subsp. *fuscans* strains CFB4834-R, 4834HRCR, 4834HRPG and 4834YAPH2, *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 and *E. coli* C600 were cultured three days at 28°C under static conditions in polypropylene microtiter plates from inoculum at 5×10^5 CFU/ml. Crystal violet-stained surface-attached cells were quantified by solubilizing the dye absorbed by adherent cells, after removal of suspensions, in ethanol and determining the optical density at 600 nm. Means and SEM were calculated on 2 independent repeats. Each repeat contained three replicates per treatment. Different letters refers to significantly different values based on a Mann-Whitney test.

(bean faced to *X. fuscans* subsp. *fuscans*), incompatible (bean faced to *X. campestris* pv. *campestris*) or null (bean faced to *E. coli*). This was observed from inoculation time on seeds until seedlings reached the age of 14 days. This apparent absence of molecular dialogue between bacteria and plant seedling was confirmed with the analysis of population sizes of plant pathogenic bacterial mutants in TTSS. This was observed both for mutants in structural and regulatory *hrp* genes of *X. fuscans* subsp. *fuscans* and in structural *hrp* genes of *X. campestris* pv. *campestris*. In a previous work (Darsonval et al. submitted a) we showed that *E. coli* and *X. fuscans* subsp. *fuscans* with a mutation in the regulatory *hrpG* gene were impaired in their survival on bean leaf surface and that *X. campestris* pv. *campestris* and *X. fuscans* subsp. *fuscans* strains with mutations in structural *hrp* genes are able to survive in the phyllosphere but are significantly impaired in their multiplication in this environment.

Colonization of germinating seeds and seedlings by bacteria did not require a functional TTSS and did not depend on a compatible interaction until 14 days. Abundant nutrients are released by germinating seeds and seedlings (Nelson, 2004). As *hrp* genes are not induced in rich medium (Valls et al. 2006), it is not surprising that mutants in *hrp* genes did not show a phenotype differing from that of the wild type strains in seedlings. In the phyllosphere where nutrients are in limiting quantities (Mercier and Lindow 2000), *X. fuscans* subsp. *fuscans* *hrp* mutants, particularly *hrpG* mutant, are impaired in their multiplication (Darsonval et al. submitted a). This observation is coherent with carbohydrate scavenging through TonB-dependent receptors that was demonstrated to be under the regulation of *hrpG* in *X. campestris* pv. *campestris* (Blanvillain et al. 2007).

In a rich medium phytopathogenic bacteria behave like saprophytes (Valls et al. 2006). This could explain why no defense reactions were induced in bean seedlings by *X. campestris* pv. *campestris* strain ATCC33913. Indeed, absence of defense reaction induction by *X. campestris* pv. *campestris* in bean seedlings could be due to the absence of attack of plant cells by the bacteria and consequently the absence of recognition of the bacteria by the plant. Moreover, it has always been argued that seedborne bacteria and especially xanthomonads colonizes the surface of seedlings and have no endophytic development (Gilbertson and Maxwell 1992). This localization limits necessarily contacts between bacteria and plant cells and hence bacterial PAMPs recognition.

Peroxydase and β -1,3-glucanase activities assayed as markers of plant defense reactions confirmed that no defense reactions were induced by *X. campestris* pv. *campestris* in bean seedlings (incompatible interaction). Absence of induction of defense reactions could alternatively be a consequence of low levels of inducible and basal resistances in young seedling tissues. Young tissues of plants are often less resistant to

diseases than older ones (Jacques 1996) and age-related resistance has been described in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Rusterrucci et al. 2005) and *P. viridiflava* (Goss and Bergelson 2006). However in some interactions, seedlings are more resistant than mature plants as shown for clover and leaf scorch (Chandrashekar and Halloran 1991). There are several examples of induced defense responses in seedlings by the treatment of seeds with the plant defense activator acibenzolar-S-methyl. Resistance in seven days-old seedlings of cowpea was induced by acibenzolar-S-methyl against *Colletotrichum destructivum* (Latunde-Dada and Lucas 2001). Defense response activation was also monitored from three to five days after germination in melon (Buzi et al. 2004). In our experiments, peroxidase and β -1,3-glucanase activities were higher in seedlings that were treated with acibenzolar-S-methyl than in negative control indicating that defense can be induced in bean seedlings. It is different from the case of flowers that are supposed to lack inducible defense responses (Ngugi and Scherm 2006).

Molecular mechanisms underlying activation of plant defense responses depend on the type of pathogen (biotrophic or necrotrophic) (Glazebrook 2005) and on the type of interaction, non-host or gene-for-gene resistance (Jones and Dangl 2006). In this paper we addressed the non-host resistance that uses transmembrane pattern recognition receptors (PRRs) that respond to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (Jones and Dangl 2006). In Gram negative bacteria PAMPs, considered as general elicitors, include flagellin, lipopolysaccharides (LPS) and elongation factor Tu (EF-Tu) (Mishina and Zeier 2007). PAMPs are generally considered to correspond to slowly evolving patterns, and to be conserved among bacteria of the same class (Nürnberg and Lipka 2005). In a compatible interaction pathogenic bacteria are supposed to be able to suppress defense responses induced by PAMPs by the way of TTSS effectors (Nomura et al. 2005; Mishina and Zeier 2007). It is interesting to note that in our work *X. campestris* pv. *campestris* and its *hrp* mutant induced similar levels of defense reactions in bean leaves, confirming that PAMPs and not TTSS effectors induced the non-host resistance. *X. fuscans* subsp. *fuscans* strain mutated in *hrcR* gene did not induce increased levels of POX activity in bean leaves compared to the wild type strain. This result strongly suggests that *X. fuscans* subsp. *fuscans* does not suppress host defense reactions by the way of TTSS effectors. PAMPs of *X. fuscans* subsp. *fuscans* were not recognized because they were masked or because they did not induce defense reaction in bean leaves whereas those of *X. campestris* pv. *campestris* did. In this second hypothesis, PAMPs would be different between *X. campestris* pv. *campestris* and *X. fuscans* subsp. *fuscans* thus not conserved at the level of the genus. Evidences are needed to validate this proposal as it could play an important role in host specificity inside this group of pathogens.

Attachment to seeds represents a key step for the introduction of bacteria into the rhizosphere (Danhorn and Fuqua 2007) and would represent an advantage for seedborne pathogens. *X. fuscans* subsp. *fuscans* has strong capacities of attachment to seeds compare to *E. coli* C600. We however confirmed that this strain was not globally deficient in adhesion capacities by using an adhesion assay on polypropylene. This apolar surface was shown to be particularly well suited to show slight differences in adhesion capacities among *Pseudomonas fluorescens* mutants (O'Toole and Kolter 1998). Other strains of *E. coli* and *Salmonella enterica*, which are human pathogens, are reported to be very difficult to remove from alfalfa and mung bean seeds (Danhorn and Fuqua 2007, Singh et al. 2005). These differences could be due to different patterns of surface structures among strains of *E. coli* or to different qualities of seed coat surface requiring different adhesion mechanisms. We previously showed that *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R produces at least six adhesins some of which are involved in attachment to seeds and/or are important for *in planta* transmission to bean seeds (Darsonval et al. submitted b).

In conclusion, nutrients being available in sufficient amounts on germinating seeds and seedlings, bacteria do not need to set up a molecular dialogue with the plant to multiply. Specific interactions between *X. fuscans* subsp. *fuscans* and bean take place later on during colonization of the phyllosphere when nutrient availability is limiting for bacterial multiplication. Mechanisms involved in spermosphere and seedling colonization are certainly highly conserved among bacteria and concerns basic behavior as attachment, protection against xenobiotics and toxins and an adapted carbohydrate metabolism to metabolites released by the specified plant.

1.5 Materials and Methods

Bacterial strains, plasmids and growth conditions. The bacterial strains used in this study are described in Table 1. Xanthomonads strains were grown at 28°C in 10% TSA medium (1.7 g/l tryptone, 0.3 g/l soybean peptone, 0.25 g/l glucose, 0.5 g/l NaCl, 0.5 g/l K₂HPO₄ and 15 g/l agar) supplemented with the appropriate antibiotics. *Escherichia coli* cells were cultivated at 37°C in Luria Bertani medium (10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl, 15 g/l agar) and for *in planta* studies on 100% TSA medium (17 g/l tryptone, 3 g/l soybean peptone, 2.5 g/l glucose, 5 g/l NaCl, 5 g/l K₂HPO₄ and 15 g/l agar) supplemented with rifamycin. Antibiotics were used at the following final concentrations: rifamycin (R): 50 mg/l; kanamycin (Km): 25 mg/l; rifampicin (Rif): 50 mg/l and

chloramphenicol (Cm): 12.5 mg/l. For *in planta* studies media were supplemented with 50 mg/l cycloheximide and 10 mg/l propiconazole to inhibit fungal growth. To prepare inocula, strains were grown 48 h in appropriate media supplemented with appropriate antibiotics. Bacterial cells were scraped from agar plates and suspended in sterile distilled water. Suspensions were calibrated to 1×10^8 CFU/ml and adjusted to the desired final concentrations with sterile distilled water.

Plant material. *In planta* experiments were conducted with a susceptible variety of dry bean (*P. vulgaris* cv. Flavert). Seeds were provided by Vilmorin and were considered to be free of *X. fuscans* subsp. *fuscans* following the analysis of about 100,000 seeds per lot with standard tests (International Seed Testing Association, 2007). When necessary, seeds were incubated in sterile germination boxes (17.5×11.5×15.5 cm) on moistened sterile paper in growth chambers at 25°C for 48 hours under 16 h of light at 25°C and 8 h of darkness at 22°C and under high (95%) relative humidity (RH). Seedlings were transplanted under the same environmental conditions in 10×10×18 cm pots (1 seed per pot) containing soil substrate (Neuhaus humin substrat S NF 11-44-551, Proveg, La Rochelle, France) in growth chambers. Plants were watered three times per week.

Bean inoculations. Seeds were vacuum (Samplatec Corp. Japan) infiltrated by soaking in 2 ml inoculum/seed during 30 min. Vacuum was then applied for 3 min. Seeds were dried for 2 hours in a sterile environment at room temperature. Plants were vacuum infiltrated by soaking in 500 ml inoculum/plant and applying vacuum for 3 min. Plants were dried for 2 hours at room temperature. Plant inoculations were carried out under quarantine at UMR PaVé, Centre INRA, Beaucozé, France. To avoid cross-contaminations during plant growing time lapse, plants receiving a similar treatment were grouped in growth chamber and were separated by polypropylene curtains from other treatments resulting in highly homogeneous conditions in growth chamber among treatments. Treatments were randomly distributed in each repetition. Two to five samples were analyzed per treatment and per sampling date. Experiments were repeated at least twice.

Monitoring bacterial population sizes. To quantify bacterial population sizes seeds were soaked in 2 ml of sterile distilled water per g of seeds or per seed for individual analyses overnight at 4°C. Then samples were shaken with a vortex for 30 s at maximal speed three times. Seedlings and leaf samples were weighed and ground (Stomacher 80; Seward, London, United Kingdom) individually for 2 min at maximum power in 5 ml of distilled water. Every sample and appropriate dilutions were spiral plated (Spiral Biotech,

Bethesda, MD) on selective medium to quantify the inoculated strain. Samples from control plants were plated on 100% TSA to quantify bacterial indigenous population sizes.

Assays for peroxidase and glucanase activities. Enzymes were extracted as described in Venisse and associates (2002) by grinding 800 mg to 1000 mg of plant material into 5 ml of 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5) containing 1 mM polyethyleneglycol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 8% (wt/vol) polyvinylpyrrolidone and 0.01% (vol/vol) triton X-100. Homogenates were centrifuged at 16,000×g at 4°C for 20 min and supernatants were centrifuged at 10,000×g at 4°C for 10 min. POX activity was determined according to the method of Chance and Maehly (1955) and were expressed in μ moles (tetraguaiacol)/mg proteins/min. GLU activity was assayed according to the method of Wirth and Wolf (1992) modified by Venisse et al. (2002) and calculated from the difference of absorbance at 600 nm between the sample incubated 45 min at 37°C and the sample not incubated. Protein content in crude enzyme extracts was determined according to the method of Bradford (1976) using Coomassie Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, IL, U.S.A.).

All experiments were performed with two samples of plant material each constituted by bulks of 3 to 8 seedlings or bulk of fragments of primary leaves from 3 plants. Two replicates of every sample were analyzed at each sampling date per treatment.

Bacterial adhesion to bean seeds. Bacterial adhesion to bean seeds was tested as previously described (Darsonval et al. submitted b). Briefly columns were filled with 6 g of bean seeds and fully saturated with 12 ml of inoculum at 1×10^5 CFU/ml. Inoculum was removed after a contact time between the culture and the seeds of 2 hours. Seeds in columns were washed twice with 12 ml of distilled water. Bacterial population sizes adherent on seeds were monitored by seed maceration. The ratio #Ac (number of attached cells) / #Ic (number of inoculated cells) indicated irreversible adhesion capacities (Espinosa-Urgel et al. 2000). Experiments were repeated at least twice with three samples per treatment.

Bacterial adhesion to polypropylene. Bacterial adhesion under static conditions was quantified by a crystal violet incorporation assay with 96-well polypropylene microtiter plates (Microwell, Nunc, Denmark) using the method of O'Toole and Kolter (1998) modified by Darsonval et al. (b). Three wells per strain were fulfilled with 200 μ l MME minimal medium and inoculated with 1:20 dilutions of inoculums calibrated at 1×10^7 CFU ml⁻¹.

Plates were incubated at 28°C for 3 days. Bacterial growth was confirmed by measuring the OD₆₀₀ using the µQuant™ platewell reader (Bio-Tek Instruments, Inc., USA) of the supernatants. To quantify surface-attached bacteria, surface-attached cells in wells were stained for 15 min at room temperature with 200 µl per well of a 1% (wt:vol) crystal violet (CV) solution. Then CV solution was discarded and the wells thoroughly washed with distilled water. Finally the dye incorporated in attached cells was solubilized in 200 µl of 95% ethanol per well and the OD₆₀₀ were determined in the microplate reader. These tests were repeated at least twice for every bacterial strain.

Statistical analyses. Statistical analyses were performed using Statview®. 5.0 (SAS Institute. Incorporated, Cary USA). Data expressed as means of Log10-transformed population sizes or means of enzymatic activities (± SEM were analyzed with Mann-Whitney U tests (Sokal and Rohlf 1969).

Acknowledgments

This work was supported by grant from Conseil Régional des Pays de la Loire. We thank J. Benard and S. Hanteville for plant production.

1.6 Literature Cited

- Beattie, G. A., and Lindow, S.E. 1995. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:145-172.
- Blanvillain, S., Meyer, D., Boulanger, A., Lautier, M., Guynet, C., Denance, N., Vasse, J., Lauber, E., and Arlat, M. 2007. Plant carbohydrate scavenging through TonB-dependent receptors: a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. *PLoS ONE* 2:doi:10.1371/journal.pone.0000247.
- Bloemberg, G. V., and Lugtenberg, B. J. J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:343-350.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brunings, A.M., and Gabriel, D.W. 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol. Plant Pathol.* 4:141-157.

- Buzi, A., Ghilosi, G., De Sillo, D., and Magro, P. 2004. Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotium* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. *J. Phytopathol.* 152:34-42.
- Chance, B., and Maehly, A. C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol.* 2:764-775.
- Chandrashekar, M., Halloran, G. M. 1991. Leaf scorch (*Kabatiella caulivora* (Kirch.) Kirk.) of subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.): Influence of host cultivar, growth stage and pathogen isolates on the disease severity. *Euphytica.* 61:181
- Danhorn, T., and Fuqua, C. 2007. Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 61:401-22.
- Darrasse, A., Bureau, C., Samson, R., Morris, C., and Jacques, M.-A. 2007. Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. *Eur. J. Plant Pathol.* 119:203-215.
- Darsonval, A., Darrasse, A., Meyer, D., Demarty, M., Durand, K., Bureau, C., Manceau, C., and Jacques, M.-A. (a) Type III secretion system of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* is involved in phyllosphere colonization process and in transmission to seeds of susceptible bean. Submitted.
- Darsonval, A., Darrasse, A., Durand, K., Bureau, C., Cesbron, S., and Jacques, M.-A. (b) Adhesins of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* are implicated in phyllosphere colonization processes and in transmission to seeds of susceptible bean. Submitted.
- da Silva, A.C., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Monteiro-Vitorello, C.B., Van Sluys, M.A., Almeida, N.F., Alves, L.M., do Amaral, A.M., Bertolini, M.C., Camargo, L.E., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L.P., Cicarelli, R.M., Coutinho, L.L., Cursino-Santos, J.R., El-Dorry, H., Faria, J.B., Ferreira, A.J., Ferreira, R.C., Ferro, M.I., Formighieri, E.F., Franco, M.C., Greggio, C.C., Gruber, A., Katsuyama, A.M., Kishi, L.T., Leite, R.P., Lemos, E.G., Lemos, M.V., Locali, E.C., Machado, M.A., Madeira, A.M., Martinez-Rossi, N.M., Martins, E.C., Meidanis, J., Menck, C.F., Miyaki, C.Y., Moon, D.H., Moreira, L.M., Novo, M.T., Okura, V.K., Oliveira, M.C., Oliveira, V.R., Pereira, H.A., Rossi, A., Sena, J.A., Silva, C., de Souza, R.F., Spinola, L.A., Takita, M.A., Tamura, R.E., Teixeira, E.C., Tezza, R.I., Trindade dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, S.M., White, F.F., Setubal, J.C., and Kitajima, J.P. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417:459-463.
- Espinosa-Urgel, M., Salido, A., and Ramos, J.-L. 2000. Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *J. Bacteriol.* 182:2363-69.

- Gilbertson, R. L., and Maxwell, D. P. 1992. Common bacterial blight of bean. Pages: 18-39. in: Diseases of vegetable and oil seed crops. H. S. Chaube and J. Kumar eds.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:205-27.
- Gomez-Gomez, L., and Boller, T. 2002. Flagellin perception : a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* 7:251-256.
- Goss, E. M., and Bergelson, J. 2006. Variation in resistance and virulence in the interaction between *Arabidopsis thaliana* and a bacterial pathogen. *Evolution* 60:1562-1575.
- Gurlebeck, D., Thieme, F., and Bonas, U. 2006. Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J. Plant Physiol.* 163:233-255.
- Hirano, S.S., Charkowski, A.O., Collmer, A., Willis, D.K., and Upper, C.D. 1999. Role of the Hrp type III protein secretion system in growth of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a on host plants in the field. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9851-9856.
- International Seed Testing Association. 2007. ISTA validating method 7-021 : Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* on *Phaseolus vulgaris*. Retrieved March 2007, from http://www.seedtest.org/upload/cms/user/ISTAValidatedMethod7-021_2007_14.11.2006.pdf
- Jacques, M.-A. 1996. The effect of leaf age and position on the dynamics of microbial populations on aerial plant surfaces. Pages 233-245 in: Aerial plant surface microbiology. C.E. Morris, P.C. Nicot, and C. Nguyen-The, eds. Plenum Press, New York.
- Jacques, M.-A., Josi, K., Darrasse, A., and 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.
- Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 444:323-329.
- Latunde-Dada, A. O., and Lucas, J. A. 2001. The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 58:199-208.
- Lindgren, P.B., Peet, R.C., and Panopoulos, N.J. 1986. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "*phaseolicola*" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. *J. Bacteriol.* 168:512-522.
- Maude, R.B. 1996. Seedborne diseases and their control *Principles & Practice*. CAB International, Oxon, UK.

Mercier, J., and Lindow, S.E. 2000. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:369-374.

Mishina, T. E., and Zeier, J. 2007. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant J.* 50:500-513.

Mudgett, M. B. 2005. New insights to function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:509-31.

Nelson, E. B. 2004. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:271-309.

Ngugi, H. K., and Scherm, H. 2006. Biology of flower-infecting fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* 44:261-282.

Nomura, K., Melotto, M., and He, S.-Y. 2005. Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8:361-368.

Nürnbergger, T., and Lipka, V. 2005. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol. Plant Pathol.* 6:335-345.

O'Brien, A. D., Newland, J. W., Miller, S. F., Holmes, R. K., Smith, H. W., and Formal, S. B. 1984. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science.* 226:694-696.

O'Toole, G.A., and Kolter, R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28:449-461.

Rusterrucci, C., Zhao, Z., Haines, K., Mellersh, D., Neumann, M., and Cameron, R. K. 2005. Age-related resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* is associated with the transition to flowering in *Arabidopsis* and is effective against *Peronospora parasitica*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 66:222-231.

Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G.H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P.E., Stromberg, V.K., and Vidaver, A.K. 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 28:494-518.

- Simon, H. M., Smith, K. P., Dodsworth, J. A., Guenther, B., Handelsman, J., and Goodman, R. M. 2001. Influence of tomato genotype on growth of inoculated and indigenous bacteria in the spermosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:514-520.
- Singh, B. R., Chandra, M., Agarwal, R., Babu, N. 2005. Curing of *Salmonella enterica*, serovar *typhimurium*-contaminated cowpea seeds and sprouts with vinegar and chlorination. *J. Food Process. Preserv.* 29:278-277.
- Sokal, R. R., and Rohlf, F. J. 1969. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research.* Freeman & Co., San Francisco, Calif.
- Valls, M., Genin, S., and Boucher, C. 2006. Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathog.* 2:e82. Doi:10.1371/journal.ppat.0020082.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., and Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45:472-489.
- Vauterin, L., Rademaker, J., and Swings, J. 2000. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology* 90:677-682.
- Venisse, J.-S., Malnoy, M., Faize, M., Paulin, J.-P., and Brisset, M.-N. 2002. Modulation of defense responses of *Malus* spp. during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant Interact.* 15:1204-1212.
- Vidaver, A.K. 1993. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: cause of common bacterial blight of bean. Pages 40-44 in: *Xanthomonas*. J.G. Swings, and E.L. Civerolo, eds. Chapman & Hall, London.
- Walcott, R. R., Gitaitis, R. D., and Castro, A. C. 2003. Role of blossom in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytopathology* 93:528-534.
- Weller, D.M., and Saettler, A.W. 1980. Evaluation of seedborne *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* as primary inocula in bean blights. *Phytopathology* 70:148-152.
- Wichmann, G., and Bergelson, J. 2004. Effector genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* promote transmission and enhance other fitness traits in the field. *Genetics* 166:693-706.
- Wirth, S. J., and Wolf, G. A. 1992. Microplate colorimetric assay for endoacting cellulase, xylanase chitinase, 1,3- β -glucanase and amylase extracted from forest horizons. *Soil Biol. Biochem.* 24:511-519.

D i s c u s s i o n
g é n é r a l e e t
p e r s p e c t i v e s

Discussion générale et perspectives

La proposition de nouvelles méthodes de lutte dirigées contre les phyto bactérioses transmises par les semences passe par une meilleure connaissance du développement de l'agent pathogène lors des différentes étapes clés de la colonisation de l'hôte. Ces étapes clés sont la contamination de la plantule à partir de la semence contaminée, la colonisation de la phyllosphère, ainsi que la transmission du pathogène aux graines. Les études réalisées au cours de cette thèse avaient pour objectif initial d'identifier et de caractériser des mécanismes impliqués dans ces étapes clés pour le pathosystème *X. fuscans* subsp. *fuscans* - haricot. Les déterminants moléculaires impliqués dans ces étapes étaient alors partiellement méconnus, certainement à cause de contraintes méthodologiques fortes (quel que soit le modèle biologique retenu) : absence de bio-test rapide et facile à mettre en œuvre car le caractère est quantitatif, nécessité de manipuler de grandes quantités de plantes sur de longues durées pour la transmission à la graine et réponse de type quantitative passant par des quantifications de populations bactériennes et des dénombrements d'organes contaminés. Les différents travaux de recherche présentés dans cette thèse ont été menés selon une démarche avec *a priori* sur la base des connaissances générales concernant les déterminants de la colonisation d'une plante par les bactéries.

1. Etude de comportements bactériens de référence lors des différentes étapes de colonisation du haricot

Dans la spermosphère du haricot, le comportement des souches choisies pour représenter des situations types : compatible (*X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R), incompatible (*X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913) et nulle (*E. coli* EC600) n'est pas différencié. Les dynamiques des tailles des différentes populations bactériennes ne sont pas différentes et l'on note l'absence d'activation des réactions de défense (péroxydases et glucanase) de la plante. Les graines en germination larguent des nutriments en abondance et leur disponibilité contribue à faire de la spermosphère un environnement favorable à la multiplication bactérienne (Nelson, 2004). Les bactéries n'ont ainsi pas de nécessité de mettre en place un dialogue moléculaire coûteux avec la plante pour s'approvisionner en sources de carbone et d'azote comme peut le prouver l'absence

d'expression de gènes *hrp* en milieu riche, gènes clés impliqués dans le dialogue moléculaire (Schulte et Bonas, 1992; Tsuge *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 2006).

L'absence d'activation des réactions de défense du haricot par les bactéries phytopathogènes lors de la colonisation de la spermosphère et des plantules pose trois questions : (i) des réactions de défense ne seraient-elles pas inductibles lors de ce stade phénologique ou alors d'un niveau très faible ? (ii) les bactéries développeraient-elles des mécanismes contrariant leur reconnaissance par le système de défense de la plante ? ou (iii) aucun contact ne s'établirait avec la plante qui ne percevrait pas la présence des bactéries ? Nos résultats nous conduisent à penser que ces trois explications ne sont pas mutuellement exclusives. En effet, les niveaux d'expression des activités peroxydase et glucanase sont induits dans les jeunes plantules par un éliciteur des réactions de défense : le Bion. Leur niveau est par contre bas par rapport à ce qui est dosé dans les feuilles. Dans les feuilles de haricot, le niveau d'expression face à *X. campestris* pv. *campestris* est comparable à celui quantifié dans les feuilles de pommier résistantes à *Erwinia amylovora* souche agressive en situation incompatible (Venisse *et al.*, 2002). La non-induction des réactions de défense dans la plantule de haricot nous semble consécutive à la non-reconnaissance des pathogènes bactériens. Ils se comportent très probablement en saprophytes à la surface des organes, l'abondance en nutriments lors de la germination (Nelson, 2004) induisant ce mode de vie chez les bactéries (Valls *et al.*, 2006).

Un comportement contrasté entre les différentes souches de référence se met en place plus tardivement lors de l'expansion des cataphylles. La colonisation active de la plante caractérisée par une importante multiplication dans la phyllosphère et des fréquences élevées de transmission aux semences est alors caractéristique de l'interaction compatible entre une bactérie phytopathogène (*X. fuscans* subsp. *fuscans*) et sa plante hôte sensible (le flageolet de variété Flavert). Néanmoins, *X. campestris* pv *campestris* en interaction incompatible avec le haricot peut survivre dans sa phyllosphère, s'y disperser et même se transmettre aux graines, à des fréquences faibles et avec des populations de taille réduite. Des réactions de défense sont alors induites dans la phyllosphère comme observé suite aux infiltrations des cataphylles par *X. campestris* pv *campestris* montrant la spécificité de ces réactions de défense. L'induction de ces réactions de défense après infiltration de *X. campestris* pv *campestris* dans les feuilles est un argument supplémentaire permettant d'expliquer la localisation pratiquement exclusivement épiphyte de cet organisme dans la phyllosphère. La transmission à la graine de cet organisme opère sans doute également exclusivement par l'intermédiaire des pièces florales et non par la voie vasculaire. Cette hypothèse est soutenue par une absence supposée de défenses inductibles dans ces organes (Ngugi et Scherm, 2006). De plus, le

style pourrait faciliter l'accès des bactéries à l'ovaire sans qu'elles n'entrent en contact avec les cellules végétales. L'ensemble style-stigmate a d'ailleurs été assimilé à une blessure par laquelle les pathogènes peuvent facilement entrer (Maude, 1996; Ngugi et Scherm, 2006).

La souche C600 de *E. coli* est incapable de s'installer dans la phyllosphère du haricot. Ses populations y disparaissent rapidement prévenant toute dispersion ultérieure et transmission aux graines. Cette souche C600 de *E. coli* dérivant de la lignée K-12 est une souche non pathogène dépourvue de l'ensemble des gènes de virulence de *E. coli* (Kuhnert *et al.*, 1995). Nous avons utilisé cette souche dans cet environnement pour représenter une situation extrême de complète inadaptation. Ainsi dans la phyllosphère, le comportement obtenu correspondait bien au comportement attendu. En revanche, dans la spermosphère son comportement, similaire à celui de *X. fuscans* subsp. *fuscans* et *X. campestris* pv *campestris*, n'en a paru que plus surprenant. Il est ainsi probable que l'abondance de nutriments soit le paramètre majeur expliquant l'absence de différences de tailles de populations entre les différents organismes testés.

2. Rôle des différents déterminants moléculaires ciblés dans la colonisation de la spermosphère et de la phyllosphère

Pendant les 10 premiers jours qui suivent la germination des graines nous avons mis en évidence que des souches de *X. fuscans* subsp. *fuscans* mutées dans un gène de structure du SST3 (*hrcR*) ou dans un gène de régulation (*hrpG*) étaient capables de se développer de façon similaire à la souche sauvage. Ces résultats viennent corroborer les observations faites sur *P. syringae* pv. *syringae* B728a par Hirano et ses collaborateurs (1999). Dans leur étude, des souches mutées dans des gènes de structure du SST3 (*hrcJ* et *hrcR*) sont tout à fait capables de coloniser les graines en germination et les plantules de haricots au champ avec des tailles de populations similaires à celles observées pour la souche sauvage (Hirano *et al.*, 1999).

La mutation unique de différents gènes *hrp/hrc* chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* a permis de montrer que ce sont des déterminants moléculaires essentiels de la colonisation asymptomatique de la phyllosphère du haricot. Des mutants des protéines de structure du SST3, du translocon ainsi que du pilus *hrp* survivent essentiellement de manière épiphyte dans la phyllosphère. La fonctionnalité des gènes de régulation *hrpG* et *hrpX* est nécessaire

à la survie de l'agent pathogène lors de la colonisation de la phyllosphère. Hirano et ses collaborateurs (1999) ont montré une implication similaire du SST3 chez *P. syringae* pv. *syringae* lors de la colonisation de la phyllosphère du haricot. Des mutants altérés dans les gènes *hrpJ* et *hrcC* présentent des tailles de populations significativement plus basses que celles de la souche sauvage sur haricots en plein-champ.

Le SST3 permet la sécrétion de protéines effectrices dans les cellules de la plante hôte. Certains effecteurs ont un rôle avéré dans la fitness des bactéries *in planta* : c'est le cas de AvrBs1, AvrBs2, AvrBs3 et AvrBs4 de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Wichmann et Bergelson, 2004; Wichmann *et al.*, 2005). Nous avons testé le rôle de deux effecteurs du SST3 (AvrBs2 et AvrBs3) dans la fitness de *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R sur le haricot. La mutation individuelle d'un homologue du gène *avrBs2* et d'un homologue d'un gène de la famille *avrBs3* chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* n'a pas eu de répercussion ni sur la multiplication *in planta*, ni sur la dispersion du pathogène dans la phyllosphère ou sa transmission aux graines. Plusieurs exemplaires du gène *avrBs3* sont présents chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R, permettant sans doute de compenser la perte de fonctionnalité de l'un de ces gènes par la présence des autres allèles (Roden *et al.*, 2004; Wichmann et Bergelson, 2004). Aussi, il faudrait envisager de cumuler les mutations dans ces effecteurs du SST3 afin de déterminer leur contribution dans la fitness *in planta*. Dans le pathosystème utilisé dans notre étude (*X. fuscans* subsp. *fuscans*/haricot) la colonisation est à la fois épiphyte, endophyte mais également vasculaire, ce qui différencie notre pathosystème de celui utilisé par Wichmann et Bergelson (2004) (*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*/poivron) dans lequel la colonisation est limitée aux parenchymes. Une étude populationnelle associée à des travaux d'histopathologie permettrait d'évaluer le rôle des effecteurs dans la spécificité tissulaire. Il faut également envisager l'absence de fonctionnalité de chacun de ces deux effecteurs chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R. Il a été récemment montré que de nombreux gènes d'aviorulence ne sont pas fonctionnels chez les trois souches de *Pseudomonas syringae* aux génomes séquencés (Lindeberg *et al.*, 2006). En étendant la recherche d'effecteurs du SSTT dans la souche CFBP4834-R de *X. fuscans* subsp. *fuscans* sur la base d'un répertoire de 30 gènes d'effecteurs identifiés chez les *Xanthomonas spp.*, il s'avère que cette souche comporte au moins 13 gènes codant des effecteurs du SST3 appartenant à des familles très différentes (Hajri *et al.*, 2008). Leur fonctionnalité est à ce jour inconnue.

Il est envisageable de cumuler des mutations avec la technique Cre-Lox. En construisant un mutant délété dans le gène *pilA* nous avons adapté la technique Cre-Lox à *X. fuscans* subsp. *fuscans*. Cette technique a été mise au point chez deux bactéries à Gram négatif phylogénétiquement éloignées : *Methylobacterium extorquens* AM1 (une α -

protéobactérie) et *Burkholderia fungorum* (une β -protéobactérie) (Marx et Lidstrom, 2002) puis a été utilisée avec succès chez *Ralstonia solanacearum* (Genin *et al.*, 2005; Angot *et al.*, 2006) et *X. campestris* pv. *campestris* (Blanvillain *et al.*, 2007). Néanmoins, cette technique présente quelques limites dont celle de nécessiter la séquence des régions flanquantes dans le cas de petits gènes. Il est en effet nécessaire de cloner dans un vecteur de grands fragments (de l'ordre de 600 pb) en amont et en aval du fragment que l'on souhaite exciser afin d'optimiser la double recombinaison homologe aboutissant à l'excision du fragment d'intérêt. De plus, la délétion de la séquence d'intérêt laisse la place à quelques nucléotides provenant des sites *loxP*. Il s'avère que ces nucléotides restant s'accumulent en même temps que s'accumulent les mutations ce qui peut entraîner des réarrangements après un certain nombre de mutations dans une même souche (Genin, comm. pers.).

Le cumul des mutations dans les gènes d'avirulence présents chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* passe bien évidemment par une identification de ces effecteurs. La recherche de protéines effectrices peut être envisagée selon la démarche développée par Roden et ses collaborateurs (2004) chez *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. Ils ont construit une banque d'insertion avec un mini-transposon dans lequel se trouve le gène codant pour la protéine AvrBs2 tronquée de son signal de translocation. Ils ont ensuite criblé les clones sur poivron résistant porteur du gène *Bs2*. Seules les fusions protéiques intégrant un signal de translocation dépendant du SST3 provoqueront une HR sur poivron marquant ainsi la présence d'un effecteur de type 3. Les auteurs ont ainsi repéré sept effecteurs, ce qui ne représente pas la totalité des effecteurs présents dans cette souche. De même, chez *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* l'utilisation d'une technologie similaire utilisant la protéine AvrRpt2 a permis d'identifier 13 effecteurs potentiels (Guttman *et al.*, 2002). L'identification d'effecteurs chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* peut aussi être entreprise par la recherche de gènes candidats par PCR grâce à des amorces consensus. Ce travail est cours dans l'équipe d'accueil est constitué le travail de thèse d'Ahmed Hajri. D'autres méthodes bioinformatiques basées sur la recherche de séquences promotrices (Hrp_{II}-Box ou PIP-Box) pourront être envisagées dès que la séquence complète du génome de *X. fuscans* subsp. *fuscans* sera disponible (courant 2008).

Les mécanismes régulés par les gènes *hrpG* et *hrpX* sont indispensables à la survie de *X. fuscans* subsp. *fuscans* dans la phyllosphère. Chez certains organismes d'autres fonctions que la régulation du SST3 par le gène *hrpG* ont été identifiées. La protéine HrpG régule la production d'enzymes de dégradation de la paroi cellulaire végétale, la production de phytohormones, l'adhésion et bien d'autres fonctions chez *R. solanacearum* (Valls *et al.*, 2006). Cette régulation de la fonction d'adhésion a aussi été mise en

évidence chez *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* pour lequel HrpG régule XadA, une protéine d'adhésion non-fibrillaire (Noel *et al.*, 2001). Chez *E. amylovora* c'est la mobilité qui est régulée par HrpG (Cesbron *et al.*, 2006).

Nous avons détecté et muté six adhésines chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* : PilA, FhaB1, FhaB2, XadA1, XadA2 et YapH2. La mutation unique de ces gènes a montré qu'ils sont bien impliqués individuellement dans les mécanismes d'adhésion aux surfaces biotiques et/ou abiotiques. Les gènes *yapH2* et *pilA* sont les plus importants à cet égard. L'analyse du phénotype *in planta* des différents mutants est réalisée dans des conditions de stress hydrique. En effet, l'humidité relative de l'air est descendue à 50% dès 48h après l'inoculation. Le maintien initial des plantes inoculées sous une HR élevée (95%) est nécessaire à l'installation de la souche sauvage dans la phyllosphère, mais le stress hydrique appliqué ensuite permet de contraster les comportements (Darsonval *et al.*, 2005). Globalement, la mutation individuelle de ces adhésines n'altère pas la capacité de colonisation de la phyllosphère par la bactérie sauf en ce qui concerne le mutant *yapH2* incapable de résister à un xénobiotique. L'adhésion des bactéries aux surfaces et l'agrégation des bactéries entre elles sont des mécanismes impliqués dans les étapes de formation des biofilms qui confèrent une importante protection aux bactéries face aux stress environnementaux (Jacques *et al.*, 2005). Il serait intéressant de vérifier les capacités d'adhésion de ces mutants aux surfaces foliaires comme cela a été effectué pour *X. citri* subsp. *citri* lors de la colonisation des feuilles de citronnier à l'aide de la quantification des cellules adhérentes par le dosage du crystal violet (Rigano *et al.*, 2007). Cette stratégie bactérienne de colonisation des surfaces fait également appel à de nombreux mécanismes liés à la mobilité, la production d'exopolysaccharides composant la matrice du biofilm et à la communication de cellules à cellules. La mutation du gène *flhN*, dont le produit est impliqué dans la formation du moteur du flagelle, n'a pas permis de mettre en évidence de rôle de ce gène dans la colonisation de la phyllosphère et la dispersion de la bactérie. En revanche, il apparaît que la production d'exopolysaccharide et de xanhomonadine sont au moins partiellement nécessaires pour l'installation des cellules dans la phyllosphère.

Les systèmes *pig* et *rpf* régulent la synthèse des molécules DF et DSF. Au cours des dix dernières années, diverses études ont prouvé que les molécules signales sont des cibles potentielles de méthodes de lutte dirigées contre les agents pathogènes les produisant. Ces molécules signales peuvent être dégradées par des enzymes bactériennes, végétales et animales, des contraintes physico-chimiques ou des inhibiteurs de N-AHLs ouvrant le chemin aux stratégies novatrices de contrôle biologique (Rasmussen *et al.*, 2000; Uroz *et al.*, 2005; Faure et Dessaux, 2007; Uroz *et al.*, 2007). La présence de certaines molécules

signales de type butyrolactones a déjà été identifiée chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* (Jacques *et al.*, 2005). Après avoir vérifié l'implication spécifique de ces molécules lors des étapes clés de colonisation du haricot, il serait envisageable de tester *in planta* leur dégradation par l'une ou l'autre des méthodologies déjà décrites.

3. Déterminisme de la transmission des bactéries aux graines

Nous avons montré que *X. fuscans* subsp. *fuscans* peut se transmettre aux graines de haricot aussi bien par la voie florale que la voie vasculaire en l'absence de symptômes. La transmission vasculaire de *X. fuscans* subsp. *fuscans* aux graines de haricot avait été mise en évidence par Aggour et ses collaborateurs (1989) suite à l'injection de *X. fuscans* subsp. *fuscans* dans les pédicelles des gousses. La transmission par les voies florales n'avait par contre pas été documentée.

Les mutants dans le SST3 sont incapables de se transmettre par la voie vasculaire aux graines ce qui peut s'expliquer par le fait que ces mutants s'internalisent très difficilement. Les mutants dans les gènes codant les adhésines FhaB2, XadA2 et PilA ont des fréquences de transmission aux graines par voie vasculaire fortement réduites contrairement à celles du mutant codant l'adhésine YapH2. La transmission des bactéries aux graines par la voie florale reste possible pour tous les mutants étudiés que ce soit ceux du SST3 ou des adhésines. Il semble que cette voie florale de transmission aux graines ne soit pas limitante pour les bactéries, comme nous l'avons vu précédemment avec *X. campestris* pv. *campestris*.

Ces études populationnelles devront être poursuivies par des observations de la localisation et de l'organisation des populations bactériennes *in planta* à l'aide des outils de microscopie. La construction de nouveaux mutants intégrant des gènes rapporteurs est nécessaire. De telles études de localisation ont été réalisées dans les fleurs de pommier et poirier pour des souches d'*Erwinia amylovora* transformées avec le gène rapporteur *gfp* pour « green fluorescent protein » (Spinelli *et al.*, 2005). Elles ont permis dans certains cas d'observer l'organisation des bactéries en biofilm (Ramey *et al.*, 2004; Koutsoudis *et al.*, 2006; Danhorn et Fuqua, 2007). Alternativement, il est possible d'utiliser le gène rapporteur *lux* codant une luciférase (Meyer *et al.*, 2005). L'avantage de cette solution est de permettre les observations macroscopiques et non-destructives des échantillons ce qui permet le suivi de la colonisation de l'hôte au cours du temps. Pour ces études, il serait intéressant d'utiliser une plante modèle de petite taille pour laquelle de très nombreux

mutants sont accessibles et parfaitement caractérisées comme c'est le cas pour *Arabidopsis thaliana* et *Medicago truncatula*. Cette dernière est une plante de la même famille que le haricot (*Fabaceae*) et est de plus sensible à *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R (Jacques, comm. pers.). Le criblage de différents mutants, dont ceux (*dmi1*, *dmi2* et *dmi3*) incapables de symbiose avec les bactéries du genre *Sinorhizobium* et d'endomycorrhization (Catoira *et al.*, 2000) pourrait révéler des relations éventuelles entre mécanismes de défense/de sensibilité et mécanismes symbiotiques.

4. Recherche d'autres déterminants moléculaires

La poursuite de la recherche de déterminants moléculaires impliqués dans les étapes clés de la colonisation de l'hôte indépendamment de l'expression de symptômes peut être appréhendée selon deux types d'approches : (i) une approche ciblée avec *a priori* visant à caractériser le rôle de gènes candidats, (ii) et une approche non ciblée, sans *a priori*, permettant de mettre en évidence l'ensemble des gènes bactériens intervenant pendant ces étapes. La démarche avec *a priori* nous a d'ores et déjà permis d'identifier certains mécanismes impliqués dans de la colonisation asymptomatique du haricot. La mise en place d'une démarche sans *a priori* est d'ores et déjà envisageable. Néanmoins l'utilisation d'un grand nombre de techniques repose sur la connaissance de la séquence complète du génome qui ne sera disponible pour *X. fuscans* subsp. *fuscans* qu'au cours de l'année 2008. Parmi l'ensemble des techniques sans *a priori* disponibles, je me suis attaché à en présenter quatre qui pourraient être applicables à notre modèle pour répondre à notre question de recherche.

4.1 par hybridation suppressive soustractive

Les différences d'expression entre deux banques d'ADNc peuvent être étudiées par la méthode d'hybridation suppressive soustractive (HSS). Il s'agit d'une technique de criblage différentiel permettant l'amplification sélective par PCR de fragments d'ADNc dont l'expression est spécifique d'un état physiologique particulier tout en évitant d'amplifier les fragments communs (Diatchenko *et al.*, 1996). Deux groupes d'ADNc correspondant à chacune des conditions sont utilisés, l'un comme échantillon et l'autre comme référence. Cette méthode permettrait d'avoir accès aux gènes transcrits différentiellement à chaque étape de la colonisation grâce aux différentes combinaisons possibles de comparaisons (Beyer *et al.*, 2001). Cependant, cette technique est essentiellement qualitative et ne permet pas d'avoir accès aux niveaux d'expression. Chez

les plantes, cette technique a été utilisée avec succès dans des études de développement, avec l'identification de gènes impliqués dans la maturation florale chez *Dianthus caryophyllus* (Kim *et al.*, 1999), pour des études sur la résistance à des pathogènes tels que *Phytophthora infestans* chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) (Birch *et al.*, 1999). Cette technique peut également être utilisée pour identifier les fragments d'ADN spécifiques à un organisme. Une étude de ce type a été effectuée en 2006 au cours de la thèse de Medhi Alavi au sein de l'équipe EDTa-BP à l'INRA d'Angers. Quatre HSSs ont été réalisés à partir de souches représentatives des quatre lignées génétiques de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (*sensu* Vauterin *et al.*, 2000) : la lignée *fuscans* et les trois lignées non-*fuscans*. Un jeu de 40 séquences uniques et spécifiques de ces quatre lignées a ainsi pu être identifié. Ces séquences sont des homologues de gènes codants des hémagglutinines, un récepteur TonB dépendant, une protéine présentant un motif métalloprotéase zinc-dépendant, des protéines impliqués dans les systèmes de sécrétion de type 3 et 4, des effecteurs de type 3 et des séquences de fonctions inconnues (Alavi, 2006).

4.2 par l'analyse du protéome

L'analyse du protéome peut être utilisée pour avoir accès à l'ensemble des protéines produites par un agent pathogène dans des conditions de croissance données. L'analyse du protéome s'attache également à quantifier les taux d'expression des protéines en fonction de différents facteurs, ainsi qu'à caractériser leur structure et leur fonction. L'analyse des séquences génomiques permet d'obtenir un ensemble de données sur tous les peptides codés par un organisme (Raskin *et al.*, 2006). Une étude protéomique menée sur *Methylobacterium extorquens* a permis d'identifier la protéine PhyR qui est un régulateur de la voie générale de réponse aux stress et qui est impliqué dans la croissance épiphyte de cet organisme (Gourion *et al.*, 1996; Gourion *et al.*, 2008). Des analyses protéomiques sont venues compléter des données issues de la transcriptomique concernant la formation de biofilms chez *P. aeruginosa* (Sauer, 2003). De telles études pourraient permettre l'identification de nouvelles protéines de *X. fuscans* subsp. *fuscans* exprimées différemment lors des étapes clés de la colonisation du haricot.

4.3 par des études de transcriptomique

L'utilisation de puces à ADN permet de quantifier simultanément les niveaux relatifs d'expression (ARN messagers) de centaines voire de milliers de gènes (Zinselmeier *et al.*, 2002). Cette technique est basée sur un principe d'hybridation. Les fragments d'ADN génomique de l'espèce étudiée, obtenus à partir d'une banque ciblée ou non, sont fixés sur un support. L'ARN provenant de la souche dont on veut analyser l'expression est

extrait, puis converti en ADNc via une transcription réverse. Cet ADNc est marqué puis mis en contact avec l'ADN fixé lors de l'étape d'hybridation. L'analyse de l'intensité de la fluorescence au niveau de chacun des sites potentiels d'hybridation permet ensuite de déterminer les profils d'expression.

La construction de puces aléatoires est essentielle lorsque l'on souhaite avoir une idée globale non-biaisée des gènes exprimés durant un mécanisme biologique donné. Elle est particulièrement utile lorsque le génome de l'organisme à étudier est inconnu : il est alors nécessaire de fixer l'ensemble du génome concerné sur le support d'hybridation, sous la forme de fragments d'ADN génomique. Sanchez et ses collaborateurs (2006) ont réalisé ainsi une puce de fragments d'ADN de petite taille (1 kb) chez *P. brassicacearum*. Cette approche leur a permis de mettre en évidence l'expression de certains gènes lors de la variation de phase de cette bactérie, ainsi que le rôle de petits ARN régulateurs présents dans des régions non codantes (Sanchez *et al.*, 2006). Cette technique a également été utilisée afin d'identifier l'expression des gènes de *Erwinia chrysanthemi*, dont le génome n'a pas encore été séquencé, pendant son processus infectieux (Okinaka *et al.*, 2002). Pour cela, l'ADN génomique bactérien a été extrait, partiellement digéré par une enzyme de restriction ; les fragments obtenus ont été séparés sur gel d'agarose afin de récupérer ceux de taille 3 kb. Ces derniers sont intégrés dans des vecteurs (plasmides) et transférés dans des cellules d'*E. coli*, afin de construire une banque génomique aléatoire de 5 000 clones (couvrant 2,7 fois le génome de *E. chrysanthemi*).

Cette technique est très sensible, et permet de détecter des ADNc qui ont un niveau d'expression de l'ordre de 1 copie pour 100 000 à 500 000 molécules d'ARNm (Gerhold *et al.*, 1999). Les sondes utilisées correspondent à l'ensemble des ARNm spécifiques de l'état physiologique que l'on désire analyser (développement, stress, etc.). Elles peuvent aussi correspondre à des fractions d'ADNc, issues de l'utilisation de techniques différentielles à partir de l'ADNc- RDA (Representational Difference Analysis) (Geng *et al.*, 1998). Ainsi, il est possible de caractériser un transcrit grâce aux variations d'expression que l'on peut observer après différentes hybridations.

4.4 grâce au séquençage du génome de *X. fuscans* subsp. *fuscans* CFBP4834-R

La proximité du séquençage du génome de *X. fuscans* subsp. *fuscans* offre de nouvelles perspectives grâce à la génomique comparative qui permet par l'analyse des génomes séquencés, d'identifier les différences et les similitudes génétiques entre des génomes entiers pour corréler les gènes en question à une fonction biologique. Ainsi, l'analyse et la comparaison des séquences des génomes d'espèces relativement proches

peut accélérer l'annotation fonctionnelle de nouveaux gènes, qui ne sont apparents que dans un contexte de génomique comparable (Raskin *et al.*, 2006).

En comparant les génomes séquencés d'organismes dont l'histoire évolutive est liée, les outils de génomique comparative permettent également de mieux connaître les pressions de sélection évolutive et les mécanismes de transfert ou de perte de gènes, et d'identifier de ce fait les déterminants impliqués dans l'évolution du pouvoir pathogène ou globalement de la fitness (Curtis *et al.*, 2005; Raskin *et al.*, 2006). Ils peuvent prédire que des gènes très conservés chez différents agents pathogènes paraissent être importants dans l'évolution de ces organismes (Raskin *et al.*, 2006; Burrack et Higgins, 2007). La comparaison du génome de *X. fuscans* subsp. *fuscans* avec le génome d'une bactérie typiquement vasculaire comme *X. campestris* pv. *campestris* ou d'une bactérie encore plus proche phylogénétiquement mais limitée aux parenchymes comme *X. citri* subsp. *citri* permettrait sans doute d'identifier des déterminants de la spécificité tissulaire. Des études similaires sont d'ores et déjà en cours sur la base de la comparaison du génome de *X. oryzae* pv. *oryzae* avec celui de *X. oryzae* pv. *oryzicola*, ceux de *X. citri* subsp. *citri* vs. *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* et encore *X. campestris* pv. *campestris* vs. *X. campestris* pv. *armoraciae* (Liolios *et al.*, 2008). Dans ces trois couples de pathogènes du riz, des agrumes et des *Brassicaceae*, l'un des pathogènes est vasculaire (le premier cité) et l'autre limité aux parenchymes (le second).

Avec les avancées du séquençage génomique à grande échelle, le séquençage complet ou partiel du génome de nombreuses espèces a engendré une augmentation significative de la quantité d'information génomique, qui a nécessité l'évolution des logiciels d'analyse et d'annotation fonctionnelle. En parallèle à l'augmentation du nombre de gènes identifiés, la connaissance de leur fonction et de leurs interactions nécessite souvent une validation expérimentale, à partir des hypothèses formulées grâce aux méthodes informatiques. La génomique comparative associée à la génomique fonctionnelle a permis très récemment d'identifier de nombreux déterminants moléculaires responsables de la spécificité d'hôte à partir de la souche 8004 de *X. campestris* pv. *campestris* chez une large collection d'isolats provenant de Chine (He *et al.*, 2007).

A l'avenir, l'utilisation combinée des informations issues de la génomique, de la transcriptomique et également de la métabolomique nous permettra de décrypter le dialogue moléculaire s'établissant entre les deux partenaires lors des différentes étapes clés de la colonisation. Il sera particulièrement intéressant de focaliser les efforts sur l'étape de transmission à la graine. Cette transmission est le fruit de deux voies, l'une nécessitant une adaptation particulière de la bactérie à son hôte (la voie vasculaire) et

une autre voie semblant nettement moins contraignante (la voie florale). L'enjeu de tels travaux est le développement de méthodes de lutte adaptées aux pathogènes transmis par les semences.

Références
Bibliographiques

- Abramovitch, R. B., Kim, Y. J., Chen, S. R., Dickman, M. B., Martin, G. B. (2003). *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *Embo J.*; **22**: 60-69.
- Abramovitch, R. B., Martin, G. B. (2005). Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.*; **7**: 356-364.
- Aggour, A. R., Coyne, D. P., Vidaver, A. K., Eskridge, K. M. (1989). Transmission of the common blight pathogen in bean seed. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*; **114**: 1002-1008.
- Aizawa, S.-I., Harwood, C. S., Kadner, R. J. (2000). Signaling components in bacterial locomotion and sensory reception. *J. Bacteriol.*; **182**: 1459-1471.
- Alavi, S. M. (2006). Recherche de déterminants moléculaires impliqués dans la spécificité d'hôte de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* et son variant *fuscans*: Université d'Angers.
- Alavi, S. M., Poussier, S., Manceau, C. (2007). Characterization of ISXax1, a novel insertion sequence restricted to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Variants *fuscans* and non-*fuscans*) and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Appl. Environ. Microbiol.*; **73**: 1678-1682.
- Aldon, D., Brito, B., Boucher, C., Genin, S. (2000). A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *Embo J*; **19**: 2304-2314.
- Alfano, J. R., Collmer, A. (1997). The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol*; **179**: 5655-5662.
- Andrews, J. H., Harris, R. F. (2001). The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annu. Rev. Phytopathol.*; **39**: 145-180.
- Angot, A., Peeters, N., Lechner, E., Vaillau, F., Baud, C., Gentzbittel, L., Sartorel, E., Genschik, P., Boucher, C., Genin, S. (2006). *Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **103**: 14620-14625.
- Arlat, M., Van Gijsegem, F., Huet, J. C., Pernollet, J. C., Boucher, C. A. (1994). PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. *Embo J*; **13**: 543-553.
- Arnaud-Santana, E., Pena-Matos, E., Coyne, D. P., Vidaver, A. K. (1991). Longevity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infested dry bean (*Phaseolus vulgaris*) debris. *Plant Dis.*; **75**: 952-953.
- Arora, S. K., Richtings, B. W., Almira, E. C., Lory, S., Ramphal, R. (1997). A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J. Bacteriol.*; **179**: 5574-5581.
- Astua-Monge, G., Minsavage, G. V., Stall, R. E., Vallejos, C. E., Davis, M. J., Jones, J. B. (2000). Xv4-vrxv4: a new gene-for-gene interaction identified between

- Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* race T3 and wild tomato relative *Lycopersicon pennellii*. *Mol Plant Microbe Interact*; **13**: 1346-1355.
- Audy, P., Braat, C. E., Saindon, G., Huang, H. C., Laroche, A. (1996). A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. *Phytopathology*; **86**: 361-366.
- Audy, P., Laroche, A., Saindon, G., Huang, H. C., Gilbertson, R. L. (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**: 1185-1192.
- Bai, J., Choi, S. H., Ponciano, G., Leung, H., Leach, J. E. (2000). *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* avirulence genes contribute differently and specifically to pathogen. *Mol. Plant-Microbe Interact.*; **13**: 1322-1329.
- Ballvora, A., Pierre, M., van den Ackerveken, G., Schornack, S., Rossier, O., Ganal, M., Lahaye, T., Bonas, U. (2001). Genetic mapping and functional analysis of the tomato Bs4 locus governing recognition of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AvrBs4 protein. *Mol Plant Microbe Interact*; **14**: 629-638.
- Barbour, W. M., Hattermann, D. R., Stacey, G. (1991). Chemotaxis of *Bradyrhizobium Japonicum* to soybean exudates. *Appl. Environ. Microbiol.*; **57**: 2635-2639.
- Barenkamp, S. J., St Geme, J. W., 3rd (1996). Identification of a second family of high-molecular-weight adhesion proteins expressed by non-typable *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol*; **19**: 1215-1223.
- Beattie, G. A., Lindow, S. E. (1995). The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annu. Rev. Phytopathol.*; **33**: 145-172.
- Beattie, G. A., Lindow, S. E. (1999). Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology*; **89**: 353-359.
- Beaver, J. S., Rosas, J. C., Myers, J. (2003). Contributions of the Bean/Cowpea CRSP to cultivar and germplasm development in common bean. *Field Crops Res.*; **82**: 87-102.
- Begonia, M. F., Kremer, R. J. (1999). Chemotaxis of deleterious rhizobacteria to birdsfoot trefoil. *App. Soil Ecol.*; **11**: 35-42.
- Bewley, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. *Plant Cell*; **9**: 1055-1066.
- Beyer, K., Binder, A., Boller, T., Collinge, M. (2001). Identification of potato genes induced during colonization by *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant Pathol.*; **2**: 125-134.
- Bhattacharyya, A., Stilwagen, S., Reznik, G., Feil, H., Feil, W. S., Anderson, I., Bernal, A., D'Souza, M., Ivanova, N., Kapatral, V., Larsen, N., Los, T., Lykidis, A., Selkov, E., Jr., Walunas, T. L., Purcell, A., Edwards, R. A., Hawkins, T., Haselkorn, R., Overbeek, R., Kyrpides, N. C., Predki, P. F. (2002). Draft sequencing and comparative genomics of *Xylella fastidiosa* strains reveal novel biological insights. *Genome Res.*; **12**: 1556-1563.

- Birch, P. R. J., Avrova, A. O., Duncan, J. M., Lyon, G. D., Toth, R. L. (1999). Isolation of potato genes that are induced during an early stage of the hypersensitive response to *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant Microbe Interact.*; **12**: 356-361.
- Blanvillain, S., Meyer, D., Boulanger, A., Lautier, M., Guynet, C., Denance, N., Vasse, J., Lauber, E., Arlat, M. (2007). Plant carbohydrate scavenging through TonB-dependent receptors: a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. *PLoS ONE*; **2**: doi:10.1371/journal.pone.0000247.
- Boch, J., Joardar, V., Gao, L., Robertson, T. L., Lim, M., Kunkel, B. N. (2002). Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* genes induced during infection of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Microbiol*; **44**: 73-88.
- Bogdanove, A. J., Beer, S. V., Bonas, U., Boucher, C. A., Collmer, A., Coplin, D. L., Cornelis, G. R., Huang, H. C., Hutcheson, S. W., Panopoulos, N. J., Van Gijsegem, F. (1996). Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.*; **20**: 681-683.
- Bonas, U., Stall, R. E., Staskawicz, B. (1989). Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Gen. Genet.*; **218**: 127-136.
- Boucher, C., Genin, S., Arlat, M. (2001). Current concepts on the pathogenicity of phytopathogenic bacteria. *C R Acad Sci III*; **324**: 915-922.
- Bowman, J. P., Sly, L. I., Hayward, A. C., Spiegel, Y., Stackebrandt, E. (1993). *Telluria mixta* (*Pseudomonas mixta* Bowman, Sly, and Hayward 1988) gen. nov., comb. nov., and *Telluria chitinolytica* sp. nov., soil-dwelling organisms which actively degrade polysaccharides. *Int J Syst Bacteriol*; **43**: 120-124.
- Bradbury, J. F. (1986). Guide to plant pathogenic bacteria. UK: CAB International.
- Brandl, M. T., Mandrell, R. E. (2002). Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the cilantro phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*; **68**: 3614-3621.
- Braun, V., Killmann, H. (1999). Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Bioch. Sci.*; **24**: 104-109.
- Bren, A., Eisenbach, M. (2000). How signals are heard during bacterial chemotaxis: Protein-Protein interactions in sensory signal propagation. *J Bacteriol*; **182**: 6865-6873.
- Brito, B., Aldon, D., Barberis, P., Boucher, C., Genin, S. (2002). A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes. *Mol Plant Microbe Interact*; **15**: 109-119.
- Brito, B., Marena, M., Barberis, P., Boucher, C., Genin, S. (1999). *prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by *PrhA* in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol*; **31**: 237-251.
- Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., Vanderley, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.)-model food legumes. *Plant Soil*; **252**: 55-128.

- Brown, I. R., Mansfield, J. W., Taira, S., Roine, E., Romantschuk, M. (2001). Immunocytochemical localization of HrpA and HrpZ supports a role for the Hrp pilus in the transfer of effector proteins from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* across the host plant cell wall. *Mol Plant Microbe Interact*; **14**: 394-404.
- Brunings, A. M., Gabriel, D. W. (2003). *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol. Plant Pathol.*; **4**: 141-157.
- Buell, C. R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I. T., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Deboy, R. T., Durkin, A. S., Kolonay, J. F., Madupu, R., Daugherty, S., Brinkac, L., Beanan, M. J., Haft, D. H., Nelson, W. C., Davidsen, T., Zafar, N., Zhou, L., Liu, J., Yuan, Q., Khouri, H., Fedorova, N., Tran, B., Russell, D., Berry, K., Utterback, T., Van Aken, S. E., Feldblyum, T. V., D'Ascenzo, M., Deng, W. L., Ramos, A. R., Alfano, J. R., Cartinhour, S., Chatterjee, A. K., Delaney, T. P., Lazarowitz, S. G., Martin, G. B., Schneider, D. J., Tang, X., Bender, C. L., White, O., Fraser, C. M., Collmer, A. (2003). The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **100**: 10181-10186.
- Burkholder, W. H. The bacterial diseases of bean: a comparative study. Ithaca: N. Y. Agric. Exp. Stn.; 1930. Report No.: 127.
- Burrack, L. S., Higgins, D. E. (2007). Genomic approaches to understanding bacterial virulence. *Curr. Opin. Microbiol.*; **10**: 4-9.
- Butterworth, J., McCartney, H. A. (1991). The dispersal of bacteria from leaf surfaces by water splash. *J. Appl. Bacteriol.*; **71**: 484-496.
- Buttner, D., Bonas, U. (2002). Getting across bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *Embo J.*; **21**: 5313-5322.
- Buttner, D., Bonas, U. (2002). Port of entry--the type III secretion translocon. *Trends Microbiol.*; **10**: 186-192.
- Buttner, D., Bonas, U. (2003). Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.*; **6**: 312-319.
- Buttner, D., Nennstiel, D., Klusener, B., Bonas, U. (2002). Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.*; **184**: 2389-2398.
- Buttner, D., Noel, L., Stuttmann, J., Bonas, U. (2007). Characterization of the nonconserved *hpaB-hrpF* region in the *hrp* pathogenicity island from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*; **20**: 1063-1074.
- Cafati, C. R., Saettler, A. W. (1980). Role of nonhost species as alternate inoculum sources of *Xanthomonas phaseoli*. *Plant Dis.*; **64**: 194-196.
- Capdevila, S., Martinez-Granero, F. M., Sanchez-Contreras, M., Rivilla, R., Martin, M. (2004). Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiology*; **150**: 3889-3897.

- Carbonnelle, E., Helaine, S., Nassif, X., Pelicic, V. (2006). A systematic genetic analysis in *Neisseria meningitidis* defines the Pil proteins required for assembly, functionality, stabilization and export of type IV pili. *Mol. Microbiol.*; **61**: 1510-1522.
- Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, R. V., Journet, E.-P., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C. L., Dénarié, J. (2000). Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. *Plant Cell*; **12**: 1647-1666.
- Cesbron, S., Paulin, J. P., Tharaud, M., Barny, M. A., Brisset, M. N. (2006). The alternative sigma factor HrpL negatively modulates the flagellar system in the phytopathogenic bacterium *Erwinia amylovora* under *hrp*-inducing conditions. *FEMS Microbiol. Lett.*; **257**: 221-227.
- Chan, J. W., Goodwin, P. H. (1999). The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol. Adv.*; **17**: 489-508.
- Chang, W. H., Lee, M. C., Yang, M. T., Tseng, Y. H. (2005). Expression of heat-shock genes *groESL* in *Xanthomonas campestris* is upregulated by CLP in an indirect manner. *FEMS Microbiol Lett*; **243**: 365-372.
- Collyn, F., Lety, M. A., Nair, S., Escuyer, V., Ben Younes, A., Simonet, M., Marceau, M. (2002). *Yersinia pseudotuberculosis* harbors a type IV gene cluster that contributes to pathogenicity. *Infect. Immun.*; **70**: 6196-6205.
- Cornelis, G. R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nat. Rev. Microbiol.*; **4**: 811-825.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*; **284**: 1318-1322.
- Cotter, S. E., Surana, N. K., St Geme, J. W., 3rd (2005). Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. *Trends Microbiol*; **13**: 199-205.
- Cottyn, B., Regalado, E., Lanoot, B., De Cleene, M., Mew, T. W., Swings, J. (2001). Bacterial populations associated with rice seed in the tropical environment. *Phytopathology*; **91**: 282-292.
- Craig, L., Pique, M. E., Tainer, J. A. (2004). Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.*; **2**: 363-78.
- Crossman, L., Dow, J. M. (2004). Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. *Microb. Infect.*; **6**: 623-629.
- Cunnac, S., Boucher, C., Genin, S. (2004). Characterization of the cis-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. *J. Bacteriol.*; **186**: 2309-2318.
- Cunnac, S., Occhialini, A., Barberis, P., Boucher, C., Genin, S. (2004). Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. *Mol Microbiol*; **53**: 115-128.

- Curtis, M. A., Slaney, J. M., Aduse-Opoku, J. (2005). Critical pathways in microbial virulence. *J. Clin. Periodontol.*; 32: 28-38.
- Côme, D., Durand, B., Jacques, R., Penon, P., Roland, J.-C. (1982). Croissance et développement. Paris, Fr: Hermann.
- da Silva, A. C., Ferro, J. A., Reinach, F. C., Farah, C. S., Furlan, L. R., Quaggio, R. B., Monteiro-Vitorello, C. B., Van Sluys, M. A., Almeida, N. F., Alves, L. M., do Amaral, A. M., Bertolini, M. C., Camargo, L. E., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L. P., Cicarelli, R. M., Coutinho, L. L., Cursino-Santos, J. R., El-Dorry, H., Faria, J. B., Ferreira, A. J., Ferreira, R. C., Ferro, M. I., Formighieri, E. F., Franco, M. C., Greggio, C. C., Gruber, A., Katsuyama, A. M., Kishi, L. T., Leite, R. P., Lemos, E. G., Lemos, M. V., Locali, E. C., Machado, M. A., Madeira, A. M., Martinez-Rossi, N. M., Martins, E. C., Meidanis, J., Menck, C. F., Miyaki, C. Y., Moon, D. H., Moreira, L. M., Novo, M. T., Okura, V. K., Oliveira, M. C., Oliveira, V. R., Pereira, H. A., Rossi, A., Sena, J. A., Silva, C., de Souza, R. F., Spinola, L. A., Takita, M. A., Tamura, R. E., Teixeira, E. C., Tezza, R. I., Trindade dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, S. M., White, F. F., Setubal, J. C., Kitajima, J. P. (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*; 417: 459-463.
- da Silva Neto, J., Koide, T., Abe, C., Gomes, S., Marques, M. (2007). Role of σ_{54} in the regulation of genes involved in type I and type IV pili biogenesis in *Xylella fastidiosa*. *Arch. Microbiol.*; <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-007-0314-x>:
- Dangl, J. L., Jones, J. D. G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*; 411: 826-833.
- Danhorn, T., Fuqua, C. (2007). Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*; 61: 654-663.
- Daniels, M. J., Barber, C. E., Turner, P. C., Cleary, W. G., Sawczyc, M. K. (1984). Isolation of mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* showing altered pathogenicity. *J. Gen. Microbiol.*; 130: 2447-2455.
- Darrasse, A., Bureau, C., Samson, R., Morris, C., Jacques, M.-A. (2007). Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. *Eur. J. Plant Pathol.*; 119: 203-215.
- Darsonval, A., Darrasse, A., Demarty, M., Bureau, C., Durand, K., Jacques, M. A. Specific interactions and molecular determinants of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* implicated in bean asymptomatic colonization. In: 5th ISTA - SHC Seed Health Symposium. Angers; 2005.
- Davey, M. E., O'Toole G, A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*; 64: 847-867.
- de Boisgrollier, H. (1993). Semences de haricots - Bilan des zones indemnes de bactérioses. *bulletin semences*; 124: 41-44.
- DebRoy, S., Thilmony, R., Kwack, Y. B., Nomura, K., He, S. Y. (2004). A family conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and

- promotes disease necrosis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **101**: 9927-9932.
- Deng, W. L., Huang, H. C. (1999). Cellular locations of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* HrcC and HrcJ proteins, required for harpin secretion via the type III pathway. *J. Bacteriol.*; **181**: 2298-2301.
- Deng, W. L., Rehm, A. H., Charkowski, A. O., Rojas, C. M., Collmer, A. (2003). *Pseudomonas syringae* Exchangeable Effector Loci: Sequence Diversity in Representative Pathovars and Virulence Function in *P. syringae* pv. *syringae* B728a. *J Bacteriol*; **185**: 2592-2602.
- Derridj, S. Nutrients on the leave surface. In: Morris CE, Nicot PC, Nguyen-The C, editors. Aerial plant surface microbiology. New York: Plenum Press; 1996.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D. X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, L., Genin, S., Marco, Y. (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*; **100**: 8024-8029.
- Deslandes, L., Pileur, F., Liaubet, L., Camut, S., Can, C., Williams, K., Holub, E., Beynon, J., Arlat, M., Marco, Y. (1998). Genetic characterization of RRS1, a recessive locus in *Arabidopsis thaliana* that confers resistance to the bacterial soilborne pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact*; **11**: 659-667.
- Desveaux, D., Singer, A. U., Dangl, J. L. (2006). Type III effector proteins: doppelgangers of bacterial virulence. *Curr. Opin. Plant Biol.*; **9**: 376-382.
- Dharmapuri, S., Sonti, R. V. (1999). A transposon insertion in the *gumG* homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causes loss of extracellular polysaccharide production and virulence. *FEMS Microbiol Lett*; **179**: 53-59.
- Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D., Siebert, P. D. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **93**: 6025-6030.
- Diggle, S. P., Crusz, S. A., Camara, M. (2007). Quorum sensing. *Curr. Biol.*; **17**: 907-910.
- Dow, J. M., Crossman, L., Findlay, K., He, Y. Q., Feng, J. X., Tang, J. L. (2003). Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **100**: 10995-1000.
- Dow, J. M., Feng, J. X., Barber, C. E., Tang, J. L., Daniels, M. J. (2000). Novel genes involved in the regulation of pathogenicity factor production within the *rpf* gene cluster of *Xanthomonas campestris*. *Microbiology*; **146**: 885-891.
- Dunger, G., Relling, V. M. (2007). Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. *Arch. Microbiol.*; **188**: 127-135.

- Fargier, E. (2007). L'étude de la pathologie de *Xanthomonas campestris* et de la structure génétique de ses pathovars a permis l'amélioration de la détection du pathogène dans les semences de Brassicacées: Université d'Angers.
- Faure, D., Dessaux, Y. (2007). Quorum sensing as a target for developing control strategies for the plant pathogen *Pectobacterium*. *Eur. J. Plant Pathol.*; **119**: 353-365.
- Feil, H., Feil, W. S., Lindow, S. E. (2007). Contribution of fimbrial and afimbrial adhesins of *Xylella fastidiosa* to attachment to surfaces and virulence to grape. *Phytopathology*; **97**: 318-324.
- Fenselau, S., Balbo, I., Bonas, U. (1992). Determinants of pathogenicity in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals. *Mol. Plant-Microbe Interact.*; **5**: 390-396.
- Fininsa, C., Tefera, T. (2001). Effect of primary inoculum sources of bean common bacterial blight on early epidemics, seed yield and quality aspects. *Int. J. Pest Managment*; **47**: 221-225.
- Fininsa, C., Yuen, J. (2002). Temporal progression of bean common bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*) in sole and intercropping systems. *Eur. J. Plant Pathol.*; **108**: 485-495.
- Flor, H. H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annu Rev Phytopathol*; **9**: 275-296.
- Fouhy, Y., Lucey, J. F., Ryan, R. P., Dow, J. M. (2006). Cell-cell signaling, cyclic di-GMP turnover and regulation of virulence in *Xanthomonas campestris*. *Res. Microbiol.*; **157**: 899-904.
- Fouts, D. E., Abramovitch, R. B., Alfano, J. R., Baldo, A. M., Buell, C. R., Cartinhour, S., Chatterjee, A. K., D'Ascenzo, M., Gwinn, M. L., Lazarowitz, S. G., Lin, N.-C., Martin, G. B., Rehm, A. H., Schneider, D. J., van Dijk, K., Tang, X., Collmer, A. (2002). Genomewide identification of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **99**: 2275-2280.
- Galan, J. E., Collmer, A. (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*; **284**: 1322-1328.
- Gambodgi, P. (1983). Seed transmission of *Fusarium oxysporum*: Epidemiology and control. *Seed Sci. Technol.*; **11**: 815-827.
- Gamliel, A., Katan, J. (1992). Chemotaxis of fluorescent *Pseudomonads* towards seed exudates and germinating-seeds in solarized soil. *Phytopathology*; **82**: 328-332.
- Garcia, A. J., Lopes, J. R. S., Beretta, M. J. G. (1997). Population survey of leafhopper vectors of *Xylella fastidiosa* in citrus nurseries, in Brazil. *Fruits*; **52**: 371-374.
- Gassmann, W., Dahlbeck, D., Chesnokova, O., Minsavage, G. V., Jones, J. B., Staskawicz, B. J. (2000). Molecular evolution of virulence in natural field strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol*; **182**: 7053-7059.

- Geng, M., Wallrapp, C., Müller-Pillasch, F., Frohme, M., Hoheisel, J. D., Gress, T. M. (1998). Isolation of differentially expressed genes by combining representational difference analysis (RDA) and cDNA library arrays. *BioTechniques*; **25**: 434-438.
- Genin, S., Brito, B., Denny, T. P., Boucher, C. (2005). Control of the *Ralstonia solanacearum* Type III secretion system (Hrp) genes by the global virulence regulator PhcA. *FEBS Lett.*; **579**: 2077-2081.
- Genin, S., Gough, C. L., Zischek, C., Boucher, C. A. (1992). Evidence that the hrpB gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Microbiol*; **6**: 3065-3076.
- Gent, D. H., Lang, J. M., Schwartz, H. F. (2005). Epiphytic survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* on leguminous hosts and onion. *Plant Dis.*; **89**: 558-564.
- Gerhold, D., Rushmore, T., Caskey, C. T. (1999). DNA chips: promising toys have become powerful tools. *Trends Bioch. Sci.*; **24**: 168-173.
- Gilbertson, R. L., Maxwell, D. P. Common bacterial blight of bean. In: Deases of vegetables and oil seed crop.; 1992. p. 18-39.
- Gitaitis, R., Walcott, R. (2007). The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.*; **45**: 371-397.
- Goel, A. K., Rajagopal, L., Nagesh, N., Sonti, R. V. (2002). Genetic locus encoding functions involved in biosynthesis and outer membrane localization of xanthomonadin in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Bacteriol.*; **184**: 3539-3548.
- Goel, A. K., Rajagopal, L., Sonti, R. V. (2001). Pigment and virulence deficiencies associated with mutations in the *aroE* gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.*; **67**: 245-250.
- Goodman, R. N., Novacky, A. J. (1994). The hypersensitive reaction in plants to pathogens. St Paul: APS Press.
- Gourion, B., Francez-Charlot, A., Vorholt, J. A. (2008). PhyR is involved in the general stress response of *Methylobacterium extorquens* AM1. *J. Bacteriol.*; **190**: 1027-1035.
- Gourion, B., Rossignol, M., Vorholt, J. A. (1996). A proteomic study of *Methylobacterium extorquens* reveals a response regulator essential for epiphytic growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **103**: 13186-13191.
- Grant, S. R., Fisher, E. J., Chang, J. H., Mole, B. M., Dangl, J. L. (2006). Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Ann Rev Microbiol*; **60**: 425-449.
- Gueneron, M., Timmers, A. C., Boucher, C., Arlat, M. (2000). Two novel proteins, PopB, which has functional nuclear localization signals, and PopC, which has a large leucine-rich repeat domain, are secreted through the *hrp*-secretion apparatus of *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol*; **36**: 261-277.

- Guilhabert, M. R., Kirkpatrick, B. C. (2005). Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: hemagglutinin adhesins contribute to *X. fastidiosa* biofilm maturation and colonization and attenuate virulence. *Mol Plant Microbe Interact*; **18**: 856-868.
- Gunasekera, T. S., Paul, N. D. (2007). Ecological impact of solar ultraviolet-B (UV-B: 320-290nm) radiation on *Corynebacterium aquaticum* and *Xanthomonas* sp. colonization on tea phyllosphere in relation to blister blight disease incidence in the field. *Lett. Appl. Microb.*; **44**: 513-519.
- Gurlebeck, D., Thieme, F., Bonas, U. (2006). Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J. Plant Physiol.*; **163**: 233-255.
- Guttman, D. S., Vinatzer, B. A., Sarkar, S. F., Ranall, M. V., Kettler, G., Greenberg, J. T. (2002). A Functional Screen for the Type III (Hrp) Secretome of the Plant Pathogen *Pseudomonas syringae*. *Science*; **295**: 1722-1726.
- Hajri, A., Delcourt, S., Brin, C., Manceau, C., Poussier, S., Boureau, T. Détermination des répertoires d'effecteurs de type III chez divers pathovars de *Xanthomonas axonopodis*. In: 8^{ème} Rencontres Plantes-Bactéries. Aussois; 2008.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from Natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.*; **2**: 95-108.
- Hamilton, W. D., Lenton, T. M. (1998). Spora and Gaia: how microbes fly with their clouds. *Ethol. Ecol. Evol.*; **10**: 1-16.
- Hantke, K. (2005). Bacterial zinc uptake and regulators. *Curr. Opin. Plant Biol.*; **8**: 196-202.
- Harrison, J. J., Turner, R. J., Marques, L. L. R., Ceri, H. (2005). Biofilms a new understanding of microbial communities is driving a revolution in microbiology. *Am Sci*; **93**: 508-515.
- Hauck, P., Thilmony, R., He, S. Y. (2003). A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible Arabidopsis plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **100**: 8577-8582.
- He, S. Y., Nomura, K., Whittam, T. S. (2004). Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim. Biophys. Acta.*; **1694**: 181-206.
- He, Y. Q., Zhang, L., Jiang, B. L., Zhang, Z. C., Xu, R. Q., Tang, D. J., Qin, J., Jiang, W., Zhang, X., Liao, J., Cao, J. R., Zhang, S. S., Wei, M. L., Liang, X. X., Lu, G. T., Feng, J. X., Chen, B., Cheng, J., Tang, J. L. (2007). Comparative and functional genomics reveals genetic diversity and determinants of host specificity among reference strains and a large collection of Chinese isolates of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Biol.*; **8**: doi:10.1186/gb-2007-8-10-r218.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C., Ala'Aldeen, D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev*; **68**: 692-744.

- Herbers, K., Conrads-Strauch, J., Bonas, U. (1992). Race-specificity of plant resistance to bacterial spot disease determined by repetitive motifs in a bacterial avirulence protein. *Nature*; **355**: 172-174.
- Hikichi, Y., Yoshimochi, T., Tsujimoto, S., Shinohara, R., Nakaho, K., Kanda, A., Kiba, A., Ohnishi, K. (2007). Global regulation of pathogenicity mechanism of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Biotechnol.*; **24**: 149-154.
- Hirano, S. S., Charkowski, A. O., Collmer, A., Willis, D. K., Upper, C. D. (1999). Role of the Hrp type III protein secretion system in growth of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a on host plants in the field. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **96**: 9851-9856.
- Hirano, S. S., Clayton, M. K., Upper, C. D. (1994). Estimation of and temporal changes in means and variances of populations of *Pseudomonas syringae* on snap bean leaflets. *Phytopathology*; **84**: 934-940.
- Hirano, S. S., Ostertag, E. M., Savage, S. A., Baker, L. S., Willis, D. K., Upper, C. D. (1997). Contribution of the regulatory gene *lemA* to field fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.*; **63**: 4304-4312.
- Hirano, S. S., Upper, C. D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* - a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*; **64**: 624-653.
- Hotson, A., Chosed, R., Shu, H., Orth, K., Mudgett, M. B. (2003). *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Mol Microbiol*; **50**: 377-389.
- Hsu, C. H., Chu, Y. F., Argin-Soysal, S., Hahm, T. S., Lo, Y. M. (2004). Effects of surface characteristics and xanthan polymers on the immobilization of *Xanthomonas campestris* to fibrous matrices. *Journal of Food Science*; **69**: 441-448.
- Hu, R. M., Yang, T. C., Yang, S. H., Tseng, Y. H. (2005). Deduction of upstream of *Xanthomonas campestris* flagellar genes responding to transcription activation by FleQ. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **335**: 1035-1043.
- Huang, B., Whitchurch, C. B., Mattick, J. S. (2003). FimX, a multidomain protein connecting environmental signals to twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*; **185**: 843-853.
- Huang, H. C., Lin, R. H., Chang, C. J., Collmer, A., Deng, W. L. (1995). The complete *hrp* gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 includes two blocks of genes required for harpin Pss secretion that are arranged colinearly with *Yersinia* *ysc* homologs. *Mol. Plant-Microbe Interact.*; **8**: 733-746.
- Huang, J. S. (1986). Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*; **24**: 141-157.
- Hueck, C. J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*; **62**: 379-433.

- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W., Reverchon, S. (1996). Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu. Rev. Microbiol.*; **50**: 213-257.
- International Seed Testing Association. ISTA validated method 7-021: Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* on *Phaseolus vulgaris*. In; 2007.
- Jackson, R. W., Athanassopoulos, E., Tsiamis, G., Mansfield, J. W., Sesma, A., Arnold, D. L., Gibbon, M. J., Murillo, J., Taylor, J. D., Vivian, A. (1999). Identification of a pathogenicity island, which contains genes for virulence and avirulence, on a large native plasmid in the bean pathogen *Pseudomonas syringae* pathovar *phaseolicola*. *Microbiology*; **96**: 10875-10880.
- Jacobs, J. L., Carroll, T. L., Sundin, G. W. (2005). The role of pigmentation, ultraviolet radiation tolerance, and leaf colonization strategies in the epiphytic survival of phyllosphere bacteria. *Microb Ecol*; **49**: 104-113.
- Jacobs, J. L., Sundin, G. W. (2001). Effect of solar UV-B radiation on a phyllosphere bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.*; **67**: 5488-5496.
- Jacques, M. A., Josi, K., Darrasse, A., Samson, R. (2005). *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. *Appl. Environ. Microbiol.*; **71**: 2008-2015.
- Jacques, M. A., Morris, C. E. (1995). A review of issues related to the quantification of bacteria from the phyllosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.*; **18**: 1-14.
- Jurkevitch, E. J., Shapira, G. (2000). Structure and colonization dynamics of epiphytic bacterial communities and of selected component strains on tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaves. *Microb. Ecol.*; **40**: 300-308.
- Jyot, J., Dasgupta, N., Ramphal, R. (2002). *FleQ*, the major flagellar gene regulator in *Pseudomonas aeruginosa*, binds to enhancer sites located either upstream or atypically downstream of the RpoN binding site. *J. Bacteriol.*; **184**: 5251-5260.
- Kaiser, D. (2007). Bacterial swarming: a re-examination of cell-movement patterns. *Curr. Biol.*; **17**: 561-570.
- Kaiser, W. J., Vakili, N. G. (1978). Insect transmission of pathogenic xanthomonads to bean and cowpea in Puerto Rico. *Phytopathology*; **68**: 1057-1063.
- Kang, Y., Liu, H., Genin, S., Schell, M. A., Denny, T. P. (2002). *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Mol. Microbiol.*; **46**: 427-437.
- Katzen, F., Ferreira, D. U., Oddo, C. G., Ielmini, M. V., Becker, A., Puhler, A., Ielpi, L. (1998). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. *J. Bacteriol.*; **180**: 1607-1617.
- Kaufman, P. H., Leben, C. (1974). Soybean bacterial blight: Flower inoculation studies. *Phytopathology*; **64**: 329-331.

- Kay, S., Boch, J., Bonas, U. (2005). Characterization of AvrBs3-like effectors from a Brassicaceae pathogen reveals virulence and avirulence activities and a protein with a novel repeat architecture. *Mol Plant Microbe Interact*; **18**: 838-848.
- Kearney, B., Ronald, P. C., Dahlbeck, D., Staskawicz, B. J. (1988). Molecular basis for evasion of plant host defence in bacterial spot disease of pepper. *Nature*; **332**: 541-543.
- Kearney, B., Staskawicz, B. J. (1990). Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene *avrBs2*. *Nature*; **346**: 385-386.
- Keller, L., Surette, M. G. (2006). Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat. Rev. Microbiol.*; **4**: 249-258.
- Kelly, J. D., Gepts, P., Miklas, P. N., Coyne, D. P. (2003). Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field Crops Res.*; **82**: 135-154.
- Kim, J. G., Park, B. K., Yoo, C. H., Jeon, E., Oh, J., Hwang, I. (2003). Characterization of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Hrp pathogenicity island. *J. Bacteriol.*; **185**: 3155-3166.
- Kim, S.-H., De Hertoqh, A. A., Nelson, P. V. (1999). Effects of plant growth regulators applied as sprays or media drenches on forcing of Dutch-grown bleeding heart as a flowering potted plant. *HortTechnol.*; **9**: 629-633.
- Kinkel, L. L. (1997). Microbial population dynamics on leaves. *Annu. Rev. Phytopathol.*; **35**: 327-347.
- Kocks, Zadoks, Ruissen (1999). Spatio-temporal development of black rot (*X. campestris* pv. *campestris*) in cabbage in relation to initial inoculum levels in field plots in The Netherlands. *Plant Pathology*; **48**: 176-188.
- Koebnik, R., Kruger, A., Thieme, F., Urban, A., Bonas, U. (2006). Specific Binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-Type Transcriptional Activator HrpX to Plant-Inducible Promoter Boxes. *J. Bacteriol.*; **188**: 7652-7660.
- Koutsoudis, M. D., Tsaltas, D., Minogue, T. D., Von Bodman, S. B. (2006). Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **103**: 5983-5988.
- Kremer, R. J. (1987). Identity and properties of bacteria inhabiting seeds of selected broadleaf weed species. *Microb. Ecol.*; **14**: 29-37.
- Krimm, U., Abanda-Nkwatt, D., Schwab, W., Schreiber, L. (2005). Epiphytic microorganisms on strawberry plants (*Fragaria ananassa* cv. *Elsanta*): identification of bacterial isolates and analysis of their interaction with leaf surfaces. *FEMS Microbiol. Ecol.*; **53**: 483-492.
- Kuan, T.-L., Minsavage, G. V., Schaad, N. W. (1986). Aerial dispersal of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from naturally infected *Brassica campestris*. *Plant Disease*; **70**: 409-413.

- Kuhnert, P., Nicolet, J., Frey, J. (1995). Rapid and accurate identification of *Escherichia coli* K-12 strains. *Appl. Environ. Microbiol.*; **61**: 4135-4139.
- Kvitko, B. H., Ramos, A. R., Morello, J. E., Oh, H.-S., Collmer, A. (2007). Identification of harpins in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, which are functionally similar to HrpK1 in promoting translocation of type III secretion system effectors. *J. Bacteriol.*; **189**: 8059-8072.
- Lahaye, T., Bonas, U. (2001). Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. *Trends Plant Sci*; **6**: 479-485.
- Lam, E., Kato, N., Lawton, M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*; **411**: 848-853.
- Latasa, C., Solano, C., Penades, J. R., Lasa, I. (2006). Biofilm-associated proteins. *C. R. Biol.*; **329**: 849-857.
- Laurent, E. (1990). Deux années d'expérience sur la production française de semences de haricots indemnes de grasse: ça marche! *Bulletin fnams semences*; **111**: 53-54.
- Lavie, M., Seunes, B., Prior, P., Boucher, C. (2004). Distribution and sequence analysis of a family of type III-dependent effectors correlate with the phylogeny of *Ralstonia solanacearum* strains. *Mol. Plant-Microbe Interact.*; **17**: 931-940.
- Lavie, M., Shillington, E., Eguiluz, C., Grimsley, N., Boucher, C. (2002). PopP1, a new member of the YopJ/AvrRxv family of type III effector proteins, acts as a host-specificity factor and modulates aggressiveness of *Ralstonia solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact*; **15**: 1058-1068.
- Lazo, G. R., Gabriel, D. W. (1987). Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology*; **77**: 448-453.
- Leach, J. E., Vera Cruz, C. M., Bai, J., Leung, H. (2001). Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annu Rev Phytopathol*; **39**: 187-224.
- Leach, J. E., Vera Cruz, C. M., Bai, J., Leung, H. (2001). Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annu. Rev. Phytopathol.*; **39**: 187-224.
- Leben, C. (1988). Relative humidity and the survival of epiphytic bacteria with buds and leaves of cucumber plants. *Phytopathology*; **78**: 179-185.
- Lee, B. M., Park, Y. J., Park, D. S., Kang, H. W., Kim, J. G., Song, E. S., Park, I. C., Yoon, U. H., Hahn, J. H., Koo, B. S., Lee, G. B., Kim, H., Park, H. S., Yoon, K. O., Kim, J. H., Jung, C. H., Koh, N. H., Seo, J. S., Go, S. J. (2005). The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Res.*; **33**: 577-586.
- Lee, M. C., Weng, S. F., Tseng, Y. H. (2003). Flagellin gene *fliC* of *Xanthomonas campestris* is upregulated by transcription factor Clp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **307**: 647-652.

- Lepoivre, P. (2003). *Phytopathologie*. 1ère ed. Bruxelles: de Boeck.
- Lighthart, B. (1997). The ecology of bacteria in the alfresco atmosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.*; **23**: 263-274.
- Lighthart, B., Prier, K., Loper, G., Bromenshenk, J. (2000). Bees scavenge airborne bacteria. *Microb. Ecol.*; **39**: 314-321.
- Lindeberg, M., Cartinhour, S., Myers, C. R., Schechter, L. M., Schneider, D. J., Collmer, A. (2006). Closing the circle on the discovery of genes encoding Hrp regulon member and type III secretion system effectors in the genomes of three model *Pseudomonas syringae* strains. *Mol Plant Microbe Interact*; **19**: 1151-1158.
- Lindemann, J., Constantinidou, H. A., Barchet, W. R., Upper, C. D. (1982). Plants as sources of airborne bacteria, including ice nucleation-active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*; **44**: 1059-1063.
- Lindgren, P. B. (1997). The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.*; **35**: 129-152.
- Lindgren, P. B., Peet, R. C., Panopoulos, N. J. (1986). Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "*phaseolicola*" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. *J. Bacteriol.*; **168**: 512-522.
- Lindow, S. E. (1983). The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*; **21**: 363-384.
- Lindow, S. E., Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*; **69**: 1875-1883.
- Linke, D., Riess, T., Autenrieth, I. B., Lupas, A., Kempf, V. A. (2006). Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. *Trends Microbiol.*; **14**: 264-270.
- Liolios, K., Mavromatis, K., Tavernarakis, N., Kyrprides, N. C. (2008). The Genomes On Line Database (GOLD) in 2007: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. *Nucleic Acids Res.*; **36**: 475-479.
- Liu, R., Ochman, H. (2007). Stepwise formation of the bacterial flagellar system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **104**: 7116-7121.
- Loprasert, S., Sallabhan, R., Atichartpongkul, S., Mongkolsuk, S. (1999). Characterization of a ferric uptake regulator (*fur*) gene from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* with unusual primary structure, genome organization, and expression patterns. *Gene*; **239**: 251-258.
- Mahuku, G. S., Jara, C., Henriquez, M. A., Gastllanos, C., Cuasquer, J. (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. *J. Phytopathol.*; **154**: 35-44.
- Manceau, C., Horvais, A. Strategies for identification of oligonucleotidic sequences specific to plant pathogenic bacteria useful to design primers for PCR. In:

Manceau C, Spak J, editors. Advances in the detection of plant pathogens by polymerase chain reaction. Luxembourg: Office for official publications of the European Communities.; 1998. p. 89-97.

- Marenda, M., Brito, B., Callard, D., Genin, S., Barberis, P., Boucher, C., Arlat, M. (1998). PrhA controls a novel regulatory pathway required for the specific induction of *Ralstonia solanacearum* hrp genes in the presence of plant cells. *Mol Microbiol*; **27**: 437-453.
- 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. *Mol Plant Microbe Interact*; **15**: 637-646.
- Marx, C. J., Lidstrom, M. E. (2002). Broad-host-range cre-lox system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria. *BioTechniques*; **33**: 1062-1067.
- Mattick, J. S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.*; **56**: 289-314.
- Maude, R. B. (1996). Seedborne diseases and their control *Principles & Practice*. Oxon, UK: CAB International.
- Mazar, J., Cotter, P. A. (2006). Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Mol Microbiol*; **62**: 641-654.
- McElhaney, R., Alvarez, A. M., Kado, C. I. (1998). Nitrogen limits *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* invasion of the host xylem. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*; **52**: 15-24.
- McKellar, M. E., Nelson, E. B. (2003). Compost-induced suppression of *Pythium* damping-off is mediated by fatty-acid-metabolizing seed-colonizing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*; **69**: 452-460.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., He, S. Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*; **126**: 969-980.
- Meng, Y., Li, Y. R., Galvani, C. D., Hao, G., Turner, J. N., Burr, T. J., Hoch, H. C. (2005). Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. *J. Bacteriol.*; **187**: 5560-5567.
- Meyer, D. (2005). Etude de la virulence de du régulome de la bactérie phytopathogène *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: Université Toulouse II.
- Meyer, D., Cunnac, S., Gueneron, M., Declercq, C., Van Gijsegem, F., Lauber, E., Boucher, C., Arlat, M. (2006). PopF1 and PopF2, two proteins secreted by the type III protein secretion system of *Ralstonia solanacearum*, are translocators belonging to the HrpF/NopX family. *J Bacteriol*; **188**: 4903-4917.
- Meyer, D., Lauber, E., Roby, D., Arlat, M., Kroj, T. (2005). Optimization of pathogenicity assays to study *Arabidopsis thaliana*-*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pathosystem. *Mol. Plant Pathol.*; **6**: 327-333.
- Michael, T. E. The bean plant. In: Hall R, editor. Compendium of bean diseases. Saint Paul: APS Press; 1994. p. 1-4.

- Miklas, P. N., Coyne, D. P., Grafton, K. F., Mutlu, N., Reiser, J., Lindgren, D. T., Singh, S. P. (2003). A major QTL for common bacterial blight resistance derives from the common great northern landrace cultivar Montana No. 5. *Euphytica*; **131**: 137-146.
- Minsavage, G. V., Dahlbeck, D., Whalen, M. C., Kearney, B., Bonas, U., Staskawicz, B. J., Stall, R. E. (1990). Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* - Pepper interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.*; **3**: 41-47.
- Mkandawire, A. B. C., Mabagala, R. B., Guzman, P., Gepts, P., Gilbertson, R. L. (2004). Genetic diversity and pathogenic variation of common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) suggests pathogen coevolution with the common bean. *Phytopathology*; **94**: 593-603.
- Monier, J. M., Lindow, S. E. (2003). Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **100**: 15977-15982.
- Monier, J. M., Lindow, S. E. (2004). Frequency, size, and localization of bacterial aggregates on bean leaf surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*; **70**: 346-355.
- Montesinos, E., Bonaterra, A., Badosa, E., Francés, J., Alemany, J., Llorente, I., Moragrega, C. (2002). Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *Int. Microbiol.*; **5**: 169-175.
- Moreira, L. M., De Souza, R. F., Almeida Jr, N. F., Setubal, J. C., Oliveira, J. C., Furlan, L. R., Ferro, J. A., Da Silva, A. C. (2004). Comparative genomics analyses of Citrus-associated bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*; **42**: 163-184.
- Morris, C. E., Georgakopoulos, D. G., Sands, D. C. (2004). Ice nucleation active bacteria and their potential role in precipitation. *J. Phys. IV France*; **121**: 87-103.
- Morris, C. E., Monier, J.-M., M-A., J. (1997). Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*; **63**: 1570-1576.
- Morris, E. C., Kinkel, L. L., Xiao, K., Prior, P., Sands, D. C. (2007). Surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Infection, Genetics and Evolution*; **7**: 84-92.
- Mudgett, M. B., Staskawicz, B. J. (1999). Characterization of the *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* AvrRpt2 protein: demonstration of secretion and processing during bacterial pathogenesis. *Mol. Microbiol.*; **32**: 927-941.
- Mutlu, N., Miklas, P., Reiser, J., Coyne, D. P. (2005). Backcross breeding for improved resistance to common bacterial blight in pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Breeding*; **124**: 282-287.
- Nelson, E. B. (2004). Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. *Annu. Rev. Phytopathol.*; **42**: 271-309.

- Newman, K., Almeida, R. P. P., Purcell, A. H., Lindow, S. E. (2004). Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **101**: 1737-1742.
- Ngugi, H. K., Scherm, H. (2006). Biology of flower-infecting fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.*; **44**: 261-282.
- Noel, L., Thieme, F., Gabler, J., Buttner, D., Bonas, U. (2003). XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.*; **185**: 7092-7102.
- Noel, L., Thieme, F., Nennstiel, D., Bonas, U. (2001). cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Microbiol.*; **41**: 1271-1281.
- Normander, B., Prosser, J. I. (2000). Bacterial origin and community composition in the barley phytosphere as a function of habitat and presowing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*; **66**: 4372-4377.
- O'Garro, L. W., Gibbs, H., Newton, A. (1997). Mutation in the *avrBs1* avirulence gene of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* influences survival of the bacterium in soil and detached leaf tissue. *Phytopathology*; **87**: 960-966.
- Ochiai, H., Inoue, H., Takeya, M., Sasaki, A., Kaku, H. (2005). Genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* suggests contribution of large numbers of effector genes and insertion sequences to its race diversity. *Japan Agr. Res. Quarterly*; **39**: 275-287.
- Ojanen-Reuhs, T., Kalkkinen, N., Westerlund-Wikstrom, B., van Doorn, J., Haahtela, K., Nurmiaho-Lassila, E. L., Wengelnik, K., Bonas, U., Korhonen, T. K. (1997). Characterization of the *fimA* gene encoding bundle-forming fimbriae of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.*; **179**: 1280-1290.
- Okinaka, Y., Yang, C.-H., Perna, N. T., Keen, N. T. (2002). Microarray profiling of *Erwinia chrysanthemi* 3937 genes that are regulated during plant infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.*; **15**: 619-629.
- Orth, K., Xu, Z., Mudgett, M. B., Bao, Z. Q., Palmer, L. E., Bliska, J. B., Mangel, W. F., Staskawicz, B., Dixon, J. E. (2000). Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science*; **290**: 1594-1597.
- Paranjpye, R. N., Strom, M. S. (2005). A *Vibrio vulnificus* type IV pilin contributes to biofilm formation, adherence to epithelial cells, and virulence. *Infect. Immun.*; **3**: 1411-1422.
- Petnicki-Ocwieja, T., van Dijk, K., Alfano, J. R. (2005). The *hrpK* operon of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 encodes two proteins secreted by the type III (Hrp) protein secretion system: HopB1 and HrpK, a putative type III translocator. *J. Bacteriol.*; **187**: 649-663.
- Pizarro-Cerda, J., Cossart, P. (2006). Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*; **124**: 715-727.

- Poplawsky, A. R., Chun, W. (1997). *pigB* determines a diffusible factor needed for extracellular polysaccharide slime and xanthomonadin production in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J. Bacteriol.*; **179**: 439-444.
- Poplawsky, A. R., Chun, W. (1998). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* requires a functional *pigB* for epiphytic survival and host infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.*; **11**: 466-475.
- Poplawsky, A. R., Chun, W., Slater, H., Daniels, M. J., Dow, J. M. (1998). Synthesis of extracellular polysaccharide, extracellular enzymes, and Xanthomonadin in *Xanthomonas campestris*: Evidence for the involvement of two intercellular regulatory signals. *Mol. Plant-Microbe Interact.*; **11**: 68-70.
- Poplawsky, A. R., Urban, S. C., Chun, W. (2000). Biological role of xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Appl. Environ. Microbiol.*; **66**: 5123-5127.
- Poplawsky, A. R., Walters, D. M., Rouviere, P. E., Chun, W. (2005). A gene for a dioxygenase-like protein determines the production of the DF signal in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Molecular Plant Pathology*; **6**: 653-657.
- Powell, A. A., Matthews, S. (1978). Damaging effect of water on dry pea embryos during imbibition. *J. Exp. Bot.*; **29**: 1215-1229.
- Powell, A. A., Matthews, S. (1981). A physical explanation for solute leakage from dry pea embryos during imbibition. *J. Exp. Bot.*; **32**: 1045-1050.
- Pozidis, C., Chalkiadaki, A., Gomez-Serrano, A., Stahlberg, H., Brown, I. R., Tampakaki, A. P., Lustig, A., Sianidis, G., Politou, A. S., Engel, A., Panopoulos, N. J., Mansfield, J. W., Pugsley, A. P., Karamanou, S., Economou, A. (2003). HrcN a peripheral membrane ATPase that is activated by oligomerization. *J. Biol. Chem.*; **278**: 25816-25824.
- Puhler, A., Arlat, M., Becker, A., Gottfert, M., Morrissey, J. P., O'Gara, F. (2004). What can bacterial genome research teach us about bacteria-plant interactions? *Curr. Opin. Plant Biol.*; **7**: 137-147.
- Qian, W., Jia, Y., Ren, S. X., He, Y. Q., Feng, J. X., Lu, L. F., Sun, Q., Ying, G., Tang, D. J., Tang, H., Wu, W., Hao, P., Wang, L., Jiang, B. L., Zeng, S., Gu, W. Y., Lu, G., Rong, L., Tian, Y., Yao, Z., Fu, G., Chen, B., Fang, R., Qiang, B., Chen, Z., Zhao, G. P., Tang, J. L., He, C. (2005). Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res.*; **15**: 757-767.
- Rademaker, J. L., Hoste, B., Louws, F. J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P., de Bruijn, F. J. (2000). Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*; **50**: 665-677.
- Ramey, B. E., Koutsoudis, M., Von Bodman, S. B., Fuqua, C. (2004). Biofilm formation in plant-microbe associations. *Curr. Opin. Microbiol.*; **7**: 602-609.

- Randhawa, P. S., Singh, N. J., Schaad, N. W. (1987). Bacterial flora of cotton seeds and biocontrol of seedling blight caused by *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Seed Sci. Technol.*; **15**: 65-70.
- Raskin, D. M., Seshadri, R., Pukatzki, S. U., Mekalanos, J. J. (2006). Bacterial genomics and pathogen evolution. *Cell*; **124**: 703-714.
- Rasmussen, T. B., Manefield, M., Anderson, J. B., Eberl, L., Anthoni, U., Christophersen, C., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Givskov, M. (2000). How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiology*; **146**: 3237-3244.
- Ratledge, C., Dover, L. G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*; **54**: 881-941.
- Ray, S. K., Rajeshwari, R., Sharma, Y., Sonti, R. V. (2002). A high-molecular-weight outer membrane protein of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* exhibits similarity to non-fimbrial adhesins of animal pathogenic bacteria and is required for optimum virulence. *Mol Microbiol*; **46**: 637-647.
- Reboutier, D., Frankart, C., Briand, J., Biligui, B., Laroche, S., Rona, J.-P., Barny, M.-A., Bouteau, F. (2007). The HrpNea harpin from *Erwinia amylovora* triggers differential responses on the nonhost *Arabidopsis thaliana* cells and on the host apple cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.*; **20**: 94-100.
- Reizer, J., Bachem, S., Reizer, A., Arnaud, M., Saier Jr, M. H., Stulke, J. (1999). Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis - the complete complement of PTS proteins encoded within the genome *Bacillus subtilis*. *Microbiology*; **145**: 3419-3429.
- Rigano, L. A., Siciliano, F., Enrique, R., Sendin, L., Filippone, P., Torres, P. S., Qüesta, J., Dow, J. M., Castagnaro, A. P., Vojnov, A. A., Marano, M. R. (2007). Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*; **20**: 1222-1230.
- Roden, J., Eardley, L., Hotson, A., Cao, Y., Mudgett, M. B. (2004). Characterization of the *Xanthomonas* AvrXv4 effector, a SUMO protease translocated into plant cells. *Mol Plant Microbe Interact*; **17**: 633-643.
- Roden, J. A., Belt, B., Ross, J. B., Tachibana, T., Vargas, J., Mudgett, M. B. (2004). A genetic screen to isolate type III effectors translocated into pepper cells during *Xanthomonas* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **101**: 16624-16629.
- Rohmer, L., Guttman, D. S., Dangl, J. L. (2004). Diverse evolutionary mechanisms shape the type III effector virulence factor repertoire in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Genetics*; **167**: 1341-1360.
- Romantschuk, M., Richter, G. Y., Mukhopadhyay, P., Mills, D. (1991). IS801, an insertion sequence element isolated from *Pseudomonas syringae* pathovar *phaseolicola*. *Mol. Microbiol.*; **5**: 617-622.
- Rosenblueth, M., Martinez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant-Microbe Interact.*; **19**: 827-837.

- Rossier, O., Van den Ackerveken, G., Bonas, U. (2000). HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Mol Microbiol*; **38**: 828-838.
- Rossier, O., Wengelnik, K., Hahn, K., Bonas, U. (1999). The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **96**: 9368-9373.
- Roumagnac, P., Pruvost, O., Chiroleu, F., Hughes, G. (2004). Spatial and temporal analyses of bacterial blight of onion caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*. *Phytopathology*; **94**: 138-146.
- Rouse, D. I., Nordhim, E. V., Hirano, S. S., Upper, C. D. (1985). A model relating the probability of foliar disease incidence to the population frequencies of bacterial plant pathogens. *Phytopathology*; **70**: 505-509.
- Rudolph, K. Infection of the plant by *Xanthomonas*. In: Swings JG, Civerolo EL, editors. *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall; 1993. p. 193-264.
- Saddler, G. S., Bradbury, J. F. (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York, NY: Springer.
- Saettler, A. W., Cafati, C. R. (1986). Nonoverwintering of *Xanthomonas* bean blight bacteria in Michigan. *Plant Dis.*; **70**: 285-287.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J. C., Cattolico, L., Chandler, M., Choisine, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguiet, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J., Boucher, C. A. (2002). Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*; **415**: 497-502.
- Sanchez, L., Merlin, C., Achouak, W. Régulation de la variation phénotypique de *Pseudomonas brassicacearum* par des petits ARNs non codants. In: 7ème rencontre Plantes-Bactéries; 2006; Aussois; 2006.
- Sauer, K. (2003). The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol.*: doi:10.1186/gb-2003-4-6-219.
- Schaad, N. W. (1980). Detection of seedborne bacterial plant pathogens. *Plant Dis.*; **66**: 885-890.
- Schaad, N. W., Dianese, J. C. (1981). Cruciferous weeds as sources of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers. *Phytopathology*; **71**: 1215-1220.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G. H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K., Vidaver, A. K. (2005). Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. rev.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp.

- nov. nom. rev.; and "var. fuscans" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*; **28**: 494-518.
- Schalk, I. J., Isabelle, J., Yue, W. W., Buchanan, S. K. (2004). Recognition of iron-free siderophores by TonB-dependent iron transporters. *Mol. Microbiol.*; **54**: 14-22.
- Scher, F. M., Kloeppe, J. W., Singleton, C. A. (1985). Chemotaxis of fluorescent *Pseudomonas* spp. to soybean seed exudates *in vitro* and in soil. *Can. J. Microbiol.*; **31**: 570-574.
- Schornack, S., Meyer, A., Römer, P., Jordan, T., Lahaye, T. (2006). Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *J. Plant Physiol.*; **163**: 256-272.
- Schulte, R., Bonas, U. (1992). A *Xanthomonas* pathogenicity locus is induced by sucrose and sulfur-containing amino acid. *Plant Cell*; **1992**: 79-86.
- Schultz, T., Gabrielson, R. L. (1986). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Western Washington crucifer seed fields: occurrence and survival. *Phytopathology*; 1306-1309.
- Schuster, M. L., Coyne, D. P. (1974). Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*; **12**: 199-221.
- Sela, S., Nestel, D., Pinto, R., Nemny-Lavy, E., Bar-Joseph, M. (2005). Mediterranean fruit fly as a potential vector of bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.*; **71**: 4052-4056.
- Shao, F., Merritt, P. M., Bao, Z. Q., Innes, R. W., Dixon, J. E. (2002). A *Yersinia* effector and a pseudomonas avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell*; **109**: 575-588.
- Shen, Y., Chern, M., Silva, F. G., Ronald, P. (2001). Isolation of a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* flagellar operon region and molecular characterization of flhF. *Mol. Plant-Microbe Interact.*; **14**: 204-213.
- Shen, Y., Ronald, P. (2002). Molecular determinants of disease and resistance in interactions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice. *Microbes and Infection*; **4**: 1361-1367.
- Shi, W., Sun, H. (2002). Type IV pilus-dependent motility and its possible role in bacterial pathogenesis. *Infect. Immun.*; **70**: 1-4.
- Simon, A., Rovira, A. D., Sands, D. C. (1973). An improved selective medium for isolating fluorescent pseudomonads. *J. Appl. Bacteriol.*; **36**: 141-145.
- Simon, E. W., Mathavan, S. (1986). The time-course of leakage from imbibing seeds of different species. *Seed Sci. Technol.*; **14**: 9-13.
- Simon, E. W., Raja Harun, R. M. (1972). Leakage during seed imbibition. *J. Exp. Bot.*; **23**: 1076-1085.
- Simon, H. M., Smith, K. P., Dodsworth, J. A., Guenther, B., Handelsman, J., Goodman, R. M. (2001). Influence of tomato genotype on growth of inoculated

and indigenous bacteria in the spermosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*; **67**: 514-520.

- Simpson, A. J., Reinach, F. C., Arruda, P., Abreu, F. A., Acencio, M., Alvarenga, R., Alves, L. M., Araya, J. E., Baia, G. S., Baptista, C. S., Barros, M. H., Bonaccorsi, E. D., Bordin, S., Bove, J. M., Briones, M. R., Bueno, M. R., Camargo, A. A., Camargo, L. E., Carraro, D. M., Carrer, H., Colauto, N. B., Colombo, C., Costa, F. F., Costa, M. C., Costa-Neto, C. M., Coutinho, L. L., Cristofani, M., Dias-Neto, E., Docena, C., El-Dorry, H., Facincani, A. P., Ferreira, A. J., Ferreira, V. C., Ferro, J. A., Fraga, J. S., Franca, S. C., Franco, M. C., Frohme, M., Furlan, L. R., Garnier, M., Goldman, G. H., Goldman, M. H., Gomes, S. L., Gruber, A., Ho, P. L., Hoheisel, J. D., Junqueira, M. L., Kemper, E. L., Kitajima, J. P., Krieger, J. E., Kuramae, E. E., Laigret, F., Lambais, M. R., Leite, L. C., Lemos, E. G., Lemos, M. V., Lopes, S. A., Lopes, C. R., Machado, J. A., Machado, M. A., Madeira, A. M., Madeira, H. M., Marino, C. L., Marques, M. V., Martins, E. A., Martins, E. M., Matsukuma, A. Y., Menck, C. F., Miracca, E. C., Miyaki, C. Y., Monteriro-Vitorello, C. B., Moon, D. H., Nagai, M. A., Nascimento, A. L., Netto, L. E., Nhani, A., Jr., Nobrega, F. G., Nunes, L. R., Oliveira, M. A., de Oliveira, M. C., de Oliveira, R. C., Palmieri, D. A., Paris, A., Peixoto, B. R., Pereira, G. A., Pereira, H. A., Jr., Pesquero, J. B., Quaggio, R. B., Roberto, P. G., Rodrigues, V., de, M. R. A. J., de Rosa, V. E., Jr., de Sa, R. G., Santelli, R. V., Sawasaki, H. E., da Silva, A. C., da Silva, A. M., da Silva, F. R., da Silva, W. A., Jr., da Silveira, J. F., Silvestri, M. L., Siqueira, W. J., de Souza, A. A., de Souza, A. P., Terenzi, M. F., Truffi, D., Tsai, S. M., Tsuhako, M. H., Vallada, H., Van Sluys, M. A., Verjovski-Almeida, S., Vettore, A. L., Zago, M. A., Zatz, M., Meidanis, J., Setubal, J. C. (2000). The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* consortium of the organization for nucleotide sequencing and analysis. *Nature*; **406**: 151-159.
- Singh, S. P. (2001). Broadening the genetic base of common bean cultivars: a review. *Crop. Sci.*; **41**: 1659-1675.
- Skerker, J. M., Berg, H. C. (2001). Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **98**: 6901-6904.
- Slater, H., Alvarez-Morales, A., Barber, C. E., Daniels, M. J., Dow, J. M. (2000). A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol. Microbiol.*; **38**: 986-1003.
- Sperandio, V. (2004). Striking a balance: inter-kingdom cell-to-cell signalin, friendship or war? *Trends Immun.*; **25**: 505-507.
- Spinelli, F., Ciampolini, F., Cresti, M., Geider, K., Costa, G. (2005). Influence of stigmatic morphology on flower colonization by *Erwinia amylovora* et *Pantoea agglomerans*. *Eur. J. Plant Pathol.*; **113**: 395-405.
- Sproston, E. L., Macrae, M., Ogden, I. D., Wilson, M. J., Strachan, N. J. C. (2005). Slugs: Potential novel vectors of *Escherichia coli* 0157. *Appl. Environ. Microbiol.*; **72**: 144-149.

- Stall, R. E., Gottwald, T. R., Koizumi, R., Schaad, N. W. Ecology of plant pathogenic xanthomonads. In: Swings JGaELC, editor. *Xanthomonas*. London, UK: Chapman & Hall; 1993.
- Stall, R. E., Seymour, C. P. (1983). Canker, a threat to citrus in the Gulf-Coast States. *Plant Dis.*; **67**: 581-585.
- Staskawicz, B. J., Dahlbeck, D., Keen, N. T. (1984). Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on Glycine max (L.) Merr. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **81**: 6024-6028.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.*; **56**: 187-209.
- Sundin, G. W., Jacobs, J. L. (1999). Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field-grown peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Microb Ecol*; **38**: 27-38.
- Sutherland, I. W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*; **147**: 3-9.
- Swarup, S., Yang, Y., Kingsley, M. T., Gabriel, D. W. (1992). An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Mol Plant Microbe Interact*; **5**: 204-213.
- Swings, J. G., Vauterin, L., Kersters, K. The bacterium *Xanthomonas*. In: Swings JGaELC, editor. *Xanthomonas*. London, UK: Chapman & Hall; 1993. p. 121-156.
- Tang, J. L., Gough, C. L., Daniels, M. J. (1990). Cloning of genes involved in negative regulation of production of extracellular enzymes and polysaccharide of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Mol. Gen. Genet.*; **222**: 157-160.
- Tans-Kersten, J., Brown, D., Allen, C. (2004). Swimming motility, a virulence trait of *Ralstonia solanacearum*, is regulated by FlhDC and the plant host environment. *Mol. Plant-Microbe Interact.*; **17**: 686-695.
- Tans-Kerten, J., Huang, H. C., Allen, C. (2001). *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *J. Bacteriol.*; **183**: 3597-3605.
- Taylor, J. D., Dudley, C. L., Presly, L. (1979). Studies of halo-blight seed infection and disease transmission in dwarf bean. *Ann. App. Biol.*; **93**: 267-277.
- Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Buttner, D., Caldana, C., Gaigalat, L., Goesmann, A., Kay, S., Kirchner, O., Lanz, C., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Mittenhuber, G., Nies, D. H., Niesbach-Klosgen, U., Patschkowski, T., Ruckert, C., Rupp, O., Schneiker, S., Schuster, S. C., Vorholter, F. J., Weber, E., Puhler, A., Bonas, U., Bartels, D., Kaiser, O. (2005). Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J. Bacteriol.*; **187**: 7254-7266.
- Troisfontaines, P., Cornelis, G. R. (2005). Type III secretion: more systems than you think. *Physiology*; **20**: 326-339.

- Tsuge, S., Furutani, A., Fukunaka, R., Oku, T., Tsuno, K., Ochiai, H., Inoue, H., Kahu, H., Kubo, Y. (2002). Expression of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* *hrp* genes in XOM2, a novel synthetic medium. *J. Gen. Plant Pathol.*; **68**: 363-371.
- Underwood, W., Melotto, M., He, S. Y. (2007). Role of plant stomata in bacterial invasion. *Cell Microbiol*; **9**: 1621-1629.
- Uroz, S., Chhabra, S. R., Camara, M., Williams, P., Oger, P., Dessaux, Y. (2005). *N*-Acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by yboth amidolytic and novel oxidoreductase activities. *Microbiology*; **151**: 3313-3322.
- Uroz, S., Oger, P., Chhabra, S. R., Camara, M., Williams, K., Dessaux, Y. (2007). *N*-acyl homoserine lactones are degraded via an amidolytic activity in *Comamonas* sp. strain. *Arch. Microbiol.*; **187**: 249-256.
- Valls, M., Genin, S., Boucher, C. (2006). Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathog.*; **2**: doi:10.1371/journal.ppat.0020082.
- 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.
- van Dijk, K., Fouts, D. E., Rehm, A. H., Hill, A. R., Collmer, A., Alfano, J. R. (1999). The Avr (effector) proteins HrmA (HopPsyA) and AvrPto are secreted in culture from *Pseudomonas syringae* pathovars via the Hrp (type III) protein secretion system in a temperature- and pH-sensitive manner. *J. Bacteriol.*; **181**: 4790-4797.
- van Doorn, J., Hollinger, T. C., Oudega, B. (2001). Analysis of the type IV fimbrial-subunit gene *fimA* of *Xanthomonas hyacinthi*: application in PCR-mediated detection of yellow disease in Hyacinths. *Appl. Environ. Microbiol.*; **67**: 598-607.
- Van Gijsegem, F., Vasse, J., Camus, J. C., Marendra, M., Boucher, C. (2000). *Ralstonia solanacearum* produces *hrp*-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. *Mol. Microbiol.*; **36**: 249-260.
- Van Sluys, M. A., Monteiro-Vitorello, C. B., Camargo, L. E., Menck, C. F., Da Silva, A. C., Ferro, J. A., Oliveira, M. C., Setubal, J. C., Kitajima, J. P., Simpson, A. J. (2002). Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*; **40**: 169-189.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J. (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*; **45**: 472-489.
- Vauterin, L., Rademaker, J., Swings, J. (2000). Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology*; **90**: 677-682.
- Venisse, J.-S., Brisset, M.-N., Paulin, J. P. (2002). Modulation of defence response of *Malus* during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant Microbe Interact.*; **15**: 1204-1212.
- Vera Cruz, C. M., Bai, J., Ona, I., Leung, H., Nelson, R. J., Mew, T. W., Leach, J. E. (2000). Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment

of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **97**: 13500-13505.

- Verona, O. (1958). La spermosphere. *Ann Inst Pasteur (Paris)*; **95**: 795-803.
- Vidaver, A. K. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: cause of common bacterial blight of bean. In: Swings JG, Civerolo EL, editors. *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall; 1993. p. 40-44.
- Vivian, A., Arnold, D. L. (2000). Bacterial effector genes and their role in host-pathogen interactions. *J. Plant Pathol.*; **82**: 163-178.
- Vojnov, A. A., Slater, H., Daniels, M. J., Dow, J. M. (2001). Expression of the gum operon directing xanthan biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and its regulation *in planta*. *Mol Plant Microbe Interact*; **14**: 768-774.
- Von Bodman, S. B., Bauer, W. D., Coplin, D. L. (2003). Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*; **41**: 455-482.
- Walcott, R. R., Gitaitis, R. D., Castro, A. C. (2003). Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytopathology*; **93**: 528-534.
- Walker, T. S., Pal Bais, H., Desziel, E., Schweizer, H. P., Rahme, L. G., Fall, R., Vivanco, J. M. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* - Plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiol*; **134**: 320-331.
- Watnick, P., Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.*; **182**: 2675-2679.
- Weber, E., Berger, C., Bonas, U., Koebnik, R. (2007). Refinement of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* hrpD and hrpE operon structure. *Mol. Plant-Microbe Interact.*; **20**: 559-567.
- Weber, E., Koebnik, R. (2006). Domain structure of HrpE, the Hrp pilus subunit of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.*; **187**: 6175-6186.
- Weber, E., Koebnik, R. (2006). Positive selection of the Hrp pilin HrpE of the plant pathogen *Xanthomonas*. *J. Bacteriol.*; **188**: 1405-1410.
- Weber, E., Ojanen-Reuhs, T., Huguet, E., Hause, G., Romantschuk, M., Korhonen, T. K., Bonas, U., Koebnik, R. (2005). The type III-dependent Hrp pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with pepper host plants. *J. Bacteriol.*; **187**: 2458-2468.
- Wehling, M. D., Guo, M., Fu, Z. Q., Alfano, J. R. (2004). The *Pseudomonas syringae* HopPtoV protein is secreted in culture and translocated into plant cells via the type III protein secretion system in a manner dependent on the ShcV type III chaperone. *J Bacteriol*; **186**: 3621-3630.
- Wei, K., Tang, D. J., He, Y. Q., Feng, J. X., Jiang, B. L., Lu, G. T., Chen, B., Tang, J. L. (2007). *hpaR*, a putative marR family transcriptional regulator, is positively controlled by HrpG and HrpX and involved in the pathogenesis, hypersensitive response, and extracellular protease production of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *J Bacteriol*; **189**: 2055-62.

- Wei, W., Plovanich-Jones, A., Deng, W. L., Jin, Q. L., Collmer, A., Huang, H. C., He, S. Y. (2000). The gene coding for the Hrp pilus structural protein is required for type III secretion of Hrp and Avr proteins in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **97**: 2247-2252.
- Wei, Z. M., Beer, S. V. (1995). *hrpL* activates *Erwinia amylovora* *hrp* gene transcription and is a member of the ECF subfamily of sigma factors. *J. Bacteriol.*; **177**: 6201-6210.
- Wei, Z. M., Laby, R. J., Zumoff, C. H., Bauer, D. W., He, S. Y., Collmer, A., Beer, S. V. (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*; **257**: 85-88.
- Weller, D. M., Saettler, A. W. (1980). Colonization and distribution of *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in field-grown navy beans. *Phytopathology*; **70**: 500-506.
- Weller, D. M., Saettler, A. W. (1980). Evaluation of seedborne *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* as primary inocula in bean blights. *Phytopathology*; **70**: 148-152.
- Wengelnik, K., Bonas, U. (1996). *HrpXv*, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.*; **178**: 3462-3469.
- Wengelnik, K., Van den Ackerveken, G., Bonas, U. (1996). HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Mol Plant Microbe Interact*; **9**: 704-712.
- West, S. A., Griffin, A. S., Gardner, A., Diggle, S. P. (2006). Social evolution theory for microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.*; **4**: 597-607.
- White, F. F., Yang, B., Johnson, L. B. (2000). Prospects for understanding avirulence gene function. *Current Opinion In Plant Biology*; **3**: 291-298.
- Wichmann, G., Bergelson, J. (2004). Effector genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* promote transmission and enhance other fitness traits in the field. *Genetics*; **166**: 693-706.
- Wichmann, G., Ritchie, D., Kousik, C. S., Bergelson, J. (2005). Reduced genetic variation occurs among genes of the highly clonal plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, including the effector gene *avrBs2*. *Appl. Environ. Microbiol.*; **71**: 2418-2432.
- Williams, P. H. (1980). Black rot: a continuing threat to world crucifers. *Plant Disease*; **64**: 736-742.
- Wylie, J. L., Worobec, E. A. (1995). The OprB porin lays a central role in carbohydrate uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*; **177**: 3021-3026.
- Yang, B., White, F. F. (2004). Diverse members of the AvrBs3/PthA family of type III effectors are major virulence determinants in bacterial blight disease of rice. *Mol Plant Microbe Interact*; **17**: 1192-1200.

- Yang, B., Zhu, W., Johnson, L. B., White, F. F. (2000). The virulence factor AvrXa7 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is a type III secretion pathway-dependent nuclear-localized double-stranded DNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **97**: 9807-9812.
- Yang, C.-H., Crowley, D. E., Borneman, J., Keen, N. T. (2001). Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **98**: 3889-3894.
- Yang, P., Vauterin, L., Vancanneyt, M., Swings, J., Kersters, K. (1993). Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.*; **16**: 47-71.
- Yang, Y., Feyter, R. d., Gabriel, D. W. (1994). Host-specific symptoms and increased release of *Xanthomonas citri* and *X. campestris* pv. *malvacearum* from leaves are determined by the 102-bp tandem repeats of *pthA* and *avrb6*, respectively. *Mol. Plant-Microbe Interact.*; **7**: 345-355.
- Yang, Y., Gabriel, D. W. (1995). Intragenic recombination of a single plant pathogen gene provides a mechanism for the evolution of new host specificities. *J Bacteriol*; **177**: 4963-4968.
- Yang, Y., Gabriel, D. W. (1995). *Xanthomonas* avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. *Mol Plant Microbe Interact*; **8**: 627-631.
- Yang, Y., Yuan, Q., Gabriel, D. W. (1996). Watersoaking function(s) of XcmH1005 are redundantly encoded by members of the *Xanthomonas avr/pth* gene family. *Mol. Plant-Microbe Interact.*; **8**: 627-631.
- Young, J. M., Dye, D. W., Bradbury, J. F., Panagopoulos, C. G., Robbs, C. F. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. In: *New Zealand Journal of Agricultural Research*; 1978. p. 153-177.
- Yu, K., Park, S. J., Poysa, V. (2000). Marker-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: efficacy and economics. *Plant Breeding*; **119**: 411-415.
- Yu, Z. H., Stall, R. E., Vallejos, C. E. (1998). Detection of genes for resistance to common bacterial blight of bean. *Crop. Sci.*; **38**: 1290-1296.
- Zaumeyer, W. J., Thomas, H. R. A monographic study of bean diseases and methods for their control.: U. S. Dep. Agric. Tech. Bull.; 1957. Report No.: 868.
- Zhao, Y., Thilmony, R., Bender, C. L., Schaller, A., He, S. A., Howe, G. A. (2003). Virulence system of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signalling pathway. *Plant J.*; **36**: 485-499.
- Zheng, X. Y., Sinclair, J. B. (1996). Chemotactic response of *Bacillus megaterium* strain B153-2-2 to soybean root and seed exudates. *Physiological and Molecular Plant Pathology*; **48**: 21-35.

- Zheng, X. Y., Sinclair, J. B. (2000). The effects of traits of *Bacillus megaterium* on seed and root colonization and their correlation with the suppression of *Rhizoctonia* root rot of soybean. *Biocontrol*; **45**: 223-243.
- Zhu, W., MaGbanua, M. M., White, F. F. (2000). Identification of Two Novel *hrp*-Associated Genes in the *hrp* Gene Cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Bacteriol.*; **182**: 1844-1853.
- Zhu, W., Yang, B., Chittoor, J. M., Johnson, L. B., White, F. F. (1998). AvrXa10 contains an acidic transcriptional activation domain in the functionally conserved C terminus. *Mol Plant Microbe Interact*; **11**: 824-832.
- Zinselmeier, C., Sun, Y. J., Helentjaris, T., Beatty, M., Yang, S., Smith, H., Habben, J. (2002). The use of gene expression profiling to dissect the stress sensitivity of reproductive development in maize. *Field Crops Res.*; **75**: 111-121.
- Zou, L. F., Wanf, X. P., Xiang, Y., Zhang, B., Li, Y. R., Xiao, Y. L., Wang, J. S., Walmsley, A. R., Chen, G. Y. (2006). Elucidation of the *hrp* clusters of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* that control the hypersensitive response in nonhost tobacco and pathogenicity in susceptible host rice. *Appl. Environ. Microbiol.*; **72**: 6212-6224.
- Zwiesler-Vollick, J., Plovanich-Jones, A. E., Nomura, K., Bandyopadhyay, S., Joardar, V., Kunkel, B. N., He, S. Y. (2002). Identification of novel *hrp*-regulated genes through functional genomic analysis of the *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 genome. *Mol Microbiol*; **45**: 1207-1218.

ETUDE DE DETERMINANTS MOLECULAIRES DE *XANTHOMONAS FUSCANS* SUBSP. *FUSCANS* IMPLIQUES DANS LA COLONISATION DE SON HOTE *PHASEOLUS VULGARIS*

Résumé

Xanthomonas fuscans subsp. *fuscans* (Xff) est l'un des agents responsables de la graise commune de haricot, bactériose transmise par les semences. A partir d'une semence contaminée, cet agent pathogène colonise les parties aériennes de son hôte sur la totalité d'un cycle cultural sans enclencher de processus infectieux ; cette colonisation asymptomatique aboutissant finalement à sa transmission à la graine. La proposition de nouvelles méthodes de lutte dirigées contre cet agent pathogène passe par une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans la colonisation de son hôte. Les objectifs de cette thèse ont été d'identifier des déterminants moléculaires de Xff et de caractériser leur rôle dans trois étapes clés de la colonisation asymptomatique du haricot: (i) colonisation de la graine et de la plantule, (ii) colonisation de la phyllosphère et (iii) transmission aux graines. Deux types de gènes candidats ont été identifiés chez Xff: (i) des gènes induits *in planta* codant le système de sécrétion de type trois (SST3) et ses effecteurs, (ii) des gènes impliqués dans les processus d'adhésion aux surfaces et de formation des biofilms, éléments clés de structuration des populations *in planta*. Des mutants ont été construits dans chacun des gènes candidats et leur comportement caractérisé *in planta*.

Contrairement à la phyllosphère, la graine de haricot en germination et les jeunes plantules ne constituent pas des environnements limitant pour la multiplication bactérienne. L'absence d'induction de réactions de défense à cette étape laisse penser que les bactéries se comportent en saprophytes et n'établissent pas de dialogue moléculaire avec la plante. La survie de Xff dans la phyllosphère du haricot dépend partiellement des régulateurs HrpG et HrpX du SST3 ; la colonisation active et la transmission aux graines par la voie vasculaire nécessitent quant à elle un SST3 fonctionnel. En situation incompatible non-hôte, *X. campestris* pv. *campestris* et ses mutants du SST3 survivent et se transmettent à la graine de haricot, mais peu fréquemment et avec de faibles tailles de populations. Les six adhésines identifiées chez Xff interviennent toutes lors de la colonisation de la phyllosphère ou pour la transmission à la graine de haricot par la voie vasculaire. La transmission à la graine par la voie florale est une voie plus générale, régulée seulement partiellement par HrpG et HrpX. Le schéma d'une vision globale et dynamique des déterminants moléculaires de la colonisation d'une plante par Xff a ainsi pu être amorcé.

TOWARD THE STUDY OF MOLECULAR DETERMINANTS OF *XANTHOMONAS FUSCANS* SUBSP. *FUSCANS* IMPLICATED IN COLONIZATION OF ITS HOST *PHASEOLUS VULGARIS*

Abstract

The seed-borne pathogen *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* (Xff) is one of the causal agents of common bacterial blight of bean. From a contaminated seed, this pathogen colonizes aerial parts of its host during an entire growing season without engaging an infectious process; this asymptomatic colonization ending finally in its transmission to the seeds. Proposition of new control strategies against this pathogenic agent needs a better knowledge of mechanisms involved in host colonization. Objectives of this thesis were to identify molecular determinants of Xff and characterize their roles in three key stages of the bean asymptomatic colonization process: (i) seed and seedling colonization, (ii) phyllosphere colonization and (iii) transmission to seeds. We identified two main types of candidate genes in Xff: (i) *in planta* induced genes coding the type three secretion system (T3SS) and its effectors, (ii) genes involved in adhesion surface and biofilm formation processes, key determinants of the *in planta* population organization. Mutants were built in each candidate gene, and then characterized for their *in planta* behavior.

The germinating seed and seedling environments do not constitute restrictive environments for the bacterial multiplication. The absence of induced defense reactions at this stage implies that bacteria behave as saprophytes and do not establish molecular dialogue with the plant. In the bean phyllosphere, Xff survival depends partially on HrpG and HrpX regulators of the T3SS; active colonization and transmission to seeds by the vascular pathway require a functional T3SS. In non-host incompatible situation, *X. campestris* pv. *campestris* and its mutants in the T3SS can survive in the phyllosphere and transmit to the seeds with lower population sizes and frequencies than in the compatible situation. The six identified adhesins in Xff get involved during phyllosphere colonization or transmission to bean seeds by the vascular pathway. The transmission to the seeds by the floral pathway is a more general pathway and is only partially regulated by HrpG and HrpX. A scheme for a global and a dynamic view of the molecular determinants implied in the colonization process of a plant by *X. fuscans* subsp. *fuscans* was engaged.