

**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER II

Ecole doctorale : **SIBAGHE**

Discipline : **Biologie Intégrative des Plantes**

Présentée et soutenue publiquement

par

Mélanie MARGUERETTAZ

Le 7 décembre 2010

**Rôle du système de sécrétion de type III SPI-1 et des
mégaenzymes NRPS dans le cycle de vie de *Xanthomonas*
albilineans, l'agent causal de l'échaudure des feuilles
de la canne à sucre**

JURY :

M. Guy CONDEMINE (Directeur de Recherche, CNRS Lyon), Rapporteur.

M. Alain GIVAUDAN (Directeur de Recherche, INRA Montpellier), Président du jury.

Mme Marie-Agnès JACQUES (Chargé de Recherche, INRA Angers), Rapporteur.

Mme Monique ROYER (Directeur de Recherche, CIRAD Montpellier), Directeur de thèse.

Remerciements

Je tiens à remercier Monique ROYER qui a encadré ce travail. Elle a toujours été de bons conseils et disponible.

Mes remerciements vont également à Marie-Agnès Jacques et Guy Condemine pour avoir accepté d'évaluer ce travail, ainsi qu'à Alain Givaudan pour m'avoir suivie au cours de cette thèse.

Je remercie la région Languedoc-Roussillon et le Cirad pour avoir co-financé cette thèse.

Merci aux membres de l'équipe 3 : Philippe, Isabelle, Stéphane et Sandrine, pour m'avoir accueillie durant ces 3 ans, ainsi que pour leurs conseils, leur aide et leur soutien. Et Philippe on est d'accord : s'il n'y a pas d'albicidine ce ne sont pas de vraies lignes blanches!! Et merci à Jérôme pour son travail sur le Spy One et sa bonne humeur au labo.

Une dédicace spéciale pour le groupe des "Tueurs de canne" avec lesquels j'ai passé de lonnnngues journées. Marie-Jo et Sandrine, heureusement que vous avez été là pour couler ces milliers de boîtes! Vous êtes définitivement les reines de la logistique. Marc, bien que tu sois parti loin, j'ai énormément apprécié nos discussions philosophiques dans la serre souvent suivies de tes disparitions mystérieuses. Et enfin Damien, qui en venant renforcer le groupe, n'a pas hésité une seconde à faire couler la sève des pauvres cannes pour la science.

A mes formidables collègues de bureau! Il faut bien avouer que j'ai vraiment eu de la chance. Philippe et Laurence, nos discussions mi-scientifiques, mi-potin me manquent encore...et merci Bernard pour tes dictées corsées. Heureusement que le Potager est là pour prolonger ces bons moments. Audrey et Pierre-o, c'est vrai on a formé un bureau de choc, c'était trop court! Quoiqu'il en soit je vous remercie tous les quatre pour votre soutien au cours de cette thèse (et les pauses sandwichs). Audrey, prépare ta poupée, la séance d'exorcisme va commencer !!

Petite pensée pour mon frère de galère qui se reconnaîtra... We did it! Ainsi que pour Mauricio et ses conseils avisés.

Je tiens à remercier mes collègues de BGPI pour la bonne humeur. Amandine et Joan pour les petites pauses entre deux manips, Emmanuel pour ses histoires plus drôles les unes que les autres. Et tous les autres trop nombreux à citer.

Merci, merci, merci à tous mes amis qui sont toujours là pour moi. Cora ! La vache ça va bientôt faire 15 ans qu'on se connaît, faudra qu'on pense à se faire engager dans le même labo un jour! Vraiment merci d'être là même depuis toutes ces années. Merci à toi aussi Marion! La Rebelle de médecine! La fêtarde de tous les instants! Ma psy aussi... Enfin merci à mes deux réunionnais préférés Willy et Tony.

Je terminerai en remerciant ma famille, ça y est c'est fini! Vous m'avez soutenu toutes ces années et c'est grâce à vous aussi, et surtout, que j'en suis là. Enfin Vincent, même si tout n'a pas été rose, tu es toujours là pour m'épauler, merci.

Cette thèse a été sponsorisée par RedBull, Picard et Rivière du Mât.

Table des matières

Liste des figures.....	10
Liste des tableaux.....	12
Abréviations.....	13
Objectifs de la thèse	15
Chapitre 1. Synthèse bibliographique.....	21
1 Les bases moléculaires des interactions plante-bactérie.....	23
1.1 Les mécanismes de défense chez les plantes.....	23
1.1.1 Les défenses préformées	23
1.1.2 Les défenses inductibles.....	24
1.1.2.1 <i>La reconnaissance de l'agent pathogène</i>	24
1.1.2.2 <i>Les réactions de défense suite à la reconnaissance d'un microorganisme</i>	24
1.1.2.3 <i>Le modèle en zigzag</i>	26
1.2 Les principaux facteurs de pathogénie chez les bactéries.....	26
1.2.1 Les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire.....	27
1.2.2 Les exopolysaccharides.....	27
1.2.3 Les structures impliquées dans la mobilité	29
1.2.3.1 <i>Le flagelle</i>	29
1.2.3.2 <i>Le pilus de type IV</i>	30
1.2.4 Les adhésines non fibrillaires.....	31
1.2.5 Les systèmes de captation du fer.....	32
1.2.6 La signalisation cellulaire	33
1.2.6.1 <i>Gènes rpf</i>	33
1.2.6.2 <i>Gènes pig</i>	35
1.2.7 Les pompes d'efflux.....	35
1.2.8 Les systèmes de sécrétion de protéines.....	37
1.2.8.1 <i>Le système de sécrétion de type I</i>	39
1.2.8.2 <i>Le système de sécrétion de type II</i>	40
1.2.8.3 <i>Le système de sécrétion de type III</i>	42
1.2.8.4 <i>Le système de sécrétion de type IV</i>	44
1.2.8.5 <i>Le système de sécrétion de type V</i>	46
1.2.8.6 <i>Le système de sécrétion de type VI</i>	48

1.2.9 Les effecteurs de virulence ou d'avirulence sécrétés par les bactéries Gram négatif phytopathogènes	49
1.2.9.1 Les effecteurs de type III	49
1.2.9.2 Un exemple d'effecteur d'avirulence sécrété par le système de sécrétion de type I	51
1.2.9.3 Les effecteurs sécrétés par des pompes d'efflux	52
2 Modes de transmission et de dissémination des bactéries phytopathogènes	53
2.1 Les bactéries phytopathogènes dans l'environnement.....	53
2.1.1 Le sol	53
2.1.2 L'eau	53
2.1.3 Les repousses et les plantes adventices	55
2.2 La colonisation épiphyte	55
2.3 La transmission par le biais d'insectes	57
3 La colonisation du xylème par les bactéries phytopathogènes.....	59
3.1 Morphologie du xylème.....	59
3.2 Composition de la sève brute.....	61
3.3 Les bactéries colonisatrices du xylème	61
3.3.1 <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	61
3.3.2 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	62
3.3.3 <i>Ralstonia solanacearum</i>	63
3.3.4 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>	64
3.3.5 <i>Xylella fastidiosa</i>	65
3.3.6 <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	65
3.3.7 <i>Xanthomonas albilineans</i>	66
3.4 Importance de l'organisation physique des vaisseaux du xylème dans la résistance à l'infection par des bactéries.....	66
3.5 Exemples de réactions de défenses produites par la plante lors d'une invasion du xylème par des bactéries	67
3.6 Exemples de facteurs de pathogénie associés à la colonisation du xylème par les bactéries	69
3.6.1 Changements de morphologie.....	70
3.6.2 La motilité	71
3.6.3 L'adhésion	71
3.6.4 Signalisation cellulaire	72

3.6.5	Enzymes de dégradation de la paroi.....	73
3.6.6	SST3 et effecteurs spécifiques à la colonisation du xylème	73
4	Présentation du pathosystème canne à sucre/ <i>Xanthomonas albilineans</i>	75
4.1	La plante : la canne à sucre	75
4.1.1	Taxonomie et cytogénétique	75
4.1.2	Origine et répartition géographique	77
4.1.3	L'importance économique	77
4.1.4	Description morphologique.....	78
4.2	La maladie : l'échaudure des feuilles	81
4.2.1	Les symptômes de la maladie	82
4.2.2	Les modes de transmission de <i>Xanthomonas albilineans</i>	84
4.2.2.1	<i>La transmission mécanique par l'homme</i>	84
4.2.2.2	<i>La transmission aérienne et la colonisation épiphyte</i>	85
4.2.3	Les méthodes de lutte	85
4.3	L'agent pathogène : <i>Xanthomonas albilineans</i>	87
4.3.1	Présentation de <i>Xanthomonas albilineans</i>	87
4.3.2	<i>Xanthomonas albilineans</i> au sein de la famille des <i>Xanthomonadaceae</i> ..	88
4.3.3	<i>Xanthomonas albilineans</i> : une bactérie limitée au xylème.....	90
4.3.4	L'albicidine	91
4.3.4.1	<i>Description</i>	91
4.3.4.2	<i>Le mode d'action</i>	92
4.3.5	La diversité génétique de <i>Xanthomonas albilineans</i>	92
5	Etat de l'art sur l'étude de la pathogénie de <i>Xanthomonas albilineans</i>	95
5.1	Méthodologie.....	95
5.1.1	La mesure de la production d'albicidine	95
5.1.2	Mesure du pouvoir pathogène de <i>Xanthomonas albilineans</i>	96
5.1.2.1	<i>La mesure de l'intensité des symptômes foliaires</i>	96
5.1.2.2	<i>La mesure de la colonisation de la canne à sucre par <i>Xanthomonas albilineans</i></i>	97
5.2	La variabilité du pouvoir pathogène	98
5.2.1	Relation entre variabilité du pouvoir pathogène et variabilité génétique de <i>Xanthomonas albilineans</i>	99

5.2.2 Relation entre la variabilité du pouvoir pathogène et la production d'albicidine	100
5.2.3 Etude de la résistance de la canne à sucre à l'échaudure des feuilles	101
5.3 Le séquençage récent du génome de <i>Xanthomonas albilineans</i> : de nouvelles perspectives	103
Chapitre 2. Etude du Système de Sécrétion de Type III SPI-1	107
1 Introduction	109
1.1 Les systèmes de sécrétion de type III.....	109
1.1.1 Description générale.....	109
1.1.2 Différentes familles de systèmes de sécrétion de type III.....	110
1.2 Le système de sécrétion de type III SPI-1	111
1.2.1 Structure et fonctionnement	111
1.2.2 Le SST3 SPI-1 chez les bactéries associées aux insectes ou aux mammifères.....	112
1.2.3 Le SST3 SPI-1 chez les bactéries phytopathogènes	113
1.2.4 Objectifs de l'étude du SST3 SPI-1 de <i>Xanthomonas albilineans</i> présentée dans ce chapitre.....	113
2 Article	114
3 Conclusion et perspectives	181
Chapitre 3. Etude du rôle des gènes NRPS	185
1 Introduction	187
1.1 Métabolites secondaires : définitions et généralités	187
1.2 Les peptides non ribosomiaux : diversité et rôles possibles dans la pathogénie..	188
1.2.1 La biosynthèse non ribosomale source de diversité.....	188
1.2.2 Les phytotoxines	189
1.2.2.1 La coronatine	189
1.2.2.2 La syringoline	190
1.2.2.3 La syringomycine	190
1.2.2.4 La tabtoxine.....	191
1.2.2.5 La phaséolotoxine	191
1.2.2.6 La thaxtomine.....	192

1.2.2.7 <i>L'albicidine</i>	192
1.3 Les " NonRibosomal Peptide Synthetases "	193
1.3.1 Structure et fonctionnement d'une NRPS	193
1.3.1.1 <i>Domaine A ("Adenylation")</i>	195
1.3.1.2 <i>Domaine PCP ("Peptidyl Carrier Protein")</i>	196
1.3.1.3 <i>Domaine C ("Condensation")</i>	197
1.3.1.4 <i>Domaine TE ("Thioesterase")</i>	198
1.3.1.5 <i>Domaines optionnels intervenant dans les modifications de la structure de l'acide aminé incorporé</i>	198
1.3.1.6 <i>Exemples de gènes de modification responsables de la maturation et du transport du peptide assemblé</i>	199
1.3.2 L'analyse <i>in silico</i> des gènes NRPS peut renseigner sur la nature du peptide synthétisé.....	201
1.4 <i>Xanthomonas albilineans</i> possède plusieurs gènes NRPS	203
1.4.1 L'albicidine, déterminant majeur de la pathogénie chez <i>Xanthomonas albilineans</i>	203
1.4.2 Les gènes de biosynthèse de l'albicidine	203
1.4.3 L'analyse <i>in silico</i> des gènes NRPS de biosynthèse de l'albicidine contribue à une meilleure connaissance de la structure de cette molécule.....	205
1.4.4 Les autres gènes NRPS de <i>Xanthomonas albilineans</i> ont-ils un rôle dans la pathogénie ?	205
2 Article	207
3 Conclusion et perspectives	253
Chapitre 4. Discussion et perspectives	254
Références bibliographiques	254

Liste des figures

Figure 1. Modèle en zigzag illustrant les interactions plante-agent pathogène.	25
Figure 2. Représentation schématique d'un modèle d'autoinduction du signal DSF.	34
Figure 3. Représentation schématique des différentes familles de pompes d'efflux MDR.	37
Figure 4. Le système de sécrétion de type II.	41
Figure 5. Le système de sécrétion de type III.	43
Figure 6. Le système de sécrétion de type IV.	45
Figure 7. Le système de sécrétion de type V.	47
Figure 8. Le système de sécrétion de type VI.	49
Figure 9. Cycle de vie hypothétique de <i>Pseudomonas syringae</i> lié à l'eau.	54
Figure 10. Visualisation de <i>Pseudomonas syringae</i> sur la surface de feuilles de haricot.	56
Figure 11. Observation en microscopie confocale d'une coupe transversale au niveau d'un entre-noeud de canne à sucre.	59
Figure 12. Représentation schématique de l'anatomie des tiges de dicotylédones et de monocotylédones.	60
Figure 13. Symptômes sur feuilles de riz provoqués par <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	62
Figure 14. Lésions chlorotiques et/ou nécrotiques provoquées par <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	63
Figure 15. Flétrissement de feuilles de tomate provoqué par <i>Ralstonia solanacearum</i>	64
Figure 16. A. Symptômes foliaires provoqués par <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i> . B. Exsudats de gomme au niveau de tiges de canne à sucre infectées par <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>	64
Figure 17. A. Symptômes provoqués par <i>Xylella fastidiosa</i> . B. <i>Homalodisca vitripennis</i>	65
Figure 18. Rougissements de tige causés par <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	66
Figure 19. A. Coupe transversale de tige de canne à sucre infectée par <i>Xanthomonas albilineans</i> . B. Observation microscopique de <i>Xylella fastidiosa</i> enrobée d'une substance inconnue dans un vaisseau du xylème de la vigne.	68
Figure 20. A. Petites et grandes colonies de <i>Xanthomonas albilineans</i> observées sur milieu de culture. B. Colonies de <i>Xylella fastidiosa</i> lisses et ondulées observées <i>in planta</i>	70
Figure 21. Observation en microscopie à balayage d'une souche sauvage et d'une souche <i>hxfA</i> de <i>Xylella fastidiosa</i> à l'intérieur du xylème de la vigne.	72
Figure 22. Aires de production de la canne à sucre et zones géographiques contaminées par l'échaudure des feuilles de la canne à sucre.	76
Figure 23. Caractéristiques anatomiques et morphologiques de la canne à sucre.	79
Figure 24. Symptômes d'échaudure de feuilles de la canne à sucre.	83
Figure 25. <i>Xanthomonas albilineans</i>	87

Figure 26. Arbre MLSA obtenu pour neuf espèces de <i>Xanthomonadaceae</i> avec les séquences concaténées des gènes de ménage <i>gyrB</i> , <i>atpD</i> , <i>dnaK</i> , <i>efp</i> , <i>groEL</i> , <i>glnA</i> et <i>recA</i>	89
Figure 27. A. Observation par microscopie électronique à transmission d'un vaisseau de protoxylème d'une feuille de canne à sucre envahie par des cellules de <i>Xanthomonas albilineans</i> . B. Observation par microscopie confocale d'une souche de <i>Xanthomonas albilineans</i> gfp dans le xylème d'une feuille de canne à sucre.....	90
Figure 28. Bioessais de production d'albicidine réalisés <i>in vitro</i>	95
Figure 29. Symptômes provoqués par la souche GPE PC73 de <i>Xanthomonas albilineans</i> sur canne à sucre.....	96
Figure 30. Positionnement des différentes zones de prélèvements lors des analyses des cannes à sucre inoculées avec <i>Xanthomonas albilineans</i>	98
Figure 31. Populations bactériennes et symptomatologie associée chez six variétés de canne à sucre trois mois après inoculation des tiges avec trois souches de <i>Xanthomonas albilineans</i>	102
Figure 32. Comparaison de la structure du flagelle bactérien avec la structure des injectisomes des familles Ysc et Hrp.	110
Figure 33. Modèle de translocation des effecteurs de type III par le SST3 SPI-1.....	112
Figure 34. Structures similaires de l'acide jasmonique et de la coronatine.	189
Figure 35. Représentation schématique de pores formés à travers la membrane plasmique et stabilisés par des molécules de syringomycine.....	190
Figure 36. Représentation schématique du fonctionnement d'une "NonRibosomal Peptide Synthetase".....	194
Figure 37. Modèle des voies de biosynthèse de l'albicidine et prédiction du squelette de la molécule.....	204

Liste des tableaux

Tableau 1. Comparaison des caractéristiques génétiques, phénotypiques et de pathogénie de 20 souches de <i>Xanthomonas albilineans</i>	100
Tableau 2. Présence/absence dans le génome de la souche GPE PC73 de <i>Xanthomonas albilineans</i> de gènes codant les facteurs de pathogénie.	104
Tableau 3. Modèle prédictif du code non ribosomal.....	196

Abréviations

A : Adenylation
ABC : ATP Binding Cassette
ACP : Acyl Carrier Protein
AcpS : Acyl carrier protein Synthase
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AL : Acyl-CoA Ligase
AT : Acyltransférase
ATP : Adénosine Triphosphate
C: Condensation
CDS : protein-coding sequence
CFA : Acide Coronafique
CMA : Acide Coronamique
CWDE : Cell-Wall Degrading Enzyme
DSF : Diffusible Signal Factor
EPS : Exopolysaccharide
ETI : Effector-Triggered Immunity
HR : Hypersensitive Response
Hrp : Hypersensitive response and pathogenicity
KR : Ketoreductase
KS : Ketoacylsynthase
LPS : Lipopolysaccharide
LRR : Leucin Rich Repeat
MAMP : Microbe-Associated Molecular Patterns
MATE : Multiple And Toxic-compound Extrusion
MDR : MultiDrug Resistance
MFS : Major Facilitator Super family
MFP : Membrane Fusion Protein
MLSA : MultiLocus Sequence Analysis
NRPS : NonRibosomal Peptide Synthetase.
OMP : Outer Membrane Protein
pb : paire de bases
PCP : Peptidyl Carrier Protein
Ppant : Phosphopantéthéinyl
PAIs : Pathogenicity Islands
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns
PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis

Objectifs de la thèse

Xanthomonas albilineans est une bactérie pathogène de la canne à sucre qui occupe une niche particulière : le xylème. Peu d'informations sont connues sur son écologie (mode naturel d'infection, vie en dehors du xylème, ...) ou sur les déterminants moléculaires de sa pathogénie. L'étude de son génome a permis de confirmer que *X. albilineans* est une bactérie originale au regard des autres espèces de *Xanthomonas*. La découverte de plusieurs clusters de gènes spécifiques à cette bactérie pathogène de la canne à sucre ouvre de nouvelles perspectives pour mieux comprendre son mode de vie et sa pathogénie.

Contrairement aux autres espèces de *Xanthomonas*, *X. albilineans* ne possède pas de système de sécrétion de type III de la famille Hrp ("Hypersensitive response and pathogenicity") (SST3 Hrp) dont la fonction est d'injecter des effecteurs protéiques directement dans les cellules végétales. L'absence remarquable de SST3 Hrp dans le génome de *X. albilineans* laisse supposer que cette bactérie fait appel à des facteurs de pathogénie originaux. Le principal facteur de pathogénie connu à ce jour chez *X. albilineans* en est un premier exemple : l'albicidine est une phytotoxine dont le mode d'action est original (l'albicidine inhibe l'ADN gyrase des proplastides et bloque ainsi leur différenciation en chloroplastes), comme ses voies de biosynthèse (elles font intervenir des mégaenzymes de la famille des NRPS "NonRibosomal Peptide Synthetases" particulières). Les recherches menées par notre équipe au cours des dernières années ont permis de montrer que la pathogénie de *X. albilineans* ne repose pas uniquement sur la production d'albicidine. En effet, il a été démontré que (i) la production d'albicidine est une condition nécessaire mais pas suffisante pour l'expression des symptômes de la maladie et (ii) la variabilité de pathogénie observée chez *X. albilineans* n'est pas liée à une variabilité de production de l'albicidine.

Le séquençage récent du génome de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* a permis de révéler la présence, en plus des trois gènes NRPS de biosynthèse de l'albicidine, de neuf nouveaux gènes NRPS dont la fonction est inconnue. Au total, les gènes NRPS représentent 4% de la taille du génome de *X. albilineans*. L'absence

remarquable de SST3 Hrp et la présence de ces gènes NRPS dans le génome de *X. albilineans* suggèrent que les interactions de cette bactérie avec la canne à sucre pourraient reposer sur des petites molécules produites par voie non ribosomale. En effet, ces petites molécules pourraient être sécrétées par *X. albilineans* au niveau du xylème et atteindre leurs cellules cibles par diffusion. Une fois dans la cellule végétale, ces petites molécules joueraient le rôle d'effecteurs. Leur fixation à une ou plusieurs protéines de la canne à sucre empêcherait la mise en place des mécanismes de défense de la plante ou modifierait la physiologie de la cellule végétale afin de favoriser la multiplication de la bactérie dans le xylème.

La transmission de *X. albilineans* est essentiellement liée à l'utilisation de boutures de canne à sucre infectées ou de matériel de coupe contaminé. Cependant, il a été mis en évidence, dans certaines conditions environnementales, une contamination par voie aérienne de la canne à sucre par *X. albilineans* et une survie épiphyte de la bactérie à la surface des feuilles de la plante hôte. Néanmoins, peu d'éléments sur la vie de *X. albilineans* en dehors de la canne à sucre sont connus. Le séquençage du génome de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* a révélé la présence d'un système de sécrétion SST3 de la famille SPI-1 ("*Salmonella* Pathogenicity Island-1"). Les SST3 SPI-1 permettent aux bactéries d'interagir avec un hôte animal. Plus précisément, ils permettent l'injection d'effecteurs protéiques dans le cytoplasme de cellules animales. La présence de ce système dans le génome de *X. albilineans* pourrait indiquer l'existence d'une association de cette bactérie avec un animal (un insecte par exemple). Cette association, qui reste à démontrer, pourrait jouer un rôle important dans l'écologie de *X. albilineans*.

Ce travail de thèse vise à étudier de nouveaux gènes mis en évidence lors de l'analyse du génome de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* : (i) le cluster de gènes codant le SST3 SPI-1 et (ii) les neuf nouveaux gènes NRPS dont la fonction reste inconnue.

Une synthèse bibliographique constituera le premier chapitre. Cette synthèse présentera les bases moléculaires des interactions plante-bactérie, avec une attention particulière concernant les bactéries du xylème. Les différents modes de dissémination

des bactéries phytopathogènes seront également abordés avant de présenter le pathosystème *X. albilineans*/canne à sucre sur lequel porte cette étude.

Le second chapitre sera consacré à la description et à l'étude du SST3 SPI-1 de *X. albilineans*. Ce chapitre décrira (i) la comparaison du cluster de gènes SST3 SPI-1 de *X. albilineans* avec celui de *Burkholderia pseudomallei*, (ii) la construction de mutants de *X. albilineans* incapables d'assembler ce SST3 SPI-1 et l'analyse de la capacité de ces mutants à se multiplier dans la canne à sucre, (iii) le criblage d'une collection de bactéries phytopathogènes pour la présence du SST3 SPI-1 de *X. albilineans* et, pour finir, (iv) l'étude de la variabilité du SST3 SPI-1 dans une population représentative de la diversité génétique de *X. albilineans*. L'ensemble des résultats obtenus fait l'objet d'un article accepté pour publication dans la revue *Molecular Plant-Microbe Interactions*.

Le troisième chapitre sera consacré à la description et à l'étude des gènes NRPS de *X. albilineans*. Ce chapitre décrira (i) l'analyse *in silico* des gènes NRPS et la prédiction de la nature des peptides synthétisés par ces NRPS, (ii) la construction d'un mutant de *X. albilineans* incapable d'activer les NRPS et l'étude de la capacité de ce mutant à se multiplier dans la canne à sucre, (iii) la découverte dans le génome d'une souche africaine de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* d'un cluster de gènes NRPS très proche d'un des clusters de gènes de *X. albilineans*, et (iv) la construction d'un mutant de *X. oryzae* pv. *oryzae* incapable d'activer les NRPS et l'étude de la capacité de ce mutant à infecter le riz. L'ensemble des résultats obtenus fait l'objet d'un article dont la soumission pour publication dans la revue *Molecular Plant-Microbe Interactions* est prévue en 2011.

La dernière partie de ce travail de thèse sera consacrée à la discussion et aux perspectives envisagées dans le cadre de la poursuite de ces travaux.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

1 Les bases moléculaires des interactions plante-bactérie

Les interactions entre les microorganismes phytopathogènes et leurs plantes hôtes sont de nature très complexe. En réponse à l'attaque d'un microorganisme, les plantes utilisent un arsenal de défense que le microorganisme s'attache à son tour à contourner par l'utilisation d'un ensemble de facteurs de pathogénie.

Avant de présenter les facteurs moléculaires permettant aux bactéries d'infecter les plantes, je présenterai brièvement les mécanismes de défense mis en place par les plantes pour se protéger des microorganismes.

1.1 Les mécanismes de défense chez les plantes

Les plantes sont soumises à de nombreuses agressions par divers microorganismes envers lesquels elles ont développé plusieurs stratégies de reconnaissance et de défense. On distingue les défenses préformées présentes et actives hors infection, et les défenses inductibles activées lors d'une attaque par un microorganisme pathogène.

1.1.1 Les défenses préformées

Les défenses préformées regroupent les mécanismes de défense mis en place par les plantes avant l'attaque par un microorganisme. Elles regroupent d'une part les barrières physiques qui sont développées au niveau de la paroi végétale (cutine, subérine, cire) qui limitent la germination des spores fongiques ou l'entrée de bactéries pathogènes dans la plante (Nawrath 2006). D'autre part, elles font appel à des barrières chimiques qui interfèrent avec la multiplication des microorganismes. On observe ainsi la production de phytoalexines (composés antimicrobiens) et de métabolites secondaires (Morrissey et Osbourn 1999; van Loon et al. 2006) présents de manière constitutive en quantité variable dans la cellule. Des gènes de défense [codant en particulier des protéines PR ("Pathogenesis-Related protein"), protéines liées à la pathogénie ayant des fonctions diverses comme celle de protéase] sont également exprimés dans les tissus avant infection (Vergne et al. 2010).

1.1.2 Les défenses inductibles

1.1.2.1 **La reconnaissance de l'agent pathogène**

La reconnaissance d'un agent pathogène par la plante induit la transduction d'un signal qui va déclencher des réactions de défense. La plante utilise deux stratégies de reconnaissance des microorganismes pathogènes.

Stratégie 1 : La première stratégie se traduit par une reconnaissance des microorganismes pathogènes de manière aspécifique. L'identification du microorganisme se fait par le biais de PAMPs ("Pathogen-Associated Molecular Patterns") ou plus généralement de MAMPs ("Microbe-Associated Molecular Patterns"). Plusieurs molécules bactériennes peuvent être reconnues comme par exemple la flagelline, les lipopolysaccharides (LPS), le peptidoglycane ou encore le facteur d'élongation Tu (EF-Tu) (He et al. 2007; Boller et Felix 2009). Cette reconnaissance active la PTI ("PAMP-Triggered Immunity"). Dans le cas de la flagelline, il a été montré qu'un peptide de 22 acides aminés, flg22, suffit à l'induction des réponses de la plante. Les PAMPs sont généralement nécessaires à l'agent pathogène qui ne peut donc pas s'en débarrasser (par exemple le flagelle est déterminant pour la motilité), et ils ne sont pas spécifiques d'un seul microorganisme. Ces molécules, dites élicitrices, sont reconnues par des récepteurs PRRs ("Pattern Recognition Receptors") chez la plante.

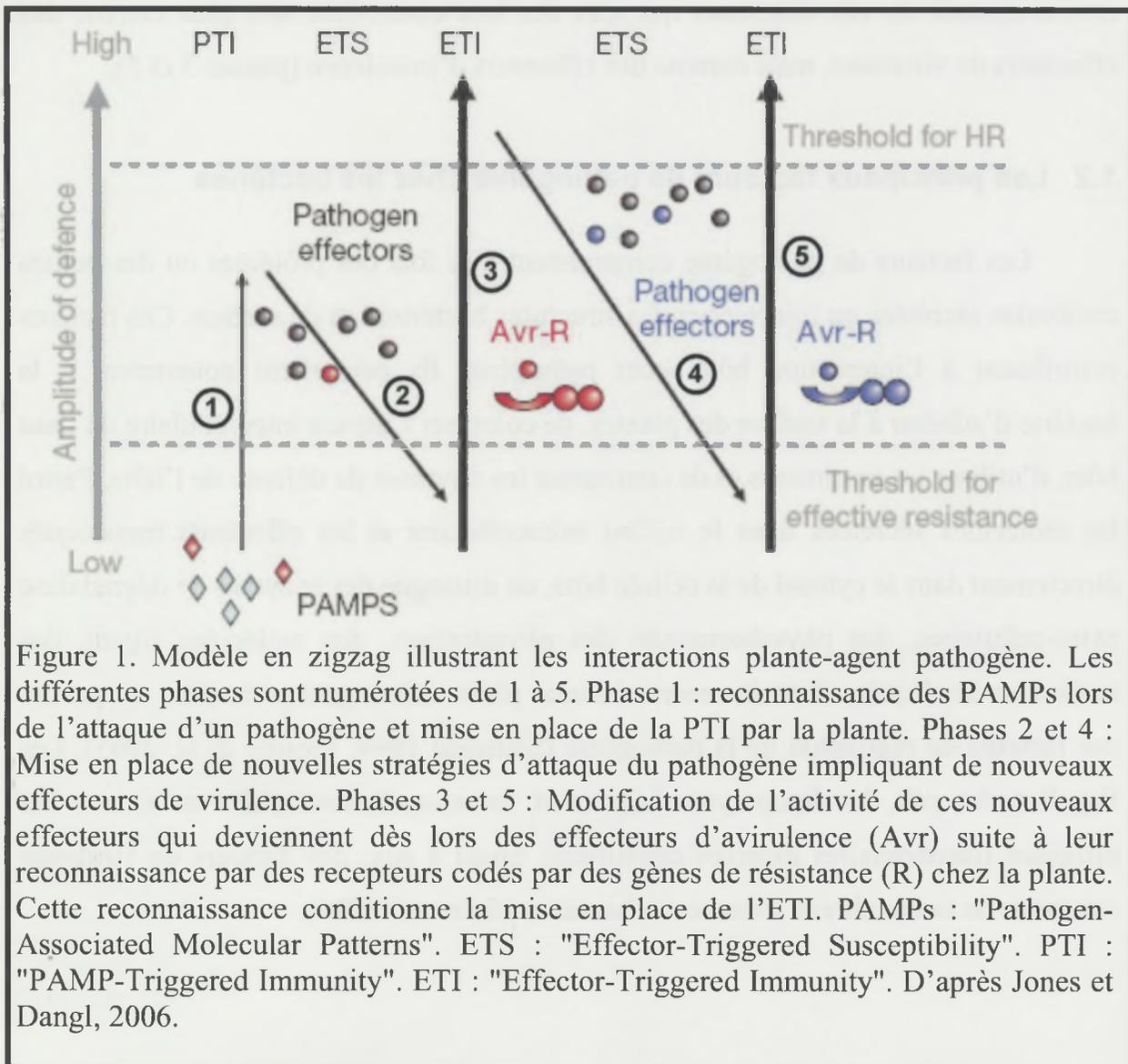
Stratégie 2 : L'identification du microorganisme se fait de manière spécifique. Des récepteurs reconnaissent des facteurs d'avirulence provenant des agents pathogènes. Cette reconnaissance induit l'ETI ("Effector-Triggered Immunity"), aussi appelée la résistance gène-pour-gène (Flor 1971). Les interactions gène pour gène dépendent du patrimoine génétique des deux partenaires (un gène d'avirulence chez le microorganisme auquel correspond un gène de résistance spécifique chez la plante).

1.1.2.2 **Les réactions de défense suite à la reconnaissance d'un microorganisme**

La reconnaissance de PAMPs (PTI) ou d'effecteurs d'avirulence (ETI) (stratégies 1 et 2) déclenche les mêmes mécanismes de défense. Elle initie la voie des MAPKs ("Mitogen-Activated Protein Kinases"), aboutissant à l'activation de facteurs de transcription, notamment ceux de type WRKY. Les facteurs de transcription de type

WRKY possèdent un domaine de liaison à l'ADN particulier (domaine WRKY) qui comprend une structure en doigt de zinc et la séquence en acides aminés WRKYGQK. Les facteurs de transcription activés par la voie des MAPKs déclenchent les réactions de défense de la plante : (i) production de ROS (Reactive Oxygen Species), (ii) dépôt de callose, (iii) biosynthèse de molécules anti-microbiennes telles les phytoalexines, et (iv) expression des protéines PR (Abramovitch et al. 2006).

La reconnaissance d'un facteur d'avirulence par la protéine codée par le gène de résistance correspondant chez la plante (relation gène pour gène) provoque une réaction d'hypersensibilité (HR) qui aboutit à une mort cellulaire. La HR est une nécrose rapide et localisée dont le but est de limiter la multiplication du microorganisme pathogène (Dangl et al. 1996).



1.1.2.3 Le modèle en zigzag

Le modèle en zigzag illustré sur la figure 1 propose une co-évolution des mécanismes de défense de la plante et des stratégies d'attaque du microorganisme. Selon ce modèle, la plante développe un mécanisme de défense en réponse à l'attaque du microorganisme (phase 1 du modèle), obligeant ce dernier à mettre en place une nouvelle stratégie d'attaque (phase 2) à laquelle la plante répond à son tour par la mise en place de nouveaux mécanismes de défense (phase 3), et ainsi de suite (phases 2 et 3 = phases 4 et 5) (Chisholm et al. 2006; Jones et Dangl 2006).

Les microorganismes produisent des effecteurs de virulence capables de moduler les mécanismes de défense de la plante hôte (phases 2 et 4). L'adaptation de la plante se traduit par le déclenchement des mécanismes de défense suite à la reconnaissance de ces effecteurs qui sont dès lors considérés, non plus comme des effecteurs de virulence, mais comme des effecteurs d'avirulence (phases 3 et 5).

1.2 Les principaux facteurs de pathogénie chez les bactéries

Les facteurs de pathogénie comprennent à la fois des protéines ou des petites molécules sécrétées ou injectées et des structures bactériennes de surface. Ces facteurs contribuent à l'interaction hôte-agent pathogène. Ils permettent notamment à la bactérie d'adhérer à la surface des plantes, de coloniser l'espace intercellulaire du tissu hôte, d'utiliser les nutriments et de contourner les réponses de défense de l'hôte. Parmi les molécules sécrétées dans le milieu extracellulaire et les effecteurs transloqués directement dans le cytosol de la cellule hôte, on distingue des enzymes de dégradation extra-cellulaires, des phytohormones, des phytotoxines, des molécules signal, des molécules impliquées dans la reconnaissance plante hôte-agent pathogène ou encore des facteurs de régulation de la pathogénie (Salmond 1994; Preston et al. 2005). Les flagelles, les pili, les lipopolysaccharides et les exopolysaccharides ou encore les protéines membranaires externes constituent, quant à eux, des facteurs de virulence solidaires de la membrane externe des bactéries (Salmond 1994).

1.2.1 Les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire

La plupart des bactéries phytopathogènes produisent de nombreuses enzymes extracellulaires capables de dégrader la paroi cellulaire des plantes. Ces protéines sont dénommées CWDE pour "Cell-Wall-Degrading Enzymes" et ont pour rôle essentiel la dégradation des polysaccharides (cellulose, hémicellulose et pectine) et de la lignine qui composent les parois cellulaires des végétaux. Des gènes codant ces enzymes de dégradation extracellulaires ont été mis en évidence chez toutes les bactéries phytopathogènes Gram négatif dont les génomes ont été séquencés récemment, bien que le nombre et les combinaisons de ces enzymes varient très fortement entre les espèces (Van Sluys et al. 2002). Ces gènes codent des pectines estérases, des polygalacturonases, des xylanases, des pectate lyases, des cellulases ou encore des pectinases (Simpson et al. 2000; Da Silva et al. 2002; Salanoubat et al. 2002; Monteiro-Vitorello et al. 2004; Lee et al. 2005). Les CWDE sont nécessaires pour la virulence des bactéries, mais elles peuvent activer les réponses de défense des plantes. En effet, la dégradation de la paroi végétale par l'agent pathogène stimule chez la plante la biosynthèse d'enzymes anti-microbiennes, la production de phytoalexines ou la déposition de callose. Elle provoque également une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène en créant un "burst oxydatif" et l'apparition de la mort cellulaire programmée (Aparna et al. 2009).

1.2.2 Les exopolysaccharides

Les exopolysaccharides (EPS) sont des polysaccharides sécrétés à l'extérieur de la cellule bactérienne. Ils sont extrêmement variables dans leur composition et donc dans leurs propriétés chimiques et physiques (Leigh et Coplin 1992). Les EPS jouent un rôle important dans la virulence, la colonisation de la plante hôte et la survie des bactéries phytopathogènes. Dans certains cas, comme chez l'espèce *Xylella fastidiosa*, responsable de la maladie de Pierce chez la vigne, ils contribuent au blocage des vaisseaux du xylème (Roper et al. 2007a). Les EPS participent également à l'adhésion des bactéries entre-elles et à une surface, et contribuent ainsi à la formation de biofilms qui sont connus pour jouer un rôle important dans la protection des communautés

bactériennes contre les antibiotiques, la dessiccation ou les défenses de l'hôte (de Souza et al. 2002; Osiro et al. 2004). La formation de ces biofilms est contrôlée par des signaux de cellule à cellule et des mécanismes de quorum sensing (Parsek et Singh 2003; Smith et Iglewski 2003).

X. fastidiosa et la plupart des espèces de *Xanthomonas* produisent des EPS particuliers qui sont connus sous le nom de gomme xanthane. La forte valeur commerciale du xanthane a été à l'origine de nombreux travaux pour le décryptage des gènes et la compréhension des voies de biosynthèse de cette substance, notamment chez *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Harding et al. 1995; Chou et al. 1997). La biosynthèse du xanthane chez les *Xanthomonas* est codée par 12 gènes appelés *gumB* à *gumM*. Ces gènes sont regroupés en un cluster unique de 16 kb au sein duquel chaque gène possède une fonction associée à la biosynthèse ou l'export du xanthane (Harding et al. 1995). Les études de mutations au sein de l'opéron *gum* ont montré que le xanthane joue un rôle essentiel dans la virulence. Des mutations dans les gènes *gum* impliqués dans les derniers stades de biosynthèse de cette molécule se traduisent par une réduction d'agressivité de *X. campestris* et *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* envers leurs hôtes respectifs, voire une perte complète du pouvoir pathogène chez *X. oryzae* pv. *oryzae* si on abolit totalement la biosynthèse de xanthane (Chou et al. 1997; Katzen et al. 1998). Chez *X. oryzae* pv. *oryzae* et *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, les EPS ont un rôle primordial dans l'adhésion et la survie des bactéries à la surface des feuilles (Dharmapuri et Sonti 1999; Dunger et al. 2007). Ce cluster de gènes est extrêmement conservé entre deux espèces de *Xanthomonas* telles que *X. axonopodis* pv. *citri* et *X. campestris* pv. *campestris*, avec près de 98% de similarité en acides aminés (Da Silva et al. 2002). En revanche, lorsque ces espèces sont comparées avec la souche de *X. fastidiosa* 9a5c, les similarités sont plus faibles, avec des valeurs comprises entre 65% et 83%. Chez *X. fastidiosa*, l'absence des gènes *gumG*, *gumI* et *gumL*, impliqués dans l'élongation et la modification du polymère de xanthane, résulte en l'absence du résidu mannose terminal (Roper et al. 2007a). Il a été suggéré que cette différence pourrait expliquer l'adaptation de cette bactérie à la transmission par un vecteur insecte (Moreira et al. 2004).

1.2.3 Les structures impliquées dans la mobilité

1.2.3.1 Le flagelle

Le flagelle est très répandu chez les procaryotes. Il permet aux bactéries d'être plus compétitives vis-à-vis des autres microorganismes et facilite leur recherche de nutriments en leur permettant de se mouvoir. Cependant, les systèmes flagellaires jouent également un rôle très important dans l'adhésion aux substrats, la formation de biofilms et l'invasion de l'hôte par la bactérie phytopathogène (Moens et Vanderleyden 1996).

Le flagelle possède une structure filamenteuse impliquée dans la motilité nataoire ("swimming motility") ou dans la motilité par essaimage ("swarming motility") de la bactérie, lorsqu'elle se trouve respectivement en milieu liquide ou sur des surfaces solides. Il constitue également un système d'export pour les protéines impliquées dans la biosynthèse de ce filament. Les flagelles sont des structures complexes composées d'un long filament hélicoïdal ancré dans la membrane cellulaire grâce à un "crochet" flexible et un corps basal complexe. Le filament du flagelle est constitué d'un tube creux composé d'un très grand nombre de copies d'une protéine unique, la flagelline, qui est polymérisée en une hélice complexe. Le mouvement du flagelle est contrôlé au niveau du corps basal par les différentes parties du moteur flagellaire, composé de trois protéines (MacNab 1996). Les gènes impliqués dans la biosynthèse et l'assemblage du flagelle sont souvent organisés en opérons au sein d'un même cluster comme c'est le cas chez *Ralstonia solanacearum* (Tans-Kersten et al. 2001). Les clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse et l'assemblage du flagelle contiennent également des gènes codant des protéines impliquées dans le chimiotactisme (Moreira et al. 2004). La plupart des bactéries phytopathogènes possède un tel cluster (Tans-Kersten et al. 2001; Da Silva et al. 2002; Buell et al. 2003; Monteiro-Vitorello et al. 2004; Lee et al. 2005), à l'exception de *X. fastidiosa* qui n'est pas flagellée (Simpson et al. 2000).

1.2.3.2 Le pilus de type IV

Le pilus de type IV (PT4) est une structure fibrillaire présente au pôle de certaines bactéries Gram négatif qui est essentielle à la virulence de beaucoup de bactéries. Le PT4 est impliqué dans une forme particulière de mobilité, appelée "twitching motility" qui permet à la bactérie de se déplacer sur des surfaces solides et humides. La "twitching motility" résulte de l'alternance de phases d'extension, d'adhésion à une surface et de rétractation du pilus (Wall et Kaiser 1999). La voie de biosynthèse et d'assemblage du PT4 fait intervenir plusieurs gènes tels *pilA* codant la piline, et *pilD* codant une enzyme de clivage qui permet la formation de la molécule finale de piline (Mattick 2002). La piline est ensuite assemblée en un polymère pour former un filament polaire flexible (Genin et Boucher 2004). Chez les bactéries animales telles que *Pseudomonas aeruginosa*, chez qui il a été initialement décrit, le PT4 intervient dans des fonctions diverses telles que l'adhésion, l'agrégation, la formation des biofilms, le développement multicellulaire, la pathogénie et finalement la "twitching motility".

L'importance et le rôle du PT4 dans la pathogénie des bactéries phytopathogènes semblent variables selon les organismes considérés. Chez *R. solanacearum*, une mutation dans le gène *pilA* se traduit par une diminution de la virulence de cet agent pathogène dans les plants de tomate (Kang et al. 2002). De même, chez *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*, une mutation du gène *pilA* conduit à une diminution du pouvoir pathogène de la bactérie sur plants de haricot (Darsonval et al. 2009). En revanche, chez *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* et *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, des mutations dans le gène *fimA* (homologue de *pilA*) ont montré que celui-ci est davantage responsable de l'agrégation de cellule à cellule et de la protection contre le stress environnemental que de l'adhésion ou de la colonisation de la surface des plantes (Ojanen-Reuhs et al. 1997; Roine et al. 1998).

1.2.4 Les adhésines non fibrillaires

Les protéines d'adhésion non fibrillaires sécrétées dans le milieu extracellulaire ont été très largement décrites et étudiées chez les bactéries humaines et animales, étant donnée leur importance dans la pathogénie de ces organismes. Ces protéines sont sécrétées dans le milieu extérieur à travers la double membrane des bactéries Gram négatif *via* le système de sécrétion de type V (Henderson et Nataro 2001; Van Sluys et al. 2002).

Les protéines d'adhésion non fibrillaires sont caractérisées par des régions riches en glycine et des tailles importantes, généralement supérieures à 2500 acides aminés, soit huit fois la taille moyenne des protéines bactériennes (Van Sluys et al. 2002). Chez plusieurs espèces de *Xanthomonas*, les protéines d'adhésion XadA et XadB ont été identifiées (des "Xanthomonas adhesin-like protein" proches de YadA de *Yersinia* spp.) (Da Silva et al. 2002; Lee et al. 2005). Chez *X. oryzae* pv. *oryzae*, XadA est impliquée dans la colonisation de la feuille et l'attachement à sa surface (Das et al. 2009). Les souches de *X. fastidiosa* possèdent un grand nombre de gènes codant des adhésines et des hémagglutinines. Ceci est probablement lié au fait que *X. fastidiosa* est présente à la fois dans les plantes hôtes et dans ses insectes vecteurs. Elle doit pouvoir interagir de manière spécifique avec les différentes surfaces cellulaires (Chatterjee et al. 2008b). Parmi les hémagglutinines et adhésines non fimbriales potentiellement présentes chez la souche Temecula 1 de *X. fastidiosa*, HxfA, HxfB et XadA ont été décrites. XadA et HxfB contribueraient surtout à l'attachement initial des bactéries sur les surfaces (Chatterjee et al. 2008b). D'autres protéines d'adhésion identifiées ou putatives, telles que FhaB et YapH, relatives aux hémagglutinines ou aux hémolysines, ont été identifiées d'abord chez *X. fastidiosa*, puis chez *R. solanacearum* et chez certains membres des *Xanthomonadaceae*. Les gènes codant ces protéines sont en nombre variable chez ces différents agents pathogènes (Van Sluys et al. 2002). Chez *X. fuscans* subsp. *fuscans*, la mutation des gènes *pilA* (PT4), *fhab*, *xadA1*, *xhadA2* et *yapH*, entraîne une altération dans la capacité d'adhésion, de colonisation et de transmission aux graines de ces différents mutants (Darsonval et al. 2009).

X. axonopodis pv. *citri* possède une protéine filamenteuse proche des hémagglutinines (protéine XaFhaB) localisée dans le voisinage de sa propre protéine de transport (XaFhaC). XaFhaB et XaFhaC forment un système TPS, pour "Two-Partner Secretion" (Gottig et al. 2009). Des analyses fonctionnelles ont permis de montrer que XaFhaB est impliqué dans la virulence et la colonisation des agrumes par la bactérie. Les mutants de XaFhaB semblent avoir perdu leur faculté d'adhésion et de formation de biofilms et ne sont capables d'entraîner que quelques lésions mineures et dispersées de la maladie chez la plante hôte (Gottig et al. 2009).

1.2.5 Les systèmes de captation du fer

Le fer ferrique (Fe^{3+}) est un élément essentiel à toute forme de vie. Pour les bactéries vivant *in planta*, le fer est un facteur de croissance limitant (Expert et al. 1996). Pour capter le fer présent dans leur environnement, les bactéries sécrètent des systèmes de captation et d'assimilation nommés sidérophores (Wandersman et Delepelaire 2004). Ces sidérophores ont la capacité de se lier au Fe^{3+} extracellulaire en formant un complexe sidérophores/ Fe^{3+} . Les sidérophores peuvent être produits par voie ribosomale mais également par voie non ribosomale (Voir Chapitre 3) comme dans le cas de la yersibactine produite par *Yersinia pestis* (Bearden et al. 1997) ou de la pyoverdine produite par les *Pseudomonas* (Oves-Costales et al. 2009).

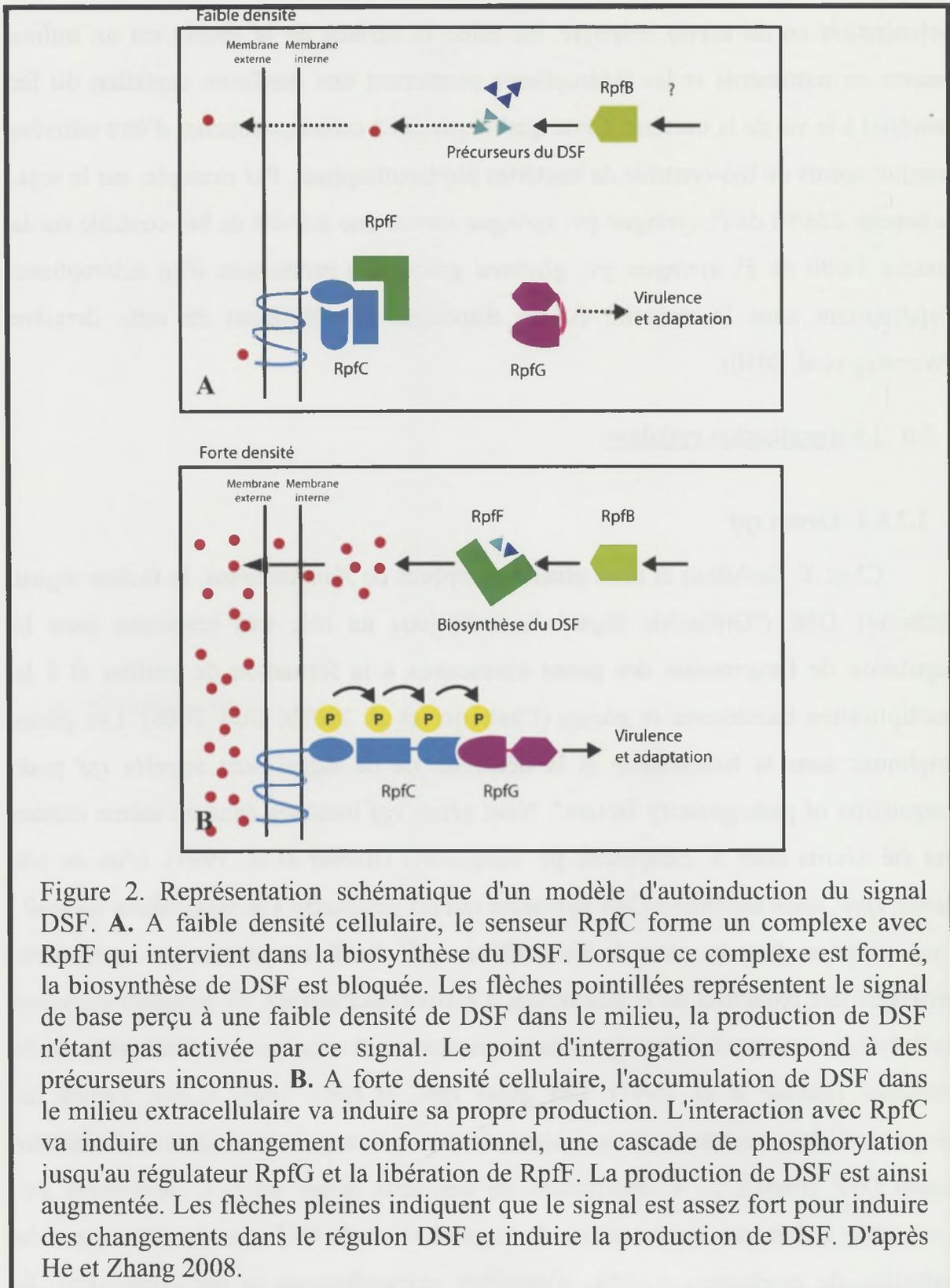
La capture du Fe^{3+} par les sidérophores se fait par un processus énergétique qui implique des récepteurs/transporteurs de la membrane externe comme les protéines TonB, ExbB et ExbD1 (Schalk et al. 2004). De par leur fonction, les sidérophores ont souvent un rôle de facteur de virulence chez les bactéries. Chez *X. campestris* pv. *campestris*, des mutants affectés dans les gènes *tonB*, *exbB* et *exbD1* qui codent des protéines impliquées dans l'acquisition du fer sont incapables de provoquer la maladie chez le chou (Wiggerich et Puhler 2000; Blanvillain et al. 2007). Une étude menée chez *Dickeya dadantii* a mis en évidence que le sidérophore nommé chrysobactine est indispensable à la virulence de la bactérie car déterminante pour la multiplication bactérienne et la production d'acide salicylique, entraînant une perturbation des défenses de l'hôte (Dellagi et al. 2009). Néanmoins, les sidérophores semblent procurer un avantage certain aux bactéries les produisant lors des phases de

colonisation ou de survie épiphyte. En effet, la surface de la feuille est un milieu pauvre en nutriments et les sidérophores permettent une meilleure captation du fer essentiel à la vie de la bactérie. Cette qualité permet à certaines souches d'être utilisées comme agents de bio-contrôle de bactéries phytopathogènes. Par exemple, sur le soja, la souche 22d/93 de *P. syringae* pv. *syringae* exerce une activité de bio-contrôle sur la souche 1a/96 de *P. syringae* pv. *glycinea* grâce à la production d'un sidérophore, s'appropriant ainsi la majorité du fer disponible au détriment de cette dernière (Wensing et al. 2010).

1.2.6 La signalisation cellulaire

1.2.6.1 Gènes *rpf*

Chez *X. fastidiosa* et chez plusieurs espèces de *Xanthomonas*, le facteur signal diffusible DSF ("Diffusible Signal Factor") joue un rôle très important dans la régulation de l'expression des gènes nécessaires à la formation de biofilm et à la multiplication bactérienne *in planta* (Chatterjee et al. 2008b; Dow 2008). Les gènes impliqués dans la biosynthèse et la détection de ce signal sont appelés *rpf* pour "regulation of pathogenicity factors". Neuf gènes *rpf* localisés dans un même cluster ont été décrits chez *X. campestris* pv. *campestris* (Barber et al. 1997). L'un de ces gènes, *rpfF*, code une enoyl-CoA hydratase qui est nécessaire à la biosynthèse du DSF. Une mutation dans le gène de biosynthèse *rpfF* de *X. campestris* pv. *campestris* provoque une réduction de la production d'exopolysaccharides, de certaines enzymes hydrolytiques extracellulaires (protéases, pectinases) et entraîne une diminution de la virulence (Barber et al. 1997). Les gènes *rpfC* et *rpfG*, quant à eux, codent un récepteur à deux composantes qui assure la perception et la transduction du facteur signal DSF (Figure 2). L'interruption de ces deux gènes chez *X. campestris* pv. *campestris* induit une augmentation de la production de DSF tout en provoquant la réduction de production d'EPSs, d'enzymes extracellulaires et par conséquent, la diminution de la virulence (He et al. 2004; Wang et al. 2004). Chez *X. fastidiosa*, la



production de DSF a également été mise en évidence et l'interruption de l'expression du gène *rpjF* a permis de montrer que le DSF est indispensable à la transmission de la bactérie par son insecte vecteur (Newman et al. 2004). En l'absence de DSF, *X. fastidiosa* est incapable de produire des biofilms chez son insecte vecteur, ce qui explique pourquoi les bactéries mutées au niveau du gène *rpjF* ne sont plus transmissibles.

1.2.6.2 Gènes *pig*

La majorité des *Xanthomonas* produit des pigments de couleur jaune appelés xanthomonadines. Chez *X. campestris* pv. *campestris*, les gènes de biosynthèse de la xanthomonadine ont été identifiés. Il s'agit d'un cluster de sept gènes d'environ 25 kb contenant les gènes *pigA* à *pigG* (Poplawsky et al. 2000). Les xanthomonadines ne semblent pas être importantes pour la multiplication des bactéries à l'intérieur de la plante hôte. Toutefois, une interruption dans le gène *pigB* induit une perte de production de xanthomonadine et d'EPS, mais aussi de DF (facteur diffusible différent du DSF, mais également impliqué dans la signalisation cellulaire). Cette mutation engendre la réduction de la survie épiphyte et de l'infection naturelle de l'hôte *via* les hydathodes (Poplawsky et Chun 1998). De plus, d'autres travaux suggèrent que le DF sert de signal pour la production de xanthomonadine et d'EPS, ainsi que de molécule signal dans les phases de survie épiphyte et d'infection de l'hôte. La production de xanthomonadine et d'EPS pourrait donc jouer un rôle dans l'infection et/ou la survie épiphyte de la bactérie (Poplawsky et al. 2000).

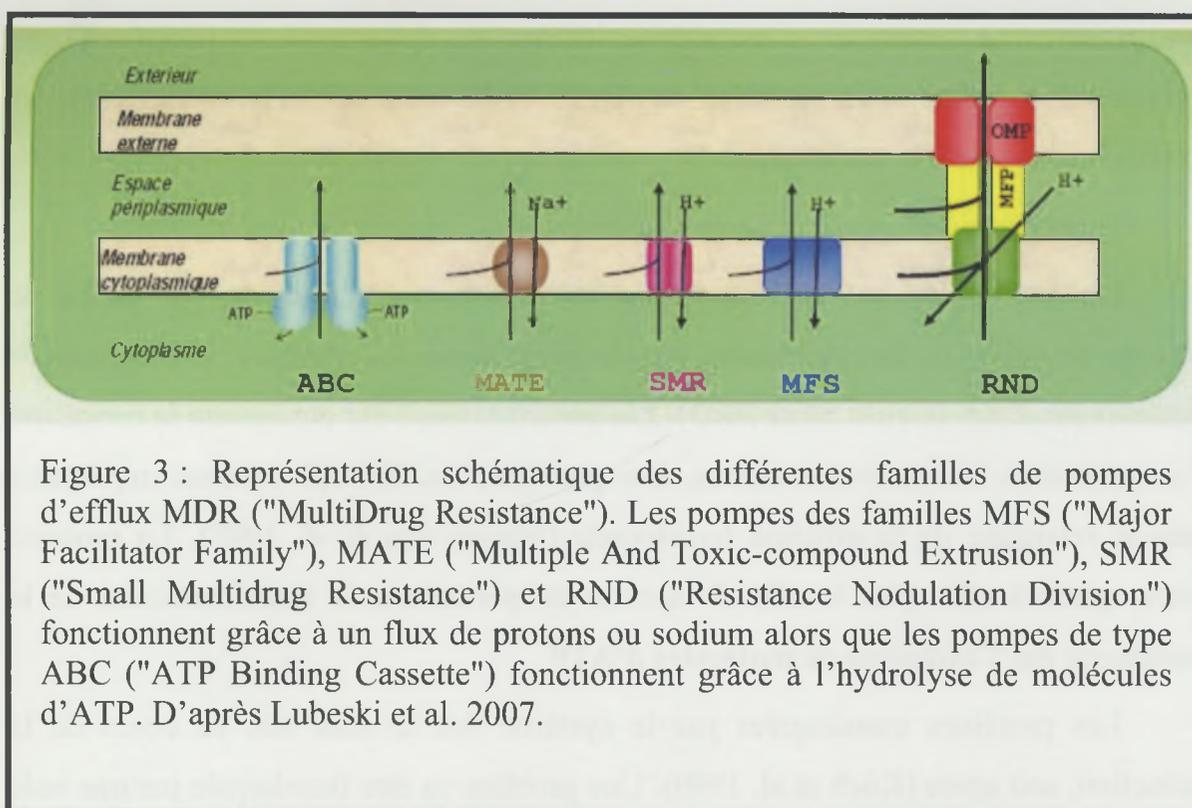
1.2.7 Les pompes d'efflux

Les bactéries peuvent exporter des protéines ou des petites molécules par exportation active grâce à des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux. Ces transporteurs jouent un rôle important chez certaines bactéries phytopathogènes en permettant la sécrétion de protéines ou de petites molécules synthétisées par la bactérie et impliquées dans la pathogénie. L'efflux est également un mécanisme de résistance universel chez toutes les cellules vivantes qui permet de refouler à l'extérieur de la cellule des composés de structure très différente, notamment des composés toxiques,

comme par exemple des antibiotiques. Les pompes d'efflux contribuent donc également indirectement à la virulence bactérienne en conférant une résistance aux antibiotiques produits par les microorganismes concurrents ou une résistance aux substances antimicrobiennes produites par les plantes. On distingue deux types de pompes d'efflux: (i) les pompes spécifiques d'une classe d'antibiotiques ou d'une famille de petites molécules et (ii) les pompes responsables de MDR ("MultiDrug Resistance").

Les pompes d'efflux spécifiques d'une famille de molécule sont constituées d'une protéine intégrée dans la membrane interne. Leur mode de fonctionnement reste peu connu, il pourrait impliquer des protéines accessoires qui permettraient aux molécules de traverser la membrane externe. La sécrétion des petites molécules synthétisées par voie non ribosomale est assurée par des pompes d'efflux spécifiques. Par exemple, l'albicidine, produite par *X. albilineans*, est sécrétée par une pompe spécifique codée par un gène présent dans le cluster de gène de biosynthèse de cette phytotoxine (Bostock et al. 2006).

Chez les bactéries Gram négatif, les pompes MDR se composent de trois types de protéines : i) une protéine intégrée dans la membrane interne qui est le moteur du système, ii) une protéine MFP ("Membrane Fusion Protein") qui joue le rôle d'adaptateur entre les deux membranes bactériennes et iii) une protéine OMP ("Outer Membrane Protein") qui forme un pore au niveau de la membrane externe et qui est aussi appelée TolC. Ces trois constituants s'assemblent en présence du substrat pour former une pompe d'efflux MDR (Thanabalu *et al.* 1998, Van Bambeke et al. 2000, Lubelski et al. 2007). Il existe cinq familles de pompes d'efflux MDR : la famille ABC ("ATP Binding Cassette"), la famille MFS ("Major Facilitator Super family"), la famille MATE ("Multiple And Toxic-compound Extrusion"), la famille SMR ("Small Multidrug Resistance") et la famille RND ("Resistance Nodulation Division"). Pour fonctionner, les pompes d'efflux utilisent l'énergie fournie par dissipation d'un gradient de protons (familles MFS, RND et SMR) ou d'ions sodium (famille MATE) ou encore par hydrolyse d'ATP (famille ABC) (Figure 3).



1.2.8 Les systèmes de sécrétion de protéines

De nombreuses protéines nécessaires à la virulence des bactéries phytopathogènes sont exportées dans l'environnement ou injectées directement dans les cellules de l'hôte grâce à des systèmes de sécrétion. Contrairement aux bactéries Gram positif qui possèdent une seule membrane biologique, les bactéries Gram négatif possèdent deux membranes biologiques asymétriques : (i) la membrane interne, également appelée membrane cytoplasmique ou périplasmique, et (ii) la membrane externe. Ces deux membranes maintiennent en "sandwich" l'espace périplasmique. Pour pouvoir traverser la paroi bactérienne, les protéines doivent franchir les deux obstacles que sont la membrane interne et la membrane externe, toutes deux hydrophobes et donc imperméables aux composés hydrophiles. Le terme "export" décrit le mouvement d'une protéine depuis le cytoplasme vers le périplasma au travers de la membrane interne, alors que la "sécrétion" décrit la translocation de la protéine dans le milieu extracellulaire (Salmond 1994). A ce jour, six systèmes de sécrétion protéiques majeurs, numérotés I à VI, ont été décrits chez les bactéries Gram négatif. Les systèmes de sécrétion de type II, IV, V et VI font intervenir des systèmes Sec (Pugsley 1993) ou Tat ("Twin-Arginine") (Voulhoux et al. 2001) pour la translocation

des protéines au travers de la membrane interne, du cytoplasme au périplasma, au contraire des systèmes de sécrétion de type I et III pour lesquels la sécrétion des protéines se fait en une seule étape.

Le système Sec

Le système Sec est une importante voie d'export des protéines qui permet le passage de celles-ci du cytoplasme vers le périplasma. Ce système se compose de plusieurs protéines (Cao et Saier 2003). Les protéines SecYEG permettent la formation d'un pore dans la membrane interne. Les protéines SecDFYajC seraient impliquées dans le relargage de la protéine transloquée (Matsuyama et al. 1993). La protéine SecA, quant à elle, joue le rôle de moteur en permettant le fonctionnement de la machinerie par l'hydrolyse de molécules d'ATP.

Les protéines transloquées par le système Sec le sont soit au cours de la traduction, soit après (Koch et al. 1999). Une protéine va être transloquée par une voie ou une autre en fonction de sa séquence signal placée en N-terminal. Cette séquence signal est constituée de trois domaines : un domaine N-terminal basique, un domaine central hydrophobe et un domaine C-terminal polaire. Cette séquence signal va permettre la reconnaissance de la protéine par le système Sec, sa translocation puis son relargage dans le périplasma. Lorsqu'une protéine est transloquée après sa traduction, elle est prise en charge par SecB qui va l'amener au système Sec en évitant sa dégradation ou son repli. SecB est éliminé lorsque la protéine est transloquée.

Une fois dans le périplasma, la protéine va perdre sa séquence signal par intervention d'une peptidase et ainsi adopter sa forme mature.

Le système Tat

Le nom Tat pour "Twin-Arginine" provient de la présence de deux arginines consécutives dans la séquence signal. En effet, la machinerie du système Tat reconnaît le motif (S-R-R-x-F-L-K) en N-terminal des protéines qui seront transloquées dans le périplasma (Muller 2005). Cette séquence signal est nécessaire à l'exportation de la protéine, et sera ensuite éliminée par une peptidase dans l'espace périplasmique. Pour être transloquées par le système Tat, les protéines doivent être sous forme repliée. Elles prennent cette conformation sous l'action de chaperonnes (Jack et al. 2004). La

machinerie Tat fait intervenir plusieurs protéines. TatA va former un pore dans la membrane interne et va interagir avec TatB et TatC qui participent à la reconnaissance de la séquence signal Tat (Lee et al. 2006).

Les six systèmes de sécrétion, numérotés de I à VI, sont conservés chez la plupart des bactéries phytopathogènes (Genin et Boucher 2004).

1.2.8.1 Le système de sécrétion de type I

Le système de sécrétion de type I (SST1) est utilisé par de nombreuses bactéries pour la sécrétion de protéines de différentes tailles et fonctions (protéases, glucanases, nucléases, lipases, toxines...) (Delepelaire, 2004). La sécrétion des protéines par le SST1 nécessite l'intervention de chaperonnes, qui empêchent la protéine de se replier pour lui permettre d'être sécrétée de manière active par hydrolyse d'ATP. Les chaperonnes sont généralement spécifiques des protéines sécrétées. Le SST1 utilise les pompes d'efflux MDR de la famille ABC. Les protéines sécrétées par le SST1 sont reconnues par la pompe ABC grâce à une séquence riche en glycine localisée dans la partie C-terminale (Wandersman et Delepelaire, 1990; Salmond, 1994).

Les bactéries Gram négatif utilisent le SST1 pour la sécrétion d'enzymes hydrolytiques (protéases, phosphatases, estérases, nucléases et glucanases), de protéines toxiques (les hémolysines, les bactériocines ou des phytotoxines) (Delepelaire, 2004 ; Koronakis et al. 2004). La capacité des bactéries phytopathogènes à engendrer des symptômes sur leurs plantes hôtes peut résulter de la production de phytotoxines, sécrétées par un SST1. Les phytotoxines jouent différents rôles dans la virulence. Certaines toxines affectent les voies de signalisation dans la cellule-hôte ou déstabilisent la membrane cytoplasmique en contribuant à la formation de pores (Linhartová et al. 2010). Une telle fonctionnalité a été trouvée dans le cas des toxines de la famille RTX ("Repeats in Toxin") chez les bactéries Gram négatif, notamment chez *X. fastidiosa* (Simpson et al. 2000). Chez *X. oryzae* pv. *oryzae*, la présence des gènes *rtxA* et *rtxC* codant des phytotoxines de la famille RTX a été rapportée par Lee et al. (2005).

Plusieurs expérimentations concernant la protéine TolC (composant du SST1 et des pompes d'efflux MDR) ont été menées chez plusieurs bactéries phytopathogènes.

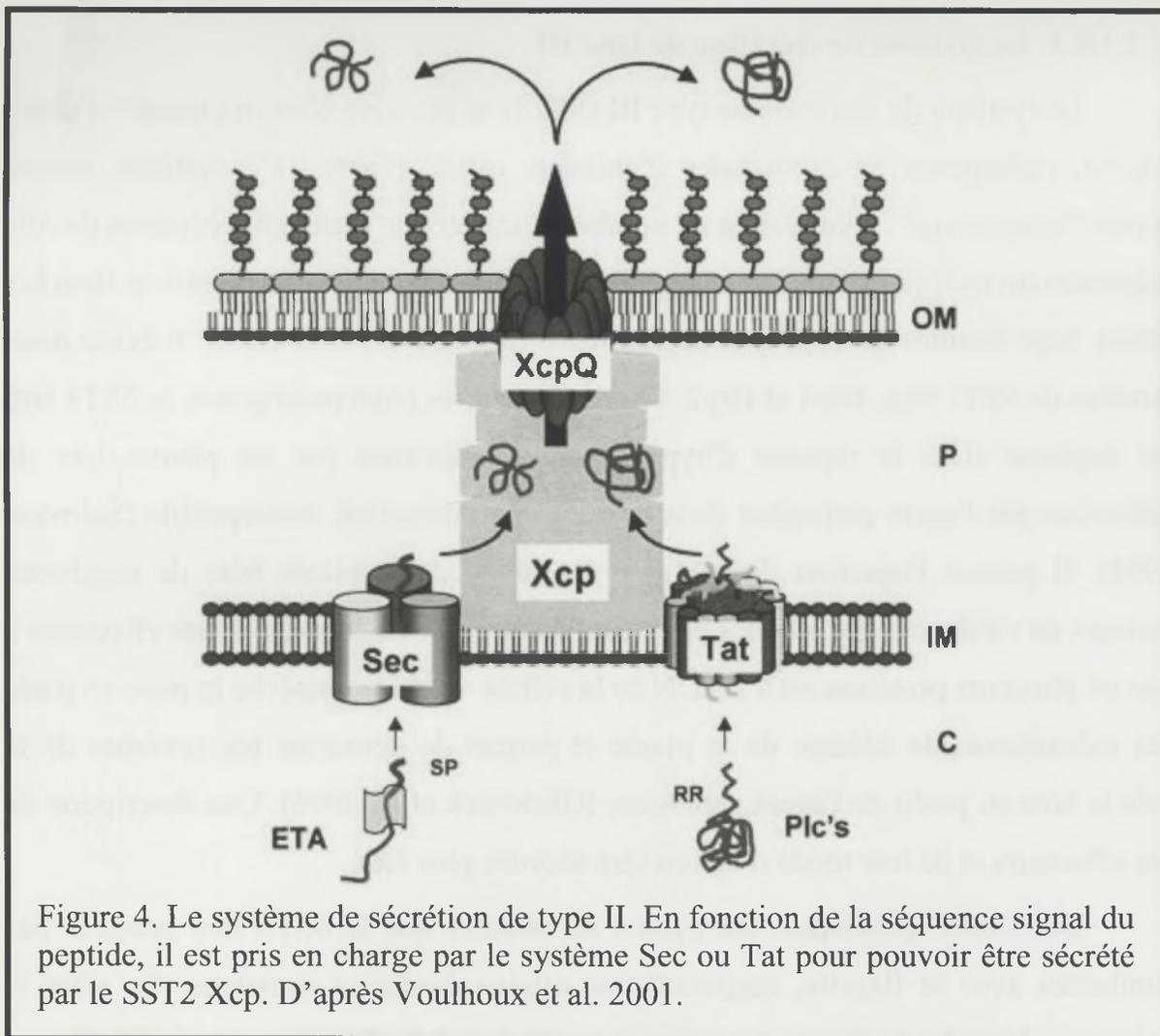
Ces expérimentations ont permis de mettre en évidence un rôle de TolC dans la pathogénie de ces bactéries. Chez *X. fastidiosa*, qui ne possède qu'un seul gène *tolC*, des souches mutantes pour ce gène inoculées sur des plants de vigne ont perdu tout pouvoir pathogène (Reddy et al. 2007).

1.2.8.2 Le système de sécrétion de type II

Le système de sécrétion de type II (SST2) permet la sécrétion dans le milieu extracellulaire de protéines diverses qui sont le plus généralement des enzymes de dégradation de la paroi des cellules de la plante (pectate lyases, polygalacturonases, pectine méthylestérases, cellulases, protéases, lipases, phospholipases, élastases, ...). La sécrétion de ces protéines s'effectue en deux étapes. La première consiste en une translocation de la protéine dans le périplasme à travers la membrane interne en utilisant les systèmes d'exportation Sec-dépendant ou Tat (Figure 4), en fonction de la nature de la "séquence signal" localisée au niveau de la partie N-terminale de la protéine sécrétée. A ce stade, la protéine subit une maturation. Lors de la deuxième étape, la protéine est sécrétée du périplasme vers le milieu extracellulaire à travers la membrane externe par la machinerie de sécrétion de type II proprement dite et qui est codée par 12 à 16 gènes (Sandkvist 2001; Filloux 2004), codant, entre autres, une ATPase, une protéine chaperonne et une peptidase.

La majorité des bactéries phytopathogènes Gram négatif possède un ou plusieurs SST2 dont l'organisation et le nombre de gènes peuvent varier d'une espèce à l'autre. Par exemple, *P. aeruginosa* dispose de deux SST2, chacun étant impliqué dans la sécrétion de substrats spécifiques liés à des conditions environnementales différentes (Ball et al. 2002).

Une autre caractéristique du SST2 concerne les similarités trouvées entre ses composants et ceux du pilus de type IV (PT4) (Peabody et al. 2003). Cinq des protéines du SST2 et du PT4 sont homologues, ce qui suggère une origine évolutive commune et laisse envisager que le pseudopilus servirait de piston pour pousser les protéines sécrétées dans le milieu extracellulaire à travers le pore de sécrétion (Sandkvist 2001).



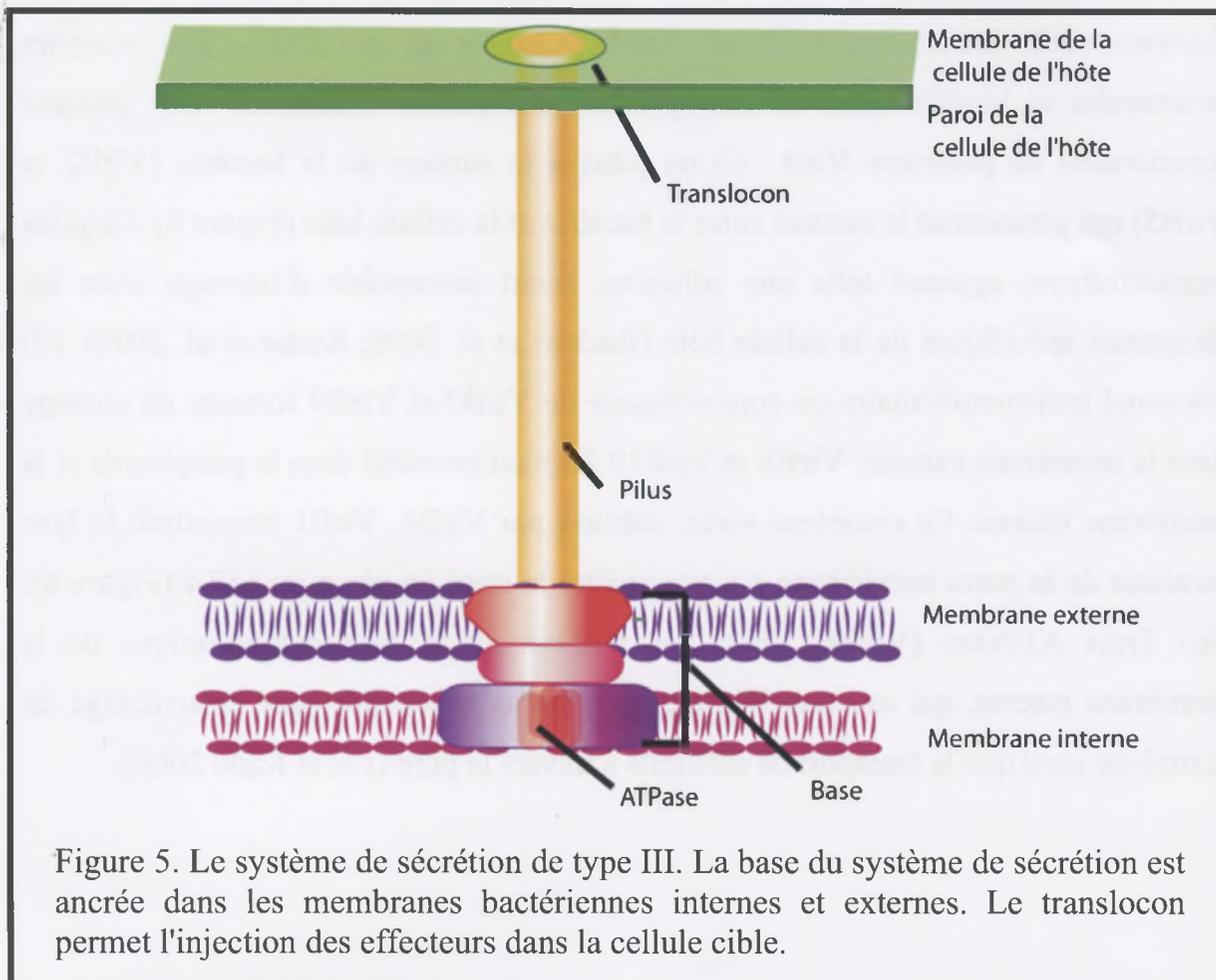
Même si certaines bactéries sont dépourvues de SST2, comme c'est le cas d'*Agrobacterium tumefaciens* ou de *Shigella flexeneri* (Cianciotto 2005), de nombreuses bactéries pathogènes utilisent le SST2 pour sécréter des facteurs de virulence tels que des toxines (*Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*), ou bien encore des pectinases et des pectates lyases (*Erwinia amylovora* et *X. campestris* pv. *campestris*). Il a été démontré par des analyses fonctionnelles que les SST2 sont importants pour la virulence des bactéries phytopathogènes (Liu et al. 2005). Chez les *Xanthomonas*, il existe deux types de SST2 : Xps et Xcs (Lu et al. 2008). Xcs est absent chez *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola* et *X. albilineans*. Il a été montré que Xps est impliqué dans la pathogénie de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Szczesny et al. 2010).

1.2.8.3 Le système de sécrétion de type III

Le système de sécrétion de type III (SST3) se retrouve chez des bactéries Gram négatif, pathogènes ou mutualistes d'animaux ou de plantes. Ce système, encore appelé "injectisome", a fait l'objet de nombreux travaux de recherche en raison du rôle prépondérant qu'il joue dans la pathogénie de bactéries très diverses (Genin et Boucher 2004). Sept familles de SST3 ont été décrites à ce jour (voir chapitre 2). Il existe deux familles de SST3 Hrp, Hrp1 et Hrp2. Chez les bactéries phytopathogènes, le SST3 Hrp est impliqué dans la réponse d'hypersensibilité exprimée par les plantes lors de l'infection par l'agent pathogène dans le cas d'une interaction incompatible (Salmond 1994). Il permet l'injection directe dans la cellule de la plante hôte de nombreux facteurs de virulence, que sont les effecteurs de type III. La fixation de ces effecteurs à une ou plusieurs protéines ou à l'ADN de la cellule végétale empêche la mise en place des mécanismes de défense de la plante et permet de détourner les systèmes de la cellule hôte au profit de l'agent pathogène (Gürlebeck et al. 2006). Une description de ces effecteurs et de leur mode d'action sera abordée plus loin.

Des études génétiques ont permis de montrer que le SST3 Hrp présente des similarités avec le flagelle, suggérant une origine évolutive commune. En effet, il existe une homologie de structure entre le corps basal du flagelle et du SST3 (Figure 5). Les protéines du SST3 de la famille Hrp sont codées par un ensemble de gènes, les gènes *hrp* ("hypersensitive response and pathogenicity") et *hrc* ("hrp conserved"), qui sont organisés en clusters de gènes dans le génome de la plupart des bactéries phytopathogènes (Salmond 1994). Le nombre et l'organisation de ces gènes varient cependant d'une espèce à l'autre (Hueck 1998). Les gènes *hrp* sont généralement regroupés dans une région d'environ 22 à 35 kb qui comprend une vingtaine de gènes organisés en six à huit opérons. Ceux-ci peuvent être chromosomiques, portés par un mégaplasmide comme chez *R. solanacearum* (Boucher et al. 2001) ou par un plasmide comme chez *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophilae* (Manulis et Barash 2003). Chez les bactéries phytopathogènes, les gènes *hrp* sont généralement regroupés dans des PAIs ("Pathogenicity Islands") et sont souvent caractérisés par un GC% inférieur à celui du reste du génome. Le SST3 Hrp peut cependant être absent du génome de certaines bactéries phytopathogènes comme c'est le cas pour *X. albilineans*, *X.*

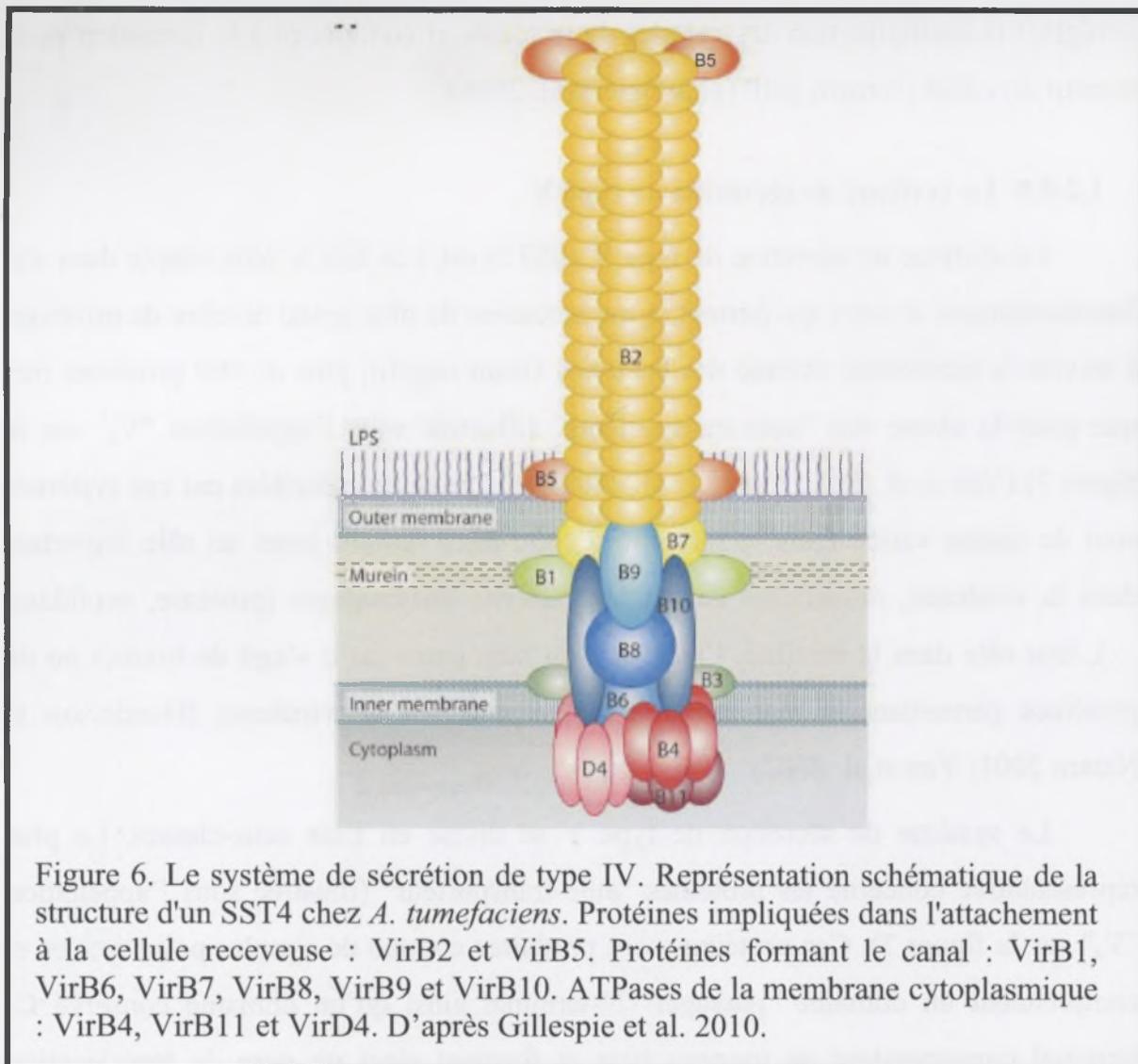
fastidiosa ou *A. tumefaciens* (Van Sluys et al. 2002). Le pilus Hrp, sorte de seringue moléculaire, permet de transporter les effecteurs de la cellule bactérienne à la cellule végétale (Brown et al. 2001). Les effecteurs sont secrétés à travers la membrane plasmique de la cellule végétale *via* un translocon qui va former un pore dans la membrane de la cellule végétale (Büttner et al. 2002). Une ATPase fournit l'énergie nécessaire à la translocation (Lorenz et Büttner 2009). Deux classes de protéines chaperonnes permettent l'assemblage de la machinerie de l'injectisome alors qu'une troisième classe de chaperonne facilite la translocation des protéines effectrices. Les gènes du SST3 sont nécessaires pour une colonisation efficace de la plante hôte, et pour une croissance optimale de l'agent pathogène *in planta* (Salmond 1994). Cependant, les gènes *hrp* ne sont pas toujours essentiels pour l'invasion de la plante hôte dans la mesure où chez certains agents pathogènes, tel que *R. solanacearum*, des mutants du SST3 conservent leur capacité à coloniser le système vasculaire de la plante malgré une réduction de la taille des populations bactériennes (Genin et Boucher 2004).



1.2.8.4 Le système de sécrétion de type IV

Le système de sécrétion de type IV (SST4) est destiné au transport de protéines seules, de complexes macromoléculaires ou de complexes ADN-protéine. Ils partagent une origine ancestrale commune avec la machinerie de conjugaison bactérienne des bactéries Gram négatif et positif (Christie 2001). Les membres de la famille des SST4 sont regroupés en trois catégories : (i) les systèmes de conjugaison assurant le transfert d'ADN vers une cellule réceptrice cible, (ii) les systèmes de transport d'effecteurs qui exportent les molécules effectrices du pathogène vers les cellules eucaryotes durant l'infection des plantes ou des mammifères, (iii) les systèmes de "compétence ou de libération d'ADN" permettant l'échange d'ADN avec le milieu extracellulaire. Récemment, un SST4 permettant le transfert d'îlot de pathogénie entre bactéries a été mis en évidence (Juhás et al. 2007).

La sécrétion peut être dépendante du système Sec ou se faire en une seule étape. Les SST4 ont des structures proches. Le SST4 le mieux caractérisé est celui d'*A. tumefaciens*, chez qui les composants de la machinerie de transport sont codés par l'opéron *virB* (Beijersbergen et al. 1994 ; Christie et al. 2005). Les analyses structurales et biochimiques de ces systèmes ont permis d'identifier trois groupes fonctionnels de protéines VirB : (i) un pilus à la surface de la bactérie (VirB2 et VirB5) qui permettrait le contact entre la bactérie et la cellule hôte (Figure 6). Ce pilus extracellulaire, agissant telle une adhésine, serait susceptible d'interagir avec les récepteurs spécifiques de la cellule hôte (Backert et al. 2008; Kutter et al. 2008). (ii) Un canal transmembranaire ou core composé de VirB7 et VirB9 formant un passage dans la membrane externe, VirB8 et VirB10 formant un canal dans le périplasme et la membrane interne. Ce complexe serait stabilisé par VirB6. VirB1 permettrait la lyse localisée de la paroi bactérienne pour permettre la mise en place du SST4 (Figure 6). (iii) Trois ATPases (VirB4, VirB11 et VirD4) sur la face cytoplasmique de la membrane interne, qui assurent l'apport énergétique nécessaire pour l'assemblage du complexe ainsi que le transport de substrats à travers le pore (Lai et Kado 2000).



La sécrétion ne peut se faire qu'après reconnaissance par le système de la séquence en C-terminale du substrat par VirD4. Par ailleurs, de nombreux SST4 possèdent des "coupling proteins" (T4CP) associées servant au recrutement des effecteurs et guidant ces derniers au niveau de la protéine VirB10 (Llosa et O'Callaghan 2004). Les SST4 sont les seuls systèmes de sécrétion bactérienne permettant d'exporter de l'ADN. Cependant, dans ce cas, le substrat de conjugaison n'est jamais de l'ADN nu mais de l'ADN simple brin associé à des protéines. Ce sont ces protéines dites pilotes qui sont reconnues et transférées dans la cellule hôte entraînant l'ADN dans ce passage (Lavigne et al. 2006). Par exemple, chez *A. tumefaciens*, le système VirB est responsable du transport de la bactérie vers la plante d'un ADN oncogène (complexe-T), porté par le plasmide Ti. Ce plasmide contient des gènes assurant son transfert et des gènes de synthèse de facteurs de croissance,

dérégulant la multiplication des cellules de la plante et conduisant à la formation de la tumeur du collet ("crown gall") (Lavigne et al. 2006).

1.2.8.5 Le système de sécrétion de type V

Le système de sécrétion de type V (SST5) est à la fois le plus simple dans son fonctionnement et celui qui permet la translocation du plus grand nombre de protéines à travers la membrane externe des bactéries Gram négatif, plus de 500 protéines rien que pour la classe des "auto-transporteurs" (illustrée sous l'appellation "V_a" sur la figure 7) (Yen et al. 2002; Tseng et al. 2009). Les protéines sécrétées par ces systèmes sont de nature variée mais la majorité d'entre-elles semble jouer un rôle important dans la virulence, notamment de par leur activité enzymatique (protéase, peptidase, ...), leur rôle dans la motilité, l'adhésion ou bien parce qu'il s'agit de toxines ou de protéines permettant la maturation d'autres protéines de virulence (Henderson et Nataro 2001; Yen et al. 2002).

Le système de sécrétion de type V se divise en trois sous-classes. La plus représentative concerne les protéines "auto-transporteur" (illustrée sous l'appellation "V_a" sur la figure 7). Ces protéines sont produites comme de simples polypeptides et comprennent un domaine "passager" N-terminal ainsi qu'un domaine conservé C-terminal correspondant au tonneau beta et forment ainsi un pore de translocation (Henderson et al. 2004). Ces auto-transporteurs sont synthétisés avec un peptide signal N-terminal qui permet leur export dans le périplasme *via* la machinerie Sec.

Le tonneau beta, quant à lui, s'insère dans la membrane externe et permet ainsi la translocation du domaine "passager" dans l'espace extra-cellulaire (Henderson et Nataro 2001).

La deuxième sous-classe de SST5 représente le système de sécrétion qui repose sur deux partenaires (TPS pour two-partner system), l'un portant le domaine du tonneau beta, l'autre étant la protéine sécrétée (illustrée sous l'appellation "V_b" sur la figure 7).

La dernière sous-classe (illustrée sous l'appellation "V_c" sur la figure 7) concerne les protéines trimériques formant un tonneau beta unique à partir de trois "auto-transporteurs".

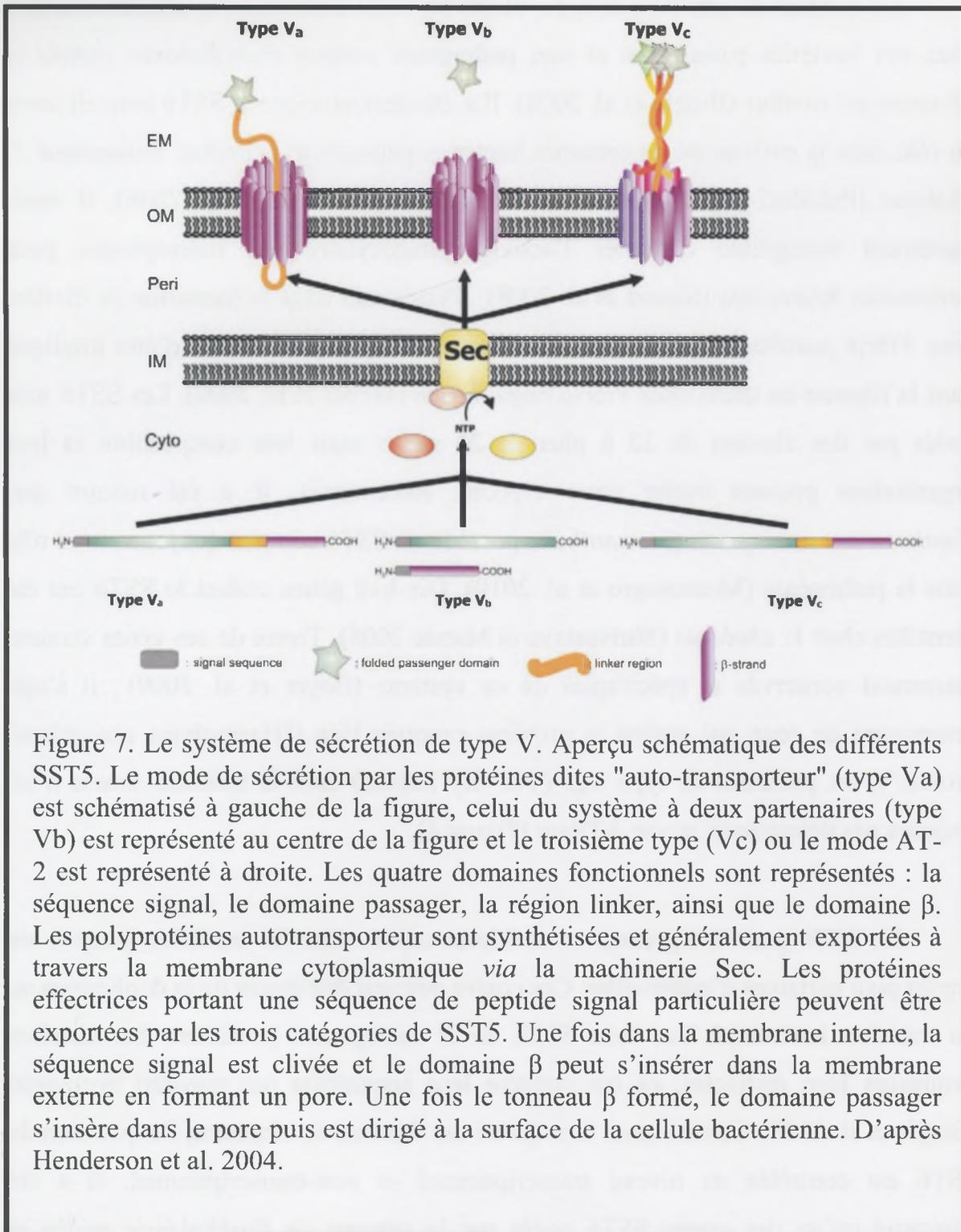
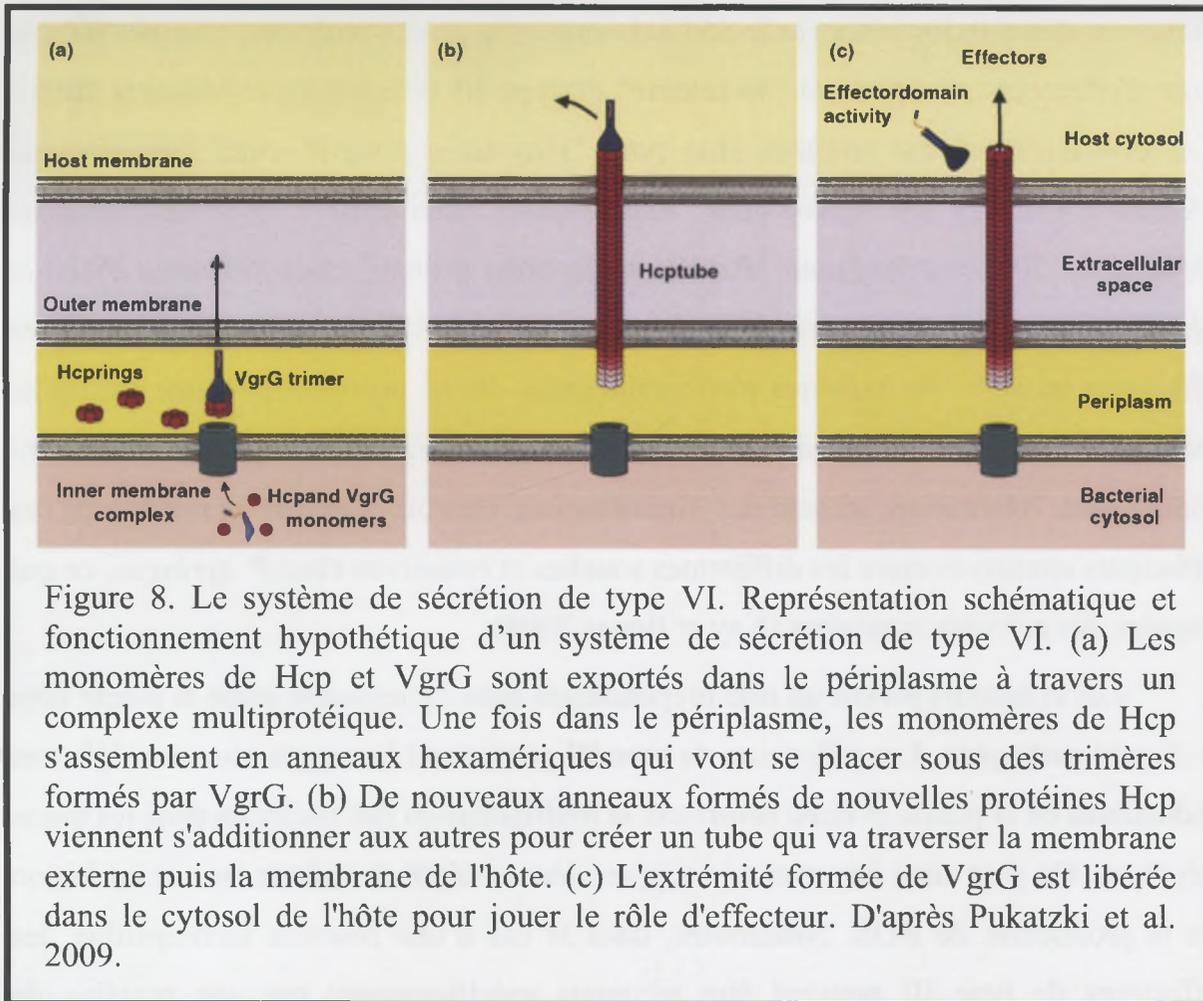


Figure 7. Le système de sécrétion de type V. Aperçu schématique des différents SST5. Le mode de sécrétion par les protéines dites "auto-transporteur" (type Va) est schématisé à gauche de la figure, celui du système à deux partenaires (type Vb) est représenté au centre de la figure et le troisième type (Vc) ou le mode AT-2 est représenté à droite. Les quatre domaines fonctionnels sont représentés : la séquence signal, le domaine passager, la région linker, ainsi que le domaine β . Les polyprotéines autotransporteur sont synthétisées et généralement exportées à travers la membrane cytoplasmique *via* la machinerie Sec. Les protéines effectrices portant une séquence de peptide signal particulière peuvent être exportées par les trois catégories de SST5. Une fois dans la membrane interne, la séquence signal est clivée et le domaine β peut s'insérer dans la membrane externe en formant un pore. Une fois le tonneau β formé, le domaine passager s'insère dans le pore puis est dirigé à la surface de la cellule bactérienne. D'après Henderson et al. 2004.

1.2.8.6 Le système de sécrétion de type VI

Le système de sécrétion de type VI (SST6) a été décrit très récemment à la fois chez des bactéries pathogènes et non pathogènes comme *Pseudomonas putida* et *Myxococcus xanthus* (Bingle et al. 2008). Il a été démontré que le SST6 pouvait jouer un rôle dans la pathogénie de certaines bactéries pathogènes animales, notamment *V. cholerae* (Pukatzki et al. 2006) et *P. aeruginosa* (Mougous et al. 2006). Il serait également susceptible d'inhiber l'activité phagocytaire des macrophages pour *Aeromonas hydrophila* (Suarez et al. 2008), d'intervenir dans la formation de biofilm chez *Vibrio parahaemolyticus* (Enos-Berlage et al. 2005) ou encore d'être impliqué dans la réponse au stress chez *Vibrio anguillarum* (Weber et al. 2009). Les SST6 sont codés par des clusters de 12 à plus de 20 gènes mais leur composition et leur organisation peuvent varier entre espèces. Récemment, il a été montré que *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* possède un SST6 complet qui jouerait un rôle dans la pathogénie (Montenegro et al. 2010). Dix-huit gènes codant le SST6 ont été identifiés chez *V. cholerae* (Shrivastava et Mande 2008). Treize de ces gènes seraient hautement conservés et spécifiques de ce système (Boyer et al. 2009); il s'agit notamment de ceux qui codent la protéine exportée Hcp ("Haemolysin coregulated protein"), les protéines de type Vgr (Val Gly Repeat) dont la fonction exacte n'est toujours pas déterminée, et une ATPase (Figure 8).

Le SST6 peut être présent en multiples copies chez les bactéries, jusqu'à six copies pour certaines d'entre-elles. Ces copies peuvent être issues de la duplication ou du transfert horizontal. Les trois SST6 de *P. aeruginosa* possèdent des histoires évolutives bien distinctes, ce qui suggère leur acquisition par transfert horizontal (Bingle et al. 2008). Comme pour la majorité des facteurs de virulence, l'expression du SST6 est contrôlée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Il a été démontré qu'un des quatre SST6 codés par le génome de *Burkholderia mallei* et impliqué dans la virulence infectieuse chez le hamster, est sous contrôle d'un système "two-component" VirAG et d'un régulateur de type Ara-C (Schell et al. 2007).



1.2.9 Les effecteurs de virulence ou d'avirulence sécrétés par les bactéries Gram négatif phytopathogènes

Les bactéries phytopathogènes produisent des effecteurs de virulence capables de bloquer la mise en place des mécanismes de défense de la plante hôte. Selon le modèle en zigzag présenté au paragraphe 1.1.2.3, la co-évolution d'une bactérie et de sa plante hôte peut conduire à une adaptation de la plante hôte qui se traduit par le déclenchement des mécanismes de défense suite à la reconnaissance de ces effecteurs qui sont dès lors considérés, non plus comme des effecteurs de virulence, mais comme des effecteurs d'avirulence.

1.2.9.1 Les effecteurs de type III

La majorité des bactéries phytopathogènes Gram négatif possède un SST3 Hrp et exprime leur pathogénie en injectant des protéines de virulence directement à

l'intérieur des cellules hôtes *via* le SST3. L'ensemble de ces protéines, connues sous le nom d'effecteurs, constitue le "secrétome" de type III (Greenberg et Vinatzer 2003). Ces effecteurs ont été nommés Hop pour "Hrp outer protein" chez *Pseudomonas* (Alfano et Collmer 1997), Xop pour "*Xanthomonas* outer protein" chez *Xanthomonas* (Noël et al. 2001) ou Pop pour "*Pseudomonas* outer protein" chez *Ralstonia* (Arlat et al. 1994). Il existe une très grande hétérogénéité dans la séquence et la fonction de ces effecteurs au sein des bactéries phytopathogènes. Ils ne présentent aucune similarité avec d'autres gènes de fonction connue, ce qui rend difficile leur classement fonctionnel. Néanmoins, au sein des *Xanthomonas*, on trouve un certain nombre de ces effecteurs conservés entre les différentes souches et conservés chez *P. syringae*, ce qui suggère des activités similaires (Kay et Bonas 2009).

Les effecteurs jouent un rôle prépondérant dans l'interaction entre la plante hôte et l'agent pathogène. Les effecteurs de type III permettent la suppression des défenses inductibles de la plante et donc favorisent la multiplication des bactéries dans les tissus végétaux. On peut ainsi observer une suppression du dépôt de callose ou une inhibition de la production de ROS. Néanmoins, dans le cas d'une réaction incompatible, les effecteurs de type III peuvent être reconnus spécifiquement par une protéine de résistance de la plante qui va activer ses défenses et provoquer une réaction d'hypersensibilité (Jones et Dangl 2006; Boller et Felix 2009; Hann et al. 2010). On dit que l'agent pathogène est rendu avirulent, d'où la description première des effecteurs de type III sous le nom de protéines d'avirulence (ou Avr) (Chang et al. 2004). La perte, la modification ou le gain de nouveaux effecteurs va permettre à une bactérie rendue avirulente d'être à nouveau capable de neutraliser les défenses de sa plante hôte (voir le modèle zig zag, paragraphe 1.1.2.3). Les effecteurs de type III peuvent ainsi jouer des rôles d'éliciteurs ou de supprimeurs des défenses de la plante (Alfano et Collmer 2004; Jones et Dangl 2006).

Les effecteurs peuvent avoir plusieurs cibles dans la plante. Concernant les *Xanthomonas*, des études approfondies sur les mécanismes moléculaires de la fonction des effecteurs de type III ont révélé que les effecteurs avec une fonction enzymatique jouent un rôle important dans l'interaction des *Xanthomonas* avec leurs hôtes. C'est le cas notamment de la protéase SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) XopD qui induit

une répression des facteurs de transcription, ce qui va avoir un impact direct sur les défenses de la plante (Kim et al. 2008). Des effecteurs de la famille AvrBs3 peuvent mimer les activateurs transcriptionnels de la plante et ainsi permettre à la bactérie de "manipuler" le transcriptome de la plante hôte (Kay et Bonas 2009). AvrBs3 fait partie de la famille des TAL ("Transcription Activator-Like") ayant un rôle d'activateurs transcriptionnels. Les TAL sont spécifiques des *Xanthomonas*. La structure des gènes de cette famille est particulière puisque leur région centrale est généralement constituée de plusieurs répétitions en tandem (de 5,5 à 25,5) de 34 acides aminés dont le nombre et l'organisation déterminent la spécificité d'hôte (Schornack et al. 2006). Il a récemment été montré que ces répétitions en tandem sont spécifiques de la séquence d'ADN sur laquelle se fixe l'effecteur TAL chez la plante (une répétition étant spécifique d'une paire de base donnée). Un code permettant de prédire les séquences d'ADN reconnues par un effecteur TAL sur la base de l'analyse de ses répétitions en tandem a récemment été publié (Boch et al. 2009; Moscou et Bogdanove, 2009; Bogdanove et al. 2010). On note également au niveau des effecteurs TAL la présence de signaux de localisation nucléaire (NLS) et d'un domaine d'activation transcriptionnel dans la région C-terminale (Van den Ackerveken et al. 1996; Zhu et al. 1998).

1.2.9.2 Un exemple d'effecteur d'avirulence sécrété par le système de sécrétion de type I

Chez certaines variétés de riz, l'activation du récepteur XA21 par le peptide Ax21 produit par la bactérie *X. oryzae* pv. *oryzae* induit les mécanismes de résistance (Lee et al. 2006). La production d'Ax21 est dépendante de plusieurs gènes de *X. oryzae* pv. *oryzae* qui fournissent des indices sur sa nature moléculaire. Les gènes requis pour la production et la sécrétion d'Ax21, nommés gènes *rax*, incluent huit gènes impliqués dans trois fonctions : (i) *raxA*, *raxB* et *raxC* codent respectivement une protéine MFP ("Membrane Fusion Protein"), un transporteur ABC ("ATP-Binding Cassette") et une protéine OMP ("Outer Membrane Protein") qui constituent un système de sécrétion type I (da Silva et al. 2004; Lee et al. 2008); (ii) *raxQ*, *raxP* et *raxST* sont impliqués dans le métabolisme du soufre (Shen et Ronald 2002; da Silva et

al. 2004); et (iii) *raxH* et *raxR* codent pour des protéines similaires à celles de systèmes régulateurs à deux composants et qui régulent l'expression du gène *raxST* (Burdman et al. 2004; Lee et al. 2006; Lee et al. 2008). Ax21 est sécrété par le SST1 dans l'espace extracellulaire où il peut fonctionner comme un ligand de XA21. On retrouve des gènes similaires à *raxB* chez plusieurs *Xanthomonas* ainsi que chez *X. fastidiosa* qui possède également des orthologues de *raxA* et *raxC*. Ax21 a longtemps été considéré comme un effecteur d'avirulence pour finalement être reclassé récemment comme PAMP (Park et al. 2010).

1.2.9.3 Les effecteurs sécrétés par des pompes d'efflux

Plusieurs phytotoxines sont synthétisées par des enzymes NRPS "NonRibosomal Peptide Synthetases". Ces phytotoxines sont des petites molécules, leur poids moléculaire est inférieur à 3000 Da. Elles sont sécrétées par les bactéries par des pompes d'efflux spécifiques de chaque phytotoxine. Elles sont ensuite capables de pénétrer dans les cellules de la plante hôte en utilisant les pompes destinées à l'acquisition de nutriments (nucléosides, sucres, ...). Certaines de ces phytotoxines non ribosomales sont capables de bloquer les mécanismes de défense de la plante hôte (voir chapitre 3). Chaque phytotoxine non ribosomale a une structure particulière et un mode d'action particulier. Le cluster de gènes impliqué dans la biosynthèse d'une phytotoxine non ribosomale comprend non seulement les gènes nécessaires à la biosynthèse de la phytotoxine mais également le gène codant la pompe d'efflux spécifique de la phytotoxine synthétisée.

2 Modes de transmission et de dissémination des bactéries phytopathogènes

2.1 Les bactéries phytopathogènes dans l'environnement

Certaines bactéries phytopathogènes sont capables de survivre ou de se multiplier en dehors de leur plante hôte, ce qui leur permet d'être transportées par l'eau, le vent ou des insectes vecteurs et d'infecter de nouvelles plantes.

2.1.1 Le sol

Certaines bactéries pathogènes de plantes se retrouvent communément dans le sol. *R. solanacearum* vit dans le sol et infecte ses plantes hôtes au niveau de lésions sur les racines, les tubercules, les tiges coupées ainsi qu'au point d'émergence des radicelles. La multiplication des bactéries dans la rhizosphère est conditionnée par les exsudats racinaires qui sont une source de nutriments. La disponibilité des nutriments va déterminer le niveau de multiplication bactérienne. En effet, les phénomènes de compétition sont fréquents et certaines bactéries obtiennent un avantage sur d'autres en produisant certaines substances comme des sidérophores, permettant la captation du fer (Fischer et al. 2010). D'autres bactéries phytopathogènes ne survivent qu'un laps de temps très court dans le sol sous forme de colonies isolées (quelques jours), comme c'est le cas de *X. axonopodis* pv. *citri*. En revanche, lorsque cette bactérie se trouve dans des débris végétaux, sa capacité de survie est sensiblement augmentée, faisant des débris végétaux d'excellents réservoirs de *X. axonopodis* pv. *citri*. Ces propriétés de survie dans le sol semblent être partagées par la majorité des espèces de *Xanthomonas* (Schaad et White, 1974) ainsi que par de nombreuses autres bactéries.

2.1.2 L'eau

De nombreuses bactéries phytopathogènes sont retrouvées dans l'eau et sont disséminées par ce biais. *D. dadantii*, l'agent causal de pourriture molle chez de nombreuses plantes, a été retrouvée dans l'eau des sources de deux rivières

australiennes et cette bactérie semble faire partie des microorganismes indigènes de ces écosystèmes (Coher et Gilbert 1990). *D. dadantii* peut ainsi être disséminée via les systèmes irrigation. Ce cas de figure est aussi observé pour *P. syringae*, *Pectobacterium carotovorum*, *R. solanacearum* ou *X. oryzae* pv. *oryzae*. *P. syringae* possède en plus un noyau glaçogène qui favorise la formation de neige ou de givre à des températures négatives. Cette propriété permet à la bactérie d'être transportée sur de longues distances par les nuages et d'être relarguée sous forme de précipitations (Morris et al. 2008, Figure 9). Elle lui vaut également d'être utilisée pour la production de neige artificielle en station de sports d'hiver.

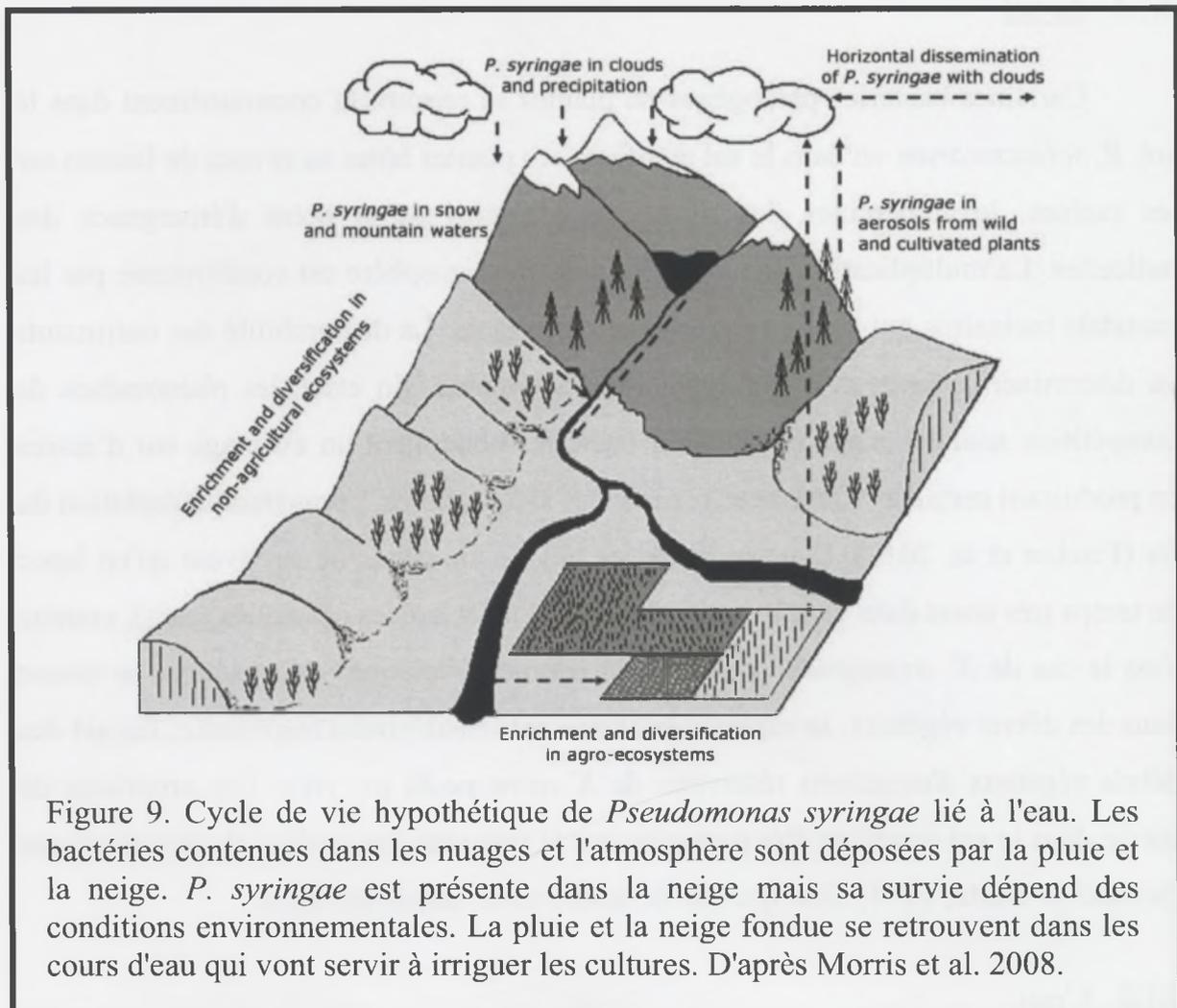


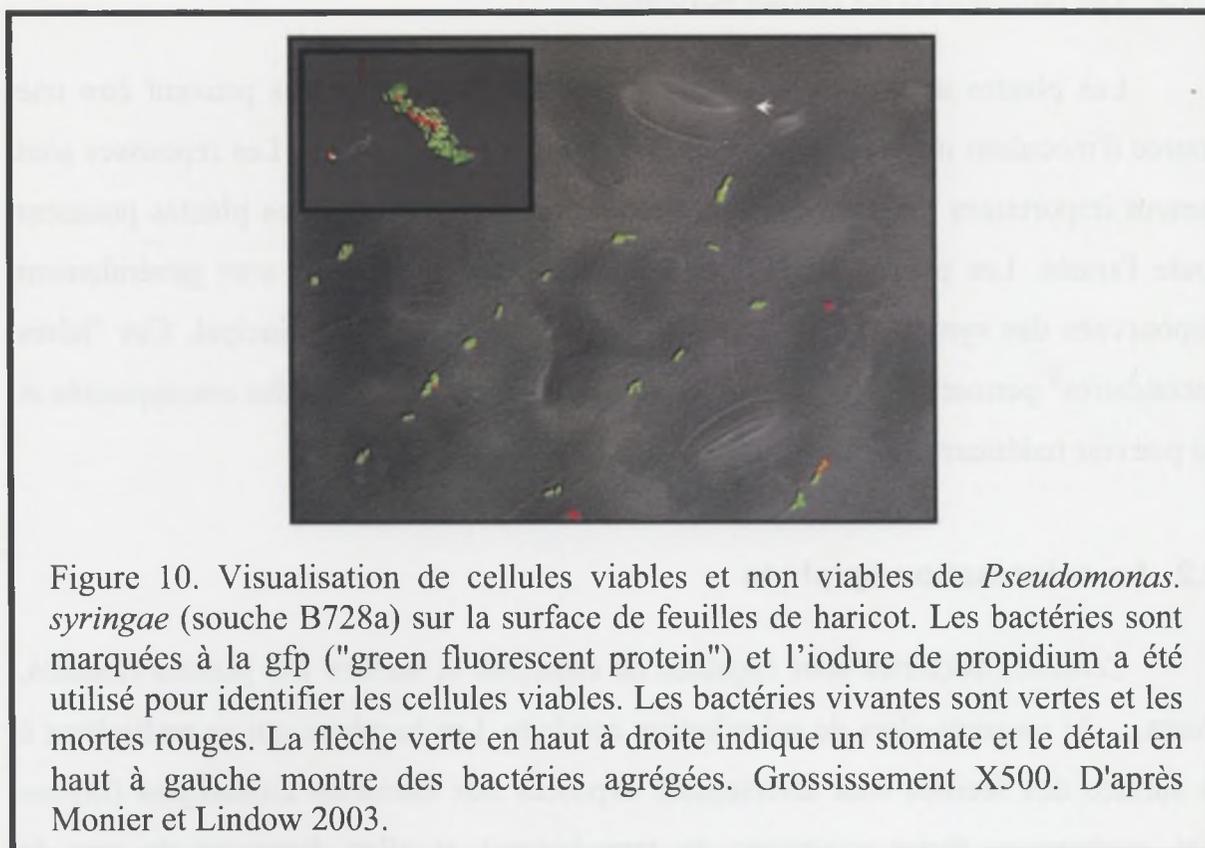
Figure 9. Cycle de vie hypothétique de *Pseudomonas syringae* lié à l'eau. Les bactéries contenues dans les nuages et l'atmosphère sont déposées par la pluie et la neige. *P. syringae* est présente dans la neige mais sa survie dépend des conditions environnementales. La pluie et la neige fondue se retrouvent dans les cours d'eau qui vont servir à irriguer les cultures. D'après Morris et al. 2008.

2.1.3 Les repousses et les plantes adventices

Les plantes adventices et les repousses de plantes cultivées peuvent être une source d'inoculum importante pour les bactéries phytopathogènes. Les repousses sont surtout importantes dans les pays tropicaux et sub-tropicaux où les plantes poussent toute l'année. Les plantes adventices infectées par des bactéries sont généralement dépourvues des symptômes de la maladie observés sur l'hôte principal. Ces "hôtes secondaires" permettent à la bactérie de survivre pendant des périodes conséquentes et de pouvoir redémarrer une épidémie (Swings et Civerolo 1993).

2.2 La colonisation épiphyte

Certaines bactéries sont capables de coloniser la surface des plantes (feuilles, fleurs, ...) : on parle alors de colonisation épiphyte. Les bactéries qui se multiplient à la surface des feuilles sont directement exposées aux éléments climatiques (rayons UV, sécheresse, fortes variations de température) et elles disposent de peu de nutriments. La surface des feuilles est donc un environnement hostile dans lequel les bactéries sont soumises à de nombreux stress (Beattie et Lindow 1995; Beattie et Lindow 1999). Les bactéries des genres *Pseudomonas* et *Xanthomonas* sont souvent décrites comme étant des bactéries épiphytes. Les bactéries épiphytes mettent en œuvre différentes stratégies pour se protéger des stress rencontrés à la surface des feuilles. Par exemple, les *Xanthomonas* produisent des pigments de couleur jaune, les xanthomonadines codées par les gènes *pig*, qui vont jouer un rôle protecteur contre les rayons UV (Poplawsky et Chun 1998; Poplawsky et al. 2000). Les bactéries vivent généralement en colonies "emprisonnées" dans une couche d'EPS appelée biofilm (Lindow et Brandl 2003; Jacques et al. 2005; Dunger et al. 2007, Figure 10). Ce type de structure permet aux bactéries de s'ancrer à la surface de la feuille et de créer un micro-environnement qui les protège du manque d'eau, des rayons UV, des molécules de défense produites par la plante, etc.... Les bactéries agrégées en biofilm montrent un taux de survie supérieur aux bactéries isolées (Monier et Lindow 2003, Figure 10).



Les bactéries se développent préférentiellement dans les zones en surface des feuilles offrant le plus de nutriments comme la face inférieure ou les zones proches des stomates, des trichomes ou encore des hydathodes (Beattie et Lindow 1999). Certaines bactéries sont également capables de produire des substances qui améliorent la disponibilité des nutriments. Les surfactants, par exemple, facilitent non seulement les déplacements des bactéries sur la feuille, mais ils augmentent également la disponibilité des nutriments (Lindow et Brandl 2003). La biosynthèse d'hormones végétales par les bactéries peut également altérer les parois cellulaires et permettre la libération d'oligosaccharides utilisés comme nutriments (Lindow et Brandl 2003). Enfin, les sidérophores, comme la pyoverdine chez *P. syringae*, permettent de chélater le fer, peu disponible à la surface des feuilles et pourtant nécessaire à la vie de la bactérie (Lindow et Brandl 2003; Wensing et al. 2010).

Cette carence en nutriments disponibles amène les bactéries à affronter des phénomènes de compétition. Pour éliminer les bactéries concurrentes, certaines

bactéries produisent une ou plusieurs toxines aux propriétés antibiotiques, comme c'est le cas pour *P. syringae* (Völksch et Weingart 1998).

La colonisation épiphyte facilite la dissémination des bactéries par l'eau et le vent, et elle peut donc jouer un rôle important dans le cycle de vie de la bactérie en permettant l'infection de nouvelles plantes. Elle permet également aux bactéries transportées par l'eau ou le vent de se multiplier sur la surface de la plante hôte avant de pouvoir coloniser d'autres tissus en entrant par des ouvertures naturelles (stomates, hydathodes) ou par des blessures.

2.3 La transmission par le biais d'insectes

De nombreuses bactéries utilisent une transmission vectorielle par le biais d'insectes (Sigeo, 1993). Ce mode de transmission est très important notamment pour les bactéries qui sont incapables de survivre dans l'environnement ou à la surface des feuilles. *X. fastidiosa* est un exemple de bactérie phytopathogène dont l'importance agronomique repose essentiellement sur ce mode de transmission (Chatterjee et al. 2008a). *X. fastidiosa* est capable de coloniser un très grand nombre de plantes (vigne, agrumes, caféier, amandier, etc...) mais son habitat est limité au xylème. *X. fastidiosa* est transmise via plusieurs espèces d'insectes se nourrissant de sève brute. Ce type de transmission permet à la bactérie de passer du xylème d'une plante à celui d'une autre plante. Les insectes introduisent directement la bactérie dans le système vasculaire de la plante hôte. *X. fastidiosa* ne coloniserait pas tout l'insecte mais se fixerait uniquement à l'entrée de son intestin, ce qui lui permettrait d'être "injectée" dans la plante lorsque l'insecte va s'y nourrir (Chatterjee et al. 2008a). Cette adhésion serait en partie conditionnée par des adhésines non fibrillaires et la production de biofilm (Killiny et Almeida 2009). *Candidatus liberibacter asiaticus*, bactérie du phloème responsable de la maladie du greening des agrumes (encore appelée Huanglongbing), est un autre exemple de bactérie disséminée par insecte (Manjunath et al. 2008). Cette bactérie est transportée par des psylles qui lui permettent de se disséminer rapidement dans les cultures d'agrumes et de poser de gros problèmes aux producteurs.

La survie hivernale des bactéries peut être liée à la survie de l'insecte vecteur. Par exemple, l'intensité des dégâts causés par *Pantoea stewartii*, bactérie pathogène du maïs transmise par une altise, est en relation directe avec le taux de survie hivernale de son insecte vecteur (Esker et Nutter 2003).

Peu de données sont disponibles concernant les interactions des bactéries phytopathogènes avec leur insecte vecteur. Cependant, il a été montré que certaines souches de *P. carotovorum* sp. *carotovorum*, bactérie responsable de la pourriture molle sur les tiges et les fruits de la tomate, sont capables de se multiplier et d'induire des réactions de défense chez la drosophile (Basset et al. 2000). La capacité de ces souches à se multiplier chez cet insecte vecteur pourrait jouer un rôle important dans la transmission de *P. carotovorum* sp. *carotovorum* de plante à plante. Par ailleurs, des études préliminaires suggèrent que la transmission de *P. stewartii* par une altise est conditionnée par des interactions de la bactérie avec son insecte vecteur faisant appel à des effecteurs de type III (Correa et al. 2010).

3 La colonisation du xylème par les bactéries phytopathogènes

Le xylème est une niche particulière pour les bactéries. En effet, c'est un milieu constitué principalement de cellules mortes, où les nutriments nécessaires à la multiplication des bactéries sont plus rares que dans les autres tissus végétaux. De plus, la morphologie très cloisonnée du xylème limite son invasion par les bactéries. Cependant, cette niche particulière reste favorable à la multiplication des bactéries car, le xylème étant un tissu vasculaire et conducteur, son invasion conduit à une infection systémique de la plante.

3.1 Morphologie du xylème

Les vaisseaux du xylème sont constitués de cellules mortes alignées et entourées de lignine. Ils ont la capacité de transporter la sève brute depuis les racines jusqu'aux feuilles.

Le xylème primaire provient de la différenciation d'un méristème primaire. Dans l'organe en cours d'élongation apparaît du procambium, tissu méristématique dont certaines cellules vont se différencier pour former le protoxylème (petit diamètre) et d'autres pour former le métaxylème (gros diamètre). Les vaisseaux du xylème sont groupés avec des vaisseaux du phloème (transportant la sève élaborée) pour former des faisceaux vasculaires (Figure 11).

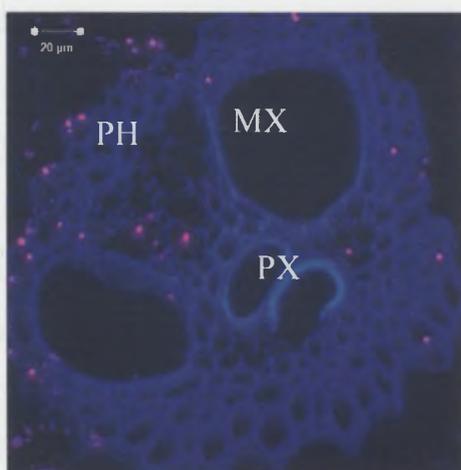
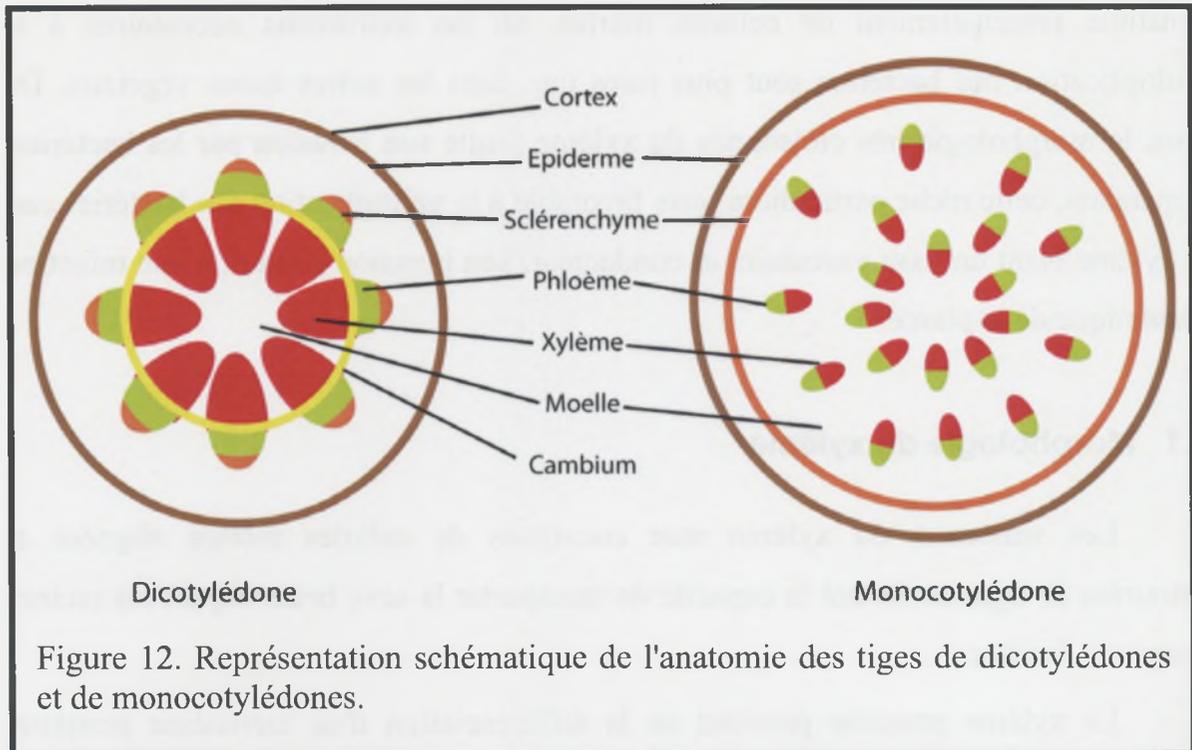


Figure 11 : Observation en microscopie confocale d'une coupe transversale au niveau d'un entre-nœud de canne à sucre. MX : Métaxylème, PX : Protoxylème, PH : Phloème. Photo M-S Vernerey.

L'organisation des faisceaux vasculaires des monocotylédones et des dicotylédones diffère par leur répartition au niveau de la tige. Dans une tige de monocotylédone, les faisceaux sont répartis uniformément alors que dans une tige de dicotylédone, les faisceaux sont organisés en couronne (Figure 12).



Les vaisseaux du xylème ne sont pas continus. En effet, plusieurs cas de discontinuité peuvent être observés, notamment au niveau des nœuds caulinaires :

- des fusions du métaxylème et du protoxylème,
- une division en branches plus petites du métaxylème,
- une terminaison des vaisseaux au niveau des nœuds (par exemple, chez la canne à sucre, seuls 10% des vaisseaux se prolongent d'un entre-nœud à l'autre (Teakle et al. 1978; Dong et al. 1997)).

Les vaisseaux du xylème forment un réseau connecté par le biais de membranes criblées ("pit membranes"). Ces membranes criblées permettent le passage des liquides et des petites molécules au travers de pores d'un diamètre inférieur à $0,2 \mu\text{m}$ ne permettant pas le passage des bactéries. Cependant, chez la vigne, certains vaisseaux ne sont pas terminés par des membranes criblées mais sont ouverts sur tout leur long, permettant ainsi le passage des microorganismes sur de longues distances dans la tige

et parfois dans la feuille (Chatelet et al. 2006; Thorne et al. 2006). Ces études montrent que la colonisation passive de la vigne par des microorganismes peut être importante, notamment si ces derniers sont introduits directement dans le xylème par des insectes vecteurs. L'existence de tels vaisseaux n'a pas été démontrée chez la canne à sucre.

3.2 Composition de la sève brute

La sève brute est transportée par les vaisseaux du xylème des racines jusqu'aux parties aériennes de la plante. Le xylème a pour fonction de transporter l'eau absorbée par les racines vers les autres organes de la plante. La sève brute contient essentiellement des sels minéraux (absorbés au niveau des poils absorbants), des hormones et des sucres. La concentration en sucre dans la sève brute est variable. Elle varie par exemple de 0 à 9% dans la sève brute de la canne à sucre (Dong et al. 1997). Chez cette plante, le taux de sucre varie aussi en fonction du niveau de la tige. En effet, la quantité de saccharose est plus faible dans les entre-nœuds situés dans le haut de la tige (Dong et al. 1997).

3.3 Les bactéries colonisatrices du xylème

Le nombre de bactéries capables de coloniser les tissus riches en nutriments (phloème, mésophylle,...) est plus important que le nombre de bactéries capables de coloniser le xylème. Ce paragraphe présente les principales bactéries phytopathogènes d'intérêt agronomique capables de coloniser le xylème. Certaines bactéries sont capables d'infecter d'autres tissus, notamment au moment de la pénétration dans la plante. D'autres sont uniquement confinées au xylème.

3.3.1 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

X. oryzae pv. *oryzae* est responsable de la bactériose vasculaire du riz. *X. oryzae* pv. *oryzae* pénètre dans le riz par les pores naturels comme les hydathodes. Après la pénétration, les bactéries se multiplient dans les espaces intercellulaires de l'épiderme avant de se répandre dans la plante *via* les vaisseaux du xylème. La progression de la bactérie se fait alors de manière verticale grâce à son interaction avec les cellules du



Figure 13. Symptômes sur feuilles de riz provoqués par *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Photo G. Robin.

xylème, mais aussi de manière latérale au sein des vaisseaux xylémiques secondaires. Les premiers symptômes de la maladie sont généralement visibles près des points d'entrée de la bactérie, au niveau des hydathodes. De courtes lésions jaunâtres apparaissent sur les bords de la feuille, puis ces lésions se développent sur toute la surface foliaire (Figure 13).

3.3.2 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

X. campestris pv. *campestris* attaque les crucifères. C'est une bactérie épiphyte qui peut pénétrer dans la plante par les stomates ou les blessures au niveau des feuilles et/ou des racines, cependant elle pénètre plus naturellement par les hydathodes. Après la pénétration dans la plante, la bactérie envahit les vaisseaux du xylème et déclenche les symptômes de la nervation noire des crucifères (Figure 14). Le sol constitue pour *X. campestris* pv. *campestris* une autre niche écologique. Lorsqu'une plante infectée meurt ou perd ses feuilles à l'approche de l'hiver, les bactéries qu'elle contient sont capables de survivre dans les débris végétaux enfouis. Elles adoptent alors un mode de vie saprophyte et cette phase du cycle peut durer plusieurs années. La pluie, le vent et les insectes contribuent à la dispersion de *X. campestris* pv. *campestris* dans

l'environnement. Cependant les semences infectées représentent la source majeure de dissémination et de développement de la maladie.



Figure 14. Lésions chlorotiques et/ou nécrotiques en bordure des feuilles de chou provoquées par *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Photo : <http://www.fito-info.bf.uni>

3.3.3 *Ralstonia solanacearum*

R. solanacearum est une bactérie phytopathogène du sol responsable du flétrissement bactérien (Figure 15). *R. solanacearum* a plus de 200 espèces hôtes dont certaines ont une importance agronomique majeure comme la tomate, la pomme de terre, l'aubergine, le manioc ou l'arachide. La distinction entre espèces hôtes ou non-hôtes est basée sur la capacité de *R. solanacearum* à coloniser ou non les vaisseaux conducteurs de ces espèces. Les espèces végétales sont dites tolérantes quand la bactérie n'est capable de se développer que d'une manière très limitée dans leur xylème (Alvarez et al. 2008). Son cycle infectieux passe généralement par un stade de survie saprophyte dans le sol ou dans l'eau qui peut se prolonger pendant plusieurs années. *R. solanacearum* peut également constituer des réservoirs de populations dans les tissus d'espèces adventices ou non-hôtes comme l'orge ou le maïs. *R. solanacearum* va infecter les plantes par les racines, profitant de blessures (nématodes, outils agricoles, etc...) ou d'ouvertures naturelles (émergence des racines secondaires, lenticelles) pour pénétrer son hôte. Après la pénétration, les bactéries se propagent du cortex jusqu'au xylème où elles se multiplient et synthétisent des EPS. Cela entraînera alors l'obstruction des vaisseaux conducteurs qui va elle-même entraîner le flétrissement de la plante.

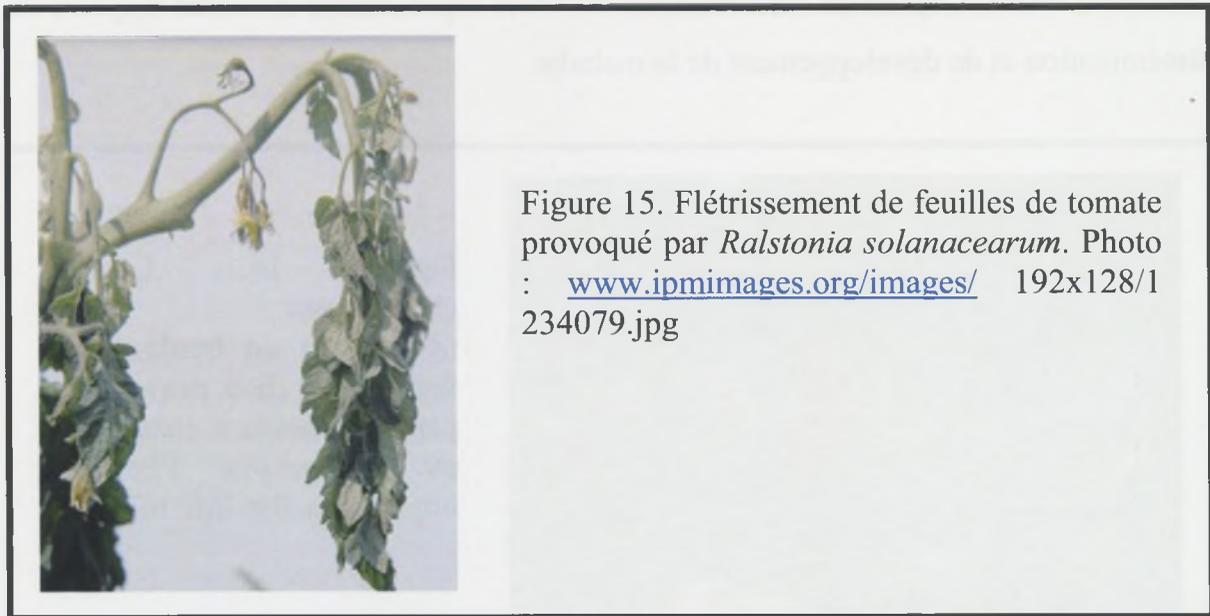


Figure 15. Flétrissement de feuilles de tomate provoqué par *Ralstonia solanacearum*. Photo : www.ipmimages.org/images/192x128/1234079.jpg

3.3.4 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum*

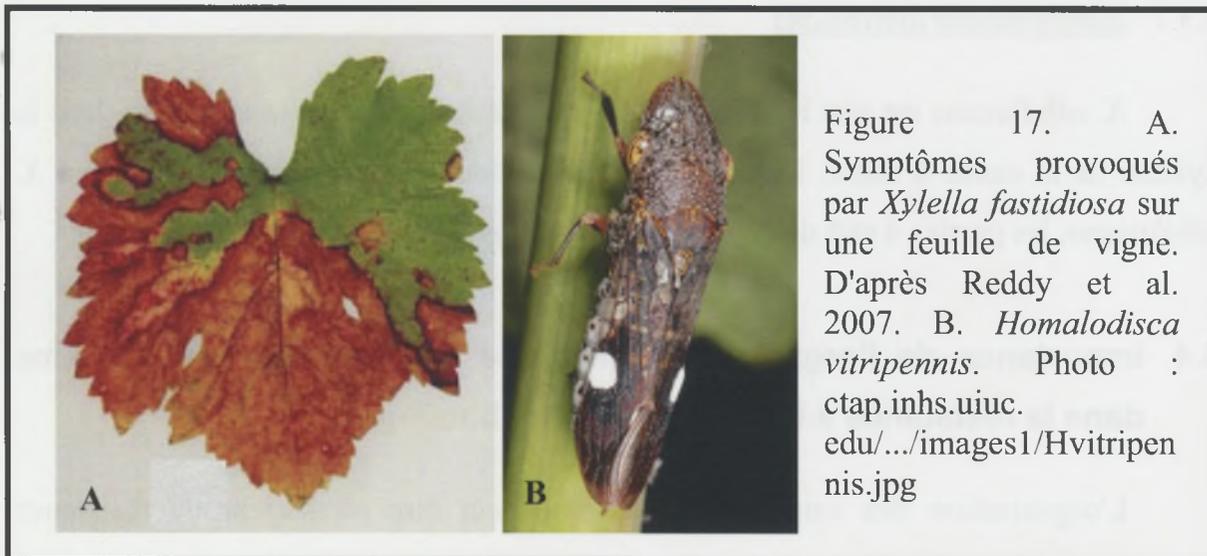
X. axonopodis pv. *vasculorum* est une bactérie pathogène de la canne à sucre qui, bien que colonisant les vaisseaux du xylème, est capable de se multiplier dans d'autres tissus comme le parenchyme. Elle cause la gommose qui se traduit par des symptômes foliaires (stries jaunes et nécroses) ou la présence d'exsudats de gomme au niveau de la tige (Figure 16). Chez des cannes infectées, on peut observer un rougissement au niveau des nœuds et une production de gomme. Dans les cas les plus graves, un écoulement de gomme (EPS) peut être observé lors d'une coupe transversale de la tige. La mort de la plante intervient lorsque le méristème est touché. Cette bactérie est transmise lors de tempêtes ou plus classiquement par le biais de l'utilisation de boutures infectées ou d'outils contaminés.



Figure 16. A. Symptômes foliaires provoqués par *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum* sur la canne à sucre. B. Exsudats de gomme au niveau de tiges de canne à sucre infectées par *X. axonopodis* pv. *vasculorum*. Photos : MSIRI.

3.3.5 *Xylella fastidiosa*

X. fastidiosa est une bactérie strictement xylémique dont le spectre d'hôte est très large. Ce spectre comprend une centaine de plantes hôtes dont de nombreuses espèces d'intérêt agronomique comme la vigne, les agrumes, le pêcher ou le caféier. Elle provoque la maladie de Pierce de la vigne (Figure 17) ou encore la chlorose variégée du citronnier ("Citrus Variegated Chlorosis"). Pour contaminer une autre plante, *X. fastidiosa* doit obligatoirement être transmise par insecte. Plusieurs insectes se nourrissant de sève du xylème sont capables de la disséminer, notamment *Homalodisca vitripennis*, qui a lui-même un large spectre d'hôte et qui a fait de *X. fastidiosa* un vrai problème sur plante cultivée.



3.3.6 *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

L. xyli sp. *xyli* est une bactérie Gram positif responsable du rabougrissement des repousses de la canne à sucre ("Ratoon Stunting Disease" ou RSD). Cette bactérie xylémique ne provoque pas de symptômes typiques mais a comme effet principal de limiter le nombre et la taille des repousses de canne à sucre. Cet effet a un impact économique important puisque la culture de la canne à sucre est basée sur la récolte des repousses d'une année à l'autre. *L. xyli* subsp. *xyli* provoque un rougissement de la tige au niveau des nœuds (Figure 18). La transmission de cette bactérie est principalement liée à l'utilisation de boutures infectées ou d'outils contaminés.

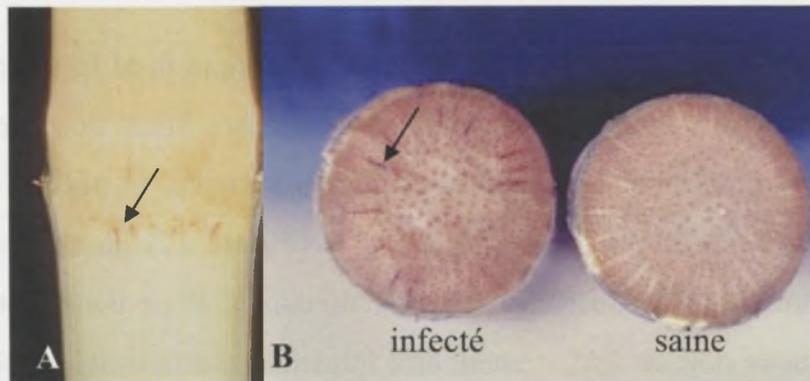


Figure 18. Rougissements de tige causés par *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (flèche). A. coupe longitudinale de tige au niveau d'un nœud de canne à sucre. B. coupe transversale de tige au niveau d'un entre-nœud. Photo : BSES et S. Matsuoka.

3.3.7 *Xanthomonas albilineans*

X. albilineans est une bactérie pathogène que l'on retrouve uniquement dans le xylème de la canne à sucre. Le travail réalisé au cours de cette thèse portant sur *X. albilineans*, les parties 4 et 5 de cette synthèse bibliographique lui seront consacrées.

3.4 Importance de l'organisation physique des vaisseaux du xylème dans la résistance à l'infection par des bactéries

L'organisation des vaisseaux du xylème peut être un facteur de résistance variétale. Chez la canne à sucre, plusieurs études ont permis de montrer que le nombre de petits vaisseaux issus de la division des gros vaisseaux du xylème au niveau des nœuds peut être significativement différent entre les différentes variétés de canne à sucre. Les gros vaisseaux peuvent donner de deux à six petites branches suivant les variétés. Cette donnée a une importance considérable sur le flux de liquide transporté par le xylème : plus le xylème est ramifié, moins sa capacité de transport sera élevée. Cette particularité semble également être un facteur déterminant dans la résistance à la colonisation par des bactéries du xylème telles que *L. xyli* subsp. *xyli* (Teakle et al. 1974; Teakle et al. 1978; Dong et al. 1997). Le diamètre des vaisseaux du xylème chez les variétés résistantes de canne à sucre (65 μm) est significativement inférieur à celui

des variétés sensibles (80 μm). Des expériences menées avec des particules de latex de couleur ont confirmé ces observations. Les particules s'accumulent au bout des vaisseaux et ont donc un parcours limité dans la tige (Dong et al. 1997). Ce blocage intervient également parfois lorsque deux vaisseaux du xylème ne sont pas connectés directement au niveau d'un nœud, mais sont séparés par du parenchyme qui laissera passer uniquement le liquide. L'organisation du xylème de la canne à sucre en fonction des variétés (ramifications, taille des vaisseaux) semble être un déterminant important de la résistance aux bactéries du xylème.

3.5 Exemples de réactions de défenses produites par la plante lors d'une invasion du xylème par des bactéries

Le xylème, bien qu'étant constitué principalement de cellules lignifiées et donc mortes, n'est pas dépourvu de moyens de défense contre les microorganismes pathogènes qui tentent de le coloniser. Ces moyens de défenses peuvent être de plusieurs types. Divers composés peuvent y être sécrétés rendant le xylème hostile à la prolifération et à la progression des microorganismes et notamment des bactéries.

Dong et al (1997) ont montré qu'en réponse à une infection par *Acetobacter diazotrophicus* (une bactérie endophyte fixatrice d'azote), la canne à sucre produit au niveau du xylème un composé de couleur rouge vif. Ce composé a comme propriété d'éliminer les bactéries en quelques jours et de bloquer le mouvement de liquide en obstruant les vaisseaux avec pour conséquence secondaire de bloquer également les déplacements des bactéries dans les vaisseaux du xylème. La canne à sucre infectée par *X. albilineans* ou attaquée par un insecte semble également produire ce type de composé (Figure 19A). Aucune étude complémentaire n'a été réalisée sur ce composé chez la canne à sucre.

Néanmoins, chez la vigne, il a été montré qu'un composé sécrété dans les vaisseaux du xylème enrobe les bactéries pour limiter leur développement (Figure 19B, Huang et al. 1986).

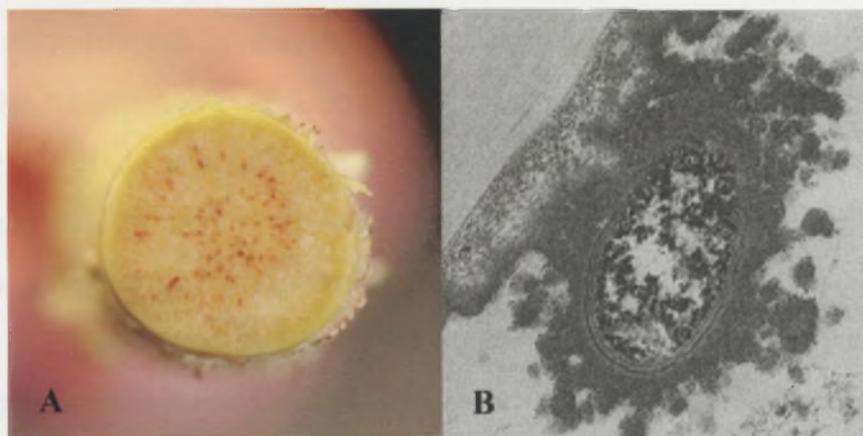


Figure 19. A. Coupe transversale de tige de canne à sucre infectée par *Xanthomonas albilineans*. Photo : P. Rott. B. Observation microscopique de *Xylella fastidiosa* enrobée d'une substance inconnue dans un vaisseau du xylème de la vigne. D'après Huang et al. 1986.

Fry et Milholland (1990) ont montré que ce composé est probablement constitué de pectines et de gommes. Leurs études menées sur des variétés de vigne résistantes, tolérantes et sensibles à la maladie de Pierce ont permis de mettre en évidence une occlusion des vaisseaux provenant de la production de plusieurs composés tels que les pectines, les gommes, les tyloses et les tanins. La variété de vigne résistante produit rapidement des gommes et des tanins. Néanmoins, la pectine a été identifiée comme étant le composé le plus efficace pour obstruer totalement les vaisseaux quelle que soit la variété. La variété résistante semble plus réactive dans la production de ces composés suite à l'intrusion d'un microorganisme. Cette réactivité semble permettre à la plante de stopper la progression de la bactérie et donc de limiter la colonisation contrairement à ce qui se produit chez la variété sensible.

Ce type de réaction n'est pas unique à la canne et à la vigne. Robb et al. (1991) ont décrit, chez la tomate lorsqu'elle est attaquée par un champignon vasculaire, un phénomène d'"enrobage vasculaire" qui résulte en un dépôt de subérine dans les vaisseaux du xylème sous l'effet de l'acide abscissique. Ces réactions de défenses font partie des réactions innées qui sont mises en place dès qu'une agression est détectée par la plante.

Des protéines codées par des gènes de défense pourraient être sécrétées dans le xylème en présence de bactéries phytopathogènes. Chez la vigne infectée par *X.*

fastidiosa, des analyses de protéomique sur des échantillons de xylème infectés ont permis de révéler la présence de plusieurs protéines PR connues pour jouer un rôle dans le pouvoir pathogène (Basha et al. 2009). Une β -1,3 glucanase capable de dégrader les parois fongiques ainsi qu'une peroxydase et une "oxygen-evolving enhancer protein 1", impliquées dans la production d'espèces réactives à l'oxygène, ont été identifiées (Ward et al. 1991). Des expériences de génomique ont conduit à l'identification du même type de protéines exprimées chez la vigne infectée par *X. fastidiosa* (Lin et al. 2007).

Par ailleurs, des protéines purifiées à partir de la sève brute du brocoli, du colza, de la citrouille, du concombre et de la tomate partagent des homologies avec des protéines PR comme les protéines riches en glycine, des peroxydases, des chitinases ou des protéases. Chez la tomate, il a été montré que la composition en protéines du xylème varient lors de la réponse à une infection fongique. La bactérie *X. oryzae* pv. *oryzae*, responsable du flétrissement bactérien chez le riz, induit la transcription d'une peroxydase lors d'une réaction incompatible (Young et al. 1995 ; Hilaire et al. 2001). La peroxydase PO-C1 a été détectée dans le mésophylle, mais aussi dans le xylème 12 heures après infection avec une souche avirulente de *X. oryzae* pv. *oryzae*. Le rôle précis des peroxydases lors d'une réponse de défense reste flou, mais plusieurs hypothèses ont été avancées. Un des rôles possible des peroxydases serait la constitution de barrières structurales en réponse à la bactérie comme le renforcement des parois en lien avec une production de lignine ou subérine. Les peroxydases pourraient également neutraliser les phénols produits par les bactéries ou encore être toxiques pour celles-ci.

3.6 Exemples de facteurs de pathogénie associés à la colonisation du xylème par les bactéries

Afin de pouvoir coloniser le xylème et contourner les défenses de sa plante hôte, une bactérie va utiliser plusieurs facteurs de pathogénie.

3.6.1 Changements de morphologie

Certaines bactéries xylémiques peuvent adopter des morphologies différentes qui vont avoir un impact sur leur capacité de colonisation. Deux types de colonies associées à deux morphotypes ont été mis en évidence chez *X. albilineans* (Ricaud et Ryan, 1989). Des colonies de grande taille et des colonies de petite taille peuvent être observées simultanément à partir de bactéries récupérées *in planta* (Figure 20A). Les petites colonies ont une croissance plus lente et sont composées de bactéries longues et filamenteuses. Les bactéries associées aux petites colonies sont plus agressives sur canne à sucre que les petites bactéries associées aux grosses colonies (Champoiseau, communication personnelle).

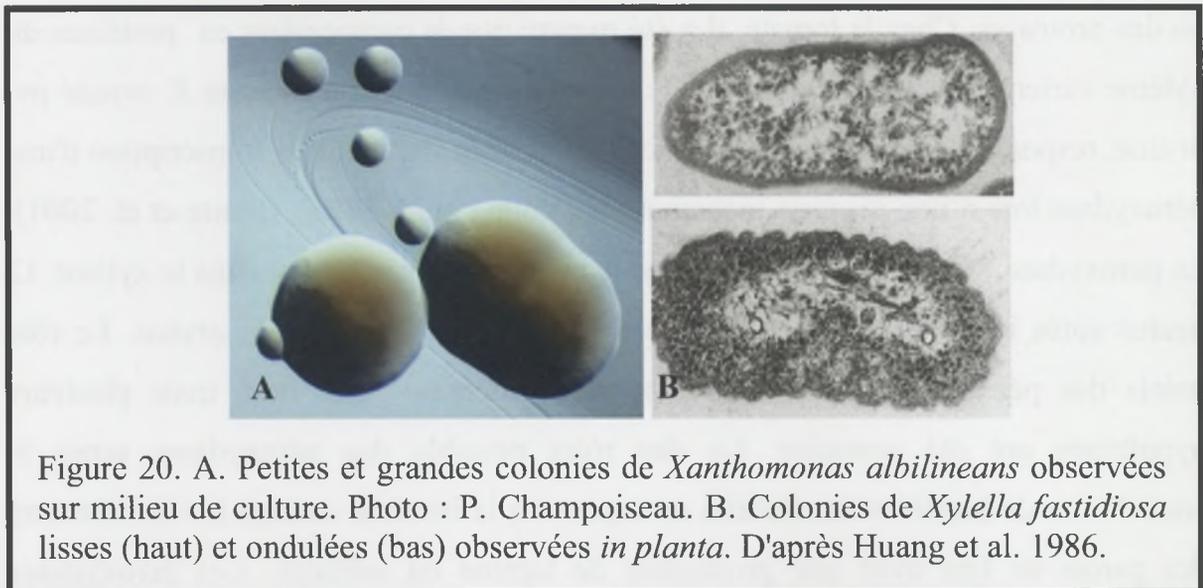


Figure 20. A. Petites et grandes colonies de *Xanthomonas albilineans* observées sur milieu de culture. Photo : P. Champoiseau. B. Colonies de *Xylella fastidiosa* lisses (haut) et ondulées (bas) observées *in planta*. D'après Huang et al. 1986.

Des différences de morphologie ayant un impact sur la pathogénie ont également été rapportées chez *X. fastidiosa* (Huang et al. 1986). *In planta*, des colonies de type lisse et des colonies de type ondulé peuvent être observées (Figure 20B). Les bactéries de type ondulé sont moins sensibles à l'enrobage par les pectines. Seules 1,5 % des bactéries ondulées sont enrobées contre 50% pour les bactéries de type lisse. Les bactéries lisses sont apparemment capables de se développer plus rapidement lors de l'infection, mais les bactéries ondulées prennent le dessus dans des plants de vigne infectés de longue date. En effet, trois mois après inoculation, les populations de

bactéries lisses chutent de 95 à 25%, alors que les populations de bactéries ondulées augmentent de 5 à 75%.

3.6.2 La motilité

La motilité cellulaire est un élément important dans la capacité de colonisation de la plante hôte et la virulence de nombreuses bactéries phytopathogènes. Une étude récente a montré que des mutations dans certains gènes *fli* (impliqués dans la biosynthèse du flagelle) chez *R. solanacearum*, se traduisaient par une réduction significative de la capacité des mutants à provoquer la maladie chez des plants de tomate inoculés (Tans-Kersten et al. 2001), soulignant ainsi la contribution des flagelles dans la pathogénie des bactéries qui en sont dotées. Cependant, le rôle des flagelles dans la motilité *in planta*, et donc l'invasion de la plante, n'est pas encore clairement décrit.

Le rôle du pilus de type IV dans la mobilité des bactéries phytopathogènes, notamment chez *R. solanacearum* est aussi à souligner (Liu et al. 2001). Les gènes impliqués dans sa biosynthèse ont également été identifiés dans les génomes de *X. fastidiosa*, de divers *Xanthomonas* et de *P. syringae* (Van Sluys et al. 2002; Buell et al. 2003). Il est intéressant de noter que la "twitching motility" a également été observée pour la migration de bactéries dans un système liquide. En effet, chez *X. fastidiosa*, qui est une bactérie non flagellée et dont l'habitat est limité au xylème, il a été démontré que le pilus permet à la bactérie de se disséminer dans la plante malgré la force contraire du flux du xylème, facilitant ainsi son adhérence aux vaisseaux, conjointement à d'autres composants tels que les EPS (Meng et al. 2005). Par ailleurs, chez *X. oryzae* pv. *oryzae*, une mutation dans le gène *pilQ* provoque une diminution significative de la capacité de la bactérie à coloniser la feuille de riz.

3.6.3 L'adhésion

Certaines protéines d'adhésion peuvent diminuer la virulence d'une bactérie pathogène du xylème. En effet, chez *X. fastidiosa*, une mutation dans deux gènes (*hxfA* et *hxfB*) codant deux hémagglutinines impliquées dans la formation de biofilms

(Figure 21) s'est traduite par une virulence accrue des mutants par rapport au type sauvage, caractérisée par une augmentation des densités de populations bactériennes, de la vitesse de colonisation et de la mort de la plante infectée par ces mutants. Dans ce cas précis, l'hémagglutinine extracellulaire de *X. fastidiosa* joue un rôle dans l'atténuation de la virulence et probablement le retard de la mort de l'hôte (Guilhabert et Kirkpatrick 2005). A l'inverse, chez *X. oryzae* pv. *oryzae*, une mutation dans ces deux gènes (*hxfA* et *hxfB*) n'entraîne pas de déficience dans la colonisation du xylème, mais la bactérie devient incapable de pénétrer naturellement la plante hôte suite à une contamination de surface. Par contre, une mutation dans le gène *yapH* rend la bactérie incapable de coloniser la plante hôte après une inoculation par blessure (Das et al. 2009).

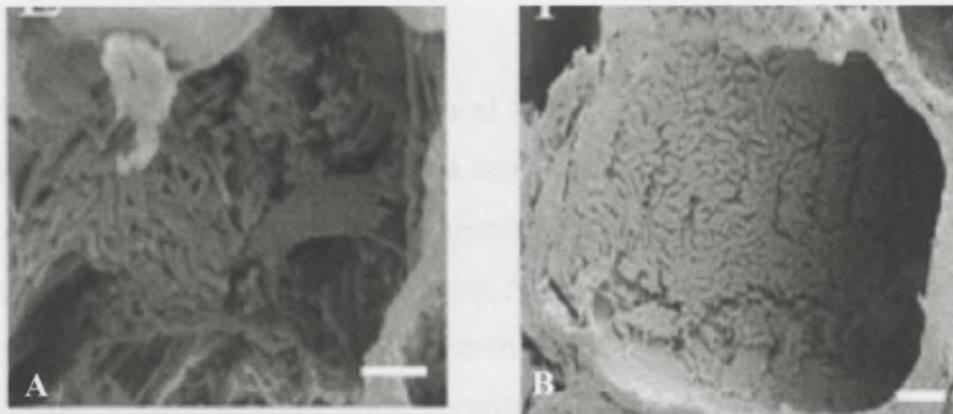


Figure 21. Observation en microscopie à balayage d'une souche sauvage (A) et d'une souche *hxfA*⁻ (B) de *Xylella fastidiosa* à l'intérieur du xylème de la vigne. Le mutant n'est plus capable de former des biofilms. Echelle 5µm. D'après Guilhabert et Kirkpatrick 2005.

3.6.4 Signalisation cellulaire

La communication cellule-à-cellule joue un rôle important dans la colonisation du xylème. Chez *X. fastidiosa*, des mutants *rpfF* sont toujours capables de produire des biofilms dans le xylème de la vigne et sont beaucoup plus virulents que la souche sauvage chez la vigne. Ce phénomène s'expliquerait par une capacité de colonisation accrue couplée à une multiplication plus importante aboutissant à une obstruction des

vaisseaux du xylème. Par contre, ces mutants *rpfF* de *X. fastidiosa* sont incapables de produire des biofilms chez l'insecte. La régulation par le DSF serait un moyen pour les bactéries de réguler leur prolifération pour préserver la plante hôte et donc leur survie (Chatterjee et al. 2008a). Ces résultats sont congruents avec les résultats obtenus avec les mutants *hxfA* et *hxfB*.

3.6.5 Enzymes de dégradation de la paroi

Les enzymes de dégradation jouent un rôle important dans la pathogénie des bactéries colonisatrices du xylème. En effet, elles permettent d'élargir les pores des membranes criblées, principaux obstacles à la progression de la bactérie dans la plante hôte. Plusieurs études de mutagenèse ont montré l'importance de ce type d'enzymes.

Chez *X. fastidiosa*, le gène *pglA* code la polygalacturonase : lorsque ce gène est interrompu, on observe une perte du pouvoir pathogène de la bactérie liée à une altération dans sa capacité à coloniser la vigne (Roper et al. 2007b). Néanmoins, Perez-Donoso et al. (2010) ont montré que l'action d'une seule enzyme de dégradation n'est pas optimale pour la dégradation des membranes criblées, mais qu'en revanche une association de plusieurs enzymes permet l'obtention de résultats plus satisfaisants. Chez *R. solanacearum*, des mutants incapables de synthétiser une ou plusieurs enzymes cellulolytiques provoquent des symptômes moins sévères que chez la souche sauvage (Liu et al. 2005). Chez *X. oryzae* pv. *oryzae*, une mutation du gène *xynB* codant la xylanase réduit de manière significative la virulence (Rajeshwari et al. 2005).

3.6.6 SST3 et effecteurs spécifiques à la colonisation du xylème

Chez *R. solanacearum*, le SST3 semble également jouer un rôle dans la colonisation des vaisseaux du xylème. Des mutants dans les gènes *hrpB* et *hrpG* sont affectés dans leur capacité à coloniser le xylème de la tomate (Vasse et al. 2000). L'inoculation du mutant *hrpB* provoque également une VHR ("Vascular Hypersensitive Response") qui se traduit par une mort simultanée des bactéries et des cellules du parenchyme adjacentes. Cette VHR est associée à un dépôt de subérine dans les vaisseaux du xylème. Récemment, un effecteur de type III a été identifié chez

X. campestris pv. *campestris* et nommé AvrAC_{Xcc8004} (Xu et al. 2008). Cet effecteur qui possède un domaine LRR ("Leucine Rich Repeat") semble nécessaire à la colonisation du xylème de l'écotype Col-O d'*Arabidopsis thaliana*. En effet, l'inoculation d'un mutant *avrAC_{Xcc8004}* directement dans la nervure centrale d'une feuille d'*Arabidopsis* provoque une HR alors qu'une inoculation par infiltration provoque les mêmes symptômes que la souche sauvage.

4 Présentation du pathosystème canne à sucre/*Xanthomonas albilineans*

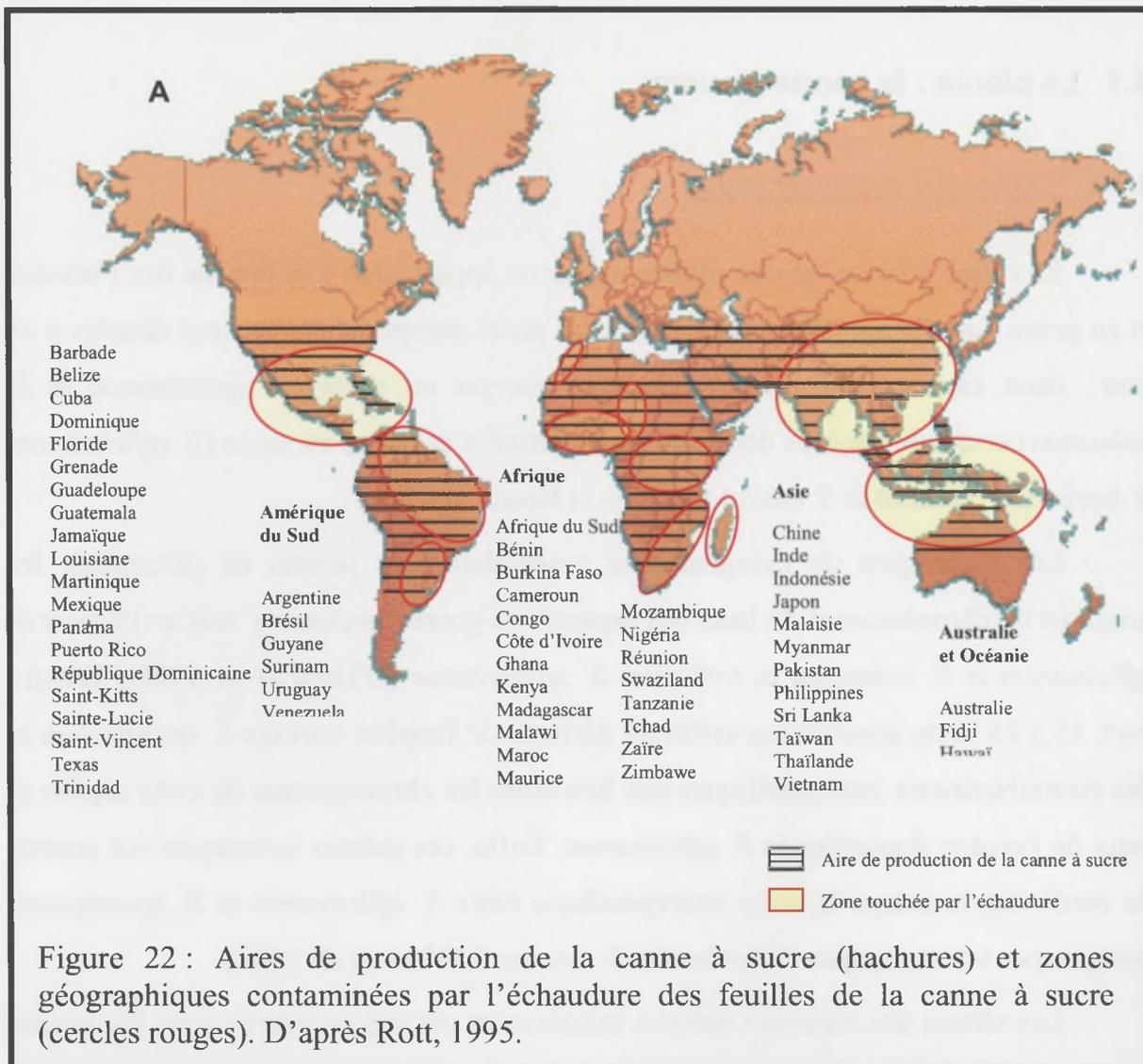
4.1 La plante : la canne à sucre

4.1.1 Taxonomie et cytogénétique

La canne à sucre est une monocotylédone appartenant à la famille des *Poaceae* et au genre *Saccharum* (Blackburn 1984). Ce genre comprend six espèces décrites à ce jour : deux espèces sauvages et robustes, pauvres en sucre (*S. spontaneum* et *S. robustum*) et quatre espèces domestiquées, cultivées et riches en sucre (*S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense* et *S. edule*) (Daniels et Roach 1987).

Les techniques de cytogénétique moléculaire ont permis de déterminer les nombres de chromosomes de base des espèces du genre *Saccharum*, soit $x=10$ pour *S. officinarum* et *S. robustum* et $x=8$ pour *S. spontaneum* (D'Hont et al. 1998). D'autre part, 15 à 25 % du génome des cultivars dérivent de l'espèce sauvage *S. spontaneum* et des recombinaisons interspécifiques ont lieu entre les chromosomes de cette espèce et ceux de l'espèce domestiquée *S. officinarum*. Enfin, ces mêmes techniques ont permis de confirmer la nature hybride interspécifique entre *S. officinarum* et *S. spontaneum* des groupes taxonomiques *S. barberi* et *S. sinense* (D'Hont et al. 2002).

Les clones des espèces cultivées initialement ont été remplacés dans les années 1920 par du matériel introgressé par l'espèce sauvage *S. spontaneum*. Dès lors, les cultivars actuels de canne à sucre sont des hybrides interspécifiques artificiels (*Saccharum* spp.), caractérisés par un génome très complexe, avec une structure génomique hybride aneuploïde à forte polyploïdie ($2n>100$). Environ une centaine de chromosomes de *S. officinarum* sont ainsi associés à quelques chromosomes de *S. spontaneum* dans les clones de cultivars modernes (Feldmann et al. 1997).



4.1.2 Origine et répartition géographique

La canne à sucre est une grande graminée tropicale cultivée pour le sucre qu'elle accumule dans ses tiges. Les différents croisements de la canne à sucre et son acclimatation ancienne en de nombreux pays rendent l'étude de son origine très difficile. Cependant, il semblerait que celle-ci se situe en Papouasie-Nouvelle-Guinée et que l'origine de sa domestication soit antérieure à 2500 ans avant notre ère. Au cours des siècles, la canne à sucre se serait d'abord répandue dans les îles du Pacifique Sud, en Inde et en Chine (1500 à 1000 ans avant notre ère), puis, plus tardivement, en Perse (500 ans avant notre ère) d'où sa culture fut étendue en Afrique du Nord et aux îles de l'Atlantique (Madère, Canaries, îles du Cap-Vert, Sao Tomé). C'est en 1506, date du second voyage de Christophe Colomb en Amérique, que sa première introduction dans les Amériques et en Hispaniola (aujourd'hui Saint-Domingue) semble avoir eu lieu (Daniels et Roach 1987; Meyer 1989). Ce n'est qu'au XVII^{ème} siècle que la canne à sucre fut importée du Brésil à Barbade et dans les autres possessions anglaises, dans les îles espagnoles de l'Amérique, au Mexique, au Pérou, au Chili et enfin dans les colonies françaises, hollandaises et danoises. Son introduction dans les Antilles, et en particulier en Guadeloupe, est datée du début des années 1640 (Meyer 1989).

La culture de la canne à sucre, limitée par le froid et l'altitude, se situe entre le 37° parallèle de latitude Nord et le 30° parallèle de latitude Sud (Fauconnier et Bassereau 1970). Présente dans plus d'une centaine de pays (Figure 22), la canne à sucre est cultivée par des millions d'agriculteurs indépendants et par de grands complexes agro-industriels.

4.1.3 L'importance économique

La canne à sucre constitue l'une des plus importantes cultures des régions tropicales et subtropicales, avec près de 24 millions d'hectares cultivés dans plus d'une centaine de pays. La production mondiale de canne à sucre a atteint 1,743 milliard de

tonnes en 2008 dont près de 57% sont répartis entre le Brésil et l'Inde (données statistiques de la F.A.O. pour 2009, <http://faostat.fao.org>).

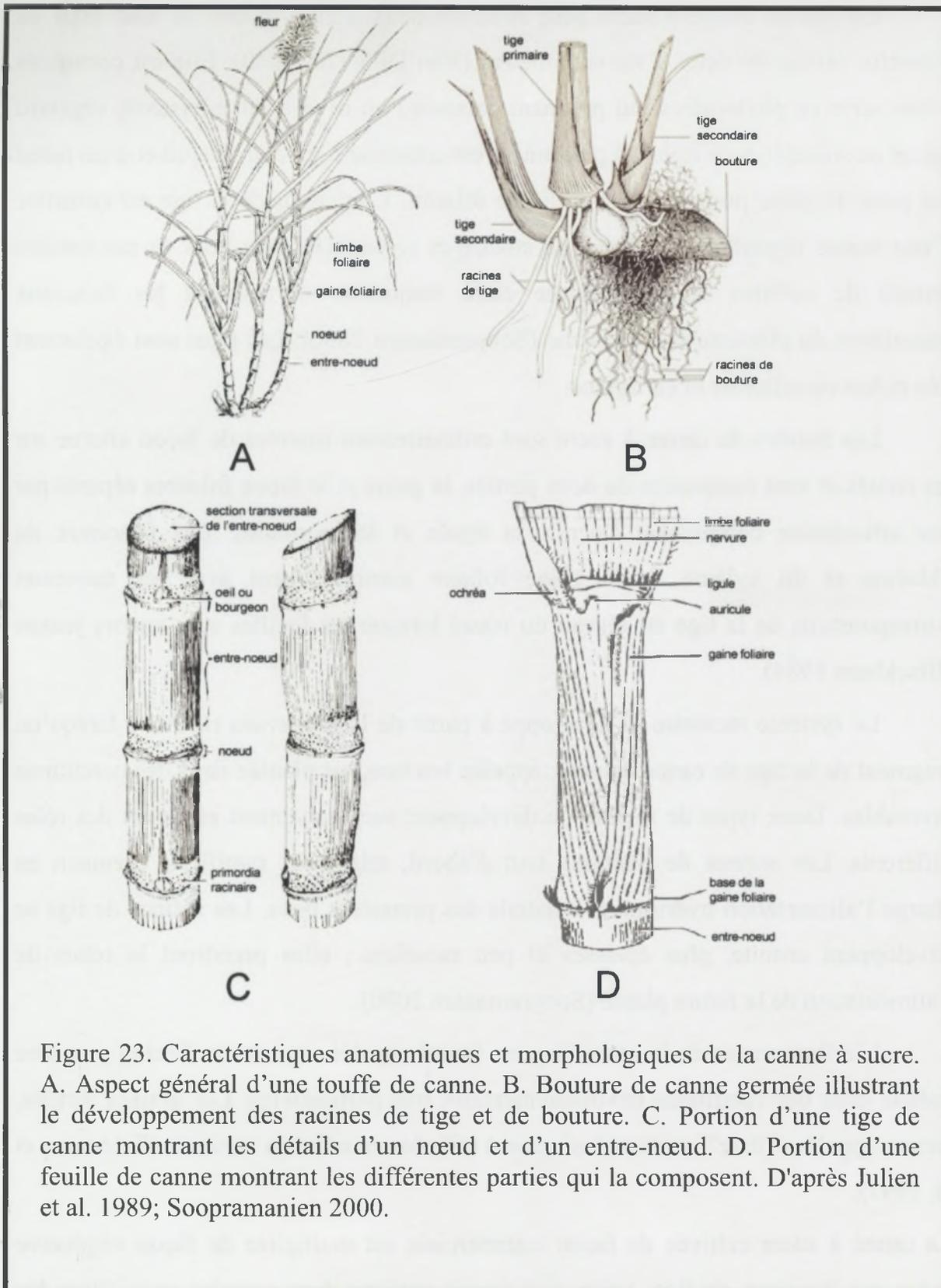
Sur le plan mondial, la canne à sucre représente, avec la betterave sucrière, la principale source de sucre donnant lieu à une exploitation industrielle. En 2006-2007, la production mondiale de sucre a battu ses records avec 162 millions de tonnes de sucre. La canne à sucre en a fourni les trois quarts et la betterave le quart restant. Si les marchés du sucre et du rhum ont toujours été l'apanage de cette culture, d'autres marchés s'ouvrent, comme l'énergie et les carburants, la chimie, la construction, le papier ou encore le fourrage et les compléments alimentaires pour bétail (lesucre.com).

Le bioéthanol, obtenu à partir du sucre ou de la plante entière, est déjà utilisé comme carburant dans certains pays, tel le Brésil, premier producteur de canne à sucre. Le Brésil a développé la filière de l'éthanol carburant à partir de la canne à sucre depuis le choc pétrolier de 1973. En 2008, le Brésil a produit 22,3 milliards de litres d'éthanol, soit 1/3 de la production mondiale. La moitié des champs de canne à sucre au Brésil sont consacrés à la production de l'éthanol, dont 85% sont consommés sur le marché intérieur, seuls 15% étant exportés. Au Brésil, l'éthanol est utilisé comme biocarburant : le bioéthanol de canne à sucre couvre 22 % des besoins nationaux en carburant.

La bagasse (résidu de broyage des tiges de canne) est utilisée pour l'énergie électrique, l'alimentation animale ou encore pour la fabrication de panneaux de particules agglomérées pour l'ameublement (le bagapan). Le saccharose de la canne à sucre est également utilisé pour la fabrication d'un plastique végétal biodégradable : le bioplastique.

4.1.4 Description morphologique

La canne à sucre, comme toutes les graminées, se présente sous la forme d'une touffe de tiges (encore appelées talles) possédant un système racinaire fibreux, de grands épis de fleurs et de longues feuilles (Figure 23).



La tige de canne à sucre peut atteindre deux à cinq mètres de haut pour un diamètre variant de deux à six centimètres (Van Dillewijn 1960). Elle est constituée d'une série de phytomères qui prennent naissance au niveau du méristème végétatif terminal au sommet de la tige. Un phytomère est constitué d'un entre-nœud et d'un nœud qui porte la gaine prolongée par le limbe foliaire. L'intérieur de la tige est constitué d'une masse importante de tissus de stockage (essentiellement pour le saccharose) formée de cellules du parenchyme entre lesquelles se trouvent les faisceaux vasculaires du phloème et du xylème (Soopramanien 2000). Les tiges sont également très riches en cellulose et en lignine.

Les feuilles de canne à sucre sont ordinairement insérées de façon alterne sur les nœuds et sont composées de deux parties, la gaine et le limbe foliaires séparés par une articulation comprenant l'ocréa, la ligule et les auricules. Les faisceaux du phloème et du xylème de la gaine foliaire communiquent avec les faisceaux correspondants de la tige au niveau du nœud lorsque les feuilles sont encore jeunes (Blackburn 1984).

Le système racinaire se développe à partir de la *primordia* racinaire lorsqu'un fragment de la tige de canne à sucre, appelée bouture, est plantée dans des conditions favorables. Deux types de racines se développent successivement et jouent des rôles différents. Les racines de boutures tout d'abord, minces et ramifiées, prennent en charge l'alimentation hydrique et minérale des premières tiges. Les racines de tige se développent ensuite, plus épaisses et peu ramifiées ; elles prendront le relais de l'alimentation de la future plante (Soopramanien 2000).

L'inflorescence de la canne à sucre (aussi appelée aigrette ou flèche) peut être induite dans des conditions environnementales très particulières. Les graines fertiles, encore appelées "fuzz", sont exclusivement utilisées en création variétale (Feldmann et al. 1997).

La canne à sucre cultivée de façon commerciale est multipliée de façon végétative grâce aux boutures de tige, voire aux cannes entières dans certains pays. Dans les conditions adéquates, les bourgeons latéraux se développent à partir de la bouture pour donner la tige primaire d'où se développeront les talles secondaires, puis les talles tertiaires, définissant ainsi le tallage. Après la floraison, ou un dommage du méristème

apical (qui peut être causé par certaines maladies, des produits chimiques ou encore certains insectes tels que les foreurs de tiges), les bourgeons latéraux pourront se développer sur les tiges de canne matures et former ce que l'on appelle les "ailerons latéraux" (Soopramanien 2000). Après la germination, les trois étapes importantes du développement de la canne à sucre sont le tallage, la croissance de tige et la maturation.

4.2 La maladie : l'échaudure des feuilles

La canne à sucre est une monoculture pluriannuelle plantée sur de grandes surfaces, ce qui la rend particulièrement exposée aux ravageurs ainsi qu'à de nombreuses maladies. En 2000, près de 60 maladies d'origines bactériennes, virales, fongiques ou encore provoquées par des phytoplasmes étaient recensées sur la canne à sucre (Rott et al. 2000). L'échaudure des feuilles (*leaf scald* en anglais), provoquée par *X. albilineans*, est considérée comme une des principales maladies d'origine bactérienne de la canne à sucre. La canne à sucre est l'hôte principal de *X. albilineans*, cependant d'autres *Poaceae* comme le maïs ou des graminées sauvages poussant à proximité des plantations de canne (*Brachiaria piligera*, *Imperata cylindrica*, *Panicum maximum*, *Paspalum* spp., *Pennisetum purpureum* et *Rottboelia cochinchinensis*) ont été décrites comme hôtes occasionnels de la bactérie (Orian 1942). La présence naturelle et fréquente des hôtes sauvages dans les zones de production de canne à sucre pourrait expliquer pourquoi la maladie n'a jamais pu être éliminée une fois installée dans un lieu donné (Ricaud et Ryan 1989).

Les répercussions économiques de l'échaudure des feuilles peuvent être très importantes lorsque des variétés sensibles de canne à sucre sont touchées, en particulier lorsque la maladie est identifiée pour la première fois dans une zone de production ou lorsqu'une nouvelle souche apparaît (Rott 1995). Des plantations entières de variétés sensibles peuvent être détruites en quelques mois ou années. La maladie affecte aussi bien le tonnage de la canne à sucre que la qualité du jus qui en est extrait. Aujourd'hui, cette maladie est recensée dans au moins 61 zones géographiques à travers le monde (Rott 1995) (Figure 22).

4.2.1 Les symptômes de la maladie

On peut distinguer deux symptomatologies d'échaudure des feuilles : une forme chronique et une forme aiguë. Elles peuvent apparaître indépendamment, mais généralement il y a une évolution graduelle de la forme chronique vers la forme aiguë (Martin et Robinson 1961). Ces deux formes de la maladie sont caractérisées par l'apparition de symptômes internes et externes.

La forme chronique de la maladie est caractérisée par la présence, sur le limbe des feuilles, de stries ou lignes chlorotiques parallèles aux nervures (Figure 24). Ces stries peuvent varier d'une ligne étroite de moins d'un millimètre à un centimètre de large, s'allongeant graduellement le long du limbe. Leurs couleurs varient du blanc au jaune sur le limbe pour prendre une teinte violacée au niveau de la gaine. En vieillissant, les stries peuvent prendre une coloration rouge (Figure 24). En s'intensifiant, la maladie se manifeste par des stries plus larges et plus diffuses, notamment sur les feuilles vieillissantes. Le tissu foliaire blanchit, pouvant conduire à un blanchiment et une chlorose du feuillage entier (Figure 24). La décoloration du limbe est accompagnée d'un dessèchement de l'extrémité des feuilles qui finissent par se recourber vers l'intérieur, évoquant la forme d'un fuseau. Sur les tiges plus âgées, la phase chronique se caractérise tout particulièrement par le démarrage et le développement des bourgeons axillaires ou ailerons le long de la tige, sans effet de dominance apicale. C'est ainsi que les jeunes pousses issues des bourgeons de la base de la tige peuvent alors présenter les mêmes symptômes que le feuillage principal. En section longitudinale ou transversale, la tige malade présente un rougissement caractéristique des faisceaux vasculaires au niveau des nœuds, voire des entre-nœuds. Sur les cultivars sensibles, la maladie peut entraîner la mort de la plante entière (Figure 24).

La forme aiguë de la maladie semble être limitée aux cultivars les plus sensibles et se manifeste par un flétrissement et un dessèchement soudain des cannes matures, sans qu'il y ait pour autant de symptômes caractéristiques de la phase chronique. C'est ainsi que des cannes à sucre qui paraissent saines meurent, comme si elles avaient été tuées par la sécheresse. Les raisons de l'apparition de la phase aiguë sont encore mal



Figure 24. Symptômes d'échaudure de feuilles de la canne à sucre. A. Aspect général d'une tige de canne infectée montrant l'enroulement et le dessèchement des feuilles. B. Coupe longitudinale de tiges montrant des tissus sains et malades (rougissement des faisceaux vasculaires). C. Lignes blanches de chlorose parallèles à la nervure centrale. D. Blanchiment du feuillage. E. Plantation de canne à sucre atteinte de l'échaudure des feuilles. Photos M. Muller (C) et P. Rott (A, B, D, E).

connues, mais celle-ci se produit souvent après une période de pluie suivie d'une période de sécheresse prolongée.

Par ailleurs, on distingue également deux phases distinctes : une phase de latence au cours de laquelle la plante porteuse de l'agent pathogène ne présente aucun symptôme de la maladie, et une phase d'éclipse où les symptômes disparaissent (Martin et Robinson 1961; Ricaud et Ryan 1989; Rott et Davis 2000).

La phase de latence constitue l'un des principaux obstacles à la lutte contre l'échaudure des feuilles. En effet, au cours de cette phase, la plante peut tolérer l'agent pathogène pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois, sans pour autant présenter de symptômes, ou alors ne présenter que quelques lignes blanches foliaires discrètes pouvant échapper, au champ, à l'attention de l'observateur (Ricaud et Ryan 1989). Cette phase de latence prend fin pour des raisons encore indéterminées, mais l'hypothèse la plus probable semble être liée à un état de stress consécutif à des conditions climatiques ou nutritionnelles particulières, favorisant le développement de la maladie.

La phase d'éclipse peut être concomitante avec la phase de latence. Au cours de cette phase, les lignes blanches caractéristiques apparaissent puis disparaissent sur le limbe foliaire. Elles ne sont plus visibles après la sénescence et la mort des feuilles âgées, et les plus jeunes feuilles ne présentent plus de symptômes. Un même plant peut apparaître sain ou infecté selon la date d'inspection.

4.2.2 Les modes de transmission de *Xanthomonas albilineans*

4.2.2.1 **La transmission mécanique par l'homme**

Il s'agit du principal mode de transmission de la maladie. Elle s'effectue essentiellement par les instruments de coupe contaminés et les boutures infectées utilisées lors des plantations (Ricaud et Ryan 1989; Rott et Davis 2000). En raison de la phase de latence de l'échaudure des feuilles, ce mode de transmission a largement contribué à la dissémination de l'agent pathogène. En effet, des boutures de plants apparemment sains, mais infectés, peuvent être disséminés d'une zone de production à une autre, tant à l'échelle des parcelles qu'au niveau mondial.

4.2.2.2 La transmission aérienne et la colonisation épiphyte

Une transmission de *X. albilineans* par voie aérienne a été observée en Guadeloupe (Klett et Rott 1994; Daugrois et al. 2003) et à Maurice (Autrey et al. 1995) dans les années 1990. Cette observation a coïncidé avec une réémergence de la maladie dans l'arc caribéen ainsi qu'à Maurice. Depuis, la transmission aérienne de *X. albilineans* a également été mise en évidence en Floride (Comstock 2001). Elle a pu être associée avec l'existence d'une phase épiphyte dans le cycle infectieux de la maladie, notamment en Guadeloupe (Daugrois et al. 2005; Champoiseau et al. 2009). La survie épiphyte observée au champ n'a jamais pu être reproduite au laboratoire. Il est ainsi possible que l'augmentation des densités bactériennes observées sur les feuilles de canne à sucre ne provienne pas d'une multiplication de la bactérie correspondant à de la colonisation épiphyte, mais simplement d'une accumulation de nouvelles bactéries amenées par les intempéries qui correspondrait à de la survie. Les feuilles porteuses de bactéries peuvent alors servir de sources d'inoculum de l'agent pathogène sous l'action du vent ou de fortes pluies (Klett et Rott 1994). Lors d'une contamination aérienne, l'agent pathogène pénétrerait dans la plante par les feuilles, sans doute *via* les ouvertures naturelles (stomates ou hydathodes) ou des blessures, fréquentes dans les cultures au champ (Rudolph 1993), néanmoins ceci n'a jamais été montré. Le passage en systémie, à savoir la progression de la bactérie dans la plante, suite à une contamination naturelle du feuillage de plants de canne à sucre indemnes de la maladie, a été décrit en Guadeloupe sur le cultivar B69566, sensible à la maladie (Daugrois et al. 2005).

4.2.3 Les méthodes de lutte

Les pratiques culturales de la canne à sucre rendent cette culture particulièrement sensible à l'échaudure des feuilles, notamment du fait de quelques spécificités : (i) les épidémies sont facilitées dans un contexte de monoculture sur de grandes surfaces agricoles, (ii) la propagation des agents pathogènes est facilitée par la multiplication végétative par bouturage et (iii) la sélection variétale est longue et

difficile, notamment à cause du caractère pluriannuel de la culture. Les méthodes de lutte contre l'échaudure des feuilles sont essentiellement préventives car aucun moyen de lutte chimique n'est utilisé à l'heure actuelle.

La sélection de variétés résistantes représente le moyen de lutte le plus efficace et le plus répandu pour lutter contre les principales maladies de la canne à sucre. L'introduction de nouvelles variétés résistantes (hybrides interspécifiques *S. spontaneum* x *S. officinarum*) a notamment permis de contenir la maladie de l'échaudure des feuilles. Cependant, la sélection variétale est un processus relativement long (10-12 ans en moyenne) qui nécessite la mise en place de schémas de sélection complexes, et pour être efficace dans la lutte contre les maladies à long terme, la sélection doit être accompagnée de mesures prophylactiques telles que (i) l'élimination du matériel végétal infecté, (ii) le nettoyage et la désinfection des outils de coupe en pépinières et (iii) des contrôles sanitaires et la production de matériel végétal assaini.

Des contrôles sanitaires stricts ont été mis en place pour l'échange et la distribution de matériel végétal (boutures) dans les zones de production où la maladie n'est pas présente mais aussi au niveau d'une zone déjà atteinte par la maladie dans laquelle il ne faut pas introduire de nouvelles souches de l'agent pathogène pouvant présenter une agressivité accrue. C'est par exemple le rôle de la quarantaine internationale du CIRAD à Montpellier, qui fournit des variétés traitées, testées et assainies après passage par deux cycles de quarantaines d'un an (Rott 1995).

L'assainissement du matériel végétal fait appel aux techniques récentes de culture *in vitro* mais aussi aux techniques plus classiques de thermothérapie des boutures. La culture *in vitro* permet la production et la multiplication de matériel végétal assaini en laboratoire à partir de différents tissus de plantes tels que les méristèmes apicaux ou les bourgeons latéraux (Feldmann et al. 1994). Les vitroplants ainsi produits sont utilisés pour la mise en place des schémas de pépinières, mais aussi dans différents essais expérimentaux, notamment en phytopathologie. La thermothérapie des boutures, quant à elle, est une méthode basée sur la destruction par la chaleur des bactéries dans les boutures infectées, sans endommager les tissus végétaux. Elle consiste en un trempage des boutures préalablement immergées dans de

l'eau à 25°C pendant 48 heures, suivi d'un bain d'eau chauffée à 50°C pendant une durée trois heures (Rott 1995). Ce procédé n'est toutefois pas toujours compatible avec la taille des surfaces agricoles à planter, et son utilisation est le plus souvent limitée aux pépinières ou à la quarantaine.

La mise au point et l'efficacité de ces techniques de contrôle et de gestion durable de l'échaudure des feuilles nécessitent une connaissance approfondie de l'agent qui en est responsable : *X. albilineans*.

4.3 L'agent pathogène : *Xanthomonas albilineans*

4.3.1 Présentation de *Xanthomonas albilineans*

Baptisée initialement *Bacterium albilineans* par Ashby en 1929, cette bactérie aérobie, Gram négatif, non sporulante, en forme de bâtonnet court possédant un unique flagelle polaire lui permettant de se déplacer en milieu liquide (Figure 25A) et produisant un pigment jaune, a été reclassée sous le nom *Xanthomonas albilineans* par Dowson (Dowson 1943). Bien que présentant les caractéristiques du genre *Xanthomonas*, *X. albilineans* se distingue des autres espèces de *Xanthomonas* notamment par un spectre caractéristique de résistance aux antibiotiques, et par une production très faible d'exopolysaccharide (Vauterin et al. 1993; Vivien 2005). En culture sur milieu gélosé, elle forme des colonies circulaires, convexes, lisses, brillantes et translucides d'une couleur jaune-miel qui a tendance à foncer après cinq jours de croissance à 28°C (Figure 25B).

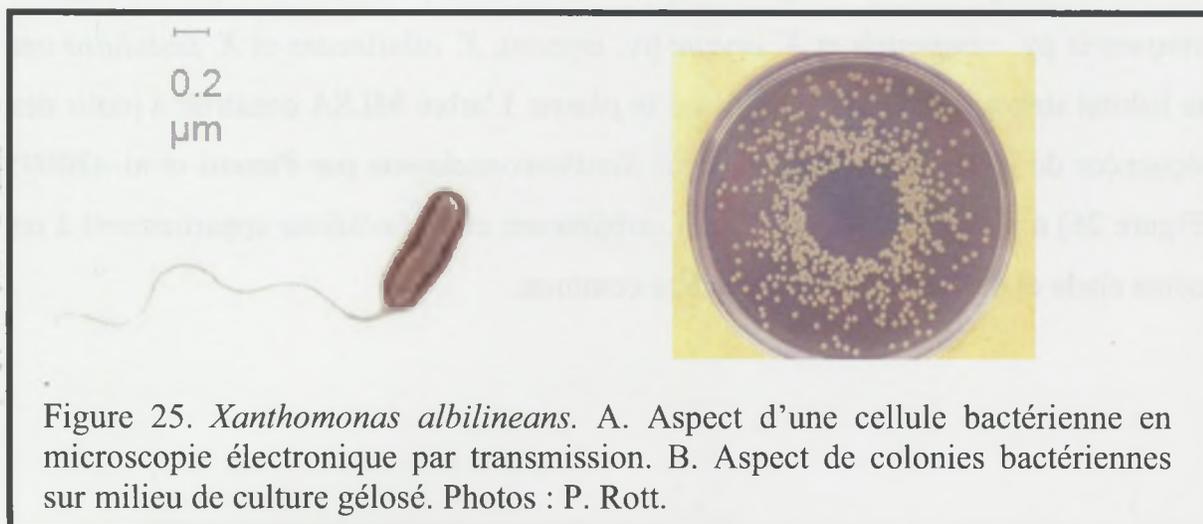


Figure 25. *Xanthomonas albilineans*. A. Aspect d'une cellule bactérienne en microscopie électronique par transmission. B. Aspect de colonies bactériennes sur milieu de culture gélosé. Photos : P. Rott.

4.3.2 *Xanthomonas albilineans* au sein de la famille des *Xanthomonadaceae*

Les *Xanthomonadaceae* sont des bactéries Gram négatif qui appartiennent à l'ordre des *Xanthomonadales*, à la sous-division gamma des Proteobactéries (Saddler et Bradbury 2005). Cette famille comprend 19 genres : *Aquimonas*, *Arenimonas*, *Aspromonas*, *Dokdonella*, *Dyella*, *Frateuria*, *Fulvimonas*, *Ignatzschineria*, *Luteibacter*, *Luteimonas*, *Lysobacter*, *Pseudoxanthomonas*, *Rhodanobacter*, *Silanimonas*, *Stenotrophomonas*, *Thermomonas*, *Wohlfahrtiimonas*, *Xanthomonas* et *Xylella* (<http://www.bacterio.cict.fr/classifgenerafamilies.html>). Les membres de cette famille se développent dans différentes niches écologiques de l'environnement (eau, sol, plante,...). Les genres *Xanthomonas* et *Xylella* sont phytopathogènes, alors que *Stenotrophomonas* est un genre opportuniste présent dans l'environnement, pouvant dans certains cas occasionner des maladies nosocomiales chez l'homme.

Le genre *Xanthomonas* comprend 21 espèces différentes, toutes associées à une plante donnée. La majorité des espèces provoque des maladies importantes chez les plantes cultivées ou les plantes d'ornement. Certaines de ces espèces comprennent plusieurs pathovars. Un pathovar (pv.) regroupe les souches responsables d'un type de symptômes sur une espèce ou un groupe d'espèces végétales. L'ensemble des membres du genre *Xanthomonas* cause des maladies chez au moins 124 espèces de plantes monocotylédones et 268 espèces de plantes dicotylédones (Hayward, 1993). Contrairement aux espèces de *Xanthomonas* vasculaires capables de coloniser non seulement le xylème mais également d'autres tissus vivants de la plante (e.g. *X. campestris* pv. *campestris* et *X. oryzae* pv. *oryzae*), *X. albilineans* et *X. fastidiosa* ont un habitat strictement limité au xylème *in planta*. L'arbre MLSA construit à partir des séquences de gènes de ménage de neuf *Xanthomonadaceae* par Pieretti et al. (2009) (Figure 26) a permis de montrer que *X. albilineans* et *X. fastidiosa* appartiennent à un même clade et dérivent du même ancêtre commun.

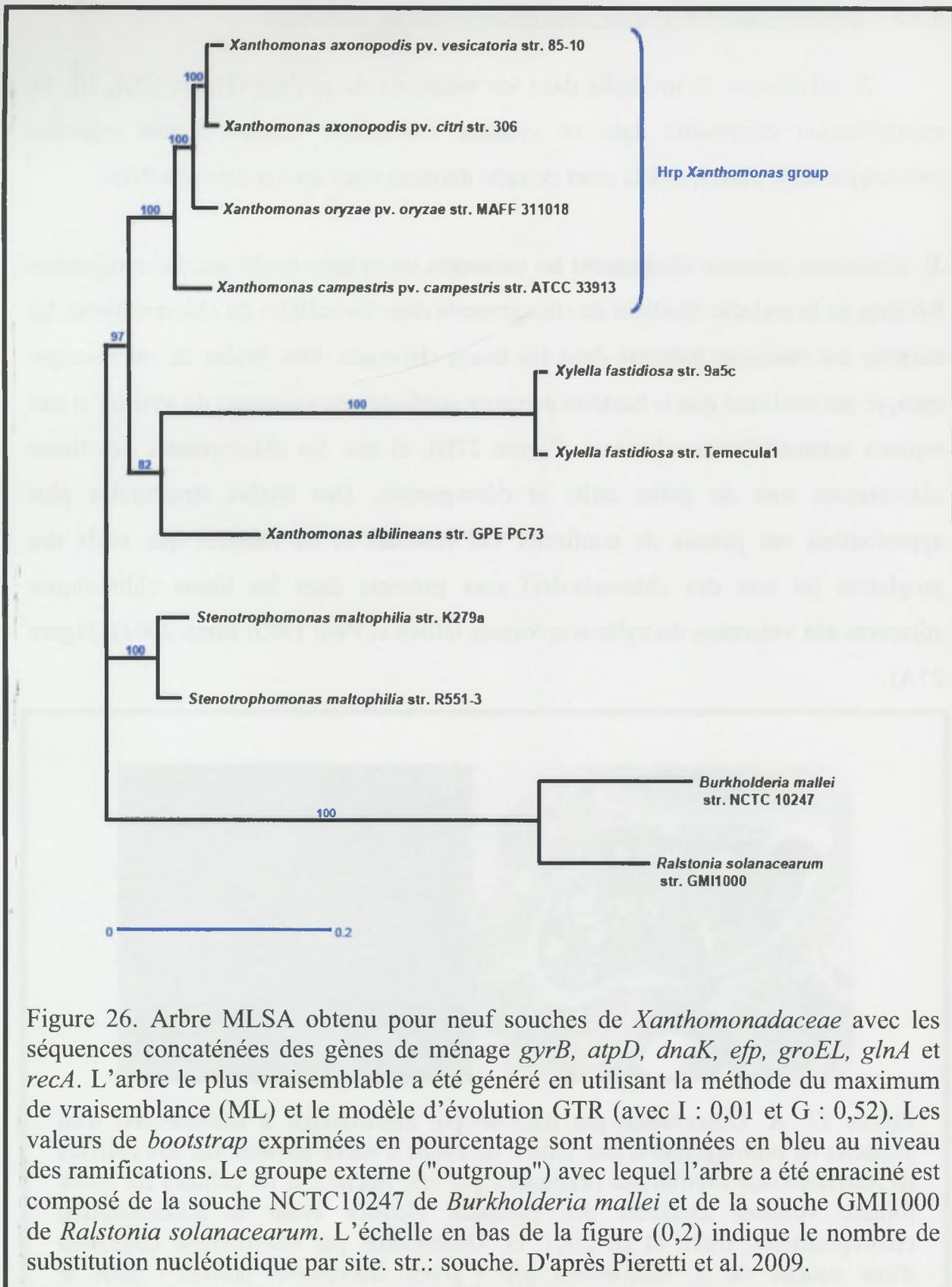


Figure 26. Arbre MLSA obtenu pour neuf souches de *Xanthomonadaceae* avec les séquences concaténées des gènes de ménage *gyrB*, *atpD*, *dnaK*, *efp*, *groEL*, *glnA* et *recA*. L'arbre le plus vraisemblable a été généré en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (ML) et le modèle d'évolution GTR (avec I : 0,01 et G : 0,52). Les valeurs de *bootstrap* exprimées en pourcentage sont mentionnées en bleu au niveau des ramifications. Le groupe externe ("outgroup") avec lequel l'arbre a été enraciné est composé de la souche NCTC10247 de *Burkholderia mallei* et de la souche GMI1000 de *Ralstonia solanacearum*. L'échelle en bas de la figure (0,2) indique le nombre de substitution nucléotidique par site. str.: souche. D'après Pieretti et al. 2009.

4.3.3 *Xanthomonas albilineans* : une bactérie limitée au xylème

X. albilineans se multiplie dans les vaisseaux du xylème (Figure 27A, B). Sa multiplication importante dans ce système conducteur conduit à une infection systémique de la plante, et à la mort de cette dernière chez les variétés sensibles.

X. albilineans colonise uniquement les vaisseaux du xylème tandis que les symptômes foliaires de la maladie résultent de changements dans les cellules du chlorenchyme. La bactérie est rarement présente dans les tissus chlorosés. Des études de microscopie optique ont confirmé que la bactérie demeure confinée aux vaisseaux du xylème et aux espaces intercellulaires adjacents (Figure 27B), et que les chloroplastes des tissus chlorotiques sont de petite taille et désorganisés. Des études structurales plus approfondies ont permis de confirmer ces résultats et de montrer que seuls des proplastides (et non des chloroplastes) sont présents dans les tissus chlorotiques adjacents aux vaisseaux du xylème colonisés (Birch et Patil 1983; Birch 2001) (Figure 27A).

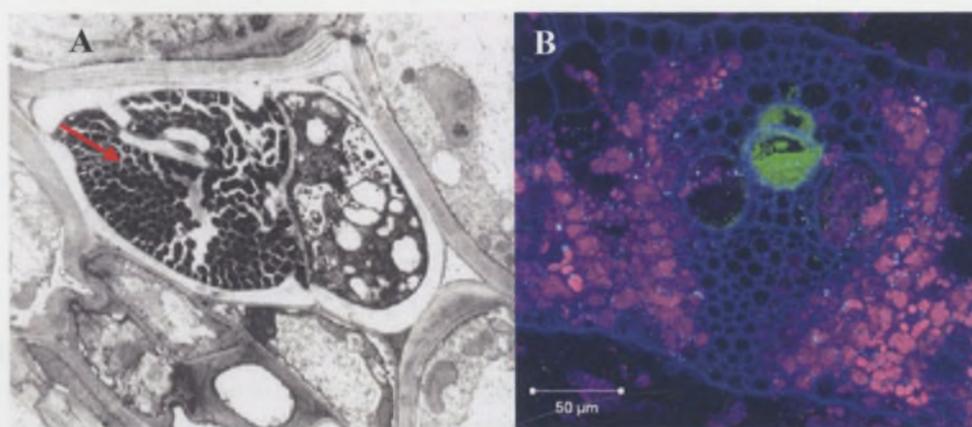


Figure 27. A. Observation par microscopie électronique à transmission d'un vaisseau de protoxylème d'une feuille de canne à sucre envahie par des cellules de *Xanthomonas albilineans* (indiquées par une flèche), et de cellules du limbe foliaire voisines montrant des plastides bloqués avant la différenciation chloroplastique. Birch et al. 2001. B. Observation par microscopie confocale d'une souche de *X. albilineans* gfp ("green fluorescent protein") dans le protoxylème d'une feuille de canne à sucre. Photo : M-S. Vernerey.

La principale plante hôte de *X. albilineans* est la canne à sucre. Néanmoins, le maïs et plusieurs *Poacées* (*Brachiaria piligera*, *Imperata cylindrica*, *Panicum maximum*, *Paspalum* sp., *Pennisetum* sp., *Rottboellia cochinchinensis*) sont connus comme hôtes secondaires et peuvent présenter des symptômes de lignes blanches foliaires lorsqu'ils sont infectés. En revanche *X. albilineans* semble incapable de se multiplier dans le riz (Philippe Rott, communication personnelle).

4.3.4 L'albicidine

4.3.4.1 Description

X. albilineans produit un métabolite secondaire toxique, appelé albicidine, qui est une composante essentielle de son pouvoir pathogène : (i) l'albicidine a été associée à l'apparition des symptômes d'échaudure des feuilles, notamment les lignes blanches et les chloroses foliaires (Birch et Patil 1987a) ; (ii) l'albicidine bloque la différenciation du chloroplaste qui reste bloqué au stade proplaste (Birch et Patil 1987b) ; (iii) l'albicidine bloque la réplication de l'ADN du chloroplaste (Birch et Patil 1987b) ; (iv) des cannes à sucre transgéniques exprimant un gène de détoxification de l'albicidine ne présentent pas de lignes blanches caractéristiques de l'échaudure des feuilles (Zhang et al. 1999); et enfin, (v) des mutants d'insertion *Tox⁻*, incapables de produire la toxine, n'induisent plus de symptômes foliaires sur des variétés très sensibles (Birch et Patil 1987a). Cependant, il a également été démontré que des mutants de *X. albilineans* ne produisant plus d'albicidine sont toujours capables de coloniser efficacement la canne à sucre (Birch et Patil 1987a). Outre son activité phytotoxique, l'albicidine possède également une activité antibiotique à des concentrations nanomolaires sur une large gamme de bactéries Gram positif et Gram négatif. Cette activité antibiotique est susceptible de jouer un rôle dans l'inhibition du développement d'agents pathogènes secondaires ou d'autres microorganismes endophytes, et ainsi de conférer un avantage compétitif à *X. albilineans* lors de la colonisation de la plante.

4.3.4.2 Le mode d'action

Le mode d'action de l'albicidine a été bien caractérisé. L'albicidine est un antibiotique et une phytotoxine capable de bloquer la réplication de l'ADN bactérien et chloroplastique. Ainsi, l'albicidine est un puissant inhibiteur de l'ADN gyrase, les concentrations inhibitrices à 50% (40-50 nM) étant plus faibles que celles observées pour d'autres inhibiteurs de gyrase tels que les coumarines ou les quinolones (Hashimi et al. 2007). Le rôle de l'ADN gyrase est d'introduire des supertours négatifs contre le gradient de tension mécanique de l'ADN superenroulé, grâce au couplage avec l'énergie chimique libérée par l'hydrolyse de l'ATP. Ainsi, elle favorise le déroulement local de la double hélice de l'ADN nécessaire à la transcription et à la réplication. Contrairement aux coumarines et aux quinolones, l'albicidine n'inhibe pas l'activité ATPase de la gyrase. L'albicidine, comme la microcine B17, bloque l'interaction de l'ADN gyrase avec l'ADN. Par ailleurs, *X. albilineans* se protège de l'activité bactéricide de l'albicidine en utilisant plusieurs mécanismes. Deux gènes impliqués dans ces mécanismes sont présents dans le même cluster de gènes que les gènes de biosynthèse de l'albicidine. Le premier code une pompe d'efflux qui permet l'export de l'albicidine au fur et à mesure qu'elle est synthétisée (Royer et al. 2004; Bostock et al. 2006). Le deuxième code une protéine de la famille McbG qui protégerait l'ADN gyrase de la fixation de l'albicidine (Royer et al. 2004; Vivien et al. 2007). Un troisième gène, localisé ailleurs sur le génome de *X. albilineans*, code une sous-unité A de l'ADN gyrase résistante à l'albicidine (Hashimi et al. 2008). Cette résistance est liée à une séquence particulière dans la partie C-terminale de la sous-unité A de l'ADN gyrase au niveau du site de fixation de l'albicidine (Hashimi et al. 2008).

4.3.5 La diversité génétique de *Xanthomonas albilineans*

Une étude menée sur 218 souches de *X. albilineans* originaires de 31 zones géographiques distinctes a permis d'identifier 54 haplotypes différents et huit groupes génétiques majeurs (PFGE A à H) grâce à la technique d'électrophorèse en champs pulsés (PFGE) (Davis et al. 1997). Deux groupes génétiques supplémentaires (PFGE I et J), soient 10 groupes PFGE au total, ont par la suite été identifiés (Clerc 1997). Deux principaux groupes RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism"),

ALB-RFLP-A et B, ont été caractérisés au cours d'une étude plus récente menée sur 74 souches d'origines diverses en utilisant une sonde de 49 kb couvrant le cluster de gènes de biosynthèse de l'albicidine (Champoiseau et al. 2006a). Il est intéressant de noter que les souches identifiées comme appartenant au groupe ALB-RFLP-B appartiennent toutes au groupe PFGE-B. Les souches associées à la recrudescence de la maladie observée en Guadeloupe, aux Etats-Unis et à Taiwan appartiennent toutes au groupe PFGE-B (Davis et al. 1997). Le séquençage d'une souche appartenant au groupe PFGE-B (la souche GPE PC73) a permis de démontrer que le profil RFLP du groupe ALB-RFLP-B est lié à la méthylation des sites TCGA par une dam methyltransférase codée par le gène XALc_2634 (Monique Royer, communication personnelle).

5 Etat de l'art sur l'étude de la pathogénie de *Xanthomonas albilineans*

X. albilineans est une bactérie peu étudiée et nous ne disposons que de peu d'éléments sur les bases moléculaires sa pathogénie. Bien que la manipulation de sa plante hôte (la canne à sucre) soit difficile à cause notamment de sa taille et sa vitesse de croissance limitée, une série d'outils destinés à évaluer le pouvoir pathogène de différentes souches a été développée. Le séquençage récent du génome de la souche GPE PC73 (Pieretti et al. 2009) a ouvert de nouvelles perspectives de recherche afin d'accroître nos connaissances sur cette bactérie. Une synthèse des résultats obtenus ces dernières années est présentée ci-après.

5.1 Méthodologie

Des outils adaptés à la mesure de la production d'albicidine *in vitro* et de la colonisation de la tige de canne à sucre ont été développés au sein de l'équipe.

5.1.1 La mesure de la production d'albicidine

Des bioessais utilisant la souche DH5 α d'*E. coli* permettent d'évaluer la production d'albicidine *in vitro*. Ces bioessais consistent à faire croître pendant cinq à sept jours une culture circulaire de la souche de *X. albilineans* à tester au centre d'une boîte de milieu Wilbrink sans antibiotique afin que l'albicidine produite se diffuse dans le milieu. Au terme de cette période de croissance, un "top agar" (surcouche d'agar noble) contenant la souche rapportrice d'*E. coli* est coulé afin de révéler un halo d'inhibition de croissance et pouvoir estimer la production d'albicidine (Figure 28).



Figure 28. Bioessais de production d'albicidine réalisés *in vitro* et basés sur la capacité de l'albicidine à inhiber la croissance d'*Escherichia coli*. A gauche une souche de *Xanthomonas albilineans* productrice d'albicidine (Tox⁺) et à droite un mutant non producteur (Tox⁻). Photo : P. Rott.

5.1.2 Mesure du pouvoir pathogène de *Xanthomonas albilineans*

Les inoculations de *X. albilineans* sur canne à sucre sont réalisées par décapitation au niveau du troisième ochréa d'une tige ayant au moins 4-5 entre-nœuds. La décapitation est immédiatement suivie du dépôt d'une solution bactérienne à 10^8 UFC/ml sur la partie sectionnée. Les symptômes sont observés sur les feuilles inoculées un mois après inoculation. La colonisation des feuilles ou de la tige de la canne à sucre par *X. albilineans* est évaluée deux mois après inoculation.

5.1.2.1 La mesure de l'intensité des symptômes foliaires

La mesure de l'intensité des symptômes foliaires permet également d'évaluer le pouvoir pathogène d'une souche.

L'observation des symptômes est réalisée environ un mois après l'inoculation sur les feuilles inoculées (Figure 29) et les feuilles non inoculées. Des lignes blanches provoquées par l'albicidine, des nécroses ou un dessèchement de la feuille sont communément observés (Figure 29). Des symptômes similaires à des lignes blanches peuvent être observés sur les feuilles de plantes inoculées avec des souches non productrices d'albicidine (Figure 29).

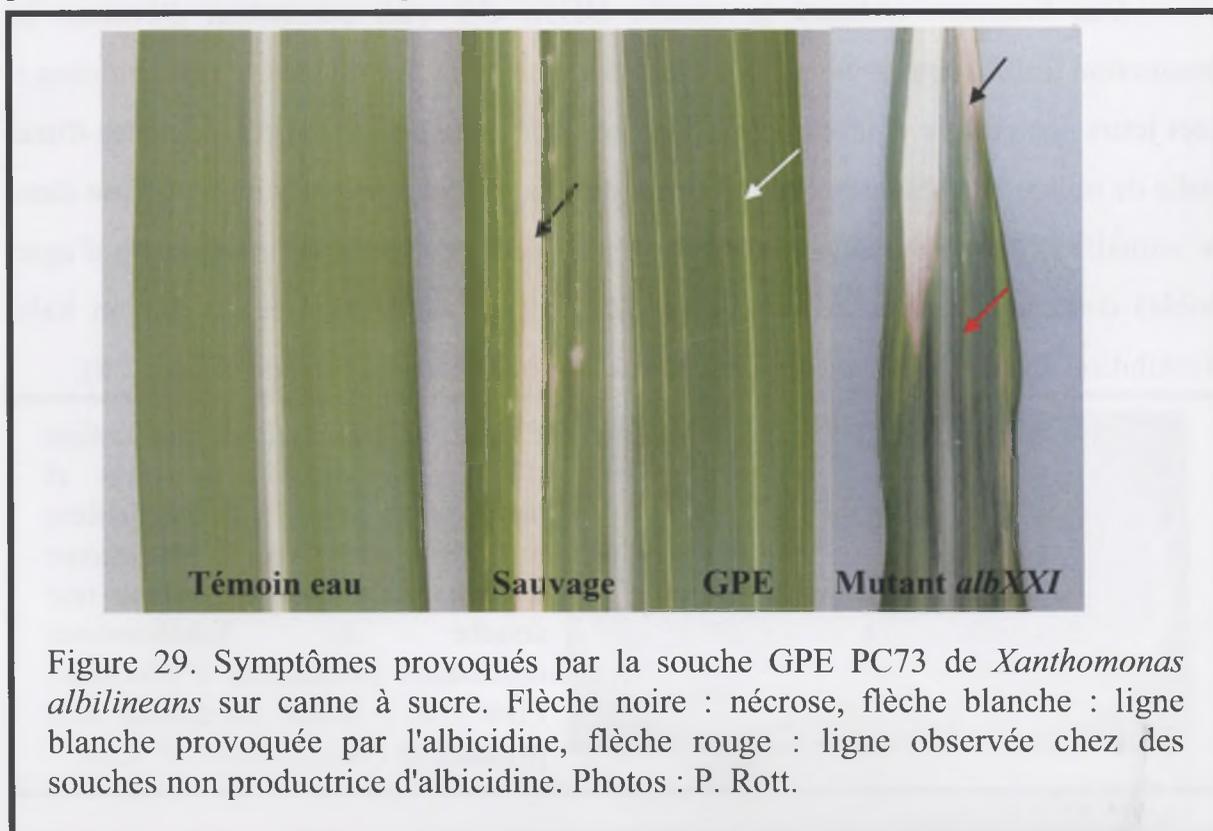


Figure 29. Symptômes provoqués par la souche GPE PC73 de *Xanthomonas albilineans* sur canne à sucre. Flèche noire : nécrose, flèche blanche : ligne blanche provoquée par l'albicidine, flèche rouge : ligne observée chez des souches non productrice d'albicidine. Photos : P. Rott.

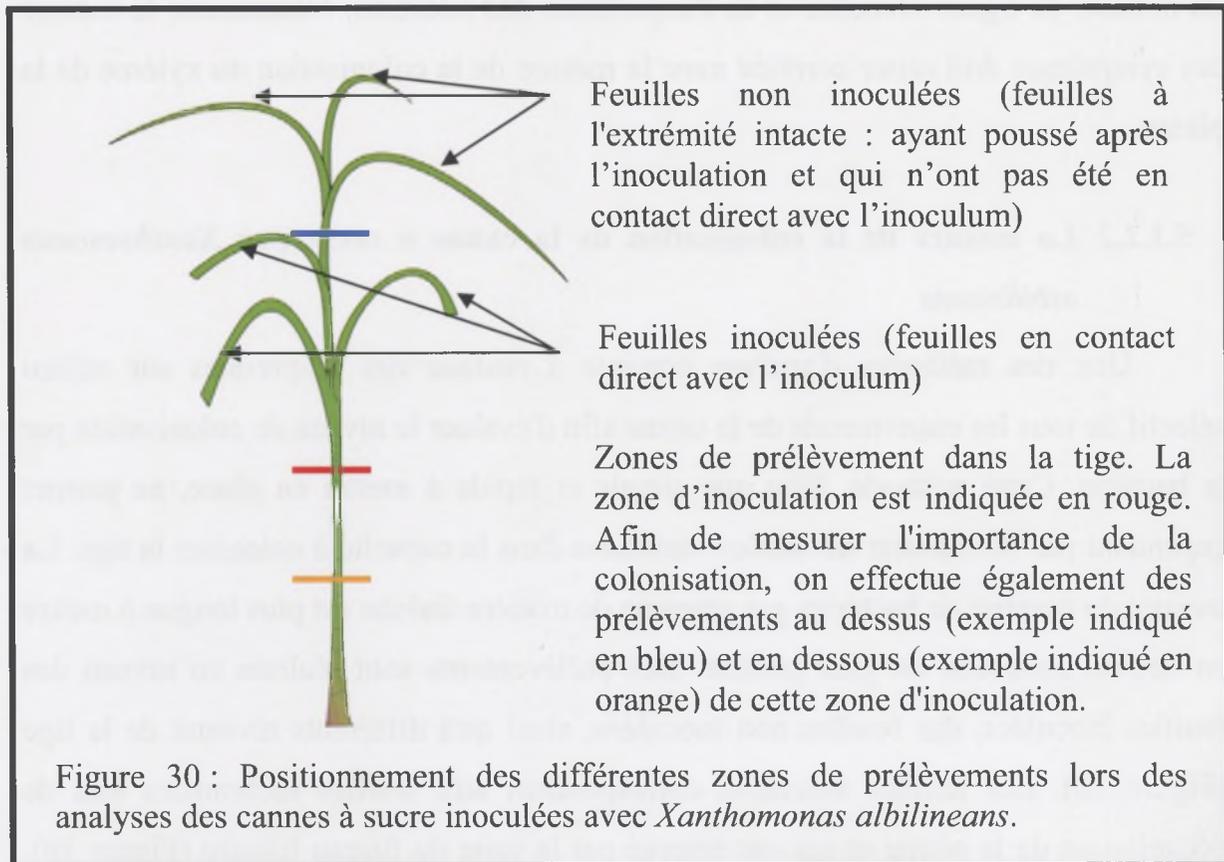
Plus le pouvoir pathogène de la souche inoculée sera important, plus les symptômes seront visibles et sévères. Cette sévérité de la maladie sera estimée à l'aide du nombre de lignes blanches et de l'importance des nécroses. Néanmoins, la mesure des symptômes doit rester corrélée avec la mesure de la colonisation du xylème de la plante.

5.1.2.2 La mesure de la colonisation de la canne à sucre par *Xanthomonas albilineans*

Une des méthodes d'analyse consiste à réaliser des empreintes sur milieu sélectif de tous les entre-nœuds de la canne afin d'évaluer le niveau de colonisation par la bactérie. Cette méthode, bien que simple et rapide à mettre en place, ne permet cependant pas de mesurer de faibles variations dans la capacité à coloniser la tige. La mesure du nombre de bactéries par gramme de matière fraîche est plus longue à mettre en oeuvre mais elle est plus précise. Des prélèvements sont réalisés au niveau des feuilles inoculées, des feuilles non inoculées, ainsi qu'à différents niveaux de la tige (Figure 30). Les feuilles inoculées correspondent aux feuilles sectionnées lors de décapitation de la plante et qui ont émergé par la suite du fuseau foliaire (Figure 30). Les feuilles non inoculées correspondent aux feuilles qui ont émergé après les feuilles inoculées (Figure 30). La présence ou l'absence de l'agent pathogène à différents points de prélèvement de la tige permet également d'évaluer la capacité de la bactérie à coloniser le xylème caulinaire. La bactérie atteint le xylème de la tige au niveau de la zone d'inoculation qui correspond aux derniers entre-nœuds en formation au moment de la décapitation de la plante. Lors de la décapitation, cette zone se situe juste à deux ou trois cm au dessus du méristème et correspond à la base des feuilles inoculées. A partir de la zone d'inoculation, la bactérie va coloniser le xylème caulinaire soit en direction de l'apex (en suivant le flux de sève), soit en direction de la base de la tige (en se déplaçant contre le flux de sève).

La présence de la bactérie dans une feuille non inoculée indique que la bactérie a colonisé le xylème d'une feuille inoculée, puis a réussi à passer du xylème foliaire au

xylème caulinaire. Elle s'est ensuite multipliée dans le xylème caulinaire pour coloniser une feuille non inoculée.



Les prélèvements sont broyés en milieu aqueux et étalés sur milieu sélectif contenant plusieurs antibiotiques et fongicides afin de n'isoler que *X. albilineans*. Après comptage, on estime le nombre de bactéries par gramme de matière fraîche. Ce type de mesures permet de détecter des faibles différences de colonisation entre deux souches.

5.2 La variabilité du pouvoir pathogène

L'étude des deux composantes essentielles de la pathogénie de *X. albilineans* - l'induction des symptômes foliaires et la capacité de colonisation de la tige de canne à sucre - ont permis de mettre en évidence (i) l'existence de variants de sévérité de la maladie, sur la base de l'intensité des symptômes foliaires, et (ii) l'existence de variants de colonisation de la tige, basés sur l'importance des densités de populations bactériennes à différents niveaux de la tige de canne à sucre. Les recherches réalisées

au CIRAD ont tenté de mettre en évidence une relation entre la variabilité du pouvoir pathogène et la variabilité génétique d'une part et la variabilité du pouvoir pathogène et la production d'albicidine d'autre part.

Par ailleurs les variétés de canne à sucre présentent des niveaux de résistance différents à l'échaudure des feuilles. En conséquence, les recherches réalisées au CIRAD ont aussi été orientées vers la compréhension des mécanismes de résistance à l'échaudure des feuilles de la canne à sucre.

5.2.1 Relation entre variabilité du pouvoir pathogène et variabilité génétique de *Xanthomonas albilineans*

Deux approches ont été mises en oeuvre pour étudier la relation entre la variabilité du pouvoir pathogène et la variabilité génétique. La première a consisté à comparer le pouvoir pathogène de souches de *X. albilineans* appartenant aux différents groupes génétiques caractérisés à l'aide de marqueurs moléculaires (groupes PFGE et RFLP, voir paragraphe 4.3.5). Cette approche n'a pas permis de mettre en évidence une telle relation (Tableau 1, Champoiseau et al. 2006a). La deuxième approche a consisté à comparer le pouvoir pathogène de souches génétiquement très proches (souches appartenant toutes au groupe ALB-RFLP-B2). Cette approche a permis d'identifier des souches génétiquement très proches mais dont le pouvoir pathogène est différent (Tableau 1). La variabilité génétique de ces souches a alors été étudiée à l'aide de nouveaux marqueurs moléculaires (AFLP et polymorphismes de gènes de pathogénie identifiés chez les autres *Xanthomonas*). Cependant, cette étude n'a pas non plus permis de mettre en évidence une relation entre la variabilité génétique et la variabilité du pouvoir pathogène au sein de ces souches appartenant au groupe ALB-RFLP-B2 (Champoiseau et al. 2006b). Cette étude sera prochainement complétée par le séquençage du génome complet de ces souches (Projet en collaboration avec le Génoscope et l'UMR LIPM).

Souche	Provenance	Groupe RFLP	Groupe PFGE	Production d'albicidine	Sévérité des symptômes	Intensité de la colonisation
TWN052	Taiwan	B3	B	M	H	H
HVO082	Burkina Faso	A2	C	H	H-I	H
BLZ103	Bélize	B2	B	M	I-L	I-L
TWN107	Taiwan	B3	B	M	I-L	I
BRA115	Brésil	B1	B	M	L	L
PNG130	Papouasie Nouvelle Guinée	A10	H	L	L	L
DOM097	République Dominicaine	B2	A	...	L	I-L
MTQ078	Martinique	B2	B	M	L	L
FJI080	Iles Fidji	A8	E	M	L	L
Xa23R1	Floride, USA	A1	A	H	L	L
GPEDC61	Guadeloupe	B2	B	M	H	H
GPEF4	Guadeloupe	B2	B	H	H	H
GPEG5	Guadeloupe	B2	B	H	H-I	H
GPEDC38	Guadeloupe	B2	B	H	I	H-I
GPEDC23	Guadeloupe	B2	B	M	I	H-I
GPET16	Guadeloupe	B2	B	H	I-L	I-L
GPEP14B	Guadeloupe	B2	B	L	L	L
GPE48	Guadeloupe	B2	B	M	L	L
GPESJ2	Guadeloupe	B2	B	L	L	L
GPESJ47	Guadeloupe	B2	B	H	L	L

Tableau 1. Comparaison des caractéristiques génétiques, phénotypiques et de pathogénie de 20 souches de *Xanthomonas albilineans*. L'appartenance des souches aux différents groupes génétiques RFLP et PFGE (voir paragraphe 4.3.5) est indiquée. Les critères de niveau de production d'albicidine, de capacité à produire des symptômes et à coloniser la tige ont été notés : H = Forte, M = Moyenne, I = Intermédiaire, et L = Faible. Adapté de Champoiseau et al. 2006a.

5.2.2 Relation entre la variabilité du pouvoir pathogène et la production d'albicidine

L'albicidine étant un facteur de pathogénie important de *X. albilineans*, des travaux ont été menés pour étudier la relation entre la variabilité de la production d'albicidine *in vitro* et la variabilité du pouvoir pathogène. Cependant, aucune relation n'a pu être mise en évidence. La capacité des souches de *X. albilineans* à produire l'albicidine *in vitro* n'est donc pas liée à la capacité de ces souches à coloniser la tige de canne à sucre (Tableau 1 ; Champoiseau et al. 2006a). Ces travaux n'ont pas non plus mis en relation le niveau de production d'albicidine des souches et leur

appartenance à un groupe génétique précis (Tableau 1). Par ailleurs, aucune relation entre la variabilité génétique des gènes de biosynthèse de l'albicidine et la capacité des souches de *X. albilineans* à produire l'albicidine *in vitro* n'a été mise en évidence (Renier et al. 2007).

5.2.3 Etude de la résistance de la canne à sucre à l'échaudure des feuilles

Les variétés de canne à sucre présentent des niveaux de résistance très différents à l'échaudure des feuilles. Des études ont été menées sur plusieurs couples variété de canne à sucre-souche de *X. albilineans* (Mohamed, 1995; Rott et al. 1997). Trois souches de *X. albilineans* appartenant à des groupes génétiques différents (MTQ058, groupe PFGE-I ; HVO005, groupe PFGE-F et GPE5, groupe PFGE-B) ont été inoculées par la technique de décapitation sur six variétés de canne à sucre présentant différents niveaux de résistance à l'échaudure des feuilles. Les plantes ont été analysées trois mois après inoculation. Les souches MTQ058 et HVO005 semblent moins pathogènes que la souche GPE5 qui appartient au groupe PFGE B. L'indice de maladie observée pour la souche GPE5 est bien corrélé au niveau de résistance des variétés de canne à sucre. La taille des populations bactériennes de la souche GPE5 dans la partie supérieure de la tige et dans l'apex est également bien corrélée au niveau de résistance ou de sensibilité des variétés de canne à sucre (Figure 31). La résistance variétale semble donc liée à la capacité de *X. albilineans* à coloniser les parties de la tige de canne à sucre qui se trouvent au-dessus du point d'inoculation dont l'apex (voir paragraphe 5.1.2.2, Figure 30). Les mécanismes de résistance à l'échaudure des feuilles restent inconnus. Ils pourraient être liés à la morphologie du xylème caulinaire qui serait moins favorable à la multiplication de la bactérie chez les variétés résistantes. Des expériences de protéomique et de microarray ont été conduites dans le but d'identifier des protéines ou des gènes de la canne à sucre dont l'expression serait induite ou réprimée lors de l'infection par *X. albilineans* (Dabbas et al. 2006; Garces et al. 2010). Cependant, à ce jour, aucun mécanisme moléculaire de résistance à l'échaudure des feuilles n'a été décrit.

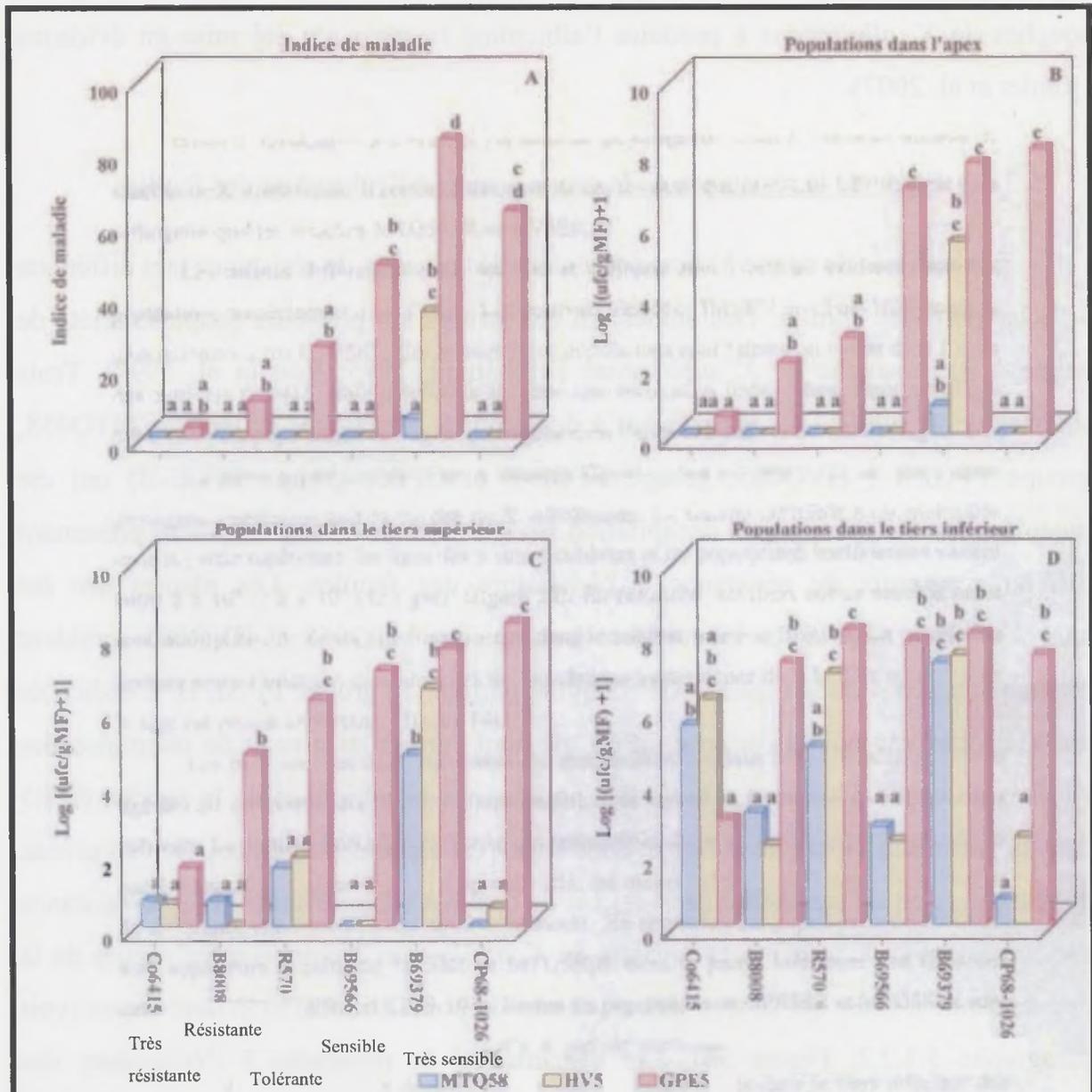


Figure 31. Populations bactériennes et symptomatologie associée chez six variétés de canne à sucre trois mois après inoculation des tiges avec trois souches de *Xanthomonas albilineans*. Chaque barre représente une moyenne de huit tiges. Dans chaque figure, les barres avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à P = 0,01 selon le test de Newman-Keuls. Le tiers supérieur de la tige se trouve au dessus du point d'inoculation (voir figure 30). Le tiers inférieur de la tige se trouve en dessous du point d'inoculation (voir figure 30). L'indice de la maladie traduit l'intensité des symptômes foliaires. D'après Mohamed, 1995.

5.3 Le séquençage récent du génome de *Xanthomonas albilineans* : de nouvelles perspectives

Récemment, la séquence du génome de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* a été obtenue en collaboration avec le génoscope d'Evry. La souche GPE PC73 est une souche très pathogène originaire de Guadeloupe qui appartient aux groupes PFGE-B et ALB-RFLP-B. L'annotation de cette séquence par notre équipe, en collaboration avec les UMR LIPM, LGDP et PaVé, a permis la mise en évidence de nouveaux gènes potentiellement impliqués dans le cycle de vie de *X. albilineans*. L'étude de ces nouveaux gènes ouvre donc de nouvelles perspectives de recherche.

X. albilineans possède un chromosome circulaire de 3.768.695 pb et trois plasmides extra-chromosomiques dont les tailles respectives sont de 32, 27 et 25 kb (Pieretti et al. 2009). Le génome de *X. albilineans* comprend 3115 séquences codant des protéines (CDSs pour "protein-coding sequences") et sa taille est plus petite que celle des génomes des autres *Xanthomonas* (en moyenne 5 Mb), mais plus grande que celle du génome de *X. fastidiosa* (2,5 Mb pour la souche Temecula1).

Le génome de *X. albilineans* comprend la plupart des facteurs et systèmes de pathogénie communément retrouvés chez les bactéries phytopathogènes et décrits en introduction (Tableau 2). Plusieurs gènes ou clusters de gènes impliqués dans la pathogénie sont néanmoins absents chez *X. albilineans* comme le cluster de gènes *gum* impliqué dans la biosynthèse du xanthane. *X. albilineans* est également dépourvue de SST6 et de SST3 Hrp. Aucun des effecteurs de type III décrits à ce jour n'est présent dans le génome de *X. albilineans*. Le génome de *X. albilineans* contient les gènes de biosynthèse de l'albicidine qui est une phytotoxine NRPS sécrétée par une pompe d'efflux (Bostock et al. 2006).

X. albilineans partage des caractéristiques génomiques particulières avec *X. fastidiosa*. Ces caractéristiques communes seraient liées à l'adaptation de ces deux espèces à un mode de vie limité aux vaisseaux du xylème qui constituent une niche cloisonnée et un environnement pauvre en éléments nutritifs (Pieretti et al. 2009). *X. albilineans* et *X. fastidiosa* ont toutes les deux subi une érosion importante de leur génome, elles ne possèdent pas de SST3 Hrp et elles codent des cellulases particulières sans doute adaptées à l'utilisation des débris cellulaires disponibles dans la sève brute

Deux hypothèses permettent de relier l'érosion du génome à l'adaptation à un mode de vie limité au xylème. La première propose que la diminution de la vitesse de croissance, qui chez les bactéries est toujours associée à l'érosion du génome, soit favorable à un mode de vie limité au xylème. Cette diminution de la vitesse de croissance, observée *in vitro* surtout chez *X. fastidiosa* et dans une moindre mesure chez *X. albilineans*, serait favorable car elle permettrait de limiter l'obstruction des vaisseaux et donc de retarder la mort de la plante. La deuxième hypothèse propose que l'adaptation à un seul habitat ait permis aux bactéries de se débarrasser des gènes nécessaires à la colonisation d'autres habitats. En effet, chez *X. fastidiosa* et *X. albilineans*, l'érosion du génome concerne principalement des gènes impliqués dans le métabolisme et les mécanismes de régulation de transcription (Pieretti et al. 2009). L'absence de SST3 Hrp serait, quant à elle, liée à un mode de vie limité au xylème qui permettrait aux bactéries d'échapper plus facilement aux systèmes de surveillance de la plante (détection des microorganismes par la plante).

L'érosion du génome de *X. albilineans* est cependant limitée par rapport à celle de *X. fastidiosa*. De plus, *X. albilineans* possède des gènes qui lui sont spécifiques et qui pourraient jouer un rôle important dans son cycle de vie (Pieretti et al. 2009) :

- un cluster de gènes codant un SST3 SPI-1 (*Salmonella* Pathogenicity Island-1) connu pour être impliqué dans des interactions avec un hôte animal.
- 12 gènes NRPS qui couvrent 4 % de la taille du génome. Trois de ces gènes sont impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine. Les neuf autres gènes NRPS seraient impliqués dans la production de nouvelles molécules.

1 Introduction

Les bactéries Gram négatif sont "isolées" du milieu extérieur grâce à la présence d'une paroi composée de deux membranes, une membrane interne et une membrane externe entourant une couche de peptidoglycane. Ces bactéries ont développé des systèmes élaborés appelés systèmes de sécrétion servant au transport de protéines au travers de ces membranes, protéines qui seront soit libérées dans le milieu extracellulaire, soit directement injectées dans la cellule de l'hôte. Il existe plusieurs systèmes de sécrétion (types I, II, III, IV, V et VI) qui assurent le transport de protéines spécifiques au travers de la paroi bactérienne. Ces différents systèmes de sécrétion sont décrits en détail dans l'introduction générale. Cette partie introductive du chapitre portera plus spécifiquement sur les systèmes de sécrétion de type III (SST3) et plus précisément sur le SST3 SPI-1 ("*Salmonella* Pathogenicity Island-1").

1.1 Les systèmes de sécrétion de type III

1.1.1 Description générale

Les SST3 ou injectisomes sont très répandus dans le monde bactérien. En effet, ils sont conservés dans plus de 25 genres de bactéries Gram négatif. Ces systèmes permettent à la bactérie d'entretenir des interactions bénéfiques ou non avec un ou plusieurs hôtes, animal ou végétal (Gürlebeck et al. 2006).

Les SST3 représentent un ensemble de gènes codant différentes protéines qui vont former des "seringues moléculaires". Les injectisomes présentent tous une structure similaire caractérisée par une partie basale ancrée dans la paroi de la bactérie et une structure externe qui va permettre l'adhésion de la bactérie à une cellule cible et l'injection d'effecteurs protéiques directement dans le cytoplasme de cette dernière. Il s'agit plus précisément d'un canal multiprotéique permettant à des protéines bactériennes de traverser les membranes interne et externe de la bactérie, de circuler dans le conduit formé par le pilus ou l'aiguille, d'atteindre la cellule hôte, d'en franchir la membrane plasmique, pour finalement entrer dans le cytoplasme. Les protéines

injectées par ces systèmes sont appelées effecteurs de type III. Tous les SST3 ont une homologie structurale avec le flagelle bactérien (Cornelis 2006) (Figure 32).

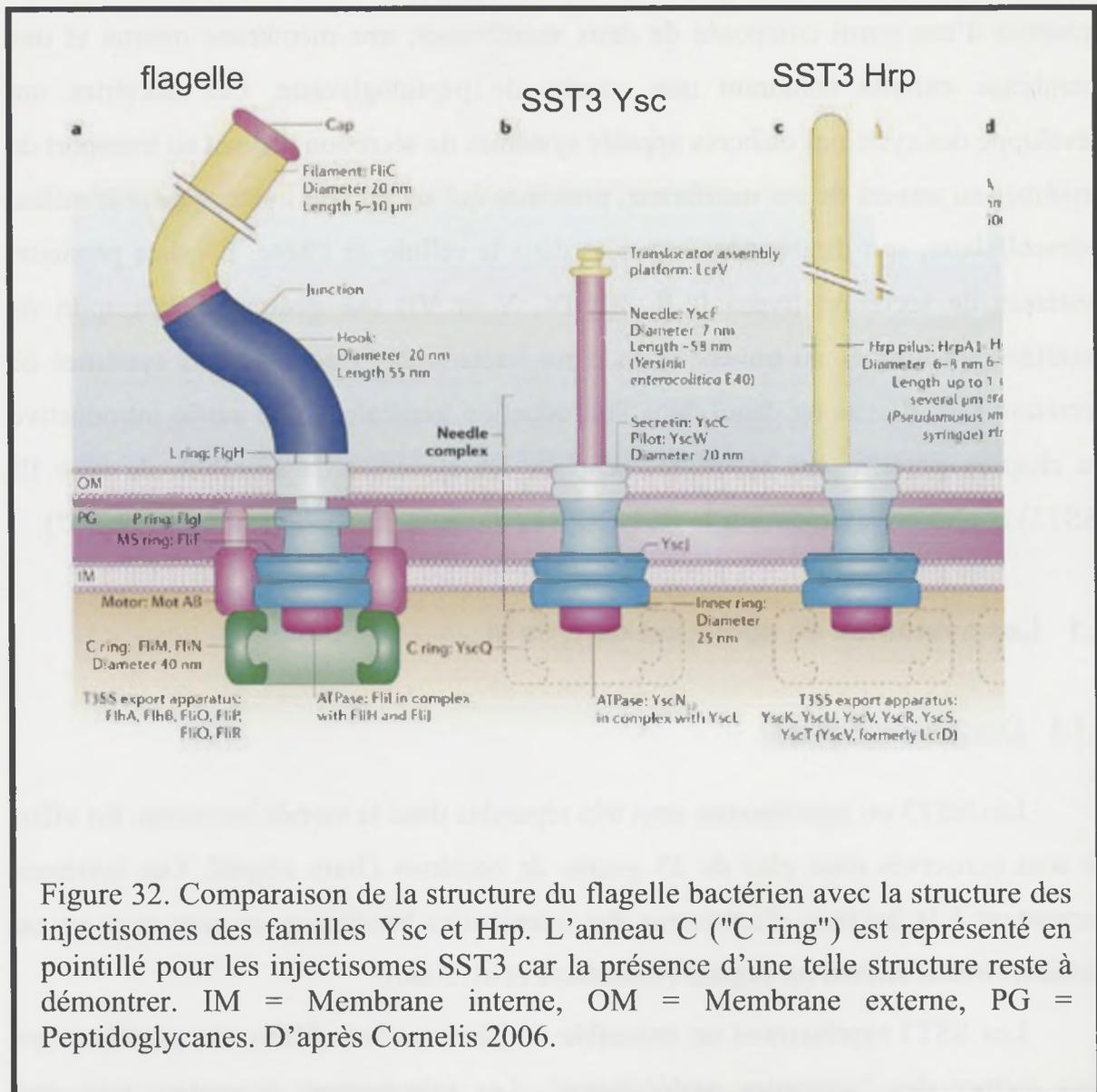


Figure 32. Comparaison de la structure du flagelle bactérien avec la structure des injectisomes des familles Ysc et Hrp. L'anneau C ("C ring") est représenté en pointillé pour les injectisomes SST3 car la présence d'une telle structure reste à démontrer. IM = Membrane interne, OM = Membrane externe, PG = Peptidoglycanes. D'après Cornelis 2006.

1.1.2 Différentes familles de systèmes de sécrétion de type III

Les SST3 étant présents chez de nombreuses bactéries, ils permettent l'injection d'effecteurs dans plusieurs types de cellules animales ou végétales. Cette caractéristique permet de classer ces SST3 en plusieurs familles. On compte sept familles de SST3 (Hueck, 1998 ; Cornelis 2006) :

- Les familles Hrp1 et Hrp2 ("Hypersensitive response and pathogenicity 1" et "Hypersensitive response and pathogenicity 2") regroupent les SST3 présents notamment chez les bactéries pathogènes de plantes. La longueur du pilus est importante et permettrait au pilus Hrp de traverser la paroi pecto-cellulosique des cellules végétales (He et Jin, 2003)(Figure 32). Ce système de sécrétion a été présenté plus en détail dans l'introduction générale.

- Les familles "Chlamydiales" et "Rhizobium" regroupent les SST3 de bactéries de l'ordre des Chlamydiales et des Rhizobia. Ces SST3 permettent l'injection dans la cellule végétale de protéines nécessaires à la mise en place des processus de nodulation chez les Rhizobia.

- Les familles Ysc ("*Yersinia* secretion") (Cornelis, 2002), SPI-1 et SPI-2 ("*Salmonella* Pathogenicity Island 1" et "*Salmonella* Pathogenicity Island 2")(Zhou et Galan, 2001) regroupent les SST3 présents notamment chez les bactéries pathogènes ou symbiontes d'animaux (mammifères, insectes, etc...).

1.2 Le système de sécrétion de type III SPI-1

1.2.1 Structure et fonctionnement

Une vingtaine de protéines sont impliquées dans la formation du SST3 SPI-1. Ces protéines sont codées par des gènes organisés en clusters. Ces gènes sont regroupés dans des îlots de pathogénie. Ce type de cluster est souvent acquis par transfert horizontal entre bactéries.

La structure d'un SST3 SPI-1 est très similaire à celle d'un SST3 Hrp. La différence principale réside dans la taille du pilus qui est beaucoup plus court chez les SST3 SPI-1 (Figure 32). Structurellement, un SST3 se décompose en deux parties principales : l'appareil d'exportation et la partie centrale (Galan et Wolf-Watz 2006) (Figure 33). L'appareil d'exportation est composé d'une ATPase et de protéines associées à la membrane interne. Il permet le passage d'effecteurs protéiques à travers la membrane interne. La partie centrale est composée de protéines associées à la membrane externe et de la seringue. Elle relie la cellule bactérienne à la cellule de

l'hôte. A l'extrémité de la seringue se trouve le translocon qui permet la reconnaissance de la cellule eucaryote animale ainsi que le passage de protéines bactériennes au travers de la membrane plasmique (Figure 33). Afin d'être sécrétés, les effecteurs doivent se lier à des protéines chaperonnes. Cette liaison va conditionner la translocation *via* le système de sécrétion. *In vitro*, il a été montré que l'ATPase va dissocier la chaperonne de son effecteur qui sera sécrété sous une forme non repliée (Akeda et Galan 2005).

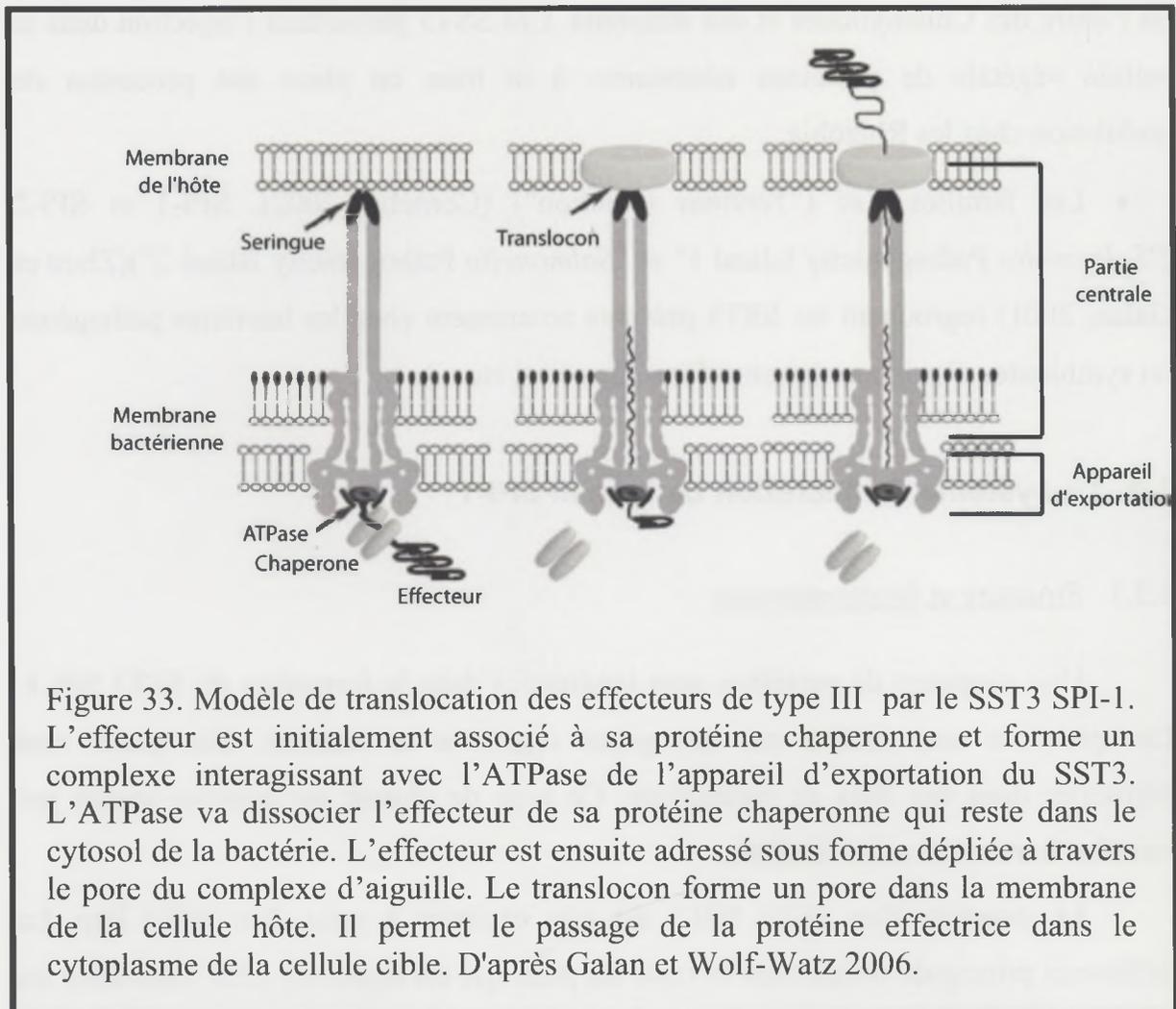


Figure 33. Modèle de translocation des effecteurs de type III par le SST3 SPI-1. L'effecteur est initialement associé à sa protéine chaperonne et forme un complexe interagissant avec l'ATPase de l'appareil d'exportation du SST3. L'ATPase va dissocier l'effecteur de sa protéine chaperonne qui reste dans le cytosol de la bactérie. L'effecteur est ensuite adressé sous forme dépliée à travers le pore du complexe d'aiguille. Le translocon forme un pore dans la membrane de la cellule hôte. Il permet le passage de la protéine effectrice dans le cytoplasme de la cellule cible. D'après Galan et Wolf-Watz 2006.

1.2.2 Le SST3 SPI-1 chez les bactéries associées aux insectes ou aux mammifères

Les SST3 SPI-1 jouent un rôle important dans (i) la pathogénie de bactéries pathogènes de mammifères comme *Salmonella*, *Bukholderia* ou *Shigella* (Lostroh et Lee 2001; Stevens et al. 2002); (ii) l'association de bactéries avec des insectes comme

Sodalis glossinidius, symbionte de *Glossina palpalis gambiensis* (Toh et al. 2006); ou (iii) l'association de bactéries avec des nématodes comme *Photorhabdus luminescens*, symbionte de *Heterorhabditis megidis* (Galan et Wolf-Watz 2006).

1.2.3 Le SST3 SPI-1 chez les bactéries phytopathogènes

Le séquençage croissant de génomes bactériens a permis de mettre en évidence la présence de SST3 SPI-1 chez plusieurs bactéries phytopathogènes: *Erwinia amylovora*, *Erwinia pyrifolia*, *Erwinia tasmaniensis* et *P. stewartii* subsp. *stewartii* (Kube et al. 2008; Correa et al. 2010; Kube et al. 2010; Sebahia et al. 2010; Smits et al. 2010). Chez *P. stewartii* subsp. *stewartii*, il a récemment été montré que le T3SS SPI-1 est nécessaire à la persistance de la bactérie chez son insecte vecteur *Chaetocnema pulicaria* (Correa et al. 2010). Le rôle du SST3 SPI-1 dans le cycle de vie des autres bactéries phytopathogènes reste inconnu.

Le séquençage et l'analyse du génome de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* ont permis (i) de confirmer l'absence de SST3 Hrp chez cette bactérie et (ii) de mettre en évidence la présence d'un SST3 SPI-1. Aucune association de *X. albilineans* avec un animal vecteur, plus vraisemblablement un insecte, n'a été décrite à ce jour (Pieretti et al. 2009). Une telle association pourrait jouer un rôle important dans l'écologie de *X. albilineans*.

1.2.4 Objectifs de l'étude du SST3 SPI-1 de *Xanthomonas albilineans* présentée dans ce chapitre

Les objectifs de cette étude étaient : (i) de réaliser une analyse fonctionnelle du SST3 SPI-1 de *X. albilineans* afin de confirmer que ce système n'est pas nécessaire à l'infection de la canne à sucre ; (ii) d'analyser la distribution de ce SST3 SPI-1 dans une collection de bactéries phytopathogènes et (iii) d'étudier la diversité génétique du cluster de gène SST3 SPI-1 afin de proposer des hypothèses concernant l'importance de ce système dans le cycle de vie de cette bactérie responsable de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre.

L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans l'article suivant publié en ligne dans la revue *Molecular Plant-Microbe Interactions* le 18 octobre 2010.

2 Article

Genomic and evolutionary features of the SPI-1 Type III Secretion System that is present in *Xanthomonas albilineans* but not essential for xylem colonization and symptom development of sugarcane leaf scald.

1 MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, 2010

2

3

4 **Genomic and Evolutionary Features of the SPI-1 Type III Secretion System**
5 **that is present in *Xanthomonas albilineans* but not Essential for Xylem**
6 **Colonization and Symptom Development of Sugarcane Leaf Scald**

7

8

9

10 Running title: The T3SS SPI-1 of *Xanthomonas albilineans*

11

12 Mélanie Marguerettaz¹, Isabelle Pieretti¹, Philippe Gayral^{1,3}, Jérôme Puig¹, Chrystelle Brin²,

13 Stéphane Cociancich¹, Stéphane Poussier², Philippe Rott¹, Monique Royer^{1*}

14

15 ¹ UMR BGPI Cirad, Campus international de Baillarguet, TA A-54/K, 34398 Montpellier
16 Cedex 5, France.

17 ² UMR PaVé Agrocampus ouest, BP 60057, 42 rue Georges Morel, 49071 Beaucozé Cedex,
18 France.

19 ³Present address: Institut des Sciences de l'Evolution, CNRS UMR 5554, Université
20 Montpellier 2, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier, France.

21

22

23 *Corresponding author. Mailing address: UMR BGPI Cirad, Campus international de
24 Baillarguet, TA A-54/K, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

25 Phone: 33 (0) 4 99 62 48 44. Fax: 33 (0) 4 99 62 48 08. E-mail: monique.royer@cirad.fr.

26

27 **ABSTRACT**

28 *Xanthomonas albilineans* is the causal agent of sugarcane leaf scald. Interestingly, this
29 bacterium, which is not known to be insect- or animal-associated, possesses a type III
30 secretion system (T3SS) belonging to the injectisome family SPI-1 (*Salmonella* Pathogenicity
31 Island-1). The T3SS SPI-1 of *X. albilineans* shares only low similarity with other available
32 T3SS SPI-1 sequences. Screening of a collection of 128 plant pathogenic bacteria revealed
33 that this T3SS SPI-1 is present in only two species of *Xanthomonas*: *X. albilineans* and *X.*
34 *axonopodis* pv. *phaseoli*. Inoculation of sugarcane with knockout mutants showed that this
35 system is not required by *X. albilineans* to spread within xylem vessels and to cause disease
36 symptoms. This result was confirmed by the absence of this T3SS SPI-1 in a *X. albilineans*
37 strain isolated from diseased sugarcane. To investigate the importance of the T3SS SPI-1
38 during the life cycle of *X. albilineans*, we analyzed T3SS SPI-1 sequences from 11 strains
39 spanning the genetic diversity of this species. No nonsense mutations or frameshifting indels
40 were observed in any of these strains, suggesting that the T3SS SPI-1 system is maintained
41 within the species *X. albilineans*. Evolutionary features of T3SS SPI-1 based on phylogenetic,
42 recombination and selection analyses are discussed in the context of the possible functional
43 importance of T3SS SPI-1 in the ecology of *X. albilineans*.

44

45

46

47 **INTRODUCTION**

48 The *Xanthomonadaceae* are a family of Gram-negative bacteria belonging to the order
49 *Xanthomonadales* in the gamma subdivision of the *Proteobacteria* (Saddler and Bradbury
50 2005). Members of this family occupy diverse ecological niches in soil and water, as well as
51 being present in plant tissues. Many *Xanthomonadaceae*, especially species from the genera
52 *Xanthomonas* and *Xylella*, cause plant diseases, and one species, *Stenotrophomonas*
53 *maltophilia*, is known to be an opportunistic human pathogen.

54 *Xanthomonas albilineans* is a systemic, xylem-invading pathogen that causes leaf
55 scald—a lethal disease of sugarcane (interspecific hybrids of *Saccharum* spp.; Rott and Davis
56 2000). Leaf scald symptoms vary from a single, sharply defined narrow white stripe to
57 complete wilting and necrosis of infected leaves leading to plant death. The pathogen is
58 transmitted mainly by infested tools and infected sugarcane cuttings. *X. albilineans* is not
59 known to be insect-transmitted but there is evidence of aerial transmission under certain
60 environmental conditions (Saumtally et al. 1996; Davis et al. 1997; Daugrois et al. 2003;
61 Champoiseau et al. 2009). The only pathogenicity factor of *X. albilineans* that has been
62 studied extensively to date is albicidin—a secreted small molecule with phytotoxic and
63 antibiotic properties (Birch 2001). Albicidin is a potent DNA gyrase inhibitor that targets
64 chloroplastic DNA gyrase A, inhibits chloroplast DNA replication and blocks chloroplast
65 differentiation, resulting in the white foliar stripe symptom (Birch 2001; Hashimi et al. 2007).

66 Type III secretion systems (T3SSs), also called injectisomes, deliver effector proteins
67 specifically into the cytoplasm of host cells. These effectors then target key functions of the
68 host, thus explaining the major role played by T3SSs in pathogenesis and symbiosis (for
69 review, see He et al. 2004; Cornelis 2006; Saijo and Schulze-Lefert 2008; Lewis et al. 2009).
70 The mechanisms whereby T3SS effectors interact with host cells have been well documented
71 for animal-infecting bacteria and plant pathogens (Kay and Bonas 2009; McGhie et al. 2009;

72 Croxen and Finlay 2010). Evolutionary trees of injectisome T3SS gene clusters based on 16S
73 rRNA analysis are completely different from bacterial evolutionary trees (Gupta 2000),
74 implying that T3SS gene clusters have been distributed among bacteria through lateral gene
75 transfer. Based on phylogenetic analyses, T3SSs were divided into seven families (Cornelis
76 2006), including three that are found mainly in free-living animal pathogens (Ysc, for
77 *Yersinia* secretion; SPI-1 and SPI-2, for *Salmonella* Pathogenicity Island-1 and 2,
78 respectively), and two that occur mainly in plant-invading bacteria (Hrp1 and Hrp2, for
79 Hypersensitive Response and Pathogenicity-1 and 2, respectively). The global architecture of
80 the structural components within the bacterial membrane is well conserved among the
81 different T3SSs families. However, the length of the pilus that extends from the basal
82 structure varies from 40 to 80 nm in animal pathogens (T3SSs SPI-1, SPI-2 or Ysc), and up to
83 several microns in plant-invading bacteria (T3SSs Hrp1 or Hrp2) allowing it to protrude into
84 the thick plant cell wall (Cornelis 2006).

85 Recent sequencing of the complete genome of *X. albilineans* strain GPE PC73
86 confirmed the absence of a T3SS of the Hrp1- or Hrp2-type but revealed the presence of
87 T3SS SPI-1 (Pieretti et al. 2009). T3SS SPI-1, which is found mostly in bacteria associated
88 with mammals or insects, also occurs in four plant-invading bacteria: *Erwinia amylovora*
89 strain Ea273 (the causal agent of fire blight of apple, pear and related plants), *Erwinia*
90 *tasmaniensis* strain Et1/99 (a strictly epiphytic bacterium isolated from apple flowers),
91 *Erwinia pyrifoliae* (the causal agent of black stem blight of pear) and *Pantoea stewartii*
92 subsp. *stewartii* (the causal agent of Stewart's wilt of maize; Kube et al. 2008, 2010; Correa
93 et al. 2010; Sebahia et al. 2010; Smits et al. 2010). Moreover, three DNA fragments of a
94 putative T3SS SPI-1 were disclosed by subtractive hybridization in strains belonging to one
95 (lineage 1) of the four genetic lineages of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (the causal
96 agent of common bacterial blight of bean; Alavi et al. 2008). Similarly, T3SS Ysc, which is

97 found preferentially in animal pathogens, has also been found in the genome of the plant
98 pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* strain 1448A (the causal agent of halo
99 blight disease in common bean; Joardar et al. 2005). The role of T3SSs SPI-1 or Ysc in these
100 plant-invading bacteria remains unknown, but it could be hypothesized that T3SS SPI-1 or
101 Ysc is required for interaction of these plant-invading bacteria with an insect or an animal. In
102 *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, it was shown recently that T3SS SPI-1 was required for
103 persistence in its flea beetle vector, *Chaetocnema pulicaria*, whereas T3SS Hrp was involved
104 in plant colonization (Correa et al. 2010).

105 The objectives of the present study were (i) to perform a functional analysis of the
106 T3SS SPI-1 of *X. albilineans* in order to confirm that this system is not required for sugarcane
107 infection, (ii) to analyze the distribution of this T3SS SPI-1 within a collection of plant
108 pathogenic bacteria, and (iii) to analyze the genetic diversity of the T3SS SPI-1 gene cluster
109 within the species *X. albilineans* in order to shed some light on its functional importance
110 during the life cycle of the causal agent of sugarcane leaf scald.

111

112 RESULTS

113 The genome of *X. albilineans* strain GPE PC73 harbours a T3SS SPI-1.

114 Annotation of the genome of *X. albilineans* strain GPE PC73 revealed the presence of
115 a T3SS similar to the *bsa* T3SS of several *Burkholderia* species, e.g. *bsa* T3SS of
116 *Burkholderia pseudomallei*, which belongs to the injectisome family SPI-1 and is a causal
117 factor in human melioidosis (Stevens et al. 2002). In *X. albilineans* strain GPE PC73, T3SS
118 SPI-1 is present in a region of 43.6 kb flanked by IS elements and which has an overall G+C
119 base composition (52%) lower than that of the rest of the genome (63%). Both these latter
120 features suggest that the 43.6 kb region represents a genetic island acquired by lateral gene
121 transfer. This region is located next to the albicidin biosynthesis gene cluster near the

- 6 -

122 terminus of replication (Pieretti et al. 2009). Phylogenetic reconstruction using a
123 concatenation of six T3SS SPI-1 structural proteins from bacteria associated with mammals,
124 insects or plants showed that the T3SS SPI-1 of *X. albilineans* belongs to the same
125 phylogenetic group as the T3SS SPI-1 present in the plant-invading bacteria *E. tasmaniensis*,
126 *E. amylovora*, *E. pyrifoliae* and *P. stewartii* subsp. *stewartii* (Group A; Fig. 1). All *B.*
127 *pseudomallei* genes encoding the components of the SPI-1 injectisome and translocon are
128 conserved in *X. albilineans* (Fig. 2, Table 1). Genes required for injectisome assembly were
129 annotated with reference to their *bsa* orthologous genes in *Burkholderia* (*xsaJ*, *xsaK*, *xsaL*,
130 *xsaM*, *xsaO*, *xsaP*, *xsaQ*, *xsaR*, *xsaS*, *xsaV*, *xsaW*, *xsaX*, *xsaY* and *xsaZ*, see Fig. 2). Genes
131 encoding components of the SPI-1 translocon were annotated *xipB*, *xipC* and *xipD* with
132 reference to their *bip* and *sip* orthologous genes in *Burkholderia* and *Salmonella*, respectively.
133 The *B. pseudomallei* gene *bsaN*, which encodes a transcriptional regulator of the AraC
134 family, is conserved in *X. albilineans*, in which it was annotated as *xsaN*. *B. pseudomallei*
135 gene *bicA* (encoding a chaperone protein) is also conserved in *X. albilineans* (annotated as
136 *xicA*). Two *B. pseudomallei* genes encoding putative oxygen-regulated invasion proteins are
137 also conserved in *X. albilineans*, and were annotated as *orgA* and *orgB*. Interestingly, *B.*
138 *pseudomallei* genes *bsaT* and *bsaU*, which are specific to T3SSs SPI-1 of *Burkholderia*, are
139 not conserved in *X. albilineans*. *B. pseudomallei* genes encoding T3SS SPI-1 effectors are
140 also not conserved in *X. albilineans*. BLAST analyses with the entire genome of *X.*
141 *albilineans* confirmed that this species does not possess any of the known T3SS secreted
142 effectors (T3SEs). However, T3SS SPI-1 of *X. albilineans* strain GPE PC73 encodes 15
143 hypothetical proteins specific to this species that represent candidate T3SEs. In other T3SSs
144 SPI-1 described to date, several genes encoding T3SEs are present in the same genetic island
145 as the genes encoding structural components. Genes encoding candidate T3SEs SPI-1 of *X.*
146 *albilineans* were annotated as *xapA* through *xapO* for *x*anthomonas *a*ssociated protein. The

147 presence of an F-box-like domain in the hypothetical protein encoded by *xapN* supports the
148 hypothesis that this protein is a T3SE because such a domain was described in T3SEs of
149 *Ralstonia solanacearum* (Angot et al. 2006). The similarity of the hypothetical protein
150 encoded by *xapM* with the toxin RtxA of *Photorhabdus luminescens* is also evidence that this
151 protein may be a T3SE.

152 153 **Screening of 128 plant pathogenic bacteria for the presence of T3SS SPI-1.**

154 It was shown recently by subtractive hybridization that strains belonging to lineage 1
155 of *X. axonopodis* pv. *phaseoli* harbour at least three DNA fragments encoding putative
156 components of a T3SS SPI-1 (Alavi et al. 2008). These fragments share >85% nucleotide
157 identity and 83% amino acid identity with the sequence of the T3SS SPI-1 gene cluster of *X.*
158 *albilineans*. To determine whether the T3SS SPI-1 gene cluster was fully or partially present
159 in *X. axonopodis* pv. *phaseoli* strains, we used 35 primer pairs designed to amplify the
160 complete T3SS SPI-1 from *X. albilineans* (supplemental data 1). PCR products of the
161 expected size were obtained with only 8 primer pairs (TTSS 6, 9, 13, 14, 15, 17, 18 and 22) in
162 three *X. axonopodis* pv. *phaseoli* strains (CFBP 2534, CFBP 6164 and CFBP 6982).
163 Sequencing of these PCR products revealed between 77% and 87% nucleotide identity with
164 the sequence of the T3SS SPI-1 of *X. albilineans*. Moreover, no nucleotide diversity was seen
165 between the three tested *X. axonopodis* pv. *phaseoli* strains. The amplified PCR products
166 correspond to genes required for injectisome assembly (*xsaJ*, *xsaK*, *xsaL*, *xsaM*, *xsaO*, *xsaP*,
167 *xsaR*, *xsaW*, *xsaX* or *xsaY*) and one gene encoding a component of the SPI-1 translocon
168 (*xipB*). However, other T3SS SPI-1 genes, including *xipD* and candidate T3SEs genes, were
169 not detected by PCR in any strain of *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

170 To see whether this T3SS SPI-1 gene cluster is indeed restricted to only two
171 xanthomonads (*X. albilineans* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli*), a collection of 128 strains

172 representing the main genera of plant pathogenic bacteria (supplemental data 2) was screened
173 by PCR and dot-blot hybridization. Both methods yielded the same result and revealed that
174 the distribution of T3SS SPI-1 is very restricted. Indeed, no DNA fragments homologous to
175 T3SS SPI-1 were detected in any of the 128 strains, with the exception of the 14 strains
176 belonging to *X. albilineans* and genetic lineage 1 of *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (supplemental
177 data 3).

178

179 **Is T3SS SPI-1 required for *X. albilineans* to infect sugarcane and cause symptoms?**

180 Sugarcane cultivar CP68-1026 was inoculated with wild type strain GPE PC73 R5 and
181 three *xsaO* mutants of GPE PC73 R5 (six plants inoculated per strain at 10^8 CFU/ml).
182 Detailed results are presented in supplemental data 4. Within 2-4 weeks, the wild type strain
183 and all three mutants produced pencil-line stripes characteristic of leaf scald symptoms on
184 inoculated leaves. Eight stripes per inoculated leaf were observed on average with strain GPE
185 PC73 R5, whereas the average number of stripes varied between 8 and 10 for the three *xsaO*
186 mutants (18 leaves observed per strain). In the six plants inoculated with the wild type strain,
187 16/19 (84%) sampled stalk internodes were colonized by the pathogen. In plants inoculated
188 with the three *xsaO* mutants, the pathogen was recovered in 15/20 (75%), 15/19 (79%) and
189 21/23 (91%) sampled stalk internodes, respectively. Thus, the capacity of the *xsaO* mutants to
190 spread through sugarcane xylem and cause leaf symptoms was similar to that of the wild type
191 strain.

192

193 **Sequencing of the T3SS SPI-1 gene cluster from *X. albilineans* strain Xa23R1.**

194 A 56-kb DNA region containing the complete albicidin biosynthesis gene cluster from
195 *X. albilineans* strain Xa23R1 was previously sequenced (Royer et al. 2004). This region also
196 included the five hypothetical protein genes *xapM*, *xapL*, *xapK*, *xapJ* and *xapI*. The rest of the

197 T3SS SPI-1 gene cluster, which corresponds to a 37-kb region, was amplified by PCR from
198 strain Xa23R1 with primers generating 35 overlapping PCR fragments (Fig. 2C;
199 Supplemental data 1). Assembling the sequences of the PCR fragments and the previously
200 sequenced 56-kb region reconstituted the sequence of the entire T3SS SPI-1 gene cluster from
201 *X. albilineans* strain Xa23R1 (Fig. 2C). All genes identified in strain GPE PC73 are
202 conserved in strain Xa23R1. The most notable differences between the two sequences are (i)
203 an internal deletion of 30 nucleotides in *xapH* of Xa23R1, (ii) a mutation in the start codon of
204 *xapB* making the ORF 45 nucleotides shorter in Xa23R1, and (iii) the presence, upstream of a
205 sequence similar to *bipD* of *B. pseudomallei*, of two different sequences of 963 bp and
206 1143 bp in GPE PC73 and Xa23R1, respectively. These two latter sequences showed no
207 significant alignment with any nucleotide or amino acid sequence available in GenBank.
208 Further analysis of these two unique sequences suggested that the XipD translocase proteins
209 encoded by *X. albilineans* strains GPE PC73 and Xa23R1 each have their own unique
210 features (Fig. 3). In both strains, the sequence similar to *bipD* is present in an ORF that is
211 much longer (1881 and 2061 bp in strains GPE PC73 and Xa23R1, respectively) than
212 orthologous genes described to date in other T3SSs SPI-1 (855–1020 bp). The first 363 bp of
213 the *xipD* ORFs of strains GPE PC73 and Xa23R1 are 98% identical and did not align
214 significantly with any amino acid sequence available in GenBank. The last 555 bp of these
215 *xipD* ORFs are also 98% identical and exhibit 58% amino acid similarity with the
216 orthologous gene *bipD* of *B. pseudomallei* (Fig. 3). The strain-specific internal sequences of
217 963 bp and 1143 bp exhibit 37% amino acid identity and 59% amino acid similarity (Fig. 3;
218 supplemental data 5), suggesting that the two allelic forms of *xipD* are derived from the same
219 ancestor gene and have a similar and unique function. Additionally, the 184 bp upstream of
220 the two allelic forms of *xipD* are 97% identical, indicating that transcriptional regulatory

221 sequences are conserved in both *X. albilineans* strains. The two allelic forms of *xipD* were
222 designed *xipD-G* for GPE PC73 and *xipD-X* for Xa23R1, respectively.

223

224 **Phylogenetic and recombination analyses of T3SS SPI-1 sequences from different**
225 **strains of *X. albilineans*.**

226 Sequence analyses were performed with a collection of 12 strains representative of the
227 genetic diversity of *X. albilineans* previously identified using pulsed field gel electrophoresis
228 (PFGE) (Davis et al. 1997). Strains Xa23R1, GPE PC73, HVO082, REU173, FIJ080,
229 HVO005, LKA070, PNG130, MTQ058 and REU209 belong to PFGE groups A, B, C, D, E,
230 F, G, H, I and J, respectively (Supplemental data 6). Because strains involved in sugarcane
231 leaf scald disease outbreaks since the late 1980s belong to group PFGE-B, two additional
232 strains belonging to this group were included in our analysis (strains MTQ078 and BRA115).
233 To study evolution of the core genome, multilocus sequence analysis (MLSA) was performed
234 using a concatenated sequence of PCR fragments of seven housekeeping genes (*groEL*, *dnaK*,
235 *gyrB*, *atpD*, *efp*, *recA* and *glnA*) (Fig. 4). To study evolution of the T3SS SPI-1 gene cluster,
236 five fragments were amplified by PCR: (i) the large ORF *xipD* except its 3' part, (ii) the 3'
237 part of *xipD* and complete sequence of *xapA* and *xapB*, (iii) partial sequence of *xsaM*, (iv)
238 partial sequence of *xsaO*, and (v) partial sequence of *xapH* including the 30-nucleotide
239 deletion observed in Xa23R1 (Fig. 5B). All five PCR fragments were amplified from all
240 strains except strain PNG130, which has probably lost T3SS SPI-1. Sequences of these PCR
241 fragments were compared with the corresponding sequence of strains GPE PC73 and
242 Xa23R1, allowing analysis of 11 strains in all. Interestingly, orf *xipD* is present in all 11
243 strains but the distribution of the allelic forms *xipD-G* or *xipD-X* was not congruent with the
244 core genome MLSA tree, suggesting the occurrence of recombination events (Fig. 4). To
245 explain this unexpected result, recombination analyses were performed with different

246 algorithms (CHIMAERA, RDP, GENECONV and DNAsp) using a concatenated sequence of
247 the five PCR fragments (Fig. 5B) for each of the 11 strains. Several recombination events
248 were predicted with high probability (P -values varying from 1×10^{-6} to 8×10^{-40} ; Fig. 5C), not
249 only at the *xipD* locus, but also along the entire concatenated sequence. Similar phylogenetic
250 analyses were also conducted with these 11 strains using the entire coding sequences of *xipD*,
251 *xapA* and *xapB*, and partial coding sequences of *xsam*, *xsao* and *xapH*. The coding sequence
252 of *xipD* was divided into three parts that were analyzed separately: *xipD/a* corresponds to the
253 5' part of *xipD* shared by strains GPE PC73 and Xa23R1, *xipD/b* corresponds to the internal
254 sequence specific to each allelic form (*xipD-G* and *xipD-X*) and *xipD/c* corresponds to the
255 sequence similar to *bipD* that is common to strains GPE PC73 and Xa23R1 (Fig. 3). Two
256 distinct phylogenetic clades (clade 1 and clade 2), were obtained for each of the seven coding
257 sequences used for phylogenetic analyses (*xipD/a*, *xipD/c*, *xapA*, *xapB*, *xsam*, *xsao* and
258 *xapH*) (Fig. 4). The distribution of the 11 strains in clade 1 or clade 2 differed accordingly to
259 the sequence used for phylogenetic analyses (Fig. 4). For example, strains GPE PC73 and
260 LKA070, which possess two different allelic forms of *xipD*, are in the same clade (clade 1) in
261 trees constructed with *xipD/a*, *xapB*, *xsam*, *xsao* and *xapH*, but in different clades in trees
262 constructed with *xipD/c* and *xapA*. Similarly, strains FIJ080 and Xa23R1, which also possess
263 two different allelic forms of *xipD*, are in the same clade (clade 2) in trees constructed with
264 *xipD/a*, *xapA*, *xsam* and *xapH*, but in different clades in trees constructed with *xipD/c* and
265 *xsao*. Distribution of the 11 strains in phylogenetic trees obtained with housekeeping genes
266 (core genome) or coding sequences *xsao*, *xapA*, *xipD/b* and *xipD/c* also provided evidence of
267 recombination events (Fig. 5D). The existence of only two allelic forms of *xipD* (*xipD-G* and
268 *xipD-X*, Fig. 3), and the distribution of T3SS SPI-1 sequences in only two clades (clade 1 and
269 clade 2, Fig. 4) indicate that recombination events have mobilized only two ancestral alleles
270 of T3SS SPI-1.

271

272 **Selection analysis of T3SS SPI-1 coding sequences in 11 strains of *X. albilineans*.**

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

Despite the occurrence of several recombination events, no nonsense mutations or frameshifting indels were observed in any of the five PCR fragments from nine *X. albilineans* strains or in the complete sequence of T3SS SPI-1 from strains GPE PC73 and Xa23R1. The 30-nt internal deletion in *xapH* found in strain Xa23R1 was not detected in any other strain; this deletion does not modify the coding phase and thus may not affect the function of *xapH*. The mutation in the start codon of *xapB* in Xa23R1, which shortens the ORF by 45 nucleotides, was also observed in strains HVO082, HVO005 and REU209. This codon, which was identified as a start codon by annotators of the genome of strain GPE PC73, is not preceded by a known ribosome binding site and is most likely not a real start codon. Thus, *xapB* may be 45 nucleotides shorter than previously thought in all *X. albilineans* strains. All T3SS SPI-1 genes are conserved in strains GPE PC73 and Xa23R1, which belong to two distinct core genome (MLSA) clades. All these data suggest that T3SS SPI-1 is still functional in all 11 *X. albilineans* strains.

Estimation of the $\omega = d_N/d_S$ ratio (non synonymous to synonymous substitution ratio) is usually used to quantify the selective pressure acting on genes. Genes evolving under no selective pressure evolve neutrally ($\omega = 1$), while genes evolving under selection pressure have $\omega \neq 1$. Purifying selection ($\omega < 1$) is observed when amino acid replacement is counter-selected, and positive selection ($\omega > 1$) occurs when amino acid replacement is favoured by natural selection. We estimated the ω ratio for each coding sequence of the T3SS SPI-1 cluster retrievable from the five PCR fragments (Table 2). Four coding sequences (*xipD/c*, *xapA*, *xapB* and *xsaM*) have an ω ratio ranging from 0.248 to 1.956, which was not statistically different from 1 according to LRT tests (P -value = 0.1512, 0.2073, 0.3638 and 0.6825, respectively) (Table 2). The corresponding genes are therefore thought to have

296 evolved neutrally, under no selection pressure. The coding sequences *xipD/a* and *xsaO* have
297 an ω ratio of 0.252 and 0.113, respectively, which was statistically significant at $P < 1$ (P -
298 value = 0.0158 and P -value < 0.001 , respectively) (Table 2). This result suggests the presence
299 of purifying selection, i.e. selection still acting on *xsaO* and *xipD/a* to prevent amino acid
300 replacement, indicating that the 5' part of *xipD* (*xipD/a*) is translated in *X. albilineans* and
301 supporting the hypothesis that *xipD* is longer than orthologous genes.

302 Unlike other analyzed T3SS SPI-1 coding sequences, *xapH* has an $\omega > 1$ ($\omega = 4.552$;
303 P -value = 0.0125; Table 2), suggesting that *xapH* evolved under positive selection. The
304 presence of positive selection was analyzed in detail using a codon-by-codon approach (Table
305 3). Positive selection in a few codons of a sequence may increase the estimated average ω
306 ratio for the whole gene, thus leading to an artefactual signature of neutral evolution. We
307 observed that *xapH* evolved under positive selection (P -value = 0.044) and that no other
308 genes of the T3SS SPI-1 evolved under positive selection (P -values obtained for genes other
309 than *xapH* were not significant: $0.662 < P\text{-value} > 1.000$), thus confirming that averaged ω
310 estimations were not biased by overestimation.

311
312

313 DISCUSSION

314

315 Recent sequencing of the genome of the sugarcane leaf scald pathogen *X. albilineans*
316 strain GPE PC73 revealed the presence of a complete T3SS SPI-1 gene cluster (Pieretti et al.
317 2009). Data described herein reveal that this complete gene cluster is also present in *X.*
318 *albilineans* strain Xa23R1, which belongs to another MLSA group. This T3SS SPI-1, which
319 shows low similarity with other T3SS SPI-1 sequences available in data libraries, encodes a
320 translocase protein XipD (= SipD) exhibiting a unique and large additional sequence. A

321 collection of 128 strains belonging to the main genera of plant pathogenic bacteria, including
322 42 species of *Xanthomonas* to ensure that the genetic diversity of this genus was fully
323 represented, was screened for the presence of the T3SS SPI-1 gene cluster of *X. albilineans*.
324 This gene cluster was found in only two phylogenetically distant species of *Xanthomonas*,
325 namely *X. albilineans* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Interestingly, the T3SS SPI-1 was not
326 found in *X. translucens* and *X. hyacinthi*—the two species most related to *X. albilineans*
327 according to a phylogenetic study based on 1314 AFLP markers (Bui Thi Ngoc et al. 2010).

328 The presence of the same T3SS SPI-1 in two species of *Xanthomonas* (*X. albilineans*
329 and *X. axonopodis*) raises the question of the origin of this gene cluster. Did these species
330 share the same ecological niche and exchange genetic material? Did these species acquire
331 T3SS SPI-1 independently from the same bacterium? Was a T3SS SPI-1 present in the
332 ancestor of the genus *Xanthomonas* but subsequently lost by most *Xanthomonas* species? The
333 lack of PCR detection of *xipD* and candidate T3SEs genes in *X. axonopodis* pv. *phaseoli* may
334 be due to polymorphism between the two species of *Xanthomonas* at the level of these genes.
335 Sequencing of the complete genome of a *X. axonopodis* pv. *phaseoli* strain harboring T3SS
336 SPI-1 should allow some conclusions to be drawn about the maintenance or degradation of
337 this gene cluster in this species.

338 The flanking regions of the complete T3SS SPI-1 are identical in strains GPE PC73
339 and Xa23R1, indicating the occurrence of a single integration event of T3SS SPI-1 in the
340 genome of the common ancestor of all *X. albilineans* strains. However, phylogenetic and
341 recombination analyses clearly indicate that several recombination events have occurred
342 between two alleles of the same T3SS SPI-1 gene cluster in ancestors of *X. albilineans*
343 strains. No remains of a second copy of the T3SS SPI-1 gene cluster were found in the
344 genome sequence of *X. albilineans* strain GPE PC73, and none were amplified by PCR in
345 other strains. Therefore, in order for these recombination events to have occurred, a second

346 copy of T3SS SPI-1 must have been present in ancestors of *X. albilineans* strains, either on a
347 non replicative DNA molecule (hypothesis 1) or on an ancestral plasmid (hypothesis 2) that
348 was subsequently lost. According to hypothesis 1, multiple lateral gene transfers of T3SS
349 SPI-1 must have occurred either between ancestors of *X. albilineans* strains themselves or
350 between ancestors of *X. albilineans* strains and an unknown bacterium living in the same
351 environment and possessing the same T3SS SPI-1. According to hypothesis 2, the occurrence
352 of recombination events in both MLSA I and MLSA II groups supposes that the plasmid
353 harboring a second copy of T3SS SPI-1 was lost only after the divergence of strains LKA070
354 and Xa23R1, implying that this plasmid was maintained by ancestors of *X. albilineans*
355 strains.

356 Interestingly, phylogenetic analyses of the T3SS Hrp gene clusters of *Pseudomonas*
357 *syringae* or enterobacterial plant pathogens (*Erwinia*, *Brenneria*, *Pectobacterium*, *Dickeya*
358 and *Pantoea*) also revealed conflicts between phylogenetic trees constructed with different
359 genes of the same T3SS Hrp gene cluster (Guttman et al. 2006; Naum et al. 2009).
360 Recombination events between the conserved copy of the T3SS Hrp gene cluster of *P.*
361 *syringae* and an ancestral lost copy was proposed to explain these conflicts (Guttman et al.
362 2006). Extensive lateral gene transfer of T3SS Hrp genes among enterobacterial plant
363 pathogens was proposed to explain the occurrence of multiple recombination events (Naum et
364 al. 2009). As in the case of the T3SS SPI-1 of *X. albilineans*, phylogenetic analyses of the
365 T3SS Hrp of *P. syringae* indicated that recombination events mobilized only two ancestral
366 alleles. Interpretations of phylogenetic analyses of T3SSs Hrps of enterobacterial plant
367 pathogens are more complicated, probably because multiple recombination events mobilized
368 multiple alleles.

369 Shigellae and enteroinvasive *Escherichia coli* both contain a virulence plasmid
370 harbouring a full T3SS SPI-1 (Buchrieser et al. 2000; Venkatesan et al. 2001). *X. albilineans*

371 could have acquired a similar plasmid harboring a T3SS SPI-1, possibly by lateral gene
372 transfer. In a second step, this T3SS SPI-1 could have been integrated into the chromosome of
373 *X. albilineans* near the terminus of replication. Acquisition of genes by lateral gene transfer at
374 the terminus of replication has been described in other bacteria. In *Bacillus subtilis*, the
375 presence of a large SPb prophage at the terminus of replication has caused lateral gene
376 transfer (Kunst et al. 1997). Similarly, in *E. coli*, lambdoid prophages tend to cluster close to
377 the terminus of replication (Campbell 1992), and it has been suggested recently that hyper-
378 recombination in the *E. coli* terminus region is due largely to these prophage sequences
379 (Corre et al. 2000). Interestingly, the *X. albilineans* replication terminus region contains seven
380 phage-related CDSs that are orthologous of CDSs present in a filamentous prophage Cf1C
381 close to the terminus of replication in other *Xanthomonas*. The presence of these phage
382 sequences probably caused hyper-recombination and facilitated integration of the full T3SS
383 SPI-1 and the albicidin biosynthesis gene cluster. The presence of these phage sequences may
384 indicate that the full T3SS SPI-1 and the albicidin biosynthesis gene cluster were acquired by
385 lateral gene transfer.

386 Despite the occurrence of several recombination events, no nonsense mutations or
387 frameshifting indels were observed in the five PCR fragments from nine *X. albilineans* strains
388 or in the complete sequence of T3SS SPI-1 from strains GPE PC73 and Xa23R1, supporting
389 the hypothesis that T3SS SPI-1 is maintained in *X. albilineans*. Inoculation of sugarcane with
390 knockout mutants showed clearly that the T3SS SPI-1 of *X. albilineans* is not required for
391 sugarcane xylem colonization and symptom development by the pathogen. This result is in
392 agreement with the absence of the T3SS SPI-1 in strain PNG130 of *X. albilineans*, which is
393 pathogenic to sugarcane. Alternatively, the T3SS SPI-1 may be required for interaction with
394 an insect or animal host. An interaction of *X. albilineans* with an insect could have played or
395 and could possibly still play an important role in the dissemination of this bacterium, as is the

396 case for *Xylella fastidiosa*. Various sap-feeding insects can acquire and transmit *X.*
397 *fastidiosa*—a xylem-limited bacterium that causes Pierce's disease of grapevine and other
398 important plant diseases (Chatterjee et al. 2008). Interestingly, *X. albilineans* and *X. fastidiosa*
399 are derived from the same ancestor, and experienced convergent genome erosion during their
400 descent from the progenitor of the *Xanthomonas* genus (Pieretti et al. 2009). Their similar
401 insect-associated lifestyles may have favoured such genome erosion because most genes
402 required for a plant-associated lifestyle are most likely not required for an insect-associated
403 lifestyle (Pieretti et al. 2009). Furthermore, the *chiA* gene recently characterized as required
404 by *X. fastidiosa* to use chitin of insect hosts as a source of carbon (Killiny et al. 2010) is also
405 present in the genome of *X. albilineans*. However, *X. fastidiosa* lacks any T3SS, showing that
406 T3SS SPI-1 is not necessarily required for insect transmission.

407 Selection analysis indicated that purifying selection has driven the evolution of *xipD*
408 and *xsaO*. Further analyses will be necessary to determine if purifying selection also drove
409 evolution of the entire T3SS SPI-1 gene cluster. Interestingly, most synonymous mutations in
410 *xsaO* and *xipD/a* were acquired by recombination (supplemental data 7), indicating that the
411 variability in T3SS SPI-1 revealed in this study corresponds to the variability of the two
412 allelic forms of T3SS SPI-1. According to hypothesis 1 (multiple lateral genetic transfer of
413 T3SS SPI-1), this variability could reflect evolution of T3SS SPI-1 either in two ancestors of
414 *X. albilineans* or in the unknown bacterium harbouring T3SS SPI-1 living in the same
415 environment. According to hypothesis 2 (plasmid-borne second copy of T3SS SPI-1), this
416 variability might reflect co-evolution of two copies of the same T3SS SPI-1 in the common
417 ancestor of *X. albilineans* strains. Consequently, the T3SS SPI-1 should be considered as a
418 system involved in the lifecycle of *X. albilineans* or in the lifecycle of the unknown bacterium
419 occupying the same environment as *X. albilineans*.

420 Selection analysis also indicated that diversifying selection drove the evolution of
421 *xapH* which, like other hypothetical protein genes specific to the T3SS SPI-1 of *X.*
422 *albilineans*, is proposed to encode a T3SE. The proposed function of *xapH* is compatible with
423 diversifying selection acting on this gene, which may prevent detection of the T3SE by
424 animal immune systems.

425 Both allelic forms of *xipD* probably conserved the function of T3SS translocase
426 because they harbor the same 3' part, which is similar to the translocase genes *bipD* and *sipD*
427 of *Burkholderia* and *Salmonella*, respectively. The translocase protein SipD was described as
428 being involved in the attachment of *Salmonella enterica* sv. *typhimurium* to animal host cells
429 (Lara-Tejero and Galan 2009). Similarly, the two allelic forms of *xipD* may be involved in
430 attachment to two different types of animal cells. According to hypothesis 1 (multiple lateral
431 genetic transfer), selection of one of the two allelic forms of *xipD* may be linked to an
432 adaptation of *X. albilineans* strains to attachment to only one type of animal cell. According
433 to hypothesis 2 (plasmid harboring a second copy of T3SS SPI-1), maintenance of the two
434 allelic forms of *xipD* in the ancestor of *X. albilineans* may be linked to association with an
435 animal or insect host involving attachment to these two different types of cells.

436 Demonstration of *in vitro* expression of T3SS SPI-1 genes could provide further
437 evidence for the functional maintenance of this secretion system in *X. albilineans*. However,
438 RT-PCR assays with primers specific for *xipD*, *xsaO* or *xsaM* failed to show any transcription
439 of T3SS SPI-1 in *X. albilineans* strain GPE PC73 grown in a rich medium (Royer et al.,
440 unpublished data). Furthermore, transformation with plasmids harboring a bi-directional
441 promoter located between genes *xsaN* and *xsaM* fused in both orientations to a green
442 fluorescent protein gene failed to yield any fluorescing bacteria in *X. albilineans* strain GPE
443 PC73 grown in minimal and rich medium supplemented with different samples prepared from

444 sugarcane leaves, mice, insects, primate cell or insect cell cultures (Royer et al., unpublished
445 data).

446 To conclude, phylogenetic, recombination and selection analyses all concur that the
447 T3SS SPI-1 is maintained within the species *X. albilineans*, although this gene cluster is
448 absent in strain PNG130 and is not required for xylem colonization and symptom
449 development in sugarcane. T3SS SPI-1 may play an important role in association with an
450 insect or animal host, or in the ecology of *X. albilineans*. PCR screening for the presence of
451 *X. albilineans* in insects collected recently in sugarcane fields in Guadeloupe failed to identify
452 any insect host for this sugarcane pathogen thus far (Royer *et al.*, unpublished data). Further
453 surveys of insects or animals may be necessary to identify candidate hosts and to shed light
454 on the function of T3SS SPI-1 in *X. albilineans*. T3SS SPI-1 PCR screening of bacteria,
455 including endophytic and uncultivable bacteria, living in the xylem of sugarcane may also
456 help determine the origin of the T3SS SPI-1 in *X. albilineans* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

457

458 MATERIALS AND METHODS

459

460 Bacterial strains.

461 The 12 *X. albilineans* strains used in this study originated from the collection of plant
462 pathogenic bacteria of CIRAD (Montpellier, France), and are representative of the genetic
463 diversity of *X. albilineans* (Supplemental data 6). Eleven strains were previously described
464 (Renier et al. 2007), and one—GPE PC73 (group PFGE B)—was recently sequenced (Pieretti
465 et al. 2009). Strain GPE PC73 R5 is a spontaneous rifampicin-resistant strain derived from
466 GPE PC73. Strains were grown for 48h on modified Wilbrink's medium (Rott et al. 1994) or
467 on XAS selective growth medium (Davis et al. 1994) at 28°C before use.

468

469 Construction of *xsaO* mutants.

470 A 698 bp fragment of gene *xsaO* was amplified with *xsaO* primers (Supplemental data
471 1) from strain GPE PC73 and cloned into pCR4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, USA), yielding
472 pTOPO-*xsaO*. An *XhoI/SpeI* fragment of pTOPO-*xsaO* containing the *xsaO* fragment was
473 then transferred into vector pVO155 (Oke and Long, 1999), yielding pVO155-*xsaO*. Plasmid
474 pVO155-*xsaO* was then introduced into *X. albilineans* strain GPE PC73R5 by triparental
475 conjugation using pRK2073 as described by Royer et al. (2004). Transformants were plated
476 on Wilbrink agar plates supplemented with 50 mg/l rifampicin and 20 mg/l kanamycin. Plates
477 were incubated at 28°C and mutants that grew within 5-7 days were screened with *xsaO*-
478 screen primers, which consisted of one primer specific for pVO155 and one primer upstream
479 of the fragment of *xsaO* used to construct the mutant (Supplemental data 1).

480

481 Inoculation of sugarcane with *X. albilineans* and determination of stalk colonization.

482 Pathogenicity experiments were conducted at Cirad in a S3 containment facility using
483 healthy plants of sugarcane cultivar CP68-1026, which is susceptible to leaf scald. Inoculum
484 of *X. albilineans* was prepared from 5-day-old agar cultures on XaPR medium [10 g/l
485 sucrose, 5 mg/l CaCl₂(H₂O), 50 mg/l ferric ammonium citrate (C₆H₈O₇ · xFe₃⁺ · yNH₃), 1g/l
486 NH₄Cl, 0.5 g/l MgSO₄ (7H₂O), 0.1 g/l DL-methionine, 15g/l agar; pH adjusted to 6.8 with a
487 volume to volume solution of Na₂HPO₄ (12H₂O) and KH₂PO₄ at 1/15 M]. Six sugarcane
488 stalks with at least 4–5 internodes were inoculated per strain with 10⁸ CFU/ml bacterial
489 suspension in sterile distilled water by the decapitation method as described by Rott et al.
490 (1997). Leaf scald symptoms were recorded on three emerging leaves one month after
491 inoculation. Stalk colonization by *X. albilineans* was determined by the stalk blot inoculation
492 technique in 3–4 upper internodes that had grown four months after inoculation. Stalks were
493 sampled individually and cut at the soil level with pruning shears. The rind of stalk fragments

494 was cleaned with absorbent paper and flamed with alcohol to ensure external sterilization.
495 Each stalk location was then cut transversally, in the middle, with sterile pruning shears. Cut
496 sections were pressed firmly onto two plates of XAS selective growth medium supplemented
497 with 50 mg/l rifampicin for stalks inoculated with wild type strain XaPC73 R5, and on XAS
498 selective growth medium supplemented with 50 mg/l rifampicin and 20 mg/l kanamycin for
499 stalks inoculated with *xsaO* mutant strains of *X. albilineans*. Pruning shears were flamed with
500 alcohol after each cut. Growth of *X. albilineans* was recorded after incubating the agar plated
501 for 5 days at 28°C.

503 **Design of PCR primers.**

504 The 35 primer pairs used for amplification of the TTSS SPI-1 gene cluster were
505 designed using the tool Primer 3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi).
506 Primers were designed based on the sequence of the T3SS SPI-1 of strain GPE PC73
507 (GenBank accession number: FP565176), and 35 overlapping DNA fragments of 1.2 to
508 1.9 kb were defined. Primer pairs used for amplification of fragments of seven housekeeping
509 genes (*gyrB*, *groEL*, *recA*, *dnaK*, *efp*, *atpD* and *glnA*) were designed manually and validated
510 using the IDT Tm calculator
511 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/Default.aspx>). Sequences of the
512 primers are presented in supplemental data 1.

514 **PCR conditions.**

515 DNA templates were prepared by suspending a freshly grown colony in 100 µl sterile
516 nuclease-free water. PCR amplifications were performed in an automated thermal cycler
517 PTC-100 (MJ Research, Inc, Watertown, MA, USA). The 25-µl PCR reaction mix consisted
518 of 3 µl bacterial suspension, 2.5 µl of 10x PCR buffer without MgCl₂ (Sigma-Aldrich, St

519 Louis, USA), 120 μ M dNTP mix, 2.0 mM $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich), 0.36 μ M of each primer,
520 1 unit of *Taq* DNA Polymerase (Sigma-Aldrich), and sterile nuclease-free water to final
521 volume. The PCR program was 94°C for 4 min, 30 cycles at 94°C for 30 seconds, T_m
522 (melting temperature) for 1 min 30 seconds, and 72°C for 1 min, with a final 72°C extension
523 for 8 min. A 5- μ l aliquot of each amplified product was analyzed by electrophoresis through a
524 1% agarose gel.

525

526 DNA sequencing.

527 DNA sequencing was performed by Beckman Coulter Genomics (Takely, UK). PCR
528 fragments were sequenced with the primers used for their amplification. Sequences were
529 aligned using ClustalW implemented in Bioedit software version 2 (ClustalW2:
530 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) and corrected manually as necessary.

531

532 Phylogenetic analyses.

533 The phylogenetic T3SS SPI-1 tree was reconstructed using the maximum likelihood
534 method implemented in the PhyML program. The LG substitution model was selected,
535 assuming an estimated proportion of invariant sites (of 0.01) and four gamma-distributed rate
536 categories to account for rate heterogeneity across sites. The six loci analyzed (InvC/XsaS,
537 InvE/SpaP/XsaP, InvA/XsaQ, SpaQ/XsaX SpaS/XsaZ and SpaR/XsaY) are the same six
538 T3SS SPI-1 structural proteins used in previous phylogenetic analysis (Degnan et al. 2009).
539 Multiple alignments of the amino acid sequences of the six structural proteins and for all taxa
540 were performed using ClustalW. The phylogenetic tree was calculated with PhyML (Guindon
541 and Gascuel 2003); <http://atgc.lirmm.fr/phyml/>; version 2.4.4. Five hundred bootstrap
542 replicates were performed with PhyML program.

543 The phylogenetic core genome MLSA tree was reconstructed using the maximum
544 likelihood method implemented in the PhyML program. The GTR substitution model was
545 selected assuming an estimated proportion of invariant sites (of 0.01) and four gamma-
546 distributed rate categories to account for rate heterogeneity across sites. The gamma shape
547 parameter was estimated directly from the data ($\alpha = 0.011$). One thousand bootstrap replicates
548 were performed with PhyML program. The seven analyzed loci (*gyrB*, *groEL*, *recA*, *dnaK*,
549 *efp*, *atpD* and *glnA*) are typical housekeeping genes in the chromosome of *X. albilineans*
550 strain GPE PC73, located 0.004, 0.348, 1.369, 1.983, 2.245, 3.442, and 3.655 Mb from the
551 origin of replication, respectively. The total length of the partial CDSs nucleotide sequences
552 concatenated for each taxon was 3972 bp. Multiple alignments of the nucleotide sequences of
553 the seven housekeeping fragment genes and for all taxa were performed using ClustalW.

554 Phylogenetic trees were also constructed from several complete or partial coding
555 sequences of the locus T3SS SPI-1 of *X. albilineans* with the same methods used to construct
556 the MLSA tree. PCR fragments used to construct these phylogenetic SPI-1 trees or the
557 phylogenetic core genome MLSA tree were obtained from the same samples of DNA
558 templates. Additional PCR controls were performed with other samples of the same DNA
559 templates to rule out accidental mixing of samples.

560
561 **Recombination analyses.**

562 DnaSP (DNA Sequence Polymorphism, <http://www.ub.es/dnasp/> Current Released
563 Version: 5.10.01, (Librado and Rozas 2009)) and RDP3 (Recombination Detection Program
564 version 3, <http://darwin.uvigo.es/rdp/rdp.html>) were used to detect potential recombinant
565 sequences and localize possible recombination breakpoints in multiple sequence alignments.
566 RDP3 is a Windows interface for a range of different recombination detection and analysis
567 programs including the RDP method (Martin et al. 2005), GENECONV (Padidam et al.

568 1999), and Chimaera (Posada and Crandall 2001) methods used in this study. Analyses were
569 performed with default settings for all detection methods.

570

571 **Selection analyses.**

572 Estimation of the ratio $\omega = d_N/d_S$ (nonsynonymous to synonymous substitution rate)
573 was performed using the 'branch models' of the codeml program implemented in PAML 4.3
574 (Yang 1997, 1998). The likelihood (L) of each model was estimated by PAML. (i) To test
575 whether two clades in a given phylogeny underwent distinct selective pressures, a null model
576 assuming a common ω ratio for both clades was compared to an alternative model assuming
577 one ω ratio per clade. The two models were then compared statistically by likelihood ratio
578 tests (LRT). The test statistics $2\Delta\ln L$ (twice the difference of the log-likelihood between the
579 two models) was compared to a χ^2 distribution with n degrees of freedom, n being the
580 difference between the numbers of parameters of the two models. (ii) To test whether a gene
581 evolved under purifying selection ($\omega < 1$) or evolved neutrally ($\omega = 1$), the null model
582 assuming a fixed $\omega = 1$ was compared using LRT to an alternative model with an estimated ω
583 ratio. Positive selection was detected with 'codon models' of the program codeml (PAML)
584 (Yang 1998; Yang and Nielsen 1998). A neutral model (M7), using a discrete beta
585 distribution (range [0, 1]) to model different ω ratios among sites, was compared by LRT to
586 an alternative model (M8) assuming a supplementary class of codons with $\omega > 1$ (ω
587 estimated). Comparison of evolutionary rates between two clades of a given evolutionary tree
588 was assessed by using the program baseml of PAML. A neutral model assuming that the two
589 given clades evolved at the same evolutionary rate was compared by LRT with an alternative
590 'local clock model' (Yoder and Yang 2000; Yang and Yoder 2003) that assumed that each
591 clade or subclade had its own evolutionary rate.

592

593 **Screening of plant pathogenic bacteria for the presence of the T3SS SPI-1 gene cluster**
594 **of *X. albilineans*.**

595 A collection of 128 strains belonging to the main genera of plant pathogenic bacteria
596 (*Acidovorax*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Erwinia*, *Dickeya*,
597 *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Pectobacterium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Xylophilus*) was
598 screened by PCR with the primer pairs BSA Q, J and M (based on the three DNA fragments
599 subtracted from *X. axonopodis* pv. *phaseoli*; Alavi et al. 2008) (Supplemental data 1), and
600 dot-blot hybridizations as described previously (Hajri et al. 2009). Screened bacteria are listed
601 in supplemental data 2.

602 The 35 primer pairs used to amplify the complete T3SS SPI-1 from *X. albilineans*
603 strain Xa23R1 (supplemental data 1) were used to reveal whether this gene cluster is fully or
604 partially present in *X. axonopodis* pv. *phaseoli* strains. The amplified PCR products from
605 three *X. axonopodis* pv. *phaseoli* strains (CFBP 2534, CFBP 6164 and CFBP 6982) were
606 purified from agarose gels with a NucleospinH extract II kit (Macherey-Nagel EURL, France)
607 and sequenced by the Genoscreen genomic analysis platform (Lille, France).

608

609 **ACKNOWLEDGEMENTS**

610 We thank Elisabeth Fournier and Philippe Roumagnac for fruitful discussions, Helen
611 Rothnie for English editing, and anonymous reviewers for valuable suggestions to improve
612 the manuscript. Mélanie Marguerettaz was supported by a PhD Fellowship from La Région
613 Languedoc-Roussillon. Philippe Rott was supported by a Marie Curie Outgoing International
614 Fellowship from the European Commission.

615

616 **LITERATURE CITED**

- 617 Alavi, S. M., Sanjari, S., Durand, F., Brin, C., Manceau, C., and Poussier, S. 2008.
618 Assessment of the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and
619 *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* as a basis to identify putative pathogenicity
620 genes and a type III secretion system of the SPI-1 family by multiple suppression
621 subtractive hybridizations. Appl. Environ. Microbiol. 74:3295-3301.
- 622 Angot, A., Peeters, N., Lechner, E., Vaillau, F., Baud, C., Gentzbittel, L., Sartorel, E.,
623 Genschik, P., Boucher, C., and Genin, S. 2006. *Ralstonia solanacearum* requires F-
624 box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host
625 plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103:14620-14625.
- 626 Birch, R. 2001. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease
627 control. Mol. Plant Pathol. 2:1-11.
- 628 Buchrieser, C., Glaser, P., Rusniok, C., Nedjari, H., d'Hauteville, H., Kunst, F., Sansonetti, P.,
629 and Parsot, C. 2000. The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins
630 secreted by the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. Mol. Microbiol.
631 38:760-771.
- 632 Bui Thi Ngoc, L., Verniere, C., Jouen, E., Ah-You, N., Lefeuvre, P., Chiroleu, F., Gagnevin,
633 L., and Pruvost, O. 2010. Amplified fragment length polymorphism and multilocus
634 sequence analysis-based genotypic relatedness among pathogenic variants of
635 *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *Xanthomonas campestris* pv. *bilvae*. Int. J. Syst. Evol.
636 Microbiol. 60:515-525.
- 637 Campbell, A. M. 1992. Chromosomal insertion sites for phages and plasmids. J. Bacteriol.
638 174:7495-7499.
- 639 Champoiseau, P., Rott, P., and Daugrois, J. H. 2009. Epiphytic populations of *Xanthomonas*
640 *albilineans* and subsequent sugarcane stalk infection are linked to rainfall in
641 Guadeloupe. Plant Dis. 93:339-346.

- 642 Chatterjee, S., Almeida, R. P. P., and Lindow, S. 2008. Living in two worlds: The plant and
643 insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46:243-271.
- 644 Cornelis, G. R. 2006. The type III secretion injectisome. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:811-825.
- 645 Corre, J., Patte, J., and Louarn, J. -M. 2000. Prophage lambda induces terminal recombination
646 in *Escherichia coli* by inhibiting chromosome dimer resolution: An orientation-
647 dependent cis-effect lending support to bipolarization of the terminus. *Genetics*
648 154:39-48.
- 649 Correa, V. R., Majerczak, D. R., Ammar, E., Merighi, M., Pratt, R. C., Redinbaugh, M. G.,
650 Coplin, D. L., and Hogenhout, S. A. 2010. A bacterial pathogen uses distinct type III
651 secretion systems to alternate between host kingdoms. *Phytopathology* 100:S27.
- 652 Croxen, M. A., and Finlay, B. B. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli*
653 pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:26-38.
- 654 Daugrois, J. H., Dumont, V., Champoiseau, P., Costet, L., Boisne-Noc, R., and Rott, P. 2003.
655 Aerial contamination of sugarcane in Guadeloupe by two strains of *Xanthomonas*
656 *albilineans*. *Eur. J. Plant Pathol.* 109:445-458.
- 657 Davis, M., Rott, P., Baudin, P., and Dean, J. 1994. Evaluation of selective media and
658 immunoassays for detection of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane
659 leaf scald disease. *Plant Dis.* 78:78-82.
- 660 Davis, M., Rott, P., Warmuth, C., Chatenet, M., and Baudin, P. 1997. Intraspecific genomic
661 variation within *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen.
662 *Phytopathology* 87:316-324.
- 663 Degnan, P. H., Leonardo, T. E., Cass, B. N., Hurwitz, B., Stern, D., Gibbs, R. A., Richards,
664 S., and Moran, N. A. 2009. Dynamics of genome evolution in facultative symbionts of
665 aphids. *Environ. Microbiol.* 12:2060-2069.

- 666 Gerlach, R., and Hensel, M. 2007. *Salmonella* pathogenicity islands in host specificity, host
667 pathogen-interactions and antibiotics resistance of *Salmonella enterica*. Berl. Munch.
668 Tierarztl. Wochenschr. 120:317-327.
- 669 Guindon, S., and Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large
670 phylogenies by maximum likelihood. Syst. Biol. 52:696-704.
- 671 Gupta, R. S. 2000. The natural evolutionary relationships among prokaryotes. Crit. Rev.
672 Microbiol. 26:111-131.
- 673 Guttman, D. S., Gropp, S. J., Morgan, R. L., and Wang, P. W. 2006. Diversifying selection
674 drives the evolution of the type III secretion system pilus of *Pseudomonas syringae*.
675 Mol. Biol. Evol. 23:2342-2354.
- 676 Hajri, A., Brin, C., Hunault, G., Lardeux, F., Lemaire, C., Manceau, C., Boureau, T., and
677 Poussier, S. 2009. A «repertoire for repertoire» hypothesis: Repertoires of type three
678 effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*. PLoS One
679 4:e6632.
- 680 Hashimi, S. M., Wall, M. K., Smith, A. B., Maxwell, A., and Birch, R. G. 2007. The
681 phytotoxin albicidin is a novel inhibitor of DNA gyrase. Antimicrob. Agents
682 Chemother. 51:181-187.
- 683 He, S. Y., Nomura, K., and Whittam, T. S. 2004. Type III protein secretion mechanism in
684 mammalian and plant pathogens. Biochim. Biophys. Acta 1694:181-206.
- 685 Joardar, V., Lindeberg, M., Jackson, R. W., Selengut, J., Dodson, R., Brinkac, L. M.,
686 Daugherty, S. C., Deboy, R., Durkin, A. S., Giglio, M. G., Madupu, R., Nelson, W.
687 C., Rosovitz, M. J., Sullivan, S., Crabtree, J., Creasy, T., Davidsen, T., Haft, D. H.,
688 Zafar, N., Zhou, L., Halpin, R., Holley, T., Khouri, H., Feldblyum, T., White, O.,
689 Fraser, C. M., Chatterjee, A. K., Cartinhour, S., Schneider, D. J., Mansfield, J.,
690 Collmer, A., and Buell, C. R. 2005. Whole-genome sequence analysis of

- 691 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A reveals divergence among pathovars
692 in genes involved in virulence and transposition. J. Bacteriol. 187:6488-6498.
- 693 Kay, S., and Bonas, U. 2009. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant.
694 Curr. Opin. Microbiol. 12:37-43.
- 695 Killiny, N., Prado, S. S., and Almeida, R. P. P. 2010. Chitin utilization by the insect-
696 transmitted bacterium *Xylella fastidiosa*. Appl. Environ. Microbiol. 76:6134-6140.
- 697 Kube, M., Migdoll, A., Müller, I., Kuhl, H., Beck, A., Reinhardt, R., and Geider, K. 2008.
698 The genome of *Erwinia tasmaniensis* strain Et1/99, a non-pathogenic bacterium in the
699 genus *Erwinia*. Environ. Microbiol. 10:2211-2222.
- 700 Kube, M., Migdoll, A., Gehring, I., Heitmann, K., Mayer, Y., Kuhl, H., Knaust, F., Geider,
701 K., and Reinhardt, R. 2010. Genome comparison of the epiphytic bacteria *Erwinia*
702 *billingiae* and *E. tasmaniensis* with the pear pathogen *E. pyrifoliae*. BMC Genomics
703 11:393.
- 704 Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.
705 G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun,
706 M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V.,
707 Carter, N. M., Choi, S.K., Codani, J. J., Connerton, I. F., Cummings, N. J., Daniel, R.
708 A., Denizot, F., Devine, K. M., Dusterhoft, A., Ehrlich, S. D., Emmerson, P. T.,
709 Entian, K. D., Errington, J., Fabret, C., Ferrari, E., Foulger, D., Fritz, C., Fujita, M.,
710 Fujita, Y., Fuma, S., Galizzi, A., Galleron, N., Ghim, S. Y., Glaser, P., Goffeau, A.,
711 Golightly, E. J., Grandi, G., Guiseppi, G., Guy, B. J., Haga, K., Haiech, J., Harwood,
712 C. R., Henaut, A., Hilbert, H., Holsappel, S., Hosono, S., Hullo, M. F., Itaya, M.,
713 Jones, L., Joris, B., Karamata, D., Kasahara, Y., Klaerr-Blanchard, M., Klein, C.,
714 Kobayashi, Y., Koetter, P., Koningstein, G., Krogh, S., Kumano, M., Kurita, K.,
715 Lapidus, A., Lardinois, S., Lauber, J., Lazarevic, V., Lee, S. M., Levine, A., Liu, H.,

- 716 Masuda, S., Mauel, C., Medigue, C., Medina, N., Mellado, R.P., Mizuno, M., Moestl,
717 D., Nakai, S., Noback, M., Noone, D., O'Reilly, M., Ogawa, K., Ogiwara, A., Oudega,
718 B., Park, S. H., Parro, V., Pohl, T. M., Portetelle, D., Porwollik, S., Prescott, A. M.,
719 Presecan, E., Pujic, P., Purnelle, B., Rapoport, G., Rey, M., Reynolds, S., Rieger, M.,
720 Rivolta, C., Rocha, E., Roche, B., Rose, M., Sadaie, Y., Sato, T., Scanlan, E.,
721 Schleich, S., Schroeter, R., Scoffone, F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S.J.,
722 Serror, P., Shin, B. S., Soldo, B., Sorokin, A., Tacconi, E., Takagi, T., Takahashi, H.,
723 Takemaru, K., Takeuchi, M., Tamakoshi, A., Tanaka, T., Terpstra, P., Tognoni, A.,
724 Tosato, V., Uchiyama, S., Vandenbol, M., Vannier, F., Vassarotti, A., Viari, A.,
725 Wambutt, R., Wedler, E., Wedler, H., Weitzenegger, T., Winters, P., Wipat, A.,
726 Yamamoto, H., Yamane, K., Yasumoto, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H. F.,
727 Zumstein, E., Yoshikawa, H., and Danchin, A. 1997. The complete genome sequence
728 of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390:249-256.
- 729 Lara-Tejero, M., and Galan, J. E. 2009. *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*
730 pathogenicity island 1-encoded type III secretion system translocases mediate intimate
731 attachment to nonphagocytic cells. *Infect. Immun.* 77:2635-2642.
- 732 Lewis, J. D., Guttman, D. S., and Desveaux, D. 2009. The targeting of plant cellular systems
733 by injected type III effector proteins. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 20:1055-1063.
- 734 Librado, P., and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA
735 polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- 736 Martin, D. P., Posada, D., Crandall, K. A., and Williamson, C. 2005. A Modified bootscan
737 algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination
738 breakpoints. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 21:98-102.

- 739 McGhie, E. J., Brawn, L. C., Hume, P. J., Humphreys, D., and Koronakis, V. 2009.
740 *Salmonella* takes control: Effector-driven manipulation of the host. *Curr. Opin.*
741 *Microbiol.* 12:117-124.
- 742 Naum, M., Brown, E. W., and Mason-Gamer, R. J. 2009. Phylogenetic evidence for extensive
743 horizontal gene transfer of type III secretion system genes among enterobacterial plant
744 pathogens. *Microbiology* 155:3187-3199.
- 745 Oke, V., and Long, S. R. 1999. Bacterial genes induced within the nodule during the
746 rhizobium-legume symbiosis. *Mol. Microbiol.* 32:837-849.
- 747 Padidam, M., Sawyer, S., and Fauquet, C. M. 1999. Possible emergence of new geminiviruses
748 by frequent recombination. *Virology* 265:218-225.
- 749 Pieretti, I., Royer, M., Barbe, V., Carrere, S., Koebnik, R., Cociancich, S., Couloux, A.,
750 Darrasse, A., Gouzy, J., Jacques, M.-A., Lauber, E., Manceau, C., Mangenot, S.,
751 Poussier, S., Segurens, B., Szurek, B., Verdier, V., Arlat, M., and Rott, P. 2009. The
752 complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into
753 the reductive genome evolution of the xylem-limited *Xanthomonadaceae*. *BMC*
754 *Genomics* 10:616.
- 755 Posada, D., and Crandall, K. A. 2001. Evaluation of methods for detecting recombination
756 from DNA sequences: Computer simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
757 98:13757-13762.
- 758 Renier, A., Vivien, E., Cociancich, S., Letourmy, P., Perrier, X., Rott, P. C., and Royer, M.
759 2007. Substrate specificity-conferring regions of the nonribosomal peptide synthetase
760 adenylation domains involved in albicidin pathotoxin biosynthesis are highly
761 conserved within the species *Xanthomonas albilineans*. *Appl. Environ. Microbiol.*
762 73:5523-5530.

- 763 Rott, P., Abel, M., Soupa, D., Feldman, P., and Letourmy, P. 1994. Population dynamics of
764 *Xanthomonas albilineans* in sugarcane plants as determined with an antibiotic-
765 resistant mutant. *Plant Dis.* 78:241-247.
- 766 Rott, P., Mohamed, I. S., Klett, P., Soupa, D., de Saint-Albin, A., Feldmann, P., and
767 Letourmy, P. 1997. Resistance to leaf scald disease is associated with limited
768 colonization of sugarcane and wild relatives by *Xanthomonas albilineans*.
769 *Phytopathology* 87:1202-1213.
- 770 Rott, P., and Davis, M. 2000. Leaf scald. p. 38-44. *In* A guide to sugarcane diseases. P. Rott,
771 R. Bailey, J. Comstock, B. Croft, and A. Saumtally eds. CIRAD-ISSCT, Montpellier,
772 France.
- 773 Royer, M., Costet, L., Vivien, E., Bes, M., Cousin, A., Damais, A., Pieretti, I., Savin, A.,
774 Megessier, S., Viard, M., Frutos, R., Gabriel, D., and Rott, P. 2004. Albicidin
775 pathotoxin produced by *Xanthomonas albilineans* is encoded by three large PKS and
776 NRPS gene present in a gene cluster also containing several putative modifying,
777 regulatory, and resistance genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17:414-427.
- 778 Saddler, G., and Bradbury, J. 2005. The proteobacteria. *In* D. Brenner, 708 N. Krieg, J.
779 Staley, and G. Garrity (ed.), *Bergey's Manual of systematic bacteriology*, New-York
780 : Springer ed, vol. 65.
- 781 Saijo, Y., and Schulze-Lefert, P. 2008. Manipulation of the eukaryotic transcriptional
782 machinery by bacterial pathogens. *Cell Host Microbe* 4:96-99.
- 783 Saumtally, S., Medan, H., and Autrey, L. (1996). Evolution of aerial infection of leaf scald
784 caused by *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson in sugarcane. In proceedings
785 XXII Congress, J. Cock and T. Brekelbaum eds. Cartagena, Colombia: International
786 Society of Sugarcane Technologists, pp. 493-497.

- 787 Sebahia, M., Bocsanczy, A. M., Biehl, B. S., Quail, M. A., Perna, N. T., Glasner, J. D.,
788 DeClerck, G. A., Cartinhour, S., Schneider, D. J., Bentley, S. D., Parkhill, J., and
789 Beer, S. V. 2010. Complete genome sequence of the plant pathogen *Erwinia*
790 *amylovora* strain ATCC 49946. *J. Bacteriol.* 192:2020-2021.
- 791 Smits, T. H. M., Rezzonico, F., Kamber, T., Blom, J., Goesmann, A., Frey, J.r.E., and Duffy,
792 B. 2010. Complete genome sequence of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*
793 CFBP 1430 and comparison to other *Erwinia* spp. *Mol. Plant Microbe Interact.*
794 23:384-393.
- 795 Stevens, M. P., Wood, M. W., Taylor, L. A., Monaghan, P., Hawes, P., Jones, P. W., Wallis,
796 T. S., and Galyov, E. E. 2002. An Inv/Mxi-Spa-like type III protein secretion system
797 in *Burkholderia pseudomallei* modulates intracellular behaviour of the pathogen. *Mol.*
798 *Microbiol.* 46:649-659.
- 799 Venkatesan, M. M., Goldberg, M. B., Rose, D. J., Grotbeck, E. J., Burland, V., and Blattner,
800 F. R. 2001. Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of
801 *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* 69:3271-3285.
- 802 Yang, Z. 1997. PAML: A programme package for phylogenetic analysis by maximum
803 likelihood. *Comp. Appl. Biosci.* 13:555-556.
- 804 Yang, Z. 1998. Likelihood ratio tests for detecting positive selection and application to
805 primate lysozyme evolution. *Mol. Biol. Evol.* 15:568-573.
- 806 Yang, Z., and Nielsen, R. 1998. Synonymous and nonsynonymous rate variation in nuclear
807 genes of mammals. *J. Mol. Evol.* 46:409-418.
- 808 Yang, Z., and Yoder, A. D. 2003. Comparison of likelihood and Bayesian methods for
809 estimating divergence times using multiple gene loci and calibration points, with
810 application to a radiation of cute-looking mouse lemur species. *Syst. Biol.* 52:705-
811 716.

812 Yoder, A. D., and Yang, Z. 2000. Estimation of primate speciation dates using local
 813 molecular clocks. *Mol. Biol. Evol.* 17:1081-1090.

814
 815
 816
 817

818

Table 1. Comparative analysis of T3SS SPI-1 genes conserved in *Xanthomonas albilineans* and *Burkholderia pseudomallei*

Putative function	Frequently used nomenclature	<i>X. albilineans</i> (Strain GPE PC73)			<i>B. pseudomallei</i> (Strain K96243)			Amino acid identity
		Accession	Protein name	Length (aa)	Accession	Protein name	Length (aa)	
Injectisome component	PrgK/MxiJ	XALc_1486	XsaJ	295	BPSS1550	BsaJ	316	100/181 (55%)
Injectisome component	PrgJ	XALc_1487	XsaK	94	BPSS1549	BsaK	100	20/73 (27%)
Injectisome component	PrgI/MxiH	XALc_1488	XsaL	97	BPSS1548	BsaL	89	44/90 (48%)
Injectisome component	PrgH	XALc_1489	XsaM	467	BPSS1547	BsaM	428	115/441 (26%)
Regulation	InvF	XALc_1490	XsaN	210	BPSS1546	BsaN	252	73/165 (44%)
Injectisome component	InvG/MxiD	XALc_1491	XsaO	626	BPSS1545	BsaO	606	234/562 (41%)
Injectisome component	InvE/MxiC	XALc_1492	XsaP	371	BPSS1544	BsaP	373	115/371 (30%)
Injectisome component	InvA/MxiA	XALc_1493	XsaQ	703	BPSS1543	BsaQ	690	369/701 (52%)
Chaperone	InvB	XALc_1494	XsaR	136	BPSS1542	BsaR	135	32/135 (23%)
Injectisome component	InvC/SpaI	XALc_1495	XsaS	449	BPSS1541	BsaS	436	221/445 (49%)
Injectisome component	InvK/SpaO	XALc_1498	XsaV	346	BPSS1538	BsaV	327	71/266 (26%)
Injectisome component	InvL/SpaP	XALc_1499	XsaW	231	BPSS1537	BsaW	226	119/227 (52%)
Injectisome component	SpaQ	XALc_1500	XsaX	88	BPSS1536	BsaX	84	42/82 (51%)
Injectisome component	InvN/SpaR	XALc_1501	XsaY	256	BPSS1535	BsaY	256	102/244 (41%)
Injectisome component	SpaS	XALc_1502	XsaZ	358	BPSS1534	BsaZ	411	156/350 (44%)
Hypothetical protein	OrgA	XALc_1485	OrgA	198	BPSS1551	-	195	52/186 (27%)
Hypothetical protein	OrgB	XALc_1484	OrgB	220	BPSS1552	-	260	37/176 (21%)
Chaperone	SicA	XALc_1503	XicA	171	BPSS1533	BicA	171	80/166 (48%)
Translocon component	SipB/IpaB	XALc_1504	XipB	534	BPSS1532	BipB	620	131/375 (34%)
Translocon component	SipC/IpaC	XALc_1505	XipC	348	BPSS1531	BipC	419	68/263 (25%)
Translocon component	SipD/IpaD	XALc_1477	XipD	626	BPSS1529	BipD	285	66/199 (33%)

149

819 **Table 2.** ω ratio estimates and likelihood ratio tests of coding sequences of the T3SS SPI-1 of
 820 *X. albilineans*

		Coding sequences						
		<i>xipD/a</i>	<i>xipD/c</i>	<i>xapA</i>	<i>xapB</i>	<i>xsaM</i>	<i>xsaO</i>	<i>xapH</i>
Model1	np	20	20	20	20	20	20	20
$\omega = 1$ (fixed)	LnL	-555.430	-839.852	-225.446	-375.089	-1591.944	-1717.916	-1188.978
	ω	1	1	1	1	1	1	1
	np	21	21	21	21	21	21	21
Model2 ω estimated	LnL	-552.517	-838.822	-224.650	-374.677	-1591.860	-1707.969	-1185.860
	ω	0.252	0.456	0.248	1.956	0.826	0.113	4.552
	dN	0.020	0.021	0.018	0.058	0.022	0.006	0.043
	dS	0.079	0.045	0.070	0.029	0.026	0.051	0.010
LRT	$2\Delta\text{LnL}$	5.828	2.060	1.590	0.825	0.167	19.894	6.236
Model1 vs. Model2	df	1	1	1	1	1	1	1
	P-value	0.0158	0.1512	0.2073	0.3638	0.6825	8.18E-06	0.0125
	significance	*	NS	NS	NS	NS	**	*

821 LnL : Log-likelihood of the model, np : number of parameters of the model, $2\Delta\text{LnL}$: twice the likelihood of the two
 822 compared models, df : number of degree of freedom, LRT : Likelihood ratio test. * : significant at the 5% level , ** :
 823 significant at the 0.1% level, NS : not significant.
 824
 825

826 **Table 3.** Detection of positive selection in the analyzed coding sequences of the T3SS SPI-1
 827 of *X. albilineans*
 828

Coding sequence	Model and LRT	LnL	np	ω max	%	$2\Delta\text{LnL}$	df	p	significance
<i>xipD/a</i>	M7	-552.518	22						
	M8	-552.519	24						
	LRT					0	2	1.000	NS
<i>xipD/c</i>	M7	-838.823	22						
	M8	-838.823	24	1.000	0.00001				
	LRT					3.000E-05	2	1.000	NS
<i>xapA</i>	M7	-224.651	22						
	M8	-224.651	24	1.000	0.00001				
	LRT					1.540E-04	2	1.000	NS
<i>xapB</i>	M7	-375.089	22						
	M8	-374.677	24						
	LRT					8.248E-01	2	0.662	NS
<i>xsaM</i>	M7	-1591.837	22						
	M8	-1591.793	24	1.839	0.473				
	LRT					8.792E-02	2	0.957	NS
<i>xsaO</i>	M7	-1707.970	22						
	M8	-1707.970	24	1.000	0.00001				
	LRT					4.460E-04	2	0.999	NS
<i>xapH</i>	M7	-1188.978	22						
	M8	-1185.860	24	4.552	1.000				
	LRT					6.24	2	0.044	*

829 LRT : Likelihood ratio test, LnL : Log-likelihood of the model, np : number of parameters of the model, ω : max value of ω
 830 ratio estimated for codons evolving under positive selection, % : percentage of the codons evolving at ω max value, $2\Delta\text{LnL}$:
 831 twice the likelihood of the two compared models, df : number of degree of freedom. * : significant at the 5% level and NS :
 832 not significant.

833 **FIGURE CAPTIONS**

834 **Fig. 1.** Tree of the concatenated amino acid sequence of six T3SS SPI-1 structural proteins
 835 from bacteria associated with mammals (*Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia*
 836 *thailandensis*, *Yersinia enterocolitica*, *Chromobacterium violaceum*, *Salmonella*
 837 *typhimurium*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Shigella flexeneri* and *Proteus mirabilis*), insects
 838 (*Sodalis glossinidius* and *Hamiltonella defensa*) or plants (*Xanthomonas albilineans*, *Erwinia*
 839 *tasmaniensis*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia pyrifoliae* and *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*)
 840 using the maximum likelihood method and LG as the substitution model. Six T3SS SPI-1
 841 structural proteins were used in this analysis in *X. albilineans*: XsaS/InvC/SpaI,
 842 XsaP/InvE/MxiC, XsaQ/InvA/MxiA, XsaX/SpaQ, XsaZ/SpaS and XsaY/InvN/SpaR. The
 843 tree was constructed with sequences of the T3SS SPI-2 structural proteins of *B. pseudomallei*
 844 and *H. defensa* as an outgroup. Bootstrap percentages retrieved in 500 replications are shown
 845 at the nodes. The scale bar (0.2) indicates the number of nucleotide substitutions per site.

846

847 **Fig. 2. A,** Schematic illustration of the structure of T3SS SPI-1 of *Xanthomonas albilineans*.
 848 The putative locations of *X. albilineans* proteins are based on the function proposed for the
 849 corresponding homologous structural proteins of *Salmonella enterica* (Gerlach and Hensel
 850 2007). The *X. albilineans* proteins and their respective homologous proteins in *Salmonella* are
 851 XsaS/InvC, XsaM/PrgH, XsaJ/PrgK, XsaQ/InvA, XsaV/InvK, XsaW/InvL, XsaY/InvN,
 852 XsaX/SpaQ, XsaZ/SpaS, XsaK/PrgJ, XsaO/InvG, XsaL/PrgI, XipD/SipD, XipB/SipB and
 853 XipC/SipC. **B,** Genomic organization of the T3SS SPI-1 gene cluster in *X. albilineans* strain
 854 GPE PC73. All genes depicted within a single block are in the same orientation (indicated by
 855 the arrow at the end of the last gene of each box). Gene names are indicated below the boxes.
 856 Putative gene functions: *black boxes* translocon components, *grey hatched boxes* products
 857 associated with inner membrane, *light grey box* product associated with both inner and outer

858 membranes, *dark grey box* product associated to external syringe (needle), *white hatched box*
 859 product associated with outer membrane. The *white boxes with horizontal dashes* indicate
 860 other genes conserved in *Burkholderia pseudomallei*: putative chaperone protein genes (*xica*
 861 and *xsaR*), putative regulatory protein gene (*xsaN*) and putative oxygen-regulated invasion
 862 protein genes (*orgA* and *orgB*). Empty white boxes indicate hypothetical protein genes
 863 (candidate secreted T3SS SPI-1 effectors = T3SEs). **C**, Genomic organization of the T3SS
 864 SPI-1 gene cluster in *X. albilineans* strain Xa23R1. Boxes defined as in **B**. Parts of the T3SS
 865 SPI-1 previously sequenced by Royer et al. (2004) or amplified by PCR and sequenced in the
 866 present study are indicated at the bottom of the figure. IS = Insertion sequence. XALB1 =
 867 albicidin biosynthesis gene cluster (Royer et al. 2004). The label « Genes conserved in other
 868 *Xanthomonas* » on the left side of **B** indicates genes present upstream from the first insertion
 869 sequence and which are conserved in other *Xanthomonas*. T= replication terminus. Adapted
 870 from (Guttman et al. 2006).

871

872 **Fig. 3. A**, Comparison of the physical maps of the allelic forms of *xipD* present in
 873 *Xanthomonas albilineans* strains GPE PC73 and Xa23R1. *Black and grey hatched boxes*
 874 indicate parts of coding sequence of *xipD* shared by both strains (parts called *xipD/a* and
 875 *xipD/c*, respectively). *Grey hatched box* (part *xipD/c*) indicates the part of *xipD* that is similar
 876 to the *bipD* gene of *Burkholderia pseudomallei*. *White and black dotted boxes* indicate the
 877 region of the coding sequence of *xipD* that is not shared by strains GPE PC73 and Xa23R1
 878 (*xipD/b*). *Boxes with bricks* upstream of the ATG codon indicate the non-coding 5' region
 879 shared by strains GPE PC73 and Xa23R1. The lengths of the corresponding nucleotide
 880 sequences are indicated below each box. Putative start codon (ATG), stop codon (TAA) and a
 881 ribosome binding site (GAGAA) located 8 bp upstream of the start codon are indicated for the
 882 two allelic forms of *xipD*. IS = Insertion sequence. **B**, Data from BLAST alignments of the

883 two allelic forms of *xipD* of strains GPE PC73 and Xa23R1. C, Data from BLAST
884 alignments of the two allelic forms of *xipD* with the orthologous gene *bipD* of *B.*
885 *pseudomallei*. Vertical grey zones indicate the three parts of coding sequence of *xipD* (*xipD/a*,
886 *xipD/b* and *xipD/c*).

887

888 **Fig. 4.** Phylogenetic trees of *Xanthomonas albilineans* based on sequences of 11 or 12 strains
889 of the pathogen. The MLSA tree was constructed with the concatenated nucleotide sequences
890 of PCR fragments from seven housekeeping genes (*gyrB*, *atpD*, *dnaK*, *efp*, *groEL*, *glnA* and
891 *recA*) using the maximum likelihood method and GTR as the substitution model. The tree
892 was constructed with *X. albilineans* strain Xsa3 as outgroup. Strain Xsa3, which was isolated
893 in Guadeloupe from sugarcane leaf surfaces, failed to induce symptoms in sugarcane after
894 plant inoculation (Daugrois et al. 2003) and lacks most of the sequences identified in the
895 complete genome sequence of GPE PC73 as being specific to *X. albilineans*, including T3SS
896 SPI-1 (Royer *et al.*, unpublished data). Bootstrap percentages retrieved in 1000 replications
897 and >70% are shown at the nodes. The scale bar (0.005) indicates the number of nucleotide
898 substitutions per site. Distribution of the two allelic forms of gene *xipD* (*xipD-G* or *xipD-X*)
899 in different strains of *X. albilineans* is indicated to the right of the tree. No PCR product was
900 obtained with primers specific to T3SS SPI-1 for strain PNG130. The other trees were
901 constructed with the complete or partial coding sequence of six genes from the T3SS SPI-1
902 gene cluster of *X. albilineans* using the maximum likelihood method and GTR as the
903 substitution model. Trees *xapA* and *xapB* resulted from alignment of complete genes *xapA*
904 and *xapB*, respectively. Trees *xsaM*, *xsaO* and *xapH* resulted from alignment of the partial
905 coding sequences of genes *xsaM*, *xsaO* and *xapH*, respectively. Trees *xipD/a* and *xipD/c*
906 resulted from alignment of the 5' part and 3' part of *xipD* (see Fig. 3). Major clades (1 and 2)
907 are indicated on top of the left branch of each tree (see text for details). Bootstrap percentages

908 retrieved in 1000 replications and >50% are shown at the nodes. The scale bar (0.001 or
909 0.002) indicates the number of nucleotide substitutions per site.

910

911 **Fig. 5.** Detection of recombination events in the T3SS SPI-1 of *X. albilineans*. **A**, Genomic
912 organization of the *X. albilineans* T3SS SPI-1 gene cluster as presented in Fig. 2B. Coloured
913 boxes indicate sequences amplified by PCR from 10 *X. albilineans* strains and retrieved from
914 GenBank for *X. albilineans* strain GPE PC73: *orange box* two overlapping PCR fragments
915 amplified by primer pairs TTSS28/XipDF and TTSS27/TTSS27bis, *green box* PCR fragment
916 amplified by primer pair TTSS20/TTSS20bis, *blue box* PCR fragment amplified by primer
917 pair TTSS18/TTSS18bis, *purple box* PCR fragment amplified by primer pair
918 TTSS3/TTSS3bis. IS = Insertion Sequence. XALB1 = albicidin biosynthesis gene cluster. T =
919 terminus of replication. **B**, Concatenation of the five PCR fragments used for recombination
920 analyses. Concatenated sequence included coding and non coding sequences. Names of
921 following coding sequences are indicated below boxes: complete *xipD* gene (parts a, b and c,
922 see Fig. 3 for details), complete *xapA* and *xapB* genes, partial sequences of genes *xaM*, *xaO*,
923 *xipC* and *xapH*. Scale bar 500 bp. **C**, Recombination analyses. Horizontal bars indicate
924 recombinant regions detected in the concatenated sequence by the method listed to the left of
925 the figure. The reported *P*-value, indicated above each bar, corresponds to the method in bold
926 type and is the best calculated *P*-value. **D**, Phylogenetic analyses. The tree corresponds to the
927 MLSA tree shown in Fig. 4, except that branch lengths are not proportional to the number of
928 nucleotide substitutions per site. Numbers 1 and 2 indicate the clade to which each strain
929 belongs in trees obtained for each coding sequence included in the concatenated sequence
930 (trees presented in Fig. 4). Distribution of the two allelic forms of gene *xipD* (*xipD*-G or
931 *xipD*-X) in the different strains of *X. albilineans* is indicated for the coding sequence *xipD*/b.

Fig. 1

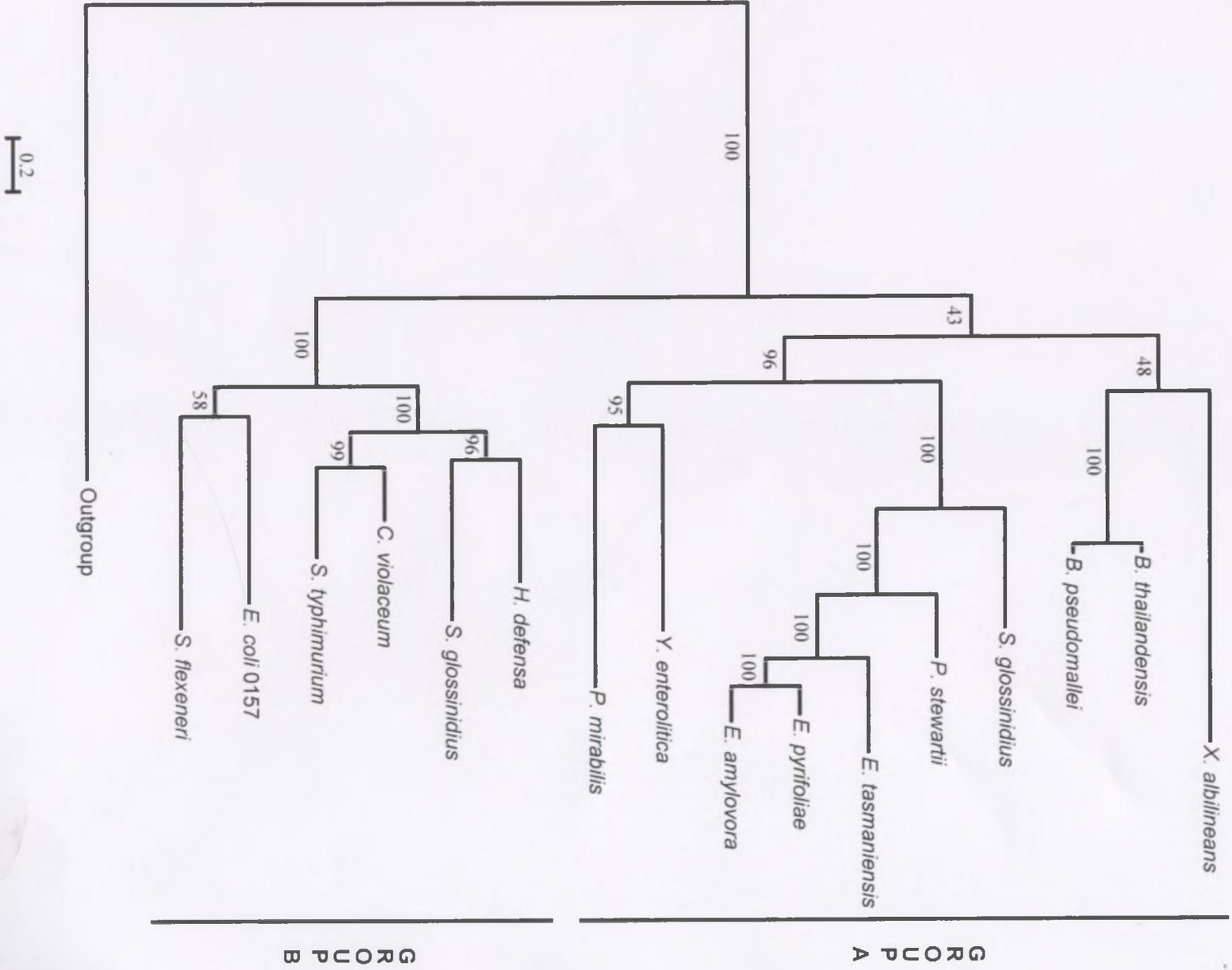


Fig. 2

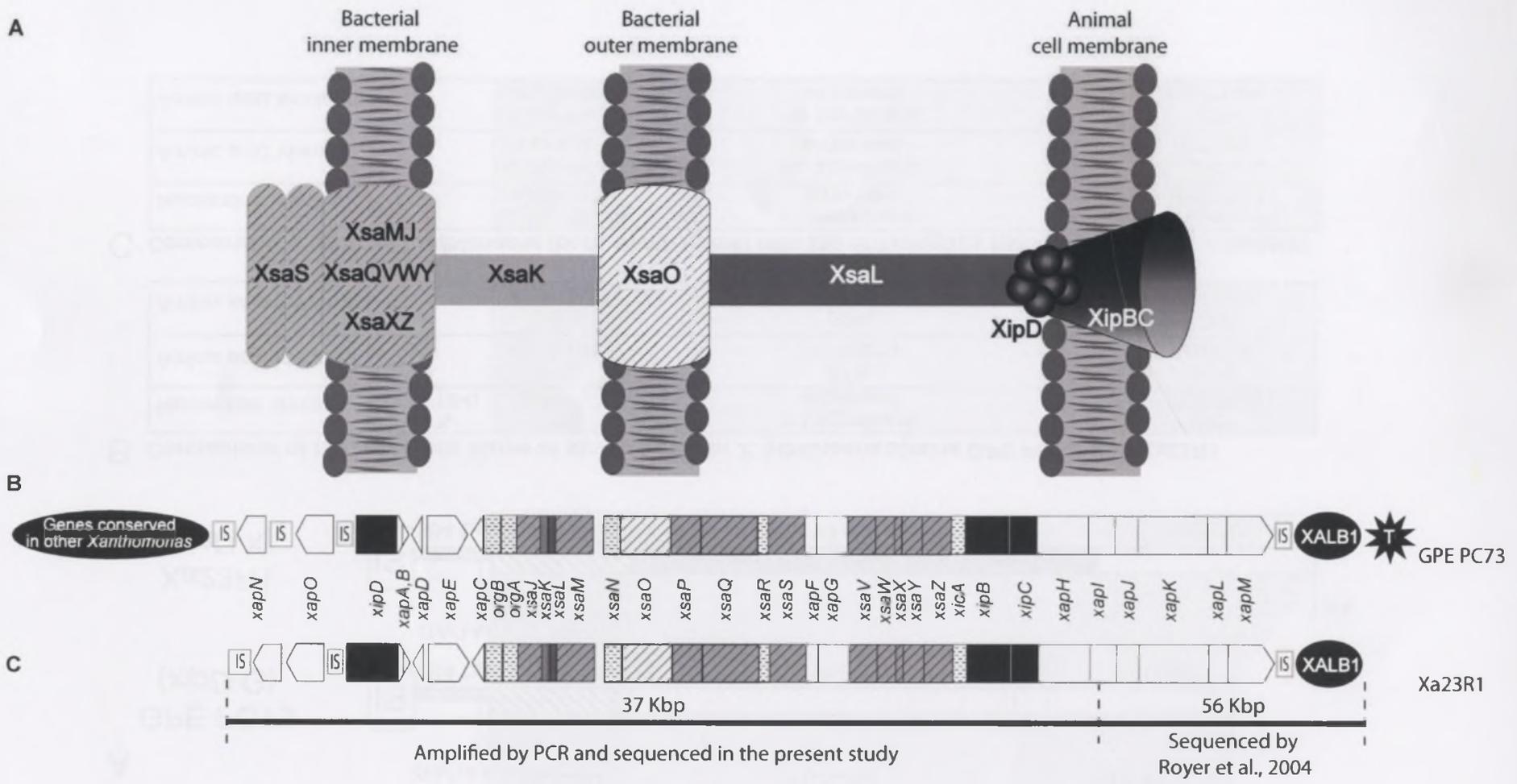
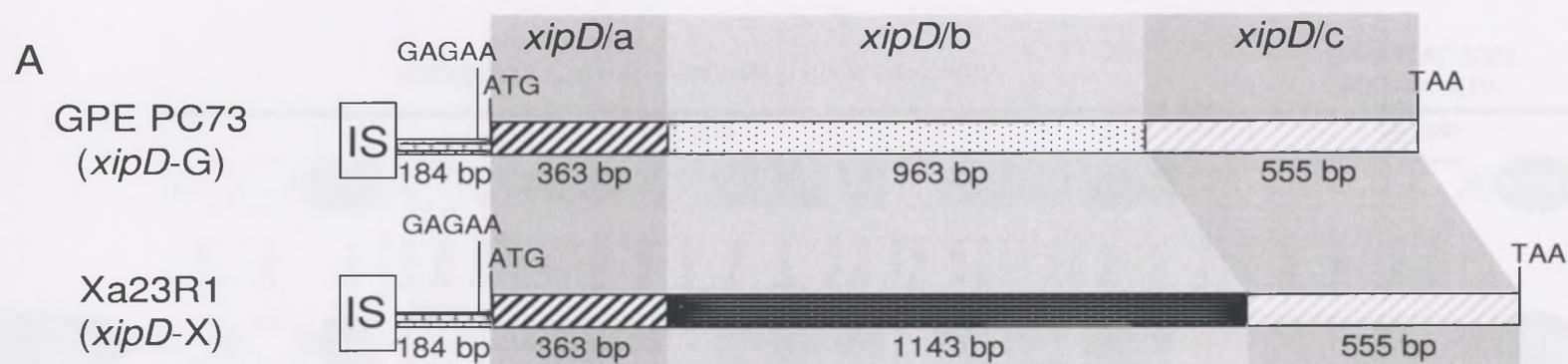


Fig. 3



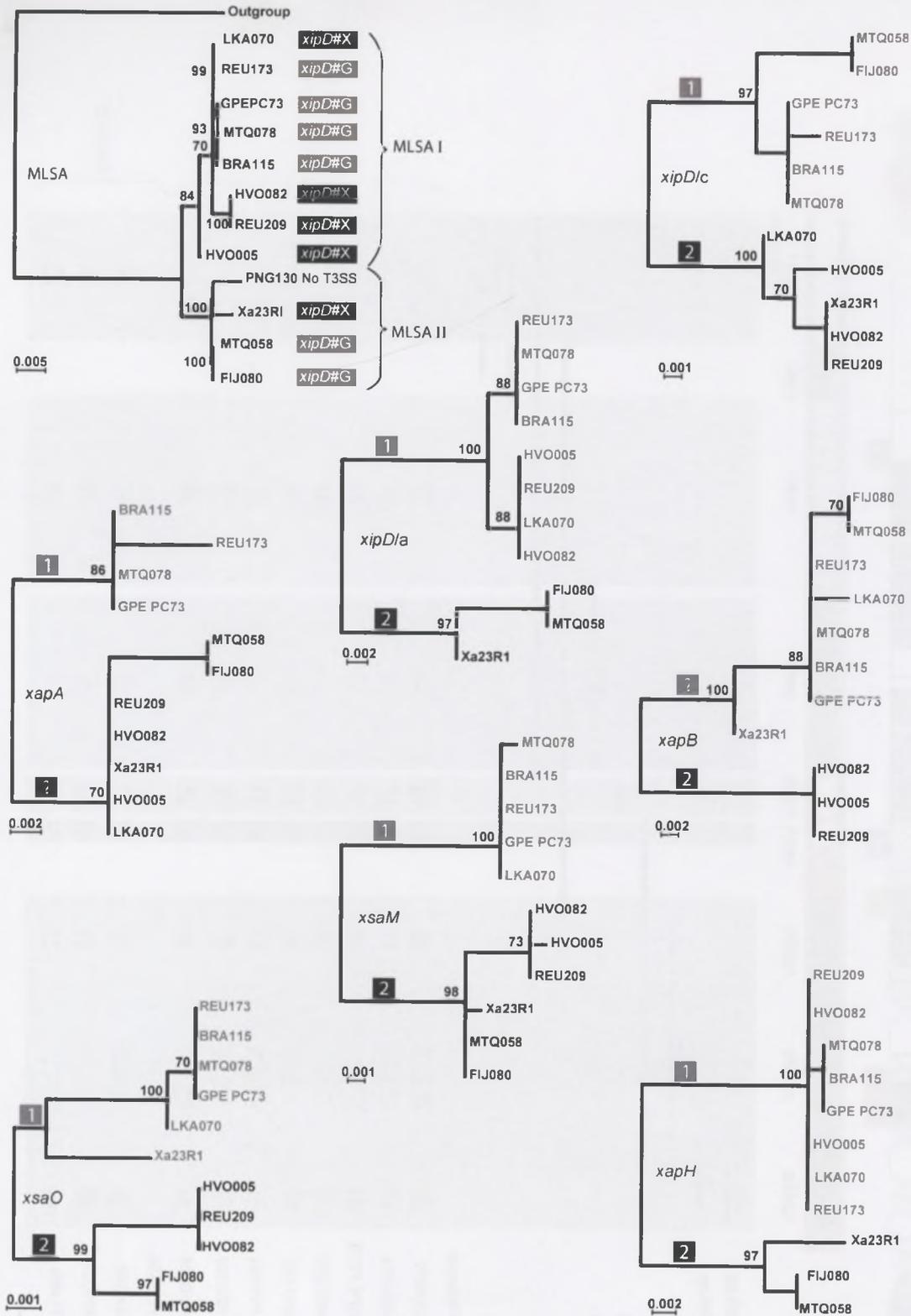
B Comparison of the two allelic forms of *xipD* present in *X. albilineans* strains GPE PC73 and Xa23R1

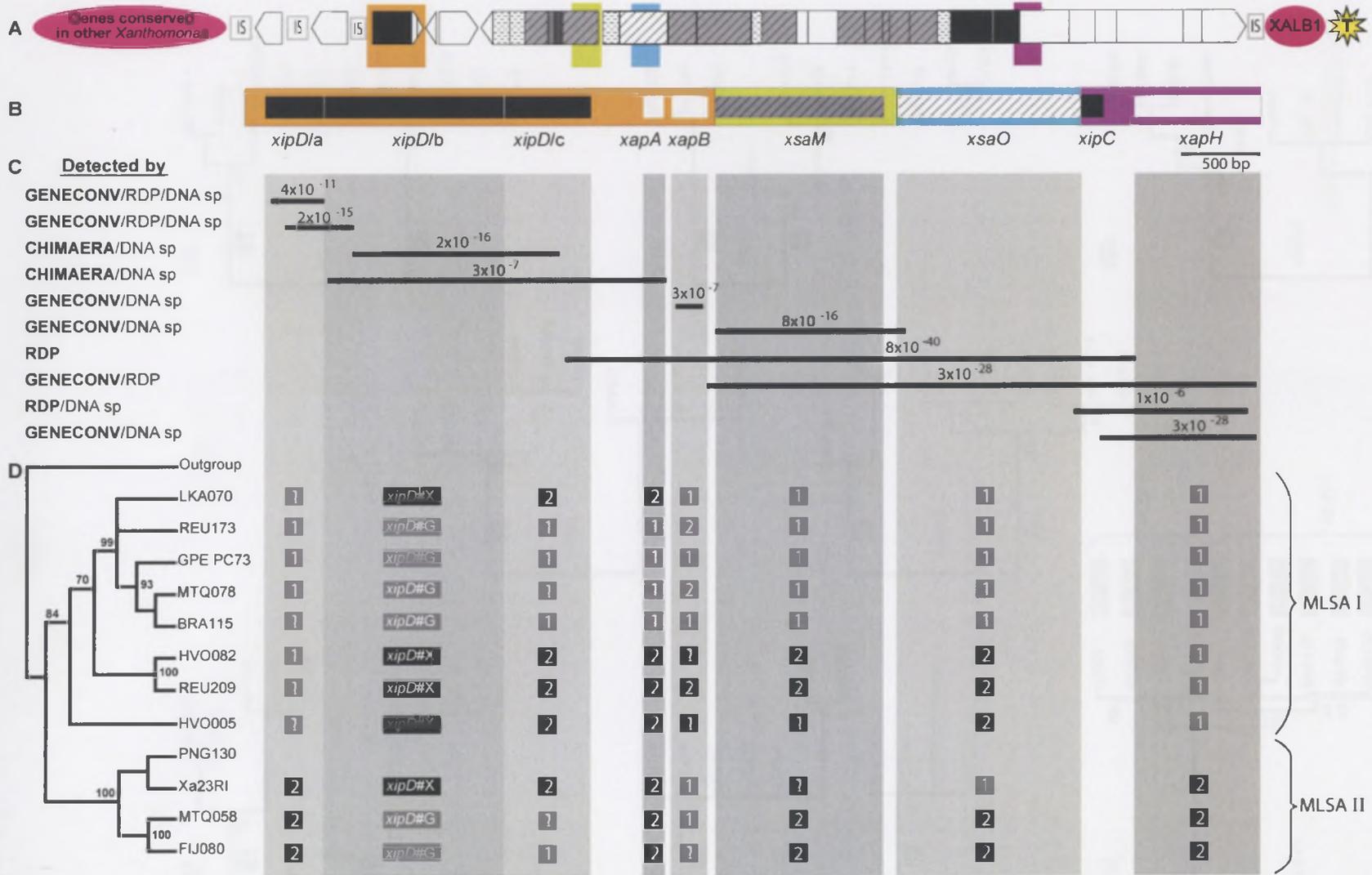
Nucleotide identity	97% (178/184)	98% (355/363)	no significant alignment	98% (546/555)
Amino acid identity		96% (116/121)	37% (119/321)	98% (181/185)
Amino acid similarity		96% (116/121)	59% (189/321)	99% (183/185)

C Comparison of *xipD* of *X. albilineans* (both allelic forms) with the orthologous *bipD* gene of *B. pseudomallei*

Nucleotide identity		no significant alignment	no significant alignment	no significant alignment
Amino acid identity		no significant alignment	no significant alignment	35% (66/185)
Amino acid similarity		no significant alignment	no significant alignment	58% (107/185)

Fig. 4





Supplemental data 1.

Sequence of primers used to amplify the T3SS SPI-1 genes of *Xanthomonas albilineans*^a

Primer name	Primer sequence-Forward	Primer sequence-Bis	T_m (°C)
TTSS1	CGGTCTTCATCGTTGGGCCT	CATCATCGGATCGTCGCCAGGAT	56
TTSS2	ATATTAATAAGCGATCTGAGCTGG	GCTTATTCAGTGCTAAATTGA	56
TTSS3	ATTATGCGAAGGCTGACCTG	GACCGTCCCGCCGGATGAAT	56
TTSS4	TGTCAGATGCACTGAAGAACG	TGACACTTCCTGCTGATTCTGATC	56
TTSS5	TCTGCAACTGCAATCCTGAC	TATCCAGACGAATAGTGTCTCCGA	56
TTSS6	GCTGGCAAAGGATGACTTG	TGCGACCTTGGCTGCATATTCGTC	56
TTSS7	CGCTTTGTTTCAGAGCTAGGG	TCGGCATGGCGCAAATCCTT	56
TTSS8	TGATTGTGGCGAGTCCATTCT	GGACAGTTGCCGTTGCCTCGA	56
TTSS9	ATCACATCGACGTTTCATGC	GCAAACATCAGATTCAGGAAC	56
TTSS10	TTCGCGACCTCGGTATATGT	AAGAATTCCACAAGCTCCT	56
TTSS11	ACGTGGTTATATAGTGCAA	ATCGTGCCATCGCTCTCGAT	56
TTSS12	ACGAATTCGCTCATTGCTT	CGGTATCACGTCCAGCCATA	56
TTSS13	GGCTGCTTGATCTGACACAAC	CCTGATATCTCGCAAGCTGC	56
TTSS14	ATTGCAGGATATTGGCATCG	GCGCCATACCGATCGGCTCA	56
TTSS15	TTCATCGTCATCACGAAAGG	GCGGCTATCCAGCATATCGAG	56
TTSS16	CATTGCCGGACCTGTATGAC	CGCGTACACCGTCTCCATCA	56
TTSS17	AGACGGAGAGGTCGAAATGA	ACACCGCCTGCTCGCAACTC	56
TTSS18	TGCGATCCAGGGAAAGATAG	CGGTACTGATTTGAGTGTGCGCC	56
TTSS19	GCCAATGACCACCTTGATG	TAATCCCATCGTACGGATGAG	56
TTSS20	TGGAAAGCGTCTTTTCTCGT	ATAGTCGGTCCACGCCGATA	56
TTSS21	GTAAGCCCGGATAGCAGTGA	CATAGACGAGCCTGAATTAATTC	56
TTSS22	GCGCTGACTGAATAGGCCAG	ATGCGCTCGTAAGCGGTGTCG	56
TTSS23	TCGTCCTGGCTCATCTCAGT	CATCCTCTTCGACACGTACGA	56
TTSS24	TACAGCACATTAAGCGGGTTC	AGCCCCATCAGCCAGACGAA	56
TTSS25	GGCACTATTCGACGAACCTC	TCCGAGCATCACGTTGCAACG	56
TTSS26	TGCACGATGGATAGCTGAAG	AGATGATGGCTGCAAATCGA	56
TTSS27	TTCAAGGCGGACGATCTGAA	ATTGCGCCCTGCCAATTAAT	56
TTSS28	CTTGCTCGAACTGCTTACCAC	ATTCTGCGTACGTTGAAATT	56
TTSS29	CCTTGCCTAGACCAGCTTTGC	AGAGTCGCATAGTCTTTAGCA	56
TTSS30	GTGGACTGGAAAAGTGATGG	AAGTGTGCGGATGAGAAAAG	56
TTSS31	AGCTGAGCTGGCAGTAAAAA	TTCATGCTGCGGTACAGTTA	56
TTSS32	TCACGCAGTGCAGTTAAAAA	TTGGCCGTAAGTAAATTTGT	56
TTSS33	AAGCCAACATGCAGGTCTAC	GTCATGAAATTCGGTGAAGC	56
TTSS34	GCTTCATGCAACTGCCTATT	CCAGGTTGAGACGTAGGTGA	56
TTSS35	AACGAGCATTGGTTCTTGTC	AAGCGATCTATGCCAATGAG	56

^a A fragment of 1.2Kbp is amplified with all primers except with primers 28 which yield a fragment of 1.9Kbp.

Sequence of primers used to amplify fragments of housekeeping genes

Gene amplified	Primer sequence-Forward	Primer sequence-Bis	T_m (°C)	Size of amplification product (bp)
<i>groEL</i>	GCAGGCGCTGATCCGCGAAG	GACTCGATCGCGGCCGTATCG	60	720
<i>dnaK</i>	CCATCGCTCAGCACGACAAC	CGTAAGGCAAGTTGACTTCGGTC	57	600
<i>gyrB</i>	CACTGCTGACCGCATTGATC	TCAAATGTGCGAGGTTGGCGACC	57	605
<i>atpD</i>	TATGGCCAGATGAACGAGCC	TCAGGCCTTTTCGGCCATC	57	795
<i>efp</i>	ATGGCCAGCTATGGCATG	CTTGACGCGGAGAAATATTC	57	594
<i>recA</i>	ATGGACGAGAACAAGAAGCG	TAGCCTCGAGGTCTTCGG	57	1036
<i>glnA</i>	GTCTGCGGAAACTATTGAGAG	CAGTTGGCGTAATACAGCTG	57	690

Sequence of primers used to screen a collection of 128 plant pathogenic bacteria for the presence of a T3SS SPI-1

Primer name	Primer sequence-Forward	Primer sequence-Bis	T_m (°C)
BSA Q	AGCTGATCGAGAGCGC	CGACTAGCTCTCGCGC	55
BSA J	TACTATCCGGGCTTACCG	TCGACATCCTCCGTAAGC	53
BSA M	TGGAACAAGCAGATCGC	TTCCATCCAGCCATGTCG	53

Supplemental data 2 : List of bacteria screened for the presence of T3SS SPI-1

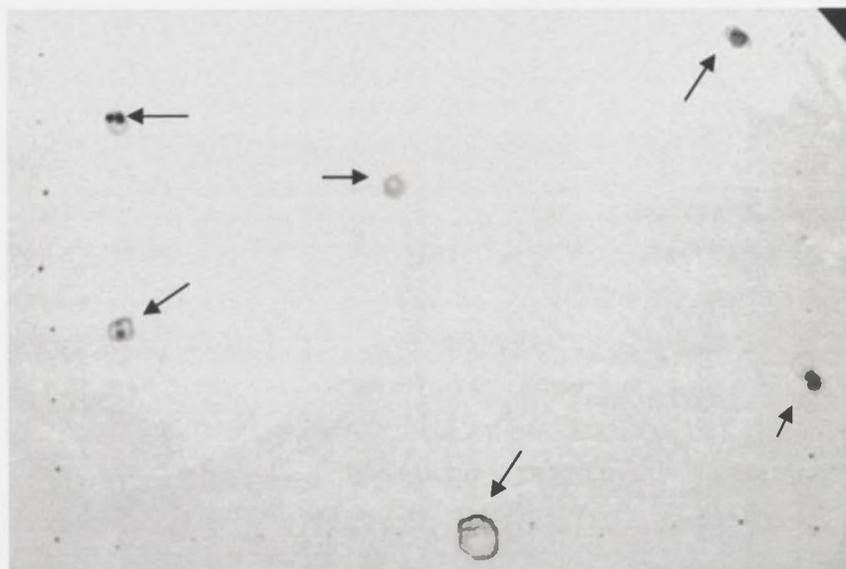
Strain	No.	Geographic origin	Host
<i>Acidovorax anthurii</i>	CFBP3232	Martinique	<i>Anthurium</i> sp.
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	CFBP2425	United States	<i>Zea mays</i>
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	CFBP1201	Réunion island	<i>Saccharum officinarum</i>
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>	CFBP2423	United States	?
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrullii</i>	CFBP4459	United States	<i>Citrullus lanatus</i>
<i>Acidovorax delafieldii</i>	CFBP2442	United States	?
<i>Acidovorax facilis</i>	CFBP2441	United States	?
<i>Acidovorax konjaci</i>	CFBP4460	Japan	<i>Amorphophallus rivieri</i> cv. <i>durieu</i>
<i>Acidovorax temperans</i>	CFBP3610	Sweden	?
<i>Acidovorax valerianellae</i>	CFBP4730	France	<i>Valerianella locusta</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	CFBP2413	?	?
<i>Burkholderia andropogonis</i>	CFBP2421	United States	<i>Sorghum vulgare</i>
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	CFBP4999	Hungary	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>betae</i>	CFBP3509	United Kingdom	<i>Beta vulgaris</i>
<i>Dickeya diffebachiae</i>	CFBP2051	United States	<i>Diffebachia</i> sp.
<i>Dickeya</i> sp.	CFBP1537	Australia	<i>Saccharum officinarum</i>
<i>Erwinia amylovora</i>	CFBP1430	France	<i>Crataegus oxyacantha</i>
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	CFBP1202	Jamaica	<i>Saccharum officinarum</i>
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	CFBP1295	Réunion island	<i>Saccharum officinarum</i>
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	CFBP1526	United Kingdom	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	CFBP2046	Denmark	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	CFBP5593	France	<i>Brassica napus</i>
<i>Pseudomonas cichorii</i>	CFBP2101	?	<i>Cichorium endivia</i>
<i>Pseudomonas corrugata</i>	CFBP2431	United Kingdom	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	CFBP1390	Canada	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	CFBP1392	United Kingdom	<i>Syringa vulgaris</i>
<i>Ralstonia solanacearum</i>	CFBP1960	Algeria	<i>Capsicum annuum</i>
<i>Xanthomonas albilineans</i>	CFBP2383	South Africa	<i>Saccharum officinarum</i>
<i>Xanthomonas albilineans</i>	CFBP7063	Guadeloupe	<i>Saccharum officinarum</i>

<i>Xanthomonas albilineans</i>	CFBP 1943	Burkina Faso	<i>Saccharum officinarum</i>
<i>Xanthomonas albilineans</i>	CFBP 1953	Guadeloupe	<i>Saccharum officinarum</i>
<i>Xanthomonas albilineans</i>	CFBP 2378	Réunion island	<i>Saccharum officinarum</i>
<i>Xanthomonas albilineans</i>	CFBP 2383	South Africa	<i>Saccharum officinarum</i>
<i>Xanthomonas albilineans</i>	CFBP 2387	Australia	<i>Saccharum officinarum</i>
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i>	CFBP 1159	United States	<i>Corylus maxima</i>
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	CFBP 1022	France	<i>Juglans regia</i>
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	CFBP 3894	New Zealand	<i>Prunus salicina</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	CFBP 4924	Colombia	<i>Axonopus scoparius</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>alfalfae</i>	CFBP 2624	Réunion island	<i>Manihot esculenta</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>allii</i>	CFBP 6369	Réunion island	<i>Allium cepa</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i>	CFBP 3528	Argentina	<i>Citrus limon</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	CFBP 2524	New Zealand	<i>Begonia</i> sp.
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	CFBP 2487	France	Begonia × Eliator Rieger
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	CFBP 3369	United States	<i>Citrus</i> sp.
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citrumelo</i>	CFBP 3371	?	<i>Citrus</i> sp.
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	CFBP 2526	Sudan	<i>Glycine hispida</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	CFBP 1559	France	<i>Glycine hispida</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	CFBP 2530	Sudan	<i>Gossypium hirsutum</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	CFBP 2012	Burkina Faso	<i>Gossypium hirsutum</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	CFBP 2603	Colombia	<i>Manihot esculenta</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> (GL1)	CFBP 2534	United States	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> (GL1)	CFBP 2626	Réunion island	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> (GL1)	CFBP 6164	Romania	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> (GL1)	CFBP 6982	Réunion island	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> (GL1)	CFBP 6983	Réunion island	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> (GL1)	CFBP 6984	Réunion island	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> (GL1)	CFBP 6987	United States	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> (GL2)	CFBP 6989	Réunion island	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> (GL2)	CFBP 6990	Réunion island	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> (GL2)	CFBP 6991	Réunion island	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> (GL3)	CFBP 6992	Réunion island	<i>Phaseolus vulgaris</i>

<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> (GL3)	CFBP6993	Réunion island	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> (GL3)	CFBP6994	Tanzania	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> (GL3)	CFBP6995	Réunion island	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> (GL3)	CFBP6996	Réunion island	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> (GL3)	CFBP6997	Réunion island	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> variant <i>fuscans</i>	CFBP4834	France	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> variant <i>fuscans</i>	CFBP6165	Canada	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> variant <i>fuscans</i>	CFBP6167	United States	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> variant <i>fuscans</i>	CFBP6964	Tanzania	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> variant <i>fuscans</i>	CFBP6965	Tanzania	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> variant <i>fuscans</i>	CFBP6969	Tanzania	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> variant <i>fuscans</i>	CFBP6970	United States	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> variant <i>fuscans</i>	CFBP6972	Tanzania	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> variant <i>fuscans</i>	CFBP6975	France	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> variant <i>fuscans</i>	CFBP6976	Switzerland	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> variant <i>fuscans</i>	CFBP6979	Tanzania	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>	CFBP5822	Australie	<i>Saccharum officinarum</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>	CFBP5823	Mauritius	<i>Saccharum officinarum</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>	CFBP5830	Malaysia	<i>Saccharum officinarum</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>	CFBP5831	South Africa	<i>Saccharum officinarum</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>	CFBP1215	Kenya	<i>Saccharum officinarum</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>	CFBP1289	Réunion island	<i>Saccharum officinarum</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>	CFBP5694	Réunion island	<i>Zea mays</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>	CFBP5695	Réunion island	<i>Tripsacum laxum</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>	CFBP5696	Réunion island	<i>Thysanolena maxima</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>	CFBP5698	Trinidad	<i>Saccharum officinarum</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	CFBP5618	United States	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	CFBP2484	Guadeloupe	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	JP71	Guadeloupe	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	JP72	Guadeloupe	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	CFBP3271	Guadeloupe	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	CFBP3272	Guadeloupe	<i>Lycopersicon esculentum</i>

<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	75-3	?	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	CFBP6805	Argentina	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	CFBP6806	Spain	<i>Capsicum annuum</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	CFBP6817	Thailand	?
<i>Xanthomonas bromi</i>	CFBP1976	France	<i>Bromus carinatus</i>
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>armoraciae</i>	CFBP5824	United States	<i>Armoracia rusticana</i>
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>armoraciae</i>	756C	?	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	CFBP5241	United Kingdom	<i>Brassica oleracea</i>
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>incanae</i>	CFBP1371	France	<i>Matthiola incana</i>
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>incanae</i>	CFBP2527	United States	<i>Matthiola incana</i>
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i>	CFBP5827	United States	<i>Raphanus sativus</i>
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i>	CFBP5828	United States	<i>Raphanus sativus</i>
<i>Xanthomonas cassavae</i>	CFBP4642	Malawi	<i>Manihot esculenta</i>
<i>Xanthomonas codiae</i>	CFBP4690	United States	<i>Codiacum variegatum</i>
<i>Xanthomonas cucurbitae</i>	CFBP2542	New Zealand	<i>Cucurbita maxima</i>
<i>Xanthomonas cynarae</i>	CFBP4188	France	<i>Cynara scolymus</i>
<i>Xanthomonas fragariae</i>	CFBP6766	United States	<i>Fragaria</i> sp.
<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>hederae</i>	CFBP5858	United States	<i>Hedera helix</i>
<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	CFBP2533	New Zealand	<i>Pelargonium peltatum</i>
<i>Xanthomonas hyacinthi</i>	CFBP1156	The Netherlands	<i>Hyacinthus orientalis</i>
<i>Xanthomonas melonis</i>	CFBP4644	Brazil	<i>Cucumis melo</i>
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	CFBP2532	India	<i>Oryza sativa</i>
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	CFBP2286	?	<i>Oryza sativa</i>
<i>Xanthomonas pisi</i>	CFBP4643	Japan	<i>Pisum sativum</i>
<i>Xanthomonas populi</i>	CFBP1817	France	<i>Populus euramericana</i>
<i>Xanthomonas sacchari</i>	CFBP4641	Guadeloupe	<i>Saccharum officinarum</i>
<i>Xanthomonas</i> sp. "false red stripe"	XfsBRA69	Brazil	<i>Saccharum officinarum</i>
<i>Xanthomonas theicola</i>	CFBP4691	Japan	<i>Camellia sinensis</i>
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>graminis</i>	CFBP3524	Switzerland	<i>Dactylis glomerata</i>
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>poae</i>	CFBP2057	Switzerland	<i>Poa</i> sp.
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>secalis</i>	CFBP2539	Canada	<i>Secale cereale</i>
<i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>holcicola</i>	CFBP2543	New Zealand	<i>Sorghum vulgare</i>

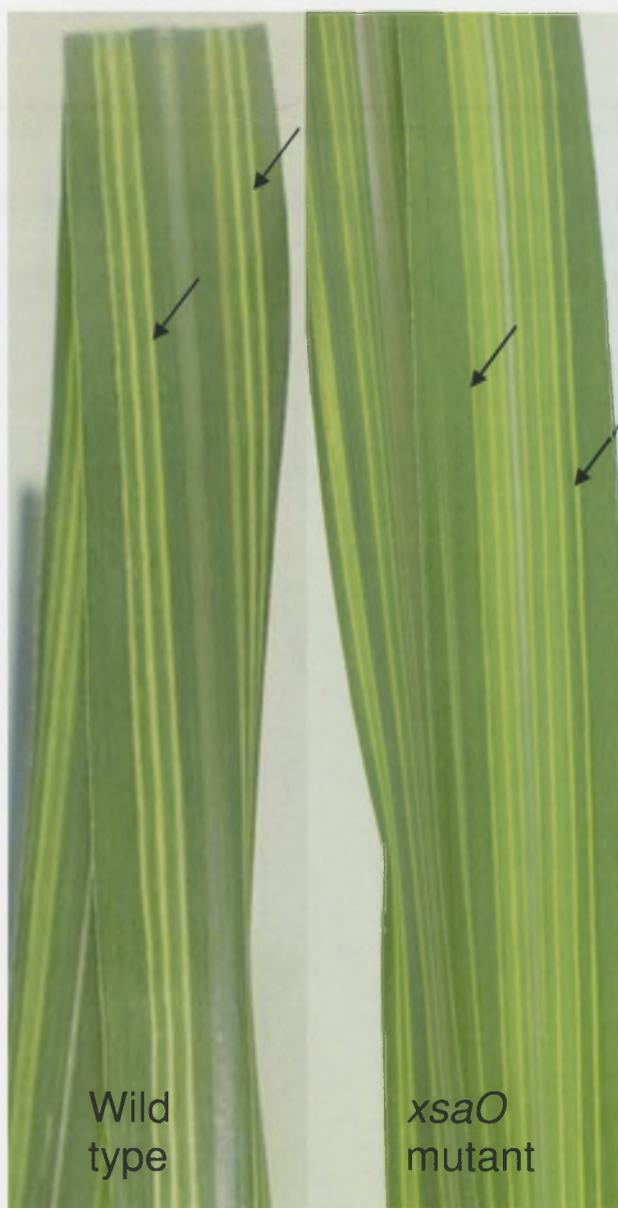
<i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>musacearum</i>	CFBP7122	Ethiopia	<i>Musa</i> sp.
<i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>musacearum</i>	CFBP7123	Ethiopia	<i>Ensete ventricosum</i>
<i>Xylophilus ampelinus</i>	CFBP1192	Crete	<i>Vitis vinifera</i>

Supplemental data 3. Result of a dot-blot hybridization experiment.

Result of a dot-blot hybridization experiment performed to analyse the distribution of the T3SS SPI-1 gene cluster among strains representing the main genera of plant pathogenic bacteria (bacteria listed in supplemental data 2). The nylon membrane was hybridized with a probe corresponding to the *bsaM* gene found in *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (supplemental data 1) (Alavi et al., 2008). The experiment was carried out as described by Hajri et al. (2009). Black spots (arrows) reveal the presence of homologous DNA fragments of *bsaM* (T3SS SPI-1). Signals were observed only with strains of *X. albilineans* and strains belonging to genetic lineage 1 of *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, as defined by Alavi et al. (2008).

Supplemental data 4. Assessment of the importance of the T3SS SPI-1 in symptom expression and capacity of *X. albilineans* to colonize sugarcane stalks.

A., Leaf scald symptoms caused by *Xanthomonas albilineans* wild type strain GPE PC73 and a *xsaO* mutant of strain GPE PC73, 4 weeks after inoculation of sugarcane cultivar CP68-1026. Black arrows indicate the pencil-line leaf stripes characteristic of the disease.



B., Pathogenicity of *Xanthomonas albilineans* wild type strain GPE PC73 and three *xsaO* mutant isolates of strain GPE PC73, expressed as production of symptoms (pencil-line leaf stripes) and colonization of the sugarcane stalk (colonized internodes).

Strain	Number of pencil-line stripes per leaf (see A.)*	Number of colonized internodes /total number of internodes**
Wild type strain GPEPC73	8	16/19 (84%)
<i>xsaO</i> mutant isolate 1	10	15/19 (79%)
<i>xsaO</i> mutant isolate 2	8	15/20 (75%)
<i>xsaO</i> mutant isolate 3	10	21/23 (91%)

Control plants inoculated with water were symptomless and free of the pathogen 4 months after inoculation.

*: 3 leaves were sampled for each of the 6 inoculated stalks. Data are the means of 18 leaves per strain or isolate.

** : 3 to 4 internodes that developed in the upper part of the stalk after inoculation were sampled for each of the 6 inoculated stalks.

Supplemental data 5.

Amino acid BLAST alignment of the two allelic forms of *xipD* (*xipD-G* and *xipD-X*, respectively). Green-highlighted alignment corresponds to the *xipD/a* part. Yellow-highlighted alignment corresponds to the *xipD/b* part. Grey-highlighted alignment corresponds to the *xipD/c* part.

Residues in red are identical in the amino acid BLAST alignment of the two allelic forms of *xipD* and the gene *bipD* of *Burkholderia pseudomallei* strain K96243.

<i>xipD-G</i>	1	MKPLESMIQRATPTSEPYAMVRATTKSSTHAPHTSGANHSDDIAPVQHLQSNGRVSDVLR	60
<i>xipD-X</i>	1	MKPLESMIQRATPTSEPYAMVRAT KSS APHTSGANHSDDIAPVQHLQSNGRVSDVLR	60
<i>xipD-G</i>	61	EATRVAVGLLPDADELRELDMTSLGKAGDIVORVVNDAATGNVHNLAFALKMQSEARAL	120
<i>xipD-X</i>	61	EATRVAVGLLPDADELRELDMTSLGKAGDIVORVVNDAATGN HNLAFALKMQSEARAL	120
<i>xipD-G</i>	121	ISNISVGISN-----LTASIPTTSVVGYH-----LGGAASSNL-	154
<i>xipD-X</i>	121	NI I N L + T S + + LG +ASS	180
<i>xipD-G</i>	155	-----TPSQVDAIVINTLEDLKTFTYQYAKDYATLKYTYIAEYGE	193
<i>xipD-X</i>	181	TP+ VDAI IN+LEDLK +Y QYA DY L YI EY E	240
<i>xipD-G</i>	194	SDPESCEEQLDAFAHRYAKPLYINAGINPAYVSLSLGDTFVVSDVNLQKGNQYQYSINA	253
<i>xipD-X</i>	241	+DP C E+L FA +Y+ PL +NAGI+PAY ++LG + +S++NLP KG ++ Y ++	300
<i>xipD-G</i>	254	ASLADLERREKFIQLHTDATDAHAIWGAV---TRNVTISLRQAEESL---RQLEAASQN	307
<i>xipD-X</i>	301	ASL F ++L D DA +W A R+ + E L +++++S+	360
<i>xipD-G</i>	308	TYQVT---ENLPDNL SFYKITQ NADGSYTVKASQKFLDAINVFNQYVNAWKEK-----	357
<i>xipD-X</i>	361	V+ ENLPD FY + + G Y V+ S KF ++ Y+ AW++K	417
<i>xipD-G</i>	358	DYPPDKSTGVGAAAEELAGLWVAEWGAPGHDTLEQQ-WVNVIQNGAIIDFDALPVPDPDN	416
<i>xipD-X</i>	418	D D+ + G E A A+ G+ +++ Q W++ I A++ ++ D	476
<i>xipD-G</i>	417	VSAEIDSLIRSDAAVYGGGLQTVTSNAKAGIIDPYGSL LQEYMQYVQSITDLLSNLSKYVT	476
<i>xipD-X</i>	477	+ +IDSL RSDAA YGGL+T S AKA IIDPYGSL LQEYMQYVQSITDLLSNLSKYVT	536
<i>xipD-G</i>	477	ASGDGTTVNFKADDLKSVIN DMLKEGAPFKEWSLTLPGTSSLSASDWKQELSGNFNVTQN	536
<i>xipD-X</i>	537	ASGDGTTVNFKADDLKSVINMLKE APFKEWSLTLPGTSSLSASDWKQELSGNFNVTQN	596
<i>xipD-G</i>	537	ADGTTISLDLSNLEAMRDSLSNYSNGDISVTQYNAWYAGFTGQKDNVMNLSQSIAEKFS	596
<i>xipD-X</i>	597	ADGTTISLDLSSLEAMRDSLSNYSNGDISVTQYNAWYAGFTGQKDNVMNLSQSIAEKFS	656
<i>xipD-G</i>	597	RMNSEFDNLVQLMSSAISALLESEEKYLQF	626
<i>xipD-X</i>	657	RMNSEFDNLVQLMSSAISALLESEEKYLQF	686

Supplemental data 6.

Characteristics of the 12 strains of *Xanthomonas albilineans* used in this study.

Strain	Origin	Authors	PFGE group
LKA070	Sri Lanka	A.C. Hayward (1962)	G
REU173	Réunion-France	J-C. Girard (1995)	D
GPE PC73	Guadeloupe-France	P. Champoiseau (2002)	B
MTQ078	Martinique-France	J.A. Spencer (1957)	B
BRA115	Brazil	C.O.N. Cardoso (1993)	B
HVO082	Burkina faso	M. Granier (1989)	C
REU209	Réunion-France	J-C. Girard (1995)	J
HVO005	Burkina faso	M. Chatenet (1980)	F
PNG130	Papua New Guinea	M. Chatenet (1993)	H
Xa23R1	Florida-USA	M.J. Davis (1993)	A
MTQ058	Martinique-France	P. Rott (1989)	I
FIJ080	Fiji	D.W. Dye (1961)	E

Supplemental data 7: Distribution of substitutions in the coding sequences of the T3SS SPI-1 in 11 strains of *X. albilineans*

A., Coding sequence *xsaO* (1164 bp); $\omega = 0.113$; P -value = 8 E-06 (Negative selection)

MLSA group	Strain name	Synonymous (S) or non synonymous substitution (NS) and position in the coding sequence												
		S 150	NS 191	S 210	S 435	NS 511	S 663	NS 839	NS 840	S 960	S 1026	S 1035	S 1038	S 1077
I	LKA070	X	X	x	X			x	x	X	x	X	X	X
	REU173	X	X	x	X			x	x	X	x	X	X	X
	PC73	X	X	x	X			x	x	X	x	X	X	X
	MTQ078	X	X	x	X			x	x	X	x	X	X	X
	BRA115	X	X	x	X			x	x	X	x	X	X	X
	HVO082						x							
	REU209						x							
	HVO005						x							
II	Xa23R1	X	X		X		x			X				
	MTQ058											X	X	X
	FIJ080											X	X	X

Grey cell: synonymous substitutions; x: substitutions probably not acquired by recombination; X: substitutions evidently acquired by recombination (due to their presence in both MLSA groups).

B., Coding sequence *xipD/a* (363 bp); $\omega = 0.252$; P -value = 0,0158 (Negative selection)

MLSA group	Strain name	Synonymous (S) or non synonymous substitution (NS) and position in the coding sequence											
		S 39	S 48	NS 74	NS 85	NS 88	S 93	S 153	NS 214	NS 311	S 345	S 357	S 360
I	LKA070											X	X
	REU173												
	PC73												
	MTQ078												
	BRA115												
	HVO082											X	X
	REU209											X	X
	HVO005											X	X
II	Xa23R1	x		x	x	x	x	x	x	x			X
	MTQ058	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
	FIJ080	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		

Grey cell: synonymous substitutions; x: substitutions probably not acquired by recombination; X: substitutions evidently acquired by recombination (due to their presence in both MLSA groups).

C., Coding sequence *xipD/c* (555 bp); $\omega = 0.456$; P -value = 0,1512 (Neutral selection)

MLSA group	Strain name	Synonymous (S) or non synonymous substitution (NS) and position in the coding sequence													
		S 9	NS 10	S 30	NS 127	S 148	S 150	S 162	NS 182	S 186	NS 287	NS 323	NS 331	S 345	NS 415
I	LKA070		X	X		X			X	X		X			
	REU173							x			x				
	PC73							x							
	MTQ078							x							
	BRA115							x							
	HVO082	x	X	X		X			X	X		X			X
	REU209	x	X	X		X			X	X		X			X
	HVO005	x	X	X	x	X			X	X		X			
II	Xa23R1	x	X	X		X			X	X		X			X
	MTQ058							x					x	x	
	FLJ080							x					x	x	

Grey cell: synonymous substitutions; x: substitutions probably not acquired by recombination; X: substitutions evidently acquired by recombination (due to their presence in both MLSA groups).

D., Coding sequence *xsaM* (1061 pb); $\omega = 0.826$; P -value = 0.6825 (Neutral selection)

MLSA Group	Strain name	Synonymous (S) or non synonymous substitution (NS) and position in the coding sequence																						
		NS 22	NS 29	NS 51	NS 112	S 156	NS 209	NS 211	S 267	NS 295	NS 323	NS 337	NS 341	NS 401	S 414	NS 677	S 804	NS 874	S 942	NS 951	S 972	NS 1001	NS 1039	NS 1041
I	LKA070		x		x	x		x		x		x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x
	REU173		x		x	x		x		x		x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x
	PC73		x		x	x		x		x		x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x
	MTQ078		x	x	x	x		x		x		x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x
	BRA115		x		x	x		x		x		x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x
	HVO082	x						x				x						x						
	REU209	x						x				x						x						
	HVO005																							
II	Xa23R1								x															
	MTQ058																							
	FIJ080																							

Grey cell: synonymous substitutions; x: substitutions probably not acquired by recombination; X: substitutions evidently acquired by recombination (due to their presence in both MLSA groups).

E., Coding sequence *xapH* (798 bp); $\omega = 4.552$; P-value = 0.2073 (Positive selection)

MLSA group	Strain name	Synonymous (S) or non synonymous substitution (NS) and position in the coding sequence																				
		NS 42	NS 110	NS 116	NS 140	NS 151	NS 161	NS 167	NS 190	NS 198	NS 227	NS 237	NS 257	NS 286	NS 353	NS 437	NS 439	S 516	NS 591	NS 700	NS 724	
I	LKA070																					
	REU173																					
	PC73		x																			
	MTQ078		x																			
	BRA115		x																			
	HVO082																					
	REU209																					
	HVO005																					
II	Xa23R1	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x		
	MTQ058	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	
	FIJ080	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	

Grey cell: synonymous substitutions; x: substitutions probably not acquired by recombination; X: substitutions evidently acquired by recombination (due to their presence in both MLSA groups).

F., Coding sequence *xapA* (147 bp); $\omega = 0.248$; P -value = 0.0125 (Neutral selection)

MLSA group	Strain name	Synonymous (S) or non synonymous substitution (NS) and position in the coding sequence		
		S 90	NS 116	NS 132
I	LKA070			
	REU173		x	x
	PC73			x
	MTQ078			x
	BRA115			x
	HVO082			
	REU209			
	HVO005			
II	Xa23R1			
	MTQ058	x		
	FIJ080	x		

Grey cell: synonymous substitutions; x: substitutions probably not acquired by recombination; X: substitutions evidently acquired by recombination (due to their presence in both MLSA groups).

G., Coding sequence *xapB* (231 bp); $\omega = 1.956$; P -value = 0.6825 (Neutral selection)

MLSA group	Strain name	Synonymous (S) or non synonymous substitution (NS) and position in the coding sequence										
		NS	NS	NS	NS	S	S	NS	NS	NS	NS	
		2	8	49	74	90	123	130	139	146	173	176
I	LKA070						x					
	REU173											
	PC73											
	MTQ078								x			
	BRA115											
	HVO082	X	X	x	x	x		x		x	x	x
	REU209	X	X	x	x	x		x		x	x	x
	HVO005	X	X	x	x	x		x		x	x	x
II	Xa23R1	X	X									
	MTQ058											
	FIJ080											

Grey cell: synonymous substitutions; x: substitutions probably not acquired by recombination; **X**: substitutions evidently acquired by recombination (due to their presence in both MLSA groups).

3 Conclusion et perspectives

Le séquençage et l'analyse du génome de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* ont permis (i) de confirmer l'absence de SST3 Hrp chez cette bactérie et (ii) de mettre en évidence la présence d'un SST3 SPI-1. Suite à nos analyses, il s'est avéré que le SST3 SPI-1 de *X. albilineans* présente des similarités avec le SST3 SPI-1 de *B. pseudomallei* et qu'il est complet et potentiellement fonctionnel. Parmi les gènes conservés chez *B. pseudomallei*, seul le gène *xipD* qui code une protéine du translocon présente une particularité spécifique à *X. albilineans*. Dans le but de proposer des hypothèses sur le rôle de ce SST3 SPI-1 dans le cycle de vie de *X. albilineans*, nous avons réalisé (i) une étude *in silico* comportant des analyses de phylogénie, de recombinaison et de sélection de ce système au sein de souches représentatives de la diversité de *X. albilineans*, (ii) le criblage d'une collection de 128 bactéries phytopathogènes pour la présence du SST3 SPI-1 de *X. albilineans* et (iii) une étude fonctionnelle du SST3 SPI-1 chez *X. albilineans* pour tenter de mettre en évidence un rôle *in planta*.

Afin de déterminer si le SST3 SPI-1 est conservé au sein de l'espèce *X. albilineans*, nous avons amplifié par PCR puis séquencé l'ensemble de la région contenant le SST3 SPI-1 chez la souche Xa23R1 appartenant au groupe génétique PFGE A qui est différent de celui de la souche GPE PC73 (PFGE B). Tous les gènes identifiés chez la souche GPE PC73 sont conservés chez la souche Xa23R1, ce qui suggère que le SST3 SPI-1 est maintenu au sein de l'espèce *X. albilineans*. Par ailleurs, le gène *xipD* de Xa23R1, bien que présentant lui aussi une particularité spécifique à *X. albilineans*, est très différent du gène *xipD* codé par la souche GPE PC73. Pour compléter notre étude, nous avons amplifié par PCR et séquencé cinq régions réparties sur le cluster de gènes T3SS SPI-1 chez neuf souches représentatives de la diversité génétique de *X. albilineans*. L'analyse des séquences obtenues suggère également que le SST3 SPI-1 est maintenu au sein de l'espèce *X. albilineans*. Cette analyse a également permis de mettre en évidence plusieurs sites de recombinaison, notamment au niveau du gène *xipD*. Ces recombinaisons résulteraient de multiples transferts latéraux du SST3 SPI-1 au sein des ancêtres des souches de *X. albilineans*,

ou entre ces ancêtres et une bactérie se multipliant dans le même environnement que *X. albilineans*.

Chez *Salmonella enterica* sv. *typhimurium*, la protéine codée par *xipD* est impliquée dans la reconnaissance et l'attachement de la bactérie aux cellules animales. Chez *X. albilineans*, la protéine codée par le gène *xipD* qui présente une particularité spécifique pourrait être impliquée dans la reconnaissance et l'attachement à une cellule particulière. La présence de deux formes alléliques de *xipD* chez les souches de *X. albilineans* serait alors liée à la reconnaissance et à l'attachement à deux types de cellules animales.

Le criblage de 128 bactéries phytopathogènes, dont certaines sont transmises par des insectes, n'a permis de révéler la présence du SST3 SPI-1 que chez *X. albilineans* et *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. L'utilisation d'amorces spécifiques du SST3 SPI-1 de *X. albilineans* n'a conduit à l'amplification par PCR que de quelques gènes chez *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Ce résultat est peut-être lié à un polymorphisme entre les deux espèces au niveau des gènes qui n'ont pas été amplifiés. Le séquençage du génome complet d'une souche de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* possédant le SST3 SPI-1 sera nécessaire pour déterminer si le SST3 est maintenu chez cette espèce. La présence d'un même SST3 SPI-1 chez deux espèces de *Xanthomonas* phylogénétiquement éloignées pose des questions sur l'origine de ce cluster de gènes. Un transfert latéral a-t-il eu lieu entre les deux espèces ? Les deux espèces ont-elles acquis ce SST3 SPI-1 par un échange de matériel avec une même bactérie tiers ? Le SST3 SPI-1 a-t-il une origine ancestrale et a-t-il été perdu chez les autres espèces de *Xanthomonas* ?

L'inoculation de plants de canne à sucre avec une souche de *X. albilineans* mutée au niveau du SST3 SPI-1 a permis de montrer que le SST3 SPI-1 de *X. albilineans* n'est pas impliqué dans les mécanismes moléculaires permettant à la bactérie de se multiplier dans la canne à sucre et d'induire des symptômes foliaires.

Le maintien du SST3 SPI-1 chez *X. albilineans* est un argument en faveur de l'implication passée ou présente d'un tel système dans le cycle de vie de la bactérie. Une des fonctions les plus probables reste un rôle dans des interactions avec un vecteur animal, plus vraisemblablement un insecte. Une association de *X. albilineans* avec un tel hôte pourrait jouer un rôle important dans la dissémination de la bactérie et

dans son écologie. Pour confirmer cette hypothèse, un criblage à grande échelle de vecteurs potentiels de *X. albilineans* sera nécessaire.

Chapitre 3
Etude du rôle des gènes NRPS

1 Introduction

Le troisième chapitre de cette thèse est consacré à l'étude du rôle des "NonRibosomal Peptide Synthetases" (NRPS) dans la pathogénie de *X. albilineans*. Le génome de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* comporte 12 gènes codant des enzymes NRPS. Au total, ces gènes NRPS représentent 4% de la taille du génome de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* (Pieretti et al. 2009). Cette étude a été élargie à une souche africaine de *X. oryzae* pv. *oryzae* qui possède un des clusters de gènes NRPS de la souche GPE PC73 de *X. albilineans*.

1.1 Métabolites secondaires : définitions et généralités

Les plantes et les micro-organismes produisent de très nombreuses petites molécules aux structures variées. Plus de 100 000 substances naturelles sont répertoriées et il en existe peut-être cinq fois plus. Ces petites molécules biologiques peuvent être divisées en deux catégories : les métabolites primaires et les métabolites secondaires. Alors que l'on retrouve les métabolites primaires (nucléotides, acides aminés naturels, sucres simples, etc...) et leurs polymères (acides nucléiques, protéines, mais également cellulose et lignine chez les plantes) dans toute cellule vivante, les métabolites secondaires sont spécifiques d'un petit nombre d'espèces.

Les métabolites secondaires ont plusieurs caractéristiques :

- ils ne sont pas indispensables à la croissance de l'organisme qui les synthétise,
- ils sont produits en faible quantité,
- ils possèdent des structures et activités biologiques diverses,
- ils sont souvent actifs sous forme de mélange de molécules structurellement très proches et appartenant à une même famille chimique,
- ils possèdent des voies de biosynthèse propres,
- leur biosynthèse est dirigée par un ensemble de gènes souvent associés à des gènes de régulation et de résistance,
- ils sont généralement produits par un nombre limité d'organismes,
- ils exercent généralement leur activité biologique sur un ou plusieurs autres organismes.

1.2 Les peptides non ribosomaux : diversité et rôles possibles dans la pathogénie

1.2.1 La biosynthèse non ribosomale source de diversité

Un grand nombre de métabolites secondaires dérive de peptides dont la diversité de structure est due, en partie, à la présence de résidus non protéinogènes (c'est-à-dire différents des 20 acides aminés constitutifs des protéines). Plus de 300 résidus non protéinogènes ont été identifiés à ce jour (Ackerley et al. 2003). L'incorporation de résidus non protéinogènes est observée chez des micro-organismes comme les bactéries et les champignons qui possèdent des mégaenzymes nommées NRPS ("NonRibosomal Peptide Synthetase"). Ces enzymes sont modulaires, multifonctionnelles, de très grande taille et catalysent la biosynthèse de peptides. Un peptide non ribosomal est donc composé d'une succession d'acides aminés protéinogènes ou non protéinogènes. La particularité de ce peptide est son mode de biosynthèse qui ne fait pas intervenir la machinerie cellulaire classique de transcription et de traduction.

Par rapport à la biosynthèse peptidique classique, les enzymes NRPS présentent l'avantage d'incorporer des substrats non protéinogéniques, contribuant largement à la diversité structurale des molécules que ces mégasynthétases produisent. Grâce aux travaux de biochimie structurale qui ont révélé le fonctionnement des différents domaines fonctionnels des NRPS, aux études biochimiques des divers produits synthétisés et aux données de séquence des différents NRPS, le mode d'action de ces mégaenzymes complexes est peu à peu élucidé.

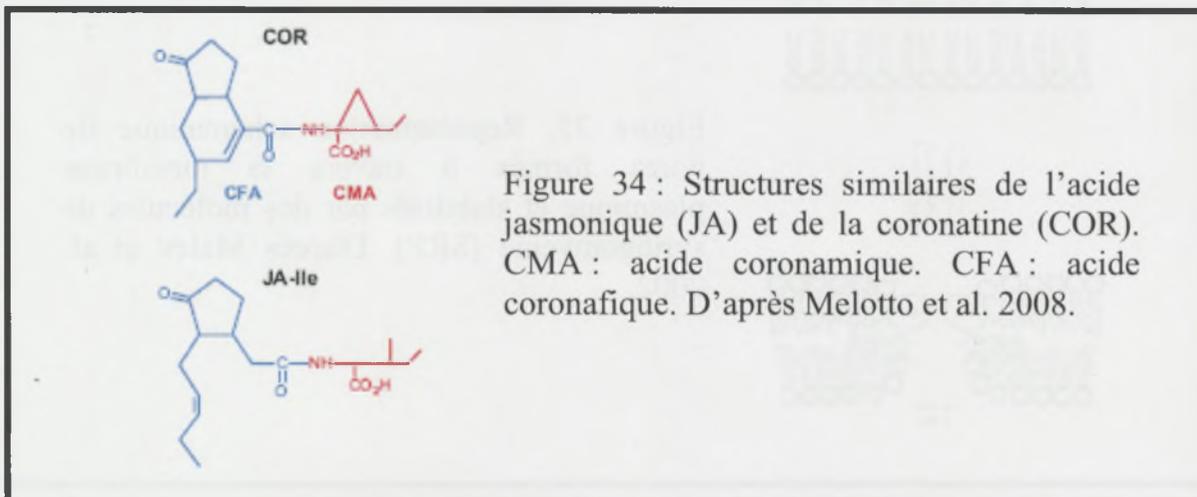
Les enzymes NRPS sont souvent associées à une autre famille de mégaenzymes modulaires nommées PKS ("PolyKetide Synthase"). Ces enzymes PKS ont un mode de fonctionnement très similaire aux NRPS et peuvent intervenir dans les mêmes voies de biosynthèse que les NRPS. Les PKS sont responsables de la biosynthèse de polycétides. Un produit dont la biosynthèse fait intervenir à la fois des PKS et des NRPS est une molécule hybride appelée polycétide-peptide. Les enzymes PKS contribuent également à la diversité structurale des produits synthétisés par les NRPS.

1.2.2 Les phytotoxines

On sait que de nombreuses phytotoxines produites par voie non ribosomale jouent des rôles déterminants dans la pathogénie de bactéries phytopathogènes. *P. syringae*, une bactérie possédant un large spectre d'hôte, produit une grande variété de phytotoxines. Ces phytotoxines peuvent avoir des propriétés variées qui permettent à la bactérie d'attaquer plus aisément sa plante hôte. Voici quelques exemples de phytotoxines connues :

1.2.2.1 La coronatine

La plus originale de ces phytotoxines, de par sa structure et son mode d'action, est sûrement la coronatine. La biosynthèse de cette petite molécule fait intervenir non seulement des NRPS mais également des PKS. La coronatine est produite par plusieurs pathovars de *P. syringae*. Cette toxine induit une chlorose et joue un rôle majeur dans la virulence en facilitant l'entrée de la bactérie dans la plante hôte. La toxine est composée d'acide coronamique (CMA) qui est lié au substrat polycétide nommé acide coronafique (CFA). Ces deux composantes de la toxine ont de fortes ressemblances avec respectivement l'éthylène et l'acide jasmonique (Figure 34). La coronatine a donc un impact sur les voies de signalisation liées à ces deux hormones qui interviennent dans les mécanismes de défense de la plante (Nomura et al. 2005). Il a récemment été montré que la coronatine conditionne la réouverture des stomates pour permettre l'invasion de la plante hôte (Melotto et al. 2008).



1.2.2.2 La syringoline

La syringoline est une autre molécule hybride peptide-polycétide produite par *P. syringae*. La syringoline peut à la fois jouer le rôle de facteur de virulence chez le pois (plante hôte de *P. syringae* ; Groll et al. 2008) et être reconnue comme éliciteur chez le riz (Waspi et al. 1998). Il a été montré *in vitro* que la syringoline provoque une inhibition irréversible du protéasome (Groll et al. 2008). Le mode d'action de la syringoline *in planta* reste inconnu. Le protéasome jouant un rôle important dans la régulation de l'expression des protéines de défense, la syringoline pourrait agir directement ou indirectement sur les mécanismes de défense en inhibant le protéasome chez la plante hôte de *P. syringae* (le pois). Il n'est pas exclu que la syringoline se fixe également sur une autre protéine cible directement impliquée dans les mécanismes de défense (Groll et al. 2008).

1.2.2.3 La syringomycine

La syringomycine est un lipopeptide cyclique produit par la plupart des souches de *P. syringae* pv. *syringae*. Les propriétés amphipatiques de la syringomycine facilitent l'insertion de la toxine dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique, induisant la formation de pores perméables aux cations et provoquant une nécrose des tissus végétaux (Hutchison et al. 1995; Hutchison et Gross 1997; Lindow et Brandl 2003).

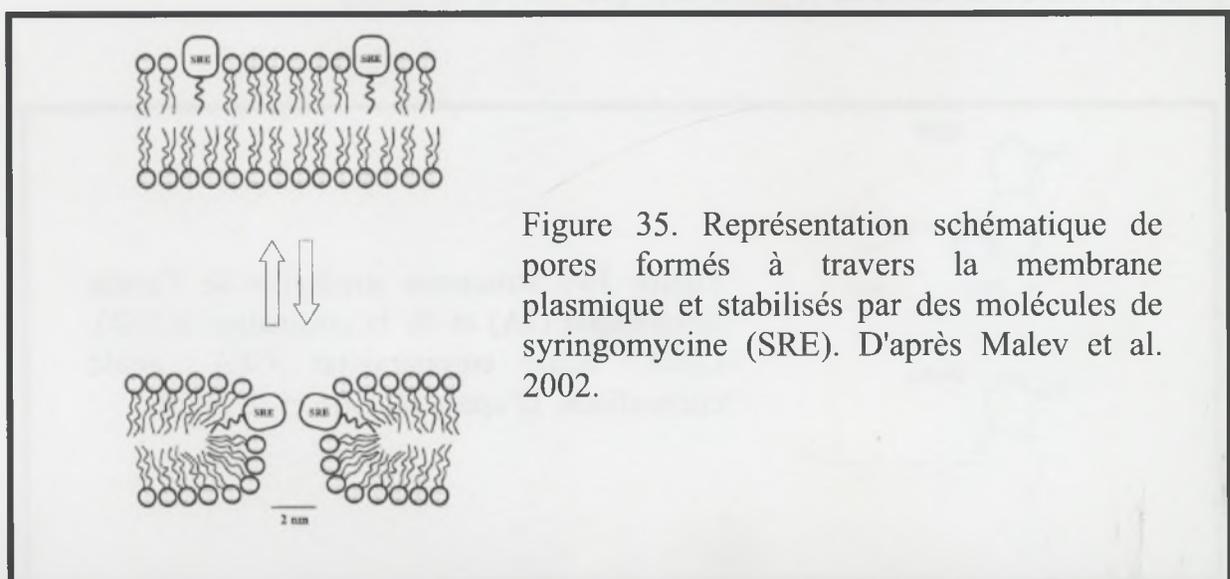


Figure 35. Représentation schématique de pores formés à travers la membrane plasmique et stabilisés par des molécules de syringomycine (SRE). D'après Malev et al. 2002.

Les propriétés surfactantes de la syringomycine joueraient également un rôle important dans la dissémination de la bactérie sur la plante en réduisant la tension superficielle de l'eau et en concentrant les quelques rares nutriments à l'interface avec le solvant (Hutchison et al. 1995; Hutchison et Gross 1997). La syringomycine, de par ses propriétés antimicrobiennes, contribue également à la pathogénie de *P. syringae* en éliminant les micro-organismes concurrents notamment lors de la phase épiphyte de la bactérie.

1.2.2.4 La tabtoxine

La tabtoxine est un β -lactame monocyclique produit par les pathovars *tabaci*, *coronafaciens* et *garcae* de *P. syringae* (Kinscherf et Willis 2005). La tabtoxine est associée aux symptômes de feu sauvage sur tabac et de halo bactérien sur avoine. Ce dipeptide synthétisé par des NRPS est composé d'un noyau tabtoxine β lactame (T β L) lié par une liaison peptidique à un résidu thréonine. C'est en fait l'hydrolyse de cette liaison peptidique par une aminopeptidase d'origine végétale ou bactérienne qui libère le composé toxique, et le noyau T β L inhibe irréversiblement la glutamine synthétase (Sinden et Durbin 1968; Thomas et al. 1983). L'inhibition de la glutamine synthétase, outre le fait que cette enzyme soit essentielle à la voie majeure de biosynthèse de glutamine dans la plante, a principalement pour effet de bloquer l'unique voie de détoxification de l'ammoniaque *in planta*.

1.2.2.5 La phaséolotoxine

La phaséolotoxine est produite par *P. syringae* pv. *phaseicola*, agent pathogène du haricot, et *P. syringae* pv. *actinidae*, agent pathogène du kiwi. La structure de la toxine révélée par Mitchell et al. (1976) consiste en un tripeptide (ornithine, alanine, homo arginine) lié à un sulfodiaminophosphinyl. La phaséolotoxine est une toxine qui inhibe l'ornithine carbamoyl transférase, une enzyme clé du cycle de l'urée. La phaséolotoxine est un inhibiteur réversible de cette enzyme. En revanche, l'octicine produite par hydrolyse de la phaséolotoxine par une peptidase végétale inhibe de façon irréversible l'ornithine carbamoyl transférase. L'inhibition de cette enzyme cause

l'accumulation d'ornithine et une déplétion en arginine intracellulaire, qui est à l'origine de la chlorose. *P. syringae* pv. *phaseicola* produit deux isoformes d'ornithine carbamoyl transférase car le cycle de l'urée est également critique chez les bactéries. Une isoforme de l'enzyme est sensible à la phaséolotoxine et l'autre y est insensible. La bactérie produit donc une isoforme ou l'autre en fonction de la production de phaséolotoxine (Peet et al. 1986). La biosynthèse de la phaséolotoxine semble faire intervenir des enzymes NRPS (Gross et Loper 2009), mais les voies biochimiques n'ont pas encore été caractérisées.

P. syringae est la bactérie productrice de phytotoxines la plus connue et étudiée, mais d'autres exemples peuvent être cités parmi les bactéries pathogènes de plantes.

1.2.2.6 La thaxtomine

Seules quatre espèces de *Streptomyces* ont été décrites comme étant pathogènes des plantes : *S. scabies*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies* et *S. ipomoeae*. Ces quatre espèces sont responsables de la galle des tubercules et produisent une phytotoxine appelée thaxtomine, un dipeptide cyclique (Healy et al. 2000; King et Calhoun 2009). La thaxtomine purifiée induit des hypertrophies cellulaires, des nécroses, une inhibition de la biosynthèse de cellulose, une perturbation des flux d'ions ou encore la production de phytoalexines. Les travaux de Healy et al. (2000) sur l'îlot de pathogénie correspondant aux gènes de biosynthèse de la thaxtomine ont conduit à la caractérisation des deux gènes structuraux, *txtA* et *txtB*, qui codent des NRPS. La production de cette toxine semble également dépendre d'une protéine MbtH dont le gène est induit en même temps que le cluster de gènes de la thaxtomine qui est sous contrôle d'un régulateur de type AraC (Joshi et al. 2007). L'implication de la protéine MbtH dans la biosynthèse de peptides par les NRPS est abordée plus loin dans le document (paragraphe 1.3.1.6).

1.2.2.7 L'albicidine

L'albicidine est une molécule hybride polycétide-peptide produite par *X. albilineans*. Il s'agit à la fois d'un antibiotique et d'une phytotoxine. En effet,

l'albicidine est un puissant inhibiteur de l'ADN gyrase capable de bloquer la réplication de l'ADN de certaines bactéries mais aussi la réplication de l'ADN des proplastides, empêchant ainsi leur différenciation en chloroplastes (Hashimi et al. 2007; Hashimi et al. 2008). L'albicidine est responsable de l'induction des symptômes de lignes blanches caractéristiques de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre (Birch et Patil 1985; Birch et Patil 1987a, b), (voir Chapitre 1, paragraphe 4.2.1).

1.3 Les " NonRibosomal Peptide Synthetases "

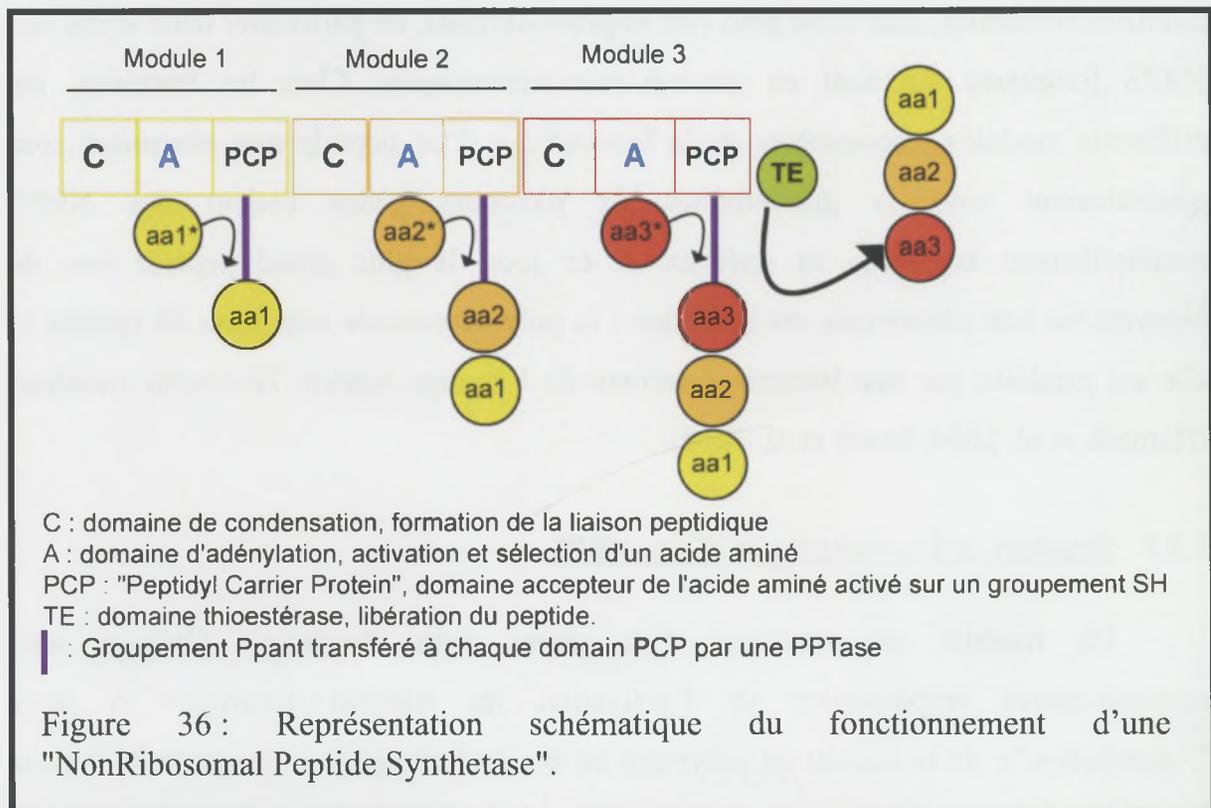
La structure d'un peptide non ribosomal, sa taille et sa complexité sont directement corrélées au nombre, à l'ordonnement et à la structure de chacun des modules composant la NRPS qui le synthétise. Chaque module au sein d'une NRPS gouverne l'incorporation d'un acide aminé particulier et, par conséquent, la succession des modules détermine la composition du peptide final (Lautru et Challis 2004). Chaque module fournit l'intégralité de la machinerie catalytique. La taille d'un module est d'environ 1000 acides aminés. Les NRPS étant des enzymes modulaires multifonctionnelles, leur taille peut être impressionnante, en particulier dans le cas des NRPS fongiques qui sont en général monocistroniques. Chez les bactéries, les différents modules responsables de la biosynthèse d'un peptide non ribosomal sont généralement sous la gouvernance de plusieurs gènes codant des NRPS éventuellement organisés en opérons. A ce jour, le plus grand peptide issu de biosynthèse non ribosomale est bactérien : la polythéonamide comporte 48 résidus et elle est produite par une bactérie symbiote de l'éponge marine *Theonella swinhoei* (Hamada et al. 2004; Inoue et al. 2010).

1.3.1 Structure et fonctionnement d'une NRPS

Un module est composé d'au moins trois domaines. Ceux-ci sont respectivement responsables de l'activation du substrat (domaine A pour "Adenylation"), de la liaison au polymère en cours d'élongation (domaine PCP pour "Peptidyl Carrier Protein") et de la formation de la liaison peptidique entre l'acide aminé adénylé et le peptide en cours d'élongation (domaine C pour "Condensation").

Ces trois domaines constituent le cœur d'un module d'élongation. Le premier module (module d'initiation) ne comporte généralement pas de domaine C, son rôle étant simplement d'initier la biosynthèse en activant un acide aminé et en le greffant sur le domaine PCP adjacent (Doekel et Marahiel 2000).

Chaque module active spécifiquement un acide aminé par une réaction en deux temps et en faisant intervenir deux domaines adjacents. Le domaine A sélectionne spécifiquement un acide aminé et l'active par une réaction d'adénylation. La partie aminoacyl est alors covalamment attachée par une liaison thioester au groupement SH fourni par le groupe prosthétique phosphopantéthéinyl (Ppant) du domaine PCP adjacent. Le groupe prosthétique Ppant du domaine PCP est ajouté par modification post-traductionnelle par une enzyme appelée phosphopantéthéinyl transférase. L'élongation du peptide en cours de biosynthèse se fait séquentiellement et unidirectionnellement sous le contrôle du domaine C. Ce domaine catalyse la formation d'une liaison peptidique par attaque nucléophile du peptidyl-S-Ppant du module n par l'acidoacyl-S-Ppant monomérique du module n+1 (Figure 36).



D'autres domaines optionnels peuvent également être trouvés au sein d'un module. Ces domaines sont responsables de modifications de la structure de l'acide aminé incorporé (comme le domaine d'épimérisation) ou de modifications du peptide en cours d'élongation (comme les domaines de méthylation, de cyclisation ou d'oxydation).

Lorsque le peptide non ribosomal a atteint sa taille définitive (c'est-à-dire qu'il est arrivé au dernier module), il est libéré de l'enzyme NRPS par le domaine TE (pour "Thioesterase") qui est responsable de l'hydrolyse de la liaison thioester entre le peptide et le groupement phosphoantéthéinyl de l'ultime domaine PCP. La libération du peptide peut s'accompagner d'une macrolactonisation (cyclisation) de la molécule.

1.3.1.1 Domaine A ("Adenylation")

Ce domaine de 500 acides aminés environ est responsable de l'activation spécifique d'un acide aminé donné. Les substrats spécifiés par plus de 180 domaines A ont été identifiés (Ackerley et al. 2003). Ces substrats peuvent être soit un acide aminé protéinogène, soit un acide aminé non protéinogène (comme par exemple le diaminobutyrate), soit un acide aryl (comme par exemple l'acide picolinique ou l'acide salicylique) (Tableau 3). De nombreuses études biochimiques ont permis d'identifier le domaine A comme étant le domaine responsable de la spécificité de substrat d'un module NRPS (Stachelhaus et al. 1999; Challis et al. 2000; May et al. 2002). Des modèles permettent de prédire la nature de l'acide aminé activé par un domaine A donné sur la base de sa séquence primaire. Ces modèles se traduisent par une séquence signature d'une dizaine d'acides aminés qui dicte la nature du substrat incorporé par un domaine A donné. Ces dix acides aminés sont les résidus clés qui, au niveau du site de fixation du domaine A à son substrat, interagissent directement avec le substrat. Il a également été montré qu'un même acide aminé peut être activé par des domaines A possédant des séquences signatures différentes. Certains domaines A ne déterminent pas l'incorporation d'un acide aminé mais d'un acide aryl, comme par exemple le 2,3-dihydroxybenzoate chez *Bacillus subtilis*. Les dix acides aminés clés qui déterminent l'incorporation des acides aryl et ceux qui déterminent l'incorporation des acides

aminés sont localisés à des positions différentes au niveau du site de fixation au substrat de leurs domaines A respectifs (May et al. 2002).

Plusieurs serveurs permettent de prédire l'acide aminé ou l'acide aryl incorporé par un module NRPS, comme le serveur "NRPS Predictor" (<http://www-ab.informatik.uni-tuebingen.de/software>) (Rausch et al. 2005)) ou encore le serveur "NRPS/PKS Analysis web site" (<http://nrps.igs.umaryland.edu/nrps/>).

Substrat spécifiquement activé	Signature										Résidu
Aad	E	P	R	N	I	V	E	F	V	K	AcvA
Ala	D	L	L	F	G	I	A	V	L	K	CssA, Hts1
Asn	D	L	T	K	L	G	E	V	G	K	BacA, CepA, Dae, Gig1, TycC
Asp	D	L	T	K	V	G	H	I	G	K	BacC, SrfA, LicB, LchAB
Cys	D	H	E	S	D	V	G	I	T	K	AcvA
Cys	D	L	Y	N	L	S	L	I	W	K	BacA, HMWP2
Dab	D	L	E	H	N	T	T	V	S	K	SyrE
Dhb/Sal	P	L	P	A	Q		V	V	N	K	EntE, DhbE, MtbA, PchD, VibE, YbtE
Gln	D	A	Q	D	L	G	V	V	D	K	LicA, LchA
Glu	D	A	W	H	F	G	G	V	D	K	FenA; FenC, FenE, PPS1, PPS3, PPS4
Glu	D	A	K	D	L	G	V	V	D	K	BacC, SrfAA
Ile	D	G	F	F	L	G	V	V	Y	K	BacA, BacC, LicC, LchAC
Ile	D	A	F	F	Y	G	I	T	F	K	FenB, PPS5
Leu	D	A	W	F	L	G	N	V	V	K	BacA, BacC, LchAA, LicB, LchAB, SrfAA, SrfAB
Leu	D	A	W	L	Y	G	A	V	M	K	CssA
Leu	D	G	A	Y	T	G	E	V	V	K	GrsB, TycC
Leu	D	A	F	M	L	G	M	V	F	K	LicA, LchAA, SrfAA
Orn	D	M	E	N	L	G	L	I	N	K	FxbC
Orn	D	V	G	E	I	G	S	I	D	K	BacB, FenC, GrsB, PPS1, TycC
Phe	D	A	W	T	I	A	A	L	C	K	GrsA, SnbDE, TycA, TycB
Phg/hPhg	D	I	F	L	L	G	L	L	C	K	CepB, CepC, SnbDE
Pip/Pipa	D	F	Q	L	L	G	V	A	V	K	FkbP, RapP, SnbA, SnbDE
Pro	D	V	Q	L	I	A	H	V	V	K	GrsB, FenA, PPS4, SnbDE, TycB
Ser	D	V	W	H	L	S	L	I	D	K	EntF, SyrE
Thr/Dht	D	F	W	N	I	G	M	V	H	K	AcmB, Fxb, PPS2, PyoD, SnbC, SyrB, SyrE
Tyr	D	G	T	I	T	A	E	V	A	K	FenA, PPS2, PPS4
Tyr	D	A	L	V	T	G	A	V	V	K	TycB, TycC
Tyr	D	A	S	T	V	A	A	V	C	K	BacC, CepA, CepB
Val	D	A	F	W	I	G	G	T	F	K	GrsB, FenE, LibB, LchAB, PPS3, SrfAB, TycC
Val	D	F	E	S	T	A	A	V	Y	K	AcvA
Val	D	A	W	M	F	A	A	V	L	K	CssA

Tableau 3. Modèle prédictif du code non ribosomal. Substrats non protéinogéniques : Aad : " δ (L α -amino adipic acid)"; Dab : "2,3-Diaminobutyrate"; Dhb : "2,3-Dihydrobenzoate"; Sal : "salicylic acid"; Phg : "L-Phenylglycine", hPhg : "4-hydroxy-L-Phenylglycine"; Pip : "pipercolinic acid"; Dht : "dehydrothreonine"; Orn : "Ornithine". D'après Stachelhaus et al. 1999 et May et al. 2002.

1.3.1.2 Domaine PCP ("Peptidyl Carrier Protein")

Le domaine PCP est un domaine de petite taille (80 à 100 acides aminés). Il constitue le domaine de transfert dont le rôle est d'être accepteur de l'acide aminé

activé par le domaine A covalamment lié sous la forme d'un thioester au groupe Ppant du domaine PCP (Stachelhaus et al. 1996). Le groupe Ppant est greffé sur le module par modification post-traductionnelle. Il fonctionne comme un bras flexible permettant le transfert de l'aminoacyl activé d'un site catalytique à un autre (Figure 36). Les domaines PCP appartiennent à la superfamille des "Carrier Proteins" (CP) (Crump et al. 1997; Weber et al. 2000).

1.3.1.3 Domaine C ("Condensation")

Ce domaine de 450 acides aminés environ est le cœur du module NRPS. En effet, c'est ce domaine qui catalyse la formation de la liaison peptidique entre l'acide aminé activé et le peptide en cours d'élongation qui sont respectivement fixés sur deux groupes Ppant de deux domaines PCP adjacents. Ce domaine catalyse l'attaque nucléophile du groupement amino de l'acide aminé activé du module n sur le groupement acyl de l'acide aminé porté par le module $n+1$ (Finking et Marahiel 2004).

Le domaine C est aussi impliqué dans la spécificité de substrat (Belshaw et al. 1999); (Doekel et Marahiel 2000; Mootz et al. 2000). Outre la fonction de catalyse de la formation de la liaison peptidique, le domaine de condensation présente une spécificité pour le substrat entrant, ce qui oriente le sens de la biosynthèse et constitue une sécurité permettant d'éviter de former une liaison peptidique entre deux peptides en cours d'élongation adjacents (ce qui serait le cas si un domaine C acceptait un substrat provenant du module situé directement en aval (Lautru et Challis 2004; Felnagle et al. 2008)). Il est possible de trouver un domaine C au niveau du module d'initiation et, nous verrons plus loin que ceci est le cas pour les nouveaux clusters de gènes NRPS découverts dans le génome de *X. albilineans*. La présence d'un domaine de condensation en début de chaîne permet la liaison du peptide synthétisé à un substrat non peptidique comme par exemple un acide gras (Yin et Zabriskie 2006). La syringomycine produite par *P. syringae* est un lipopeptide cyclique de neuf acides aminés liés à un lipide. La chaîne de biosynthèse de la syringomycine débute par un domaine C. Le processus de biosynthèse et d'attachement de l'acide gras reste inexpliqué dans le cas de la syringomycine. Dans le cas d'autres lipopeptides cycliques

comme l'iturine A de *Bacillus* spp., l'enzyme de biosynthèse de l'acide gras est codée par le cluster de gènes NRPS (Gross et Loper 2009).

1.3.1.4 Domaine TE ("Thioesterase")

La réaction de terminaison de la biosynthèse est un processus catalysé par le module le plus distal de l'enzyme NRPS, le domaine TE ("Thioesterase"). Durant toute la biosynthèse, le peptide en cours d'élongation est transféré d'un module au module suivant jusqu'à arriver au domaine PCP du dernier module. Ce module contient le domaine TE d'environ 250 acides aminés dont le rôle est la libération ordonnée du peptide non ribosomal qui conduit à une réaction de macrolactonisation (cyclisation comme dans le cas de surfactine (Tseng et al. 2002)), soit une simple hydrolyse, conduisant à la formation d'un peptide linéaire comme pour la pyochéline (Patel et al. 2003). La présence de deux domaines TE adjacents est souvent associée à une cyclisation du peptide comme pour l'arthrofactine produite par *P. syringae* (Gross et Loper 2009).

1.3.1.5 Domaines optionnels intervenant dans les modifications de la structure de l'acide aminé incorporé

Les domaines d'épimérisation

Une caractéristique particulière des peptides non ribosomaux est qu'ils incorporent de nombreux D-acides aminés. Deux stratégies existent pour l'incorporation de ces acides aminés non protéinogènes : soit le domaine d'adénylation spécifie la conformation D de l'acide aminé qu'il adényle, soit un domaine annexe d'épimérisation (domaine E) positionné du côté C-terminal du module épimérise un L-acide aminé en un D-acide aminé.

Le domaine de méthylation

Le domaine de méthylation (MT) permet la méthylation d'acides aminés spécifiques. Les domaines de méthylation sont intégrés à la chaîne de biosynthèse en s'imbriquant généralement entre les domaines A et PCP (C-A(MT)-PCP). Dans le cas de la cyclosporine, sept des 11 acides aminés incorporés sont méthylés, ce qui a un impact fort sur la conformation et peut-être l'efficacité de la cyclisation.

Le domaine de cyclisation

Le domaine de cyclisation (Cy) est le seul domaine annexe à pouvoir remplacer le domaine de condensation. Le rôle de ce domaine, outre la cyclisation du résidu cystéine, sérine ou thréonine à incorporer, est de former une liaison peptidique avec le peptide en cours d'élongation. La réaction de cyclisation conduit à l'incorporation au peptide non ribosomal d'un hétérocycle thiazoline ou oxazoline.

Le domaine d'oxydation

Les hétérocycles thiazoline ou oxazoline peuvent subir une réaction d'oxydation, généralement catalysée par un domaine d'oxydation (Ox). Les domaines Ox peuvent être placés à différentes positions dans les modules NRPS, par exemple entre les domaines A et T ou en position terminale d'un module (Schneider et Walsh 2004). L'oxydation permet notamment de stabiliser les hétérocycles.

1.3.1.6 Exemples de gènes de modification responsables de la maturation et du transport du peptide assemblé

Les gènes NRPS sont souvent regroupés en clusters et accompagnés de gènes codant des enzymes de modification ou des transporteurs (Walsh et al. 2001).

Les glycosyltransférases

Les glycosyltransférases sont des enzymes qui catalysent le transfert d'un monosaccharide depuis un sucre activé (donneur), généralement par un phosphate, vers une molécule acceptrice.

Les méthyltransférases

Les méthyltransférases catalysent le transfert d'un groupement méthyl depuis plusieurs substrats différents. Par exemple, les méthyltransférases SAM-dépendantes (S-adénosylméthionine) transfèrent un groupement méthyl du SAM à un atome d'oxygène, d'azote ou de carbone d'une grande diversité de substrats (Cho et al. 2008). Parfois, les méthyltransférases sont codées par des gènes associés aux NRPS comme dans le cas de l'albicidine qui possède deux méthyltransférases codées par les gènes

albII et *albVI* (Royer et al. 2004). Il a été montré que AlbII, une méthyltransférase SAM-dépendante, est nécessaire à la biosynthèse de l'albicidine (Huang et al. 2000b).

MbtH (*Mycobacterium tuberculosis*)

Les protéines MbtH sont présentes dans de très nombreux clusters de gènes NRPS associés à la biosynthèse de sidérophores et d'antibiotiques. Il a été montré que la protéine MbtH peut intervenir en "cross-talk" sur plusieurs clusters NRPS, c'est-à-dire qu'un gène *mbtH* fonctionnel présent dans un cluster de gènes donné peut compléter l'absence ou la mutation d'un autre gène *mbtH* présent dans un autre cluster de gènes NRPS (Lautru et al. 2007). La fonction précise de la protéine MbtH reste inconnue mais, chez *P. aeruginosa*, elle semble avoir un rôle dans la maturation, la stabilisation ou l'export de la pyoverdine (Buchko et al. 2010).

Les transporteurs

Les clusters de gènes NRPS impliqués dans la biosynthèse d'une petite molécule sécrétée codent généralement un transporteur transmembranaire qui est spécifique de cette petite molécule. Le mode de fonctionnement de ces transporteurs est peu connu. Il pourrait impliquer des protéines accessoires.

La phosphopantéthéinyl transférase

La phosphopantéthéinyl transférase (PPTase) est l'enzyme responsable de la modification post-traductionnelle des NRPS, sans laquelle ces mégasynthèses ne pourraient pas fonctionner. Le transfert de la partie phosphopantéthéinyl du coenzyme A sur le résidu sérine conservé du PCP permet la conversion de celui-ci de la forme inactive apo-PCP en forme active. La PPTase catalyse l'attaque nucléophile du groupement hydroxyl du résidu sérine conservé de l'apo-PCP sur le phosphate β du phosphopantéthéinyl. Il en résulte une conversion du PCP de la forme apo en une forme holo-PCP active avec libération d'ADP. L'importance de la PPTase dans l'activation des NRPS a été démontrée chez une souche de *B. subtilis* comportant une surfactine synthétase intacte, mais mutée pour la PPTase correspondante nommée Sfp ("Surfactin-type phosphopantetheinyl transferase"). Une absence de modification post-traductionnelle se traduit par l'absence de biosynthèse du métabolite secondaire. La complémentation de cette souche avec une copie fonctionnelle de la PPTase a permis

de restaurer la production de surfactine, confirmant le rôle de cette enzyme dans l'activation des NRPS (Nakano et al. 1992).

Il existe deux types de PPTases : les PPTases de type Sfp responsables de l'activation des NRPS et les PPTases de type AcpS ("Acyl carrier protein Synthase") responsables de l'activation des enzymes de biosynthèse des acides gras, mais également des PKS. Les PPTases de type AcpS ne sont pas capables d'activer les NRPS. A l'inverse, les PPTases de type Sfp sont parfois capables d'activer les enzymes du métabolisme primaire et secondaire lorsqu'il manque une PPTase de type AcpS. Il est très fréquent de trouver plusieurs types de PPTases dans un même organisme, chacune ayant un rôle défini (Copp et Neilan 2006). Chez *E. coli*, il existe deux types de PPTases: EntD, une PPTase de type sfp-like impliquée de la biosynthèse de l'entérobactine (un sidérophore), et une PPTase de type AcpS. Il a été montré expérimentalement que EntD n'est capable d'activer que les domaines PCP des NRPS et inversement que la PPTase de type AcpS est spécifique des domaines ACP présents dans les polykétide synthases et enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides gras (Lambalot et al. 1996). Chez *X. albilineans*, on trouve deux PPTases : AlbXXI (aussi appelée XabA), une PPTase de type sfp-like et HetI, une PPTase de type AcpS. La PPTase HetI serait responsable de l'activation des enzymes PKS chez *X. albilineans*. Des mutants affectés dans l'expression du gène codant AlbXXI ne produisent plus d'albicidine (Huang et al. 2000b; Royer et al. 2004). Le transfert chez un de ces mutants du gène *entD* d'*E. coli* a permis de restaurer la production d'albicidine (Huang et al. 2000b). Ce résultat démontre que la PPTase AlbXXI de *X. albilineans* est spécifique des domaines PCP des NRPS.

1.3.2 L'analyse *in silico* des gènes NRPS peut renseigner sur la nature du peptide synthétisé

La séquence des gènes codant les enzymes NRPS peut être utilisée pour prédire la structure des peptides synthétisés. Cette prédiction est possible grâce :

- à l'aide de modèles permettant de prédire la nature des acides aminés ou des acides aryl incorporés (voir paragraphe 1.3.1.1),

- au dogme de la règle de colinéarité qui stipule que l'ordre hiérarchique des différents modules dicte l'ordre des acides aminés dans le peptide non ribosomal (Cane et al. 1998 ; Marahiel et al. 1997; Keating et al. 2002),
- à l'identification *in silico* des différents domaines de modification ou des enzymes de modification associées aux NRPS (voir paragraphes 1.3.1.5 et 1.3.1.6).

Beaucoup de peptides non ribosomaux ont une structure qui suit ces principes, notamment le dogme de la colinéarité. C'est le cas de la surfactine produite par *B. subtilis* ou des β -lactames qui forment une large classe d'antibiotiques qui inclut les pénicillines.

Prédire une structure peut néanmoins s'avérer difficile lorsque la règle de colinéarité ne s'applique pas (Mootz et al. 2002). Récemment, il a été montré que deux clusters NRPS ayant des positions éloignées dans le génome pouvaient agir en *trans* et participer à la biosynthèse d'un sidérophore nommé érythrocheline chez *Saccharopolyspora erythraea* (Lazos et al. 2010). De plus, il est parfois difficile de prévoir les modifications apportées par les domaines optionnels ou les enzymes de modification.

Les domaines NRPS sont parfois associés à des domaines PKS. Les enzymes PKS ont un mode de fonctionnement très similaire aux NRPS. Elles permettent l'incorporation d'acylCoA et la biosynthèse de chaînes carbonées (polycétides). Il existe également des modèles permettant de prédire la nature des substrats incorporés en fonction de l'analyse *in silico* des domaines PKS.

La disponibilité croissante de génomes séquencés permet la mise en évidence croissante de gènes NRPS et de petites molécules associées à ces NRPS. Il a été estimé que plus de 50% des génomes bactériens possédaient de tels gènes (Donadio et al. 2007). La possibilité de prédire *in silico* la structure des peptides ou petites molécules synthétisés par ces nouveaux NRPS permet de trouver des homologues avec des molécules déjà identifiées chez d'autres organismes et de fournir des pistes quant à la fonction potentielle des molécules synthétisées par ces nouveaux NRPS. Parallèlement, l'analyse fonctionnelle de ces nouveaux gènes NRPS peut conduire à la caractérisation de la fonction des petites molécules synthétisées par ces NRPS. Les

progrès croissants dans l'analyse des données générées par les techniques de caractérisation chimiques telles la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) permettent de déterminer la structure d'une petite molécule de manière plus rapide et plus fiable et contribuent également à la découverte de nouvelles petites molécules issues de biosynthèse non ribosomale (Ng et al. 2009).

1.4 *Xanthomonas albilineans* possède plusieurs gènes NRPS

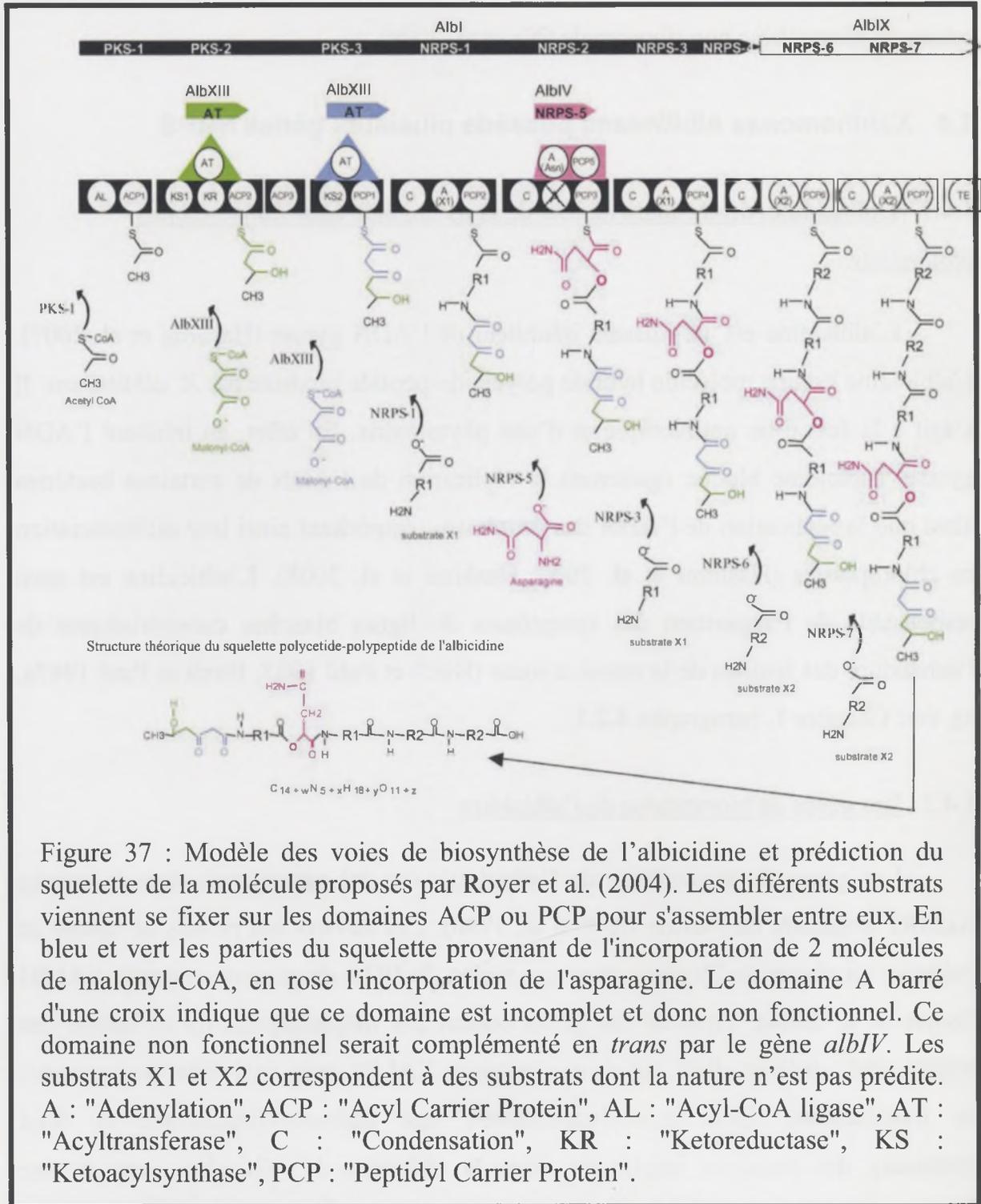
1.4.1 L'albicidine, déterminant majeur de la pathogénie chez *Xanthomonas albilineans*

L'albicidine est un puissant inhibiteur de l'ADN gyrase (Hashimi et al. 2007). L'albicidine est une molécule hybride polycétide-peptide produite par *X. albilineans*. Il s'agit à la fois d'un antibiotique et d'une phytotoxine. En effet, en inhibant l'ADN gyrase, l'albicidine bloque également la réplication de l'ADN de certaines bactéries ainsi que la réplication de l'ADN des proplastides, empêchant ainsi leur différenciation en chloroplastes (Hashimi et al. 2007; Hashimi et al. 2008). L'albicidine est ainsi responsable de l'apparition des symptômes de lignes blanches caractéristiques de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre (Birch et Patil 1985; Birch et Patil 1987a, b), voir Chapitre 1, paragraphe 4.2.1.

1.4.2 Les gènes de biosynthèse de l'albicidine

Les gènes de biosynthèse de l'albicidine ont été caractérisés chez la souche Xa23R1 originaire de Floride (Rott et al. 1996). Ces travaux ont permis de mettre en évidence un cluster de 20 gènes dans une région de 49 kb du génome nommée XALB1 (Royer et al. 2004). Trois de ces gènes codent des mégaenzymes de la famille des NRPS: *albI*, *albIX* et *albIV*. Le cluster de gènes XALB1 code également des enzymes de modification (deux méthyltransférases, une carbamoyltransférase et deux estérases), des protéines impliquées dans la résistance à l'albicidine (une pompe d'efflux spécifique de l'albicidine et la protéine McbG dont la fonction est de protéger l'ADN gyrase de la fixation de l'albicidine). Par ailleurs, il existe deux autres régions du génome impliquées dans la biosynthèse de l'albicidine. La première correspond au

gène qui code la PPTase AlbXXI indispensable à l'activation post-traductionnelle des enzymes NRPS (Huang et al. 2000a; Royer et al. 2004). La seconde correspond au gène qui code la protéine de choc thermique HtpG dont le rôle exact dans la biosynthèse de l'albicidine reste inconnu (Vivien et al. 2005).



1.4.3 L'analyse *in silico* des gènes NRPS de biosynthèse de l'albicidine contribue à une meilleure connaissance de la structure de cette molécule

L'analyse *in silico* des gènes NRPS impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine a permis d'élaborer un modèle des voies de biosynthèse du squelette de l'albicidine et de proposer une structure théorique partielle du squelette de la molécule (Royer et al. 2004) (Figure 37). Cette structure théorique reste partielle car la nature des substrats incorporés par quatre des cinq modules NRPS n'a pas pu être prédite. En effet les signatures des domaines A correspondants n'ont pas encore été décrites dans les bases de données disponibles (ces substrats non prédits sont appelés X1 ou X2 sur la figure 37). Des données de spectrométrie de masse et de RMN ont permis de préciser que l'albicidine est un composé aromatique de faible poids moléculaire (842,3 Da). En tenant compte des modifications probables de ce squelette (méthylations et transfert d'un groupement carbamoyl), ce poids moléculaire est compatible avec la structure théorique du squelette de l'albicidine. La caractérisation complète de la structure de l'albicidine fait l'objet d'un projet réalisé par notre équipe en collaboration avec l'université de Berlin et financé par l'ANR. La structure théorique du squelette de l'albicidine est très utile pour l'interprétation des données structurales qui s'avère difficile du fait de la complexité de la structure de l'albicidine.

1.4.4 Les autres gènes NRPS de *Xanthomonas albilineans* ont-ils un rôle dans la pathogénie ?

Récemment, le génome de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* a été séquencé et annoté par notre équipe en collaboration avec le Génoscope et trois autres UMRs (Pieretti et al. 2009). L'analyse de la séquence de ce génome a permis de mettre en évidence 12 gènes NRPS. Trois de ces gènes correspondent aux gènes *albI*, *albIV* et *albIX* impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine (Royer et al. 2004) (Figure 37). Les autres gènes sont de nouveaux gènes NRPS dont la fonction est inconnue.

Le séquençage du génome de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* a également permis de confirmer l'absence de système de sécrétion de type III Hrp.

L'absence remarquable de ce système suppose que les interactions de *X. albilineans* avec les cellules de la canne à sucre reposent sur d'autres systèmes de sécrétion. Les petites molécules synthétisées par les NRPS sont sécrétées par des pompes d'efflux. Par ailleurs, une fois sécrétées, les petites molécules peuvent facilement atteindre leurs cellules cibles par diffusion et pénétrer dans ces dernières en utilisant les pompes destinées à l'acquisition de nutriments. C'est le cas de l'albicidine qui est sécrétée par *X. albilineans* au niveau du xylème et qui atteint ses cellules cibles au niveau du parenchyme par diffusion. Elle pénètre ensuite à l'intérieur de ces cellules, puis de leurs chloroplastes en utilisant probablement des transporteurs de nucléosides. En effet, il a été montré chez *E. coli* que l'albicidine est transportée par un transporteur de nucléosides (Birch et al. 1990).

Les molécules synthétisées par les nouveaux NRPS identifiés récemment dans le génome de la souche GPE PC73 pourraient donc jouer un rôle dans la pathogénie de la bactérie et influencer sa capacité à coloniser le xylème de la canne à sucre. Pour explorer cette hypothèse, nous avons étudié ces nouveaux gènes NRPS. La première partie de notre travail a consisté en des analyses *in silico* qui nous ont permis de prédire la structure des peptides synthétisés et de confirmer que les petites molécules synthétisées par ces NRPS ne ressemblent à aucun peptide décrit à ce jour. Néanmoins, il existe chez d'autres bactéries des clusters de gènes proches des clusters de gènes NRPS de *X. albilineans*. De façon intéressante, un des clusters de gènes NRPS de *X. albilineans* est très proche d'un cluster de gènes identifié dans le génome de la souche africaine BAI3 de *X. oryzae* pv. *oryzae* (Koebnik et al., résultats non publiés). La deuxième partie de notre travail a consisté en l'étude du rôle des nouveaux gènes NRPS dans la pathogénie de *X. albilineans*. Pour cela, nous avons étudié la pathogénie d'un mutant de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* incapable d'activer les NRPS (portant une délétion au niveau du gène codant la PPTase responsable de l'activation post-transcriptionnelle des NRPS). *X. oryzae* pv. *oryzae* étant également une bactérie du xylème, nous avons élargi ce travail à l'étude du rôle des NRPS dans la pathogénie de cette bactérie attaquant le riz. Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'article.

2 Article

In Silico* Analysis and Functional Study of Nonribosomal Peptide Synthetases that Encode Virulence Factors in *Xanthomonas albilineans* and a Rice Elicitor in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae

1 MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, 2011

2 Submission planned in 2011 because some results remain to be completed.

3 This draft was not revised yet by all co-authors.

4

5 ***In Silico* Analyses and Functional Studies of Nonribosomal Peptide Synthetases**
6 **that Encode Virulence Factors in *Xanthomonas albilineans* and a Rice Elicitor in**
7 ***Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae***

8

9 Running title: Functional Analyses of NRPS in two *Xanthomonas* species

10

11 Mélanie Marguerettaz¹, Guillaume Robin², Cécile Dubois³, Stéphane Cociancich¹,
12 Valérie Verdier², Philippe Rott¹, Ralf Koebnik² and Monique Royer^{1*}

13

14 ¹CIRAD UMR BGPI, Campus international de Baillarguet, TA A-54/K, 34398
15 Montpellier Cedex 5, France.

16

17 ²IRD/CNRS UMR LGDP, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier
18 Cedex 5, France.

19

20 ³CIRAD UPR MV, Avenue Agropolis, TA A-75/02, 34398 Montpellier Cedex 5,
21 France.

22

23

24 *Corresponding author. Mailing address: UMR BGPI, Campus international de
25 Baillarguet, TA A-54/K, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

26 Phone: 33 (0) 4 99 62 48 44. Fax: 33 (0) 4 99 62 48 08. E-

27 mail: monique.royer@cirad.fr.

28

29 **ABSTRACT (217 words, MPMI instructions: Abstract should be limited to 210**
30 **words)**

31

32 *Xanthomonas albilineans* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are xylem-
33 invading bacterial pathogens that cause leaf scald disease of sugarcane and bacterial
34 leaf blight of rice, respectively. *X. albilineans* possesses a phosphopantetheinyl
35 transferase gene (*albXXI*) involved in posttranslational activation of nonribosomal
36 peptide synthetases (NRPSs), and required for biosynthesis of the toxin albicidin (a
37 potent DNA gyrase inhibitor that causes chlorotic symptoms). Recent sequencing of
38 the genome of *X. albilineans* strain GPE PC73 from Guadeloupe revealed the presence
39 of six NRPS loci. Two of them encode not only NRPSs but also tailoring and secretion
40 proteins. They correspond to the previously characterized NRPS gene cluster XALB1
41 involved in the biosynthesis of albicidin and to a new NRPS gene cluster called
42 META-B. Interestingly, a NRPS gene cluster similar to META-B and a gene similar to
43 *albXXI* were found in an unpublished draft sequence of the genome of *X. oryzae* pv.
44 *oryzae* African strain BAI3. Functional analyses performed on sugarcane with an
45 *albXXI* knockout mutant of *X. albilineans* strain GPE PC73 showed that at least one
46 other NRPS locus, different from XALB1, governs biosynthesis of one or more new
47 virulence factors. Functional analyses performed on rice with an *albXXI* knockout
48 mutant of *X. oryzae* pv. *oryzae* strain BAI3 revealed that the NRPS gene cluster
49 META-B is involved in biosynthesis of a rice elicitor.

50

51

52

53

54 **INTRODUCTION**

55 The *Xanthomonadaceae* are a family of Gram-negative bacteria belonging to
56 the order *Xanthomonadales* in the gamma subdivision of the *Proteobacteria* (Saddler
57 and Bradbury, 2005). Members of this family are typically characterized as
58 environmental organisms and occupy diverse ecological niches, such as soil and water,
59 as well as plant tissues. Many *Xanthomonadaceae*, especially species from the genera
60 *Xanthomonas* and *Xylella*, cause plant diseases and only one, *Stenotrophomonas*
61 *maltophilia*, is known to be an opportunistic human pathogen.

62 *Xanthomonas oryzae* pathovars are the causal agents of two important diseases
63 of rice, bacterial leaf blight caused by *X. oryzae* pv. *oryzae* and bacterial leaf streak
64 caused by *X. oryzae* pv. *oryzicola*. Bacterial leaf blight causes significant yield losses
65 in rice crops throughout Asia and Africa. Although both the Asian and African *X.*
66 *oryzae* pv. *oryzae* strains induce similar symptoms, they are nevertheless genetically
67 different, with the African strains being more closely related to *X. oryzae* pv. *oryzicola*
68 than to the Asian strains (Gonzalez et al., 2007; Soto-Suárez et al., 2010). Unlike *X.*
69 *oryzae* pv. *oryzicola* strains, African and Asian *X. oryzae* pv. *oryzae* strains are xylem-
70 invading pathogens. The complete genome of three Asian *X. oryzae* pv. *oryzae* strains
71 was recently sequenced (Lee et al., 2005; Ochiai et al., 2005 and Salzberg et al, 2008)
72 and a draft sequence of the genome of a *X. oryzae* pv. *oryzicola* strain was recently
73 made available in Genbank. No sequence of the genome of any African *X. oryzae* pv.
74 *oryzae* strains has been published to date. Pathogenicity of *X. oryzae* pv. *oryzae* and *X.*
75 *oryzae* pv. *oryzicola* is highly dependent on a Hrp-Type Three Secretion System
76 (T3SS Hrp) and on T3SS effector proteins of the *AvrBs3/pthA* family (Zhu et al.,
77 2000; Shen et al., 2002; Wang et al., 2007).

78 *Xanthomonas albilineans* is a systemic, xylem-invading pathogen that causes
79 leaf scald, a lethal disease of sugarcane (interspecific hybrids of *Saccharum* spp.) (Rott
80 and Davis, 2000). Leaf scald symptoms vary from a single, white, narrow, sharply
81 defined stripe to complete wilting and necrosis of infected leaves, leading to plant
82 death. Unlike most plant pathogenic bacteria, *X. albilineans* does not possess a T3SS
83 Hrp. The only pathogenicity factor of *X. albilineans* that was extensively studied to
84 date is albicidin, a secreted small molecule that has phytotoxic and antibiotic

85 properties (Birch, 2001). Albicidin is a potent DNA gyrase inhibitor that targets the
86 chloroplastic DNA gyrase A, inhibits chloroplast DNA replication and blocks
87 chloroplast differentiation, resulting in white foliar stripe symptoms (Birch, 2001;
88 Hashimi et al., 2007). Albicidin is also a potent antibiotic active against a wide range
89 of Gram-positive and Gram-negative pathogenic bacteria (Birch and Patil, 1985).
90 Antibiotic activity of albicidin may also help *X. albilineans* to combat rival
91 microorganisms during sugarcane invasion.

92 The genome of a *X. albilineans* virulent strain from Guadeloupe, strain GPE
93 PC73, was recently sequenced (Pieretti et al., 2009). A most prominent feature of this
94 genome is its large CDSs encoding 12 nonribosomal peptide synthetases (NRPSs) that
95 cover 4% of the genome. NRPSs catalyze the nonribosomal assembly of peptides from
96 proteinogenic and nonproteinogenic amino acids and usually possess a multimodular
97 structure (Finking and Marahiel, 2004; Sieber and Marahiel, 2005). Each module
98 consists minimally of an adenylation domain (A-domain) responsible for amino acid
99 activation; a peptidyl carrier protein domain (PCP-domain), which usually resides
100 adjacent to the A-domain, for thioesterification of the activated amino acid; and a
101 condensation domain (C-domain) for transpeptidation between the upstream and
102 downstream peptidyl and amino acyl thioesters to elongate the growing peptide chain.
103 In addition to the basic subset of core domains, each NRPS system also has a chain-
104 terminating thioesterase domain (TE-domain) that is responsible for detachment of the
105 mature polypeptide. Typically, NRPS initiation modules lack a C-domain (Finking et
106 al., 2004). However, an additional C-domain is present in initiation modules of NRPS
107 involved in biosynthesis of cyclic lipopeptide in *Pseudomonas* (de Bruijn et al., 2007),
108 where these initiation NRPS modules catalyze *N*-acylation of the first amino acid in
109 the cyclic lipopeptide. In addition to essential elongation domains (A, PCP, C and TE),
110 optional auxiliary domains like epimerization or heterocyclization domains can be
111 found within some NRPS modules. Moreover, the resulting peptide backbone can be
112 modified by NRPS-associated tailoring enzymes usually encoded within the same
113 gene cluster as the NRPS gene.

114 The A-domains are gatekeepers for the biosynthesis of the polypeptide because
115 of specificity of NRPS substrate binding pockets for their cognate substrates. In

116 addition to the 20 proteinogenic amino acids, NRPSs utilize hundreds of different non
117 proteinogenic amino acids and also various aryl acids. The NRPS substrate binding
118 pockets are so highly specific for their substrates that predictive models based upon
119 consensus signature motifs for known substrates have been determined (Stachelhaus et
120 al., 1999; Challis et al., 2000; May et al., 2002). These predictive models are based on
121 sequence analysis of NRPS A-domains of known substrates and on the crystal
122 structures of the substrate binding pockets of an amino acid-activating domain and an
123 aryl acid-activating domain, respectively. These models postulate specificity-
124 conferring signatures for NRPS A-domains consisting of ten critical amino acid
125 residues putatively involved in amino acid or aryl acid substrate specificity. The
126 number of NRPS modules and their domain organization within the enzymes control
127 the structures of the final products. All these conserved features within the NRPS
128 machinery allow to predict, on the basis of *in silico* analyses of the NRPS genes, the
129 types and sometime the exact structures of the synthesized polypeptides. It is therefore
130 possible to estimate the biosynthetic potential for a given bacterium by the *in silico*
131 analysis of its NRPS gene clusters.

132 The transfer of a phosphopantetheinyl group to PCP-domains is required for
133 posttranslational activation of NRPSs. The inactive apo-NRPSs are converted to their
134 active holo-forms by transfer of the 4'-phosphopantetheinyl (P-pant) moiety of
135 coenzyme A to the sidechain hydroxyl of a serine residue in the PCP-domains. The P-
136 pant moiety serves to tether covalently the growing polypeptide which is assembled by
137 NRPSs. The transfer of the P-pant moiety from coenzyme A to a serine residue is
138 catalyzed by 4'-phosphopantetheinyl transferases (PPTases). PPTases are involved not
139 only in posttranslational activation of NRPS but also in posttranslational activation of
140 fatty acid and polyketide synthases which do not contain PCP-domains but acyl carrier
141 protein (ACP) domains. All PPTases are recognized by a common (V/I)G(I/V)D
142 ...x40-45... (F/W)(S/C/T)xKE(S/A)xxK signature sequence, but overall sequence
143 homologies are low (Lambalot et al. 1996; Gehring et al., 1997; Walsh et al., 1997;
144 Quadri et al, 1998). Carrier protein specificity (ACP or PCP) was determined
145 experimentally for some PPTases. For example, in *Escherichia coli*, the EntD PPTase
146 involved in biosynthesis of enterobactin (a siderophore) was experimentally shown to

147 be active only on PCP-domains and not on ACP-domains (Lambalot et al., 1996;
148 Walsh et al., 1997). The genome of *X. albilineans* strain GPE PC73 contains a PPTase
149 gene annotated as *xabA* or *albXXI*, and which was previously shown to be required for
150 albicidin biosynthesis in *X. albilineans* strains LS155 and Xa23R1, respectively
151 (Huang et al. 2000; Royer et al., 2004). The *E. coli entD* gene restored biosynthesis of
152 albicidin in a *xabA* knockout mutant of *X. albilineans* strain LS155 (Huang et al.,
153 2000), demonstrating that *xabA* (or *albXXI*) has the same PPTase activity as *entD*
154 which is active only on PCP-domains.

155 Bacteria use NRPSs to produce peptides or small molecules of broad structural
156 and biological activity which can contribute to their virulence, their adaptation to
157 unfavorable environments or their competition with rival microorganisms in their
158 natural habitat (for review, Donadio et al., 2007; Gross and Loper, 2009). For
159 example, *Pseudomonas syringae* is a plant pathogen known to produce a wide range of
160 small molecules as a result of the adaptation to its multiple life styles. Some of these
161 small molecules synthesized by NRPSs are involved in plant pathogenicity, like
162 coronatin, syringolin, tabtoxin or syringomycin which present an important range of
163 structures and mode of actions (Gross and Loper, 2009). Coronatin is a structural
164 mimic of jasmonic acid which overstimulates the host jasmonic acid signalling.
165 Syringolin is a small lipopeptide which inhibits the host proteasome (Groll et al.,
166 2008). Tabtoxin is a small dipeptide which inhibits irreversibly the host glutamine
167 synthase (Thomas et al., 1983), whereas syringomycin is a cyclic lipopeptide which
168 interacts with cellular membranes, thereby altering their integrity (Raaijmakers et al.,
169 2006). Surfactant properties of syringomycin may also play an indirect role in
170 virulence by facilitating colonization of plant tissue and enhancing physical access of
171 cell wall degrading enzymes to the plant surface (Lindow and Brandl, 2003).

172 The remarkable absence of a T3SS Hrp in the genome of *X. albilineans* implies
173 that pathogenicity of this sugarcane pathogen relies on other secretion systems. Hence,
174 small molecules, which require only pumps to be secreted by the bacterium and to
175 enter the plant cell, may play an important role in pathogenicity of *X. albilineans*. This
176 assumption is based on the presence in the genome of *X. albilineans* strain GPE PC73
177 of 12 NRPS genes. Three of these NRPS genes belong to the albicidin biosynthesis

178 gene cluster XALB1 which was previously sequenced from *X. albilineans* strain
179 Xa23R1 (Royer et al., 2004). The nine other NRPS genes identified in the genome of
180 *X. albilineans* strain GPE PC73 cannot be ascribed a precise function as they have not
181 been studied. Several studies established that albicidin, which is synthesized by
182 NRPSs, plays a key role in pathogenesis of *X. albilineans* and especially in the
183 development of foliar disease symptoms (Birch 2001, Hashimi et al., 2007, Hashimi et
184 al., 2008). The objective of this study was to perform *in silico* analysis and functional
185 studies in order to evaluate the contribution(s) to the virulence of *X. albilineans* of
186 small molecules synthesized by new NRPS genes identified in the genome of *X.*
187 *albilineans* strain GPE PC73.

188 Interestingly, NRPS gene cluster META-B of *X. albilineans* strain GPE PC73 is
189 similar to a NRPS gene cluster found in a draft sequence of the genome of *X. oryzae*
190 *pv. oryzae* African strain BAI3, which also contains a gene similar to *albXXI* (Koebnik
191 et al., unpublished draft genomic sequence). This NRPS gene cluster, which encodes
192 not only NRPS but also tailoring and secretion proteins, is not present in any other
193 available bacterial sequences, including genomes of Asian *X. oryzae pv. oryzae* strains
194 and of *X. oryzae pv. oryzicola*. The presence of a similar NRPS gene cluster in *X.*
195 *oryzae pv. oryzae* African strain BAI3 and in *X. albilineans* offers the opportunity to
196 extend this study to another xylem-invading monocotyledon pathogen.

197

198 RESULTS

199

200 Genomic features of the PPTase gene *albXXI* in *X. albilineans* and in *X.* 201 *oryzae*.

202 In the three *X. albilineans* strains LS155, Xa23R1 and GPE PC73, *albXXI* is
203 located between the 30S ribosomal protein S6 gene *rpsF* (XALc_1735) and an iron-
204 sulfur cluster assembly protein gene (XALc_1737). These two latter genes are
205 conserved and adjacent in other sequenced species of *Xanthomonas*. Interestingly, a
206 gene similar to *albXXI* was found in the three sequenced Asian strains of *X. oryzae pv.*
207 *oryzae*, in the sequenced strain of *X. oryzae pv. oryzicola* and in the draft sequence of

208 the genome of the African strain BAI3 of *X. oryzae* pv. *oryzae*. This gene was called
209 *XooalbXXI*. In these *X. oryzae* strains, *XooalbXXI* is located in a region containing
210 several tRNAs and phage related sequences (Fig. 1). In *X. oryzae* pv. *oryzicola*, this
211 region also contains two NRPS genes which are partially conserved and located in the
212 same region in *X. axonopodis* pv. *citri* (Fig. 1). However, *XooalbXXI* is not conserved
213 in *X. axonopodis* pv. *citri*. The only two species of *Xanthomonas* known to possess a
214 PPTase gene similar to *albXXI* are *X. albilineans* and *X. oryzae*.

215 *albXXI* genes from *X. albilineans* and *X. oryzae* share only 46% amino acid
216 identity, but their PPTase signature sequences are very similar (Table 1). These
217 signature sequences are also very similar to the signature sequence of *entD* gene of *E.*
218 *coli* (Table 1). *X. albilineans* and *X. oryzae* possess another PPTase gene, annotated as
219 *hetI*, which is conserved in all sequenced species of *Xanthomonas*. Signature
220 sequences of *het I* of *X. albilineans* and *X. oryzae* are both similar to signature
221 sequence of a PPTase of *Mycobacterium tuberculosis* which was experimentally
222 shown to be active only on ACP-domains of fatty acid and polyketide synthases and
223 not on PCP-domains (Quadri et al., 1998; Table 1).

224 *albXXI* gene from *X. albilineans* strains LS155 and Xa23R1 are 100% identical.
225 The protein encoded by *albXXI* in *X. albilineans* strain GPE PC73 is 94% identical to
226 that encoded by *X. albilineans* strains LS155 and Xa23R1. However, *albXXI* PPTase
227 signatures are 100 % identical in all three *X. albilineans* strains (Table 1). The
228 transcription start site of *albXXI* was determined by the 5' RACE method in *X.*
229 *albilineans* strain GPE PC73 in the present study. Two boxes similar to the boxes -35
230 GAACTT and -10 TCTCA experimentally identified in the promoter of the gene *rpoE*
231 of *X. campestris* pv. *campestris* (Cheng et al., 2009) were identified upstream from the
232 transcription start site of *albXXI* (supplemental data 1). Nucleotide sequences of *X.*
233 *albilineans* strains Xa23R1 and GPE PC73 differ at the level of the box identified at
234 position -35 (supplemental data 1). This putative promoter do not match to any other
235 available sequence including sequence present upstream from *XooalbXXI* in *X. oryzae*.

236

237 **The genome of *X. albilineans* strain GPE PC73 possesses uncharacterized**
238 **NRPS genes which share homology with each other and also with NRPS of**
239 **various bacteria.**

240 In addition to the three NRPS genes previously characterized as involved in
241 biosynthesis of albicidin (Royer et al., 2004), the chromosome of *X. albilineans* strain
242 GPE PC73 possesses seven large NRPS genes distributed in three loci called META-
243 A, META-B and META-C and two short NRPS genes present elsewhere on the
244 chromosome (Table 2). These nine uncharacterized NRPS genes share only low
245 homology with NRPS genes involved in biosynthesis of albicidin, but share high
246 homology with each other. For example, they share with each other several substrate
247 specificity-conferring signatures (Table 2). These nine NRPS also share homologies
248 with NRPS genes recently identified in the genome of various bacteria such as the
249 root-nodulating *Bradyrhizobium* sp. BTAi and *Sinorhizobium medicae*, as well as the
250 entomopathogenic *Photorhabdus luminescens* subsp. *Laumondii* and *Xenorhabdus*
251 *bovienii*. These homologies are illustrated by a phylogenetic tree of C-domains from
252 *X. albilineans*, *Bradyrhizobium* sp. BTAi and *S. medicae* presented in supplemental
253 data 4.

254

255 ***In silico* analysis of NRPS loci META-A and META-C of *X. albilineans***
256 **strain GPE PC73**

257 The loci META-A and META-C encode only large NRPS genes and no
258 tailoring or secretion proteins. META-A is adjacent to the NRPS gene cluster XALB1
259 involved in biosynthesis of albicidin. The two NRPS loci META-A and XALB1 are
260 separated by the terminus of replication. META-A, which is flanked by IS elements,
261 includes two large NRPS genes: XALc_1550 (16,649 bp) and XALc_1551 (22,628
262 bp). These two genes encode a NRPS system consisting of 12 NRPS modules with the
263 three characteristic domains (C-A-PCP) followed by a terminal TE-domain (Fig. 2).
264 META-C, which is not flanked by IS elements, contains a single NRPS gene,
265 XALc_0772 (23,288 bp). This gene encodes a NRPS system consisting of seven
266 NRPS modules with the three characteristic domains (C-A-PCP) followed by a
267 terminal TE-domain (Fig. 2). First NRPS module of both META-A and META-C

268 contain C-domains that share together 73% amino acid identity. Some substrates
269 assembled by META-A and META-C, but not all, were predicted on the basis of
270 analysis of specificity-conferring signatures of A-domains (Table 2).

271 Both META-A and META-C share more than 44% amino acid identity with a
272 NRPS locus of *Bradyrhizobium* sp. BTAi which contains three genes: Bta_6814,
273 Bta_6813 and Bta_6812 (Table 3). These three genes encode a NRPS system
274 consisting of 14 NRPS modules with the 3 characteristic elongation domains (C-A-
275 PCP) followed by a terminal TE-domain. As it is the case for META-A and META-C,
276 the NRPS initiation module of this system contains a C-domain. NRPS modules of
277 *Bradyrhizobium* sp. BTAi share substrate specificity-conferring signatures with each
278 other but also with NRPS modules of *X. albilineans* (Table 3). Phylogenetic analysis
279 of C-domains indicated that NRPS modules of this system have probably the same
280 ancestral origin as NRPS modules of META-A and META-C (Fig. 2). Interestingly,
281 this analysis also indicated that the first modules of the three NRPS systems (META-
282 A, META-C and the NRPS locus of *Bradyrhizobium* sp. BTAi) form a distinct group,
283 distant from C-domains present in other modules. *Bradyrhizobium* sp. BTAi also
284 possesses a gene similar to *albXXI* (Bbta_3710).

285

286 ***In silico* analysis of NRPS loci META-B of *X. albilineans* strain GPE PC73**
287 **and *X. oryzae* pv. *oryzae* strain BAI3.**

288 The NRPS locus META-B of *X. albilineans* strain GPE PC73 encodes not only
289 NRPS but also tailoring enzymes and a secretion protein. A NRPS gene cluster
290 encoding the same tailoring enzymes and the same secretion protein was identified in
291 the draft sequence of the genome of *X. oryzae* pv. *oryzae* African strain BAI3. The two
292 corresponding NRPS gene clusters present in *X. albilineans* and *X. oryzae* were named
293 XaMETA-B and XooMETA-B, respectively (Fig.3). XooMETA-B is the only NRPS
294 locus identified in the genome of *X. oryzae* pv. *oryzae* strain BAI3. The gene cluster
295 META-B is not present in any other available bacterial sequences including genomes
296 of *Bradyrhizobium* sp. BTAi, *P. luminescens* subsp. *laumondii*, *S. medicae* or *X.*
297 *bovienii* in which NRPS share homology with NRPS of META-B but are not
298 associated to the same tailoring genes as in META-B.

299 XaMETA-B, which is flanked by an IS element only on one side, contains four
300 NRPS genes: XALc_1058 (13,685 bp), XALc_1057 (6,377 bp), XALc_1056 (32,123
301 bp) and XALc_1055 (1,823 bp) (Fig. 3). These four genes encode a NRPS system
302 consisting of 16 NRPS modules with the three characteristic elongation domains (C-A-
303 PCP). Two TE-domains were identified in XaMETA-B: (i) a single TE-domain at the
304 end of the fourth NRPS module in gene XALc_1058, and (ii) a double TE-domain
305 encoded by a separated gene which do not contain any other NRPS domain
306 (XALc_1055) (Fig. 3). XooMETA-B, which is flanked by IS elements on both sides,
307 contains two NRPS genes which encode a NRPS system consisting of at least 15
308 NRPS modules with the 3 characteristic elongation domains (C-A-PCP) (Fig. 3).
309 Complete sequence of XooMETA-B is not available yet and has to be determined
310 before submission of this manuscript for publication. For this reason, the precise
311 number of NRPS modules in XooMETA-B remains unknown. Only one TE-domain
312 was identified in XooMETA-B: a double TE-domain at the end of the fourth NRPS
313 module in orf1 (Fig. 3). The presence of a TE-domain at the end of the fourth module
314 of XaMETA-B and XooMETA-B suggests that initiation module does not correspond
315 to the first module but to the fifth module. This hypothesis is supported by
316 phylogenetic analysis of C-domains which indicated that the fifth module of
317 XaMETA-B and XooMETA-B form a distinct phylogenetic group, distant from C-
318 domains present in other modules (supplemental data 2). These C-domains share 63%
319 with each other and only 22% amino acid identity with C-domains of the initiation
320 modules of META-A and META-C. A phylogenetic analysis of NRPS modules of
321 XaMETA-B and XooMETA-B also indicated that these two gene clusters have the
322 same origin but evolved differently (Fig. 3, modules in a same color belong to the
323 same phylogenetic group). XaMETA-B and XooMETA-B share several specificity
324 conferring signatures (Table 4), but are predicted to encode different polypeptides
325 (Fig. 3).

326 XaMETA-B and XooMETA-B encode several putative tailoring enzymes: an
327 acyltransferase, an enoyl-CoA transferase, two isomerases, an amino transferase, a
328 MbtH-like protein and a hypothetical protein (Fig.3). They also encode an ABC
329 transporter and a transcriptional regulator of the AraC family. XaMETA-B and

330 XooMETA-B share more than 71% amino acid identity at the level of tailoring and
331 secretion genes (Fig. 3). Amino acid identity at the level of the transcriptional
332 regulator gene is lower (57%). On its 5' side, XooMETA-B contains a *syrP*-like gene
333 which is absent in XaMETA-B. However, this gene contains a non-sense mutation and
334 a frameshifting mutation. Therefore, it should be considered as a pseudogene.
335 Interestingly, *syrP*-like genes are frequently found within NRPS gene clusters, as it is
336 the case in the *X. albilineans* XALB-1 gene cluster in which it has been annotated as
337 *albVIII*. In *P. syringae* pv. *syringae*, the *syrP* gene was shown to regulate
338 syringomycin biosynthesis (Zhang et al., 1997).

339

340 ***In silico* analysis of two short NRPS genes of *X. albilineans* strain GPE**
341 **PC73 which overlap with a glucosyltransferase gene**

342 The annotation of the genome of *X. albilineans* strain GPE PC73 also revealed
343 the presence of two short NRPS genes, XALc_0364 (4046 bp) and XALc_1145 (3977
344 bp), which each encode only one NRPS module with four elongation domains (C-A-
345 PCP-TE) and which overlap at their 3' end with a glucosyltransferase gene.
346 XALc_0364 and XALc_1145 share 52% amino acid identity but do not share the same
347 substrate-specificity conferring signature (Supplemental data 3). Their respective
348 overlapping glucosyltransferase genes XALc_0365 and XALc_1144 share 53% amino
349 acid identity (Supplemental data 3). Similar NRPS genes encoding only one NRPS
350 module and overlapping at their 3' end with a glucosyltransferase gene were found in
351 the genome of several other bacteria, including *X. campestris* pv. *campestris* and *X.*
352 *axonopodis* pv. *citri* (which do not possess any gene similar to the PPTase gene
353 *albXXI*) or *Bradyrhizobium* BTAi (which possesses a gene similar to *albXXI*)
354 (Supplemental data 3). However, no NRPS gene encoding only one NRPS module and
355 overlapping on 3' with a glucosyltransferase gene was found in any sequenced *X.*
356 *oryzae* strains, including *X. oryzae* pv. *oryzae* strain BAI3.

357

358 **Is the NRPS gene cluster META-B required for *X. oryzae* pv. *oryzae* strain**
359 **BAI3 to infect rice and cause symptoms?**

360 *In silico* analyses indicate that Xoo*albXXI* is responsible for activation of
361 the NRPS encoded by XooMETA-B. For this reason, a knockout mutation in
362 Xoo*albXXI* should disrupt biosynthesis of the small molecule synthesized by
363 XooMETA-B. These *in silico* analyses indicate that (i) PPTase signature of
364 Xoo*albXXI* is very similar to PPTase signature of the gene *albXXI* of *X. albilineans*
365 (Table 1), and (ii) Xoo*albXXI* is located within a NRPS gene cluster in *X. oryzae* pv.
366 *oryzicola* (Fig. 1). In order to study the role of XooMETA-B in pathogenicity, an
367 *albXXI* insertional knockout mutant of *X. oryzae* pv. *oryzae* strain BAI3 was
368 constructed and was inoculated by leaf clipping on (i) two rice varieties of the species
369 *Oryza sativa* (*O. sativa* cv. IR24 belonging to the indica sub-group and *O. sativa* cv.
370 Azucena belonging to the japonica sub-group), and (ii) one rice variety of the species
371 *Oryza glaberrima* (*O. glaberrima* cv. TOG5420).

372 Two- or six-weeks old plants were inoculated with either the wild type strain or
373 the *albXXI* knockout mutant. One week after inoculation, sampling was performed on
374 inoculated leaves at 12.5 or 15 cm from the clipping point for the two- or six-weeks
375 old plants, respectively. Percentage of plants allowing bacteria recovery was greater
376 for plants inoculated with the *albXXI* mutant than plants inoculated with the wild type
377 strain for the three rice varieties (Table 5). More precisely, the difference between
378 plants inoculated with the *albXXI* mutant and plants inoculated with the wild type
379 strain is higher for *O. indica* cv. IR24 than for the two other varieties. No data were
380 available for six-weeks old *O. glaberrima* plants. Similar differences between plants
381 inoculated with the *albXXI* mutant and plants inoculated with the wild type strain were
382 observed one week after inoculation concerning the length of lesions for the three rice
383 varieties (Table 6). Additional plants of the variety *O. sativa* cv. Azucena were
384 checked two weeks after inoculation. In these plants, the percentage of the variation of
385 lesion length (mutant vs wild type) was + 38%.

386 In conclusion, disruption of the biosynthesis of small molecule by XooMETA-
387 B via the inactivation of the Xoo*albXXI* PPTase gene improved the capacity of *X.*
388 *oryzae* pv. *oryzae* strain BAI3 to induce symptoms and to spread in all three varieties,
389 on young (2-weeks old) or older plants (6-weeks old).

390 Several experiments were done to transfer, in the *albXXI* insertional knockout
391 mutant of *X. oryzae* pv. *oryzae* strain BAI3, a plasmid harboring the gene *albXXI* of *X.*
392 *albilineans* with no success so far. Further experiments are actually being done to try
393 again to obtain this complemented *albXXI* mutant.

394

395 **Are the five uncharacterized NRPS loci identified in the genome of *X.***
396 ***albilineans* strain GPE PC73 required for this strain to infect sugarcane and**
397 **cause symptoms?**

398 As previously demonstrated (Huang *et al.*, 2000), the *albXXI* gene is the only
399 PPTase gene able to activate NRPS in *X. albilineans*. The NRPS locus XALB1 was
400 already characterized as involved in biosynthesis of albicidin (Huang *et al.*, 2001;
401 Royer *et al.*, 2004). *X. albilineans* strain GPE PC73 possesses, in addition to XALB1,
402 five uncharacterized loci. In order to assess the role of these five uncharacterized
403 NRPS loci in pathogenicity, an *albl* deletion knockout mutant and an *albXXI* deletion
404 knockout mutant of *X. albilineans* strain GPE PC73 were constructed. Each of these
405 mutants was unable to produce any antibiotic activity against *E. coli* (data not shown),
406 confirming disruption of biosynthesis of albicidin and therefore knockout of genes *albl*
407 and *albXXI*, respectively.

408 Plants of a sugarcane cultivar very susceptible to leaf scald (cultivar CP80-
409 1743, Rott *et al.*, 1997) were inoculated by decapitation with either the wild type
410 strain, the *albl* knockout mutant or the *albXXI* knockout mutant. Bacterial population
411 densities were determined two months after inoculation. Samples were taken from
412 inoculated and non inoculated leaves and at three different levels of the stalk: at the
413 inoculation point, at the 2nd internode under the inoculation point and at the 4th
414 internode above of the inoculation point. The number of cfu/g (colony forming unit
415 per gram) of fresh weight was determined. Analyses do not reveal any significant
416 difference of bacterial population densities in leaves (data not shown), and at the -2nd
417 internode location in the stalk for both *albl* and *albXXI* mutants, when compared to the
418 wild type strain (Table 7). Nevertheless, the *albXXI* mutant strain was affected in its
419 capacity to colonize at the inoculation point when compared to the *albl* mutant and to
420 the wild type strain. In the upper part of the stalk, both the *albXXI* mutant strain and

421 *albI* mutant strain were affected in their capacity to colonize when compared to the
422 wild type strain. However the *albXXI* mutant strain was significantly more affected
423 than *albI* mutant strain. In the upper part of the stalk, for plants inoculated with the
424 *albXXI* mutant strain, only 8×10^3 cfu/g of fresh weight were recovered in the sample
425 taken against 4×10^7 cfu/g and 2×10^6 cfu/g of fresh weight for the plants inoculated
426 with the wild type strain and the *albI* mutant, respectively (Table 7). This experiment
427 was repeated three times, and we obtained similar results using two different *albXXI*
428 mutants generated with the same construct but obtained from two independent
429 electroporation experiments. A complementation experiment was additionally
430 performed with the *albXXI* mutant transformed with a plasmid harboring the gene
431 *albXXI* of *X. albilineans* strain GPE PC73. This experiment revealed that the plasmid
432 used in this study (pUFR043, De Feyter and Gabriel, 1991) was unstable as it was not
433 recovered in bacteria two months after inoculation. Further experiments were done
434 using the plasmid pUFR047 (De Feyter et al., 1993) which was shown to be stable in
435 *X. albilineans* (Philippe Rott, personal communication). Results of these further
436 experiments are not available yet.

437

438 DISCUSSION

439 *X. albilineans* strain GPE PC73 and *X. oryzae* pv. *oryzae* strain BAI3 share
440 similar NRPS gene clusters called XaMETA-B and XooMETA-B, respectively (Fig.
441 3). Small molecule predicted to be synthesized by XaMETA-B and XooMETA-B
442 differs significantly at the level of the polypeptide sequence (Tables 2 and 4).
443 However, the presence in XaMETA-B and XooMETA-B of very similar tailoring and
444 secretion protein genes suggest that small molecules synthesized by these NRPS gene
445 clusters and secreted by *X. albilineans* strain GPE PC73 and *X. oryzae* pv. *oryzae*
446 strain BAI3, respectively, are structurally similar. XooMETA-B is the only NRPS
447 locus present in the genome of *X. albilineans* strain BAI3.

448 We showed that the capacity to induce symptoms and to spread in rice was
449 higher for the *albXXI* insertional mutant of *X. oryzae* pv. *oryzae* strain BAI3 than for
450 the wild type strain after inoculation on either 2- or 6-weeks old plants of the three rice
451 varieties (Tables 5 and 6). This result indicates that small molecule synthesized by

452 XooMETA-B activates a mechanism of resistance in two varieties of *O. Sativa* and
453 one variety of *O. glaberrima*. Because this mechanism of resistance of rice, potentially
454 activated by small molecule synthesized by XooMETA-B in *X. oryzae* pv. *oryzae*
455 strain BAI3, is conserved in two rice species (*O. sativa* and *O. glaberrima*), one can
456 propose that it is probably widely distributed. Whether this mechanism is part of basal
457 resistance, it needs to be explored in further experiments.

458 Before to submit this manuscript for publication, this result has to be confirmed
459 by assessment of pathogenicity of an *albXXI* insertional mutant of *X. oryzae* pv.
460 *oryzae* strain BAI3 transformed with a plasmid harbouring the gene *albXXI* of *X.*
461 *albilineans* which was previously shown to be specific of PCP domains of NRPS
462 (Huang *et al.*, 2000). This complementation study will be necessary not only to
463 confirm that the phenotype observed with the knockout mutant is due to the insertion
464 in *albXXI* but also to confirm that *albXXI* has the same function in *X. albilineans* and
465 *X. oryzae* (activation of PCP domains only). Confirmation of preliminary results by
466 this complementation study will therefore demonstrate that (i): *albXXI* is functional
467 and is specific to PCP domains in *X. oryzae* pv. *oryzae* strain BAI3, (ii) XooMETA-B
468 is not a silent gene cluster, and (iii) small molecule synthesized by XooMETA-B is
469 secreted and recognized as elicitor in three rice varieties.

470 In experiments performed with a sugarcane cultivar very susceptible to leaf
471 scald, we showed that the capacity to spread in upper part of sugarcane stalk was
472 lower for the *albXXI* insertional mutant of *X. albilineans* GPE PC73 strain and the *albI*
473 insertional mutant of *X. albilineans* GPE PC73 strain when compared to the wild type
474 *X. albilineans* GPE PC73 strain. However the *albXXI* mutant strain was significantly
475 more affected than *albI* mutant strain. Interpretation of these results is difficult because
476 of the presence, in addition to XALB1, of five uncharacterized NRPS loci in *X.*
477 *albilineans* strain GPE PC73 (META-A, META-B, META-C and the two short NRPS
478 genes). However, these results clearly indicate that NRPS genes of *X. albilineans*
479 strain GPE PC73 are involved in biosynthesis of at least two virulent factors: (i)
480 albicidin which was previously shown to be responsible for induction of symptoms,
481 and for which we showed that it also plays a role in colonization of sugarcane stalk;

482 and (ii) at least one unknown small molecule which plays a role in colonization of
483 sugarcane stalk.

484 *In silico* analyses provide only few insights into structures of small molecules
485 synthesized by the five uncharacterized NRPS loci of *X. albilineans* strain GPE PC73.
486 The predicted structures of the peptides assembled by META-A, META-C and
487 META-B do not resemble to any peptide structures described to date (Table 2). The
488 initiation module of META-A, META-C and META-B does contain a C-domain,
489 indicating that it may catalyze the attachment of peptides to a fatty acid, an aromate or
490 a carbohydrate. The initiation module of META-A and META-C share very similar C-
491 domains, indicating they may catalyze the attachment of peptides to the same moiety.
492 The C-domain present in the initiation module of META-A, META-B and META-C is
493 different from the C-domains of the initiation modules of cyclic lipopeptides described
494 in *Pseudomonas* (de Bruijn et al., 2007).

495 META-B contains two TE-domains: (i) a single TE-domain at the end of the
496 fourth NRPS module, and (ii) a double TE-domain encoded by a separated gene which
497 does not contain any other NRPS domain (Fig. 3). Double TE-domains of XaMETA-B
498 and XooMETA-B might be involved in the cyclization of peptides. Several NRPS
499 systems involved in biosynthesis of cyclic peptides contain similar double TE-domain
500 (e.g. syringopeptin NRPSs, Scholz-Schroeder et al., 2001, arthofactin NRPSs,
501 Roongsawang et al., 2003; massetolide A NRPSs, de Bruijn et al., 2007). However, in
502 these systems, double TE-domains are not encoded by a separated gene but by a gene
503 also encoding several elongation modules with three characteristic elongation domains
504 (C-A-PCP). XaMETA-B is the only NRPS gene cluster sequenced to date in which a
505 separated gene encodes only a double TE-domain, without any elongation module.
506 Interestingly, in XooMETA-B, the double TE-domain is not present in a separated
507 gene but is present at the 3'-end of a gene encoding four elongation modules (Fig. 3).
508 The position of this double TE-domain in XooMETA-B corresponds to the position of
509 a single TE-domain in XaMETA-B (Fig. 3).

510 Unlike META-B, META-A and META-C do not encode any tailoring secretion
511 proteins. Peptides synthesized by these latter two gene clusters might neither be
512 modified nor secreted. Alternatively, tailoring and secretion genes involved in

513 modification and secretion of small molecules synthesized by META-A and META-C
514 might be present elsewhere in the genome. For example, peptides assembled by
515 META-A and META-C might be modified and secreted by tailoring and secretion
516 proteins encoded by META-B. In this case, the three NRPS loci META-A, META-B
517 and META-C might be involved in biosynthesis of structurally similar small
518 molecules. The specific insight of the separated gene encoded by XaMETA-B which
519 contains a double TE-domain and no elongation module might be related to a cross
520 talk between META-B and other NRPS loci. The separated double TE-domain might
521 be able to act *in trans*, allowing cyclization of peptides assembled by other NRPS loci
522 than META-B. The NRPS locus of *Bradyrhizobium* sp. BTAi similar to META-A and
523 META-C may also interact *in trans* with other NRPS loci encoding tailoring and
524 secretion proteins present elsewhere in the genome of this bacterium. However, no
525 gene encoding separated TE-domains is present in this genome.

526 The two short NRPS enzymes encoded by *X. albilineans* strain GPE PC73 might
527 interact *in trans* with META-A, META-B, META-C or XALB1 in a pathway similar
528 to that proposed for a short NRPS enzyme which contains only one module with three
529 characteristic elongation domains (C-A-PCP), and which is required for the
530 mangotoxin biosynthesis in *P. syringae* (Arrebola et al., 2007). However, short NRPS
531 enzymes encoded by *X. albilineans* do contain a TE-domain, unlike their *P. syringae*
532 counterparts, supposing that their mode of action is different. Furthermore, in *P.*
533 *syringae*, short NRPS gene involved in mangotoxin biosynthesis do not overlap with a
534 glucosyltransferase gene. The presence of similar short NRPS genes in bacteria that do
535 not possess any PPTase gene able to activate PCP-domains (Supplemental data 3)
536 suggests that either the function of these short NRPS genes associated with
537 glucosyltransferase genes does not require activation by PPTase or these short NRPS
538 genes are silent in bacteria that do not possess any PPTase gene similar to *albXXI*.

539

540 Before submission of the manuscript for publication, discussion will be
541 completed according to future results.

542

543 **MATERIALS AND METHODS**

544 **Bacterial strains.** *X. albilineans* strain GPE PC73 isolated in Guadeloupe was
545 recently sequenced (Pieretti et al., 2009). A spontaneous rifampicine mutant of this
546 strain was generated and used in this study. This strain is called GPE PC73 R5. *X.*
547 *albilineans* strains were grown for 48h on modified Wilbrink's medium (Rott et al.
548 1994) or on XAS selective growth medium (Davis et al. 1994) at 28°C before use. A
549 spontaneous rifampicine mutant of *X. oryzae* pv. *oryzae* strain BAI3 was generated.
550 This strain is called BAI3-1. *X. oryzae* pv. *oryzae* were usually grown for 24h on PSA
551 (Soto-Suarez et al. 2010) medium added of appropriate antibiotics at 28°C before use.

552
553 **Design of PCR primers.** The primer pairs used for construction and the screen
554 of the different mutants were designed using the tool Primer 3
555 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). Primers were designed
556 based on the sequence of the phosphopantetheinyl transferase gene of strain GPE
557 PC73 of *X. albilineans* and strain BAI3 of *X. oryzae* pv. *oryzae*. Sequences of the
558 primers are presented in supplemental data 5.

559
560 **PCR conditions.** DNA templates were prepared by suspending a freshly grown
561 colony in 100 µl sterile nuclease-free water. PCR amplifications were performed in an
562 automated thermal cycler PTC-100 (MJ Research, Inc, Watertown, MA, USA). The 25
563 µl PCR reaction mix consisted of 3 µl bacterial suspension, 2.5 µl 148 of 10x PCR
564 buffer without MgCl₂ (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), 120 µM dNTP mix, 2.0 mM
565 MgCl₂ (Sigma-Aldrich), 0.36 µM of each primer, 1 unit of Taq DNA Polymerase
566 (Sigma-Aldrich), and sterile nuclease-free water to final volume. The PCR program
567 was 94°C for 4 min, 30 cycles at 94°C for 30 seconds, T_m (melting temperature) for 1
568 min 30 seconds, and 72°C for 1 min, with a final 72°C extension for 8 min. A 5-µl
569 aliquot of each amplified product was analyzed by electrophoresis through a 1%
570 agarose gel.

571

572 **DNA sequencing.** DNA sequencing was performed by Beckman Coulter
573 Genomics (Takely, UK). PCR fragments were sequenced with primers used for their
574 respective amplification.

575

576 **Phylogenetic analysis.**

577 The phylogenetic trees presented on figure 2 and on supplemental data 2 were
578 reconstructed using the maximum likelihood method implemented in the PhyML
579 program. The LG substitution model was selected, assuming an estimated proportion
580 of invariant sites (of 0.01) and four gamma-distributed rate categories to account for
581 rate heterogeneity across sites. The locus analyzed is the C-domain. Multiple
582 alignments of the amino acid sequences of the C-domain and for all taxa were
583 performed using ClustalW. The phylogenetic tree was calculated with PhyML
584 (Guindon and Gascuel 2003); <http://atgc.lirmm.fr/phyml/>; version 2.4.4. Five hundred
585 bootstrap replicates were performed with PhyML program.

586

587 **Construction of *albXXI* deletion knockout mutant and albicidin mutants of**
588 ***X. albilineans*.** The construction of deletion mutants was based on the principle of the
589 double recombination. Fragments of the PPTase *albXXI* gene and of the albicidin
590 NRPS *albI* gene were amplified from *X. albilineans* strain GPE PC73 with specific
591 primers listed in supplemental data 5. For the *albXXI* mutant, fragments flanking the
592 *albXXI* gene were amplified with primers XaPPT A/B (expected size: 1,004 bp) and
593 XaPPT C/D (expected size: 922 bp) and were joined using primers XaPPT A/D. The
594 resulting fragment was cloned into Strataclone vector (Stratagene, La Jolla, USA),
595 yielding plasmid pStrata-PPTXa. Transformants were screened with primers XaPPT
596 A/ XaPPT screen1. For the *albI* mutant, we took advantage of two large internal
597 duplications present in the NRPS *albI* gene, designated as DS2 (Royer *et al.*, 2004). A
598 single fragment of 1,144 bp containing one copy of DS2 was amplified from *X.*
599 *albilineans* strain GPE PC73 with *albI* F/R primers (Supplemental data 5) and cloned
600 into Strataclone vector (Stratagene, La Jolla, USA), yielding to the plasmid pStrata-
601 *albI*. Transformants were screened with primers *albI* F/R. *Bgl*III inserts of pStrata-

602 PPTXa and pStrata-albI were then transferred into the pUFR080 (*sacB*) suicide vector
603 (Castañeda et al., 2005) digested by *Bam*HI, yielding pUFR080-PPTaseXa and
604 pUFR080-albI, respectively. Plasmids pUFR080-PPTaseXa and pUFR080-albI were
605 then introduced into *X. albilineans* strain GPE PC73 R5 by electroporation (Rott et al
606 submitted). Transformants were plated on Wilbrink agar plates without sucrose and
607 supplemented by 1% glucose and 20 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ kanamycine. Plates were incubated at
608 28°C for 5-7 days until apparition of isolated colonies which correspond to mutants in
609 which a first recombination occurred where the. At this point, transformants were
610 screened with primers XaPPT screen1/XaPPT screen2 for the *albXXI* mutant and albI
611 screen1/albI screen2 for the *albI* mutant, respectively, to ensure the recombination
612 occurred in the right orientation and in the target gene. Transformants were then
613 transferred on classic Wilbrink medium to allow the second recombination to occur.
614 Resulting colonies were screened to ensure that the deletion occurred with XaPPT
615 screen1/XaPPT screen2 primers for the *albXXI* mutant and *albI* screen3/albI screen4
616 primers for the albicidin mutant. An albicidin production assay (Birch and Patil, 1985)
617 was performed to check the absence of albicidin production.

618

619 **Construction of the *albXXI* insertional knockout mutant of *X. oryzae* pv.**
620 ***oryzae* strain BAI3.** A 1,019 bp fragment located in the 5' part of the *albXXI* gene
621 was amplified with XooPPT F/R primers (Supplemental data 5) from *X. oryzae* pv.
622 *oryzae* strain BAI3 and cloned in the Strataclone vector (Stratagene, La Jolla, USA),
623 yielding pStrata-PPTXoo. An *Xho*I/*Spe*I fragment of pStrata-PPTXoo containing the
624 *xsao* fragment was then transferred into vector pVO155 (Oke and Long, 1999),
625 yielding pVO155-PPTXoo. Transformants were screened with XooPPTR/ProR
626 primers. Plasmid pVO155-PPTXoo was then introduced into *X. oryzae* pv. *oryzae*
627 strain BAI3-1 by biparental conjugation. Donor cells (*E. coli* S 17-1 [pVO155-
628 PPTXoo]) and recipient cells (*X. oryzae* pv. *oryzae* strain BAI3-1) were mixed and
629 incubated for 24 hours at 28°C on 1% peptone-sucrose agar (PSA) plates. Cells were
630 then resuspended, plated on selective medium (PSA plates supplemented with
631 rifampicin [25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$] and kanamycin [25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$]), and incubated at 28°C. Mutants
632 were screened using one primer designed on the pVO155 (ProR) and one primer

633 designed upstream from the fragment of *albXXI* used to construct the mutant (PPTXoo
634 screen).

635

636 **Inoculation of rice with *X. oryzae* pv. *oryzae* and determination of leaf**
637 **colonization** Pathogenicity experiments were conducted at IRD in a S2 containment
638 facility using healthy plants of three different rice cultivars: *Oryza sativa* cv. IR24, *O.*
639 *sativa* cv. Azucena and *O. glaberrima* cv. TOG5420. Inoculated plants were 2- or 6-
640 weeks old. Inoculum was prepared with fresh bacterium culture prepared on PSA
641 medium. Rice was inoculated with a 10^8 CFU/ml bacterial suspension in sterile
642 distilled water by leaf clipping. Plants were analyzed one or two weeks after
643 inoculation. The length of lesions was measured. On 2-weeks old plants, a 5 cm leaf
644 sample has been taken at 12.5 cm from the inoculation point. On 6-weeks old plants, a
645 5 cm leaf sample has been taken at 15 cm from the inoculation point. Samples were
646 freezed with liquid nitrogen and crushed. 500 μ l sterile distilled water was added and
647 the samples were diluted at 1/1000 and plated with the spiral platter (Interscience,
648 France) on PSA agar medium containing 20 μ g.ml⁻¹ gentamycine, and 1% MOPS for
649 the *entD* mutant strain. Growth of *X. oryzae* pv. *oryzae* was recorded after 2 days of
650 incubation of agar plates without antibiotic at 28°C.

651

652 **Inoculation of sugarcane with *X. albilineans* and determination of stalk**
653 **colonization.** Pathogenicity experiments were conducted at Cirad in a S3 containment
654 facility using healthy plants of sugarcane cultivar CP68-1026, which is very
655 susceptible to leaf scald (Rott *et al.*, 1997). Inoculum of *X. albilineans* was prepared
656 from 5-day-old agar cultures on XaPR medium [10 g/l sucrose, 5 mg/l CaCl₂(H₂O), 50
657 mg/l ferric ammonium citrate (C₆H₈O₇ · xFe₃⁺ · yNH₃), 1g/l NH₄Cl, 0.5 g/l MgSO₄
658 (7H₂O), 0.1 g/l DL-methionine, 15g/l agar; pH adjusted to 6.8 with a volume to
659 volume solution of Na₂HPO₄ (12H₂O) and KH₂PO₄ at 1/15 M]. Sugarcane stalks with
660 at least 4–5 internodes were inoculated with 10^8 CFU/ml bacterial suspension in sterile
661 distilled water by the decapitation method as described by Rott *et al.* (1997). Leaf
662 scald symptoms were recorded on three emerging leaves one month after inoculation.
663 Number of cfu per gram of fresh weight was determined two months after inoculation

664 in inoculated and non-inoculated leaves and in stalk at three points : at the inoculation
665 point, at the 2nd node under the inoculation point and at the 4th node above the
666 inoculation point. Stalks were sampled individually and cut with pruning shears. Leaf
667 samples were mixed in 5 ml of TBS buffer (TRIS 6.05g/L, NaCl 2.92 g/L, pH adjusted
668 at 7.6) and the stalk ones in 100 ml. A dilution at 1/1000 for leaves samples and 1/10
669 for the stalk samples in sterile distilled water has been done before plating diluted
670 samples with a spiral platter (Interscience, France) on selective XAS growth medium
671 supplemented with 50 µg.ml⁻¹ rifampicin. Growth of *X. albilineans* was recorded after
672 five days of incubation of agar plates at 28°C.

673

674 **Statistical analysis.** A one-way analysis of variance was performed on
675 transformed data, using procedure GLM of SAS Software (SAS 9.1.3 for Windows),
676 with five to six plants as replicates for each strain. The choice of the appropriate data
677 transformation was made empirically to remove the relationship between mean and
678 variance, and sensible variance stabilization was obtained with logarithmic
679 transformation (log10) for stalk data, and square-root for leaves data. To be easily
680 interpreted, means values were transformed back to the original scale in table 7. Means
681 were compared pair wise using Tukey's Studentized Range (HSD) test at P = 0.05
682 level.

683

684 **ACKNOWLEDGEMENTS**

685 We thank Sandrine Duplan, Marie-Josée Darroussat, Marc Muller, Isabelle
686 Pieretti and Damien Zaragoza for their technical assistance. Mélanie Marguerettaz was
687 supported by a PhD Fellowship from La Région Languedoc-Roussillon. Philippe Rott
688 was supported by a Marie Curie Outgoing International Fellowship from the European
689 Commission.

690

691 **LITERATURE CITED**

692 Birch, R. 2001. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease
693 control. Mol. Plant Pathol. 2:1-11.

- 694 Birch, R.G., and Patil, S.S. 1985. Preliminary Characterization of an Antibiotic
695 Produced by *Xanthomonas albilineans* Which Inhibits DNA Synthesis in *Escherichia*
696 *coli*. *J. Gen. Microbiol.* 131:1069-1075.
- 697 Castañeda, A., Reddy, J.D., El-Yacoubi B. and Gabriel, D.W. 2005. Mutagenesis of all
698 eight avr genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* had no detected effect on
699 pathogenicity, but one avr gene affected race specificity. *Mol. Plant Microbe Interact.*
700 18:1306-1317.
- 701 Challis, G., Ravel, J., and Townsend, C. 2000. Predictive, structure-based model of
702 amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains.
703 *Chem. Biol.* 7:211-224.
- 704 Cheng, C.Y., Shieh, S.Y., Hsu, C.C., and Yang, M.T. 2008. Characterization and
705 transcriptional analysis of an ECF sigma factor from *Xanthomonas campestris* pv.
706 *campestris*. *FEMS Microbiol. Lett.* 289:250-257.
- 707 De Feyter, R., Yang, Y., Gabriel, D.W. 1993. Gene-for-genes interactions between
708 cotton R genes and *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* avr genes. *Mol. Plant*
709 *Microbe Interact.* 6:225-237.
- 710 Donadio, S., Monciardini, P., and Sosio, M. 2007. Polyketide synthases and
711 nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. *Nat.*
712 *Prod. Rep.* 24:1073-1109.
- 713 Finking, R., and Marahiel, M.A. 2004. Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu.*
714 *Rev. Microbiol.* 58:453-488.
- 715 Gehring, A.M., Bradley, K.A., and Walsh, C.T. 1997. Enterobactin Biosynthesis in
716 *Escherichia coli*: Isochorismate Lyase (EntB) Is a Bifunctional Enzyme That Is
717 Phosphopantetheinylated by EntD and Then Acylated by EntE Using ATP and 2,3-
718 Dihydroxybenzoate. *Biochemistry* 36:8495-8503.
- 719 Gonzalez, C., Szurek, B., Manceau, C., Mathieu, T., Séré, Y., and Verdier, V.r. 2007.
720 Molecular and Pathotypic Characterization of New *Xanthomonas oryzae* Strains from
721 West Africa. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20:534-546.

- 722 Groll, M., Schellenberg, B., Bachmann, A.S., Archer, C.R., Huber, R., Powell, T.K.,
723 Lindow, S., Kaiser, M., and Dudler, R. 2008. A plant pathogen virulence factor
724 inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism. *Nature* 452:755-758.
- 725 Gross, H., and Loper, J.E. 2009. Genomics of secondary metabolite production by
726 *Pseudomonas* spp. *Nat. Prod. Rep.* 26:1408-1446.
- 727 Hashimi, S.M., Huang, G., Maxwell, A., and Birch, R.G. 2008. DNA Gyrase from the
728 Albicidin Producer *Xanthomonas albilineans* Has Multiple-Antibiotic-Resistance and
729 Unusual Enzymatic Properties. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:1382-1390.
- 730 Hashimi, S.M., Wall, M.K., Smith, A.B., Maxwell, A., and Birch, R.G. 2007. The
731 Phytotoxin Albicidin is a Novel Inhibitor of DNA Gyrase. *Antimicrob. Agents*
732 *Chemother.* 51:181-187.
- 733 Huang, G., Zhang, L., and Birch, R. 2000. Albicidin antibiotic and phytotoxin
734 biosynthesis in *Xanthomonas albilineans* requires a phosphopantetheinyl transferase
735 gene. *Gene* 258:193-199.
- 736 Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A.,
737 Reid, R., Khosla, C., and Walsh, C.T. 1996. A new enzyme superfamily -- the
738 phosphopantetheinyl transferases. *Chem. Biol.* 3:923-936.
- 739 Lee, B.M. 2005. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*
740 KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Res.* 33:577-586.
- 741 Lindow, S.E., and Brandl, M.T. 2003. Microbiology of the Phyllosphere. *Appl.*
742 *Environ. Microbiol.* 69:1875-1883.
- 743 May, J.J., Kessler, N., Marahiel, M.A., and Stubbs, M.T. 2002. Crystal structure of
744 DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide
745 synthetases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 99:12120-12125.
- 746 Pieretti, I., Royer, M., Barbe, V., Carrere, S., Koebnik, R., Cociancich, S., Couloux,
747 A., Darrasse, A., Gouzy, J., Jacques, M.-A., Lauber, E., Manceau, C., Mangenot, S.,
748 Poussier, S., Segurens, B., Szurek, B., Verdier, V., Arlat, M., and Rott, P. 2009. The
749 complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the
750 reductive genome evolution of the xylem-limited *Xanthomonadaceae*. *BMC Genomics*
751 10:616.

- 752 Quadri, L.E.N., Weinreb, P.H., Lei, M., Nakano, M.M., Zuber, P., and Walsh, C.T.
753 1998. Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* Phosphopantetheinyl Transferase for
754 Peptidyl Carrier Protein Domains in Peptide Synthetases. *Biochemistry* 37:1585-1595.
- 755 Raaijmakers, J.M., de Bruijn, I., and de Kock, M.J.D. 2006. Cyclic Lipopeptide
756 Production by Plant-Associated *Pseudomonas* spp.: Diversity, Activity, Biosynthesis,
757 and Regulation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19:699-710.
- 758 Rott, P., and Davis, M. 2000. Leaf scald. Page 339 in: *A guide to sugarcane diseases*
759 N. S. Iacobellis, Collmer, A., Hutcheson, S.W., Mansfield, J. W., Morris, C. E.,
760 Murillo J., Schaad, N. W., Stead, D.E., Surico, G., and Ullrich, M, eds. Kluwer
761 Academic CIRAD-ISSCTs, Dordrecht, The Netherlands.
- 762 Royer, M., Costet, L., Vivien, E., Bes, M., Cousin, A., Damais, A., Pieretti, I., Savin,
763 A., Megessier, S., Viard, M., Frutos, R., Gabriel, D., and Rott, P. 2004. Albicidin
764 pathotoxin produced by *Xanthomonas albilineans* is encoded by three large PKS and
765 NRPS gene present in a gene cluster also containing several putative modifying,
766 regulatory, and resistance genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17:414-427.
- 767 Saddler, G., and Bradbury, J. 2005. The proteobacteria. in: *Beyrgey's Manual of*
768 *Systematic Bacteriology* N. S. Iacobellis, Collmer, A., Hutcheson, S.W., Mansfield, J.
769 W., Morris, C. E., Murillo J., Schaad, N. W., Stead, D.E., Surico, G., and Ullrich, M,
770 eds. Kluwer Academic Dordrecht, The Netherlands.
- 771 Salzberg, S., Sommer, D., Schatz, M., Phillippy, A., Rabinowicz, P., Tsuge, S.,
772 Furutani, A., Ochiai, H., Delcher, A., Kelley, D., Madupu, R., Puiu, D., Radune, D.,
773 Shumway, M., Trapnell, C., Aparna, G., Jha, G., Pandey, A., Patil, P., Ishihara, H.,
774 Meyer, D., Szurek, B., Verdier, V., Koebnik, R., Dow, J.M., Ryan, R., Hirata, H.,
775 Tsuyumu, S., Won Lee, S., Ronald, P., Sonti, R., Van Sluys, M.-A., Leach, J., White,
776 F., and Bogdanove, A. 2008. Genome sequence and rapid evolution of the rice
777 pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A. *BMC Genomics* 9:204.
- 778 Shen, Y., and Ronald, P. 2002. Molecular determinants of disease and resistance in
779 interactions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice. *Microbes Infect.* 4:1361-
780 1367.

- 781 Sieber, S.A., and Marahiel, M.A. 2005. Molecular Mechanisms Underlying
782 Nonribosomal Peptide Synthesis: Approaches to New Antibiotics. Chem. Rev.
783 105:715-738.
- 784 Soto-Suárez, M., González, C., Piégu, B., Tohme, J., and Verdier, V. 2010. Genomic
785 comparison between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv.
786 *oryzicola*, using suppression-subtractive hybridization. FEMS Microbiol. Lett. 308:16-
787 23.
- 788 Stachelhaus, T., Mootz, H., and Marahiel, M. 1999. The specificity-conferring code of
789 adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. Chem Biol 6:493-505.
- 790 Thomas, M.D., Langston-Unkefer, P.J., Uchytíl, T.F., and Durbin, R.D. 1983.
791 Inhibition of Glutamine Synthetase from Pea by Tabtoxinine- β -lactam. Plant
792 Physiol. 71:912-915.
- 793 Walsh, C.T., Gehring, A.M., Weinreb, P.H., Quadri, L.E.N., and Flugel, R.S. 1997.
794 Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthases.
795 Curr. Opin. Chem. Biol. 1:309-315.
- 796 Wang, L., Makino, S., Subedee, A., and Bogdanove, A.J. 2007. Novel Candidate
797 Virulence Factors in Rice Pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* as Revealed by
798 Mutational Analysis. Appl. Environ. Microbiol. 73:8023-8027.
- 799 Zhu, W., MaGbanua, M.M., and White, F.F. 2000. Identification of Two Novel hrp-
800 Associated Genes in the hrp Gene Cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. J.
801 Bacteriol. 182:1844-1853.
- 802
- 803
- 804
- 805

806 **Table 1.** Similarity between AlbXXI and other PPTases involved in antibiotic and fatty acid biosynthesis in bacteria (from Huang et al., 2000)

Pathways	Proteins	Organisms	Experimentally -determined specificities (A/P) ^a	Domain I	Spacing between domains I and II (in aa)	Domain II	Overall amino acid identities with XabA
Albicidin	XabA	<i>X. albilineans</i> str. LS155	?	GVGIDLERP	--(x)39--	FSAKESLFKAAAY	-
Albicidin	AlbXXI	<i>X. albilineans</i> str. Xa23R1	?	GVGIDLERP	--(x)39--	FSAKESLFKAAAY	278/278 (100%)
Albicidin	AlbXXI	<i>X. albilineans</i> str. GPE PC73	?	GVGIDLERP	--(x)39--	FSAKESLFKAAAY	261/278 (94%)
Unknown	?	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> str. BAI3	?	GIGIDLEHL	--(x)38--	FSAKESLFKASF	110/242 (46%)
Unknown	?	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> str. BLS256	?	GIGIDLEHL	--(x)38--	FSAKESLFKASF	109/219 (50%)
Enterobactin	EntD	<i>E. coli</i> str. K12 substr. MG1655	P ^b	PIGIDIEEI	--(x)36--	FSAKESAFKASE	60/170 (36%)
Mycobactin	PptT	<i>M. tuberculosis</i> str. CSU93	P ^c	SVGIDAEPH	--(x)35--	FCAKEATYKAWF	52/146 (36%)
Gramicidin	Gsp	<i>Bacillus brevis</i> str. ATCC 9999	P ^b	PVGIDIERI	--(x)35--	WTIKESYIKAIG	36/136 (27%)
Surfactin	Sfp	<i>Bacillus subtilis</i> str. RB14	A/P ^b	PIGIDIEKT	--(x)35--	WSMKESFIKQEG	35/133 (27%)
Fatty acids	AcpS	<i>E. coli</i> str. K-12 substr. MG1655	A ^b	GLGTDIVEI	--(x)40--	FAVKEAAAKAFG	No alignment
Fatty acids	AcpT	<i>E. coli</i> str. K12 substr. MG1655	?	EVGCDIEVI	--(x)34--	WTRKEAIVKQRG	No alignment
Fatty acids	AcpS	<i>M. tuberculosis</i> str. CSU93	A ^c	GVGIDLVSI	--(x)41--	WAAKEAVIKAWS	No alignment
Unknown	HetI	<i>X. albilineans</i> str. GPE PC73	?	RLGVDIERQ	--(x)37--	WCAKEALLKAHG	42/124 (34%)
Unknown	HetI	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> str. BAI3	?	RLGVDLERI	--(x)37 --	WCAKEALLKAYG	35/105 (34%)
Unknown	HetI	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> str. BLS256	?	RLGVDLERI	--(x)37 --	WCAKEALLKAYG	42/125 (34%)
				(V/D)G(I/V) D*		(F/W)(S/C/T)xKE (S/A)xxK*	

807 ^a A, specific for acyl carrier protein domains; P, specific for peptidyl carrier protein (PCP) domains.

808 ^b Lambalot et al. (1996).

809 ^c Quadri et al. (1998).

810 *: Consensus signature sequences of PPTase domains as defined by Walsh et al. (1997) and Quadri et al. (1998).

811

Table 2. Domains, signatures sequences and predicted substrates of new NRPS genes identified in the genome of *X. albilineans* strain GPE PC73

	Putative enzymes	Modules	Domains	Signature sequences**	Predicted substrates*	
locus	XALc_1551 (7,543 aa)	NRPS A1	C - A - PCP	DLEHNTTVSK (A8, C3)	Dab	
		NRPS A2	C - A - PCP	DVWHISLVDK (A3, B12)	Serine	
		NRPS A3	C - A - PCP	DVWHISLVDK (A2, B12)	Serine	
		M	NRPS A4	C - A - PCP	DFWNIGMVHK (B3, B7)	Threonine/Dht
		E	NRPS A5	C - A - PCP	DATKVGEVGK (B8, B10, B13, B15, C4)	Asparagine
		T	NRPS A6	C - A - PCP	DALFLGGTFK	Valine
		A	NRPS A7	C - A - PCP	DAFTVAAVCK (C2)	Phenylalanine
locus	XALc_1550 (5,550 aa)	NRPS A8	C - A - PCP	DLEHNTTVSK (A1, C3)	Dab	
		NRPS A9	C - A - PCP	DSLILGTQFK (B1)	Unknown1	
		NRPS A10	C - A - PCP	DALLLGCTIK (C6)	Unknown5	
		NRPS A11	C - A - PCP	DAEDIGTVVK (B4, B6)	Unknown2	
		NRPS A12	C - A - PCP - TE	DASTVAAVCK (B9, B11)	Tyrosine	
locus	XALc_1058 (4,562 aa)	NRPS B1	C - A - PCP	DSLILGTQFK (A9)	Unknown1	
		NRPS B2	C - A - PCP	DVWHVSLVDK	Serine	
		NRPS B3	C - A - PCP	DFWNIGMVHK (A4, B7)	Threonine / Dht	
		NRPS B4	C - A - PCP - TE	DAEDIGTVVK (A11, B6)	Unknown 2	
locus	XALc_1057 (2,126 aa)	NRPS B5	C - A - PCP	DILQLGLIWK (E)	Glycine	
		NRPS B6	C - A - PCP	DAEDIGTVVK (A11, B4)	Unknown 2	
locus	XALc_1056 (10,708 aa)	NRPS B7	C - A - PCP	DFWNIGMVHK (A4, B3)	Threonine / Dht	
		NRPS B8	C - A - PCP	DATKVGEVGK (A5, B10, B13, B15, C4)	Asparagine	
		NRPS B9	C - A - PCP	DASTVAAVCK (A12, B11)	Tyrosine / Bht	
		NRPS B10	C - A - PCP	DATKVGEVGK (A5, B8, B13, B15, C4)	Asparagine	
		NRPS B11	C - A - PCP	DASTVAAVCK (A12, B9)	Tyrosine / Bht	
		NRPS B12	C - A - PCP	DVWHISLVDK (A2, A3)	Serine	
		NRPS B13	C - A - PCP	DATKVGEVGK (A5, B8, B10, B15, C4)	Asparagine	
		NRPS B14	C - A - PCP	DLTKVGHVVK	Aspartic acid	
		NRPS B15	C - A - PCP	DATKVGEVGK (A5, B8, B10, B13, C4)	Asparagine	
NRPS B16	C - A - PCP	DSLIIIGTQFK	Unknown1			
locus	XALc_1055 (608 aa)		TE - TE			
locus	XALc_0772 (7,763 aa)	NRPS C1	C - A - PCP	DLKNVGSVVK	Unknown4	
		NRPS C2	C - A - PCP	DAFTVAAVCK (A7)	Phenylalanine	
		NRPS C3	C - A - PCP	DLEHNTTVSK (A1, A8)	Dab	
		NRPS C4	C - A - PCP	DATKVGEVGK (A5, B8, B10, B13, B15)	Asparagine	
		NRPS C5	C - A - PCP	DLYNNCLTYK	Alanine	
		NRPS C6	C - A - PCP	DALLLGCTIK (A10)	Unknown5	
		NRPS C7	C - A - PCP - TE	DAWQFGLIDK	Glutamine	
short gene	XALc_1145 (1,326 aa)	NRPS D	C - A - PCP - TE	DMLELGMVVK	Unknown6	
short gene	XALc_0364 (1,349 aa)	NRPS E	C - A - PCP - TE	DILQLGLIWK (B5)	Glycine	

C: Condensation domain; A: Adenylation domain, PCP: Peptidyl carrier protein domain, TE: Thioesterase domain, Dab: di-amino butyric acid, Dht: dihydroxytryptamine, Bht: β -hydroxytyrosine.

*Unknown substrates with a same signature are followed by a same number.

** Other modules of *X. albilineans* harboring the same signature sequence are indicated in brackets.

Table 3. Domains, signatures sequences and predicted substrates of the NRPS genes identified in the genome of *Bradyrhizobium* sp. BTAi sharing homology with new NRPS genes of *X. albilineans*

Putative enzymes	Modules	Domains	Signature sequences**	Predicted substrates *
	NRPS Bb1	C - A - PCP	DAWFLGNVVK (Bb8, Bb9, Bb14)	Leucine
Bbta_6814 (9,646 aa)	NRPS Bb2	C - A - PCP	DVWHMSLVDK (Bb7, Bb11, Bb12, Xo12)	Serine
	NRPS Bb3	C - A - PCP	DICNNGLVYK (Bb6)	Unknown
	NRPS Bb4	C - A - PCP	DAMWLGSTFK (Bb5, Bb13)	Valine
	NRPS Bb5	C - A - PCP	DAMWLGSTFK (Bb4, Bb13)	Valine
	NRPS Bb6	C - A - PCP	DICNNGLVYK (Bb3)	Unknown
	NRPS Bb7	C - A - PCP	DVWHMSLVDK (Bb2, Bb11, Bb12, Xo12)	Serine
	NRPS Bb8	C - A - PCP	DAWFLGNVVK (Bb1, Bb9, Bb14)	Leucine
	NRPS Bb9	C - A - PCP	DAWFLGNVVK (Bb1, Bb8, Bb14)	Leucine
Bbta_6813 (4,383 aa)	NRPS Bb10	C - A - PCP	DFWNIGMVHK (A4, B3, B7 , Xo9)	Threonine / Dht
	NRPS Bb11	C - A - PCP	DVWHMSLVDK (Bb1, Bb7, Bb12, Xo12)	Serine
	NRPS Bb12	C - A - PCP	DVWHMSLVDK (Bb1, Bb7, Bb11, Xo12)	Serine
Bbta_6812 (2,370 aa)	NRPS Bb13	C - A - PCP	DAMWLGSTFK (Bb4, Bb5)	Valine
	NRPS Bb14	C - A - PCP - TE	DAWFLGNVVK (Bb1, Bb8, Bb9)	Leucine

C: Condensation domain; A: Adenylation domain, PCP: Peptidyl carrier protein domain, TE: Thioesterase domain, Dht: dihydroxytryptamine.

*Unknown substrates with a same signature are followed by the same number.

** Other modules of *X. albilineans* (see Table 2), *X. oryzae* pv. *oryzae* (see Table 4) or *Bradyrhizobium* sp. BTAi harboring the same signature sequence are indicated in brackets.

Modules of *X. albilineans* are in bold.

814

815 **Table 4.** Domains, signatures sequences and predicted substrates of the NRPS genes present in the gene cluster META-B of *X. oryzae* pv. *oryzae* strain BAI3

Putative enzymes	Modules	Domains	Signature sequences**	Predicted substrates*
orf1 (4,828 aa)	NRPS Xo1	C - A - PCP	DSLIVGTQFK (Xo3)	Unknown1
	NRPS Xo2	C - A - PCP	DIDNVGASGK	Unknown3
	NRPS Xo3	C - A - PCP	DSLIVGTQFK (Xo1)	Unknown1
	NRPS Xo4	C - A - PCP - TE - TE	DLKNVGSVDK	Unknown4
orf2 (????aa)	NRPS Xo5	C - A - PCP	DILQLGLIWK (B5, E)	Glycine
	NRPS Xo6	C - A - PCP	DAQYLAYVAK	Tyrosine
?	NRPS Xo7	C - A - PCP	DAEDIGTVVK (A11, B4, B6)	Unknown2
?	?	?	?	?
	NRPS Xo8	C - A - PCP	DATKVGEVGK (A5, B8, B10, B13, B15, C4, Xo13)	Asparagine
	NRPS Xo9	C - A - PCP	DFWNIGMVHK (A4, B3, B7, Bb10)	Threonine / Dht
	NRPS Xo10		DASTVAAVCK (A12, B9, B11)	Tyrosine
	NRPS Xo11		DAMFLGCTFK	Isoleucine
	NRPS Xo12	C - A - PCP	DVWHMSLVDK (Bb1, Bb7, Bb11, Bb12)	Serine
?	?	?	?	?
	NRPS Xo13	C - A - PCP	DATKVGEVGK (A5, B8, B10, B13, B15, C4, Xo8)	Asparagine
	NRPS Xo14	C - A - PCP	DVWHISLVDK (A2, A3, B12)	Serine
	NRPS Xo15	C - A - PCP	DSLILGTQFK (A9, B1)	Unknown1

C: Condensation domain; A: Adenylation domain, PCP: Peptidyl carrier protein domain, TE: Thioesterase domain.
Dht: dihydroxytryptamine.

*Unknown substrates with a same signature are followed by the same number.

**Other modules of *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. albilineans* (See Table 2) or *Bradyrhizobium* sp. BTAi (See Table 3) harboring the same sequence signature are indicated in brackets.

?: Presence of these modules have to be confirmed before submission of the manuscript.

(????aa): Size of orf2 have to be confirmed before submission of the manuscript

816 **Table 5.** Comparison of percentage of leaves allowing the recovery of bacteria in
 817 samples from leaves inoculated with the wild type *X. oryzae* pv. *oryzae* strain BAI3 (wt)
 818 and the insertional knockout mutant of this strain ($\Delta albXXI$) on three different rice
 819 cultivars. Values are percentage of samples allowing bacteria recovery in 25 plants
 820 inoculated by leaf-clipping (1sample/1 leaf/plant). There is no data available for the *O.*
 821 *glaberrima* inoculation at 6 weeks.

822

Percentage of plants allowing bacteria recovery						
Rice cultivars	<i>O. sativa</i> cv. IR24		<i>O. sativa</i> cv. Azucena		<i>O. glaberrima</i> cv. TOG542	
	wt	$\Delta albXXI$	wt	$\Delta albXXI$	wt	$\Delta albXXI$
2 weeks-old plants	20	68	32	60	26	60
Percentage of the variation of the percentage of plants allowing bacteria recovery (mutant vs wild type)	$(68-20)/20$ = +240%		$(60-32)/32$ = 88%		$(60-26)/26$ = 131%	
6 weeks-old plants	20	68	76	88	-	-
Percentage of the variation of the percentage of plants allowing bacteria recovery (mutant vs wild type)	$(68-20)/20$ = +240%		$(88-76)/76$ = 16%		-	

823

824

825

826 **Table 6.** Comparison of the length of the lesions on leaves inoculated with the
 827 wild type *X. oryzae* pv. *oryzae* strain BAI3 (wt) and the insertional knockout mutant of
 828 this strain ($\Delta albXXI$) on three different rice cultivars. Values are an average of measures
 829 on 25 plants inoculated by leaf-clipping (1 leaf/plant).

830

Average length of the lesions (cm)						
Rice cultivars	<i>O. sativa</i> cv. IR24		<i>O. sativa</i> cv. Azucena		<i>O. glaberrima</i> cv. TOG542	
	wt	$\Delta albXXI$	wt	$\Delta albXXI$	wt	$\Delta albXXI$
2 weeks-old plants	0.66	2.52	2.04	3.42	3.00	4.58
Percentage of the variation of lesion length (mutant vs wild type)	$(2.52-0.66)/0.66$ = +281%		$(3.42-2.04)/2.04$ = +68%		$(4.58-3.00)/3.00$ = +53%	
6 weeks-old plants	0.32	0.84	4.94	5.98	0.60	1.04
Percentage of the variation of lesion length (mutant vs wild type)	$(0.84-0.32)/0.32$ = +162%		$(5.98-4.94)/4.94$ = +21%		$(1.04-0.60)/0.60$ = +73%	

831

832

833 **Table 7.** Bacterial population densities in sugarcane stalks inoculated with *X.*
 834 *albilineans* strain GPE PC73, *albI* deletion knockout mutant of *X. albilineans* strain
 835 GPE PC73, and *albXXI* deletion knockout mutant of *X. albilineans* strain GPE PC73.
 836 Data were determined two months after inoculation. In a same column, cfu values
 837 followed by the same letter are not significantly different at P=0.05 (Test of Tuckey).

838

839

840

841

842

843

Bacterial population densities (cfu/g of fresh weight)						
strain	stalk-top (+4th node)		stalk-inoc		stalk-below (-2th node)	
GPE PC73	4×10^7	a	1×10^7	a	9×10^5	a
<i>albI</i> mutant	2×10^6	b	1×10^7	a	3×10^6	a
<i>albXXI</i> mutant	8×10^3	c	3×10^5	b	5×10^5	a

844 **FIGURE CAPTIONS**

845 **Fig. 1.** Physical map of the genomic region containing the PPTase gene *albXXI*
 846 in *X. oryzae* strains and of the corresponding region in other sequenced Xanthomonads
 847 and in *Xylella fastidiosa*. In these latter species, this region contains the same tRNA and
 848 the same genes *vipA* and *pgsA*, but not the PPTase gene *albXXI*.

849 *vipA*: probable UDP-glucose/GDP-mannose dehydrogenase gene.

850 *pgsA*: probable CDP-diacylglycerol-glycerol-3-phosphate3-
 851 phosphatidyltransferase gene.

852 *nrps1* and *nrps2*: Nonribosomal peptide synthetase genes of *X. oryzae* pv.
 853 *oryzicola* which are partially conserved in *X. axonopodis* pv. *citri*.

854 : tRNA. Amino acid that indicates the nature of this tRNA. Orientation of the
 855 tag indicates the orientation of the tRNA in the genomic regions.

856

857 **Fig. 2. A.** Representation of the gene clusters META-A and META-C of *X.*
 858 *albilineans* strain GPE PC73 and of the NRPS locus of *Bradyrhizobium* sp. BTAi which
 859 share homology with META-A and META-C. The large circle indicates a complete
 860 NRPS module (domains C, A and PCP). Large circles with the same color belong to the
 861 same group in the phylogenetic tree reconstructed with the amino acid sequences of C
 862 domains and presented in B. Amino acid predicted to be activated by the corresponding
 863 A domain in each module are indicated within each circle (See also tables 2 and 3).
 864 Small circles represent TE domains. **B.** Tree reconstructed with the amino acid
 865 sequences of C domains using the maximum likelihood method and GTR as the
 866 substitution model. Bootstrap percentages retrieved in 1,000 replications and >80% are
 867 shown at the nodes. The scale bar (0.2) indicates the number of nucleotide substitutions
 868 per site.

869

870 **Fig. 3.** Representation of the gene clusters META-B of *X. albilineans* strain GPE
 871 PC73 (XaMETA-B) and *X. oryzae* pv. *oryzae* strain BAI3 (XooMETA-B). Genes
 872 represented by boxes are associated with NRPS genes. Amino acid identity (%) of these
 873 genes between both strains is indicated below each gene. The NRPS genes are

874 represented by circles. A large circle indicates a complete NRPS module (domains C, A
875 and PCP). Large circles with the same color belong to the same group in a phylogenetic
876 tree reconstructed with the amino acid sequences of C domains (this tree is presented in
877 supplemental data 2). Amino acid predicted to be activated by the corresponding A
878 domain in each module is indicated within each circle (See also tables 2 and 4). Circles
879 with dotted lines indicate modules which were not completely identified in the draft
880 sequence of the genome of *X. oryzae* pv. *oryzae* strain BAI3. Small circles represent TE
881 domains. Box with dotted lines indicate a pseudogene containing a nonsense and a
882 frameshifting mutations.

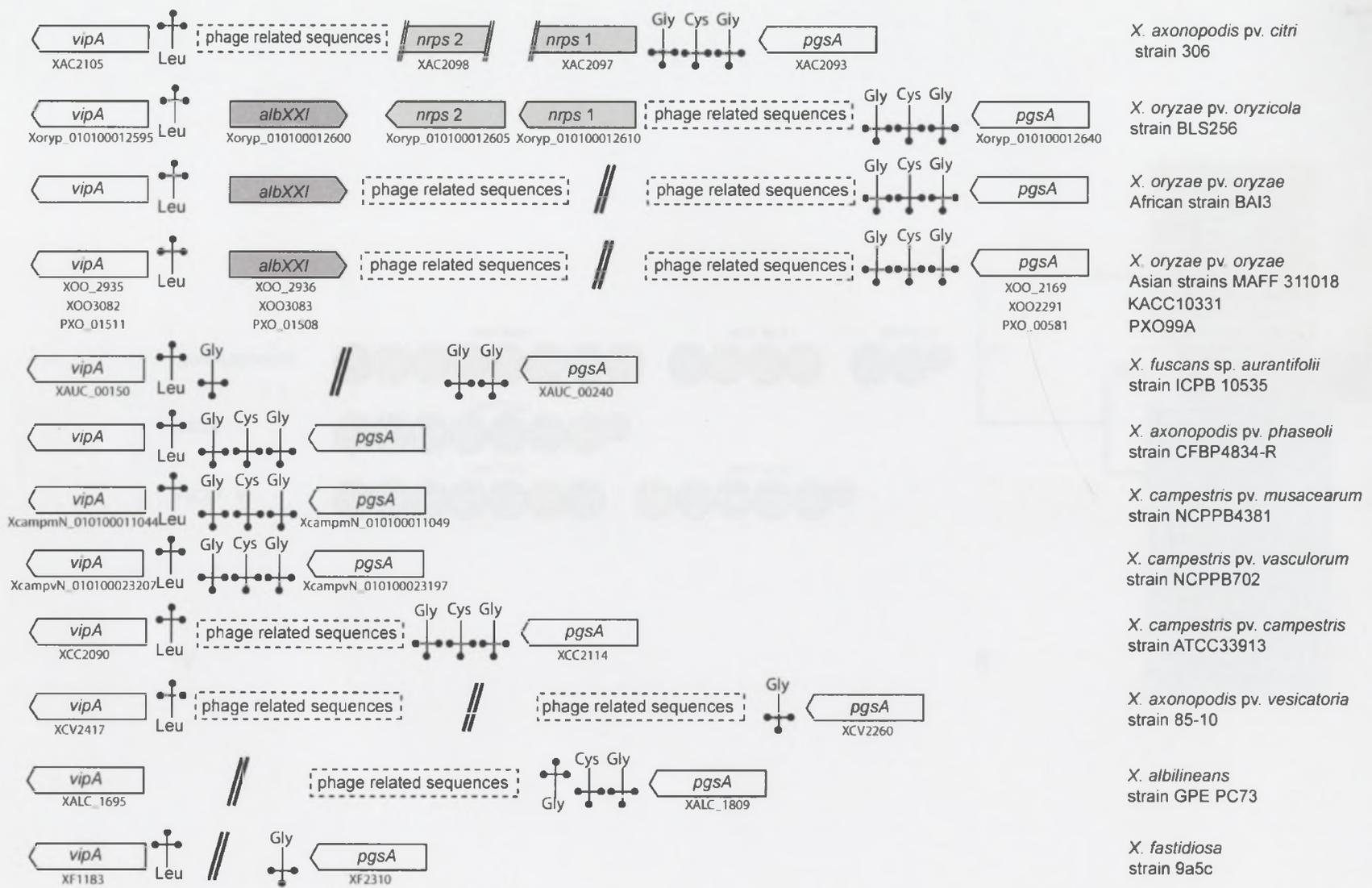
883

884

885

886

Fig. 1



890

Fig. 2

891

892

893

A

META - A



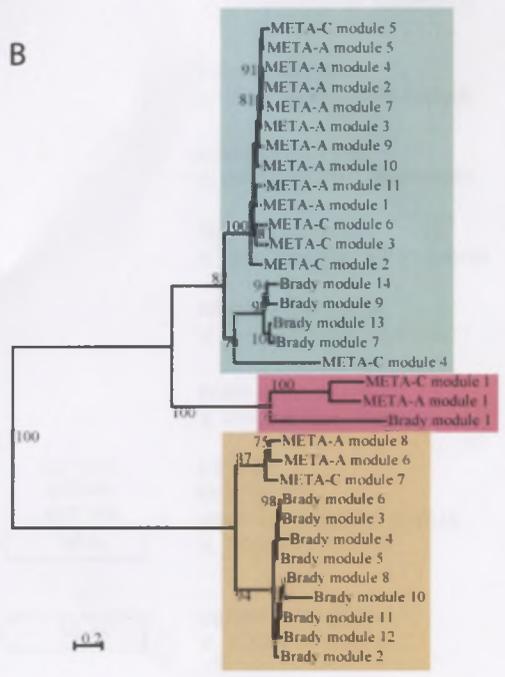
META - C



Bradyrhizobium



B



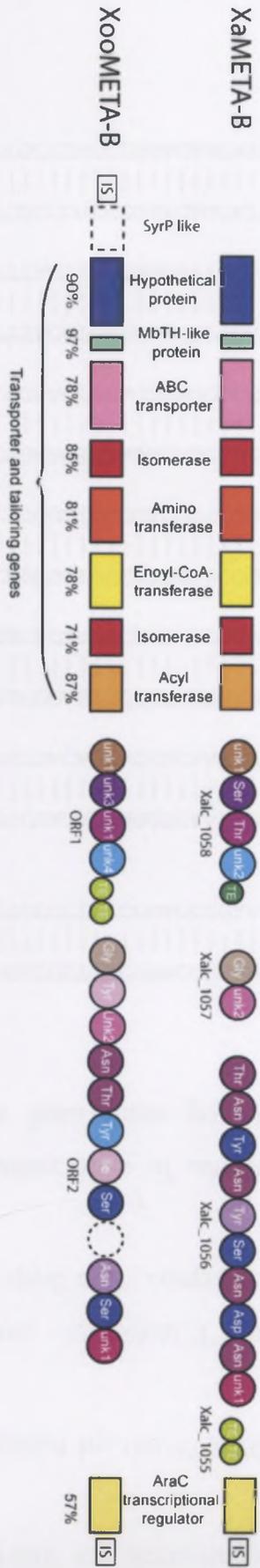
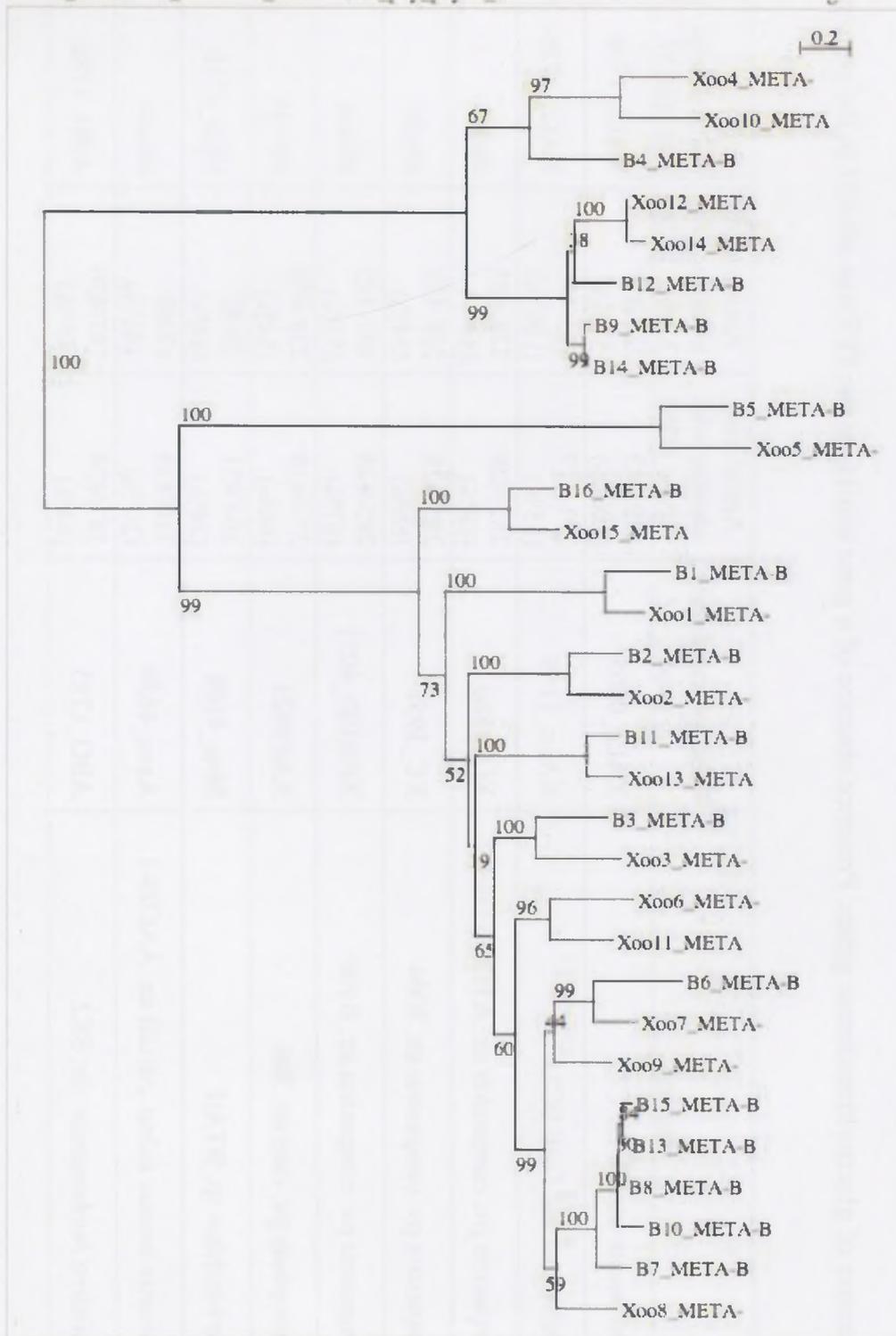


Fig. 3

937 **Supplemental data 2.** Tree reconstructed with C-domains of XooMETA-B and
 938 XaMETA-B using the maximum likelihood method and LG as the substitution model.



939

940 **Supplemental data 3:** Comparison of short NRPS genes and their associated overlapping glucosyltransferase genes of *X.*
 941 *albilineans* strain GPE PC73 with similar genes present in the genome of other bacteria.

942

943 **A.** Comparison of glucosyltransferase genes. Presence/absence of a gene similar to the PPTase *albXXI* in the genome of other
 944 bacteria.

Bacteria	Glucosyltransferase gene	Amino acid identity with XALc 0365	Amino acid identity with XALc 1144	Gene similar to <i>albXXI</i>
<i>X. albilineans</i> str. GPE PC73	XALc_0365	442/442 (100 %)	221/417 (53%)	XALc_1736
<i>X. albilineans</i> str. GPE PC73	XALc_1144	221/417 (53%)	445/445 (100 %)	XALc_1736
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC 33913	XCC3866	285/428 (68%)	228/425 (54%)	absent
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. 8004	XC_3951	285/428 (68%)	228/425 (54%)	absent
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. B100	Xccb100_4051	285/428 (67%)	231/425 (55%)	absent
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306	XAC3921	273/418 (66%)	223/420 (54%)	absent
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	Bbta_4109	104/451 (24%)	19/42 (46%)	Bbta_3710
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> str. AAC00-1	Aave_4659	110/435 (29 %)	17/42 (41%)	absent
<i>Alcanivorax borkumensis</i> str. SK2	ABO_1783	183/424 (44%)	187/420 (45 %)	ABO_1782

945

946

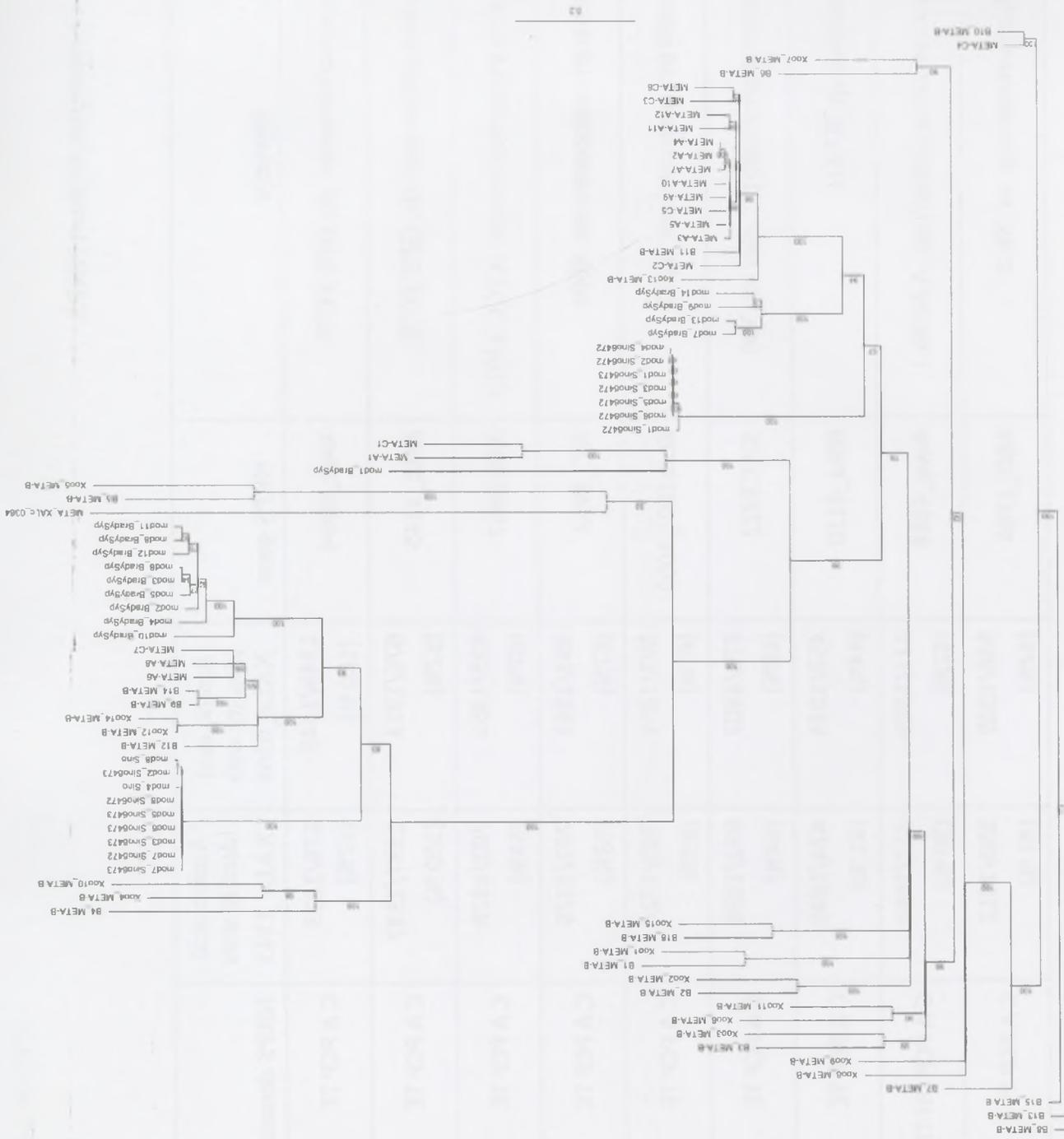
947

B. Comparison of short NRPS.

948

Bacteria	NRPS gene	Amino acid identity with XALc_0364	Amino acid identity with XALc_1145	NRPS domains	Signatures
<i>Xanthomonas albilineans</i> str. GPE PC73	XALc_0364	1349/1349 (100 %)	676/1313 (52%)	C A PCP TE	DILQLGLIWK (Gly)
<i>Xanthomonas albilineans</i> str. GPE PC73	XALc_1145	676/1313 (52%)	1337/1337 (100 %)	C A PCP TE	DMLEELGMVWK (Unk)
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC 33913	XCC3867	893/1351 (67%)	702/1328 (53%)	C A PCP TE	DILQLGLIWK (Gly)
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. 8004	XC_3952	893/1351 (67%)	702/1328 (53%)	C A PCP TE	DILQLGLIWK (Gly)
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> str B100	Xccb100_4052	893/1351 (67%)	700/1324 (53%)	C A PCP TE	DILQLGLIWK (Gly)
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306	XAC3922	873/1302 (68%)	692/1305 (54%)	C A PCP TE	DILQLGLIWK (Gly)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	Bbta_4110	452/1033 (44%)	424/1040 (41 %)	C A PCP TE	DAMLIGAICK (Unk)
<i>Acidovorax avenae</i> sp. <i>citrulli</i> str. AAC00-1	Aave_4658	427/1039 (42%)	412/1081 (39 %)	C A PCP DH TE	DVWHVSLVDK (Ser)
<i>Alcanivorax borkumensis</i> str. SK2	ABO_1784	536/1305 (42%)	550/1312 (42 %)	C A PCP TE	DILQLGLIWK (Gly)

949 Supplemental data 4. NJ phylogenetic tree reconstructed with C domains of
 950 modules of META-A (A1 META-A to A12 META-A), of META-C (C1 META-C
 951 to C7 META-C), of XaMETA-B (B1 META-B to B16 META-B), of XooMETA-B
 952 (Xo01 META-B to Xo015 META-B), XALc_0364, of *Bradyrhizobium* sp. BTA!
 953 (mod1 BradySyp to mod14 BradySyp) and of *Sinorhizobium medicae*
 954 (mod1_Sino6472 to mod8_Sino6472 and mod1_Sino6473 to mod8_Sino6473).



957 **Supplemental data 5.** Sequence of primers used to construct the mutants of
 958 *Xanthomonas albilineans* strain GPE PC73 and *X. oryzae* pv. *oryzae* strain BAI3.

959

Primer name	Sequence	<i>T_m</i> (°C)
XaPPT A	CCAGATCTGTGGTGATGATCGGAGTGCT	62
XaPPT B	TACCGACCAAGGTTGACCTTCACAGAACAGTCGGAACCCGCCAA	62
XaPPT C	TGTGAAGGTCAACCTTGGTCGGTATGAGCTTGTCATTGGCCAAG	62
XaPPT D	CCAGATCTGAATAGGACGGGATTGGAT	62
XaPPTscreen1	CCTTTCGGATGTGGCCCAAG	62
XaPPTscreen2	CCAGATCTAGCGTGGAGACACGGAACAT	62
albl F	CCAGATCTCATCGATACGCGACTGGACA	62
albl R	CCAGATCTACTTGAGGCTATGGCGGCC	62
albl screen1	CGGAGGCATCGCTGAATGAT	62
albl screen2	GGCTGTGTGATCCACAATTC	62
albl screen3	CAACACTAGCTGCCTGACCA	62
albl screen4	TGCACTTCAGAGGTGTCGAC	62
XooPPT F	CCACTAGTATCGCCTGAACAACCAGAT	62
XooPPT R	CCCTCGAGAAGTAATCTTGCGGATGTCG	62
XooPPT screen	AGGTGCCAGCGGTAATGAT	55
ProR	TTCACGGGTTGGGGTTTCTAC	62

960

961

962

963

Strain	Gene	Phenotype
1	NRPS1	...
2	NRPS2	...
3	NRPS3	...
4	NRPS4	...
5	NRPS5	...
6	NRPS6	...
7	NRPS7	...
8	NRPS8	...
9	NRPS9	...
10	NRPS10	...
11	NRPS11	...
12	NRPS12	...
13	NRPS13	...
14	NRPS14	...
15	NRPS15	...
16	NRPS16	...
17	NRPS17	...
18	NRPS18	...
19	NRPS19	...
20	NRPS20	...

3 Conclusion et perspectives

Le séquençage et l'annotation du génome de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs nouveaux clusters de gènes NRPS. L'absence remarquable de SST3 Hrp dans le génome de *X. albilineans* laisse supposer que les interactions de cette bactérie avec les cellules de la canne à sucre reposent sur d'autres systèmes de sécrétion. Les petites molécules synthétisées par les NRPS, qui sont sécrétées par des pompes d'efflux, pourraient intervenir dans ces interactions. Plusieurs petites molécules produites par des NRPSs ont été décrites comme jouant un rôle important dans la pathogénie de bactéries phytopathogènes. L'objectif de cette étude était de déterminer si les nouveaux gènes NRPS identifiés dans le génome de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* jouent un rôle dans le pouvoir pathogène de cette bactérie pathogène de la canne à sucre.

L'analyse *in silico* de ces gènes NRPS a permis de proposer plusieurs hypothèses concernant les voies de biosynthèse impliquant ces gènes et la structure des petites molécules synthétisées qui, d'après cette analyse, ne ressemblent à aucune autre petite molécule décrite à ce jour. Ces données théoriques, bien que partielles, sont très utiles pour la mise au point de protocoles de purification et pour la caractérisation de la structure chimique de ces petites molécules.

L'analyse fonctionnelle du mutant *albXXI* de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* a permis de montrer que les gènes NRPS de cette bactérie sont impliqués dans la biosynthèse d'au moins deux petites molécules intervenant dans la pathogénie : (i) l'albicidine, qui est responsable de l'induction de symptômes foliaires, et (ii) une ou plusieurs petite(s) molécule(s) inconnue(s) nécessaire(s) à la multiplication optimale de la bactérie dans le xylème caulinaire de la canne à sucre. Le rôle de ces petites molécules inconnues reste à déterminer.

L'analyse fonctionnelle du mutant *albXXI* de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* a été réalisée chez une variété de canne à sucre très sensible à l'échaudure des feuilles (variété CP68-1026, Figure 31). Cette analyse indique que ces petites molécules sont nécessaires pour l'invasion de la partie supérieure du xylème caulinaire

de cette variété. Il est intéressant de noter que la résistance variétale à l'échaudure des feuilles est liée à la capacité de *X. albilineans* à envahir cette même partie du xylème caulinaire (Mohamed 1995 ; Rott et al. 1997 ; Figure 31). La résistance variétale pourrait donc être liée à la fonction de ces petites molécules. Chez les variétés sensibles, la fixation de ces petites molécules à une protéine de la canne à sucre permettrait de bloquer les mécanismes de défense de la plante ou de contourner le métabolisme des cellules de la canne à sucre au profit de la bactérie. La résistance variétale serait liée à une action moins efficace de ces petites molécules. Pour valider cette hypothèse, nous avons réalisé une analyse fonctionnelle du mutant *albXXI* de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* chez une variété tolérante (R570) à l'échaudure des feuilles et une variété sensible (B69566) (Figure 31). Les résultats de cette étude seront très prochainement disponibles.

Par ailleurs, les taux de saccharose dans la sève brute sont plus faibles dans les parties supérieures du xylème caulinaire que dans les parties inférieures (Dong et al., 1997). Les petites molécules pourraient avoir des propriétés surfactantes et ainsi participer à la formation de pores à travers la membrane plasmique, facilitant l'accès de la bactérie aux sources de nutriments présents dans les cellules de la canne à sucre. Ces petites molécules seraient nécessaires à la bactérie surtout dans la partie du xylème caulinaire pauvre en saccharose. Les données théoriques indiquant que ces petites molécules seraient des peptides cycliques liés à un substrat non peptidique sont en accord avec cette hypothèse.

La découverte du cluster META-B de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* chez la souche BAI3 de *X. oryzae* pv. *oryzae* nous a permis d'étudier ce cluster de gènes NRPS dans un autre pathosystème. L'analyse fonctionnelle du mutant *albXXI* de la souche BAI3 de *X. oryzae* pv. *oryzae* montre que META-B est impliqué dans la biosynthèse d'une petite molécule sécrétée par la bactérie et capable d'induire les mécanismes de défense du riz. Cette étude préliminaire doit impérativement être complétée par l'étude du mutant *albXXI* transformé avec un plasmide contenant le gène *albXXI* de *X. albilineans*. Cette étude complémentaire est indispensable pour démontrer non seulement que le phénotype observé avec le mutant *albXXI* est bien lié à l'interruption de l'expression de ce gène, mais également pour démontrer que le gène

albXXI de *X. oryzae* pv. *oryzae* a la même fonction que le gène *albXXI* de *X. albilineans* (activation spécifique des sites PCP des NRPS). Cette étude complémentaire est programmée pour la deuxième quinzaine du mois de décembre 2010.

L'analyse *in silico* du cluster META-B de la souche BAI3 de *X. oryzae* pv. *oryzae* indique que la petite molécule synthétisée par ce cluster a probablement une structure très proche de celle synthétisée par le cluster META-B de *X. albilineans* (les enzymes de modification et le transporteur ABC sont très conservés chez les deux espèces). Cependant, la séquence du peptide assemblé par les NRPS chez les deux espèces est différente.

Une autre molécule synthétisée par des NRPSs est également capable d'induire les mécanismes de défenses du riz. Il s'agit de la syringoline qui est un lipopeptide produit par *P. syringae*. Il a été montré que l'application de la syringoline sur des feuilles de riz induit une résistance au champignon pathogène *Magnaporthe oryzae* (Waspi et al. 1998). De même, l'application de la syringoline sur des feuilles de blé induit une résistance à l'agent causal de l'oïdium (Waspi et al. 2001; Michel et al. 2006). La syringoline serait un des déterminants moléculaires de *P. syringae* dont la reconnaissance par les mécanismes de défense du riz expliquerait que *P. syringae* soit incapable d'infecter le riz. Chez le haricot, la syringoline est un facteur de virulence qui permettrait à *P. syringae* de contourner les mécanismes de défense probablement en inhibant le protéasome (Groll et al. 2008).

La prochaine étape de cette étude aura pour objectif la purification et la caractérisation des petites molécules synthétisées par META-B ou par les autres loci NRPS de la souche GPE PC73 de *X. albilineans*. Plusieurs approches basées sur l'analyse différentielle des surnageants de culture de la souche sauvage GPE PC73 de *X. albilineans* vs les surnageants de culture de mutants affectés dans la production de ces petites molécules sont actuellement développées dans notre équipe. Cette analyse différentielle porte à la fois sur l'analyse chimique de ces surnageants, mais également sur l'étude des activités biologiques de ces surnageants. Ces approches, qui sont décrites en détail dans la discussion générale, sont développées en collaboration avec l'équipe du Professeur Roderich Süßmuth de l'Université Technique de Berlin dans le

cadre d'un projet Franco-Allemand co-financé par l'ANR (Agence Nationale de la Recherche) et la DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft).

Chapitre 4
Discussion et perspectives

X. albilineans est l'agent causal de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre. Cette bactérie présente des particularités au sein du genre *Xanthomonas* et de la famille des *Xanthomonadaceae*. Cet agent pathogène, dont le spectre d'hôte est limité à quelques *Poacées*, colonise uniquement le xylème. *X. albilineans* se distingue donc des autres espèces de *Xanthomonas* comme *X. campestris* pv. *campestris* ou *X. oryzae* pv. *oryzae* qui, bien qu'également xylémiques, sont capables d'infecter d'autres tissus de la plante. *X. albilineans* se distingue également de *X. fastidiosa* qui, bien qu'aussi limitée au xylème, est capable d'infecter une très large gamme de plantes hôtes. Le séquençage et l'annotation du génome de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* ont permis de révéler d'autres particularités. *X. albilineans* partage des caractéristiques génomiques particulières avec *X. fastidiosa* (érosion du génome, absence de SST3 Hrp et présence de gènes codant des cellulases spécifiques probablement adaptées à la vie dans le xylème). Mais *X. albilineans* présente aussi des caractéristiques génomiques qui lui sont propres : (i) elle ne possède pas les gènes *gum* jouant un rôle très important dans la pathogénie des autres espèces de *Xanthomonas* et de *X. fastidiosa*, (ii) elle possède un cluster de gènes codant un SST3 SPI-1 connu généralement pour être impliqué dans des interactions avec un hôte animal, et (iii) elle possède plusieurs clusters de gènes codant des enzymes NRPS impliquées dans la biosynthèse non ribosomale de petites molécules. A ce jour, nous ne disposons que d'informations limitées sur le cycle de vie de *X. albilineans* en dehors du xylème de ses plantes hôtes et sur les mécanismes moléculaires qui permettent à cette bactérie d'envahir le xylème de la canne à sucre. La découverte de nouveaux clusters de gènes dans le génome de *X. albilineans* ouvre ainsi de nouvelles voies de recherches.

X. albilineans est-elle associée à un insecte ?

La première partie de nos travaux a porté sur le SST3 SPI-1 de *X. albilineans*. Nous avons montré que ce système n'est pas nécessaire à la multiplication de la bactérie *in planta*, ni à l'induction de symptômes chez la canne à sucre. Nous avons étudié la variabilité du SST3 SPI-1 au sein de souches représentatives de la diversité génétique de *X. albilineans*. Les résultats de cette étude suggèrent que le SST3 SPI-1 est maintenu au sein de l'espèce *X. albilineans*. En conséquence, ce SST3 SPI-1 joue-

t-il un rôle dans l'association de *X. albilineans* avec un insecte ? Cette association a-t-elle une importance dans la transmission de *X. albilineans* de plante à plante ?

L'association de *X. albilineans* avec un insecte pourrait être profitable non seulement à la bactérie mais également à l'insecte. Les bactéries associées aux insectes se nourrissant de sève du xylème sont très souvent des symbiotes obligatoires qui fournissent à l'insecte les éléments nutritifs absents de la sève (Moran 2007). Certaines bactéries symbiotes facultatifs participent également à l'assimilation de nourriture chez les insectes herbivores (Lundgren et Lehman 2010). Grâce à ses enzymes de dégradation comme les cellulases, *X. albilineans* pourrait dégrader les débris végétaux présents dans la sève brute en produits directement assimilables pour un insecte hôte. L'albicidine pourrait également jouer un rôle important dans une association de *X. albilineans* avec un insecte en supprimant ou en limitant l'action de bactéries pathogènes pour cet insecte.

Ces différentes hypothèses ne pourront pas être explorées tant qu'un insecte vecteur de *X. albilineans* n'aura été identifié. Le criblage d'une vingtaine d'insectes collectés récemment dans un champ de canne à sucre en Guadeloupe n'a pas permis l'identification d'un tel insecte vecteur (Monique Royer, communication personnelle). Un criblage à plus grande échelle permettrait d'augmenter la probabilité d'identifier un tel vecteur.

Les mégaenzymes NRPS ont-elles un rôle dans la vie de *X. albilineans* en dehors du xylème de ses plantes hôtes?

La seconde partie de notre travail a porté sur les gènes NRPS de la souche GPE PC73 de *X. albilineans*. Nous nous sommes notamment intéressés au cluster de gènes NRPS META-B conservé chez *X. albilineans* et *X. oryzae* pv. *oryzae*. Nous avons montré que, chez la souche BAI3 de *X. oryzae* pv. *oryzae*, le cluster de gènes META-B est impliqué dans la biosynthèse d'une petite molécule sécrétée par la bactérie et capable d'induire des mécanismes de défense du riz. Il s'avère donc que la production de cette petite molécule, et donc la présence de META-B dans le génome de *X. oryzae* pv. *oryzae*, ne sont pas favorables à la vie *in planta* de cette bactérie (dans le xylème

du riz). La présence du cluster de gènes META-B dans le génome de la souche BAI3 de *X. oryzae* pv. *oryzae* pourrait donc être liée, non pas à la pathogénie de la bactérie, mais à sa vie en dehors du xylème de la plante hôte. Le cluster de gènes META-B de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* pourrait avoir un rôle similaire et intervenir dans la vie de la bactérie en dehors du xylème de la canne à sucre. Les petites molécules produites par voie non ribosomale jouent un rôle important dans la vie de certaines bactéries phytopathogènes en dehors de leur plante hôte. Ainsi, chez *P. syringae*, il a été proposé que la biosynthèse de ces petites molécules permette à la bactérie de s'adapter aux divers environnements qu'elle colonise (Gross et Loper, 2009).

Chez *P. syringae*, la mangotoxine a un pouvoir antibiotique qui, au cours de la vie épiphyte, confère à la bactérie un avantage sélectif sur les bactéries concurrentes et lui assure ainsi un accès privilégié aux nutriments nécessaires à sa survie. L'albicidine, de par ses propriétés antibiotiques, pourrait jouer un rôle similaire chez *X. albilineans*. Les petites molécules synthétisées par le cluster de gènes META-B ou par les autres clusters de gènes NRPS identifiés dans le génome de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* pourraient avoir des propriétés antibiotiques ou antifongiques qui contribueraient également à l'élimination de microorganismes concurrents. L'isolement de bactéries sur un milieu sélectif pour *X. albilineans* à partir de gouttelettes de rosée collectées sur des feuilles de canne à sucre en Guadeloupe a permis de mettre en évidence une survie épiphyte de *X. albilineans* (Daugrois et al. 2003). Cette étude a également conduit à l'identification d'une bactérie particulière : la souche XaS3. Nous avons montré que cette bactérie est phylogénétiquement proche de *X. albilineans* (souche choisie comme groupe externe dans l'arbre MLSA présenté sur la figure 4 du manuscrit SPI-1) et qu'elle ne possède ni le gène *albXXI*, ni aucun des gènes NRPS de la souche GPE PC73 de *X. albilineans*, ni le SST3 SPI-1. Elle possède cependant une ADN gyrase très proche de celle de *X. albilineans* et donc probablement résistante à l'albicidine. Des études complémentaires ont confirmé que la souche XaS3 est résistante à l'albicidine (Stéphane Cociancich, communication personnelle). Les études réalisées à partir de gouttelettes de rosée collectées sur des feuilles de canne à sucre en Guadeloupe ont permis de montrer que la souche XaS3 est

éliminée de la surface des feuilles de canne à sucre en présence d'une souche de *X. albilineans* appelée XaS1 appartenant au groupe génétique PFGE-B (Daugrois et al. 2003). Les mécanismes moléculaires permettant à la souche XaS1 d'éliminer la souche XaS3 ne font pas intervenir l'albicidine, mais il est possible qu'ils fassent intervenir les petites molécules synthétisées par META-B ou les autres loci NRPS identifiés dans le génome de la souche GPE PC73 de *X. albilineans*.

Chez *P. syringae*, la syringomycine participe à la formation de pores à travers la membrane plasmique des plantes et des microorganismes, ce qui lui permet à la fois de faciliter l'accès de la bactérie aux sources de nutriments présents dans les cellules végétales et de contribuer à l'élimination de microorganismes concurrents. Les propriétés surfactantes de la syringomycine facilitent également le mouvement de la bactérie à la surface de la feuille (Lindow et Brandl 2003). Nous avons plusieurs fois essayé de mettre en évidence la présence de surfactants dans des surnageants de culture de la souche GPE PC73 de *X. albilineans*, mais sans succès. Cet échec peut être lié à un faible niveau d'expression des gènes NRPS dans les conditions de culture utilisées.

Afin d'approfondir nos connaissances sur la phase épiphyte du cycle de vie de *X. albilineans*, et de pouvoir étudier le rôle des NRPS, nous avons tenté de reproduire cette phase de survie épiphyte par inoculation artificielle de feuilles de canne à sucre. Nous avons réalisé plusieurs essais sur de jeunes plants de canne à sucre (plants inoculés un mois après sevrage) et, bien que plusieurs paramètres aient été évalués (température, hygrométrie, densité d'inoculation), aucun de ces essais ne s'est révélé fructueux. Le nombre de bactéries récupérées sur les feuilles chutait généralement rapidement pour devenir nul en quelques jours. Un seul essai nous a permis de maintenir des bactéries en vie sur des feuilles de canne à sucre durant une quinzaine de jours, mais ce résultat n'a pas pu être reproduit malgré plusieurs tentatives. De façon similaire, des essais réalisés en Guadeloupe n'ont pas permis, eux non plus, la reproduction de la survie épiphyte de *X. albilineans* par inoculation artificielle de feuilles de canne à sucre (Jean Daugrois, communication personnelle). Une des explications possibles à ces échecs serait l'association de *X. albilineans*, en conditions naturelles, avec une bactérie non résistante aux antibiotiques présents dans le milieu

sélectif utilisé lors des expérimentations sur goutte de rosée. Cette association serait indispensable pour permettre à *X. albilineans* de survivre à la surface des feuilles de la canne à sucre. L'isolement de bactéries à partir de gouttelettes de rosée collectées sur des feuilles de canne à sucre, non pas sur un milieu sélectif pour *X. albilineans*, mais sur un milieu contenant de l'albicidine pourrait conduire à l'identification de bactéries potentiellement impliquées dans une telle association.

La formation de biofilm joue un rôle très important dans la vie épiphyte des bactéries phytopathogènes. L'analyse du génome de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* a permis de confirmer l'absence des gènes *gum* qui, chez les autres espèces de *Xanthomonas* et chez *X. fastidiosa*, sont nécessaires à la production d'EPS et à la formation de biofilm. Des expériences menées récemment au laboratoire ont permis de montrer que *X. albilineans*, bien que dépourvue des gènes *gum*, est capable de produire des biofilms dans certaines conditions. La capacité du mutant *albXXI* de la souche GPE PC73 à produire des biofilms sera prochainement étudiée afin de déterminer le rôle des NRPS dans la formation de ces structures comme c'est le cas chez *P. fluorescens* (deBruijn et al. 2008). L'association de *X. albilineans* avec une autre bactérie pourrait aussi favoriser la protection de *X. albilineans* sous forme de biofilm à la surface des feuilles de la canne à sucre. Une telle association favorable à la formation de biofilm a été récemment mise en évidence chez des bactéries vivant sur la surface d'une algue marine. Ces bactéries agissent en synergie pour augmenter significativement (de plus de 167%) leur production de biofilm (Burmolle et al. 2006).

Quel est le mode d'action des petites molécules synthétisées par les NRPS impliqués dans la pathogénie de *X. albilineans* ?

Notre étude a permis de montrer que les NRPS de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* sont impliqués dans la biosynthèse d'au moins deux petites molécules intervenant dans la pathogénie de *X. albilineans* : (i) l'albicidine, qui est responsable de l'induction de symptômes foliaires et, (ii) une ou plusieurs petite(s) molécule(s) encore inconnue(s) qui serai(en)t nécessaire(s) à la multiplication de la bactérie dans le xylème caulinaire de la canne à sucre.

Quel est le rôle de ces petites molécules inconnues ? Sont-elles capables d'interagir avec des protéines de la canne à sucre pour bloquer les mécanismes de défense de la plante ou pour détourner le métabolisme des cellules de la canne à sucre au profit de la bactérie ? Sont-elles des surfactants qui facilitent le mouvement de la bactérie à la surface des parois du xylème ou participent-elles à la formation de pores à travers la membrane plasmique, facilitant ainsi l'accès de la bactérie aux sources de nutriments présents dans les cellules de la canne à sucre ?

La purification et la caractérisation de ces petites molécules permettront d'apporter des éléments de réponse à ces questions. Notre équipe développe actuellement un projet dont l'objectif est de purifier et de caractériser ces petites molécules. Les approches développées dans le cadre de ce projet sont basées sur l'analyse différentielle des surnageants de culture de la souche sauvage GPE PC73 de *X. albilineans* vs les surnageants de culture de mutants affectés dans la production de ces petites molécules : mutant de délétion *albXXI* et mutants chez lesquels un fragment d'un des gènes NRPS identifiés a été délété (l'ensemble de ces mutants a été préparé dans le cadre de cette thèse). La présence d'un gène codant un transporteur membranaire au sein du locus META-B et les résultats obtenus chez *X. oryzae* pv. *oryzae*, décrivant l'activité élicitrice observée chez le riz, indiquent que les petites molécules synthétisées par META-B sont sécrétées et donc potentiellement présentes dans les surnageants de culture de la souche sauvage. Cette analyse différentielle porte à la fois sur l'analyse chimique de ces surnageants, mais également sur l'étude de leur(s) activité(s) biologique(s). Les résultats obtenus chez la souche BAI3 de *X. oryzae* pv. *oryzae* vont, par exemple, permettre de développer des approches pour mettre en évidence dans ces surnageants une activité élicitrice chez le riz (c'est-à-dire une activité qui induirait les mécanismes de défense du riz).

Deux approches sont actuellement développées par notre équipe pour mettre en évidence cette activité élicitrice. La première consiste à étudier l'effet des extraits obtenus à partir des surnageants de culture sur la capacité d'une souche du champignon phytopathogène *Magnaporthe oryzae* à infecter des plants de riz. Pour cela, les extraits de surnageants de culture sont pulvérisés sur des plants de riz 24 heures avant l'inoculation du champignon. L'analyse différentielle des symptômes

obtenus sur les plants traités avec les extraits de surnageants de culture de la souche sauvage vs les plants traités avec les extraits de surnageants de cultures de mutants NRPS devrait permettre de mettre en évidence une activité élicitrice synthétisée par les NRPS chez la souche sauvage. La deuxième approche consiste à étudier l'effet des extraits obtenus à partir des surnageants de cultures sur la capacité du mutant *albXXI* de la souche BAI3 de *X. oryzae* pv. *oryzae* à infecter le riz. Pour cela, les extraits de surnageants de cultures sont introduits dans le xylème foliaire à l'extrémité de feuilles de riz par la méthode de « clipping » quelques heures avant l'inoculation, par la même méthode, de ces mêmes feuilles avec le mutant *albXXI* de la souche BAI3 de *X. oryzae* pv. *oryzae*. L'analyse différentielle des symptômes obtenus sur les plants traités avec les extraits de surnageants de cultures de la souche sauvage vs les plants traités avec les extraits de surnageants de cultures de mutants NRPS devrait permettre de mettre en évidence une activité élicitrice synthétisée par les NRPS chez la souche sauvage.

D'autres approches seront développées au laboratoire pour mettre en évidence une activité biologique spécifique des surnageants de culture de la souche sauvage, comme par exemple la recherche d'une activité inhibitrice du protéasome ou d'une activité antifongique ou antibactérienne. La mise en évidence d'une activité biologique spécifique des surnageants de culture de la souche sauvage permettra non seulement de proposer une fonction aux petites molécules synthétisées par des NRPS, mais également d'en faciliter les étapes de purification (les fractions purifiées pourront être criblées pour la présence de ces petites molécules à l'aide d'un test basé sur cette activité biologique).

Ce projet est réalisé dans le cadre d'une collaboration avec l'université technique de Berlin.

Quels sont les autres déterminants moléculaires de la pathogénie de *X. albilineans*?

Notre étude a permis de montrer que les gènes NRPS de *X. albilineans* sont impliqués dans les mécanismes moléculaires permettant à *X. albilineans* de se

multiplier dans le xylème caulinaire de la canne à sucre. Des approches complémentaires sont développées dans notre équipe pour identifier les autres déterminants moléculaires impliqués dans la pathogénie de *X. albilineans*.

Le criblage d'une banque de 1200 mutants aléatoires Tn5 pour leur capacité à infecter la canne à sucre a permis d'identifier plusieurs gènes permettant à la bactérie de se multiplier dans le xylème foliaire ou caulinaire de la canne à sucre et de provoquer des symptômes de la maladie. Parmi ces gènes, on compte des gènes codant des protéines de transport, des transporteurs TonB, des enzymes de biosynthèse des polysaccharides de surface (LPS, ...) ou encore une protéine OmpA de la membrane externe (Rott et al. 2010). Cette protéine OmpA fait actuellement l'objet d'une étude plus approfondie. Ce projet est réalisé dans le cadre d'une collaboration avec l'université de Floride.

Une étude transcriptomique à l'aide de puces à ADN spécifiques du génome de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* est également en cours de réalisation. Elle a pour objectif de comparer l'expression des gènes de *X. albilineans in vitro* (bactéries cultivées dans un milieu liquide riche) et *in planta* (bactéries cultivées dans des extraits de sève de canne à sucre), afin d'identifier des gènes candidats potentiellement impliqués dans la pathogénie de *X. albilineans*. Ce projet est réalisé en collaboration avec l'université du Wisconsin-Madison.

Un projet de séquençage du génome d'une trentaine de souches bactériennes proches de *X. albilineans* et *X. campestris* pv. *campestris* a récemment été accepté par le Génoscope, en collaboration avec l'UMR LIPM de Toulouse. Ce projet prévoit d'une part le séquençage du génome de souches de *X. albilineans* génétiquement très proches (appartenant toutes au sous-groupe ALB RFLP-B2) mais qui se distinguent par leur capacité à coloniser la tige de canne à sucre, et d'autre part le séquençage de bactéries vivant en relation étroite avec la canne à sucre mais présentant des particularités par rapport à *X. albilineans*. Parmi ces bactéries, on compte une souche de *X. sacchari*, une bactérie vivant dans le xylème de la canne à sucre sans pour autant provoquer de maladie, ou encore la souche XaS3 de *X. albilineans* qui, bien que pouvant survivre à la surface des feuilles, est incapable d'infecter la canne à sucre (Daugrois et al. 2003). La comparaison de la séquence du génome de ces bactéries

avec la séquence des génomes de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* et d'un autre *Xanthomonas* pathogène comme *X. campestris* pv. *campestris* permettra : (i) d'une part de mieux comprendre l'évolution de *X. albilineans* et son adaptation à un habitat limité au xylème de quelques *Poacées*, et (ii) d'autre part d'identifier d'autres gènes candidats potentiellement impliqués dans la pathogénie de *X. albilineans*. Ces gènes feront l'objet d'une étude plus approfondie afin de mieux comprendre leur rôle dans la pathogénie.

Afin de mieux évaluer ces gènes candidats, de nouveaux outils de cytologie ont récemment été développés dans notre équipe. Une souche *gfp* ("green fluorescent protein") de *X. albilineans* a été construite au laboratoire. Elle permet l'observation *in planta* de la bactérie grâce à un microscope confocal. L'évaluation du pouvoir pathogène des souches de *X. albilineans* était limitée jusqu'à présent à l'étude de la capacité de ces souches à induire des symptômes foliaires et à se multiplier dans le xylème de la canne à sucre. Ce nouvel outil permet à présent d'observer la bactérie dans son environnement, *in planta*, et de connaître exactement son organisation à l'intérieur des vaisseaux du xylème. Cet outil facilitera donc l'étude de souches de *X. albilineans* mutées au niveau de gènes candidats. Ce type d'approche sera notamment très intéressant pour étudier le mutant *albXXI* de la souche GPE PC73 de *X. albilineans*, et mieux comprendre le rôle des petites molécules dans la pathogénie.

Les travaux menés au cours de cette thèse ont permis d'apporter des éléments nouveaux sur les déterminants du pouvoir pathogène de *X. albilineans*, notamment sur le rôle des gènes NRPS. Ils ont aussi conduit à l'ouverture de nouvelles pistes de recherche sur le cycle de vie de cette bactérie. Les différents projets en cours permettront d'accroître nos connaissances sur les déterminants moléculaires de la pathogénie de *X. albilineans* et sur les mécanismes moléculaires permettant aux bactéries de se multiplier dans cet environnement particulier qu'est le xylème.

- Abramovitch, R.B., Anderson, J.C., and Martin, G.B. 2006. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7:601-611.
- Ackerley, D.F., Caradoc-Davies, T.T., and Lamont, I.L. 2003. Substrate specificity of the nonribosomal peptide synthetase PvdD from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 185:2848-2855.
- Akeda, Y., and Galan, J.E. 2005. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* 437:911-915.
- Alfano, J.R., and Collmer, A. 1997. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J. Bacteriol.* 179:5655-5662.
- Alfano, J.R., and Collmer, A. 2004. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:385-414.
- Alvarez, B., Vasse, J., Le-Courtois, V., Trigalet-Demery, D., Lopez, M.M., and Trigalet, A. 2008. Comparative behavior of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in diverse plant species. *Phytopathology* 98:59-68.
- Aparna, G., Chatterjee, A., Sonti, R.V., and Sankaranarayanan, R. 2009. A cell wall-degrading esterase of *Xanthomonas oryzae* requires a unique substrate recognition module for pathogenesis on rice. *Plant Cell* 21:1860-1873.
- Arlat, M., Van Gijsegem, F., Huet, J.C., Pernollet, J.C., and 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.
- Autrey, L.J.C., Saumtally, S., Dookun, A., Sullivan, S., and Dhayan, S. 1995. Aerial transmission of the leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.* 21:508-526.
- Backert, S., Fronzes, R., and Waksman, G. 2008. VirB2 and VirB5 proteins: specialized adhesins in bacterial type-IV secretion systems? *Trends Microbiol.* 16:409-413.
- Ball, G., Durand, E., Lazdunski, A., and Filloux, A. 2002. A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 43:475-485.
- Barber, C.E., Tang, J.-L., Feng, J.-X., Pan, M.Q., Wilson, T.J.G., Slater, H., Dow, J.M., Williams, P., and Daniels, M.J. 1997. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol. Microbiol.* 24:555-566.

- Basha, S., Mazhar, H., and Vasanthaiah, H. 2009. Proteomics approach to identify unique xylem sap proteins in Pierce's disease-tolerant *Vitis* species. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160:932-944.
- Basset, A., Khush, R.S., Braun, A., Gardan, L., Boccard, F., Hoffmann, J.A., and Lemaitre, B. 2000. The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:3376-3381.
- Bearden, S., Fetherston, J., and Perry, R. 1997. Genetic organization of the yersiniabactin biosynthetic region and construction of avirulent mutants in *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 65:1659-1668.
- Beattie, G.A., and Lindow, S.E. 1995. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:145-172.
- Beattie, G.A., and Lindow, S.E. 1999. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology* 89:353-359.
- Beijersbergen, A., Smith, S.J., and Hooykaas, P.J.J. 1994. Localization and topology of VirB proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* 32:212-218.
- Belshaw, P.J., Walsh, C.T., and Stachelhaus, T. 1999. Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. *Science* 284:486-489.
- Bingle, L.E., Bailey, C.M., and Pallen, M.J. 2008. Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr. Opin. Microbiol.* 11:3-8.
- Birch, R.G. 2001. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. *Mol. Plant Pathol.* 2:1-11.
- Birch, R.G., and Patil, S.S. 1983. The relation of blocked chloroplast differentiation to sugarcane leaf scald disease. *Phytopathology* 73:1368-1374.
- Birch, R.G., and Patil, S.S. 1985. Preliminary characterization of an antibiotic produced by *Xanthomonas albilineans* which inhibits DNA synthesis in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 131:1069-1075.
- Birch, R.G., and Patil, S.S. 1987a. Correlation between albicidin production and chlorosis induction by *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane pathogen. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 30:199-206.
- Birch, R.G., and Patil, S.S. 1987b. Evidence that an albicidin-like phytotoxin induces chlorosis in sugarcane leaf scald disease by blocking plastid DNA replication. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 30:207-214.

- Birch, R.G., Pemberton, J.M., and Basnayake, W.V.S. 1990. Stable albicidin resistance in *Escherichia coli* involves an altered outer-membrane nucleoside uptake system. *J. Gen. Microbiol.* 136:51-58.
- Blackburn, F. 1984. Sugar Cane. Longman Group, Harlow, U. K.
- Blanvillain, S., Meyer, D., Boulanger, A., Lautier, M., Guynet, C., Denancé, 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:e224.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., and Bonas, U. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326:1509-1512.
- Bogdanove, A.J., Schornack, S., and Lahaye, T. 2010. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13:394-401.
- Boller, T., and Felix, G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60:379-406.
- Bostock, J.M., Huang, G., Hashimi, S.M., Zhang, L., and Birch, R.G. 2006. A DHA14 drug efflux gene from *Xanthomonas albilineans* confers high-level albicidin antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* 101:151-160.
- Boucher, C., Genin, S., and Arlat, M. 2001. Concepts actuels sur la pathogénie chez les bactéries phytopathogènes. Current concepts of pathogenicity in plant pathogenic bacteria. *Compt. Rendus Acad. Sci. III Sci. Vie* 324:915-922.
- Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y., and Attree, I. 2009. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics* 10:104.
- Brown, I.R., Mansfield, J.W., Taira, S., Roine, E., and 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.
- Buchko, G.W., Kim, C.-Y., Terwilliger, T.C., and Myler, P.J. 2010. Solution structure of Rv2377c-founding member of the MbtH-like protein family. *Tuberculosis (Edinb)* 90:245-251.
- 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., and 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.
- Burdman, S., Shen, Y., Lee, S.-W., Xue, Q., and Ronald, P. 2004. RaxH/RaxR: A Two-component regulatory system in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* required for AvrXa21 activity. Mol. Plant Microbe Interact. 17:602-612.
- Burmolle, M., Webb, J.S., Rao, D., Hansen, L.H., Sorensen, S.J., and Kjelleberg, S. 2006. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 72:3916-3923.
- Büttner, D., Nennstiel D., Klüsener, B. and Bonas U. 2002. Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. J Bacteriol. 9:2389-98.
- Cao, T.B., and Saier, M.H. Jr. 2003. The general protein secretory pathway: phylogenetic analyses leading to evolutionary conclusions. Biochim. Biophys. Acta. 1609:115-125.
- Cane, D.E., Walsh, C.T., and Khosla, C. 1998. Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. Science 282:63-68.
- Challis, G., Ravel, J., and Townsend, C. 2000. Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. Chem. Biol. 7:211-224.
- Champoiseau, P., Daugrois, J.H., Girard, J.C., Royer, M., and Rott, P.C. 2006a. Variation in albicidin biosynthesis genes and in pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. Phytopathology. 96:33-45.
- Champoiseau, P., Daugrois, J.H., Pieretti, I., Cociancich, S., Royer, M., and Rott, P. 2006b. High variation in pathogenicity of genetically closely related strains of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen, in Guadeloupe. Phytopathology. 96:1081-1091.
- Champoiseau, P., Rott, P., and Daugrois, J.H. 2009. Epiphytic populations of *Xanthomonas albilineans* and subsequent sugarcane stalk infection are linked to rainfall in Guadeloupe. Plant Dis. 93:339-346.
- Chang, J.H., Goel, A.K., Grant, S.R., and Dangl, J.L. 2004. Wake of the flood: ascribing functions to the wave of type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. Curr. Opin. Microbiol. 7:11-18.

- Chatelet, D.S., Matthews, M.A., and Rost, T.L. 2006. Xylem structure and connectivity in grapevine (*Vitis vinifera*) shoots provides a passive mechanism for the spread of bacteria in grape plants. *Ann. Bot.* 98:483-494.
- Chatterjee, S., Almeida, R.P.P., and Lindow, S. 2008a. Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46:243-271.
- Chatterjee, S., Newman, K.L., and Lindow, S.E. 2008b. Cell-to-cell signaling in *Xylella fastidiosa* suppresses movement and xylem vessel colonization in grape. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21:1309-1315.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B.J. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124:803-814.
- Cho, J.-H., Park, Y., Ahn, J.-H., Lim, Y., and Rhee, S. 2008. Structural and functional insights into O-methyltransferase from *Bacillus cereus*. *J. Mol. Biol.* 382:987-997.
- Chou, F.L., Chou, H.C., Lin, Y.S., Yang, B.Y., Lin, N.T., Weng, S.F., and Tseng, Y.H. 1997. The *Xanthomonas campestris gumD* gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233:265-269.
- Christie, P.J. 2001. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol. Microbiol.* 40:294-305.
- Christie, P.J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S. and Cascales, E. 2005. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 59:451-485.
- Cianciotto, N.P. 2005. Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol.* 13:581-588.
- Clerc, F. 1997. Diversité génétique des *Xanthomonas* pathogènes de la canne à sucre. *Maîtrise en bioingénieries*. Université de Toulouse III, Toulouse, France, 20 p.
- Comstock, J.C. 2001. Foliar symptoms of sugarcane leaf scald. *Sugar Journal* 64:23-32.
- Copp, J.N., and Neilan, B.A. 2006. The phosphopantetheinyl transferase superfamily: phylogenetic analysis and functional implications in cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:2298-2305.
- Cornelis, G.R. 2002. *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J. Cell Biol.* 158:401-408.

- Cornelis, G.R. 2006. The type III secretion injectisome. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:811-825.
- Correa, V.R., Majerczak, D.R., Ammar, E., Merighi, M., Pratt, R.C., Redinbaugh, M.G., Coplin, D.L., and Hogenhout, S.A. 2010. A bacterial pathogen uses distinct type III secretion systems to alternate between host kingdoms. *Phytopathology* 100:S27.
- Cother, E.J., and Gilbert, R. 1990. Presence of *Erwinia chrysanthemi* in two major river systems and their alpine sources in Australia. *J. Appl. Microbiol.* 69:729-738.
- Crump, M.P., Crosby, J., Dempsey, C.E., Parkinson, J.A., Murray, M., Hopwood, D.A., and Simpson, T.J. 1997. Solution structure of the actinorhodin polyketide synthase acyl carrier protein from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biochemistry* 36:6000-6008.
- D'Hont, A., Ison, D., Alix, K., Roux, C., and Glaszmann, J.C. 1998. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. *Genome* 41:221-225.
- D'Hont, A., Paulet, F., and Glaszmann, J.C. 2002. Oligoclonal interspecific origin of "North Indian" and "Chinese" sugarcanes. *Chromosome Res.* 10:253-262.
- Da Silva, A.C.R., 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.C., do Amaral, A.M., Bertolini, M.C., Camargo, L.E.A., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L.P., Cicarelli, R.M.B., Coutinho, L.L., Cursino-Santos, J.R., El-Dorry, H., Faria, J.B., Ferreira, A.J.S., Ferreira, R.C.C., Ferro, M.I.T., Formighieri, E.F., Franco, M.C., Greggio, C.C., Gruber, A., Katsuyama, A.M., Kishi, L.T., Leite, R.P., Lemos, E.G.M., Lemos, M.V.F., Locali, E.C., Machado, M.A., Madeira, A.M.B.N., Martinez-Rossi, N.M., Martins, E.C., Meidanis, J., Menck, C.F.M., Miyaki, C.Y., Moon, D.H., Moreira, L.M., Novo, M.T.M., Okura, V.K., Oliveira, M.C., Oliveira, V.R., Pereira, H.A., Rossi, A., Sena, J.A.D., Silva, C., de Souza, R.F., Spinola, L.A.F., Takita, M.A., Tamura, R.E., Teixeira, E.C., Tezza, R.I.D., Trindade dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, S.M., White, F.F., Setubal, J.C., and Kitajima, J.P. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417:459-463.
- Da Silva, F.G., Shen, Y.W., Dardick, C., Burdman, S., Yadav, R.C., de Leon, A.L., and Ronald, P.C. 2004. Bacterial genes involved in type I secretion and sulfation are required to elicit the rice Xa21-mediated innate immune response. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17:593-601.
- Dabbas, K.M., Ferro, M.I.T., de Barros, N.M., de Laia, M.L., Zingaretti, S.M., Giachetto, P.F., de Moraes, V.A., and Ferro, J.A. 2006. Genes diferencialmente

expressos em cana-de-açúcar inoculada com *Xanthomonas albilineans*, o agente causal da escaldadura da folha. Summa Phytopathol. 32:328-338.

- Dangl, J.L., Dietrich, R.A., and Richberg, M.H. 1996. Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. Plant Cell 8:1793-1807.
- Daniels, J., and Roach, B.T. 1987. Taxonomy and evolution. P 7-84 in: Sugarcane Improvement Through Breeding. D. J. Heinz, ed. Elsevier Press, Amsterdam, Holland.
- Darsonval, A., Darrasse, A., Durand, K., Bureau, C., Cesbron, S., and Jacques, M.A. 2009. Adhesion and fitness in the bean phyllosphere and transmission to seed of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. Mol. Plant Microbe Interact. 22:747-757.
- Das, A., Rangaraj, N., and Sonti, R.V. 2009. Multiple adhesin-like functions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are involved in promoting leaf attachment, entry, and virulence on rice. Mol. Plant Microbe Interact. 22:73-85.
- Daugrois, J.-H., Dumont, V., Champoiseau, P., Costet, L., Boisne-Noc, R., and Rott, P. 2003. Aerial contamination of sugarcane in Guadeloupe by two strains of *Xanthomonas albilineans*. Eur. J. Plant Pathol. 109:445-458.
- Daugrois, J.-H., Champoiseau, P., and Rott, P. 2005. Epiphytic colonisation and infection by *Xanthomonas albilineans* of two sugarcane cultivars differing in resistance to leaf scald disease. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. 25:678-684.
- Davis, M., Rott, P., Warmuth, C., Chatenet, M., and Baudin, P. 1997. Intraspecific genomic variation within *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. Phytopathology. 87:316-324.
- de Bruijn, I., de Kock, M.J., de Waard, P., van Beek, T.A. and Raaijmakers, J.M. 2008. Massetolide A biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. J. Bacteriol. 190:2777-2789.
- de Souza, J., Weller, D., and Raaijmakers, J. 2002. Frequency, diversity, and activity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in Dutch take-all decline soils. Phytopathology 93:54-63.
- Delepelaire, P. 2004. Type I secretion in gram-negative bacteria. Biochim. Biophys. Acta. 1694:149-161.
- Dellagi, A., Segond, D., Rigault, M., Fagard, M., Simon, C., Saindrenan, P., and Expert, D. 2009. Microbial siderophores exert a subtle role in *Arabidopsis* during infection by manipulating the immune response and the iron status. Plant Physiol. 150:1687-1696.
- Dharmapuri, S., and 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.

- Doekel, S., and Marahiel, M.A. 2000. Dipeptide formation on engineered hybrid peptide synthetases. *Chem. Biol.* 7:373-384.
- Donadio, S., Monciardini, P., and Sosio, M. 2007. Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. *Nat. Prod. Rep.* 24:1073-1109.
- Dong, Z., McCully, M.E., and Canny, M.J. 1997. Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems? Anatomical and physiological data. *Ann. Bot.* 80:147-158.
- Dow, M. 2008. Diversification of the function of cell-to-cell signaling in regulation of virulence within plant pathogenic *xanthomonads*. *Sci. Signal.* 1:pe23.
- Dowson, W.J. 1943. On the generic names *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, and *Bacterium* for certain bacterial plant pathogens. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 26:1-14.
- Dunger, G., Relling, V., Tondo, M., Barreras, M., Ielpi, L., Orellano, E., and Ottado, J. 2007. Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. *Arch. Microbiol.* 188:127-135.
- Enos-Berlage, J.L., Guvener, Z.T., Keenan, C.E., and McCarter, L.L. 2005. Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol. Microbiol.* 55:1160-1182.
- Esker, P.D., and Nutter, F.W. 2003. Temporal dynamics of corn flea beetle populations infested with *Pantoea stewartii*, causal agent of Stewart's disease of corn. *Phytopathology* 93:210-218.
- Expert, D., Enard, C., and Masclaux, C. 1996. The role of iron in plant host-pathogen interactions. *Trends Microbiol.* 4:232-237.
- Fauconnier, R., and Bassereau, D. 1970. La canne à sucre. Techniques agricoles et productions tropicales. Maisonneuve et Larose, Paris, France, 468 p.
- Feldmann, P., Sapotille, J., Grédoire, P., and Rott, P. 1994. Micropropagation of sugarcane. P.15-17 in: *In Vitro Culture of Tropical Plants*. C. Teisson, ed. La Librairie du Cirad, Montpellier, France.
- Feldmann, P., d'Hont, A., Guiderdoni, E., Grivet, L., and Glaszmann, J.C. 1997. La canne à sucre. P. 197-215 in: *L'Amélioration des Plantes Tropicales*. A. Charrier, M. Jacquot, S. Hamon and D. Nicolas, eds. CIRAD and ORSTOM, Montpellier, France.
- Felnagle, E.A., Jackson, E.E., Chan, Y.A., Podevels, A.M., Berti, A.D., McMahon, M.D., and Thomas, M.G. 2008. Nonribosomal peptide synthetases involved in the production of medically relevant natural products. *Mol. Pharm.* 5:191-211.

- Filloux, A. 2004. The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim. Biophys. Acta* 1694:163-179.
- Finking, R., and Marahiel, M.A. 2004. Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu. Rev. Microbiol.* 58:453-488.
- Fischer, S., Jofré, E., Cordero, P., Gutiérrez Mañero, F., and Mori, G. 2010. Survival of native *Pseudomonas* in soil and wheat rhizosphere and antagonist activity against plant pathogenic fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek* 97:241-251.
- Flor, H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9:275-296.
- Fry, S.M., and Milholland, R.D. 1990. Response of resistant, tolerant, and susceptible grapevine tissues to invasion by the Pierce's Disease bacterium, *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* 80:66-69.
- Galan, J.E., and Wolf-Watz, H. 2006. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* 444:567-573.
- Garces, F., Hoy, J.W., and Chen, Z. 2010. Comparative proteomic analysis of sugarcane response to infection by *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald. *Phytopathology* 100:S39.
- Genin, S., and Boucher, C. 2004. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:107-134.
- Gillespie J.J., Brayton K.A., Williams K.P., Diaz M.A., Brown W.C., Azad A.F., and Sobral B.W. 2010. Phylogenomics reveals a diverse Rickettsiales type IV secretion system. *Infect. Immun.* 78:1809-1823.
- Gottig, N., Garavaglia, B.S., Garofalo, C.G., Orellano, E.G., and Ottado, J. 2009. A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. *PLoS One* 4:e4358.
- Greenberg, J.T., and Vinatzer, B.A. 2003. Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:20-28.
- Groll, M., Schellenberg, B., Bachmann, A.S., Archer, C.R., Huber, R., Powell, T.K., Lindow, S., Kaiser, M., and Dudler, R. 2008. A plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism. *Nature* 452:755-758.
- Gross, H., and Loper, J.E. 2009. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat. Prod. Rep.* 26:1408-1446.
- 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.* 18:858-868.
- Gürlebeck, D., Thieme, F., and Bonas, U. 2006. Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J. Plant Physiol.* 163:233-255.
- Hamada, T., Matsunaga, S., Yano, G., and Fusetani, N. 2004. Polytheonamides A and B, highly cytotoxic, linear polypeptides with unprecedented structural features, from the marine sponge, *Theonella swinhoei*. *J. Am. Chem. Soc.* 127:110-118.
- Hann, D.R., Gimenez-Ibanez, S., and Rathjen, J.P. 2010. Bacterial virulence effectors and their activities. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13:388-393.
- Harding, N.E., Cleary, J.M., and Ielpi, L. 1995. Genetics and biochemistry of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. P. 495-514 in: *Food Biotechnology Microorganisms*. Y. H. Hui, and G. Khachatourians, eds. VCH Publisher, New York, U.S.A.
- Hashimi, S.M., Wall, M.K., Smith, A.B., Maxwell, A., and Birch, R.G. 2007. The phytotoxin albicidin is a novel inhibitor of DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:181-187.
- Hashimi, S.M., Huang, G., Maxwell, A., and Birch, R.G. 2008. DNA gyrase from the albicidin producer *Xanthomonas albilineans* has multiple-antibiotic-resistance and unusual enzymatic properties. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:1382-1390.
- Hayward, A.C. 1993. The hosts of *Xanthomonas*. P. 1-17 in *Xanthomonas*. J.G. Swings and E. L. Civerolo, eds. Chapman & Hall., London, U.K.
- He, S.Y., and Jin, Q. 2003. The Hrp pilus: learning from flagella. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:15-19.
- He, Y.W., and Zhang, L.H. 2008. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 32:842-857.
- He, S.Y., Nomura, K., and Whittam, T.S. 2004. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim. Biophys. Acta* 1694:181-206.
- He, P., Shan, L., and Sheen, J. 2007. Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cell. Microbiol.* 9:1385-1396.
- Healy, F.G., Wach, M., Krasnoff, S.B., Gibson, D.M., and Loria, R. 2000. The txtAB genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Mol. Microbiol.* 38:794-804.

- Henderson, I.R., and Nataro, J.P. 2001. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect. Immun.* 69:1231-1243.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C., and Ala'Aldeen, D. 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:692-744.
- Hilaire, E., Young, S.A., Willard, L.H., McGee, J.D., Sweat, T., Chittoor, J.M., Guikema, J.A., and Leach, J.E. 2001. Vascular defense responses in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14:1411-1419.
- Huang, P-Y, Milholland, R.D., and Daykin, M.E. 1986. Structural and morphological changes associated with the Pierce's disease bacterium in bunch and muscadine grape tissues. *Phytopathology* 76:1232-1238.
- Huang, G., Zhang, L., and Birch, R.G. 2000a. Albicidin antibiotic and phytotoxin biosynthesis in *Xanthomonas albilineans* requires a phosphopantetheinyl transferase gene. *Gene* 258:193-199.
- Huang, G., Zhang, L., and Birch, R.G. 2000b. Analysis of the flanking *xabB*: a methyltransferase gene is involved in albicidin biosynthesis in *Xanthomonas albilineans*. *Gene* 255:327-333.
- Hueck, C.J. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:379-433.
- Hutchison, M.L., and Gross, D.C. 1997. Lipopeptide phytotoxins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: comparison of the biosurfactant and ion channel-forming activities of syringopeptin and syringomycin. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10:347-354.
- Hutchison, M.L., Tester, M.A., and Gross, D.C. 1995. Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux: a model for the mechanism of action in the plant-pathogen interaction. *Mol. Plant Microbe Interact.* 8:610-620.
- Inoue, M., Shinohara, N., Tanabe, S., Takahashi, T., Okura, K., Itoh, H., Mizoguchi, Y., Iida, M., Lee, N., and Matsuoka, S. 2010. Total synthesis of the large non-ribosomal peptide polytheonamide B. *Nat. Chem.* 2:280-285.
- Jack, R.L., Buchanan, G., Dubini, A., Hatzixanthis, K., Palmer, T., and Sargent, F. 2004. Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins. *EMBO J.* 20:3962-3972.
- 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. *Nature* 444:323-329.
- Joshi, M.V., Bignell, D.R.D., Johnson, E.G., Sparks, J.P., Gibson, D.M., and Loria, R. 2007. The AraC/XylS regulator TxtR modulates thaxtomin biosynthesis and virulence in *Streptomyces scabies*. *Mol. Microbiol.* 66:633-642.
- Juhas, M., Crook, D.W., Dimopoulou, I.D., Lunter, G., Harding, R.M., Ferguson, D.J., and Hood D.W. 2007. Novel type IV secretion system involved in propagation of genomic islands. *J Bacteriol.* 189:761-771.
- Julien, M.H.R., Irvine, J.E., and Benda, G.T. A. 1989. Sugarcane anatomy, morphology and physiology. P. 1-20 in: *Diseases of Sugarcane: Major Diseases*. C. Ricaud, B.T. Egan, A.G. Gillaspie, and C.G. Hughes, eds. Elsevier Publishers B. V., Amsterdam, Netherlands.
- 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.
- Katzen, F., Ferreiro, D.U., Oddo, C.G., Ielmini, M.V., Becker, A., Pühler, A., and Ielpi, L. 1998. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. *J. Bacteriol.* 180:1607-1617.
- Kay, S., and Bonas, U. 2009. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr. Opin. Microbiol.* 12:37-43.
- Keating, T., Marshall, C., Walsh, C., and Keating, A. 2002. The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclisation and epimerization domains. *Nat. Struct. Biol.* 9:522-526.
- Killiny, N., and Almeida, R.P.P. 2009. *Xylella fastidiosa* afimbrial adhesins mediate cell transmission to plants by leafhopper vectors. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:521-528.
- Kim, J.-G., Taylor, K.W., Hotson, A., Keegan, M., Schmelz, E.A., and Mudgett, M.B. 2008. XopD SUMO protease affects host transcription, promotes pathogen growth, and delays symptom development in *Xanthomonas*-infected tomato leaves. *Plant Cell* 20:1915-1929.
- King, R.R., and Calhoun, L.A. 2009. The thaxtomin phytotoxins: sources, synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. *Phytochemistry* 70:833-841.
- Kinscherf, T.G., and Willis, D.K. 2005. The biosynthetic gene cluster for the beta-lactam antibiotic tabtoxin in *Pseudomonas syringae*. *J. Antibiot.* 58:817-821.
- Klett, P., and Rott, P. 1994. Inoculum sources for the spread of leaf scald disease of sugarcane caused by *Xanthomonas albilineans* in Guadeloupe. *J. Phytopathol.* 142:283-291.

- Koronakis, V., Eswaran, J., Hughes, C. 2004. Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu Rev Biochem.* 73:467-89.
- Koch, H.G., Hengelage, T., Neumann-Haefelin, C., MacFarlane, J., Hoffschulte, H.K., Schimz, K.L., Mechler, B., and Müller, M. 1999. *In vitro* studies with purified components reveal signal recognition particle (SRP) and SecA/SecB as constituents of two independent protein-targeting pathways of *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Cell.* 10:2163-2173.
- Kube, M., Migdoll, A.M., Müller, I., Kuhl, H., Beck, A., Reinhardt, R., and Geider, K. 2008. The genome of *Erwinia tasmaniensis* strain Et1/99, a non-pathogenic bacterium in the genus *Erwinia*. *Environ. Microbiol.* 10:2211-2222.
- Kube, M., Migdoll, A.M., Gehring, I., Heitmann, K., Mayer, Y., Kuhl, H., Knaust, F., Geider, K., and Reinhardt, R. 2010. Genome comparison of the epiphytic bacteria *Erwinia billingiae* and *E. tasmaniensis* with the pear pathogen *E. pyrifoliae*. *BMC Genomics* 11:393.
- Kutter, S., Buhrdorf, R., Haas, J., Schneider-Brachert, W., Haas, R., and Fischer, W. 2008. Protein subassemblies of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system revealed by localization and interaction studies. *J. Bacteriol.* 190:2161-2171.
- Lai, E.-M., and Kado, C.I. 2000. The T-pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *Trends Microbiol.* 8:361-369.
- Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C., and Walsh, C.T. 1996. A new enzyme superfamily: the phosphopantetheinyl transferases. *Chem. Biol.* 3:923-936.
- Lautru, S., and Challis, G.L. 2004. Substrate recognition by nonribosomal peptide synthetase multi-enzymes. *Microbiology* 150:1629-1636.
- Lautru, S., Oves-Costales, D., Pernodet, J.-L., and Challis, G.L. 2007. MbtH-like protein-mediated cross-talk between non-ribosomal peptide antibiotic and siderophore biosynthetic pathways in *Streptomyces coelicolor* M145. *Microbiology* 153:1405-1412.
- Lavigne, J.P., Botella, E., and O'Callaghan, D. 2006. Les systèmes de sécrétions de type IV et leurs effecteurs. *Pathol. Biol. (Paris)* 54:296-303.
- Lazos, O., Tosin, M., Slusarczyk, A.L., Boakes, S., Cortés, J., Sidebottom, P.J., and Leadlay, P.F. 2010. Biosynthesis of the putative siderophore erythrochelin requires unprecedented crosstalk between separate nonribosomal peptide gene clusters. *Chem. Biol.* 17:160-173.
- 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.

- Lee, S.W., Han, S.W., Bartley, L.E., and Ronald, P.C. 2006. Unique characteristics of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* AvrXa21 and implications for plant innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:18395-18400.
- Lee, P.A., Tullman-Ercek, D., and Georgiou, G. 2006. The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu. Rev. Microbiol.* 60:373-395.
- Lee, S.-W., Jeong, K.-S., Han, S.-W., Lee, S.-E., Phee, B.-K., Hahn, T.-R., and Ronald, P. 2008. The *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PhoPQ two-component system is required for AvrXA21 activity, hrpG expression, and virulence. *J. Bacteriol.* 190:2183-2197.
- Leigh, J.A., and Coplin, D.L. 1992. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* 46:307-346.
- Lin, H., Doddapaneni, H., Takahashi, Y., and Walker, M. 2007. Comparative analysis of ESTs involved in grape responses to *Xylella fastidiosa* infection. *BMC Plant Biol.* 7:8.
- Lindow, S.E., and Brandl, M.T. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1875-1883.
- Linhartová, I., Bumba, L., Mašín, J., Basler, M., Osička, R., Kamanová, J., Procházková, K., Adkins, I., Hejnová-Holubová, J., Sadílková, L., Morová, J., and Šebo, P. 2010. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* 34:1076-1112.
- Liu, H., Kang, Y., Genin, S., Schell, M.A., and Denny, T.P. 2001. Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. *Microbiology* 147:3215-3229.
- Liu, H., Zhang, S., Schell, M.A., and Denny, T.P. 2005. Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall degrading enzymes contribute to virulence. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18:1296-1305.
- Llosa, M., and O'Callaghan, D. 2004. Euroconference on the biology of type IV secretion processes: bacterial gates into the outer world. *Mol. Microbiol.* 53:1-8.
- Lorenz, C., and Büttner, D. 2009. Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 191:1414-1428.
- Lostroh, P.C., and Lee, C.A. 2001. The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes Infect.* 3:1281-1291.

- Lu, H., Patil, P., Van Sluys, M.A., White, F.F., Ryan, R.P., Dow, J.M., Rabinowicz, P., Salzberg, S.L., Leach, J.E., Sonti, R., Brendel, V., and Bogdanove, A.J. 2008. Acquisition and evolution of plant pathogenesis-associated gene clusters and candidate determinants of tissue-specificity in *xanthomonas*. PLoS One. 11:e3828.
- Lubelski, J., Konings, W.N., and Driessen, A.J. 2007. Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. Microbiol. Mol. Biol. 3:463-476.
- Lundgren, J.G., and Lehman, R.M. 2010. Bacterial gut symbionts contribute to seed digestion in an omnivorous beetle. PLoS One 5:e10831.
- MacNab, R.M. 1996. Flagella and motility. P. 123-145 in: *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology1. 2nd ed. F. C. Neidhardt, R. Curtis III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin and H. E. Umbarger, eds. ASM Press, Washington D.C., U.S.A.
- Malev, V.V., Schagina, L.V., Gurnev, P.A., Takemoto, J.Y., Nestorovich, E.M., and Bezrukov, S.M. 2002. Syringomycin E channel: a lipidic pore stabilized by lipopeptide? Biophys. J. 82:1985-1994.
- Manjunath, K.L., Halbert, S.E., Ramadugu, C., Webb, S., and Lee, R.F. 2008. Detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus huanglongbing in Florida. Phytopathology 98:387-396.
- Manulis, S., and Barash, I. 2003. *Pantoea agglomerans* pvs. *gypsophilae* and *betae*, recently evolved pathogens? Mol. Plant Pathol. 4:307-314.
- Marahiel, M.A., Stachelhaus, T., and Mootz, H.D. 1997. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. Chem. Rev. 97:2651-2674.
- Martin, J. P., and Robinson, P. E. 1961. Leaf scald. P. 79-101 in: Sugarcane Diseases of the World. J. P. Martin, E. V. Abbott and C. G. Hughes, eds. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, Netherlands.
- Matsuyama, S., Fujita, Y., and Mizushima, S. 1993. SecD is involved in the release of translocated secretory proteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. EMBO J. 12:265-270.
- Mattick, J.S. 2002. Type IV pili and twitching motility. Annu. Rev. Microbiol. 56:289-314.
- May, J.J., Kessler, N., Marahiel, M.A., and Stubbs, M.T. 2002. Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:12120-12125.

- Melotto, M., Underwood, W., and He, S.Y. 2008. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46:101-122.
- Meng, Y., Li, Y., Galvani, C.D., Hao, G., Turner, J.N., Burr, T.J., and Hoch, H.C. 2005. Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. *J. Bacteriol.* 187:5560-5567.
- Meyer, J. 1989. L'histoire du sucre. Les éditions Desjonquières, Paris, France, 335p.
- Michel, K., Abderhalden, O., Bruggmann, R., and Dudler, R. 2006. Transcriptional changes in powdery mildew infected wheat and *Arabidopsis* leaves undergoing syringolin-triggered hypersensitive cell death at infection sites. *Plant Mol. Biol.* 62:561-578.
- Mitchell, R.E., 1976. Isolation and structure of a chlorosis-inducing toxin of *Pseudomonas phaseolicola*. *Phytochemistry.* 15:1941-1947.
- Moens, S., and Vanderleyden, J. 1996. Functions of bacterial flagella. *Crit. Rev. Microbiol.* 22:67-100.
- Mohamed, I.S. 1995. Pouvoir colonisateur de *Xanthomonas albilineans* et résistance de la canne à sucre à l'échaudure des feuilles. Orsay, France: Université de Paris XI.
- Monier, J.-M., and 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.
- Monteiro-Vitorello, C.B., Camargo, L.E.A., Sluys, M.A.V., Kitajima, J.P., Truffi, D., do Amaral, A.M., Harakava, R., de Oliveira, J.C.F., Wood, D., de Oliveira, M.C., Miyaki, C., Takita, M.A., da Silva, A.C.R., Furlan, L.R., Carraro, D.M., Camarotte, G., Almeida, N.F. Jr., Carrer, H., Coutinho, L.L., El-Dorry, H.A., Ferro, M.I.T., Gagliardi, P.R., Giglioti, E., Goldman, M.H.S., Goldman, G.H., Kimura, E.T., Ferro, E.S., Kuramae, E.E., Lemos, E.G.M., Lemos, M.V.F., Mauro, S.M.Z., Machado, M.A., Marino, C.L., Menck, C.F., Nunes, L.R., Oliveira, R.C., Pereira, G.G., Siqueira, W., de Souza, A.A., Tsai, S.M., Zanca, A.S., Simpson, A.J.G., Brumbley, S.M., and Setúbal, J.C. 2004. The genome sequence of the Gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17:827-836.
- Montenegro, N., Alvarez, A., Restrepo, S., and Bernal, A.J. 2010. Identification and characterization of genes involved in the type VI secretion system in *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Phytopathology* 100:S86.
- Mootz, H.D., Schwarzer, D., and Marahiel, M.A. 2000. Construction of hybrid peptide synthetases by module and domain fusions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:5848-5853.

- Mootz, H.D., Schwarzer, D., and Marahiel, M.A. 2002. Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem* 3:490-504.
- Moran, N.A. 2007. Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:8627-8633.
- Moreira, L.M., de Souza, R.F., Almeida, N.F Jr., Setubal, J.C., Oliveira, J.C.F., Furlan, L.R., Ferro, J.A., and da Silva, A.C.R. 2004a. Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:163-184.
- Morris, C.E., Sands, D.C., Vinatzer, B.A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffiere, A., Yan, S., Dominguez, H., and Thompson, B.M. 2008. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *ISME J.* 2:321-334.
- Morrissey, J.P., and Osbourn, A.E. 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:708-724.
- Moscou, M.J., and Bogdanove, A.J. 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326:1501.
- Mougous, J.D., Cuff, M.E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C.A., Goodman, A.L., Joachimiak, G., Ordonez, C.L., Lory, S., Walz, T., Joachimiak, A., and Mekalanos, J.J. 2006. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* 312:1526-1530.
- Muller, M. 2005. Twin-arginine-specific protein export in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 156:131-136.
- Nakano, M.M., Corbell, N., Besson, J., and Zuber, P. 1992. Isolation and characterization of *sfp*: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 232:313-321.
- Nawrath, C. 2006. Unraveling the complex network of cuticular structure and function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9:281-287.
- Newman, K.L., 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.
- Ng, J., Bandeira, N., Liu, W.-T., Ghassemian, M., Simmons, T.L., Gerwick, W.H., Linington, R., Dorrestein, P.C., and Pevzner, P.A. 2009. Dereplication and de novo sequencing of nonribosomal peptides. *Nat. Methods* 6:596-599.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D., and 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.

- 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.
- 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.
- Orian, G. 1942. Artificial hosts of the sugarcane leaf scald organism. *Revue Agricole et Sucrière de l'Ile Maurice* 21:285-304.
- Osiro, D., Muniz, J.R.C., Coleta Filho, H.D., de Sousa, A.A., Machado, M.A., Garratt, R.C., and Colnago, L.A. 2004. Fatty acid synthesis in *Xylella fastidiosa*: correlations between genome studies, ¹³C NMR data, and molecular models. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323:987-995.
- Oves-Costales, D., Kadi, N., and Challis, G.L. 2009. The long-overlooked enzymology of a nonribosomal peptide synthetase-independent pathway for virulence-conferring siderophore biosynthesis. *Chem. Commun.* 43:6530-6541.
- Park, C.J., Han, S.W., Chen, X., and Ronald, P.C. 2010. Elucidation of XA21-mediated innate immunity. *Cell Microbiol.* 8:1017-1025.
- Parsek, M.R., and Singh, P.K. 2003. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:677-701.
- Patel, H.M., Tao, J., and Walsh, C.T. 2003. Epimerization of an L-cysteinyl to a D-cysteinyl residue during thiazoline ring formation in siderophore chain elongation by pyochelin synthetase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 42:10514-10527.
- Peabody, C.R., Chung, Y.J., Yen, M.-R., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A.P., and Saier, M.H. Jr. 2003. Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology* 149:3051-3072.
- Peet, R.C., Lindgren, P.B., Willis, D.K., and Panopoulos, N.J. 1986. Identification and cloning of genes involved in phaseolotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. "*phaseolicola*". *J. Bacteriol.* 166:1096-1105.
- Perez-Donoso, A.G., Sun, Q., Roper, M.C., Greve, L.C., Kirkpatrick, B., and Labavitch, J.M. 2010. Cell wall-degrading enzymes enlarge the pore size of intervessel pit membranes in healthy and *Xylella fastidiosa*-infected grapevines. *Plant Physiol.* 152:1748-1759.
- Pieretti, I., Royer, M., Barbe, V., Carrere, S., Koebnik, R., Cociancich, S., Couloux, A., Darrasse, A., Gouzy, J., Jacques, M.-A., Lauber, E., Manceau, C., Mangenot, S., Poussier, S., Segurens, B., Szurek, B., Verdier, V., Arlat, M., and Rott, P.

2009. The complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited *Xanthomonadaceae*. *BMC Genomics* 10:616.
- Poplawsky, A.R., and 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., Urban, S.C., and Chun, W. 2000. Biological role of xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5123-5127.
- Preston, G.M., Studholme, D.J., and Caldelari, I. 2005. Profiling the secretomes of plant pathogenic *Proteobacteria*. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:331-360.
- Pugsley, A.P. 1993. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 57:50-108.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F., and Mekalanos, J.J. 2006. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:1528-1533.
- Pukatzki, S., McAuley, S.B., and Miyata, S.T. 2009. The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr. Opin. Microbiol.* 12:11-17.
- Rajeshwari, R., Jha, G., and Sonti, R.V. 2005. Role of an in planta-expressed xylanase of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in promoting virulence on rice. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18:830-837.
- Rausch, C., Weber, T., Kohlbacher, O., Wohlleben, W., and Huson, D.H. 2005. Specificity prediction of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases (NRPS) using transductive support vector machines (TSVMs). *Nucleic Acids Res.* 33:5799-5808.
- Reddy, J.D., Reddy, S.L., Hopkins, D.L., and Gabriel, D.W. 2007. TolC is required for pathogenicity of *Xylella fastidiosa* in *Vitis vinifera* grapevines. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20:403-410.
- Renier, A., Vivien, E., Cociancich, S., Letourmy, P., Perrier, X., Rott, P.C., and Royer, M. 2007. Substrate specificity-conferring regions of the nonribosomal peptide synthetase adenylation domains involved in albicidin pathotoxin biosynthesis are highly conserved within the species *Xanthomonas albilineans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:5523-5530.
- Ricaud, C., and Ryan, C.C. 1989. Leaf scald. P. 39-53 in: *Diseases of Sugarcane: Major Diseases*. C. Ricaud, B.T. Egan, A.G. J. Gillaspie and C.G. Hughes, eds. Elsevier Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands.

- Robb, J., Lee, S.-W., Mohan, R., and Kolattukudy, P.E. 1991. Chemical characterization of stress-induced vascular coating in tomato. *Plant Physiol.* 97:528-536.
- Roine, E., Raineri, D.M., Romantschuk, M., Wilson, M., and Nunn, D.N. 1998. Characterization of type IV pilus genes in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11:1048-1056.
- Roper, M.C., Greve, L.C., Labavitch, J.M., and Kirkpatrick, B.C. 2007a. Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7252-7258.
- Roper, M.C., Greve, L.C., Warren, J.G., Labavitch, J.M., and Kirkpatrick, B.C. 2007b. *Xylella fastidiosa* requires polygalacturonase for colonization and pathogenicity in *Vitis vinifera* grapevines. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20:411-419.
- Rott, P. 1995. L'échaudure des feuilles de la canne à sucre. *Agriculture et Développement* 6:49-55.
- Rott, P., and M. Davis. 2000. Leaf scald. P. 38-44 in A guide to sugarcane diseases. P. Rott, R. Bailey, J. Comstock, B. Croft, and A. Saumtally eds. CIRAD-ISSCT, Montpellier, France.
- Rott, P., Costet, L., Davis, M., Frutos, R., and Dean, G. 1996. At least two separate gene clusters are involved in albicidin production by *Xanthomonas albilineans*. *J. Bacteriol.* 178:4590-4596.
- Rott, P., Mohamed, I., Klett, P., Soupa, D., de Saint-Albin, A., Feldmann, P., and Letourmy, P. 1997. Resistance to leaf scald disease is associated with limited colonization of sugarcane and wild relatives by *Xanthomonas albilineans*. *Phytopathology* 87:1202-1213.
- Rott, P., Bailey, R.A., Comstock, J.C., Croft, B.J., and Saumtally, A.S. 2000. A guide to sugarcane diseases. CIRAD and ISSCT, Montpellier, France.
- Rott, P.C., Fleites, L., Marlow, G., Royer, M., Gabriel, D.W. 2010. Identification of New Candidate Pathogenicity Factors in the Xylem-Invasive Pathogen *Xanthomonas albilineans* by Transposon Mutagenesis. *Mol Plant Microbe Interact.* 2010 Dec 29.
- Royer, M., Costet, L., Vivien, E., Bes, M., Cousin, A., Damais, A., Pieretti, I., Savin, A., Megessier, S., Viard, M., Frutos, R., Gabriel, D.W., and Rott, P.C. 2004. Albicidin pathotoxin produced by *Xanthomonas albilineans* is encoded by three large PKS and NRPS genes present in a gene cluster also containing several putative modifying, regulatory, and resistance genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17:414-427.

- Rudolph, K. 1993. Infection of the plant by *Xanthomonas*. P. 193-264 in: *Xanthomonas*. J. G. Swings and E. L. Civerolo, eds. Chapman & Hall, London, U. K.
- Saddler, G., and J. Bradbury. 2005. The proteobacteria. In D. Brenner, N. Krieg, J. Staley, and G. Garrity (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, New-York: Springer ed, vol. 65.
- 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., Siguier, P., Thébault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J., and Boucher, C.A. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 415:497-502.
- Salmond, G.P.C. 1994. Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:181-200.
- Sandkvist, M. 2001. Biology of type II secretion. *Mol. Microbiol.* 40:271-283.
- Schaad, N.W., and White, W.C. 1974. Survival of *Xanthomonas campestris* in soil. *Phytopathology* 64:1518-1520.
- Schalk, I.J., Yue, W.W., and Buchanan, S.K. 2004. Recognition of iron-free siderophores by TonB-dependent iron transporters. *Mol. Microbiol.* 54:14-22.
- Schell, M.A., Ulrich, R.L., Ribot, W.J., Brueggemann, E.E, Hines, H.B, Chen, D., Lipscomb, L., Kim, H.S., Mrázek, J., Nierman, W.C., and DeShazer, D. 2007. Type VI secretion is a major virulence determinant in *Burkholderia mallei*. *Mol. Microbiol.* 64:1466-1485.
- Schneider, T.L., and Walsh, C.T. 2004. Portability of oxidase domains in nonribosomal peptide synthetase modules. *Biochemistry* 43:15946-15955.
- Schornack, S., Meyer, A., Römer, P., Jordan, T., and Lahaye, T. 2006. Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *J. Plant Physiol.* 163:256-272.
- Sebahia, M., Bocsanczy, A.M., Biehl, B.S., Quail, M.A., Perna, N.T., Glasner, J.D., DeClerck, G.A., Cartinhour, S., Schneider, D.J., Bentley, S.D., Parkhill, J., and Beer, S.V. 2010. Complete genome sequence of the plant pathogen *Erwinia amylovora* Strain ATCC 49946. *J. Bacteriol.* 192:2020-2021.
- Shen, Y., and Ronald, P. 2002. Molecular determinants of disease and resistance in interactions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice. *Microbes Infect.* 4:1361-1367.

- Shrivastava, S., and Mande, S.S. 2008. Identification and functional characterization of gene components of type VI secretion system in bacterial genomes. *PLoS One* 3:e2955.
- Sigee, D.C. 1993. Plant pathogenic bacteria in the environment. P. 77-106 in: *Bacterial Plant Pathology: Cell and Molecular Aspects*. D.C. Sigee, eds. Cambridge University Press, Cambridge.
- Simpson, A.J.G., Reinach, F.C., Arruda, P., Abreu, F.A., Acencio, M., Alvarenga, R., Alves, L.M.C., Araya, J.E., Baia, G.S., Baptista, C.S., Barros, M.H., Bonaccorsi, E.D., Bordin, S., Bové, J.M., Briones, M.R.S., Bueno, M.R.P., Camargo, A.A., Camargo, L.E.A., Carraro, D.M., Carrer, H., Colauto, N.B., Colombo, C., Costa, F.F., Costa, M.C.R., Costa-Neto, C.M., Coutinho, L.L., Cristofani, M., Dias-Neto, E., Docena, C., El-Dorry, H., Facincani, A.P., Ferreira, A.J.S., Ferreira, V.C.A., Ferro, J.A., Fraga, J.S., França, S.C., Franco, M.C., Frohme, M., Furlan, L.R., Garnier, M., Goldman, G.H., Goldman, M.H.S., 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.C., Lemos, E.G.M., Lemos, M.V.F., Lopes, S.A., Lopes, C.R., Machado, J.A., Machado, M.A., Madeira, A.M.B.N., Madeira, H.M.F., Marino, C.L., Marques, M.V., Martins, E.A.L., Martins, E.M.F., Matsukuma, A.Y., Menck, C.F.M., Miracca, E.C., Miyaki, C.Y., Monteiro-Vitorello, C.B., Moon, D.H., Nagai, M.A., Nascimento, A.L.T.O., Netto, L.E.S., Nhani, A., 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.G., Pereira, H.A., Pesquero, J.B., Quaggio, R.B., Roberto, P.G., Rodrigues, V., de M. Rosa, A.J., de Rosa, V.E., de Sá, R.G., Santelli, R.V., Sawasaki, H.E., da Silva, A.C.R., da Silva, A.M., da Silva, F.R., Silva, W.A., da Silveira, J.F., Silvestri, M.L.Z., Siqueira, W.J., de Souza, A.A., de Souza, A.P., Terenzi, M.F., Truffi, D., Tsai, S.M., Tshako, M.H., Vallada, H., Van Sluys, M.A., Verjovski-Almeida, S., Vettore, A.L., Zago, M.A., Zatz, M., Meidanis, J., and Setubal, J.C. 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406:151-157.
- Sinden, S.L., and Durbin, R.D. 1968. Glutamine synthetase inhibition: possible mode of action of wildfire toxin from *Pseudomonas tabaci*. *Nature* 219:379-380.
- Smith, R.S., and Iglewski, B.H. 2003. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *J. Clin. Invest.* 112:1460-1465.
- Smits, T.H.M., Rezzonico, F., Kamber, T., Blom, J., Goesmann, A., Frey, J.E., and Duffy, B. 2010. Complete genome sequence of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* CFBP 1430 and comparison to other *Erwinia* spp. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23:384-393.
- Soopramanien, G.C. 2000. Sugarcane morphology, anatomy and physiology. P. 13-20 in: *A Guide to Sugarcane Diseases*. P. Rott, R.A. Bailey, J.C. Comstock, B.J. Croft and A.S. Saumtally, eds. CIRAD and ISSCT, Montpellier, France.

- Stachelhaus, T., Hüser, A., and Marahiel, M.A. 1996. Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem. Biol.* 3:913-921.
- Stachelhaus, T., Mootz, H., and Marahiel, M. 1999. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* 6:493-505.
- Stevens, M.P., Wood, M.W., Taylor, L.A., Monaghan, P., Hawes, P., Jones, P.W., Wallis, T.S., and Galyov, E.E. 2002. An Inv/Mxi-Spa-like type III protein secretion system in *Burkholderia pseudomallei* modulates intracellular behaviour of the pathogen. *Mol. Microbiol.* 46:649-659.
- Suarez, G., Sierra, J.C., Sha, J., Wang, S., Erova, T.E., Fadl, A.A., Foltz, S.M., Horneman, A.J., and Chopra, A.K. 2008. Molecular characterization of a functional type VI secretion system from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Microb. Pathog.* 44:344-361.
- Swings, J. G., and Civerolo, E. L. 1993. *Xanthomonas*. P. 380 in: *Xanthomonas*. J. G. Swings and E. L. Civerolo, eds. Chapman & Hall, London, U. K.
- Szczesny, R., Jordan, M., Schramm, C., Schulz, S., Coge, V., Bonas, U., and Büttner, D. 2010. Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *New Phytol.* 187:983-1002.
- Tans-Kersten, J., Huang, H., and Allen, C. 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *J. Bacteriol.* 183:3597-3605.
- Teakle, D.S., Smith, P.M., and Steindl, D.R.L. 1974. Ratoon stunting disease of sugarcane: possible correlation of resistance with vascular anatomy. *Phytopathology* 65:138-141.
- Teakle, D.S., Appleton, J.M., and Steindl, D.R.L. 1978. An anatomical basis for resistance of sugar cane to ratoon stunting disease. *Physiol. Plant Pathol.* 12:83-88.
- Thanabalu, T., Koronakis, E., Hughes, C., Koronakis V. 1998. Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E.coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *EMBO J.* 17:6487-96.
- Thomas, M.D., Langston-Unkefer, P.J., Uchytel, T.F., and Durbin, R.D. 1983. Inhibition of glutamine synthetase from pea by tabtoxinine- β -lactam. *Plant Physiol.* 71:912-915.
- Thorne, E.T., Young, B.M., Young, G.M., Stevenson, J.F., Labavitch, J.M., Matthews, M.A., and Rost, T.L. 2006. The structure of xylem vessels in grapevine

- (*Vitaceae*) and a possible passive mechanism for the systemic spread of bacterial disease. *Am. J. Bot.* 93:497-504.
- Toh, H., Weiss, B.L., Perkin, S.A., Yamashita, A., Oshima, K., Hattori, M., and Aksoy, S. 2006. Massive genome erosion and functional adaptations provide insights into the symbiotic lifestyle of *Sodalis glossinidius* in the tsetse host. *Genome Res.* 16:149-156.
- Tseng, C.C., Bruner, S.D., Kohli, R.M., Marahiel, M.A., Walsh, C.T., and Sieber, S.A. 2002. Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase. *Biochemistry* 41:13350-13359.
- Tseng, T.-T., Tyler, B.M., and Setubal, J.C. 2009. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol.* 9:S2.
- Van Bambeke, F., Balzi, E., and Tulkens, P.M. 2000. Antibiotic efflux pumps. *Biochem. Pharmacol.* 60:457-470.
- Van den Ackerveken, G., Marois, E., and Bonas, U. 1996. Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell* 87:1307-1316.
- Van Dillewijn, C. 1960. *Botanique de la canne à sucre*. Hoveenman and Zonen N. V., Amsterdam, Netherlands, 321 p.
- Van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M.J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:135-162.
- Van Sluys, M.A., Monteiro-Vitorello, C.B., Camargo, L.E.A., Menck, C.F.M., da Silva, A.C.R., Ferro, J.A., Oliveira, M.C., Setubal, J.C., Kitajima, J.P., and Simpson, A.J. 2002. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:169-189.
- Vasse, J., Genin, S., Frey, P., Boucher, C., and Brito, B. 2000. The *hrpB* and *hrpG* regulatory genes of *Ralstonia solanacearum* are required for different stages of the tomato root infection process. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13:259-267.
- Vauterin, L., Hoste, B., Yang, P., Alvarez, A., Kersters, K., and Swings, J. 1993. Taxonomy of the genus *Xanthomonas*. P. 157-192 in: *Xanthomonas*. J.G. Swings and E. L. Civerolo, eds. Chapman & Hall., London, U.K.
- Vergne, E., Grand, X., Ballini, E., Chalvon, V., Saindrenan, P., Tharreau, D., Notteghem, J.-L., and Morel, J.-B. 2010. Preformed expression of defense is a hallmark of partial resistance to rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *BMC Plant Biol.* 10:206.
- Vivien, E., Megessier, S., Pieretti, I., Cociancich, S., Frutos, R., Gabriel, D.W., Rott, P.C., and Royer, M. 2005. *Xanthomonas albilineans* HtpG is required for

- biosynthesis of the antibiotic and phytotoxin albicidin. *FEMS Microbiol. Lett.* 251:81-89.
- Vivien, E., Pitorre, D., Cociancich, S., Pieretti, I., Gabriel, D.W., Rott, P.C., and Royer, M. 2007. Heterologous production of albicidin: a promising approach to overproducing and characterizing this potent inhibitor of DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:1549-1552.
- Völksch, B., and Weingart, H. 1998. Toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae* and their antagonistic activities against epiphytic microorganisms. *J. Basic Microbiol.* 38:135-145.
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M.L., Lazdunski, A., Wu, L.-F., and Filloux, A. 2001. Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J.* 20:6735-6741.
- Wall, D., and Kaiser, D. 1999. Type IV pili and cell motility. *Mol. Microbiol.* 32:1-10.
- Walsh, C.T., Chen, H., Keating, T.A., Hubbard, B.K., Losey, H.C., Luo, L., Marshall, C.G., Miller, D.A., and Patel, H.M. 2001. Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5:525-534.
- Wandersman, C., and Delepelaire, P. 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu. Rev. Microbiol.* 58:611-647.
- Wang, L.H., He, Y., Gao, Y., Wu, J.E., Dong, Y.H., He, C., Wang, S.X., Weng, L.X., Xu, J.L., Tay, L., Fang, R.X., and Zhang, L.H. 2004. A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol. Microbiol.* 51:903-912.
- Ward, E.R., Payne, G.B., Moyer, M.B., Williams, S.C., Dincher, S.S., Sharkey, K.C., Beck, J.J., Taylor, H.T., Ahl-Goy, P., Meins, F. Jr., and Ryals, J.A. 1991. Differential regulation of β -1,3-glucanase messenger RNAs in response to pathogen infection. *Plant Physiol.* 96:390-397.
- Wäspi, U., Blanc, D., Winkler, T., Raedi, P., and Dudler, R. 1998. Syringolin, a novel peptide elicitor from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* that induces resistance to *Pyricularia oryzae* in rice. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11:727-733.
- Wäspi, U., Schweizer, P., Dudler, R. 2001. Syringolin reprograms wheat to undergo hypersensitive cell death in a compatible interaction with powdery mildew. *Plant Cell.* 13:153-61.
- Weber, T., Baumgartner, R., Renner, C., Marahiel, M.A., and Holak, T.A. 2000. Solution structure of PCP, a prototype for the peptidyl carrier domains of modular peptide synthetases. *Structure* 8:407-418.

RESUME : *Xanthomonas albilineans* est l'agent causal de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre. Peu d'éléments sont connus sur les bases moléculaires de l'invasion du xylème de la canne à sucre par cette bactérie. Nous manquons également d'informations sur l'écologie de *X. albilineans* qui, dans certaines zones de culture et dans des conditions climatiques particulières, est capable d'infecter la canne à sucre par voie aérienne. La découverte récente dans le génome de *X. albilineans* de clusters de gènes spécifiques à cette espèce ouvre de nouvelles perspectives. Bien qu'aucune association de *X. albilineans* avec un hôte animal n'ait été décrite à ce jour, cette bactérie possède un système de sécrétion de type III SPI-1 ("Salmonella Pathogenicity Island-1"). Nous avons montré que ce système n'est pas indispensable à la multiplication de *X. albilineans in planta*. Des analyses de phylogénie, de recombinaison et de sélection de ce système au sein de souches représentatives de la diversité de *X. albilineans* permettent de proposer de nouvelles hypothèses sur l'écologie de cette bactérie. *X. albilineans* possède aussi plusieurs clusters de gènes NRPS ("NonRibosomal Peptide Synthetase"), dont l'un est impliqué dans la biosynthèse de l'albicidine, une phytotoxine responsable de l'apparition de symptômes foliaires. Des analyses *in silico* ont permis de montrer que les autres clusters de gènes NRPS de *X. albilineans* sont impliqués dans la biosynthèse et la sécrétion de nouvelles petites molécules. Le rôle de ces molécules reste inconnu mais, d'après l'analyse fonctionnelle des NRPS de *X. albilineans*, au moins une de ces molécules influence la multiplication de la bactérie *in planta*.

Mots clés : *Xanthomonas albilineans*, NonRibosomal Peptide Synthetase (NRPS), Système de Sécrétion Type III SPI-1 (SST3 SPI-1).

Role of the SPI-1 type III secretion system and of the NRPS megaenzymes in the life cycle of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald

ABSTRACT : *Xanthomonas albilineans* is a systemic, xylem-invading pathogen that causes leaf scald disease of sugarcane. Very little is currently known about the molecular bases of the invasion of the sugarcane xylem by this bacterium. Information is also lacking on the ecology of *X. albilineans* which is able, in certain geographical locations and under certain climate conditions, to infect sugarcane after aerial transmission. The recent discovery in the genome of *X. albilineans* of gene clusters specific to this species offers new research perspectives. *X. albilineans*, which is not known to be animal-associated, possesses a type III secretion system (T3SS) belonging to the SPI-1 (*Salmonella* Pathogenicity Island-1) injectisome family. Functional analyses confirmed that this system is not required by *X. albilineans* to spread within xylem vessels and to cause disease symptoms. Based on phylogenetic, recombination and selection analyses of T3SS SPI-1 sequences from strains spanning the genetic diversity of *X. albilineans*, new hypotheses were proposed regarding the ecology of this bacterium. *X. albilineans* possesses also several NRPS (NonRibosomal Peptide Synthetase) gene clusters, including a gene cluster which was previously shown to be involved in the biosynthesis of albicidin, a phytotoxin causing foliar symptoms. *In silico* analyses indicated that other NRPS gene clusters of *X. albilineans* are involved in biosynthesis and secretion of new small molecules with unknown function. However, functional analyses of NRPSs showed that at least one these new small molecules influence the spreading of *X. albilineans in planta*.

Key words : *Xanthomonas albilineans*, NonRibosomal Peptide Synthetase Type III Secretion System SPI-1 (T3SS SPI-1).

Discipline : **Biologie Intégrative des Plantes**

Unité où la thèse a été préparée : **UMR BGPI TA A-54/K Campus International de Baillarguet 34398 MONTPELLIER CEDEX 5**