THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Interactions plantes-microorganismes

Présentée et soutenue par :

M. ARRY MOREL

le lundi 17 décembre 2018

Titre :

Etude du rôle lors de l'infection et sur la défense des plantes hôtes des effecteurs de type III RipH1,2,3 et RipAX2 de Ralstonia pseudosolanacearum

---

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Laboratoire Interactions Plantes Microorganismes (LIPM)

Directeur(s) de Thèse :

M. NEMO PEETERS

Rapporteurs :

Mme MATHILDE FAGARD, INRA VERSAILLES GRIGNON

Mme SYLVIE GERMAN-RETANA, INRA BORDEAUX

Membre(s) du jury :

M. JEAN-PHILIPPE GALAUD, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Président

M. BORIS SZUREK, IRD MONTPELLIER, Membre

M. BRUNO FAVERY, INRA PACA, Membre

M. NEMO PEETERS, INRA TOULOUSE, Membre

Remerciements

J'ai passé 3 ans et 6 mois si on compte le stage précédent au LIPM à travailler sur mon sujet de thèse, et c'était fantastique.

Merci à Nemo qui m'a permis de faire cette thèse et pour ses encouragements. J'ai beaucoup aimé faire de la science avec toi, merci pour ta confiance.

Merci à toutes les personnes de l'équipe ou non que j'ai côtoyé pour le travail et aux échanges scientifiques que j'ai pu avoir.

Merci à tous les amis que j'ai rencontré au labo, mentions spéciales pour quelques-uns. Antho avec qui j'ai eu des conversations obscures pour le commun des scientifiques sur « votre jeu-là ». Ben avec qui j'ai passé des super soirées. Manu pour les soirées et le râlage, David pour le râlage (et un peu la science). Claire et ses octodons trop choux. Pauline pour partager du martini et des ragotages. Et les autres (je le montre pas toujours mais je vous kiffe les gens) !

Merci à tous mes autres potes « pas du labo », Chloé avec qui on s'est mutuellement encouragés à rédiger (la plupart du temps) et son chat. Adélie, meilleure pour encore très longtemps j'espère ! Elye pour le croisage dans le sens inverse sur l'autoroute du tu-sais-quoi, 10/10 t'es une super pote, et Morgan pour cette expression -il me semble- ou alors simplement pour les expressions bien trouvées en général ; meilleur pote parisien (et corse et espagnol). Farah et Lux, je vous <3 aussi (j'ai beaucoup d'appréciation pour les gens qui continuent de me donner des petits noms malgré mon manque de réciprocité) ! Et les autres gens que j'ai pu rencontrer pendant cette période !

Enfin, un gros merci à mes parents qui continuent de me nourrir, chez qui je peux laver mon linge tous les dimanches et qui me donnent surtout beaucoup d'amour. <3

Résumé

Le système de sécrétion de type III est un des déterminants majeurs de la pathogénicité de *Ralstonia pseudosolanacearum* qui lui permet d'injecter des effecteurs de type III (les « Rip », « Ralstonia Injected Protein ») directement dans les cellules des plantes hôtes. Les effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3 sont des effecteurs de type III conservés dans la plupart des souches séquencées. Au cours de ma thèse, le rôle de ces effecteurs RipH lors de l'infection de différentes plantes a été étudié en prenant comme point d'entrée les protéines de tomates avec lesquelles ces effecteurs interagissent. Un criblage par double hybride dans la levure a permis d'identifier 19 de ces protéines « cibles » de tomate. Des méthodes de génétique inverse ont ensuite été utilisées pour chercher le rôle des orthologues de ces protéines dans différentes plantes modèles lors de l'infection par *Ralstonia pseudosolanacearum*. Du VIGS chez *Nicotiana benthamiana* a permis de mettre en évidence l'implication des orthologues de la protéine TOM3 : la multiplication bactérienne est moins importante dans les feuilles lorsque l'expression de ces gènes est diminuée. Dans *Arabidopsis thaliana*, des mutants d'un gène orthologue de la cible TOM9, décrit comme jouant entre autres un rôle dans la remodélisation de la chromatine, est plus résistant à l'infection par *R. pseudosolanacearum*.

Dans un deuxième chapitre correspondant à un article publié, le rôle de l'effecteur RipAX2 a été étudié dans la résistance des aubergines AG91-25. La présence de cet effecteur dans la souche GMI1000 est nécessaire à l'établissement de la résistance de cette variété dans laquelle le locus de résistance EBWR9 a été mis en évidence. L'ajout de RipAX2 dans la souche PSS4, une souche pathogène de AG91-25 qui ne possède pas cet effecteur naturellement, la rend non pathogène. De plus, le motif protéique putatif « zinc-binding » qui est décrit comme nécessaire pour l'induction de réponses de défense chez l'espèce proche de l'aubergine *Solanum torvum* n'est pas nécessaire pour la résistance de AG91-25. Enfin, la conservation de l'effecteur RipAX2 dans les différentes souches du complexe d'espèces de *Ralstonia solanacearum* a été étudiée pour évaluer l'efficacité potentielle de cette source de résistance contre différentes souches.

Abstract

One of the major virulence determinants of plant pathogenic *Ralstonia* species is the type III secretion system that enables it to inject proteins (also called “Ralstonia Injected Proteins” or Rip) into the host cells. The RipH1,2,3 type III effectors are conserved in different strains of the *Ralstonia solanacearum* species complex. The role of these effectors during infection has been studied, taking as an entry point the tomato proteins they interact with. Using yeast-two-hybrid screenings we have identified 19 tomato targets of these three RipH. Reverse genetics methods have then been used to study the role of orthologous genes of these targets in other model plants. Virus induced gene silencing in *Nicotiana benthamiana* showed that the orthologous genes of TOM3 were involved in plant response to *Ralstonia pseudosolanacearum*, as the bacterial multiplication was diminished in plants silenced for these genes. In *Arabidopsis thaliana*, mutants of the TOM9 orthologous gene which is described as involved in chromatin remodelisation were more tolerant to infection.

In a second chapter corresponding to a published article, the role of RipAX2 has been studied. This effector triggers specific resistance in AG91-25 eggplant which carry the major resistance locus *EBWR9.* This eggplant accession AG91-25 is resistant to the wild type *R. pseudosolanacearum* strain GMI1000, while a *ripAX2* defective mutant of this strain can cause wilt. The addition of *ripAX2* from GMI1000 to the naturally pathogenic strain PSS4 suppresses its pathogenicity, demonstrating that RipAX2 causes AG91-25 resistance. Moreover, a zinc binding motif described as necessary to induce defenses on the eggplant wild relative *Solanum torvum* upon RipAX2 recognition is not necessary for AG91-25 resistance. The conservation of RipAX2 has been studied in the different strains of the bacteria in order to determine the potential of this resistance source against various strains for breeding.

Table des matières

Remerciements 1
Résumé 2
Abstract 3
Liste des abréviations 8
Liste des figures 10
Liste des tableaux 15
Introduction 16
1. *Ralstonia solanacearum* et le flétrissement bactérien 17
1.1. Différentes espèces de *Ralstonia solanacearum* 17
1.2. Spectre d'hôte et impact économique 18
1.3. Cycle de la maladie 19
1.4. Stratégies de contrôle de la maladie 20
1.5. Caractéristiques génomiques et facteurs de virulence de *Ralstonia solanacearum* 21
1.6. Système de sécrétion de type III 23
2. Système immunitaire des plantes 24
2.1. Reconnaissance des pathogènes 24
2.1.1. Reconnaissance par des récepteurs extracellulaires 24
2.1.2. Reconnaissance par des récepteurs intracellulaires 25
2.2. Après la reconnaissance des pathogènes des voies de défenses sont mises en place pour contrôler l'infection 28
2.2.1. Flux d'ions et signalisation 28
2.2.2. Espèces réactives de l'oxygènes 28
2.2.3. Déposition de callose 29
2.2.4. Cascades de MAP kinases 29
2.2.5. Signalisations hormonales 30
2.2.6. Gènes PR 31
2.2.7. Réponse hypersensible 31
2.2.8. Défenses à long terme 31
2.3. Contournement des défenses des plantes par les pathogènes 32
2.4. D'autres facteurs que les défenses des plantes et la suppression de celles-ci rentrent en jeu lors de l'infection par les pathogènes 33
2.5. Co-evolution constante plantes pathogènes 34
3. Les effecteurs de type III du complexe d'espèce de *Ralstonia solanacearum* 35
3.1. Diversité et conservation des effecteurs de type III du RSSC 35

3.2. Effecteurs de type III du RSSC dont certains rôles ont été étudiés 36
3.2.1. RipP2 36
3.2.2. RipP1 et RipAA 36
3.2.3. La famille des RipG 37
3.2.4. Famille des RipA 38
3.2.5. RipTPS 39
3.2.6. RipTAL 39
3.2.7. RipAY 40
3.2.8. RipR 40

Projet de thèse 41

Résultats – Chapitre I : Étude du rôle des effecteurs RipH1, RipH2, RipH3 lors de l'infection des plantes hôtes par *R. pseudosolanacearum* 42

1. Les effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3 de *R. pseudosolanacearum* font partie d'une famille d'effecteurs et sont conservés dans une majorité de souches 43

1.1. Les effecteurs RipH dans le RSSC 43

1.2. Les fonctions de RipH1, RipH2 et RipH3 ne sont pas connues mais leur orthologue XopP joue un rôle lors de l'infection du riz 44

1.3. Les effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3 semblent contribuer fortement à l'infection de la tomate par la souche OE1-1 45

1.4. Le phénotype de réduction de pathogénicité du triple mutant *ΔripH* n'est pas confirmé pour la souche GMI1000 45

1.5. Localisation des effecteurs RipH dans les cellules des plantes 46

1.6. Construction de tomates transgéniques exprimant les effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3 .. 46

1.7. L'expression des effecteurs RipH cause une diminution du « ROS burst » induit par un signal de stress biotique 47

2. Criblage par double hybride dans la levure des protéines de tomates interagissant avec les effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3 49

2.1. Base de données « effectorK » 50

2.2. Clonage des cibles dans des vecteurs gateway 52

2.3. Étude de la localisation des protéines interagissant avec les effecteurs RipH 52

2.4. Choix de la stratégie pour étudier le rôle des protéines cibles trouvées par double hybride dans la levure 53

2.5. Étude du « ROS burst » après surexpression des cibles TOM dans *N. benthamiana* 53

2.6. Recherche des orthologues des gènes TOM dans *Arabidopsis thaliana* et phénotypage des mutants disponibles 54

2.7. Recherche des orthologue des gènes TOM dans *Nicotiana benthamiana* et phénotypage lorsque l'expression de ces gènes a été diminuée par VIGS 54

3. Méthodes testées pour étudier les interactions protéines-protéines 56

1.1. Méthode du « Split-YFP » 56

1.2. Méthode du « Split luciferase » 57

4. TOM1/RAV1 et TOM2/RAV2 sont des facteurs de transcriptions interagissant avec RipH1 ... 58

4.1. TOM1/RAV1 et TOM2/RAV2 appartiennent à la famille de facteurs de transcription AP2/EREBP 58

4.2. Présence d'un domaine putatif de répression transcriptionnelle et interaction de certains gènes de la famille AP2/EREBP avec les protéines TOPLESS 59

4.3. Les facteurs de transcription de la famille AP2/EREBP ont des rôles variés chez les plantes 60

4.4. Implication dans la réponse au stress biotiques de certains gènes RAV 61

4.5. Le gène RAV2 est décrit chez la tomate comme un régulateur positif de la défense contre *Ralstonia pseudosolanacearum* 61

4.6. Une expérimentation de qRT-PCR ne permet pas de confirmer les résultats trouvés par Li et al. 2011 62

4.7. Des tomates Micro-tom surexprimant RAV2/TOM2 ne sont pas significativement plus tolérantes que des Micro-tom sauvages. 63

4.8. Des tomates M82 TOM2 ARNi ne sont pas significativement plus sensible à l'infection par *R. pseudosolanacearum* 63

4.9. Des tomates M82 35S::*tom2* ne sont pas significativement plus résistantes à l'infection par *R. pseudosolanacearum* 64

4.10. L'expression de RAV1/TOM1 et RAV2/TOM2 semble diminuer la production de ROS après induction par flg22 dans *N. benthamiana* 65

4.11. Étude de l'orthologie des gènes TOM1/RAV1 et TOM2/RAV2 65

4.12. Des mutants T-DNA dans *A. thaliana* de deux gènes orthologues à TOM2/RAV2 n'ont pas de phénotype différent des plantes sauvages après inoculation par *R. pseudosolanacearum* 65

4.13. Dans *N. benthamiana*, la diminution de l'expression des orthologues de TOM1/RAV1 et TOM2/RAV2 n'impacte pas la multiplication de *R. pseudosolanacearum* après infiltration dans les feuilles 66

4.14. Discussion et perspectives 67

5. La protéine TOM3 interagit avec l'effecteur RipH1 et ses orthologues dans *Nicotiana benthamiana* jouent un rôle dans la réponse immunitaire 68

5.1. TOM3 est une protéine contenant un domaine BTB/POZ 68

5.2. Des mutants des gènes orthologues de TOM3 dans *Arabidopsis thaliana* n'ont pas de phénotype différentiel 69

5.3. TOM3 possède trois orthologues dans *Nicotiana benthamiana* qui jouent un rôle dans la réponse de cette plante à l'infection par *Ralstonia pseudosolanacearum* 69

5.4. NbTOM3 dans le tabac et dans *Nicotiana benthamiana* joue un rôle dans la suppression de la HR et dans la réponse à plusieurs pathogènes 70

5.5. Discussion et perspectives 71

6. TOM9 interagit avec RipH3 et RipD et possède un orthologue dans *Arabidopsis thaliana* impliqué dans la réponse à l'infection par *R. pseudosolanacearum* 72

6.1. TOM9 appartient à une famille de protéine connues pour jouer un rôle dans la remodélisation de la chromatine 72

6.2. Un mutant d'un orthologue de TOM9 dans *Arabodopsis thaliana* a été décrit comme ayant une réponse altérée à un stress biotique 72

6.3. Les mutants *Arabidopsis thaliana* de l'orthologue à TOM9 sont plus tolérants à l'infection par *Ralstonia pseudosolanacearum* 73

6.4. L'inoculation d'une construction VIGS visant à diminuer l'expression des orthologues de TOM9 dans *Nicotiana benthamiana* cause un fort phénotype de nanisme 74

6.5. Discussion et perspectives 74

Chapitre II : La variété d'aubergine AG91-25 reconnait l'effecteur RipAX2 de *Ralstonia pseudosolanacearum* ce qui permet sa résistance 76

Introduction du chapitre 77

Matériel et méthodes 102

1. Milieux de cultures 102
   1.1. Milieu LB pour *E. coli* et *Agrobacterium tumefaciens* 102
   1.2. Milieu Φ pour *Ralstonia pseudosolanacearum* 102
   1.3. Milieu minimum MP pour *Ralstonia pseudosolanacearum* 102
   1.4. Milieu complet YPGA pour levures : 102
   1.5. Milieu minimum DO pour levures 102

2. Criblage par double hybride dans la levure 102

3. Conditions de culture des plantes 103

4. Agro infiltration pour expression transitoire 103

5. Observations en microscopie confocale 104

6. Transformation stable de tomates 104
   6.1. Cytométrie de flux pour déterminer la ploïdie des plants de tomates transformés .. 105

7. Transformation de *R. pseudosolanacearum* 105

8. Mesure de la croissance bactérienne dans du matériel végétal 105

9. « Virus Induced Gene Silencing » 106

10. Mesure de l'expression de gènes par qRT-PCR 106

11. Inoculation par *R. pseudosolanacearum* et phénotypage des symptômes de flétrissement 107

12. Génotypage des mutants Arabidopsis thaliana 107

13. « ROS burst » 108

14. Détection de la présence de protéines 108

15. « Split-Luciferase » 108

Méthode : article « Phénotypage de la pathogénicité de *Ralstonia solanacearum* sur les plantes » 110
Résumé de l'article : 110
Conclusion générale 120
Références 122
Annexe 1 – Article « Expression of the Arabidopsis thaliana immune receptor EFR in Medicago truncatula reduces infection by a root pathogenic bacterium, but not nitrogen-fixing rhizobial symbiosis. » 140
Résumé de l'article 140
Contribution 141
Annexe 2 – Article « NRG1-mediated recognition of HopQ1 reveals a link between PAMP and Effector-triggered Immunity. » 142
Résumé de l'article 142
Contribution 142

Liste des abréviations

ADN-T : ADN de Transfert

BDB : « Blood Disease Bacterium »

BTB : « Broad-complex, Tramtrack and Bric à brac »

CDPK : « calcium dependant protein kinases »

Cfu : « Colony-forming unit »

ETI : « Effector Triggered Immunity »

MAMP : « Microbe Associated Molecular Pattern »

HR : « Hypersenitive Response »

HRP : « Hypersensitive Response and Pathogenicity »

NLR : « Nucleotide binding (NB) » et « Leucine rich repeat (LRR) »

PCR : « Polymerase Chain Reaction »

PR : « Pathogenesis Related »

POZ : « Pox virus and Zinc finger »

PRR : « Pattern Recognition Receptor »

PTI : « Pattern Triggered Immunity »

Rip : « Ralstonia Injected Protein »

RLK : « Receptor Like-Kinase »

RLP : « Receptor Like Protein »

RSSC : « Ralstonia Solanacearum Species Complex »

SST3 : Système de Sécrétion de Type 3

T3E : « Type III Effector »

Liste des figures

Figure 1. Arbre phylogénétique des différentes souches et espèces du complexe d'espèces de *R. solanacearum* créé à partir de distances génétiques calculées par trois méthodes différentes (Prior et al., 2016) **Page 16**

Figure 2. Symptômes de flétrissement bactérien causés par *Ralstonia solanacearum* **Page 17**

Figure 3. Cycle infectieux de *R. pseudosolanacearum* d'après Genin 2010 **Page 17**

Figure 4. Schématisation de la structure du système de sécrétion de type III d'après Büttner, 2012 **Page 21**

Figure 5. Exemple de perception de ligands par des PRR d'après Macho et Zipfel, 2014. **Page 22**

Figure 6. Exemple de complexes formés par les récepteurs extracellulaires et d'activation des premières voies de défense et de signalisation d'après Macho et Zipfel, 2014. **Page 23**

Figure 7. Schéma de différents modèles de la reconnaissance des effecteurs par les NLR. **Page 24**

Figure 8. Le modèle en zig-zag illustre les résultats d'une interaction plante-pathogène, d'après Jones and Dangl, 2006. **Page 30**

Figure 9. Répartition des effecteurs de type III dans différentes souches du RSSC **Page 33**

Figure 10, d'après Le Roux et al., 2015. Schématisation du rôle de RipP2/PopP2 lors de l'interaction entre *R. pseudosolanacearum* et *A. thaliana*. **Page 34**

Figure 11. Visualisation de la présence et absence des effecteurs RipH1, RipH2, RipH3 et RipH4 dans 11 souches du complexe d'espèce de *Ralstonia solanacearum.* **Page 42**

Figure 12. Arbre phylogénétique créé à partir des séquences protéiques des effecteurs RipH1, RipH2, RipH3 et RipH4 des souches GMI1000, CMR15, KACC10722, Psi07 et CFBP2957 du RSSC et XopP de *Xantomonas oryzae pv. oryzae*. **Page 42**

Figure 13, d'après Chen et al. 2014. Courbes de maladie de tomates inoculées par OE1-1 et des mutants d'effecteurs RipH. **Page 43**

Figure 14. Pourcentage de survie après inoculation par arrosage de tomates par le mutant GRS522, la souche sauvage GMI1000 et des mutants simples et doubles des effecteurs RipH. **Page 43**

Figure 15. Phénotypage des souches GRS522 complémentés par les effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3 sur tomate. **Page 43**

Figure 16. Pourcentage de survie après inoculation par arrosage de tomates par le mutant GRS522, la souche sauvage GMI1000 et des mutants de délétion ripH fait par la méthode SacB. **Page 44**

Figure 17. Visualisation de la localisation des effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3 fusionnés à la mRFP après expression transitoire dans des cellules de *N. benthamiana*. **Page 44**

Figure 18. L'expression de RipH1, RipH2 et RipH3 diminue le « ROS burst » **Page 46**

Figure 19. Unités relatives de luminescence après induction des ROS par Flg22 dans des feuilles *de N. benthamiana* transformées par les effecteurs RipH. **Page 46**

Figure 20a. Visualisation des protéines interagissant avec l'effecteur RipH1 grâce à la base de données effectorK. **Page 49**

Figure 20b. Visualisation des protéines interagissant avec l'effecteur RipH2 grâce à la base de données effectorK. **Page 49**

Figure 20c. Visualisation des protéines interagissant avec l'effecteur RipH3 grâce à la base de données effectorK. **Page 49**

Figure 20d. Visualisation des protéines interagissant avec plus de deux effecteurs parmi RipH1, RipH2 et RipH3. **Page 49**

Figure 21. Visualisation dans la base de données effectorK des protéines TOM, de leurs orthologues dans *A. thaliana* et de leurs interactions. **Page 49**

Figure 22. Localisation de certaines protéines TOM **Page 50**

Figure 23. Unités relatives de luminescence après induction des ROS par Flg22 dans des feuilles de *N. benthamiana* exprimant certaines protéines TOM. **Page 52**

Figure 24. Western blot montrant l'expression des protéines fusionnées à la GFP. **Page 52**

Figure 25. Phénotypage après inoculation par arrosage de la souche GMI1000 de *R. pseudosolanacearum* de mutants dans les orthologues de TOM5 chez *Arabidopsis thaliana.* **Page 52**

Figure 26. Phénotypage après inoculation par arrosage de la souche GMI1000 de *R. pseudosolanacearum* de mutants dans les orthologues de TOM14 chez *Arabidopsis thaliana.* **Page 52**

Figure 27. Phénotypage après inoculation par arrosage de la souche GMI1000 de *R. pseudosolanacearum* de mutants dans les orthologues de TOM16 chez *Arabidopsis thaliana*. **Page 52**

Figure 28. Phénotypage après inoculation par arrosage de la souche GMI1000 de *R. pseudosolanacearum* de mutants dans les orthologues de TOM18 chez *Arabidopsis thaliana.* **Page 52**

Figure 29. Multiplication bactérienne après infiltration dans des feuilles de *N. benthamiana* dont l'expression de gènes cibles a été diminuée **Page 52**

Figure 30. Expression de certains gènes de *N. benthamiana* orthologues des TOM dans des plantes transformées transitoirement par une construction VIGS ou une construction TRV2 contrôle. **Page 53**

Figure 31. Visualisation au microscope confocal de feuilles de *N. benthamiana* transformées transitoirement par des constructions split-YFC. **Page 54**

Figure 32. Luminescence émise après infiltration de luciférine dans des feuilles de *N. benthamiana* transformées transitoirement par des constructions de split luciférase. **Page 55**

Figure 33. RipH1 interagit avec TOM1 (A) et TOM2 (B) en double hybride dans la levure. **Page 56**

Figure 34, de Sakuma et al. 2002. Arbre phylogénétique de protéines de la famille AP2. **Page 56**

Figure 35. Schéma récapitulant les familles de facteurs de transcriptions de la superfamille des AP2/EREBP. **Page 57**

Figure 36. Domaines prédit par InterPro (Finn et al. 2017) à partir de la séquence d'acides aminés de TOM1 et TOM2. **Page 57**

Figure 37, de Li. et al. 2011. Phénotypage de tomates surexprimant RAV2/TOM2 ou dans lesquelles l'expression de RAV2/TOM2 a été diminuée par RNAi. **Page 60**

Figure 38. Expression des gènes TOM1, TOM2, ERF5, Pti4, Pti6, PR5, PR9 and PR10 2h, 8h et 18h après inoculation par la souche GMI1000 de *R. pseudosolanacearum* et le mutant du SST3 GMI1000ΔhrcV. **Page 60**

Figure 39. Courbe de survie après inoculation de tomates cv Micro tom et Micro tom 35S::tom2 (Li et al. 2011). **Page 61**

Figure 40. Courbe de survie après inoculation de tomates M82 et M82 transformées par un plasmide contenant une construction visant à éteindre l'expression de tom2/rav2 (Li et al. 2011). **Page 62**

Figure 41. Courbe de survie après inoculation de tomates M82 et M82 transformées par un plasmide contenant une construction permettant de surexprimer tom2/rav2 (Li et al. 2011). **Page 62**

Figure 42. Unités relatives de luminescence après induction des ROS par Flg22 dans des feuilles de *N. benthamiana* exprimant les protéines TOM1 et TOM2. **Page 63**

Figure 43. Arbres phylogénétiques de TOM1/RAV1 et TOM2/RAV2 crées à partir des séquences des gènes orthologues retrouvés par orthoMCL. **Page 63**

Figure 44. Courbe de survie après inoculation de mutants de gènes orthologues de TOM2 dans *A. thaliana*. **Page 64**

Figure 45. Multiplication bactérienne après infiltration dans des feuilles de *N. benthamiana* dont l'expression de gènes orthologues de TOM2 a été diminuée. **Page 65**

Figure 46. Visualisation dans la base de données effectorK de TOM3, de ses orthologues dans *A. thaliana* et de leurs interactions. **Page 66**

Figure 47. Domaines prédit par InterPro (Finn et al. 2017) à partir de la séquence d'acides aminés de TOM3. **Page 66**

Figure 48. Courbe de survie après inoculation de mutants de gènes orthologues de TOM3 dans Arabidopsis thaliana. **Page 67**

Figure 49. Arbre phylogénétique des gènes paralogues et orthologues à TOM3 retrouvés par orthoMCL. **Page 67**

Figure 50. Expression des gènes *NbTOM3-1, NbTOM3-2* et *NbTOM3-3* après diminution de l'expression par VIGS. **Page 68**

Figure 51. Réduction de la multiplication bactérienne dans des *N. benthamiana* dont l'expression des gènes orthologues à TOM3 a été diminuée. **Page 68**

Figure 52. Courbe de survie après inoculation *N. benthamiana* dont l'expression de *NbTOM3-1 NbTOM3-2* et *NbTOM3-3* a été diminué. **Page 69**

Figure 53, de Orosa et al., 2017. NbPOB1 est un régulateur négatif de la défense basale et de la réponse hypersensible associée à la mort cellulaire programmée induite par différents pathogènes et effecteurs **Page 69**

Figure 54. Visualisation dans la base de données effectorK de TOM9, de son orthologue dans *A. thaliana* et de leurs interactions. **Page 70**

Figure 55. Domaines prédit par InterPro (Finn et al. 2017) à partir de la séquence d'acides aminés de TOM9. **Page 70**

Figure 56. Arbre phylogénétique des gènes paralogues et orthologues à TOM9 retrouvés par orthoMCL. **Page 70**

Figure 57. Schéma représentant la position relative des insertions T-DNA et des mutants ponctuels syd des mutants du gène SYD/AtTOM9 **Page 71**

Figure 58. Courbe de survie après inoculation par *R. pseudosolanacearum* de *A. thaliana* Col-0 et du mutant *AtTOM9-1* d'un orthologue de TOM9. **Page 71**

Figure 59. Courbe de survie après inoculation par *R. pseudosolanacearum* de *A. thaliana* Col-0 et du mutant *AtTOM9-2* d'un orthologue de TOM9. **Page 72**

Figure 60. Survie après inoculation par *R. pseudosolanacearum* des mutants syd-1 et syd-2. **Page 72**

Figure 61. Échelle de notation des symptômes de flétrissement bactérien pour A) la tomate B) *Arabidopsis thaliana.* **Page 79**

Figure supplémentaire 1. L'expression de *EFR* dans *Medicago truncatula* amène une résistance quantitative contre le pathogène *Ralstonia pseudosolanacearum.*

Figure supplémentaire 2. La diminution de l'expression de NRG1 augmente la multiplication de *Pseudomonas syringae* DC3000 dans les feuilles de *N. benthamiana.*

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste des effecteurs du RSSC conservés dans 14 souches sélectionnées du RSSC. **Page 33**

Tableau 2. Liste des effecteurs du RSSC sous pression de sélection diversifiante d'après Peeters et al. 2013. **Page 33**

Tableau 3. Transformants de tomates M82 contenant des T-DNA permettant d'exprimer RipH1, RipH2 et RipH3 sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'œstradiol XVE (Zuo et al., 2000). **Page 45**

Tableau 4. Ensemble des protéines trouvées par les criblages par double hybride dans la levure en utilisant comme appâts RipH1, RipH2 et RipH3. **Page 47**

Tableau 5. 19 protéines de tomates trouvées par criblage par double hybride dans la levure à partir de RipH1, RipH2 et RipH3 comme appât. **Page 48**

Tableau 6. Plasmides des gènes TOM clonés et disponibles au laboratoire. **Page 50**

Tableau 7. Liste des mutants dans *Arabidopsis thaliana* des orthologues de gènes TOM qui ont été phénotypés. **Page 52**

Tableau 8. Récapitulatif des gènes orthologues des gènes TOM dans *N. benthamiana* pour lesquels des constructions VIGS ont été réalisés **Page 52**

Tableaux 9 et 10. Liste des lignées obtenues après transformation de tomates M82 par les vecteurs utilisés dans Li et al. 2011. **Page 61**

Tableau 11. Plasmides utilisés pour l'expression transitoire de protéines cibles fusionnées à la YFP **Page 76**

Tableau 12 – Oligonucléotides utilisés pour le clonage SacB **Page 77**

Tableau 13 – Oligonucléotides utilisés pour le clonage des constructions VIGS **Page 78**

Tableau 14 – Oligonucléotides utilisés pour la qRT-PCR **Page 78**

Tableau 15 – Oligonucléotides utilisés pour le génotypage des mutants *A. thaliana* **Page 79**

Tableau 16 – Plasmides utilisés pour l'expression de protéines d'intérêt fusionnées à la GFP **Page 80**

Tableau 17 – Plasmides utilisés pour l'expression de protéines d'intérêt fusionnées aux parties N et C terminales de la luciferase **Page 80**

Introduction

1. *Ralstonia solanacearum* et le flétrissement bactérien

1.1. Différentes espèces de *Ralstonia solanacearum*

La maladie du flétrissement bactérien est causée par les bactéries du complexe d'espèce de *Ralstonia solanacearum* appartenant à la famille des β-protéobactéries. Cette maladie est répandue dans les pays ayant un climat tropical ou subtropical (Hayward, 1991). Le spectre d'hôtes est très important : plus de 200 espèces végétales appartenant à 44 familles botaniques (Hayward, 1991).

La classification des différentes souches de cette bactérie a beaucoup évolué ces dernières années avec les connaissances liés au séquençage des souches. Initialement, les différentes souches de « *Pseudomonas solanacearum* » étaient classées en races en fonction de leurs hôtes (races 1 à 5) et en « biovar » en fonction de leur métabolisme d'utilisation de différents substrats de sucres et d'alcool (« biovar » 1 à 5) (Hayward, 1991). Ces bactéries ont ensuite été classées grâce à des avancées génétiques dans un nouveau genre « Ralstonia », changeant le nom de l'espèce en *Ralstonia solanacearum* (Yabuuchi et al., 1995).

Le système de race et de biovar étant peu clair et non représentatif des différences phylogénétiques, les espèces de *Ralstonia solanacearum* ont ensuite été classées en quatre phylotypes (Allen et al., 2005). Chaque phylotype correspond à un groupe monophylétique. Les souches isolées en Asie appartiennent principalement au phylotype I. Les souches isolées en Amérique appartiennent principalement au phylotype II, les souches isolées en Afrique et aux îles environnantes au phylotype III et les souches isolées en Indonésie au phylotype IV. Certaines souches isolées en Australie et au Japon font aussi partie du phylotype IV (Allen et al., 2005). Le phylotype II est séparé en deux groupes, IIA et IIB (Castillo and Greenberg, 2007).

En 2014 il a été proposé de séparer l'espèce « *Ralstonia solanacearum* » en trois espèce différentes à partir de comparaison de séquences de gènes conservés et de résultats d'hybridation ADN-ADN (Safni et al., 2014). Des preuves génétiques supplémentaires allant dans le sens de cette proposition ont été apportés par la suite, en utilisant trois méthodes basées sur l'analyse du génome complet : « Average Nucleotide Identity (ANI) » (qui compare le niveau de similarité des séquences homologues) , « Maximum Unique Matches index (MUMi) » (méthode similaire mais qui prends mieux en compte la variabilité en dehors des gènes homologues) et « Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) »

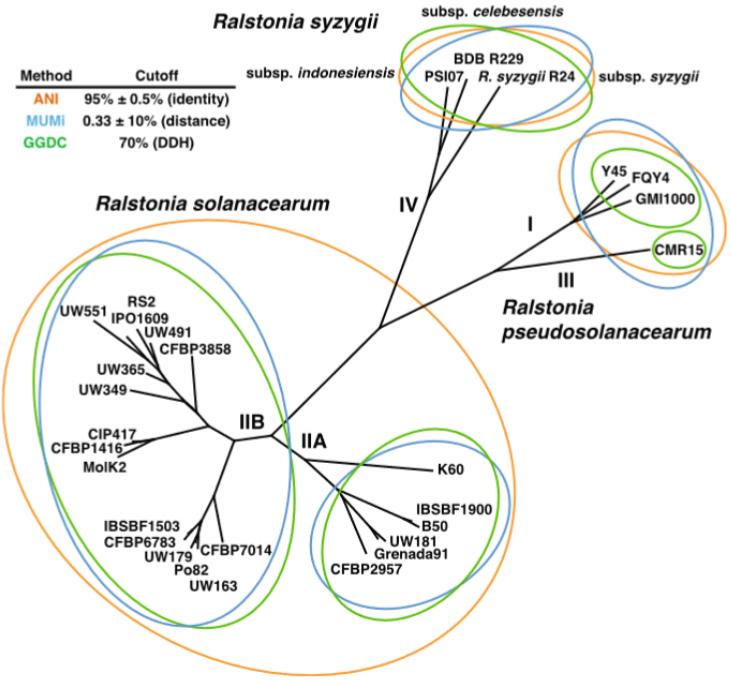


Figure 1. Arbre phylogénétique des différentes souches et espèces du complexe d'espèces de *Ralstonia solanacearum* créé à partir de distances génétiques calculées par les méthodes ANI, MUMi et GGDC (Prior et al., 2016)

(qui permet de calculer *in silico* des résultats d'hybridation ADN-ADN) (Prior et al., 2016, figure 1). Les phylotypes I et III sont regroupés dans une même espèce : *Ralstonia pseudosolanacearum,* les souches du phylotype II gardent le nom « *Ralstonia solanacearum* » et les souches du phylotype IV sont maintenant regroupées sous le nom « *Ralstonia syzygii* » (Prior et al., 2016), figure 1.

La souche modèle qui a été utilisée au cours de ma thèse est la souche GMI1000 qui fait partie de l'espèce *Ralstonia pseudosolanacearum*. Par la suite, l'ensemble des espèces *Ralstonia pseudosolanacearum*, *Ralstonia solanacearum* et *Ralstonia syzygii* sera désigné par le terme RSSC (« *Ralstonia Solanacearum* Species Complex »), ou complexe d'espèces de *Ralstonia solanacearum*. La souche modèle GMI1000 sera désignée par *Ralstonia pseudosolanacearum.*

1.2. Spectre d'hôte et impact économique

Les maladies causées par les espèces du RSSC sont connues plus généralement sous le nom de « flétrissent bactérien » mais varient selon les hôtes infectés. Chez la tomate et le tabac, l'infection cause un flétrissement rapide des parties aériennes suite au blocage du système vasculaire. Une température plus élevée (26 °C et au-dessus) augmente la rapidité avec laquelle la maladie se développe (Mew and Ho, 1977). Chez la pomme de terre, la maladie peut aussi être appelée « pourriture brune ». Des symptômes de flétrissement apparaissent sur les parties aérienne et les tubercules peuvent se nécroser avec une couleur brune caractéristique (Denny, 2006). Une des particularité de la maladie sur la pomme de terre est qu'elle peut avoir lieu à des températures bien moins élevée que sur d'autres hôtes, ce qui peut expliquer que des cas de flétrissement bactérien ont été décrits en altitude en Amérique du sud ou en Europe de l'ouest (Janse, 1996).

Le flétrissement bactérien a aussi été décrit sur les plantes ornementales comme le géranium (Denny, 2006). La maladie peut être transmise par des boutures infectées (Janse et al., 2004). Récemment, le flétrissement bactérien a été décrit sur des roses cultivées aux pays bas (Bergsma-Vlami et al., 2018).

Cette maladie est aussi un danger pour la culture du bananier. La maladie dite de « Moko » est causée par certaines souches de *R. solanacearum* (donc de phylotype II) dans les îles caraïbes et en Amérique du sud. La maladie peut être transmise par le sol, les outils de culture et dans certain cas par les insectes (Denny, 2006). La maladie de Moko cause un jaunissement et un flétrissement des feuilles et un pourrissement précoce des fruits. En Indonésie, une autre maladie dite « blood disease bacterium » (BDB) ou maladie du sang est causée par *Ralstonia syzygii* (anciennement phylotype IV de

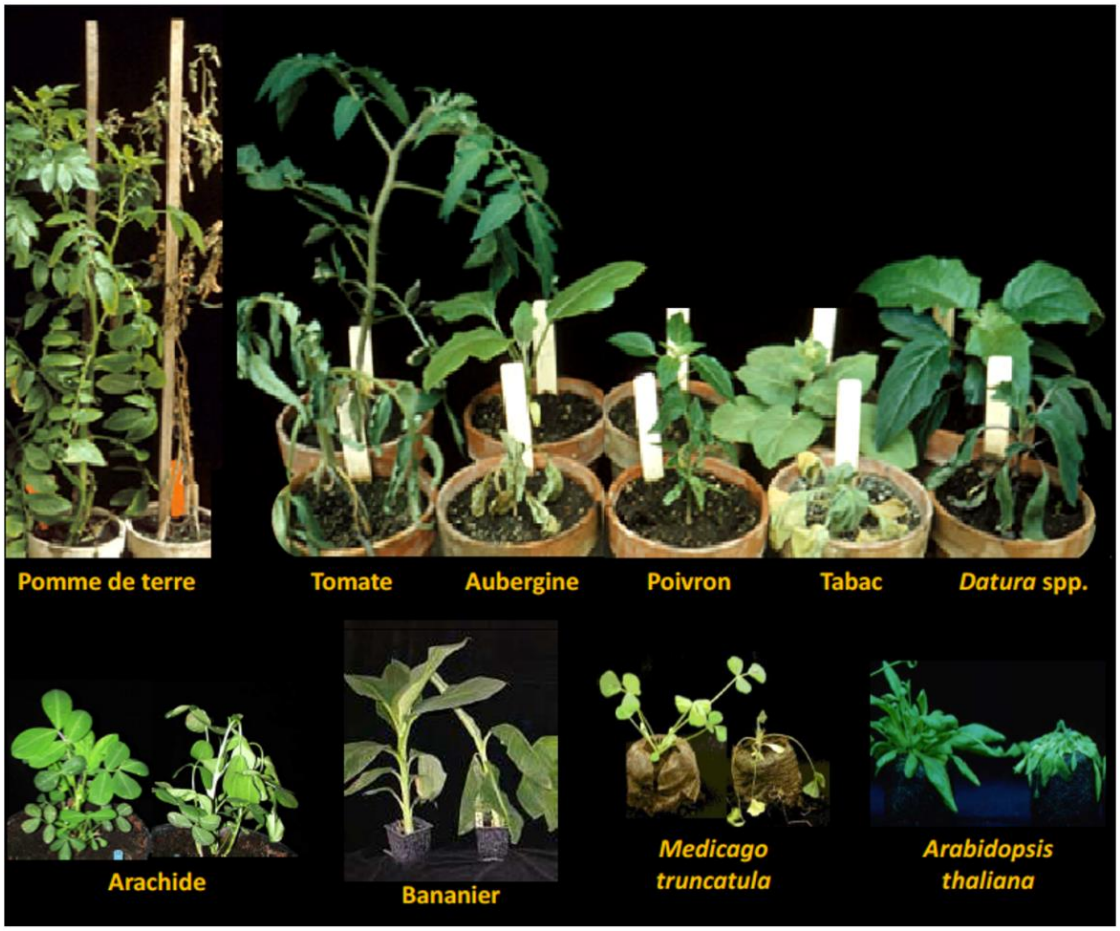


Figure 2. Symptômes de flétrissement bactérien causés par *Ralstonia solanacearum.*

R. solanacearum infecte plus de 200 espèces végétales qui appartiennent à plus de 50 familles botaniques. Pour les différentes espèces hôtes montrées ici, une plante saine et une plante présentant des symptômes de flétrissement bactérien sont présentées. D'après Lonjon, 2017.

R. solanacearum). Les symptômes sont semblables à ceux de la maladie de Moko. La transmission est principalement faite par les insectes (Denny, 2006).

Le flétrissement bactérien cause d'importantes pertes de rendement en Chine en particulier sur les cultures de tomate, de tabac et d'arachide (Jiang et al., 2017). Cette maladie a aussi un impact important sur la culture du gingembre en Asie et du clou de girofle en Indonésie (Denny, 2006).

Les plantes modèles *Arabidopsis thaliana* (Deslandes et al., 1998) et *Medicago truncatula* (Vailleau et al., 2007) sont elles aussi sensibles à l'infection par *R. pseudosolanacearum*, ce qui permet d'utiliser les outils génétiques disponibles pour ces plantes pour étudier l'interaction de *R. pseudosolanacearum* avec ses hôtes.

Des photographies montrant l'apparence des symptômes du flétrissement bactérien sur différentes espèces sont montrées sur la figure 2.

1.3. Cycle de la maladie

Les bactéries du RSSC peuvent se multiplier dans les tissus de leurs plantes hôtes jusqu'à atteindre une concentration très élevée (généralement jusqu'à 10^8 ou 10^9 cfu/g de tissu infecté). Les plantes meurent ensuite et un certain nombre de bactéries survivent dans le sol de façon saprophytique jusqu'au contact avec l'hôte suivant. Les bactéries peuvent survivre dans le sol ou dans l'eau plusieurs dizaines d'années, ce qui rend très difficile le contrôle de la maladie dans les zones contaminées (Denny, 2006).

Les bactéries présentes dans le sol peuvent pénétrer à l'intérieur de la plante par les blessures des racines. Ces blessures peuvent provenir de pratiques agricoles, d'autres organismes comme les nématodes ou les insectes ou des ouvertures naturelles présentes à l'émergence des racines secondaires. Les bactéries colonisent ensuite les cellules du cylindre central puis atteignent les vaisseaux du xylème et migrent dans la totalité de la plante via ces vaisseaux (figure 3). Les symptômes de flétrissement apparaissent une fois que la concentration bactérienne est élevée (plus de 10^7 cfu/g de matière fraiche) à la suite du blocage des vaisseaux du xylème par les bactéries et les exopolysaccharides qu'elles sécrètent (Denny, 2006).

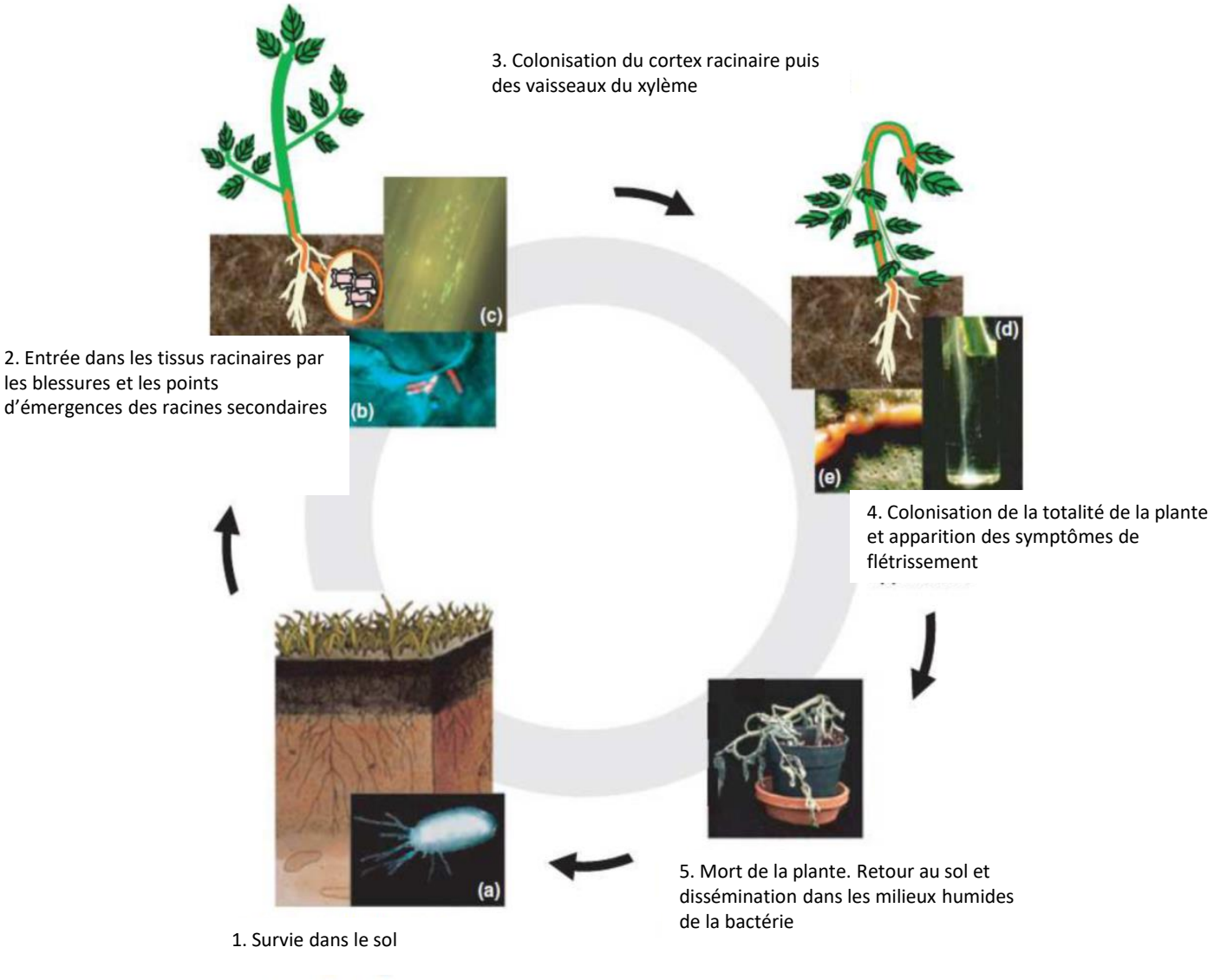


Figure 3. Cycle infectieux de *R. pseudosolanacearum* d'après Genin 2010. Les bactéries peuvent survivre dans le sol pendant plusieurs années. Elle pénètrent par les racines puis elle envahissent le système vasculaire. Les symptômes de flétrissement sont associés à une forte multiplication dans les vaisseaux du xylème et à une production massive d'exopolysaccharides (EPS), pouvant aboutir à la mort de la plante. **(a)** Observation au microscope électronique à transmission de la souche GMI1000. **(b)** Observation au microscope confocal de bactéries (en rouge) attachées à la surface des cellules végétales. **(c)** Bactéries exprimant la protéine GFP (green-fluorescent protein) observées à la surface de racines de tomates. **(d)** Diffusion de *R. pseudosolanacearum* dans l'eau à partir d'une tige sectionnée de tomate infectée. **(e)** Exopolysaccharides bactériens des vaisseaux d'une tige après section transversale.

1.4. Stratégies de contrôle de la maladie

Le contrôle chimique de *R. solanacearum* dans le sol par des antibiotiques n'est pas possible ni souhaitable en agriculture pour ne pas créer de microorganismes multirésistants et dérégler le microbiome du sol. Les méthodes utilisées pour limiter l'impact de la maladie sont en majeure partie culturale ou biologique. La rotation des cultures permet de limiter l'impact de la maladie dans des champs contaminés. Il est aussi possible de décaler les dates de culture pour éviter de cultiver des plantes sensibles pendant les périodes de l'année les plus chaudes propices au développement du flétrissement bactérien (Denny, 2006).

Certaines plantes peuvent être hôtes mais sans développer de symptômes, ce qui peut conduire à une transmission involontaire de la maladie par les agriculteurs. C'est le cas en particulier de la pomme de terre, de la banane, du gingembre et des géraniums (Denny, 2006). Des épidémies de flétrissement bactérien en Europe de l'ouest ont probablement été déclenchées par l'importation de tubercules de pommes de terre ou de boutures de géranium contaminées (Janse, 1996, Janse et al., 2004). Pour éviter de contaminer des nouveaux champs, il est recommandé de tester les semences pour savoir si elles sont infectées ou non.

Le microbiome du sol semble jouer un rôle important dans le développement et la sévérité des symptômes de la maladie. Certaines bactéries comme *Bacillus amyloliquefaciens* ou *Ralstonia pickettii* semblent avoir un effet de biocontrôle (Wei et al., 2011, 2013). De plus, il a été montré que le microbiome de tomates tolérantes Hawaii7996 et sensibles Moneymaker était différent et que l'utilisation de sol dans lequel ont préalablement poussé des plantes tolérantes pour planter des plantes sensibles pouvait diminuer la rapidité de la progression des symptômes (Kwak et al., 2018). Une souche appartenant au genre *Flavobacteriia*, TRM1, a pu être isolée à partir du sol sur lequel la progression du flétrissement bactérien est moindre et semble pouvoir être utilisée comme biocontrôle (Kwak et al., 2018).

Pour contrôler la maladie, une des stratégies les plus efficaces est d'utiliser des plantes résistantes ou tolérantes. Pour les cultures de solanacées (tomate, pomme de terre, aubergine, poivron), l'utilisation de plantes dites résistantes ne garantit pas toujours la survie de la totalité des plantes dans un champ contaminé mais permet plutôt de limiter les pertes de rendement (Lebeau et al., 2011). Pour la tomate, un QTL de résistance a été découvert dans le cultivar Hawaii7996, mais la résistance n'est pas totale – une petite proportion de tomates Hawaiii7996 peut développer des symptômes de flétrissement (Wang et al., 2000). Dans le poivron, il existe des sources de tolérance partielles liées à plusieurs gènes

(Lafortune et al., 2005). Pour l'aubergine, un certain nombre de cultivars sont résistants ou tolérants à l'infection (Wang et al., 1998). Le gène de résistance RE-bw a été cloné à partir de lignées recombinantes d'aubergines résistantes et sensibles d'origine chinoises et dépend de la présence de l'effecteur RipP2 dans les souches bactériennes (Xi'ou et al., 2015). Pour le cultivar AG91-25, cette résistance dépend de la présence de l'effecteur RipAX2 dans la souche bactérienne : voir le chapitre II des résultats, correspondant à Morel et al., 2018. Les sources de résistance utilisées pour la sélection variétale sont souvent dépendantes des souches bactériennes par leurs effecteurs et il arrive donc qu'elles soient contournées par la perte ou la modification de ceux-ci (Lebeau et al., 2011).

1.5. Caractéristiques génomiques et facteurs de virulence de *Ralstonia solanacearum*

Le premier génome d'une souche appartenant au RSSC – la souche modèle GMI1000 de *R. pseudosolanacearum* – a été séquencé en 2002 (Salanoubat et al., 2002). Ce génome est organisé sur un chromosome de 3,7 Mb et un mégaplasmide de 2,1 Mb. Par la suite, de nombreuses autres souches ont été séquencées comme CFBP2957 (phylotype IIA), CMR15 (phylotype III) et PSI07 (phylotype IV) (Remenant et al., 2010), Po82 (phylotype IIB) (Xu et al., 2011), Y45 (Phylotype I) (Li et al., 2011b), R24 et BDB R229 (*Ralstonia syzygii,* phylotype IV) (Remenant et al., 2011), K60 (Phylotype II) (Remenant et al., 2012), FQY_4 (Phylotype I) (Cao et al., 2013).

De nombreux facteurs de virulence sont essentiels pour la pathogénicité des bactéries du RSSC. Un de ces facteurs de virulence est la production d'importantes quantités d'exo-polysaccharides ; les bactéries n'en produisant pas ont une pathogénicité réduite (Saile et al., 1997). La mobilité des bactéries est aussi importante pour la virulence : le flagelle (qui permet la mobilité dite de nage) (Tans-Kersten et al., 2001) et des pili de type 4 qui permettent la mobilité dite de tressautement ou « twitching » (Kang et al., 2002). Des biofilms sont formés dans les vaisseaux du xylème en partie grâce à la libération d'ADN extracellulaire qui forme une matrice. La sécrétion de DNAses semble importante pour la modulation de la structure de ces biofilms et la dispersion des bactéries dans l'ensemble de la plante (Tran et al., 2016).

Il existe d'autres fonctions du métabolisme de *R. solanacearum* dont les rôles lors de l'infection ne sont pas encore complètement déterminés. De l'éthylène, une hormone végétale, est produit. Les mutants de la voie de synthèse de l'éthylène ne semblent pas affectés dans leur pathogénicité mais la

production de cette hormone semble induire l'expression de certains gènes dans *Arabidopsis thaliana* tels que les gènes ERF1 (« Ethylene Response Factor 1 ») et PR4 (« Pathogenesis Related 4 ») à un stade tardif de la maladie (jours 5 et 7 après inoculation) (Valls et al., 2006). Certaines souches peuvent aussi produire d'autres hormones comme l'auxine ou des cytokinines (Denny, 2006). *R. solanacearum* peut sécréter des enzymes de dégradation des paroi végétales (des polygalacturonases) mais cette fonction ne semble pas essentielle pour la pathogénicité (González and Allen, 2003).

R. solanacearum possède un système de « quorum sensing » qui permet de contrôler son métabolisme durant les différentes étapes de son cycle de vie. *R. solanacearum* sécrète un composé (3-OH MAME ou 3-OH PAME) dans son environnement ; la détection d'une forte concentration de ce composé (donc lorsque les bactéries sont en forte concentration) permet de déclencher une cascade de régulation associée avec la régulation de facteurs de virulence. Le 3-OH PAME a initialement été décrit comme le composé associé au quorum sensing dans la souche AW1 du phylotype IIA (Clough et al., 1997). Certaines souches telles que OE1-1 et GMI1000 utilisent en fait la molécule proche 3-OH MAME comme quorum sensing alors que d'autres telles que AW1, K60 et 8107 utilisent du 3-OH PAME (Kai et al., 2015). La synthèse de ce composé par PhcB puis sa perception par les récepteurs PhcS et PhcR entraine la dé-répression du régulateur central PhcA. PhcA, à forte concentration bactérienne, régule positivement des facteurs de virulence tels que les enzymes de dégradation des paroi végétales, la formation de biofilms et les exopolysaccharides et négativement des facteurs de virulence tels que la mobilité flagellaire ou de « twitching » et les sidérophores, facteurs moins utiles pour les stades tardifs de l'infection (Genin and Denny, 2012). En tout environ 30 % des gènes de *R. pseudosolanacearum* sont contrôlés par PhcA (Perrier et al., 2018). La production d'exopolysaccharides, bien que très importante pour la virulence a un coût énergétique élevé – la régulation de cette production est donc particulièrement importante pour l'optimisation du métabolisme de la bactérie et de la multiplication selon l'environnement où elle se trouve. Les mutants PhcA peuvent cataboliser une plus grande variété de substrats ce qui serait utile dans un environnement pauvre en nutriments où les bactéries sont en faible densité (Khokhani et al., 2017; Peyraud et al., 2016).

Un autre niveau de régulation des facteurs de virulence de *R. solanacearum* est lié à la perception d'un signal plante de nature encore inconnu par le récepteur PrhA (Aldon et al., 2000). Ce signal est ensuite intégré via les protéines PrhR, PrhI et PrhJ et permet d'induire les régulateurs centraux HrpG et HrpB (Brito et al., 2002). HrpG active la transcription de HrpB et induit d'autres facteurs de virulences comme la production de phytohormones ou d'enzymes de dégradation de la paroi végétale (Valls et al., 2006). HrpB est le régulateur principal du système de sécrétion de type III (Occhialini et al., 2005).

1.6. Système de sécrétion de type III

Un des déterminants majeurs du pouvoir pathogène de *R. solanacearum* est son système de sécrétion de type 3 (SST3) qui permet à la bactérie de sécréter des effecteurs de type 3 (ET3) directement à l'intérieur des cellules des plantes hôtes.

Le système de sécrétion de type 3 est présent chez un grand nombre de bactéries Gram$^-$ pathogènes de plantes ou d'animaux ou symbiontes de plantes comme les bactéries du genre *Yersinia*, *Shigella* et *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas syringae*, les *Xanthomonas* et les *Rhizobium* (Galán and Collmer, 1999). Une grande partie des gènes lié au T3SS est généralement organisé en « cluster » de gènes sur le génome (Tampakaki et al., 2010), c'est le cas chez *R. solanacearum* (Gijsegem et al., 1995).

Le SST3 est en forme de seringue composé d'un assemblage de plus de 20 protéines dont la structure est proche de celle des flagelles bactériennes (Hodgkinson et al., 2009). Un corps basal cylindrique est inséré dans les membranes de la bactérie, une aiguille creuse (pili) permet de faire le pont entre le cytoplasme de la bactérie et celui de la plante et le translocon permet la formation de pores dans les membranes des cellules hôtes. Un appareil d'export, situé à la base du corps basal, utilise de l'ATP pour exporter les effecteurs de type III (Figure 4 d'après Büttner, 2012). Chez *R. solanacearum*, le corps basal est composé des protéines HrcC, HrpT, HrpQ, HrcJ et HrcQ. HrpY correspond aux protéines du pilus. L'appareil d'export est composé des protéines HrcU, HrcV, HrcR, HrcS et HrcT. L'ATPase correspond à la protéine HrcN et le translocon est composé des protéines RipF1 et RipF2 (Gijsegem et al., 2002; Meyer et al., 2006).

Dans la souche GMI1000 de *R. pseudosolanacearum*, 72 effecteurs de type III ont été décrits. La sécrétion d'une partie de ces effecteurs est régulée par les chaperonnes HpaP, HpaG et HpaB (Lohou et al., 2014; Lonjon et al., 2016). Les différents effecteurs de type III du complexe d'espèce de *Ralstonia solanacearum* et leurs rôles connus seront décrits dans une partie suivante de cette introduction.

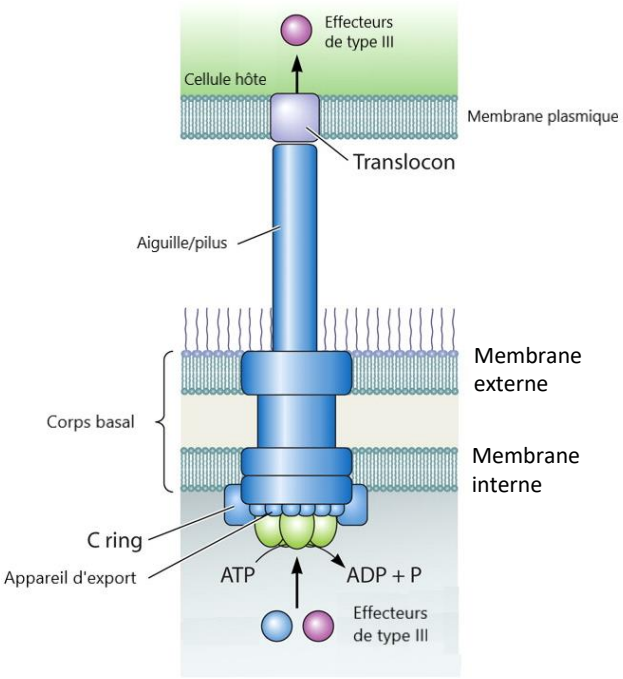


Figure 4. Schématisation de la structure du système de sécrétion de type III d'après Büttner, 2012.

2. Système immunitaire des plantes

Le système immunitaire des plantes permet de reconnaitre et de répondre à des attaques par divers organismes pathogènes. La reconnaissance peut être non spécifique ou spécifique des organismes pathogènes (Jones and Dangl, 2006). La réponse immunitaire ayant lieu à la suite de la reconnaissance permet d'empêcher ou de limiter l'impact de la maladie. Les organismes pathogènes qui réussissent à infecter les plantes ont divers moyens de contourner les défenses complexes des plantes (Jones and Dangl, 2006). Dans ce chapitre nous décrirons la reconnaissance des organismes pathogènes, la réponse des plantes et certains mécanismes que les organismes pathogènes peuvent mettre en jeu pour contourner cette réponse.

2.1. Reconnaissance des pathogènes

La reconnaissance des marqueurs d'une attaque de la plante par un pathogène peut s'effectuer à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules. La reconnaissance par des récepteurs intra-cellulaires est souvent plus spécifique (Jones and Dangl, 2006).

2.1.1. Reconnaissance par des récepteurs extracellulaires

A l'extérieur des cellules, les MAMPs (« Microbe Associated Molecular Patterns ») sont reconnus par les PRRs (« Pattern Recognition Receptors »). Les PRR sont des protéines RLK « Receptor Like-Kinase » qui possèdent généralement un domaine extracellulaire qui permet la liaison des MAMPs et un domaine intracellulaire kinase qui permet la signalisation. Certains PRR n'ont pas de domaine intracellulaire kinase et sont appelés RLP « Receptor Like Protein » (Macho and Zipfel, 2014).

Un des exemples les mieux décrits est la reconnaissance du MAMP Flg22, un peptide de la flagelline bactérienne, par le PRR FLS2. La partie extracellulaire de FLS2 se lie directement à Flg22 (Chinchilla et al., 2006). FLS2 se lie ensuite à un co-récepteur, BAK1 ce qui induit la suite de la signalisation des défenses (Sun et al., 2013), figure 5B (Macho and Zipfel, 2014).

Un autre PRR connu est EFR d'*Arabidopsis thaliana* qui peut reconnaitre le facteur d'élongation EF-Tu présent en abondance dans les bactéries car il est nécessaire à la traduction (Kunze et al., 2004). La

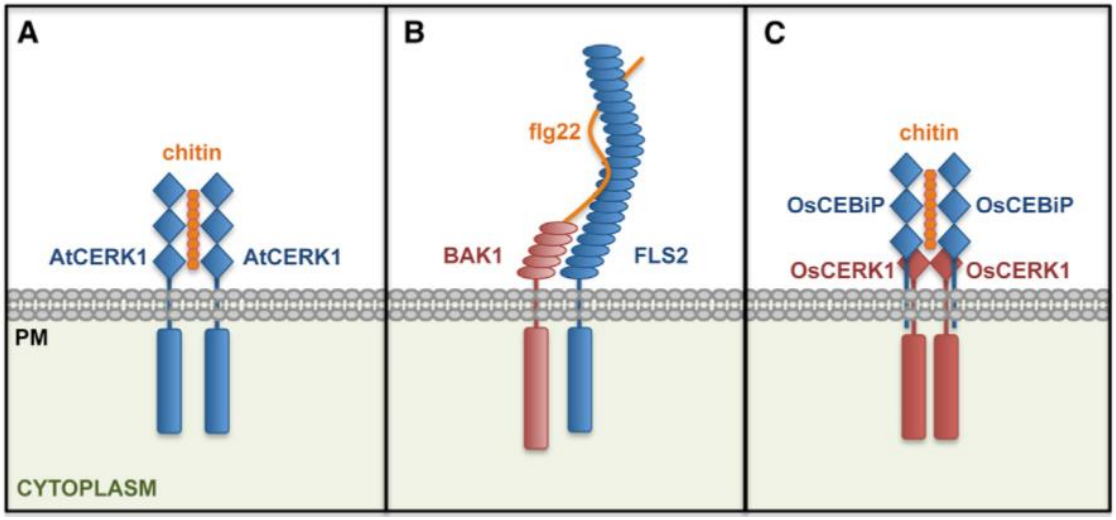


Figure 5. Exemple de perception de ligands par des PRR d'après Macho et Zipfel, 2014. (A) Dans *Arabidopsis thaliana* les oligomères de chitine sont des ligands menant à l'homodimérisation des récepteurs AtCERK1. **(B)** Dans *Arabidopsis thaliana,* le peptide flg22 est perçu par le récepteur FLS2 ce qui mène à l'hétérodimérisation entre FLS2 et BAK1. **(C)** Dans le riz, un récepteur est formé par des dimères de CEBiP et CERK1 et se lie à la chitine

transformation du récepteur EFR dans d'autres plantes comme la tomate, le blé ou *Medicago trucatula* leur donne une résistance augmentée à l'infection par des bactéries pathogènes et en particulier par *Ralstonia pseudosolanacearum* (Lacombe et al., 2010; Pfeilmeier et al., 2018; Schoonbeek et al., 2015).

Divers autres signaux peuvent être reconnus par les PRR. La chitine, un composant des parois des champignons est reconnue par CERK1 dans *Arabidopsis thaliana* (Miya et al., 2007), figure 5A (Macho and Zipfel, 2014) et CEBiP et CERK1 dans le riz (Kouzai et al., 2014), figure 5C (Macho and Zipfel, 2014). De façon intéressante, CERK1 est aussi impliqué dans la reconnaissance du peptidoglycane bactérien chez *A. thaliana*, montrant la versatilité de certains récepteurs (Willmann et al., 2011). Une xylanase peut être reconnue par le récepteur EIX de la tomate (Ron and Avni, 2004). Certains récepteurs peuvent aussi reconnaitre des signaux provenant des cellules de la plante endommagée par un pathogène : les « DAMPS » (« Damage Associated Molecular Pattern »), comme par exemple les monomères de cutine qui proviennent de la dégradation des paroi végétales par des champignons pathogènes (Schweizer et al., 1996). Le peptide AVR9 de *Cladosporium fulvum* est reconnu par les tomates et cette reconnaissance nécessite le RLP Cf-9 mais aucune interaction directe n'a pu être mise en évidence (Luderer et al., 2001). Ce dernier cas est particulier car AVR9 peut être considéré comme un effecteur reconnu par un gène de résistance, mais cette reconnaissance a lieu à l'extérieur des cellules contrairement à la plupart des cas décrits dans la littérature de reconnaissance d'effecteurs.

Après reconnaissance des MAMPs ou des DAMPs par les PRR, la transduction du signal est effectuée grâce aux domaines kinases présents dans les RLKs ou après association avec des co-récepteurs contenant un domaine kinase comme BAK1. Des protéines kinases cytoplasmiques (RLCK, « Receptor Like Cytoplasmic Kinase ») sont ensuite des substrats de ces complexes de PRR qui permettent la transduction du signal (Macho and Zipfel, 2014). C'est le cas du RLCK BIK1 qui est phosphorylé après la perception de flg22 et EF-Tu par leurs récepteurs associés (figure 6, Macho and Zipfel, 2014).

2.1.2. Reconnaissance par des récepteurs intracellulaires

Un autre pan du système immunitaire des plantes est la reconnaissance plus spécifique, directe ou indirecte, des effecteurs sécrétés par les pathogènes à l'intérieur des cellules. Cette reconnaissance est effectuée la plupart du temps par des récepteurs d'une même famille, les NB-LRR (« Nucleotide-Binding/Leucine-Rich-Repeat »), parfois raccourci en NLR (Jones and Dangl, 2006). Les NLR peuvent avoir un domaine N-terminal « coiled-coil » (structure qui est présente dans les monocotylédones et dicotyledone) ou un N-terminal « Toll-interleukin 1 receptor » (structure présente dans les dicotyledones) (Jacob et al., 2013). Leur nombre dans le génome des plantes séquencées est

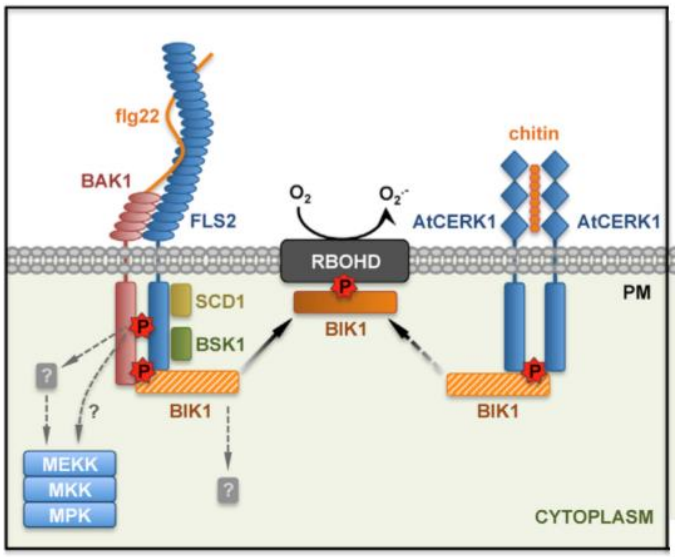


Figure 6. Exemple de complexes formés par les récepteurs extracellulaires et d'activation des premières voies de défense et de signalisation d'après Macho et Zipfel, 2014. Dans *Arabidopsis thaliana,* le peptide flg22 mène à la phosphorylation du domaine cytoplasmique de FLS2 et BAK1 et du RLCK BIK1. BIK1 ayant été activé par phosphorylation est libéré dans le cytoplasme et active à son tour l'enzyme RBOHD qui produit des espèces réactives de l'oxygène. De la même façon, BIK1 est activé après perception de la chitine par CERK1. Les MAPK sont elles aussi activées.

généralement de l'ordre de grandeur de la centaine, avec par exemple 151 NLR dans Arabidopsis thaliana (Meyers et al., 2003) et 294 NLR dans la tomate (Andolfo et al., 2013). La plupart des gènes clonés comme gène R de résistance et/ou utilisés dans la sélection de variétés résistantes sont des NLR (Takken and Tameling, 2009).

Une hypothèse historique sur le fonctionnement de l'immunité des plantes est l'hypothèse « gène pour gène ». Dans cette hypothèse, la résistance d'une plante à un pathogène est possible si un gène de résistance R est présent dans la plante et un gène d'avirulence avr est présent dans le pathogène ; si un des deux gènes est absent l'infection est possible (Flor, 1971). Bien que les connaissances aient évoluées depuis, cette hypothèse fonctionne dans le cas où un effecteur est reconnu par un unique NLR. La génétique de l'interaction est bien expliquée par ce modèle mais le concept « d'effecteur d'avirulence » est discutable : si l'effecteur était désavantageux dans tous les cas pour le pathogène, il disparaitrait rapidement lors de l'évolution. Les effecteurs reconnus ont donc probablement été conservés pour leurs fonctions qui permettent de promouvoir le pouvoir pathogène.

La reconnaissance des effecteurs peut être directe ou indirecte : lors d'une reconnaissance dite directe l'effecteur interagit physiquement avec la protéine de résistance (figure 7A). Des exemples sont décrits dans la littérature ; dans le lin, la protéine de résistance M interagit directement avec l'effecteur AvrM sécrété par la rouille du lin *Melampsora lini* (Catanzariti et al., 2010). Dans le riz, la protéine de résistance Pi-ta interagit avec la protéine AVR-Pita du champignon pathogène *Magnaporthe oryzae* et cette interaction déclenche les réponses immunitaires (Jia et al., 2000).

Un autre fonctionnement décrit de la reconnaissance des pathogènes par les NLR est celui de la « garde » : certains NLR n'interagissent pas directement avec les effecteurs pour les reconnaitre mais peuvent détecter des modifications d'une autre protéine (protéine dite « gardée ») par ces effecteurs (figure 7B). Un exemple bien décrit est celui de la protéine RIN4 dans l'immunité. L'action de l'effecteur AvrRpt2 de *Pseudomonas syringae* mène à la dégradation de RIN4, et cette dégradation est détectée par le NLR RPS2 ce qui mène à l'activation des réponses immunitaires. Deux autres effecteurs de *Pseudomonas syringae*, AvrB et AvrRpm1 permettent la phosphorylation de RIN4 ce qui déclenche l'immunité par le biais d'un autre NLR, RPM1 (Liu et al., 2011). RIN4 est une protéine qui est elle-même impliquée dans la défense ; les effecteurs la ciblent et diminuent les défenses associées à RIN4 mais le fait que cette protéine importante pour l'immunité soit gardée déclenche au final d'autres voies de défense (Kim et al., 2005).

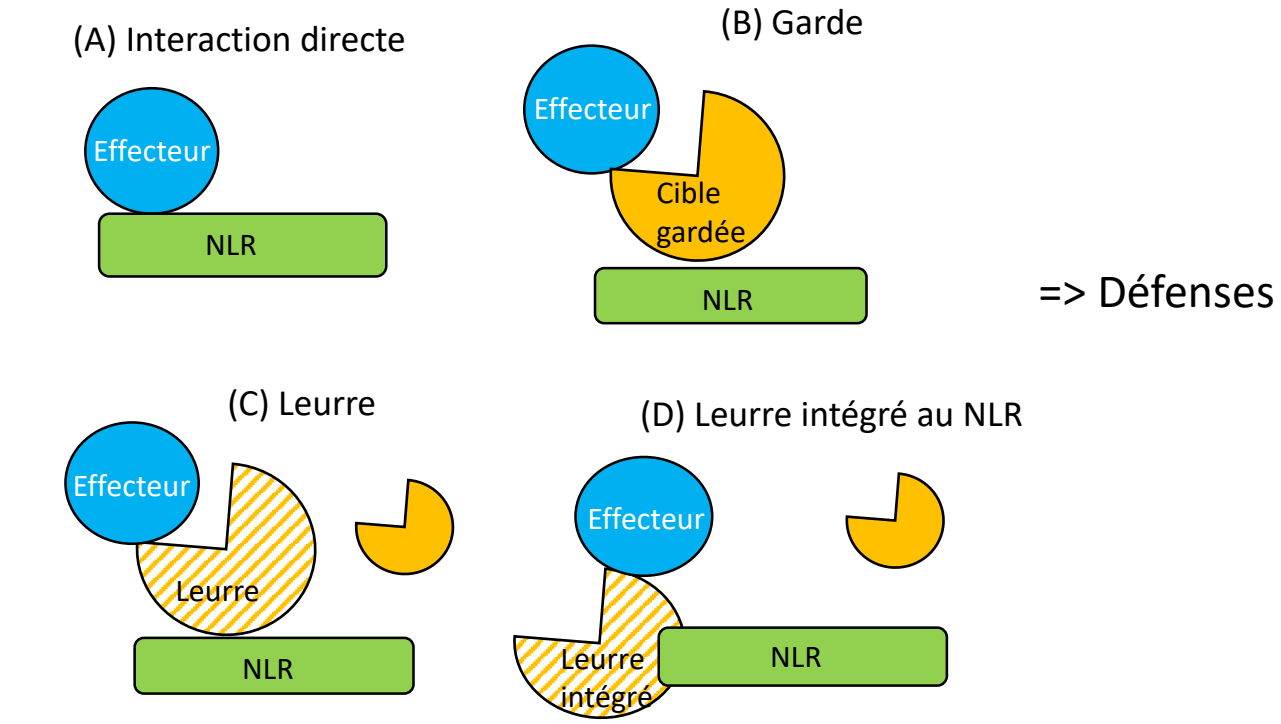


Figure 7. Schéma de différents modèles de la reconnaissance des effecteurs par les NLR.

Certaines protéines gardées ne semblent pas avoir elles-mêmes de fonction dans l'immunité, on parle alors de « leurre » - les effecteurs causent une modification de la protéine leurre qui est détectée et déclenche les défenses (figure 7C). Pour ce cas, l'exemple de ZED1 peut être cité. ZED1 est une pseudokinase, qui ne semble pas jouer de rôle dans la défense. Cette protéine est ciblée pour acétylation par l'effecteur HopZ1a de *Pseudomonas syringae* et est nécessaire pour la reconnaissance de HopZ1a par le NLR ZAR1 (Lewis et al., 2013).

Les effecteurs AvrRps4 de *Pseudomonas syringae* et RipP2 de *Ralstonia solanacearum* sont reconnus par une paire de NLR dont l'un possède un domaine leurre intégré (figure 7D). RipP2 peut acétyler des facteurs de transcription WRKY impliqués dans la défense et compromettre leurs fonctions. RRS1-R est un NLR qui possède un domaine WRKY en C-terminal – l'acétylation de ce domaine par RipP2 entraine l'activation de la paire de récepteurs RRS1-R/RPS4 qui mène à la défense (Le Roux et al., 2015). AvrRPS4 interagit aussi avec ce domaine WRKY intégré et déclenche la défense (Sarris et al., 2015).

Le fonctionnement en paire de ces deux NLR n'est pas le seul cas décrit ; des études récentes montrent que de nombreux NLR fonctionnent en paire comprenant un NLR « sensor » qui reconnait directement ou indirectement les effecteurs et un NLR « helper » qui est nécessaire pour l'activation des défenses (figure 7E) (Wu et al., 2016). De plus, certains NLR « helper » sont fonctionnellement redondants pour la reconnaissance de plusieurs effecteurs via plusieurs NLR « sensor », formant ainsi un réseau robuste (la perte ou la désactivation d'un seul NLR n'a souvent pas d'influence) permettant la reconnaissance des pathogènes (Wu et al., 2017).

Un dernier exemple de reconnaissance d'effecteur particulier peut être cité : le cas des effecteurs TAL. Les TALs (« Transcription Activator-Like ») sont des effecteurs présents principalement dans les *Xanthomonas* et pouvant agir comme des facteurs de transcription dans les cellules des plantes hôtes. La reconnaissance de ces effecteurs TAL peut avoir lieu lorsqu'ils activent la transcription de gènes de résistance, nommés « gènes exécuteurs ». Certaines de ces gènes ne sont pas des NLR (Zhang et al., 2015). Par exemple, l'effecteur TAL AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* est reconnu dans le poivron suite à l'activation de la transcription du gène de résistance *Bs3* qui appartient à une famille de gènes dont certains membres sont impliqués dans la synthèse de l'auxine, le développement et la physiologie (Römer et al., 2007). D'autres gènes exécuteurs semblent coder pour des petites protéines transmembranaires (Zhang et al., 2015).

2.2. Après la reconnaissance des pathogènes des voies de défenses sont mises en place pour contrôler l'infection

Après la perception des pathogènes par les MAMPs ou la détection de leurs effecteurs, la défense est mise en place. La réponse immunitaire après la perception des effecteurs par les NLRs est généralement décrite comme plus intense et rapide (Jones and Dangl, 2006). Une analyse de réseau a permis de montrer que les réseaux de signalisation de ces deux modes de défense sont en large mesure chevauchants (Tsuda et al., 2009), mais les différentes réponses immunitaires ont souvent un certain niveau de spécificité.

2.2.1. Flux d'ions et signalisation

Après la reconnaissance des MAMPs par les PRR, des flux d'ions entrant (H^+, Ca^{2+}) et sortant (K^+, NO_3, Cl^-) sont détectés. Un modèle ayant été utilisée pour étudier ces réponses de défense est la cryptogéine, un éliciteur des défenses rapide produit par l'oomycète *Phytophtora cryptogea*. Parmi ces réponses, le flux sortant de nitrates NO_3^- est nécessaire pour l'activation de signaux en aval comme la production de ROS (« Reactive Oxygen Species ») et influence la réponse hypersensible (Wendehenne et al., 2002).

Un autre des signaux pouvant être détecté après la perception de MAMPs par les PRR est une augmentation rapide (quelques minutes) du Ca^{2+} intracellulaire et la dépolarisation de la membrane (Blume et al., 2000). Différents MAMPs induisent une réponse de Ca^{2+} différente (Ranf et al., 2011). Après un pic initial, le Ca^{2+} est nécessaire pour l'activation des défenses via des protéines CDPK « Calcium Dependant Protein Kinases » (Boudsocq et al., 2010). L'activité de certaines CDPK augmente après un traitement par le MAMP flg22. Les protéines CDPK4 et CDPK5 induisent la production de ROS en phosphorylant l'enzyme RBOH (« Respiratory Burst Oxydase Homolog ») qui est une oxydase du NADPH (Kobayashi et al., 2007).

2.2.2. Espèces réactives de l'oxygènes

Une autre réponse rapide après la détection de pathogènes est la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS – « Reactive Oxygen Species ») qui a lieu aussi bien lors de la PTI (Zipfel et al., 2006) que dans l'ETI (Lamb and Dixon, 1997). Ces ROS sont produits par les enzymes oxydases de la NADPH, qui correspondent aux protéines de la famille RBOH dans les plantes. L'activité de ces enzymes est stimulée via les kinases dépendantes du Ca^{2+} mais aussi par d'autres voies. Le substrat direct après

association des récepteurs FLS2 et EFR avec leur corécepteur BAK1 est BIK1. BIK1 peut par ailleurs s'associer avec d'autres récepteurs dont CERK1. Il a été montré que BIK1 s'associe avec l'enzyme RBOHD et l'active par phosphorylation de façon indépendante du Ca^{2+} (Kadota et al., 2014) (figure 6, Macho and Zipfel, 2014). Enfin, certaines voies de signalisations liées à l'éthylène sont nécessaires pour la production de ROS (Mersmann et al., 2010).

Cette production de ROS a un rôle direct antimicrobien sur certains pathogènes comme *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* et *Phytophthora infestans* (Wu et al., 1995). De plus les ROS induisent un épaississement des paroi végétales par « cross-linking » des glycoprotéines (Bradley et al., 1992), la fermeture des stomates permettant de réduire l'entrée des pathogènes dans les tissus (Mersmann et al., 2010) et sont liés à la déposition de callose (Luna et al., 2011a). Les ROS ont aussi d'autres rôles indirects dans la signalisation et dans l'induction de l'expression de gènes liés à la défense (Apel and Hirt, 2004).

2.2.3. Déposition de callose

La déposition de callose sur la face interne des parois cellulaires des plantes est une réponse associée à l'immunité décrite en particulier dans *Arabidopsis thaliana.* Cette déposition est facile à visualiser et a été utilisée comme marqueur pour la mesure de l'induction des défenses. Le rôle exact de la déposition de callose est encore peu clair, mais elle pourrait servir à ralentir mécaniquement la progression des pathogènes dans les tissus ou de matrice dans laquelle des composés antimicrobiens peuvent être déposés (Luna et al., 2011a; Voigt, 2014).

2.2.4. Cascades de MAP kinases

Les cascades de MAP kinases sont des éléments essentiels de la signalisation dans les eucaryotes. Les MAP kinases-kinases-kinases catalysent la phosphorylation des MAP kinases-kinases qui a leurs tour catalysent la phosphorylation des MAP kinases. Les MAP kinases une fois activées peuvent elles-mêmes activer des substrats divers comme des facteurs de transcription (Zhang and Klessig, 2001). Dans *Arabidopsis thaliana*, la perception du MAMP Flg22 active une cascade de signalisation de MAP kinases qui mènent à l'augmentation de la transcription de facteurs de transcription WRKY impliqués dans la défense (Asai et al., 2002). Les intermédiaires permettant la transduction du signal des récepteurs aux MAP kinases ne sont pas connus pour tous les récepteurs. Dans *Arabidopsis thaliana*, la protéine PBL27 est un intermédiaire entre la perception de la chitine par CERK1 et les MAPKKK. PBL27 est phosphorylé par CERK1 et phosphoryle à son tour MAPKKK5 (Yamada et al., 2016).

L'activation des MAPK pourrait donc avoir lieu grâce à des RLCK différents de ceux impliqués dans la production de ROS comme BIK1, dont la mutation ne semble pas influencer l'activation des MAPK (Feng et al., 2012).

2.2.5. Signalisations hormonales

Un réseau complexe de signalisation hormonale est présent dans les plantes et permet de moduler les réponses immunitaires lors de l'attaque par des pathogènes. De nombreuses hormones sont mises en jeu mais les principales décrites comme impliquées dans le système immunitaire sont l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène.

La production d'acide salicylique est induite après reconnaissance des pathogènes via la PTI ou l'ETI (Durner et al., 1997; Mishina and Zeier, 2007). Une protéine essentielle à la régulation de la signalisation par l'acide salicylique est NPR1 : elle permet l'expression de nombreuses protéines de défense et de facteurs de transcription WRKY suite à la perception du signal hormonal (Dong, 2004).

La synthèse d'acide jasmonique est induite dans les plantes après une attaque de pathogènes microbiens ou une attaque par des insectes (Pieterse et al., 2012). Sa perception mène à la dégradation des répresseurs « JAZ » et mène à l'activation de nombreux facteurs de transcriptions (Memelink, 2009). Deux voies principales sont liées à la signalisation par l'acide jasmonique : la voie comprenant les facteurs de transcription de type MYC et la voie comprenant les facteurs de transcription de type ERF (Dombrecht et al., 2007). La voie des ERF (« Ethylene Response Factor ») est co-régulée par l'hormone éthylène (Lorenzo et al., 2003).

Une régulation antagoniste entre les voies de signalisation de l'acide salicylique et de l'acide jasmonique a été décrite dans les plantes. La voie de signalisation de l'acide salicylique est plus utilisée dans le cas d'attaque par des pathogènes biotrophe et celle de l'acide jasmonique dans le cas de l'attaque par des nécrotrophe ou des insectes. Cette régulation antagoniste d'une voie sur l'autre permettrait donc de moduler les réponses de défense des plantes contre les attaques de divers pathogènes (Kunkel and Brooks, 2002).

D'autres hormones peuvent être impliquées dans la défense des plantes. C'est le cas de l'acide abscissique qui peut réguler négativement la synthèse de l'acide salicylique et les défenses qui sont associées à cette hormone (Zabala et al., 2009). Les gibbérellines régulent la dégradation des protéines DELLA qui interagissent avec les régulateurs JAZ et modulent donc les réponses à l'acide jasmonique

(Hou et al., 2010). Enfin, les cytokinines peuvent réguler positivement certaines voies liées à l'acide salicylique (Choi et al., 2010).

2.2.6. Gènes PR

Un des résultats des signalisations hormonales ayant lieu après la détection de l'attaque par des pathogènes est la forte induction de gènes dit « PR » (« Pathogenesis Related »). La mesure de l'expression des gènes PR est souvent utilisée comme marqueur pour mesurer les réponses de défense des plantes. Les protéines PR ont diverses activités antimicrobiennes. Elles sont classées en 17 familles (PR-1 à PR-17) selon leur ordre de découverte. Différentes protéines PR semblent avoir un effet dirigé contre des types de pathogènes particuliers. Les PR-2 sont des enzymes endoglucanase, les PR-3, PR-4 PR-8 et PR-11 des chitinases qui pourraient agir contre les champignons pathogènes. Les PR-5 sont des « thaumatin-like » qui pourraient avoir des effets contre les oomycètes (van Loon et al., 2006). Les PR-9 sont des peroxidases qui jouent un rôle dans le renforcement des paroi des cellules lors de l'attaque d'un pathogène (Passardi et al., 2004). Certaines PR-10 ont une activité de dégradation de l'ARN (Bufe et al., 1996).

2.2.7. Réponse hypersensible

La réponse hypersensible, ou HR (« Hypersensitive Response ») est une réponse défensive associée à la mort programmée des cellules souvent due à la reconnaissance des effecteurs par les NLR (Jones and Dangl, 2006). La HR peut aussi avoir lieu suite à la reconnaissance d'un PAMP, c'est le cas pour Flg22 dans *Arabidopsis thaliana* (Naito et al., 2008). Le rôle de la mort cellulaire serait de limiter les ressources disponibles pour les pathogènes biotrophes ou hemi-biotrophe ; dans le cas des pathogènes nécrotrophes la mort cellulaire peut promouvoir leur pathogénicité (Coll et al., 2011). Mais dans de nombreux cas la résistance n'est pas liée en elle-même à la mort cellulaire : celle-ci serait plus une conséquence des réponses de défenses liées à la résistance que la cause de la résistance elle-même (Künstler et al., 2016).

2.2.8. Défenses à long terme

La résistance acquise systémique (SAR, Systemic Acquired Resistance) est une résistance à long terme et efficace contre un large spectre de pathogènes. Elle est induite après perception d'un pathogène et est liée à la voie de signalisation par l'acide salicylique (Kachroo and Robin, 2013). De plus, certaines formes de résistances peuvent être transmises sur la génération suivante de plantes par des

modifications épigénétiques de remodélisation de la chromatine et de méthylation de l'ADN (Luna et al., 2011b).

2.3. Contournement des défenses des plantes par les pathogènes

Pour pouvoir infecter les plantes, les organismes pathogènes doivent en contourner les défenses. Un grand nombre d'effecteurs sécrétés jouent ce rôle (Jones and Dangl, 2006). Les bactéries pathogènes peuvent sécréter ces effecteurs directement dans le cytoplasme par le système de sécrétion de type 3 (Hodgkinson et al., 2009) ; d'autres pathogènes ont différents systèmes de sécrétion d'effecteurs comme l'haustorium pour les champignons et les oomycètes (Wang et al., 2017), ou encore un stylet pour les nématodes (Haegeman et al., 2012).

Certains effecteurs ciblent directement les PRR permettant la reconnaissance des MAMPs ou leurs interacteurs directs. Par exemple, les effecteurs AvrPto et AvrPtoB de *Pseudomonas syringae* peuvent interagir avec BAK1. BAK1 est une protéine interagissant avec plusieurs PRR et importante pour la transduction de signaux de défense après la perception de différents MAMPs, incluant la flagelline et EF-Tu. AvrPto et AvrPtoB empêchent la formation d'un complexe entre FLS2 et BAK1 (Shan et al., 2008). Une étude de la transcription de gènes chez la tomate a montré que AvrPto était responsable de la diminution de l'expression de plus de 1000 gènes qui sont induits lors de la défense après la perception de la flagelline (Worley et al., 2016). AvrPtoB peut interagir avec FLS2 et promouvoir sa dégradation en agissant comme une E3 ubiquitine ligase (Göhre et al., 2008). Un autre effecteur de *Pseudomonas syringae*, HopF2, cible à la fois BAK1 et les MAP kinases (Zhou et al., 2014).

L'effecteur de *P. syringae* HopAI1 cible lui aussi les MAP kinases et les inactive en enlevant un groupement phosphate par une activité enzymatique (Zhang et al., 2007). La production de ROS en réponse à la perception de flg22 est par ailleurs totalement inhibée par l'expression de cet effecteur dans les cellules hôtes (Zhang et al., 2007). D'autres effecteurs suppriment ou diminuent la production de ROS, c'est le cas par exemple de Yap1 de *Ustilago maydis* qui est relocalisé dans le noyau des cellules après exposition aux ROS et qui peut réguler l'expression de peroxydases de la plante hôte (Molina and Kahmann, 2007). HopK1 de *P. syringae* diminue la production de ROS dans *A. thaliana*, mais aussi la déposition de callose et est localisé dans les chloroplastes des cellules hôtes mais son mécanisme d'action est encore obscur (Li et al., 2014). La production de ROS étant dépendante de plusieurs

niveaux de l'immunité des plantes et facile à mesurer, leur quantification peut être utilisée pour déterminer si un effecteur peut avoir un effet sur les défenses des plantes (Sang and Macho, 2017).

Certains effecteurs peuvent aussi agir sur la défense des plantes liée à la perception d'autres effecteurs. Par exemple, plusieurs effecteurs de *Pseudomonas syringae* peuvent diminuer la mort cellulaire associée à la réponse hypersensible après la perception de HopPsyA : AvrPphE, AvrPpiB1, AvrPtoB, HopPtoE et HopPtoF (Jamir et al., 2004).

Les défenses des plantes peuvent être diminuées par les pathogènes par d'autres moyens que les effecteurs, par exemple *Pseudomonas syringae* peut produire de la coronatine qui imite l'acide jasmonique produit par les plantes (Mittal and Davis, 1995). L'activation des voies de signalisations liées à l'acide jasmonique a un effet antagoniste sur les voies de défenses liées à l'acide salicylique et permet entre autres l'ouverture des stomates par lesquelles l'entrée des bactéries dans les feuilles est possible (Melotto et al., 2006). De façon intéressante, la voie de l'acide jasmonique est aussi ciblée par un effecteur de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* : HopX1 interagit avec et induit la dégradation des protéines JAZ qui sont elles-mêmes des répresseurs des voies de signalisation liées à l'acide jasmonique. Cette souche ne produit pas de coronatine et l'effet produit par HopX1 sur la pathogénicité est comparable à celui de cette toxine (Gimenez-Ibanez et al., 2014).

Les rôles des effecteurs dans le contournement des défenses des plantes sont très variés et ne peuvent pas tous être décrits ici. Les rôles connus des effecteurs du complexe d'espèces de *Ralstonia solanacearum* seront cependant détaillés par la suite.

2.4. D'autres facteurs que les défenses des plantes et la suppression de celles-ci rentrent en jeu lors de l'infection par les pathogènes

La suppression des défenses des plantes n'est pas le seul enjeu pour l'infection par les pathogènes : ceux-ci ont besoin de se multiplier et donc de nutriments pour leur métabolisme. Certains effecteurs sont connus pour jouer un rôle dans la manipulation du métabolisme des plantes hôtes pour améliorer les conditions environnementales des pathogènes lors de l'infection.

Par exemple, l'effecteur HopM1 de *Pseudomonas syringae* cause une modification de l'apoplaste en augmentant la quantité d'eau dans celui-ci. Une forte humidité dans l'apoplaste est essentiel pour la multiplication des bactéries (Xin et al., 2016).

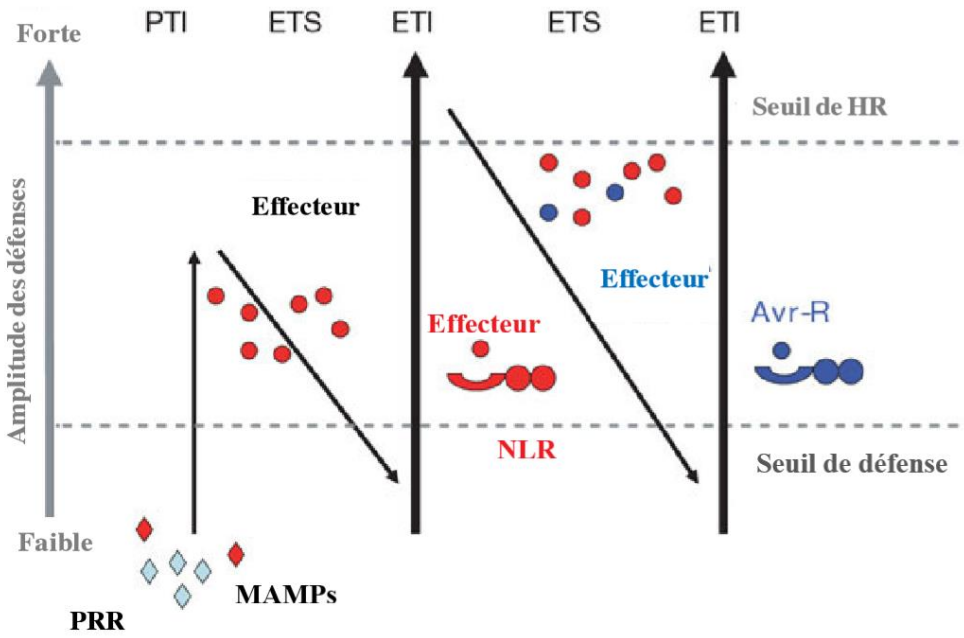


Figure 8. Le modèle en zig-zag illustre les résultats d'une interaction plante-pathogène, d'après Jones and Dangl, 2006. Dans la première phase, les plantes détectent les pathogènes grâce à leurs MAMPs ce qui induit la défense (PTI). Dans la deuxième phase, les pathogènes peuvent contourner la défense grâce à leurs effecteurs ou améliorer leurs conditions trophiques ce qui mène à l'infection (ETS). Dans la troisième phase, un effecteur peut être reconnu par une protéine NLR ce qui active la défense (ETI) qui est souvent associée à la mort cellulaire programmée (HR). Dans la dernière phase, les pathogènes évoluent en perdant les effecteurs reconnus ou en gagnant des effecteurs permettant de supprimer de manière plus efficace les défenses. Les NLR des plantes sont eux aussi sélectionnés pour reconnaitre de nouveaux effecteurs.

Un autre exemple est donné par l'action des gènes TAL de *Xanthomonas oryzae* pv*. oryzae* qui agissent comme des facteurs de transcription et induisent l'expression de gènes codant pour des transporteurs de sucres SWEET, probablement pour leur nutrition (Chen et al., 2010; Streubel et al., 2013).

En ce qui concerne *Ralstonia solanacearum,* il a été démontré que la composition du xylème était modifiée lorsque des bactéries étaient présentes dans celui-ci mais les mécanismes exacts et si des effecteurs sont ou non impliqués ne sont pas connus (Lowe-Power et al., 2018).

2.5. Co-evolution constante plantes pathogènes

Les interactions plantes pathogènes sont sous-tendues par une constantes co-évolution entre les plantes qui doivent déployer des mécanismes de défense et les pathogènes qui doivent s'adapter à ces mécanismes. Le modèle en zig-zag tente de décrire cette co-évolution : les plantes déploient en premier lieu des mécanismes pour reconnaitre les MAMPs et activer une première ligne de défense qui est la PTI, les pathogènes ont ensuite des effecteurs qui leur permettent de supprimer ou d'éviter ces défenses. Mais ces effecteurs sont eux même reconnus par les NLR ce qui induit une deuxième ligne de défense, l'ETI (Figure 8, Jones and Dangl, 2006). La défense contre le pathogène induite par un effecteur peut conduire à la sélection de la perte de l'effecteur par le pathogène, ce qui permet ainsi d'éviter la reconnaissance (Pitman et al., 2005). Sans aller jusqu'à la perte de l'effecteur en question, une forte pression de sélection diversifiante a aussi été montrée pour certains de ces effecteurs (Ma et al., 2006).

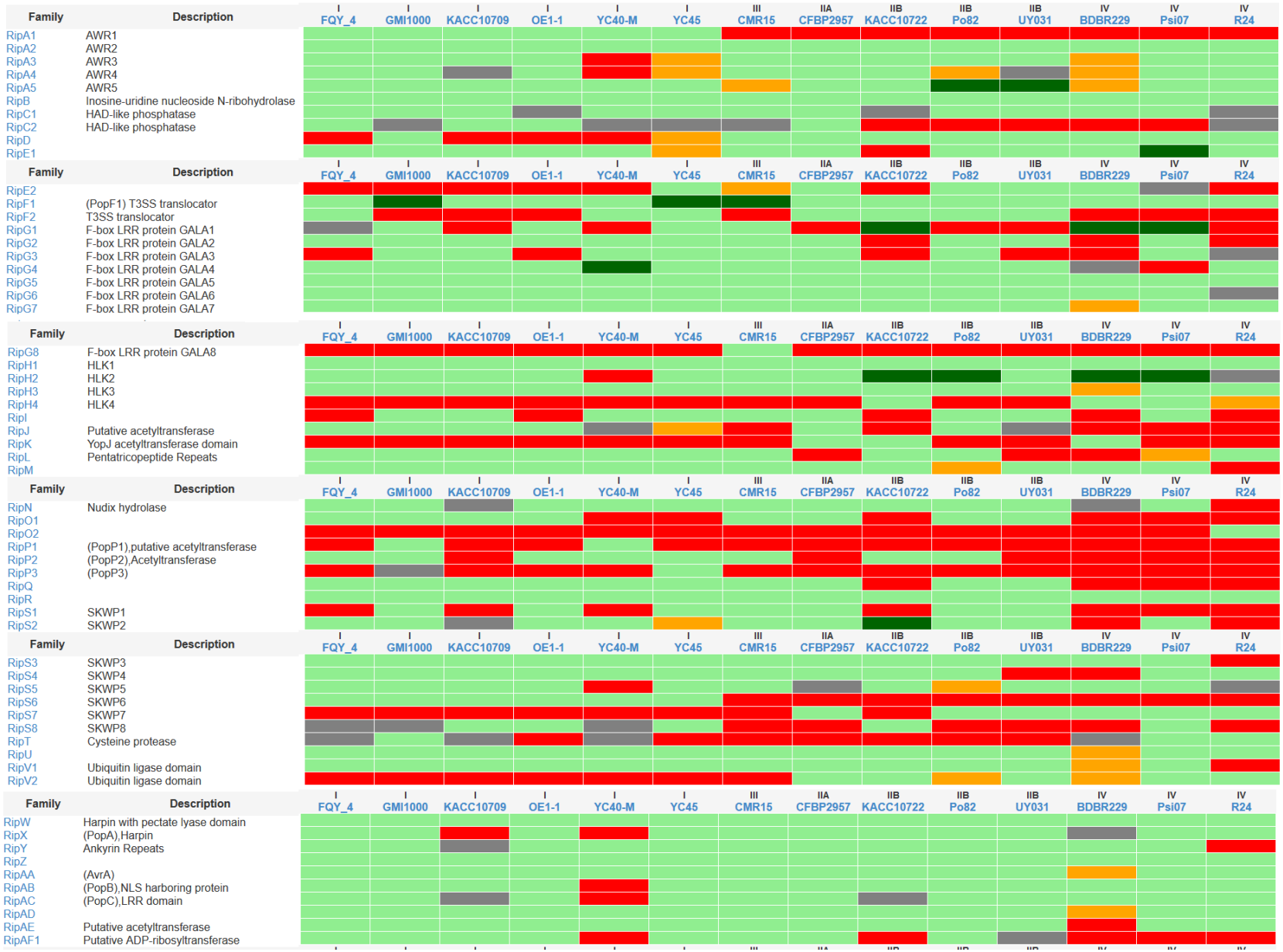


Figure 9 (1/2). Répartition des effecteurs de type III dans différentes souches du RSSC. Les 13 souches les mieux séquencées (score d'assemblage élevé , > 5,8) disponibles sur « ralsto T3E » (Peeters et al., 2013) et la souche BDBR229 dont l'annotation des effecteurs de type III a été vérifiée manuellement ont été sélectionnées



Figure 9 (2/2). Répartition des effecteurs de type III dans différentes souches du RSSC. Les 13 souches les mieux séquencées (score d'assemblage élevé , > 5,8) disponibles sur « ralsto T3E » (Peeters et al., 2013) et la souche BDBR229 dont l'annotation des effecteurs de type III a été vérifiée manuellement ont été sélectionnées

Effecteurs conservés dans 14 souches les mieux séquencées sélectionnées du RSSC	
Nom de l'effecteur	**Niveau de conservation**
RipA2	Dans les 14 souches
RipB	Dans les 14 souches
RipF1	Dans les 14 souches
RipG5	Dans les 14 souches
RipH1	Dans les 14 souches
RipR	Dans les 14 souches
RipW	Dans les 14 souches
RipZ	Dans les 14 souches
RipAJ	Dans les 14 souches
RipAM	Dans les 14 souches
RipAY	Dans les 14 souches
RipG6	Dans 13 des 14 souches
RipG7	Dans 13 des 14 souches
RipH3	Dans 13 des 14 souches
RipS3	Dans 13 des 14 souches
RipU	Dans 13 des 14 souches
RipAA	Dans 13 des 14 souches
RipAB	Dans 13 des 14 souches
RipAD	Dans 13 des 14 souches
RipAE	Dans 13 des 14 souches
RipAI	Dans 13 des 14 souches
RipAN	Dans 13 des 14 souches

Tableau 1. Liste des 22 effecteurs du RSSC conservés dans 14 souches sélectionnées.

Effecteurs sous pression de sélection diversifiante d'après Peeters et al. 2013
RipAA
RipAJ
RipAT
RipAW
RipAP
RipD
RipG7
RipH3
RipS7

Tableau 2. Liste des effecteurs du RSSC sous pression de sélection diversifiante d'après Peeters et al. 2013.

3. Les effecteurs de type III du complexe d'espèce de *Ralstonia solanacearum*

3.1. Diversité et conservation des effecteurs de type III du RSSC

Les bactéries du complexe d'espèce de *Ralstonia solanacearum* possèdent un grand nombre d'effecteurs de type III en comparaison avec d'autres espèces de bactéries phytopathogènes comme *Pseudomonas syringae* - de 10 à 40 effecteurs selon les souches - (Baltrus et al., 2011) ou *Xanthomonas campestris* - de 13 à 31 effecteurs selon les souches - (Roux et al., 2015). La souche GMI1000 de *Ralstonia pseudosolanacearum* possède quant à elle 72 effecteurs de type III décrits (Peeters et al., 2013). Le répertoire d'effecteurs de type III varie cependant beaucoup entre les différentes espèces du RSSC. La base de données « Ralsto T3E » (Peeters et al., 2013) rassemble les séquences des effecteurs de type III des souches séquencées. Les 13 souches les mieux séquencées (score d'assemblage élevé[1], > 5,8) et la souche BDBR229 dont l'annotation des effecteurs de type III a été vérifiée manuellement ont été sélectionnées pour construire un tableau montrant la présence ou absence des effecteurs de type III (figure 9). Certains effecteurs semblent conservés dans toutes ces souches ou une grande majorité de ces souches qui sont éloignées à la fois génétiquement et par leur spectre d'hôte (tableau 1). Ces effecteurs peuvent être considérés comme des effecteurs « core » qui proviennent potentiellement d'un ancêtre commun et qui peuvent être importants pour l'interaction entre ces bactéries et leurs plantes hôtes (Peeters et al., 2013). La comparaison des séquences des effecteurs de différentes souches a par ailleurs permis de mettre en évidence une pression de sélection de diversification[2] pour 9 des T3E du RSSC (tableau 2, Peeters et al., 2013).

[1] Le score d'assemblage est calculé selon la formule suivante : score = log (TailleAssemblage / NumContigs), avec TailleAssemblage = Nb nucléotides assemblés - Nb de nucléotides « N » et NumContigs = Nombre de contigs, un contig différent est séparé par au moins 10 « N ». Ce score prend donc en compte le nombre de nucléotides réels et la séparation en contigs.

[2] La méthode utilisée pour les calculs est décrite dans Remigi et al., 2011. Pour résumer, la pression de sélection a été calculée en faisant le ratio du nombre de mutations non synonymes sur le nombre de mutations synonymes puis des tests statistiques réalisés à partir de simulations.

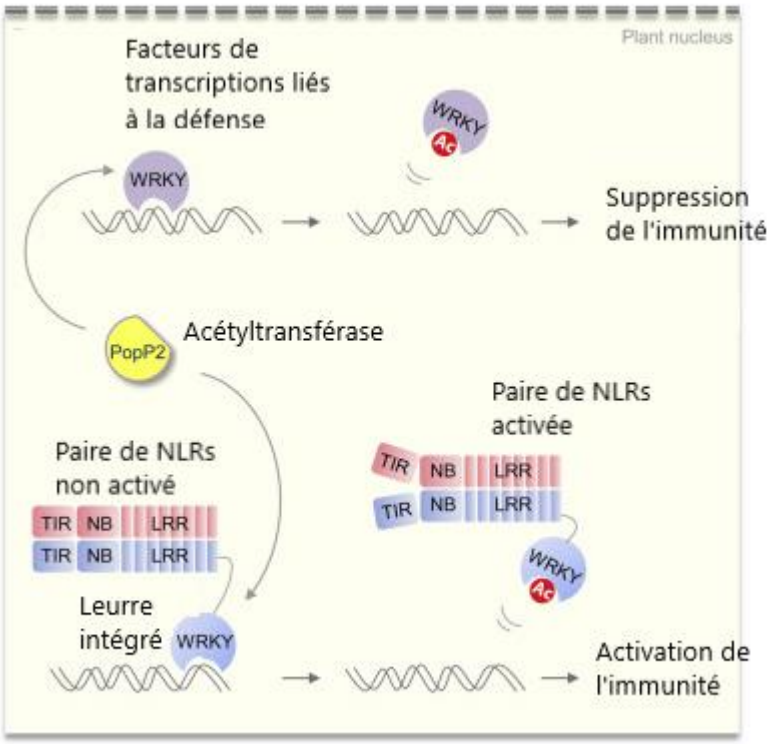


Figure 10, d'après Le Roux et al., 2015. Schématisation du rôle de RipP2/PopP2 lors de l'interaction entre *R. pseudosolanacearum* et *A. thaliana*.

Une autre particularité des effecteurs du RSSC est la présence de plusieurs familles d'effecteurs paralogues : la famille des RipA ou AWR (RipA1 à RipA5), la famille des RipG ou GALA (RipG1 à RipG7), la famille des RipH (RipH1 à RipH3) et la famille des RipS ou SKW (RipS1 à RipS8). Les effecteurs RipC1/RipC2, RipV1/RipV2, RipP1/RipP2/RipP3 et RipAX1/RipAX2 sont eux aussi des paralogues (figure 9).

3.2. Effecteurs de type III du RSSC dont certains rôles ont été étudiés

3.2.1. RipP2

RipP2, anciennement appelé PopP2, est l'effecteur de type III de *R. pseudosolanacearum* le mieux caractérisé. RipP2 fait partie de la famille d'effecteurs « YopJ-like ». YopJ est un effecteur de *Yersinia* spp qui a une fonction d'acétylation : l'acétylation de MAPK par YopJ bloque leur activation qui est essentielle pour la réponse inflammatoire (Mittal et al., 2006). RipP2 est présent dans des souches de *R. pseudosolanacearum* (phylotypes I et III) et *R. solanacearum* (phylotype II) mais n'est pas conservé dans toutes les souches (Figure 9)

RipP2 a une activité acétyltransférase menant à son auto-acétylation (Tasset et al., 2010) puis à l'acétylation de ses cibles protéiques de plantes : les facteurs de transcription WRKY. L'acétylation des facteurs de transcription WRKY inhibe leur attachement à l'ADN et donc leur activité d'activateur de la transcription de certains gènes liés à la défense. Mais l'effecteur RipP2 peut être reconnu par le NLR RRS1-R. RRS1-R est un gène de type TIR-NBS-LRR et possède un domaine WRKY « intégré » (Kroj et al., 2016; Sarris et al., 2016). L'acétylation de ce domaine par RipP2 inhibe l'attachement à l'ADN de RRS1-R puis cause l'activation de la paire de NRL RSS1-R et RPS4, menant à une réponse forte de défense et à la résistance (figure 10, Le Roux et al., 2015).

Dans l'aubergine de la variété E31, la protéine de résistance RE-bw contenant un domaine NB-ARC habituellement présent dans les NLR et un domaine WRKY peut reconnaitre et interagir de façon directe avec RipP2, ce qui mène à la résistance (Xi'ou et al., 2015).

3.2.2. RipP1 et RipAA

RipP1 (anciennement PopP1) et RipAA (anciennement AvrA) sont des effecteurs qui induisent la défense et empêchent donc l'infection de plusieurs espèces de tabac dont *Nicotiana tabacum*,

Nicotiana benthaminana et *Nicotinana glutinosa* (Poueymiro et al., 2009). RipP1 est un paralogue de RipP2 et d'un autre effecteur, RipP3. RipP1 et RipP3 sont présents dans certaines souches de *R. pseudosolanacearum* (phylotype I) mais ne sont pas conservés (figure 9). RipAA est trouvé dans les souches des quatre phylotypes et est bien conservé (figure 9). L'expression transitoire de ces deux effecteurs dans les feuilles de ces trois espèces de tabac cause des lésions caractéristiques associés à la réponse hypersensible. Dans *N. tabacum*, l'infiltration d'un mutant bactérien *ripAA* diminue les symptômes de réponse hypersensible en comparaison avec la souche sauvage GMI1000. Le double mutant *ripAA ripP1* ne cause plus de symptômes de réponse hypersensible. De plus, ce double mutant est capable de causer la maladie sur *N. benthamina*, *N. tabacum* et *N. glutinosa* contrairement à la souche sauvage. L'étude de la variation des séquences de *ripAA* dans plusieurs souches du RSSC a montré que cet effecteur possède un domaine hypervariable avec des insertions de répétitions en tandem de 12 paires de bases. L'insertion de ces répétitions est située dans une région de l'effecteur nécessaire pour la réponse hypersensible de *N. benthamiana* (Poueymiro et al., 2009).

RipP1 est aussi un facteur de spécificité d'hôte sur *Petunia* St40 : un mutant de cet effecteur est capable de causer la maladie sur cet hôte contrairement à la souche sauvage GMI1000 (Lavie et al., 2002).

Chez *N. benthamiana*, le gène permettant de reconnaitre un orthologue de RipP1 (XopJ4 de *Xanthomonas perforans*) a été identifié : il s'agit du NLR NbZAR1 (Schultink et al., 2018).

3.2.3. La famille des RipG

La famille des effecteurs GALA, aussi appelés RipG, est une famille d'effecteurs possédant un domaine F-box. Les effecteurs RipG sont présents dans les quatre phylotypes du RSSC. RipG5, RipG6 et RipG7 sont très conservés (figure 9). Dans les eucaryotes, les protéines contenant un domaine F-box peuvent s'associer avec les protéines « Skp1 » et « cullin » pour former un complexe SCF (« Skp, Cullin, F-box containing complex ») qui a une activité E3 ubiquitine ligase (Skowyra et al., 1997). Les E3 ubiquitine ligases permettent de reconnaitre des protéines substrats cibles, menant à leur ubiquitination par le complexe ubiquitine ligase. Cette ubiquitination conduit à la reconnaissance puis la dégradation par le protéasome 26S. Les protéines F-box servent comme récepteur permettant de recruter des substrats spécifiques par le complexe E3 ligase pour l'ubiquitination (Skowyra et al., 1997).

Les protéines RipG1, RipG5, RipG6 et RipG7 peuvent interagir avec certains membres de la famille des ASK de *Arabidopsis thaliana* (« *Arabidopsis SKP1-like* ») (Angot et al., 2006). Les RipG possèdent de plus un domaine LRR (Leucine Rich Repeat), domaine pouvant être impliqué dans les interactions protéines-

protéines et qui pourrait donc jouer un rôle dans la reconnaissance de substrats puis à leur ubiquitination menant à leur dégradation par le protéasome de la plante hôte. De plus, un mutant multiple des effecteurs RipG1,2,3,4,5,6,7 de la souche GMI1000 de *R. pseudosolanacearum* a un pouvoir pathogène moins important après inoculation de tomates ou de *Arabidopsis thaliana* (Angot et al., 2006). Il a par la suite été montré que les effecteurs RipG3, RipG4, RipG6 et RipG7 ont été sous pression de sélection diversifiante lors de l'évolution des différentes souches du RSSC. De plus, différents RipG semblent jouer des rôles plus ou moins important lors de l'infection de différentes plantes hôtes (tomate, aubergine, *Arabidopsis thaliana*) (Remigi et al., 2011).

L'effecteur RipG7 de GMI1000 est quant à lui un facteur de spécificité sur *Medicago trucatula* : un mutant simple de cet effecteur a un pouvoir pathogène fortement réduit sur cette plante (Angot et al., 2006; Wang et al., 2016). Le domaine F-box de RipG7 est nécessaire pour la complémentation du phénotype du mutant dans *Medicago trucatula* (Angot et al., 2006).

3.2.4. Famille des RipA

Les effecteurs RipA1, RipA2, RipA3, RipA4 et RipA5, anciennement nommés « AWR » (pour une triade d'acide aminés conservée alanine-tryptophane-arginine) sont une famille d'effecteurs du RSSC dont certains membres semblent impliqués dans le pouvoir pathogène et certains semblent déclencher la défense de plantes (Solé et al., 2012). L'effecteur RipA2 fait partie des effecteurs conservés dans les différentes souches du RSSC (figure 9). Dans les tomates Marmande (sensibles) et Hawaii7996 (tolérantes) et l'aubergine Zebrina, le quintuple mutant *ripA1-5* a une multiplication dans les feuilles moins importante que la souche sauvage GMI1000 (Solé et al., 2012). De plus, certains mutants multiples (*ripA3-5*, *ripA2-5*) ont eux aussi une multiplication moins importante. La complémentation par *RipA2* du quintuple mutant permet d'atteindre un niveau de multiplication semblable à la souche sauvage sur aubergine, montrant un rôle potentiellement plus important de cet effecteur dans le pouvoir pathogène (Solé et al., 2012). Au contraire, dans *A. thaliana,* le quintuple mutant cause une apparition des symptômes plus rapidement après inoculation que la souche sauvage GMI1000. L'expression de RipA4 et RipA5 par *Pseudomonas syringae* DC3000 diminue la multiplication bactérienne dans les feuilles de *A. thaliana,* montrant que ces effecteurs ont un effet délétère pour les bactéries sur cet hôte et qu'ils pourraient potentiellement être reconnus et déclencher les défenses immunitaires. Enfin, RipA5 et RipA2 déclenchent une réponse de type hypersensible lorsqu'ils sont exprimés transitoirement dans *N. benthamiana* (Solé et al., 2012).

Lorsqu'ils sont exprimés dans la levure, les effecteurs RipA1,2,3,5 causent une inhibition de la croissance des colonies, RipA5 ayant le phénotype le plus fort. RipA5 est un inhibiteur du régulateur central TOR (Target of Rapamycin) qui est connu pour contrôler le changement de l'allocation des ressources entre la croissance cellulaire et les réponses de stress en fonction de la disponibilité en nutriments. Dans les plantes, RipA5 réduit l'activité nitrate réductase liée à la voie TOR (Popa et al., 2016).

3.2.5. RipTPS

RipTPS est un effecteur possédant un domaine enzymatique trehalose-6-phosphate synthase. Cet effecteur est conservé dans les différentes souches du RSSC (figure 9). L'activité de catalyse de la synthèse de trehalose-6-phosphate a été confirmée dans la levure (Poueymiro et al., 2014). L'abondance du trehalose-6-phosphate est finement régulée dans les cellules de plante et pourrait servir de signal pour la régulation du métabolisme (Paul et al., 2008). Par ailleurs, RipTPS induit une réponse immunitaire de type réponse hypersensible sur *Nicotiana tabacum* après expression transitoire dans les feuilles. La partie C-terminale de l'effecteur est suffisante pour induire cette réponse, montrant que l'activité enzymatique de synthèse de trehalose-6-phosphate n'est pas nécessaire (Poueymiro et al., 2014).

3.2.6. RipTAL

RipTAL (anciennement appelé Brg11, Cunnac et al., 2004) est un effecteur orthologue des effecteurs TALs des Xanthomonas connus pour agir comme des facteurs de transcription dans les plantes hôtes. Tout comme les TALs des *Xanthomonas,* RipTAL possède des répétitions d'acides aminés (35 aa pour RipTAL) dont la variation de quelques résidus détermine à quelle séquence de nucléotides l'effecteur va s'attacher sur l'ADN. Ces séquences d'ADN sont appelées EBE (« Effector Binding Elements »). RipTAL peut s'associer à un EBE et activer la transcription d'un gène rapporteur *in planta*. RipTAL possède aussi un domaine d'activation de la transcription (AD, « Activation Domain ») en partie C-terminale (Lange et al., 2013). RipTAL est prévalent dans les souches de phylotype I et IV du RSSC mais est trouvé dans des souches appartenant à tous les phylotypes. Les différents RipTAL de différentes souches ont des EBE prédits différents. Les RipTALs peuvent activer la transcription de gènes rapporteurs clonés après leur EBE prédit mais aussi après les EBE prédits d'autres RipTALs, montrant une potentielle convergence évolutive (Schandry et al., 2016).

3.2.7. RipAY

RipAY est un effecteur conservé dans les différentes souches du RSSC (figure 9). RipAY possède un domaine ChaC, décrit dans différents organismes comme ayant une activité γ-glutamyl cyclotransferase pour dégrader le glutathion. Cet effecteur montre une certaine toxicité lorsqu'il est exprimé dans la levure et cause une inhibition de la croissance des colonies, en diminuant la concentration de glutathion intracellulaire (Fujiwara et al., 2016; Mukaihara et al., 2016). RipAY interagit avec des thioredoxines de plantes (Sang et al., 2018) et cette association est nécessaire pour son activité de dégradation du glutathion ; RipAY synthétisé à partir de procaryotes et n'ayant pas été mis en contact avec des thioredoxines eucaryotiques (extraits de levure ou de plantes) n'a pas d'activité de dégradation du glutathion (Fujiwara et al., 2016; Mukaihara et al., 2016). RipAY cause une diminution des réponses associées à la défense lorsqu'il est exprimé dans les cellules des plantes telles que le « ROS burst » ou l'expression de gènes liés à la défense et son activité enzymatique de dégradation du glutathion est nécessaire pour ce phénotype (Sang et al., 2018). Le glutathion joue un rôle dans la réponse à des stress biotiques chez les plantes, lié à la production de ROS et à la réponse hypersensible (Dubreuil-Maurizi and Poinssot, 2012).

3.2.8. RipR

RipR (anciennement appelé PopS) est un effecteur conservé dans les souches du RSSC (figure 9). Un mutant de cet effecteur dans la souche UW551 semblerait être légèrement affecté dans son pouvoir pathogène sur plusieurs hôtes comme la tomate ou la pomme de terre après inoculation par arrosage (Jacobs et al., 2013). De plus, cet effecteur semble diminuer les réponses de défenses associées à l'acide salicylique : l'expression des gènes de défenses associés à l'acide salicylique est plus importante dans les plantes après inoculation par un mutant *ripR* (Jacobs et al., 2013).

Projet de thèse

Le projet sur lequel j'ai travaillé pendant ma thèse porte sur la compréhension du rôle des effecteurs de type III RipH1, RipH2 et RipH3 de *Ralstonia pseudosolanacearum* une fois injecté dans les cellules des plantes. Ce projet s'inscrit dans un projet plus large d'études de multiples effecteurs de *R. pseudosolanacearum* dans l'équipe de recherche. En effet, les effecteurs de type III sont essentiels au pouvoir pathogène – découvrir leurs fonction précise fait partie des questions centrales sur la compréhension de la pathogénicité des bactéries. Il semble exister une redondance fonctionnelle entre les effecteurs de *R. pseudosolanacearum*, très peu de phénotypes différentiels de pathogénicité sont observés sur des mutants simples d'effecteurs (Cunnac et al., 2004). La souche GMI1000 de *R. pseudosolanacearum* possède 72 effecteurs de type III. Pour étudier leurs fonctions potentiellement redondantes il a été choisi de se focaliser sur les familles d'effecteurs paralogues ou sur des effecteurs qui sont conservés dans d'autres souches – donc qui ont été sélectionnés lors de l'évolution et potentiellement plus importants pour la pathogénicité (Peeters et al., 2013).

De plus, trouver le rôle des effecteurs dans les plantes peut permettre d'améliorer nos connaissances sur celles-ci. Les effecteurs peuvent cibler des voies de défenses conservées. La plupart des gènes de résistances sont des gènes qui permettent la reconnaissance d'effecteurs, et sont utilisés par la sélection variétale pour permettre de cultiver des plantes résistantes. Mais les effecteurs non reconnus par des gènes de résistance peuvent eux aussi être utilisés pour trouver des gènes utiles pour la sélection variétale. Ces effecteurs ciblent potentiellement des gènes ou des voies de signalisations dit de « sensibilité » - dont la présence est importante pour l'établissement de la maladie (van Schie and Takken, 2014). Des mutants de ces gènes pourraient donc être plus résistants comme le montre l'exemple du gène *Mlo* (Büschges et al., 1997).

Dans ce travail, des protéines de tomates interagissant avec les effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3 ont été trouvées par ciblage par double hybride dans la levure. Des études fonctionnelles ont ensuite été réalisées, montrant que certaines de ces protéines « cibles » semblent avoir des rôles comme gènes de sensibilités.

Résultats – Chapitre I : Étude du rôle des effecteurs RipH1, RipH2, RipH3 lors de l'infection des plantes hôtes par *R. pseudosolanacearum*

1. Les effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3 de *R. pseudosolanacearum* font partie d'une famille d'effecteurs et sont conservés dans une majorité de souches

1.1. Les effecteurs RipH dans le RSSC

En 2013, une base de données répertoriant les effecteurs de type III présents ou absents dans les souches de *R. solanacearum* séquencées a été mise en place (Peeters et al., 2013). Parmi les différentes souches séquencées, 11 appartenant à chacun des 4 phototypes ont été sélectionnées pour étudier la conservation de ces effecteurs de type III : GMI1000 (I), RS1000 (I), CMR15 (III), Psi07 (IV), BDB R229 (IV), *R. syzygii* R24 (IV), IPO1609 (II), UW551 (II), Molk2 (II), Po82 (II) et CFBP 2957 (II).

Les effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3 ont été trouvés comme conservés dans plus de 10 de ces souches. Ils ont donc été considérés comme des effecteurs dit « core » (32 effecteurs « core » en tout) qui sont très conservés malgré la diversification des espèces du RSSC (Peeters et al., 2013). Cette conservation pourrait être une indication d'un rôle important pour la bactérie de ces effecteurs. Il est intéressant de constater que ces RipH sont tous les trois conservés même s'ils appartiennent à la même famille alors qu'un certain niveau de redondance pourrait exister entre ces protéines proches.

Les séquences des effecteurs des différentes souches ont aussi été analysées pour déterminer si les gènes ont pu subir une pression de sélection de conservation ou bien de diversification. RipH3 semble être sous forte pression de sélection de diversification sur les séquences étudiées (Peeters et al., 2013). Une des explications possibles de cette sélection de diversification est que cet effecteur a pu évoluer en parallèle des plantes hôtes de *R. solanacearum*.

En utilisant les données présentes sur la base de données « Ralsto T3E », nous pouvons étudier la conservation des effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3 cette fois ci dans 14 souches appartenant aux quatre phylotypes choisies parmi les mieux séquencées (score d'assemblage élevé[3], > 5.8 avec pour

[3] Le score d'assemblage est calculé selon la formule suivante : score = log (TailleAssemblage / NumContigs), avec

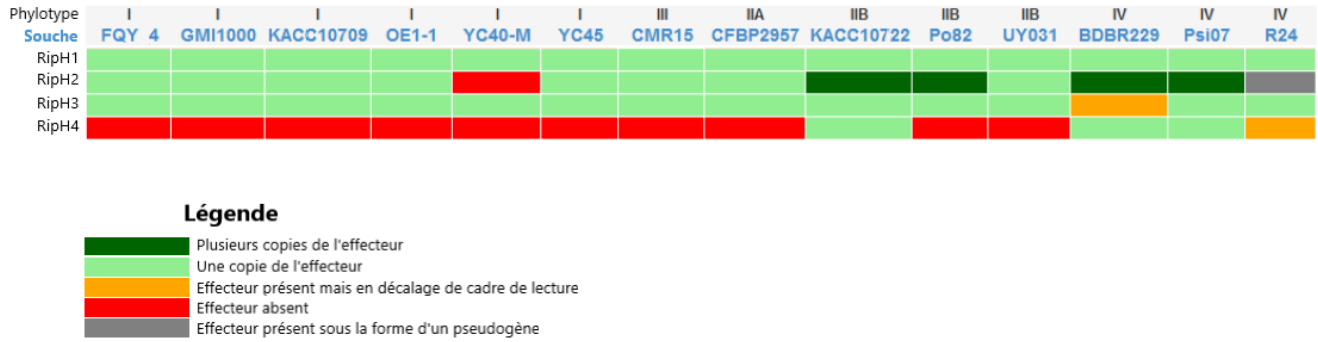


Figure 11. Visualisation de la présence et absence des effecteurs RipH1, RipH2, RipH3 et RipH4 dans 11 souches du complexe d'espèce de *Ralstonia solanacearum.* Cette représentation a été construite à partir des séquences disponibles sur la base de données « Ralsto T3E » (Peeters et al., 2013).

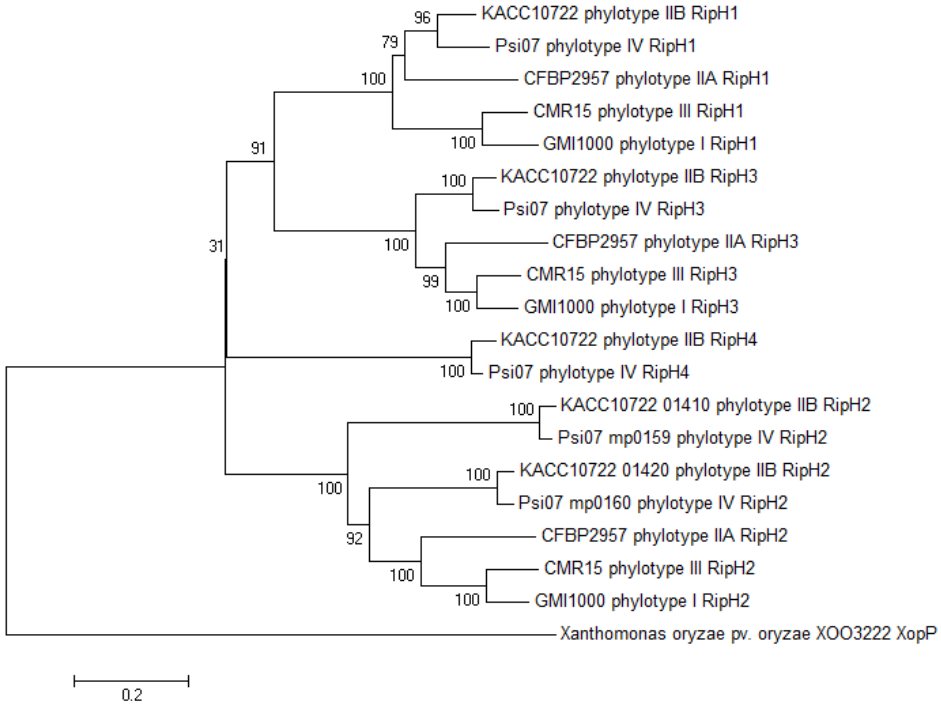


Figure 12. Arbre phylogénétique créé à partir des séquences protéiques des effecteurs RipH1, RipH2, RipH3 et RipH4 des souches GMI1000, CMR15, KACC10722, Psi07 et CFBP2957 du RSSC et XopP de *Xantomonas oryzae pv. oryzae*. La méthode utilisée est celle du neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) et le logiciel utilisé MEGA X (Kumar et al. 2018)

exception la souche BDBR229 car aucune souche causant la BDB n'avait de score >5.8 et que la présence de T3E a été vérifiée manuellement sur le génome de cette souche) : FQY_4, GMI1000, KACC10709, OE1-1, YC40-M, YC45, CMR15, CFBP2957, KACC10722, Po82, UY031, BDBR229, Psi07 et R24. RipH1 est présent dans les 14 souches, RipH2 est présent dans 12 des souches et RipH3 est présent dans 13 des souches. De façon intéressante, RipH2 est dupliqué dans 4 des souches : KACC10709, Po82, BDBR229 et Psi07 (figure 11). Ces données plus récentes confirment que les effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3 sont des effecteurs conservés dans les différentes espèces de *R. solanacearum*. Un autre effecteur de la même famille, RipH4, est présent dans 3 de ces 14 souches qui appartiennent au phylotypes II et IV : KACC10709, BDBR229 et Psi07 (figure 11). Un arbre phylogénétique construit à partir des séquences d'acides aminés des effecteurs RipH de 5 souches appartenant aux différents phylotypes est présenté sur la figure 12.

1.2. Les fonctions de RipH1, RipH2 et RipH3 ne sont pas connues mais leur orthologue XopP joue un rôle lors de l'infection du riz

Les *Xanthomonas* sont une famille de gamma-protéobactéries qui peuvent causer des maladies sur un grand nombre d'espèces végétales (Ryan et al., 2011). Les *Xanthomonas* utilisent des effecteurs de type III tout comme *R. solanacearum*, et certains effecteurs sont orthologues entre ces différentes espèces. C'est le cas de l'effecteur de type III XopP qui est un orthologue des RipH et qui est conservé dans plusieurs espèces différentes de *Xanthomonas* telles que *X. oryzae pv. oryzae*, *X. axonopodis pv. citri*, *X. campestris pv. campestris* et *X. campestris pv. vesicatoria* (Furutani et al., 2009). Un arbre phylogénétique montrant l'orthologie de XopP de *X. oryzae pv. oryzae* et des effecteurs RipH est représenté sur la figure 12.

Le rôle de XopP dans *X. oryzae pv. oryzae* a été étudié. Cette espèce de *Xanthomonas* est un pathogène du riz. XopP interagit avec la protéine du riz OsPUB44 qui est une E3 ubiquitine ligase et inhibe son activité ligase en se liant à son domaine U-box. OsPUB44 est un régulateur positif des réponses immunitaires du riz liées à la perception de la chitine et du peptidoglycane : la diminution de son

TailleAssemblage = Nb nucléotides assemblés - Nb de nucléotides « N » et NumContigs = Nombre de contigs, un contig différent est séparé par au moins 10 « N ». Ce score prend donc en compte le nombre de nucléotides réels et la séparation en contigs.

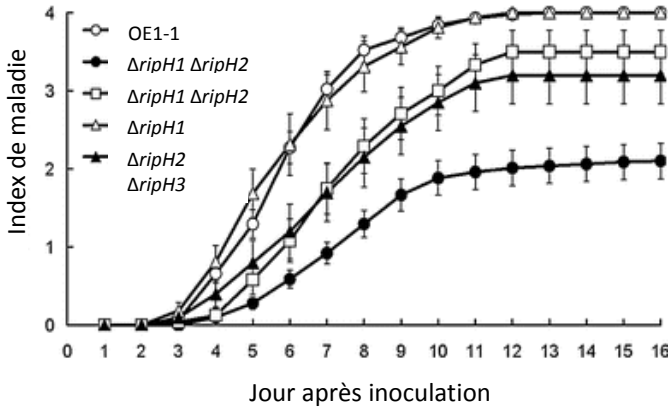


Figure 13, d'après Chen et al. 2014. Courbes de maladie de tomates inoculées par OE1-1 et des mutants d'effecteurs RipH.

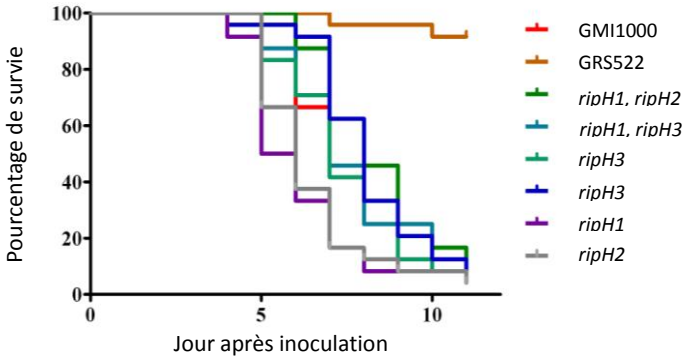
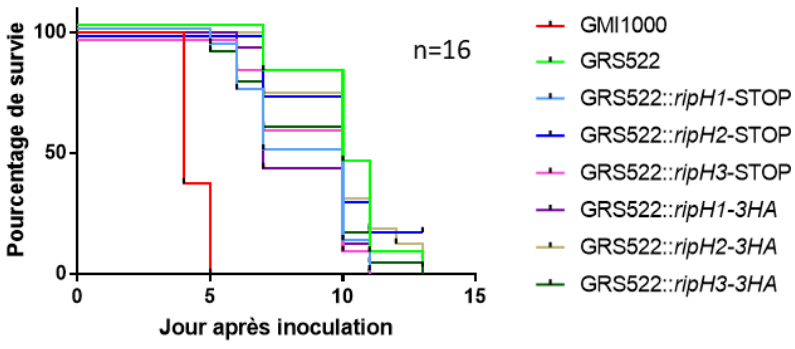


Figure 14. Pourcentage de survie après inoculation par arrosage de tomates par le mutant GRS522, la souche sauvage GMI1000 et des mutants simples et doubles des effecteurs RipH. Le mutant GRS522 a été initialement construit comme un triple mutant *ripH1, ripH2, ripH3.* La survie des tomates inoculées par le mutant GRS522 est significativement différente de celles inoculées avec la souche sauvage. Aucun autre mutant n'a de phénotype différentiel.



Comparaison avec GMI1000	
Souche	p-value
GRS522::*ripH1*- STOP	<0,0001
GRS522::*ripH2*- STOP	<0,0001
GRS522::*ripH3*- STOP	<0,0001
GRS522::*ripH1-3HA*	<0,0001
GRS522::*ripH2-3HA*	<0,0001
GRS522::*ripH3-3HA*	<0,0001

Comparaison avec GRS522	
Souche	p-value
GRS522::*ripH1* -STOP	0,015
GRS522::*ripH2* -STOP	0,6778
GRS522::*ripH3* -STOP	0,0372
GRS522::*ripH1-3HA*	0,0142
GRS522::*ripH2-3HA*	0,9387
GRS522::*ripH3-3HA*	0,1511

Figure 15. Phénotypage des souches GRS522 complémentés par les effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3 sur tomate. La complémentation a été faite par clonage des effecteurs dans le plasmide pNP329 (Monteiro et al., 2012) avec un codon stop ou non. Les tomates ont été inoculées par arrosage d'une suspension bactérienne à 5.10^7 cfu/ml. Les p-values montrées représentent le résultat d'un test de Mantel-Cox (Remigi et al., 2011).

expression cause la diminution de l'expression de gènes liées à la reconnaissance de la chitine et diminue la résistance à l'infection par *X. oryzae pv. oryzae* (Ishikawa et al., 2014).

1.3. Les effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3 semblent contribuer fortement à l'infection de la tomate par la souche OE1-1

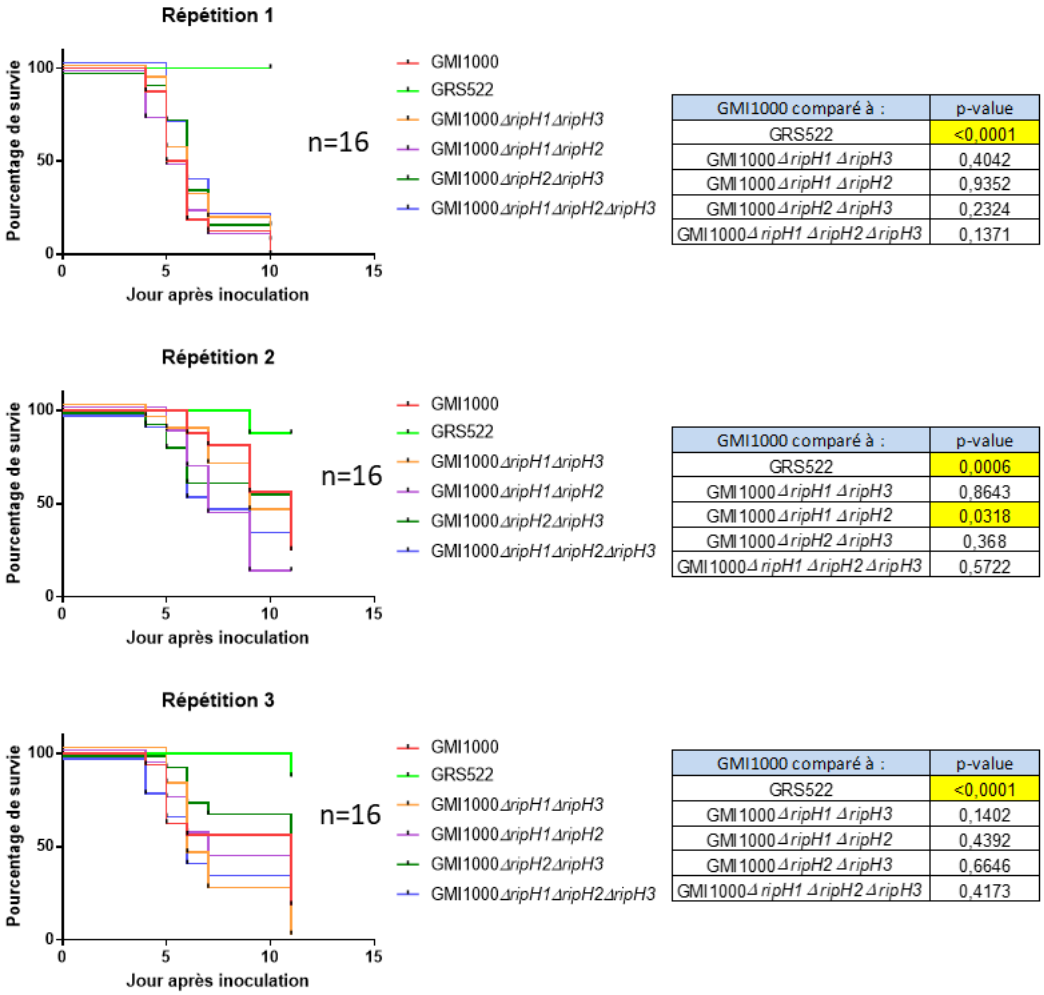
Des mutants de délétion des effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3 ont été réalisés dans la souche OE1-1, une souche japonaise de phylotype I (Hikichi et al., 1999). Le triple mutant et les doubles mutants Δ*ripH1*Δ*ripH2* et Δ*ripH2*Δ*ripH3* semblent être affectés dans leur pathogénicité après inoculation par arrosage de tomates cv. Moneymaker mais aucun test statistique n'a été réalisé sur ces données (Chen et al., 2014), voir figure 13. La multiplication bactérienne après infiltration dans les feuilles du triple mutant est aussi inférieure à celle de la souche sauvage. Le triple mutant ne semble cependant pas affecté dans sa pathogénicité sur l'aubergine et le tabac (Chen et al., 2014).

1.4. Le phénotype de réduction de pathogénicité du triple mutant *ΔripH* n'est pas confirmé pour la souche GMI1000

Historiquement, un mutant qui correspondait supposément à un triple mutant *ΔripH* avait été réalisé dans l'équipe. Ce triple mutant (appelé GRS522) a une pathogénicité fortement réduite à la fois après inoculation de tomate, de *A. thaliana* et de *Medicago truncatula*. Les doubles mutants *ΔripH1 ΔripH2* et *ΔripH1 ΔripH3* n'ont pas ce phénotype : la conclusion était donc que les trois effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3 étaient redondant fonctionnellement et étaient essentiels à la pathogénicité de *R. pseudosolanacearum* (figure 14). Ces résultats étaient en concordance avec ceux trouvés par Chen et al., 2014.

De nouveaux résultats ont infirmé ces conclusions. Tout d'abord, la complémentation du phénotype de réduction de pathogénicité par la réinsertion dans le triple mutant d'un de ces trois effecteurs était impossible – le phénotype des souches complémentées était identique à celui du mutant GRS522 (figure 15).

Ensuite, la construction de nouveaux triple mutants *ΔripH* par la méthode SacB a permis de montrer que le phénotype de réduction de pathogénicité du mutant GRS522 était probablement dû à autre chose que la mutation des effecteurs RipH : en effet le phénotype de maladie de ces nouveaux triples



GMI1000 comparé à :	p-value
GRS522	<0,0001
GMI1000 ΔripH1 ΔripH3	0,4042
GMI1000 ΔripH1 ΔripH2	0,9352
GMI1000 ΔripH2 ΔripH3	0,2324
GMI1000 ΔripH1 ΔripH2 ΔripH3	0,1371

GMI1000 comparé à :	p-value
GRS522	0,0006
GMI1000 ΔripH1 ΔripH3	0,8643
GMI1000 ΔripH1 ΔripH2	0,0318
GMI1000 ΔripH2 ΔripH3	0,368
GMI1000 ΔripH1 ΔripH2 ΔripH3	0,5722

GMI1000 comparé à :	p-value
GRS522	<0,0001
GMI1000 ΔripH1 ΔripH3	0,1402
GMI1000 ΔripH1 ΔripH2	0,4392
GMI1000 ΔripH2 ΔripH3	0,6646
GMI1000 ΔripH1 ΔripH2 ΔripH3	0,4173

Figure 16. Pourcentage de survie après inoculation par arrosage de tomates par le mutant GRS522, la souche sauvage GMI1000 et des mutants de délétion *ripH* fait par la méthode SacB. Les p-values ont été calculées par le test de Mantel-Cox (Remigi et al., 2011). La souche GRS522, initialement décrite comme un triple mutant *ripH1ripH2ripH3* est significativement altérée dans sa pathogénicité mais le nouveau triple mutant réalisé par la méthode SacB n'a pas de phénotype différent de la souche sauvage GMI1000.

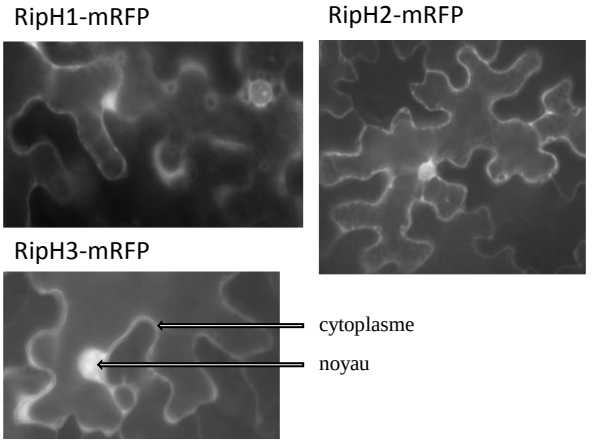


Figure 17. Visualisation de la localisation des effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3 fusionnés à la mRFP après expression transitoire dans des cellules de *N. benthamiana*. La fluorescence apparait en blanc. On peut voir que la localisation des RipH-mRFP est nucléaire et cytoplasmique.

mutants était identique à la souche sauvage sur la tomate contrairement à celui de la souche GRS522 (Figure 16).

Nous avons contacté les auteurs de la publication Chen et al., 2014 pour discuter de cette différence de résultats. Des plasmides permettant la complémentation des effecteurs RipH leur ont été envoyé mais nous n'avons pas plus d'informations concernant d'éventuelles expérimentations de complémentation.

Ces nouveaux résultats, obtenus durant la dernière partie de ma thèse, donnent un nouvel éclairage à celle-ci. Les effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3 ne sont probablement pas essentiels à la pathogénicité de *R. pseudosolanacearum*. Mais ces effecteurs sont une famille d'effecteurs conservés dans le RSSC ce qui pourrait indiquer un rôle important. Dans la suite de ce travail, nous avons trouvé des protéines interagissant avec les effecteurs RipH qui semblent jouer un rôle dans la réponse des plantes à l'infection. L'étude systématique des effecteurs, même si des mutants individuels de ceux-ci ne montrent pas de phénotypes différentiels, permettra d'élucider progressivement leurs rôles redondants lors de l'infection des plantes par *R. pseudosolanacearum*.

1.5. Localisation des effecteurs RipH dans les cellules des plantes

La localisation d'un certain nombre d'effecteur de type III de *R. pseudosolanacearum* lorsque ceux-ci sont exprimés dans les cellules des plantes a préalablement été étudiée dans l'équipe. Les effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3 ont une localisation dans le cytoplasme et le noyau des cellules lorsqu'ils sont fusionnés à la mRFP et exprimés dans les cellules de *N. benthamiana* (figure 17).

1.6. Construction de tomates transgéniques exprimant les effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3

Une approche qui permettrait d'étudier quel rôle ont les effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3 une fois injectés dans les cellules des plantes est de construire des plantes transgéniques exprimant directement ces effecteurs pour pouvoir s'affranchir des effets de la bactérie. Pendant ma thèse, des constructions permettant d'exprimer ces effecteurs ont été transformées dans des tomates de cultivar M82. Pour optimiser l'expression des RipH, il a été décidé d'utiliser des nouveaux gènes synthétisés permettant d'avoir un usage de codons le plus proche possible de celui des plantes de la famille des

Codification			
XVE::*ripH1* -STOP	XVE::*ripH2* -STOP	XVE::*ripH3* -STOP	XVE::*gus* -STOP
TRTO#9 G1D	TRTO#10 A2	TRTO#11 A3	TRTO#12 C10
TRTO#9 G2A	TRTO#10 A3	TRTO#11 A4	TRTO#12 C2A
TRTO#9 H1C	TRTO#10 A4B	TRTO#11 B3	TRTO#12 C3A
TRTO#9 H2A	TRTO#10 B2	TRTO#11 C2A	TRTO#12 C7B
TRTO#9 H2C	TRTO#10 C3B	TRTO#11 C2B	TRTO#12 D2
TRTO#9 K1	TRTO#10 C5	TRTO#11 G2	TRTO#12 E3
TRTO#9 L1A	TRTO#10 D3B	TRTO#11 H2	TRTO#12 E6A
TRTO#9 L1B	TRTO#10 E2A	TRTO#11 O1	TRTO#12 E6B
TRTO#9 M2A	TRTO#10 E3		TRTO#12 F2
TRTO#9 N1B	TRTO#10 I2		TRTO#12 J1
	TRTO#10 J1		TRTO#12 J3
	TRTO#10 K1		TRTO#12 K5
	TRTO#10 K3		TRTO#12 L11
	TRTO#10 K6B		
	TRTO#10 L1		
	TRTO#10 L2A		
	TRTO#10 L4		
	TRTO#10 L5A		
	TRTO#10 L6		
	TRTO#10 O3A		
	TRTO#10 O4A		
	TRTO#10 O5		
10 transformants	22 transformants	8 transformants	13 transformants

Tableau 3. Transformants de tomates M82 contenant des T-DNA permettant d'exprimer RipH1, RipH2 et RipH3 sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'œstradiol XVE (Zuo et al., 2000).

solanacées. Ce sont ces nouveaux gènes *RipH* qui ont été utilisés par la suite pour les expérimentations nécessitant d'exprimer ces effecteurs dans des cellules de plantes : transformation stable ou transitoire par agroinfiltration.

Une première tentative de transgénèse a été effectuée avec des effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3 dans une construction permettant de les exprimer sous le contrôle d'un promoteur 35S. Il n'a pas été possible de regénérer suffisamment de plantes transformées à partir des 200 explants de départ, une autre approche a donc été choisie.

Les effecteurs RipH sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'œstradiol (Zuo et al., 2000) ont été transformés par la suite. Un plasmide contrôle contenant le gène gus a lui aussi été transformé. Il a été possible d'obtenir 10 transformants XVE::*ripH1*-STOP, 22 transformants XVE::*ripH2*-STOP, 8 transformants XVE::*ripH3*-STOP et 13 transformants XVE::*gus*-STOP, voir tableau 3. Un gène de résistance à l'hygromycine a permis la sélection. L'insertion de l'ADN-T a été vérifiée par PCR. La ploïdie a été vérifiée par cytométrie en flux, car il peut arriver que celle-ci soit modifiée suite à une culture *in vitro* prolongée chez la tomate (Ellul et al., 2003). Le nombre d'insertions du transgène est en cours de vérification par « southern blot ».

Il n'a malheureusement pas été possible au cours de ma thèse d'étudier d'éventuelles modification de phénotype de ces plantes transformés par les effecteurs RipH, mais celles-ci seront disponibles pour la continuation de ce travail dans l'équipe.

1.7. L'expression des effecteurs RipH cause une diminution du « ROS burst » induit par un signal de stress biotique

Les ROS (espèces réactives de l'oxygène ou « Reactive Oxygen Species ») sont essentiels pour de nombreux rôles de signalisation (Mittler et al., 2011). Une production de ROS est observée rapidement dans les plantes lorsque qu'un pathogène est détecté (Torres, 2010). La mesure des ROS induit lors d'un stress biotique peut donc être un moyen d'étudier l'intensité de cette première réponse de défense. Il est possible de mesurer ces ROS par bioluminescence : grâce à une catalyse par une peroxydase, les ROS produits peuvent oxyder le luminol qui émet ainsi de la lumière détectable par des instruments de mesure (Sang and Macho, 2017).

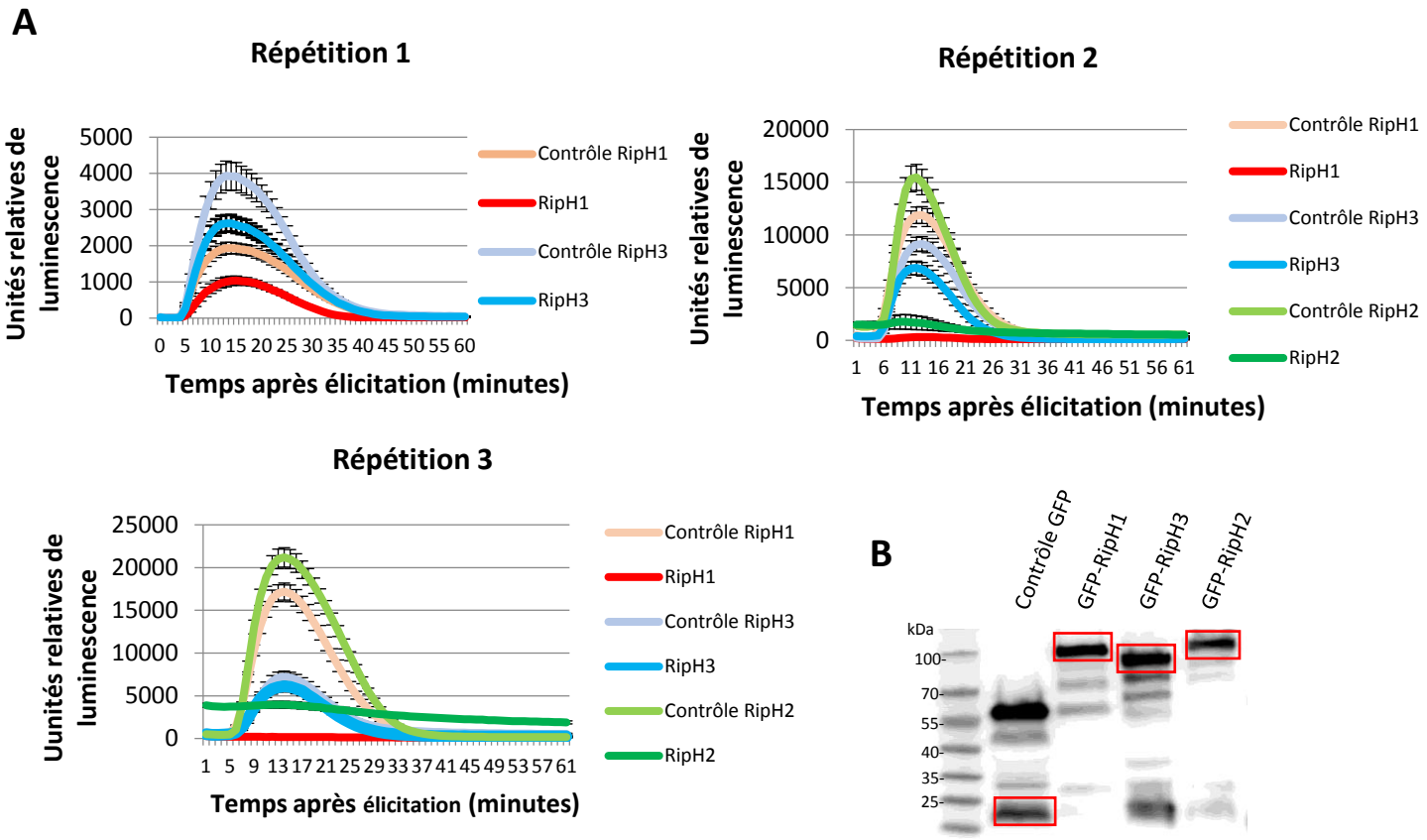
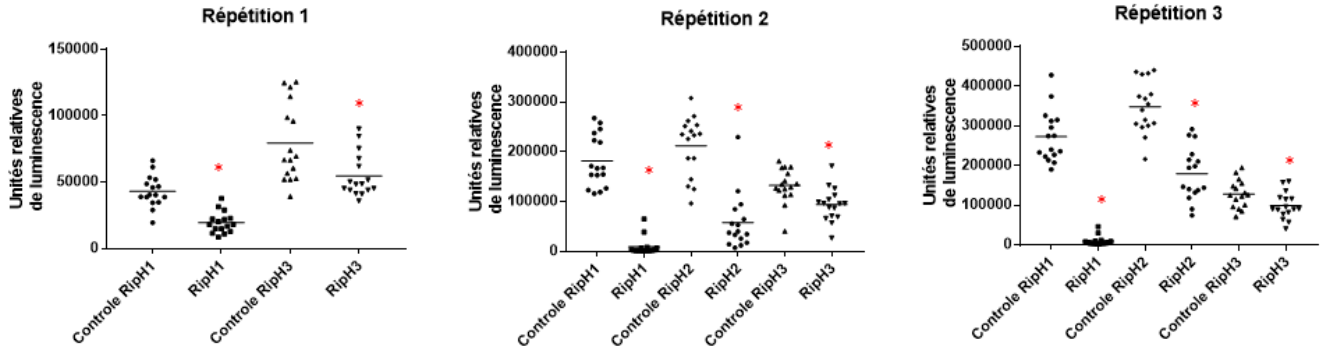


Figure 18. L'expression de RipH1, RipH2 et RipH3 diminue le « ROS burst » (A) Unités relatives de luminescence après induction des ROS par Flg22 dans des feuilles de *N. benthamiana* transformées par les effecteurs RipH ou par le contrôle GFP dans l'autre côté de la même feuille. Chaque point représente la moyenne de la luminescence mesurée dans les 16 échantillons correspondant à une condition à un temps donné. (B) Western blot montrant l'expression des RipH et du contrôle GFP (anticorps anti-GFP). Les tailles attendues sont visualisées par un rectangle rouge.



	p-value
RipH1	<0,0001
RipH3	0,0045

	p-value
RipH1	<0,0001
RipH2	<0,0001
RipH3	0,0019

	p-value
RipH1	<0,0001
RipH2	<0,0001
RipH3	0,0234

Figure 19. Unités relatives de luminescence après induction des ROS par Flg22 dans des feuilles de *N. benthamiana* transformées par les effecteurs RipH. Chaque point représente la somme sur une heure de la luminescence mesurée pour chaque échantillon. Certaines données ne suivant pas une distribution normale selon le test de Shapiro-Wilk, un test de Mann-Whitney a été effectué pour chaque paire de conditions contrôle GFP/RipH pour tester si les moyennes étaient différentes. Les étoiles rouges représentent un test indiquant une différence significative.

Nous avons utilisé cette méthode pour mesurer l'induction des ROS dans des feuilles de *N. benthamiana* transformées par RipH1, RipH2 et RipH3. L'induction de la production de ROS est déclenchée par le peptide Flg22 qui est déclenche les réponses immunitaires suite à sa perception par FLS2. La luminescence produite par l'oxydation du luminol est ensuite mesurée durant une heure.

Sur une même feuille de *N. benthamiana*, une moitié a été transformée par une construction contrôle GFP et l'autre moitié par un des trois effecteurs RipH-GFP. L'induction des ROS après mise en contact du peptide Flg22 a été mesurée pendant une heure par luminescence sur 16 échantillons par condition. Nous pouvons observer que la luminescence mesurée est moins importante dans les feuilles transformées par RipH1, RipH2 et RipH3 (figures 18A). Un western blot a permis de vérifier la bonne expression des protéines (figure 18B). Une particularité est observée dans les feuilles transformées par RipH2 : il semble qu'il y a un certain niveau de luminescence basale présent avant la détection de l'induction des ROS par Flg22. RipH2 pourrait donc induire les ROS de façon indépendate du « ROS burst » provoqué par Flg22. Des tests statistiques réalisés sur la somme de la luminescence totale mesurée par échantillons confirment que l'induction de ROS est moins importante dans les feuilles transformées par RipH1, RipH2 et RipH3 (figure 19). Les RipH pourraient donc jouer un rôle de régulation négative des défenses liées aux ROS des plantes hôtes de *R. pseudosolanacearum*.

RipH1				RipH2				RipH3				RipH3 par hybrigenics		
Identifiant Solyc	Nombre de clones trouvés	Nom TOM	Annotation Sol genomics / nom du gène	Identifiant Solyc	Nombre de clones trouvés	Nom TOM	Annotation Sol genomics / nom du gène	Identifiant Solyc	Nombre de clones trouvés	Nom TOM	Annotation Sol genomics / nom du gène	Identifiant Solyc	Note hybrigenics	Nom TOM
Solyc08g015690.2.1	9	**TOM5**	Late embryogenesis abundant protein	Solyc03g121360.1.1	8	**TOM13**	Charged multivesicular body protein 1b	Solyc11g062010.1.1	16	**TOM9**	Chromodomain helicase DNA binding protein 3	Solyc07g047770.2.1	A	**TOM6**
Solyc04g007000.1.1	7	**TOM1**	**RAV1**	Solyc10g081030.1.1	5	**TOM14**	Nascent polypeptide-associated complex alpha subunit-like protein	Solyc07g047770.2.1	6	**TOM6**	Histidine kinase 1	Solyc09g065630.2.1	A	**TOM7**
Solyc05g009790.1.1	7	**TOM2**	**RAV2**	Solyc11g017470.1.1	4	**TOM19**	NAC domain protein IPR003441	Solyc09g065630.2.1	5	**TOM7**	TIFY 4B	Solyc11g062010.1.1	A	**TOM9**
Solyc02g091800.2.1	6	**TOM4**	BHLH transcription factor	Solyc03g120880.2.1	3	**TOM16**	Nucleoporin NUP53	Solyc11g010230.1.1	4	**TOM8**	Histone H3	Solyc05g050600.2.1	B	**TOM11**
Solyc01g095400.2.1	4	**TOM3**	Kelch like protein 6	Solyc04g009440.2.1	3	**TOM17**	NAC domain protein	Solyc08g015690.2.1	3	**TOM5**	Late embryogenesis abundant protein	Solyc01g008190.2.1	D	**TOM12**
Solyc03g113510.1.1	3			Solyc06g060140.2.1	3	**TOM17**	Kinesin like protein	Solyc08g014000.2.1	2	**TOM10**	Lipoxygenase	Solyc08g015690.2.1	D	**TOM5**
Solyc01g105560.2.1	2			Solyc01g066050.2.1	3	**TOM15**	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5	Solyc05g050600.2.1	1	**TOM11**	Dynamin 2	Solyc08g014000.2.1	D	**TOM10**
Solyc04g077870.2.1	2			Solyc03g122050.1.1	2			Solyc01g008190.2.1	1	**TOM12**	Os05g0304100 protein (fragment)	Solyc01g090230.2.1	D	
Solyc10g075030.1.1	2			Solyc11g006960.1.1	2			Solyc03g006570.2.1	1			Solyc01g094800.2.1	D	
Solyc00g282510.1.1	1			Solyc03g007130.2.1	1			Solyc03g046470.2.1	1			Solyc01g102410.2.1	D	
Solyc01g007690.2.1	1			Solyc03g114680.2.1	1			Solyc03g097450.2.1	1			Solyc03g046470.2.1	D	
Solyc01g097330.2.1	1			Solyc06g007470.2.1	1			Solyc04g045480.2.1	1			Solyc03g083430.2.1	D	
Solyc01g100110.2.1	1			Solyc10g079470.2.1	1			Solyc04g050540.2.1	1			Solyc03g097450.2.1	D	
Solyc01g102580.2.1	1			**Nombre total de clones levure : 37**				Solyc05g005200.2.1	1			Solyc04g014740.1.1	D	
Solyc01g105710.2.1	1			**Nombre total de gènes : 13**				Solyc01g066290.2.1	1			Solyc04g071480.1.1	D	
Solyc01g106320.2.1	1							Solyc05g055810.2.1	1			Solyc05g052510.2.1	D	
Solyc01g106900.2.1	1							Solyc06g008020.2.1	1			Solyc06g072300.2.1	D	
Solyc01g108600.2.1	1							Solyc06g073600.2.1	1			Solyc07g055540.2.1	D	
Solyc02g082000.2.1	1							Solyc07g053740.1.1	1			Solyc09g065190.1.1	D	
Solyc02g082260.2.1	1							Solyc07g055100.2.1	1			Solyc11g027650.1.1	D	
Solyc02g087630.2.1	1							Solyc10g081730.1.1	1			Solyc01g008080.2.1	N/A	
Solyc02g088910.2.1	1							Solyc11g010470.1.1	1			Solyc01g086960.2.1	N/A	
Solyc03g059310.2.1	1							**Nombre total de clones levure : 52**				Solyc04g050440.2.1	N/A	
Solyc03g118500.2.1	1							**Nombre total de gènes : 22**				Solyc05g013630.1.1	N/A	
Solyc04g011610.1.1	1											Solyc05g054790.1.1	N/A	
Solyc04g058150.2.1	1											Solyc09g075430.2.1	N/A	
Solyc04g072630.2.1	1											Solyc09g092530.2.1	N/A	
Solyc04g074480.2.1	1											Solyc10g005730.2.1	N/A	
Solyc04g077020.2.1	1											Solyc10g019050.1.1	N/A	
Solyc04g081090.2.1	1											Solyc11g051180.1.1	N/A	
Solyc05g005950.2.1	1											Solyc11g062190.1.1	N/A	
Solyc05g050200.2.1	1											Solyc12g042900.1.1	N/A	
Solyc06g009020.2.1	1											**En commun avec notre criblage par RipH3 : 8**		
Solyc06g051550.2.1	1													
Solyc06g071100.2.1	1													
Solyc07g007930.2.1	1													
Solyc07g065120.2.1	1													
Solyc07g065200.2.1	1													
Solyc08g008350.2.1	1													
Solyc08g074680.2.1	1													
Solyc08g075370.2.1	1													
Solyc08g080080.2.1	1													
Solyc09g007250.2.1	1													
Solyc09g018750.2.1	1													
Solyc09g075420.2.1	1													
Solyc09g083030.1.1	1													
Solyc10g083970.1.1	1													
Solyc11g062130.1.1	1													
Solyc12g005340.1.1	1													
Nombre total de clones levure : 82														
Nombre total de gènes : 49														

Tableau 4. Ensemble des protéines trouvées par les criblages par double hybride dans la levure en utilisant comme appâts RipH1, RipH2 et RipH3.

2. Criblage par double hybride dans la levure des protéines de tomates interagissant avec les effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3

Pour déterminer le rôle qu'ont les effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3 après leur injection dans les cellules des plantes, le choix a été fait d'utiliser la méthode du criblage par double hybride dans la levure. Cette méthode permet de trouver des interactions protéines-protéines et est utilisée de manière fiable depuis plus de 20 ans (Chien et al., 1991). Nous avons utilisé pour ce travail une solution proposée par l'entreprise hybrigenics. Les protéines « appât », dans notre cas les effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3 sont fusionnés avec un « binding domain » LexA qui va se lier au promoteur d'un gène rapporteur d'autotrophie de la levure à l'histidine, et la banque d'ADNc est fusionnée à un « activating domain » AD-GAL4 (Ptashne, 1988). Lorsque la protéine de la banque interagit avec la protéine appât, la transcription a lieu et une colonie de levure peut pousser sur un milieu minimum de culture sans histidine.

La banque d'ADNc de tomate a été construite à partir d'ARN de racines de tomates (car l'infection par *R. pseudosolanacearum* commence par les racines) et ayant été inoculées ou non par la souche GMI1000 de *R. pseudosolanacearum* et une souche mutée dans son SST3 pour prendre en compte que certains effecteurs peuvent potentiellement diminuer l'expression de gènes de la plante hôte. La variété de tomates ayant été choisie est M82. La rétrotranscription a été faite avec des oligonucléotides dégénérés : les domaines des gènes clonés ne sont pas forcément des gènes pleine longueur et cela diminue les biais causés par la différence de taille des ARN.

Une estimation du nombre de clones de levures criblés a été faite par étalement d'un échantillon du criblage total sur un milieu non sélectif à l'histidine pour confirmer que le nombre de levures criblées était supérieur à 10 milions. Les clones positifs ont ensuite été prélevés puis amplifiés par PCR, séquencés et le résultat analysé par un pipeline bioinformatique (développé par Sebastien Carrere) pour trouver le gène de tomate correspondant. Les résultats complets des protéines trouvées sont disponibles dans le tableau 4. En tout 49 protéines ont été trouvées interagissant avec RipH1 et 37 protéines avec RipH2. Pour l'effecteur RipH3, un deuxième criblage en plus de celui fait dans notre laboratoire a été réalisé directement par la société hybrigenics à partir de la même banque d'ADNc.

Nom donné	Identifiant du gène Solyc	Annotation de la protéine par SolGenomics	Trouvé dans le criblage par	RipH3 : note du criblage par hybrigenics
TOM1	Solyc04g007000.1.1	RAV1	RipH1	
TOM2	Solyc05g009790.1.1	RAV2	RipH1	
TOM3	Solyc01g095400.2.1	Kelch like protein 6	RipH1	
TOM4	Solyc02g091800.2.1	BHLH transcription factor	RipH1	
TOM5	Solyc08g015690.2.1	Late embryogenesis abundant protein	RipH1 et RipH3	D
TOM6	Solyc07g047770.2.1	Histidine kinase 1	RipH3	A
TOM7	Solyc09g065630.2.1	TIFY 4B	RipH3	A
TOM8	Solyc11g010230.1.1	Histone H3	RipH3	Non trouvé
TOM9	Solyc11g062010.1.1	Chromodomain helicase DNA binding protein 3	RipH3	A
TOM10	Solyc08g014000.2.1	Lipoxygenase	RipH3	D
TOM11	Solyc05g050600.2.1	Dynamin 2	RipH3	B
TOM12	Solyc01g008190.2.1	Os05g0304100 protein (fragment)	RipH3	D
TOM13	Solyc03g121360.1.1	Charged multivesicular body protein 1b	RipH2	
TOM14	Solyc10g081030.1.1	Nascent polypeptide-associated complex alpha subunit-like protein	RipH2	
TOM15	Solyc01g066050.2.1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5	RipH2	
TOM16	Solyc03g120880.2.1	Nucleoporin NUP53	RipH2	
TOM17	Solyc04g009440.2.1	NAC domain protein	RipH2	
TOM18	Solyc06g060140.2.1	Kinesin like protein	RipH2	
TOM19	Solyc11g017470.1.1	NAC domain protein IPR003441	RipH2	

Tableau 5. 19 protéines de tomates trouvées par criblage par double hybride dans la levure à partir de RipH1, RipH2 et RipH3 comme appât. La dernière colonne donne les résultats du criblage par RipH3 effectué par l'entreprise hybrigenics, la note donnée (de A à D) est une note de confiance dans l'interaction déterminée par des critères inconnus par nous (A représentant la meilleure interaction trouvée dans un système de double hybride dans la levure).

Huit protéines en commun ont été trouvées interagissant avec RipH3 dans les deux criblages (surlignées en jaune dans le tableau 4), 14 protéines ont été trouvées seulement dans le criblage réalisé au laboratoire et 24 protéines ont été trouvées seulement dans le criblage réalisé par hybrigenics.

Pour garder uniquement les interactions les plus fortes, il a été fait le choix de sélectionner seulement des protéines ayant été trouvés trois fois ou plus lors du criblage (ou des deux criblages dans le cas de RipH3). Nous avons choisi de renommer ces protéines avec un identifiant « TOM » pour une meilleure organisation et mise en commun des résultats. En tout, 19 protéines ont été sélectionnés selon ce critère, et ont été étudiées plus en détail dans la suite de ce travail de thèse (tableau 5).

2.1. Base de données « effectorK »

Les expérimentations de criblage par double hybride dans la levure génèrent une quantité importante de données, qui sont parfois difficile à interpréter et à visualiser. De plus, il est difficile de partager ces données avec d'autres équipes : il serait pourtant intéressant de pouvoir mettre en commun les données d'interaction des effecteurs avec leurs « cibles » protéiques dans différentes plantes. Le travail de Mukhtar et al., 2011 a montré qu'il pouvait y avoir des protéines centrales de l'immunité des plantes ciblées par plusieurs effecteurs appartenant à différents pathogènes. Pour pouvoir rassembler à la fois nos données d'interactions trouvées par doubles hybride dans la levure et celles déjà publiées dans la littérature, la base de données « effectorK » a été mise en place dans le laboratoire avec l'équipe bio-informatique. Cette base de données permet de rassembler ces informations, de les visualiser et de les partager entre plusieurs équipes.

Les données obtenues grâce au criblage par double hybride dans la levure de la banque d'ADNc de tomate par RipH1, RipH2 et RipH3 ont été importées dans cette base de données. Des criblages par d'autres effecteurs ont aussi été réalisés dans l'équipe : l'objectif est d'obtenir une cartographie globale des interactions des effecteurs de *R. pseudosolanacearum* avec les protéines de tomate (travail de thèse de Cyrus Sabbagh). L'information sur le niveau de confiance des interactions est aussi rapportée dans cette base de données : les interactions pour lesquelles plus de trois clones de levure ont été trouvées ou celles qui ont été vérifiées en double hybride matriciel (Cyrus Sabbagh) ont un niveau de confiance plus fort. Des données provenant de sources extérieures ont elles aussi été ajoutées : les liens d'orthologie des différentes protéines avec des protéines d'organismes différents, et des données d'interactions qui ont été publiées (travail de collecte de donnée bibliographie de

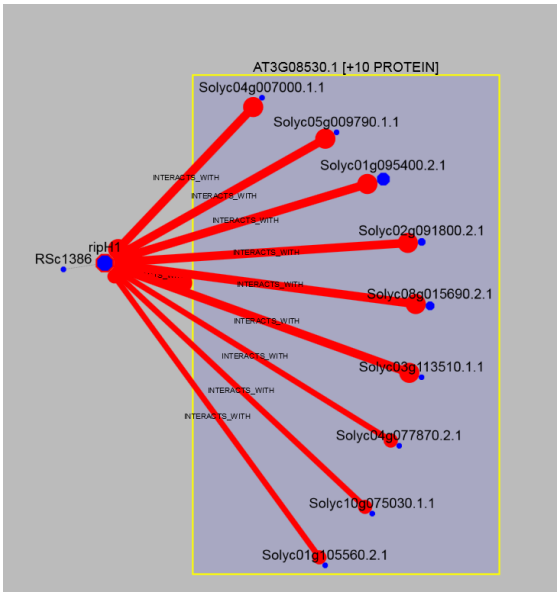


Figure 20a. Visualisation des protéines interagissant avec l'effecteur RipH1 grâce à la base de données effectorK.

La protéine à partir de laquelle a été construit l'arbre d'interaction est représentée avec un liseré rouge. La taille des hexagones bleus par lesquels sont représentés les protéines est proportionnelle au nombre d'interactions avec cette protéine dans la base de données totale. L'épaisseur des liens rouge représente un meilleur niveau de confiance dans l'interaction. La boite jaune regroupe des interactions du même type que celle de la protéine dont le nom est marqué en haut de la boite.

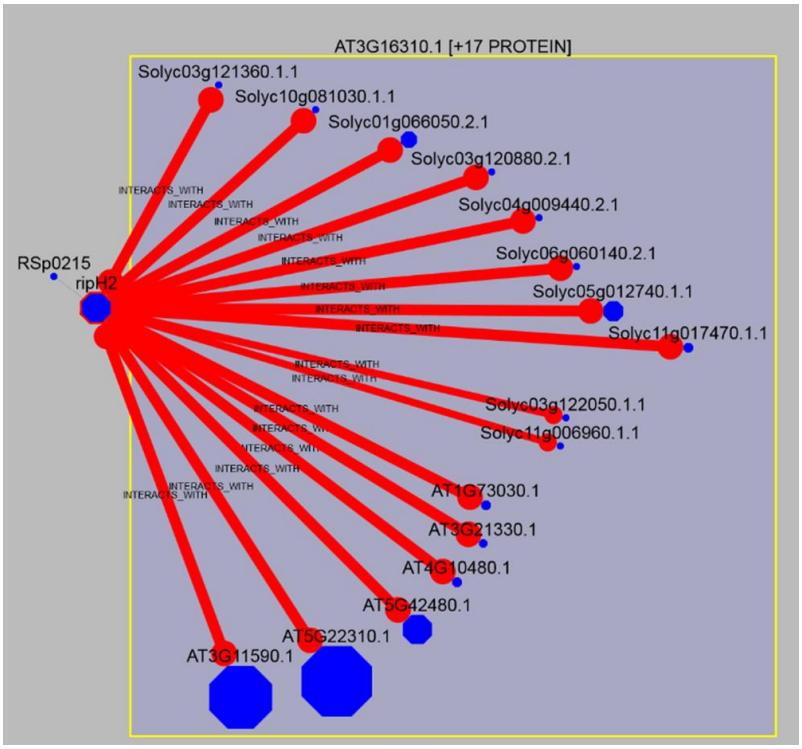


Figure 20b. Visualisation des protéines interagissant avec l'effecteur RipH2 grâce à la base de données effectorK.

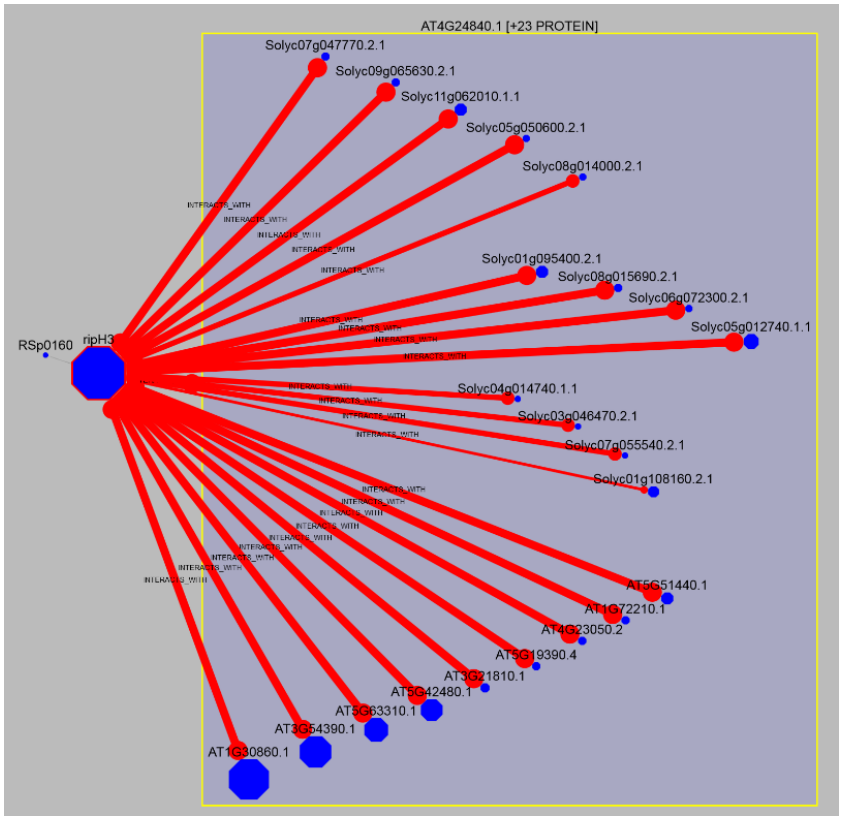


Figure 20c. Visualisation des protéines interagissant avec l'effecteur RipH3 grâce à la base de données effectorK.

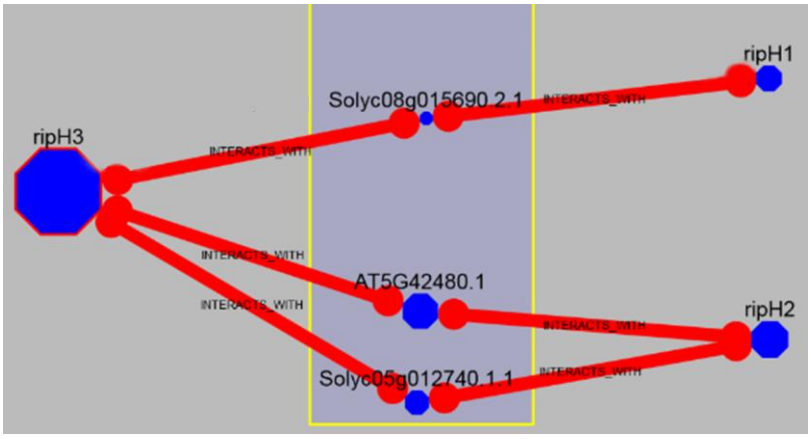
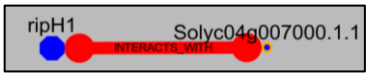
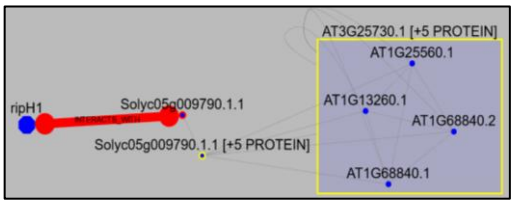


Figure 20d. Visualisation des protéines interagissant avec plus d'un effecteur parmi RipH1, RipH2 et RipH3.

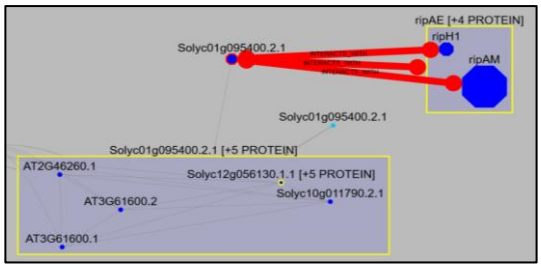
TOM1



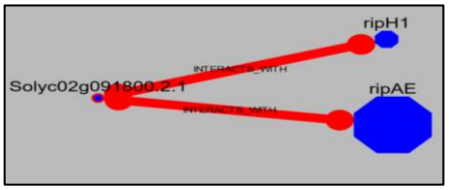
TOM2



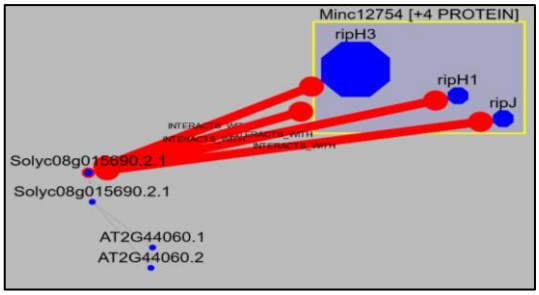
TOM3



TOM4



TOM5



TOM6

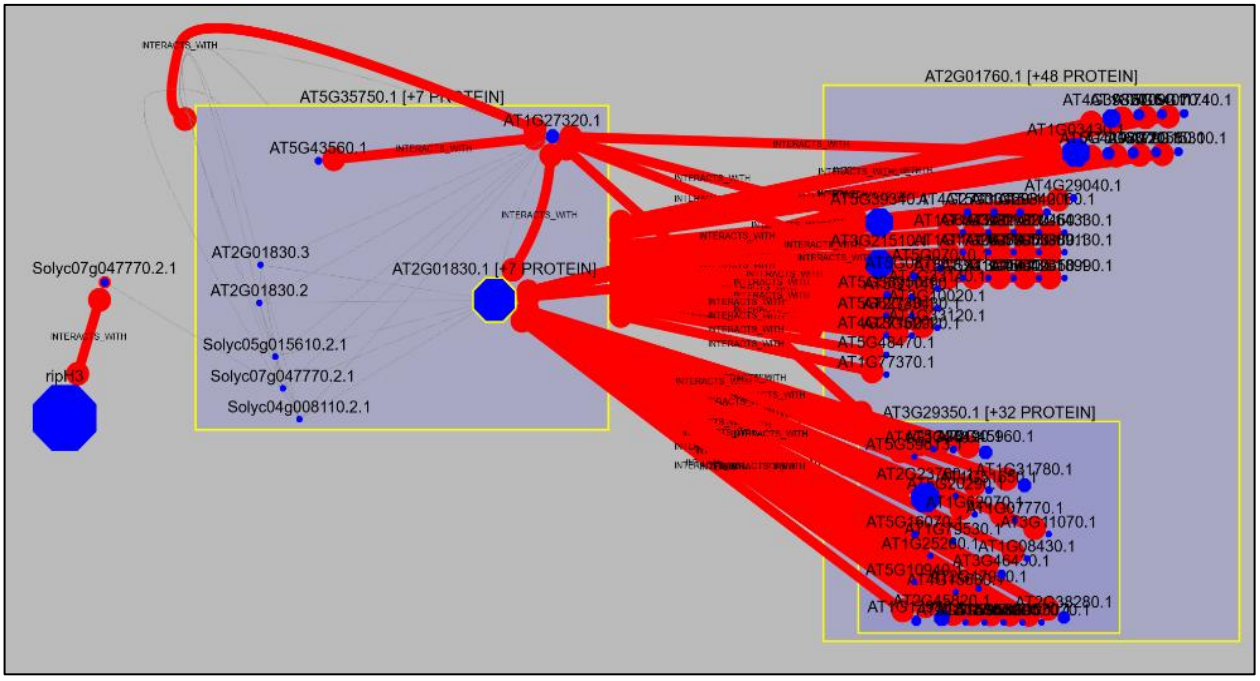
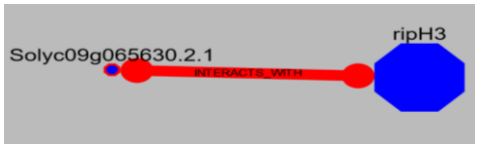
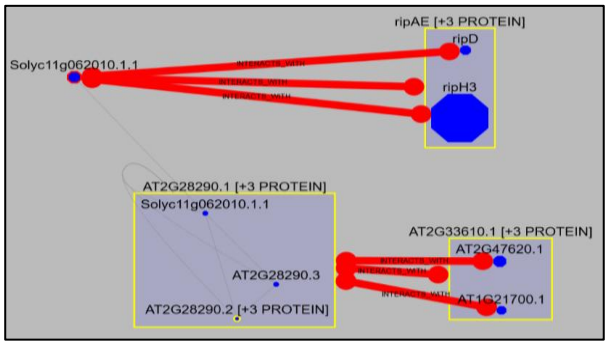


Figure 21 (1/3). Visualisation dans la base de données effectorK des protéines TOM, de leurs orthologues dans *A. thaliana* et de leurs interactions. Seulement les interactions de distance 1 sont montrées (les protéines apparaissant sur la figure ont un lien direct avec soit une protéine TOM soit un de ses orthologues). La protéine à partir de laquelle a été construit l'arbre d'interaction est représentée avec un liseré rouge. La taille des hexagones bleus par lesquels sont représentés les protéines est proportionnelle au nombre d'interactions avec cette protéine dans la base de données totale. L'épaisseur des liens rouge représente un meilleur niveau de confiance dans l'interaction. La boite jaune regroupe des interactions du même type que celle de la protéine dont le nom est marqué en haut de la boite. Les liens d'orthologie sont représentés en traits fin gris. Ici (TOM5), Minc12754 est un effecteur du nematode *Meloidogyne incognita* dont l'interaction a été trouvée par des collaborateurs.

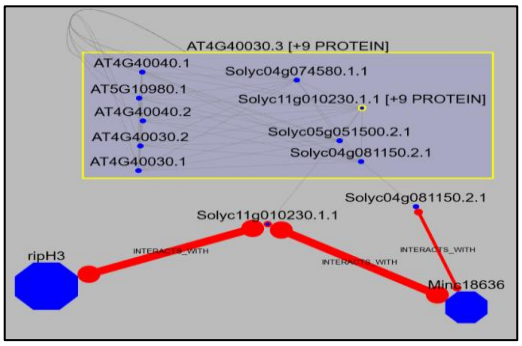
TOM7



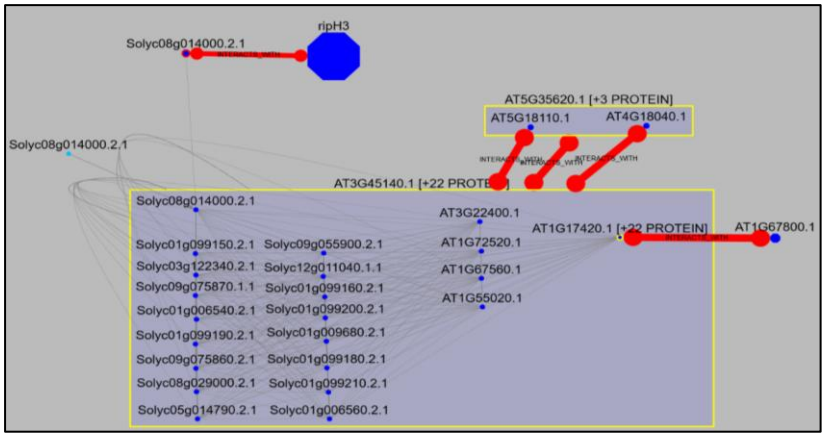
TOM9



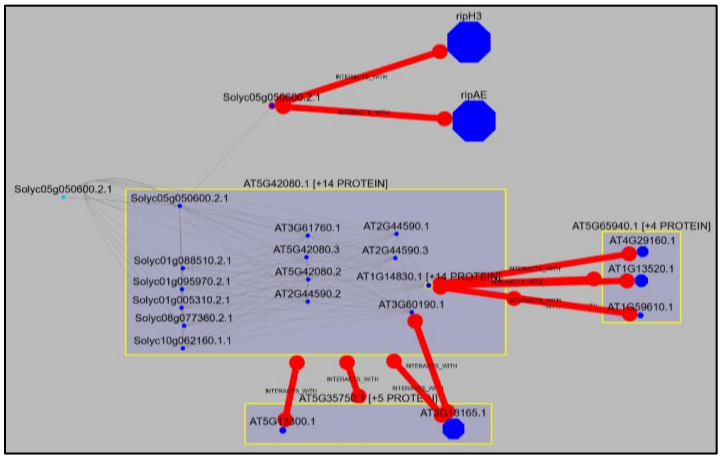
TOM8



TOM10



TOM11



TOM12

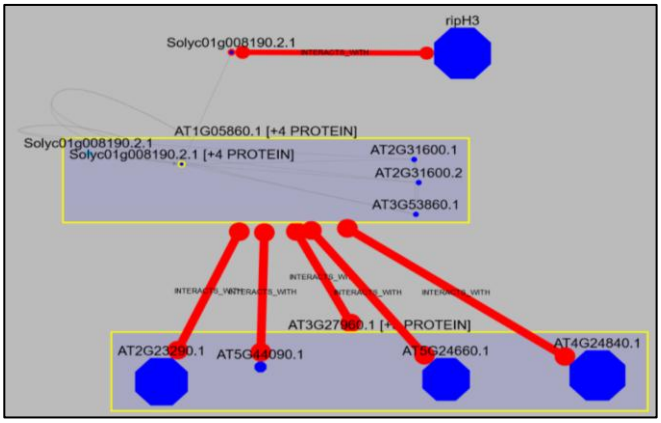


Figure 21 (2/3). Visualisation dans la base de données effectorK des protéines TOM, de leurs orthologues dans *A. thaliana* et de leurs interactions. Seulement les interactions de distance 1 sont montrées (les protéines apparaissant sur la figure ont un lien direct avec soit une protéine TOM soit un de ses orthologues). La protéine à partir de laquelle a été construit l'arbre d'interaction est représentée avec un liseré rouge. La taille des hexagones bleus par lesquels sont représentés les protéines est proportionnelle au nombre d'interactions avec cette protéine dans la base de données totale. L'épaisseur des liens rouge représente un meilleur niveau de confiance dans l'interaction. La boite jaune regroupe des interactions du même type que celle de la protéine dont le nom est marqué en haut de la boite. Les liens d'orthologie sont représentés en traits fin gris.

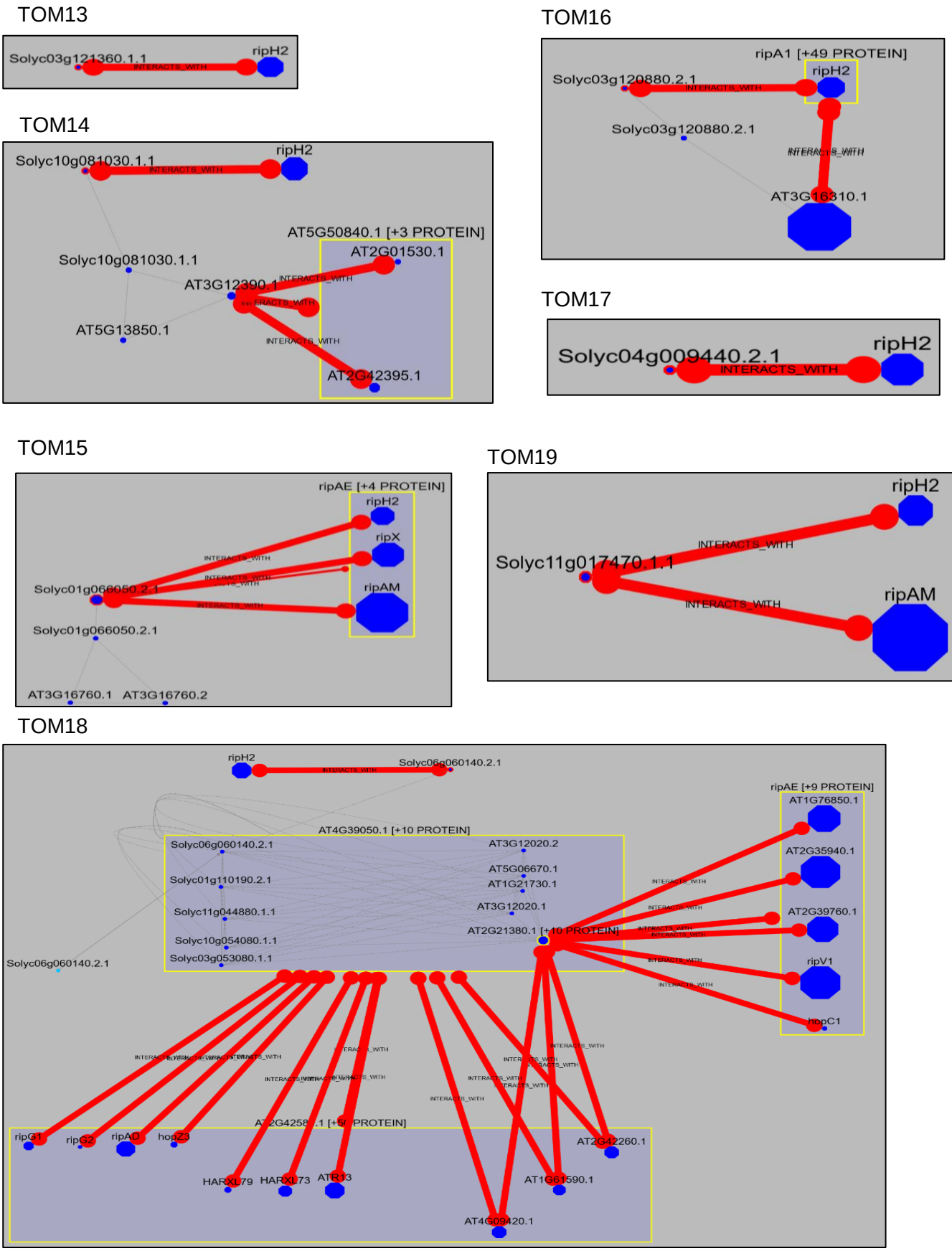


Figure 21 (3/3). Visualisation dans la base de données effectorK des protéines TOM, de leurs orthologues dans *A. thaliana* et de leurs interactions. Seulement les interactions de distance 1 sont montrées (les protéines apparaissant sur la figure ont un lien direct avec soit une protéine TOM soit un de ses orthologues). La protéine à partir de laquelle a été construit l'arbre d'interaction est représentée avec un liseré rouge. La taille des hexagones bleus par lesquels sont représentés les protéines est proportionnelle au nombre d'interactions avec cette protéine dans la base de données totale. L'épaisseur des liens rouge représente un meilleur niveau de confiance dans l'interaction. La boite jaune regroupe des interactions du même type que celle de la protéine dont le nom est marqué en haut de la boite. Les liens d'orthologie sont représentés en traits fin gris. Ici, les protéines dont le nom commence par « HARXL » sont des effecteurs de l'oomycète *Hyaloperonospora arabidopsidis.* HopC1 et HopZ3 sont des effecteurs de la bactérie *Pseudomonas syringae.*

Manuel Gonzalez-Fuente, également en thèse dans l'équipe). Certaines publications en particulier ont permis d'apporter de nombreuses données : des données sur les interactions entre les différentes protéines d'*Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011) et des données sur l'interaction d'effecteurs provenant de plusieurs pathogènes de *Arabidopsis thaliana* avec les protéines de cette plante (Mukhtar et al., 2011; Weßling et al., 2014). Enfin, des données de criblage par double hybride dans la levure en utilisant des effecteurs de *R. pseudosolanacearum* et de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* contre une banque provenant de *A. thaliana* ont été ajoutées (travail de Manuel Gonzalez-Fuente)

Les figures 20a, 20b et 20c représentent les interactions des effecteurs RipH avec les protéines « cibles » visualisées sur la base de données effectorK. Sur la figure 20d, on peut voir qu'une protéine interagit à la fois avec RipH1 et RipH3 et Solyc08g015690.2.1 (TOM5). Deux protéines interagissent à la fois avec RipH2 et RipH3 : At5g42480.1 et Solyc05g012740.1.1. Cette dernière protéine qui est une NLR avec domaine intégré DUF3542 (« Domain of Unknown Function ») a été trouvée interagissant avec plus de 11 effecteurs lors de tests matriciels dans le cadre d'un projet de l'équipe visant à tester les interactions de domaines intégrés de NLR avec des effecteurs (travail de David Landry). Les domaines intégrés dans les protéines de type NLR pourraient jouer un rôle « d'appât » pour détecter les effecteurs *(Sarris et al., 2016)*. Le fait que ce domaine interagisse avec autant d'effecteurs différents est probablement un artefact du système par double hybride dans la levure et non une interaction ayant lieu in vivo, des expérimentations supplémentaires sur cette protéine ne sont pas prévues pour le moment.

L'ensemble des interactions des protéines « TOM » et de leurs orthologues dans *A. thaliana* visualisé dans la base de données effectorK est représenté sur la figure 21. Certaines protéines ont beaucoup plus d'interactions documentées que d'autres. Plusieurs orthologues de TOM6 dans *A. thaliana* semblent être des protéines centrales au niveau d'interactions avec d'autres protéines de cette plante, ce qui pourrait être en lien avec l'activité kinase de ces protéines. Quant à TOM18, cette protéine est une kinésine : la figure 21 montre les kinésines orthologues dans la tomate et *A. thaliana* et les interactions décrites avec ces protéines dans la bibliographie.

Une autre particularité qui peut être remarquée est l'interaction avec RipAE de très nombreuses protéines cibles. Ces interactions ont été montrées par Cyrus Sabbagh lors de test matriciels de double hybride dans la levure d'effecteurs de *R. pseudosolanacearum* contre des cibles trouvées lors de criblages par certains de ces effecteurs. RipAE semble interagir avec un très grand nombre de protéines

Gènes clonées des protéines cibles de RipH1, RipH2 et RipH3			
Nom TOM	**Plasmide codon stop**	**Plasmide codon final GGA**	**Notes**
TOM1	pAM100	pAM96	
TOM2	pAM25		
TOM3	pAM119	pAM118	
TOM4	pAM26	pAM97	
TOM5	pAM29	pAM30	
TOM6	pAM31	pAM32	
TOM7		pAM28	
TOM9	pAM27	pAM135	Domaine interagissant avec RipH3 - Acides aminés 325 à 774
TOM9	pAM141	pAM151	Domaine interagissant avec RipD - Acides aminés 1 à 202
TOM9	pAM139	pAM140	Acides aminés 1 à 774
TOM13	pAM64	pAM90	
TOM14	pAM65		
TOM15	pAM70		
TOM17	pAM66	pAM67	
TOM19	pAM69	pAM68	

Tableau 6. Plasmides des gènes TOM clonés et disponibles au laboratoire.

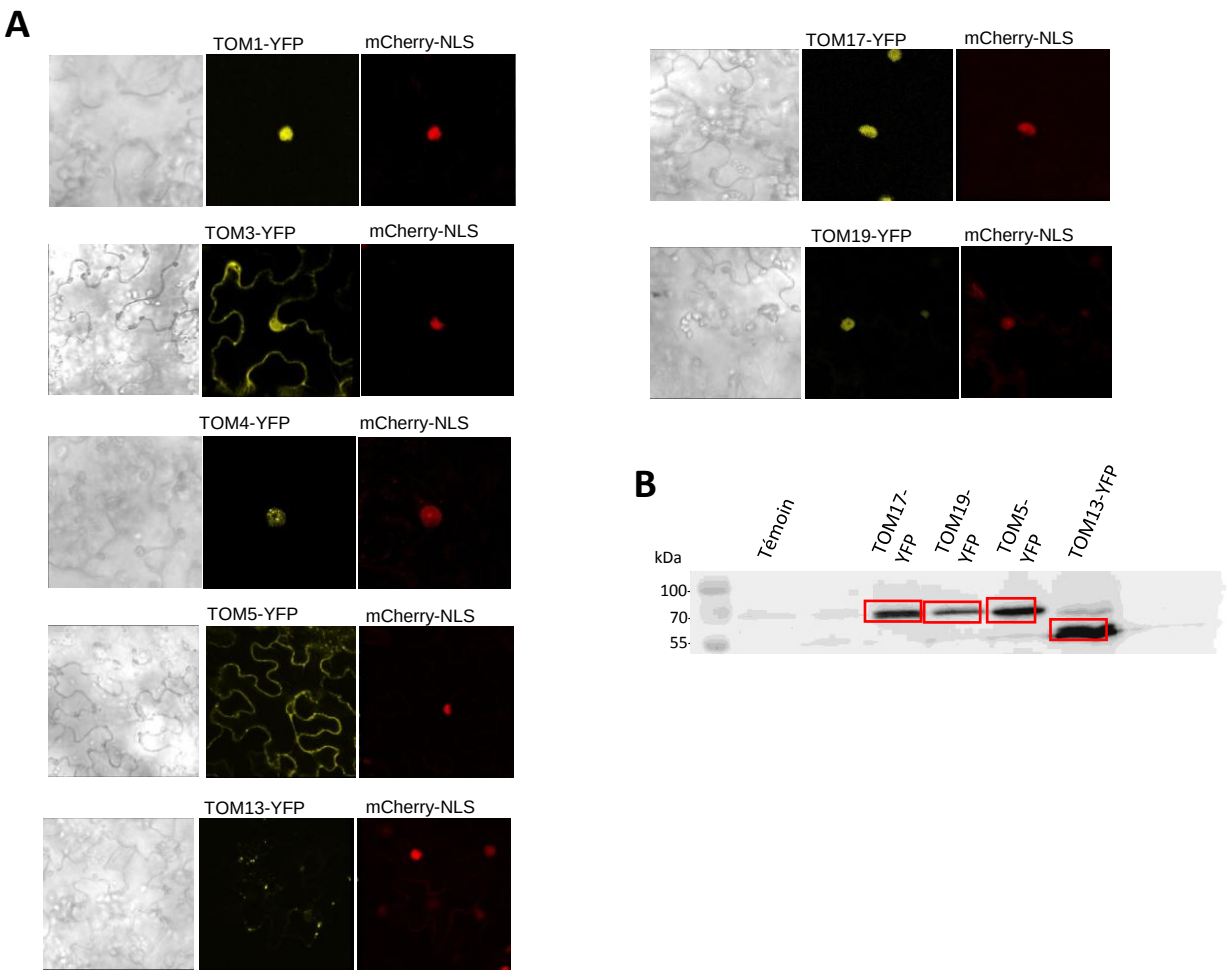


Figure 22. Localisation de certaines protéines TOM (A) Visualisation au microscope confocal des protéines TOM1, TOM3, TOM4, TOM5, TOM13, TOM17 et TOM19 fusionnées à la YFP. Une construction contrôle mCherry-NLS a été transformée en même temps. (B) Un western blot a été réalisé pour vérifier l'expression de TOM17, TOM19, TOM5 et TOM13.

testées, ce qui pourrait être un artefact pour cet effecteur de la méthode de double hybride dans la levure.

2.2. Clonage des cibles dans des vecteurs gateway

Pour pouvoir étudier le rôle des cibles dans différentes expérimentations, celles-ci ont été clonées dans des vecteurs de type gateway, avec un codon stop ou non. L'ensemble des vecteurs disponibles est récapitulé dans le tableau 6. Le cas de TOM9 est particulier : la longueur du gène (8001 paires de base soit 2667 acides aminés) l'a rendu difficile à cloner. Il a donc été fait le choix de ne cloner que certaines sous parties. TOM9 interagit avec RipH3 et RipD sur des domaines différents de la protéine, ces deux domaines ont donc été clonés pour pouvoir continuer à étudier ces interactions. Les informations sur ce gène sont plus détaillées dans la sous-partie de ce travail de thèse qui lui est dédié. Le domaine regroupant ces deux domaines a lui aussi été cloné (tableau 6).

2.3. Étude de la localisation des protéines interagissant avec les effecteurs RipH

Comme vu précédemment, les effecteurs RipH sont localisés dans le noyau et le cytoplasme des cellules végétales. Nous avons donc décidé d'étudier la localisation de leurs cibles pour avoir plus d'informations sur celles-ci et avoir une idée d'où l'interaction pourrait avoir lieu dans les cellules, tout en sachant que des re-localisations peuvent avoir lieu après ou lors de l'interaction.

Les protéines TOM1, TOM3, TOM4, TOM5, TOM13, TOM17 et TOM19 ont été clonées en fusion avec la YFP. Nous avons transformé ces constructions dans des feuilles de *N. benthamiana* et observé leur localisation avec un microscope confocal. Une construction contrôle mCherry-NLS a été transformée en même temps pour pouvoir comparer la localisation de ces protéines avec la localisation dans le noyau. TOM1, TOM4, TOM17 et TOM17 ont une localisation nucléaire (figure 22). TOM3 semble avoir une localisation nucléaire et cytoplasmique (figure 22). TOM5 semble avoir une localisation cytoplasmique. La fluorescence de TOM13 est répartie en petits îlots dans la cellule qui semblent correspondre à des vésicules (figure 22), ce qui correspondrait à l'annotation de la protéine par Sol genomics : « charged multivesicular bodies protein 1b ».

2.4. Choix de la stratégie pour étudier le rôle des protéines cibles trouvées par double hybride dans la levure

Nous avons sélectionné 19 protéines de tomate à partir du criblage par double hybride dans la levure (protéines dites « cibles » des effecteurs RipH). Sur un pas de temps correspondant à la réalisation d'une thèse, il n'a pas été possible d'étudier en profondeur les rôles de chacune de ces cibles, c'est pourquoi il a fallu garder les protéines cibles les plus « intéressantes ». Nous avons fait le choix de faire le plus rapidement possible des expérimentations pour chercher des phénotypes associés à ces cibles et à l'infection par *R. pseudosolanacearum* plutôt que de chercher à valider les interactions par d'autres méthodes que le double hybride dans la levure. Le raisonnement derrière ce choix est que les risques de faux négatifs existent dans de nombreuses méthodes de recherche d'interactions protéine-protéine, et restreindre tôt les cibles à celles dont l'interaction est « validée » aurait amené un risque supplémentaire. Par la suite, deux méthodes pour tester les interactions protéine protéines ont tout de même été testées sur les cibles jugées les plus intéressantes (liées à un phénotype de réponse différentielle à *R. pseudosolanacearum*), mais malheureusement elles n'ont pas permis de confirmer les interactions.

Pour étudier les phénotypes liés aux cibles des RipH et à leur rôle potentiel lors de l'infection par *R. pseudosolanacearum*, nous avons choisi d'étudier les orthologues de ces cibles dans d'autres plantes que la tomate. En effet, les outils génétiques disponibles sont plus développés dans d'autres systèmes. Ci-après, trois méthodes ayant été utilisées pour chercher un phénotype à partir d'un grand nombre de cibles sont décrites. Dans la suite de ce travail les résultats obtenus pour des cibles en particulier (TOM2, TOM3 et TOM9) sont détaillés dans leur propre sous partie.

2.5. Étude du « ROS burst » après surexpression des cibles TOM dans *N. benthamiana*

Nous avons vu précédemment que l'expression des RipH diminuait le « ROS burst » induit par le peptide Flg22. Nous avons voulu tester si la surexpression des cibles TOM avait un effet sur ce « ROS burst », ce qui pourrait signifier que ces protéines sont en lien avec la défense des plantes.

TOM1, TOM2, TOM3, TOM4, TOM13, TOM15, TOM17 et TOM19 ont été surexprimées dans des feuilles de *N. benthamiana*. Le « ROS burst » semble diminué dans deux répétitions sur trois lorsque

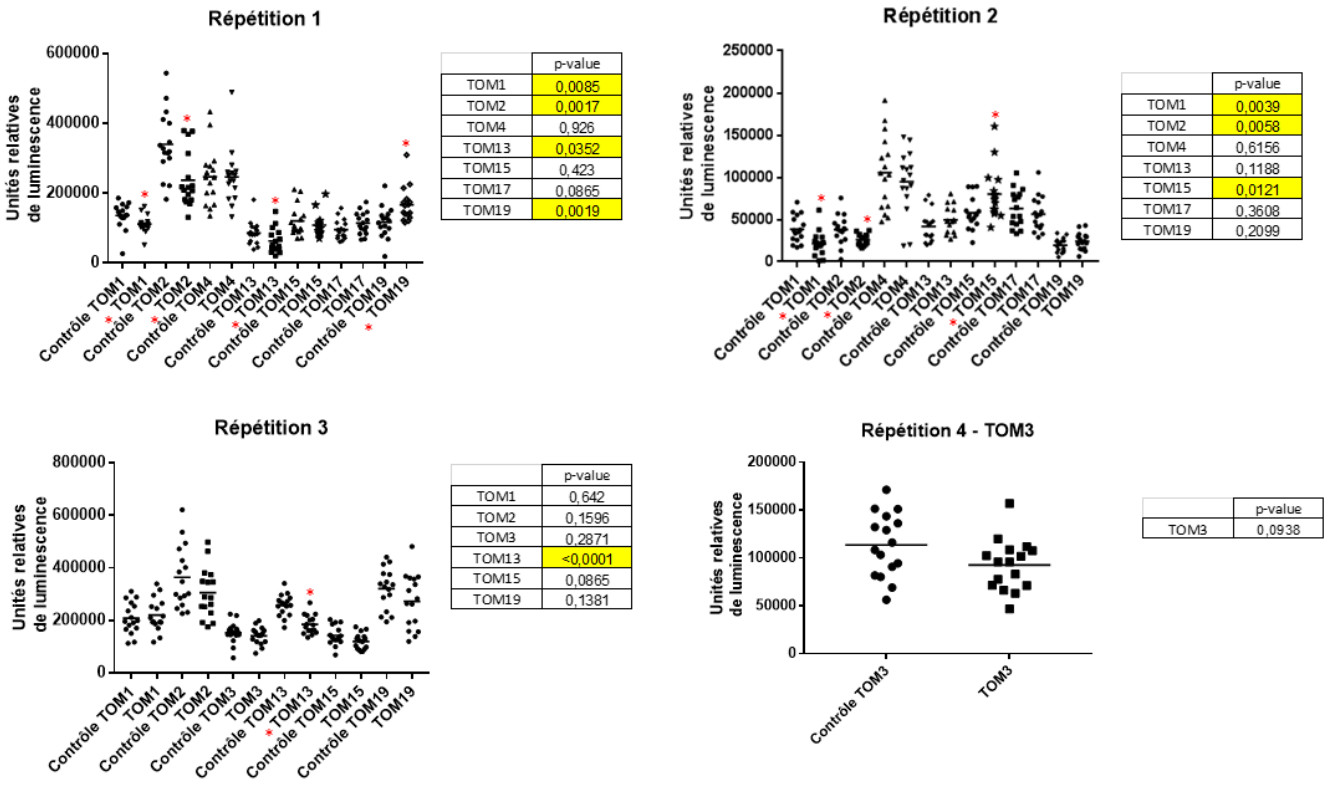


Figure 23. Unités relatives de luminescence après induction des ROS par Flg22 dans des feuilles de *N. benthamiana* exprimant certaines protéines TOM. Chaque point représente la somme sur une heure de la luminescence mesurée pour chaque échantillon. Certaines données ne suivant pas une distribution normale (test de Shapiro-Wilk), un test de Mann-Whitney a été effectué pour chaque paire de conditions contrôle/protéine TOM pour tester si les moyennes étaient différentes. Les étoiles rouges représentent un test indiquant une différence significative. Les p-values sont indiquées sur la droite des graphes.

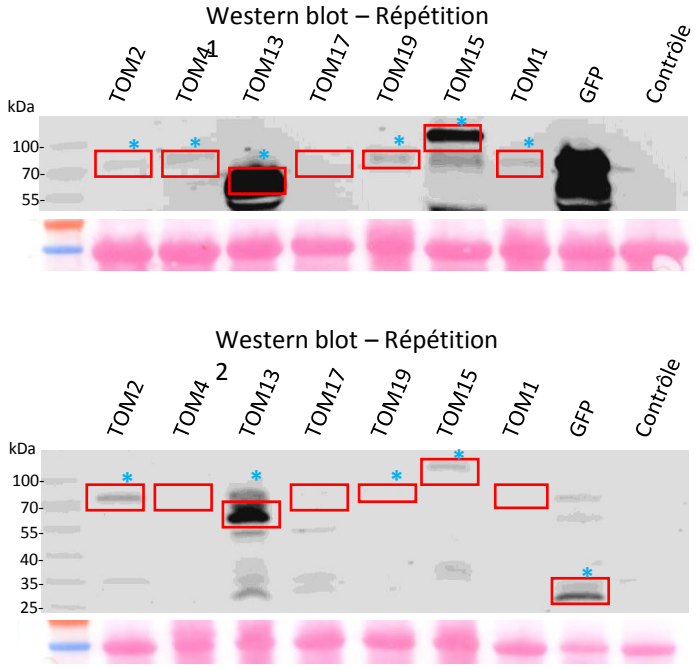


Figure 24. Western blot montrant l'expression des protéines fusionnées à la GFP. Les protéines TOM1, TOM2, TOM4, TOM17 et TOM19 semblent moins exprimées. Les étoiles bleues indiquent que les protéines sont détectables.

Gène TOM	Gène *A. thaliana*	Notation	Référence du mutant
TOM2	At1g25560	*tem1* mutant 1	SALK_029626C
TOM2	At1g25560	*tem1* mutant 2	SALK_097513C
TOM2	At1g68840	*atrav2*	SALK_070847C
TOM3	At3g61600	*atTOM3-1* mutant 1	SALK_044446C
TOM3	At3g61600	*atTOM3-1* mutant 2	SALK_033448C
TOM3	At2g46260	*atTOM3-2*	SALK_145146C
TOM5	At2g44060	*atTOM5* mutant 1	SALK_092816C
TOM5	At2g44060	*atTOM5* mutant 2	SALK_019156C
TOM14	At3g12390	*atTOM14-1* mutant 1	SALK_086658C
TOM14	At3g12390	*atTOM14-1* mutant 2	SALK_066829C
TOM14	At5g13850	*atTOM14-2*	SALK_092796C
TOM16	At3g16310	*atTOM16* mutant 1	SALK_084252C
TOM16	At3g16310	*atTOM16* mutant 2	SALK_024167C
TOM18	At1g21730	*atTOM18-1*	SALK_057300C
TOM18	At3g12020	*atTOM18-2* mutant 1	SALK_038138C
TOM18	At3g12020	*atTOM18-2* mutant 2	SALK_048182C

Tableau 7. Liste des mutants dans *Arabidopsis thaliana* des orthologues de gènes TOM qui ont été phénotypés.

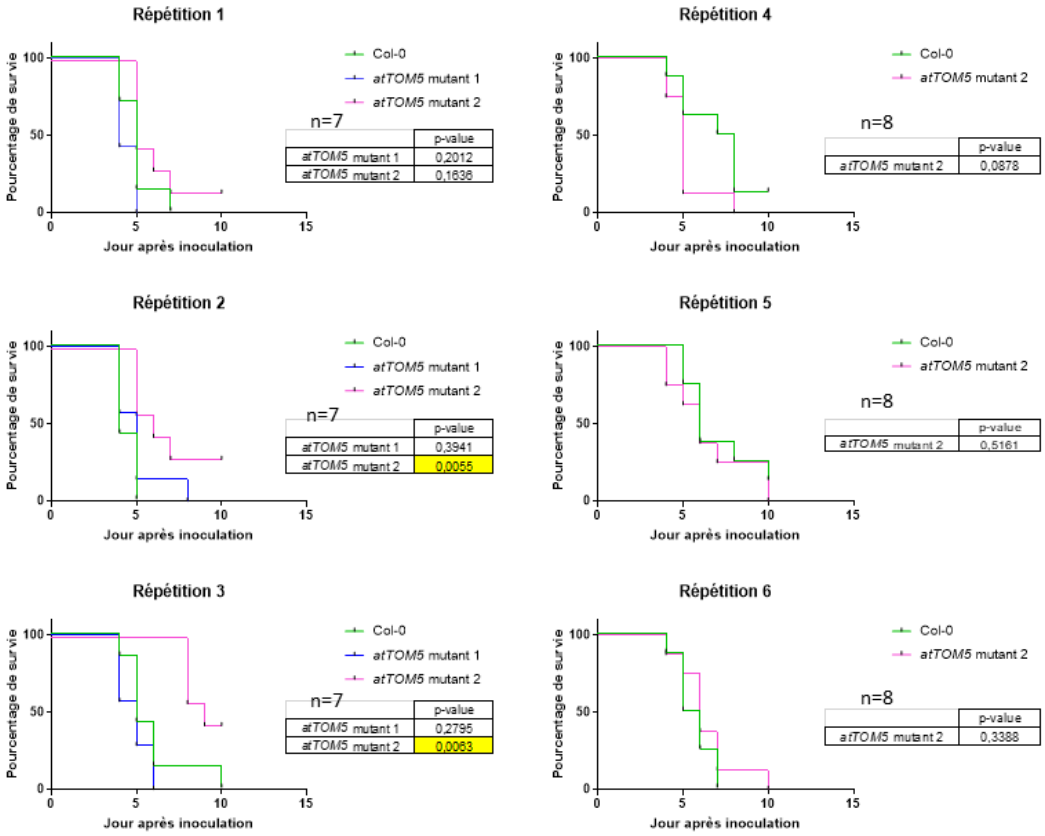


Figure 25. Phénotypage après inoculation par arrosage de la souche GMI1000 de *R. pseudosolanacearum* de mutants dans les orthologues de TOM5 chez *Arabidopsis thaliana*. La p-value a été calculée par un test de Mantel-Cox (Remigi et al., 2011).

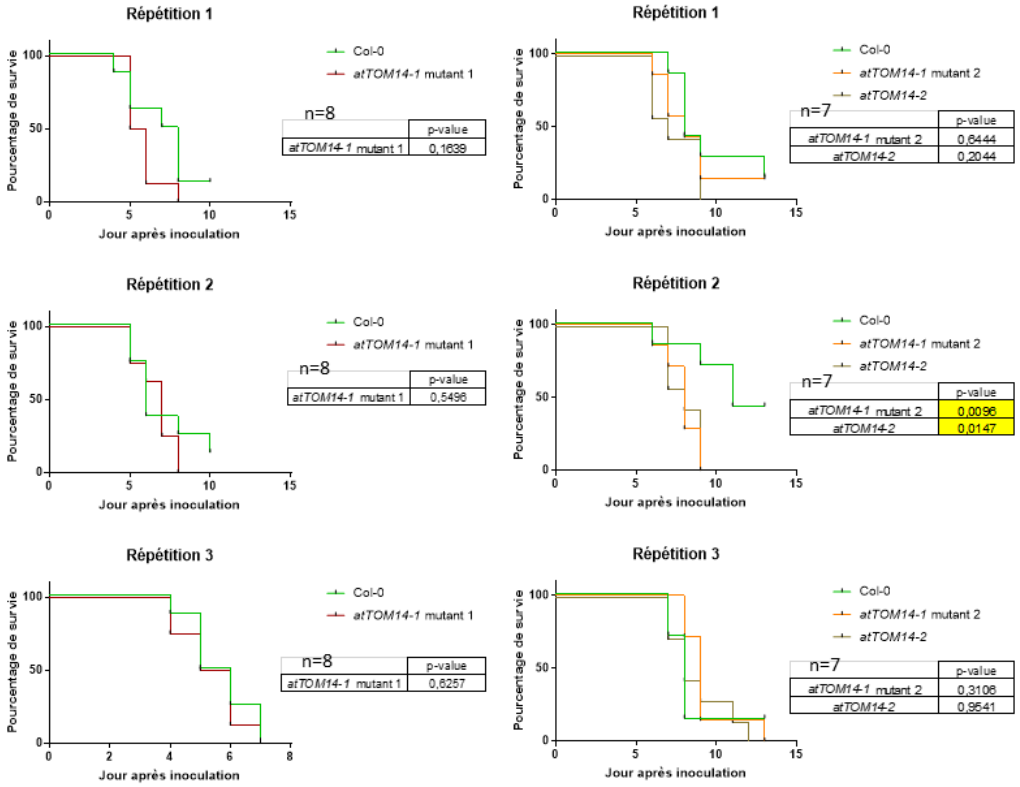


Figure 26. Phénotypage après inoculation par arrosage de la souche GMI1000 de *R. pseudosolanacearum* de mutants dans les orthologues de TOM14 chez *Arabidopsis thaliana*. La p-value a été calculée par un test de Mantel-Cox (Remigi et al., 2011).

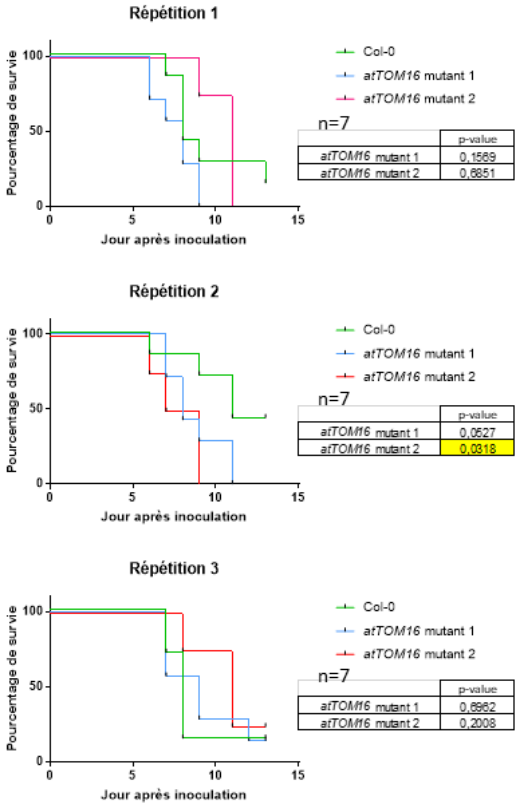


Figure 27. Phénotypage après inoculation par arrosage de la souche GMI1000 de *R. pseudosolanacearum* de mutants dans les orthologues de TOM16 chez *Arabidopsis thaliana*. La p-value a été calculée par un test de Mantel-Cox (Remigi et al., 2011).

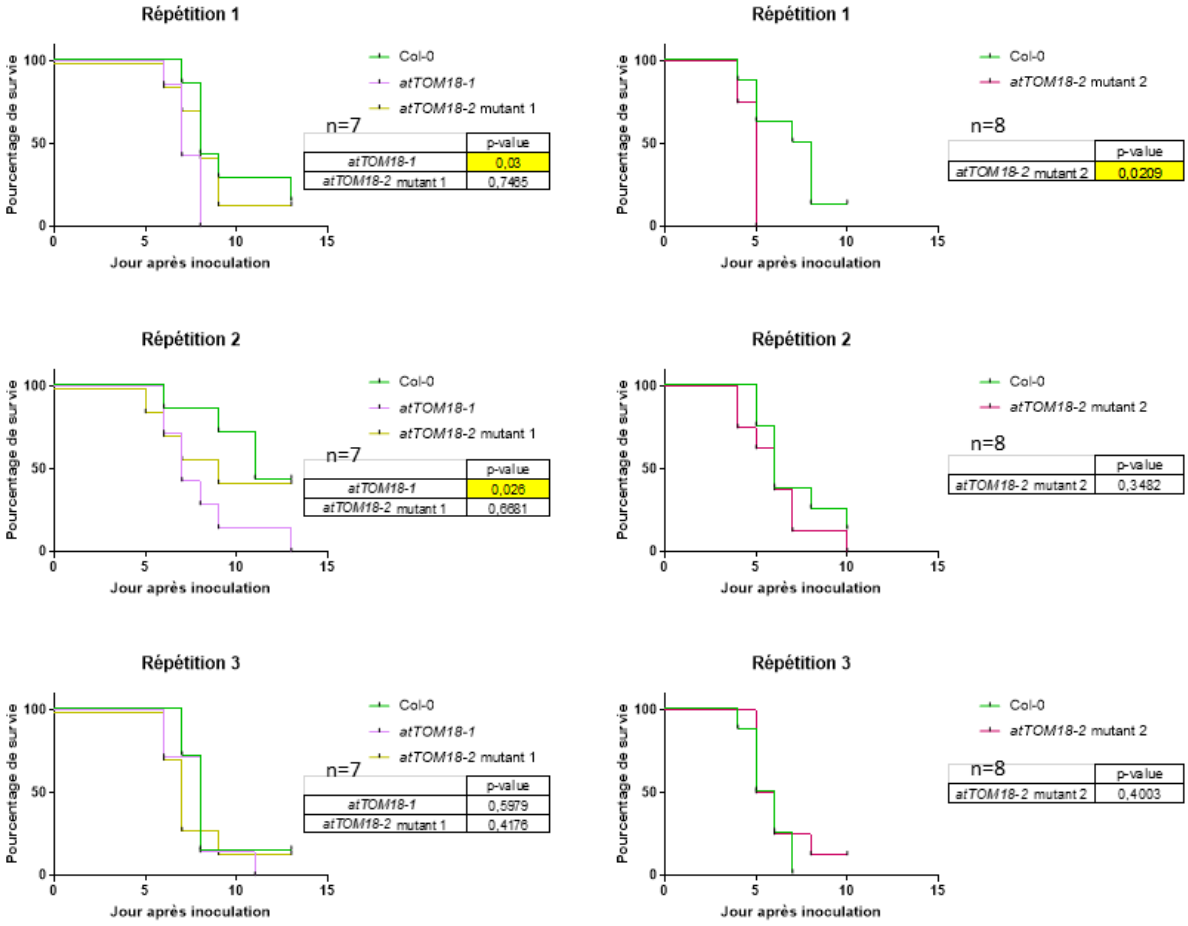


Figure 28. Phénotypage après inoculation par arrosage de la souche GMI1000 de *R. pseudosolanacearum* de mutants dans les orthologues de TOM18 chez *Arabidopsis thaliana*. La p-value a été calculée par un test de Mantel-Cox (Remigi et al., 2011).

Gène TOM	Gènes orthologues N. benthamiana	Nom de la construction
TOM1	Niben101Scf16806g00003.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM1*
TOM1	Niben101Scf06059g01001.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM1*
TOM1	Niben101Scf10767g03010.1 (gène 3)	VIGS *NbTOM1*
TOM2	Niben101Scf00872g03005.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM2*
TOM2	Niben101Scf03150g06002.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM2*
TOM3	Niben101Scf00503g10005.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM3-1*
TOM3	Niben101Scf00470g07002.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM3-2*
TOM3	Niben101Scf09241g00006.1 (gène 3)	VIGS *NbTOM3-2*
TOM7	Niben101Scf00831g00002.1	VIGS *NbTOM7*
TOM6	Niben101Scf03000g00011.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM6*
TOM6	Niben101Scf18703g00007.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM6*
TOM9	Niben101Scf01749g02007.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM9*
TOM9	Niben101Scf00672g04011.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM9*
TOM13	Niben101Scf00206g01004.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM13*
TOM13	Niben101Scf08211g03007.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM13*
TOM15	Niben101Scf06913g00002.1	VIGS *NbTOM15*
TOM16	Niben101Scf01374g06016.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM16*
TOM16	Niben101Scf09363g00006.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM16*
TOM17	Niben101Scf01818g03019.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM17*
TOM17	Niben101Scf15435g00012.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM17*
TOM18	Niben101Scf02197g02002.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM18*
TOM18	Niben101Scf03710g11004.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM18*
TOM19	Niben101Scf00799g00011.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM19*
TOM19	Niben101Scf03028g01011.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM19*

Tableau 8. Récapitulatif des gènes orthologues des gènes TOM dans *N. benthamiana* pour lesquels des constructions VIGS ont été réalisés

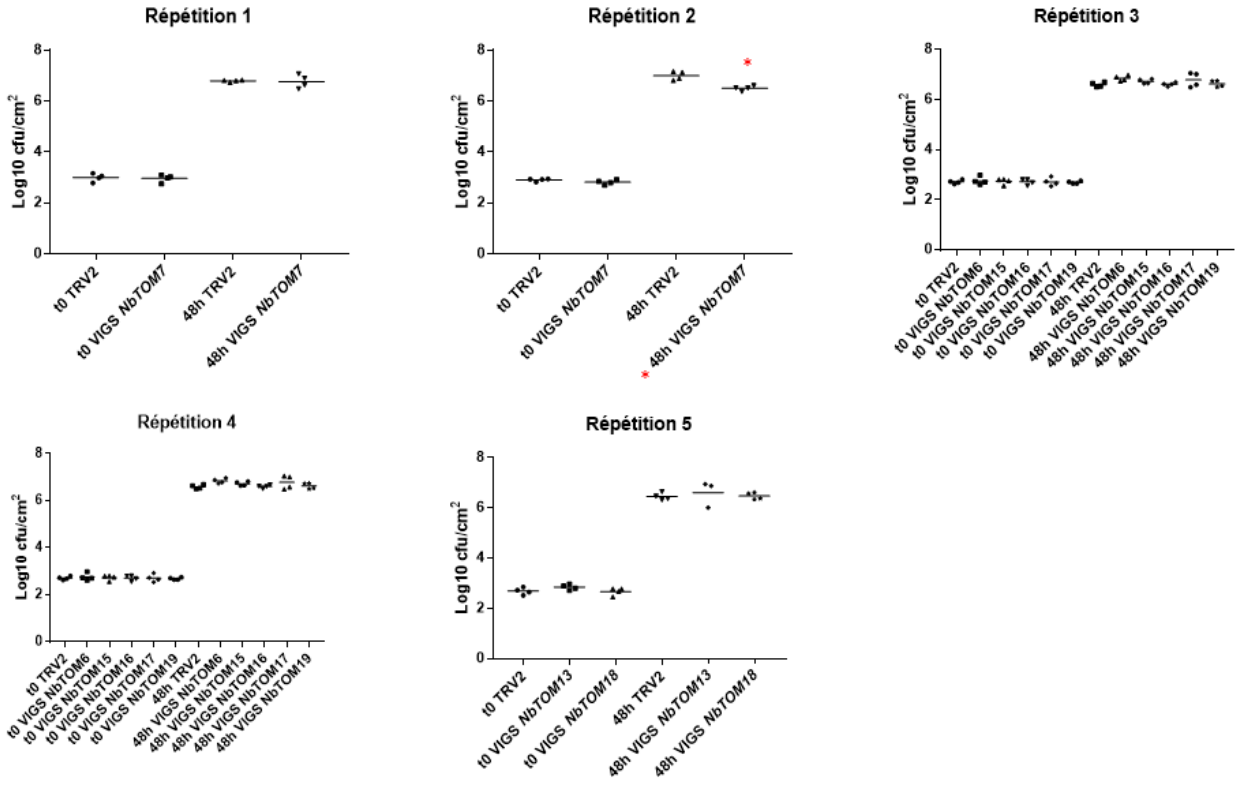


Figure 29. **Multiplication bactérienne après infiltration dans des feuilles de *N. benthamiana* dont l'expression de gènes cibles a été diminuée.** Une construction contrôle avec le TRV2 sans gène inséré (notée TRV2) a été utilisée.
Une suspension bactérienne à 10^4 cfu/ de GMI1000Δ*ripP1*Δ*ripAA* a été infiltrée dans les feuilles. Des disques foliaires ont été prélevés immédiatement pour le t0 puis 48h après.
Un test statistique de Mann-Whitney a été réalisé pour les comparaisons deux à deux dans les répétitions 1 et 2 et un test de Kruskal-Wallis a été réalisé pour les comparaisons multiples de moyennes dans les répétitions suivantes. Les étoiles rouges montrent les conditions pour lesquelles les tests indiquent un résultat significativement différent.

TOM1, TOM2 et TOM13 sont surexprimées (figure 23). Il semble être augmenté mais seulement dans une des répétitions effectuées par l'expression de TOM15 et TOM19 (figure 23). L'expression des protéines a été vérifiée par Western blot : TOM13 et TOM15 semblent être plus exprimées. TOM17 semble très peu ou pas exprimée. L'expression de TOM1, TOM2, TOM4, TOM19 est faible mais détectable et varie en fonction des répétitions (figure 24). Dans l'ensemble, ces résultats sont difficiles à interpréter et nécessiteraient des répétitions supplémentaires pour pouvoir conclure sur l'effet de la surexpression des cibles TOM sur le « ROS burst ».

2.6. Recherche des orthologues des gènes TOM dans *Arabidopsis thaliana* et phénotypage des mutants disponibles

Nous avons cherché par orthoMCL les gènes de *Arabidopsis thaliana* orthologues des gènes TOM trouvés par criblage par double hybride dans la levure. Nous avons commandé des graines des mutants T-DNA dans ces gènes lorsqu'ils étaient disponibles. L'insertion du T-DNA a été vérifiée par PCR. La liste des mutants ayant été validés par PCR et phénotypés après inoculation par arrosage de GMI1000 est disponible dans le tableau 7.

Pour les orthologues de TOM5, TOM14, TOM16 et TOM18 il ne semble pas y avoir de phénotype différentiel en comparant avec l'écotype Col-0 (figures 25, 26, 27 et 28).

Les données concernant le phénotypage des orthologues de TOM2, TOM3 et TOM9 sont détaillées dans les sous parties de cette thèse consacrées plus en détails à chacun de ces gènes.

2.7. Recherche des orthologue des gènes TOM dans *Nicotiana benthamiana* et phénotypage lorsque l'expression de ces gènes a été diminuée par VIGS

La méthode du VIGS (« Virus induced gene silencing ») permet de diminuer l'expression de gènes dans les plantes et est efficace dans *Nicotiana benthamiana* (Lu et al., 2003). Des constructions VIGS ayant pour but de diminuer l'expression des orthologues de TOM1, TOM2, TOM3, TOM6, TOM7, TOM9, TOM13, TOM15, TOM16, TOM17, TOM18 et TOM19 ont été réalisées (voir tableau 8). Les résultats concernant TOM1, TOM2, TOM3 et TOM9 sont détaillés dans les sous parties de cette thèse dédiées à ces gènes.

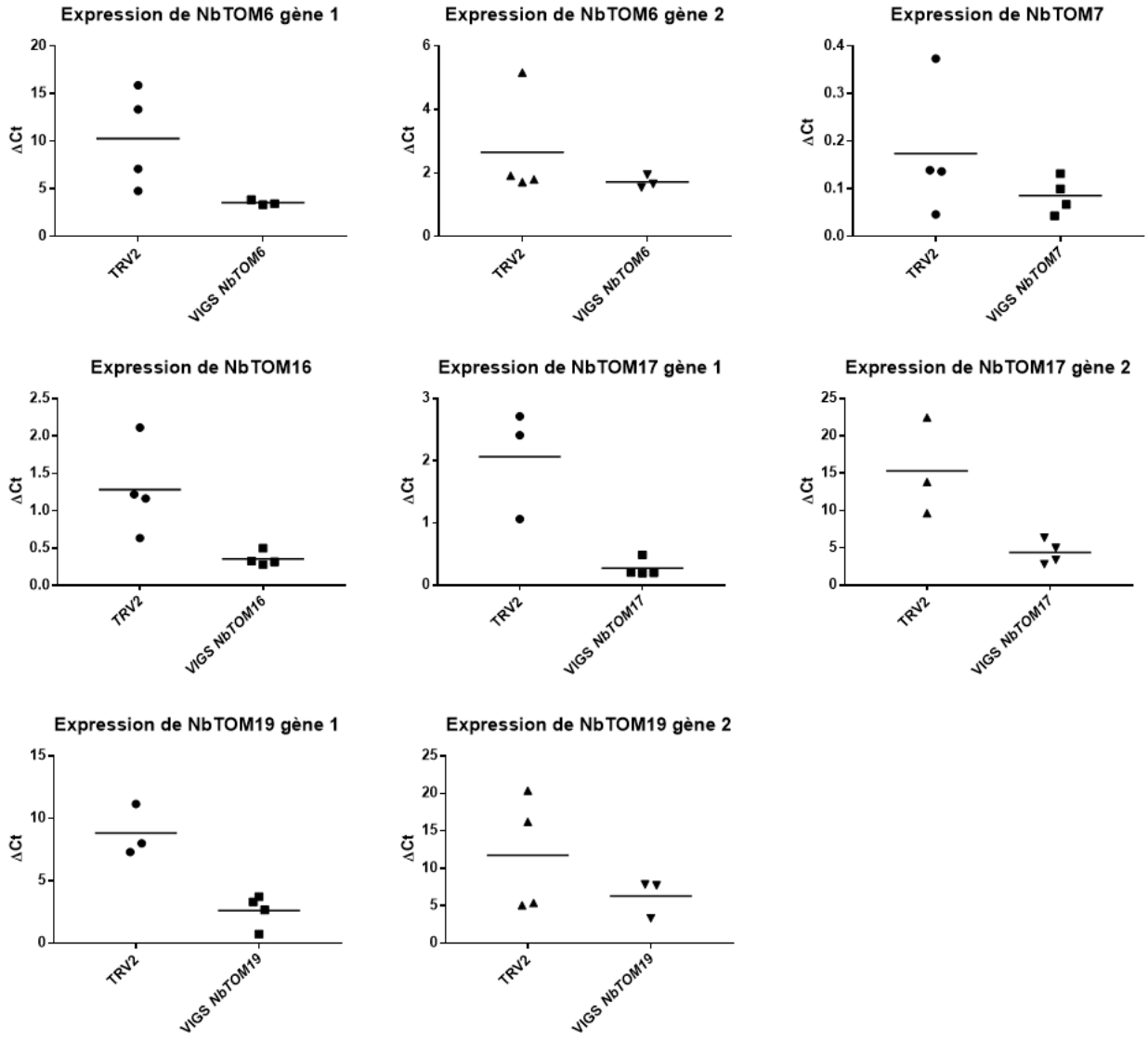


Figure 30. Expression de certains gènes de *N. benthamiana* orthologues des TOM dans des plantes transformées transitoirement par une construction VIGS ou une construction TRV2 contrôle.
L'expression n'est significativement différente sur aucun des gènes testés dû au faible nombre de répétitions mais il semble y avoir une tendance à la diminution après transformation transitoire par une construction VIGS visant à diminuer l'expression des gènes.

Pour déterminer si les orthologues des gènes cibles TOM dans *N. benthamiana* jouaient un rôle lors de l'infection par *R. pseudosolanacearum*, nous avons mesuré la multiplication bactérienne de la souche GMI1000Δ*ripP1*Δ*ripAA* capable d'infecter cette espèce (Poueymiro et al., 2009) après infiltration dans les feuilles. Aucune différence de multiplication n'a été mesurée pour les constructions VIGS *NbTOM6*, VIGS *NbTOM13*, VIGS *NbTOM15*, VIGS *NbTOM16,* VIGS *NbTOM17*, VIGS *NbTOM18* et VIGS *NbTOM19* (figure 29). Une légère diminution de la multiplication bactérienne est observée pour la construction VIGS *NbTOM7* mais dans une seule répétition (figure 29).

L'efficacité de la diminution de l'expression des gènes a été mesurée par qRT-PCR pour les constructions VIGS *NbTOM6*, VIGS *NbTOM7*, VIGS *NbTOM16,* VIGS *NbTOM17* et VIGS *NbTOM19* (figure 30).

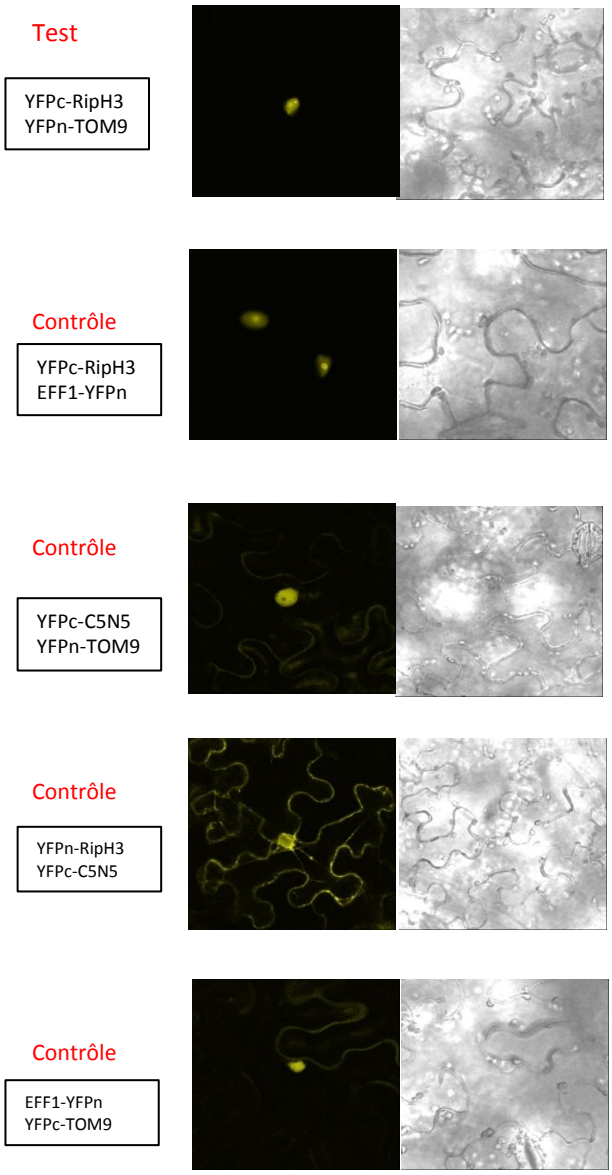


Figure 31. Visualisation au microscope confocal de feuilles de *N. benthamiana* transformées transitoirement par des constructions split-YFC. La fluorescence est visualisée en jaune. L'ensemble des paires de constructions testés émet un signal fluorescent.

3. Méthodes testées pour étudier les interactions protéines-protéines

Il arrive que des méthodes permettant d'étudier les interactions protéines-protéines donnent des résultats faux positifs ou faux négatif. Pour cette raison nous avons cherché à confirmer les interactions trouvées par criblage par double hybride dans la levure par d'autres méthodes. Malheureusement les différentes méthodes testées ont mené à des déconvenues : dans notre cas elles n'étaient pas fiables ou utilisables car les contrôles négatifs se sont révélés positifs. Ces résultats sont tout de même présentés ici.

1.1. Méthode du « Split-YFP »

La méthode du « split-YFP » consiste à récréer une protéine de YFP fluorescente par complémentation de ses deux parties N et C terminal chacune fusionnées à une protéine d'une paire de protéines testés pour leur interaction. Il existe cependant un risque de créer des faux positifs avec cette méthode, car il arrive que les deux parties de la YFP s'assemblent indépendamment des protéines avec lesquelles elles sont fusionnées (Horstman et al., 2014). Il est donc particulièrement important d'inclure des contrôles négatifs dans chaque expérimentation.

Cette méthode nous a toutefois paru intéressante car elle permet à la fois de confirmer une interaction et de visualiser l'endroit dans les cellules où elle a lieu. Nous l'avons donc testée pour étudier l'interaction de RipH3 et du domaine de TOM9 qui interagit avec cet effecteur en double hybride dans la levure. Les contrôles utilisés nous ont été fournis par une équipe travaillant sur les effecteurs de nématodes et leurs cibles dans la tomate (Michaël Quentin). L'effecteur du nématode *Meloidogyne incognita* EFF1 fusionné avec YFPn interagit avec la protéine de tomate C5N5 fusionné avec YFPc. Nous avons donc testé les différentes permutations possibles avec nos deux interacteurs putatifs RipH3 et TOM9. Après transformation, l'ensemble des paires de protéines a montré un signal de fluorescence (figure 31). Nous ne pouvons donc pas utiliser cette méthode dans notre cas car il n'est pas possible de distinguer des faux positifs de réelles interactions.

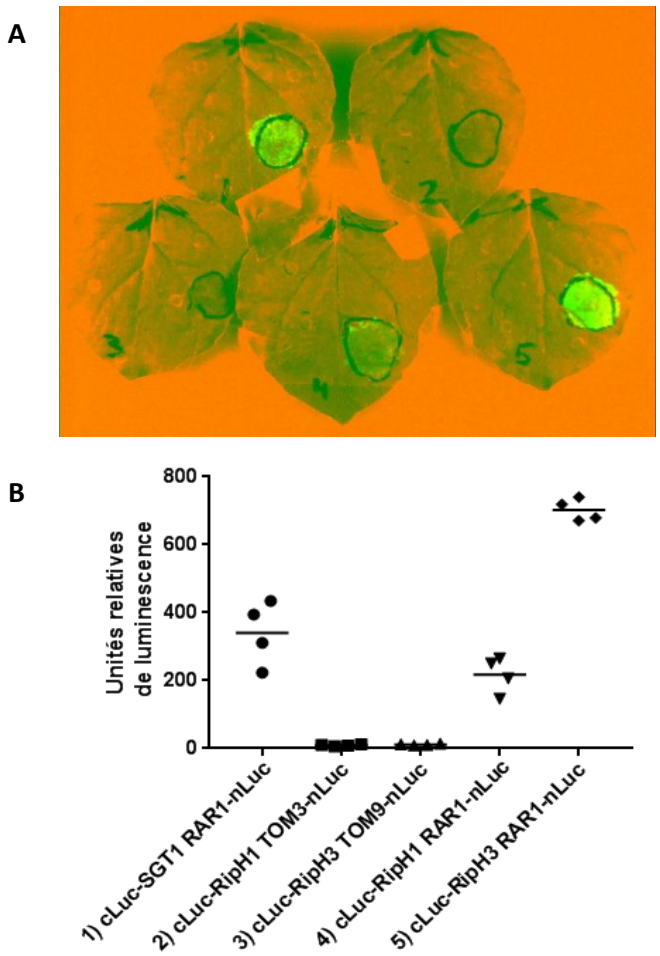


Figure 32. Luminescence émise après infiltration de luciférine dans des feuilles de *N. benthamiana* transformées transitoirement par des constructions de split luciférase. A) Photo combinée des feuilles en champ clair et de la luminescence émise visualisée en vert
B) Luminescence mesurée à partir de quatre disques prélevés sur ces feuilles.
La paire cLuc-SGT1 / RAR1-nLuc est un contrôle positif avec deux protéines ayant été décrites comme interagissant. Les contrôles négatifs ont été fait en permutant les paires mais émettent un signal de luminescence.

1.2. Méthode du « Split luciferase »

La méthode du « split luciferase » pour étudier les interactions protéines-protéines consiste à fusionner deux protéines d'intérêt avec chacun des domaines N et C terminal de la luciférase. Si les deux protéines interagissent, cela permet de recréer une enzyme luciférase fonctionnelle qui peut catalyser la luciférine et ainsi produire de la luminescence détectable (Takeaki Ozawa et al., 2001).

Nous avons choisi de tester cette méthode pour tester si les interactions RipH1/TOM3 et RipH3/TOM9 trouvées par criblage par double hybride dans la levure pouvaient être confirmées. Des plasmides contrôle nous ont été fournis par un collaborateur (Alberto Macho), avec les deux domaines de la luciférase fusionnés aux protéines RAR1 et SGT1 de *A. thaliana* dont l'interaction est connue. Ces protéines sont impliquées dans l'immunité (Azevedo et al., 2002).

De la luminescence a pu être détectée après infiltration de luciférine dans des feuilles transformées avec cLuc-SGT1 et RAR1-nLuc. Aucune luminescence n'a été détectée dans les feuilles transformées par cLuc-RipH1 et TOM3-nLuc ni par celles transformées par cLuc-RipH3 et TOM9-nLuc. De façon surprenante, de la luminescence a pu être observée dans des feuilles transformées par cLucRipH1 / cLucRipH3 et RAR1-nLuc supposé être un contrôle négatif (figure 32). Un western blot a été fait mais il ne permet pas de conclure sur l'expression des protéines car les résultats sont peu clairs (bruit de fond très important). La luminescence observée dans les feuilles transformées par cLucRipH1 / cLucRipH3 et RAR1-nLuc montre soit que cette méthode peut mener à des faux positifs et est donc inutilisable dans notre cas soit que RipH1 et RipH3 interagissent avec RAR1. RAR1 étant une protéine importante de l'immunité des plantes, cette possibilité n'est pas à exclure et nécessiterai des expérimentations et contrôles supplémentaires.



Figure 33. **RipH1 interagi avec TOM1 (A) et TOM2 (B) en double hybride dans la levure.** On trouve 5 gènes orthologues à TOM2 dans *Arabidopsis thaliana*.

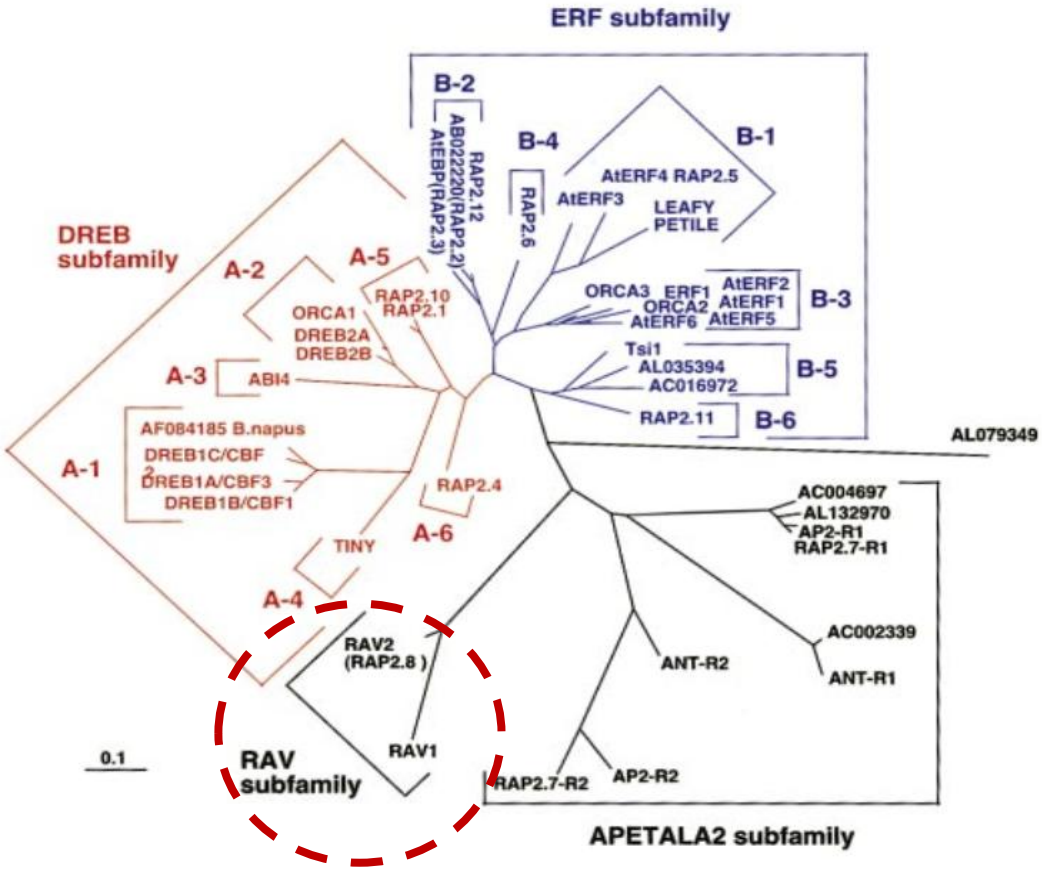


Figure 34, **de Sakuma et al. 2002. Arbre phylogénétique de protéines de la famille AP2.**

4. TOM1/RAV1 et TOM2/RAV2 sont des facteurs de transcriptions interagissant avec RipH1

Lors du criblage par double hybride dans la levure, les gènes de tomates Solyc04g007000.1.1 (noté TOM1) et Solyc05g009790.1.1 (noté TOM2) ont été trouvés comme interagissant avec l'effecteur RipH1 (figure 33).

4.1. TOM1/RAV1 et TOM2/RAV2 appartiennent à la famille de facteurs de transcription AP2/EREBP

Ces deux gènes codent pour des protéines appartenant à une famille de facteur de transcription, appelée RAV (« related to ABI3/VP1 »), une sous famille des facteurs de transcription AP2/EREBP. La famille de facteurs de transcription AP2/EREBP est une des plus grandes familles de gènes chez les plantes, avec 144 gènes identifiés dans *Arabidopsis thaliana* (Riechmann et al., 2000). Les gènes de cette famille sont classés en 4 sous familles : la sous famille des APETALA2 (AP2) avec des gènes qui contiennent deux domaines AP2, celle des RAV avec des gènes qui contiennent un domaine AP2 et un domaine B3, celle des DREB et celle des ERF qui contiennent chacun un seul domaine AP2 (Sakuma et al., 2002 – figure 34). Initialement, la famille AP2 a été décrite comme présente seulement chez les plantes mais des gènes apparentés ont été trouvés chez une cyanobactérie *Trichodesmium erythraeum,* un cilié *Tetrahymena thermophila* et des virus *Enterobacteria phage Rb49* et *Bacteriophage Felix 01* (Magnani et al., 2004).

La spécificité des domaines de liaison à l'ADN des facteurs de transcription de la famille des AP3/EREBP a été étudiée, la séquence principale permettant la liaison à l'ADN de certains DREB est la boite DRE A/GCCGAG (Sakuma et al., 2002), celle de certains ERF est la boite GCC : AGCCGCC (Ohme-Takagi and Shinshi, 1995). Certains ERFs peuvent aussi se lier à la boite DRE sous différentes conditions de stress abiotique (Cheng et al., 2013). Pour ce qui est des RAV, la spécificité de liaison d'un gène, RAV1, d'*Arabidopsis thaliana* a été décrite. Ce gène possède deux domaines de liaison AP2 et B3 qui se lient respectivement à un motif CAACA et un motif CACCTG, avec une plus forte affinité de liaison si les deux domaines sont présents (Kagaya et al., 1999).

Certains facteurs de transcriptions contenant un domaine AP2 ont été décrit comme pouvant se lier à l'ADN sur des sites différents, par exemple Rap2.4a un ERF d'*Arabidopsis thaliana*, se lie à un motif CACGCGATTC (Shaikhali et al., 2008). Un autre ERF d' *A. thaliana*, AtRAP2.2 peut se lier à un promoteur contenant le motif ATCTA (Welsch et al., 2007).

Pour une meilleure visualisation de ces informations, elles sont récapitulées sur un schéma figure 35.

4.2. Présence d'un domaine putatif de répression transcriptionnelle et interaction de certains gènes de la famille AP2/EREBP avec les protéines TOPLESS

Il existe un domaine de répression transcriptionnelle associé au domaine B3 de liaison à l'ADN, domaine présent dans les RAV (Ikeda and Ohme-Takagi, 2009). La séquence de ce domaine BRD (« B3 repression domain ») est L/VRLFGVN/DM/L/V[4]. Une séquence noyau de ce domaine, R/KLFGV, est conservée dans différentes protéines contenant le domaine B3 y compris 7 gènes RAV d'*A. thaliana*. Deux de ces gènes RAV ont une activité de répression dans un système de fusion Gal4DB transformé dans *A. thaliana*, ce qui pourrait indiquer que les gènes RAV contenant ce domaine ont des activités de répresseur transcriptionnels (Ikeda and Ohme-Takagi, 2009).

Un domaine RLFGV est présent dans TOM1/RAV1 et dans TOM2/RAV2 (figure 36), ce qui peut indiquer que ces deux facteurs de transcription ont possiblement une activité de répresseurs transcriptionnels.

Par ailleurs, dans *Arabidopsis thaliana*, de nombreux facteurs de transcription de la famille des AP2/EREBP interagissent avec les gènes TOPLESS (TPL) ou « TPL-related » (TPR) et en particulier 8 gènes de la famille des RAV (Causier et al., 2012). Les gènes de la famille des TPL/TPR agissent comme corépresseurs de la transcription en modulant la condensation de la chromatine (Long et al., 2006).

[4] Les signes / montrent que les acides aminés de part et d'autre peuvent être interchangés, ici : L ou V, RLFGV, N ou D, M L ou V.

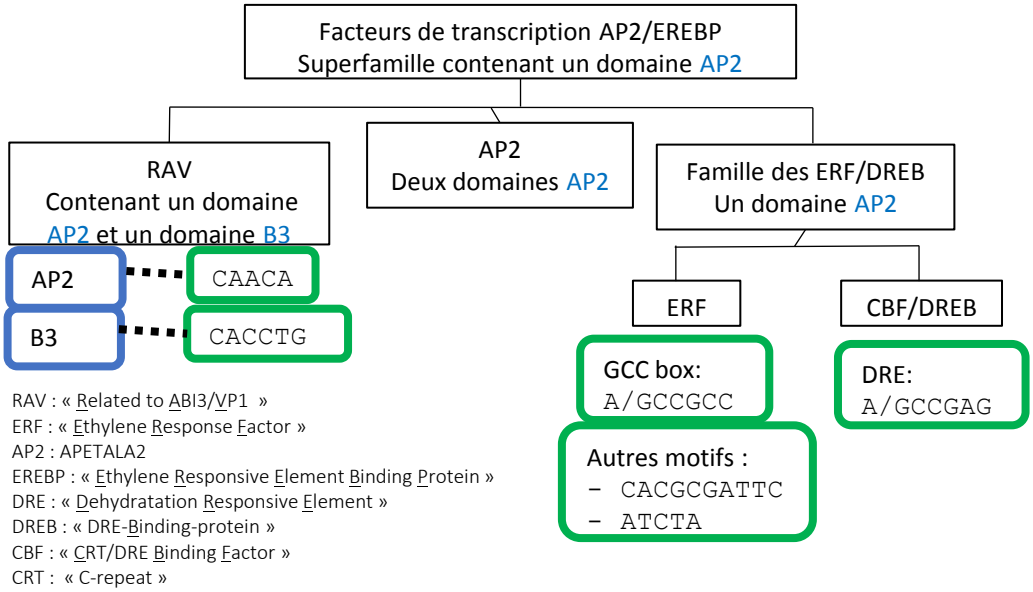


Figure 35. **Schéma récapitulant les familles de facteurs de transcriptions de la superfamille des AP2/EREBP.** Certains motifs de l'ADN (encadrés en vert) auquel les différents domaines de liaison à l'ADN (en bleu) de ces gènes peuvent se lier ont été indiqués.

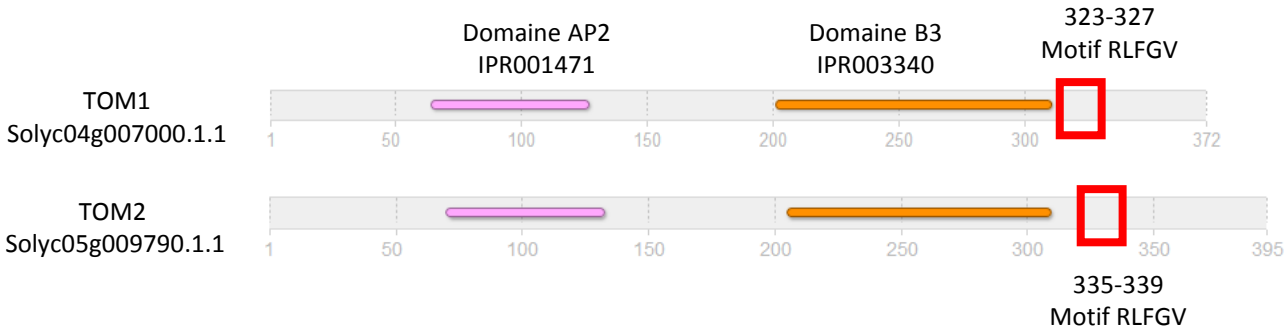


Figure 36. Domaines prédit par InterPro (Finn et al. 2017) à partir de la séquence d'acides aminés de TOM1 et TOM2. Le domaine putatif de répression BRD « B3 Repression Domain » correspondant au motif RLFGV est indiqué en rouge.

4.3. Les facteurs de transcription de la famille AP2/EREBP ont des rôles variés chez les plantes

Dans *Nicotiana tabacum*, plusieurs gènes ERF sont regroupés dans un groupe de gènes présents au même endroit sur le génome et sont impliqués dans le contrôle de la synthèse de la nicotine (Shoji et al., 2010). Un autre ERF du tabac, ORC1, est lui aussi impliqué dans le contrôle de différentes voies menant à la synthèse de la nicotine et est modulé par le jasmonate (Boer et al., 2011).

Certains gènes AP2/ERF sont impliqués dans le développement, c'est le cas des membres de la famille des AINTEGUMENTA-LIKE appartenant à la famille des AP2. Dans *A. thaliana*, 8 gènes de cette famille ont été décrits comme impliqués dans des processus tels que l'embryogénèse, la maintenance des méristèmes, le positionnement des organes et la croissance (Horstman et al., 2014b).

Dans Arabidopsis thaliana, deux gènes RAV (TEM1/EDF1 et TEM2/RAV2/RAP2.8/EDF2/AtRAV2) jouent un rôle dans la régulation de la floraison. Ces gènes sont des répresseurs de la floraison en lien avec la voie intégrant la photopériode, en réprimant l'expression de FLOWERING LOCUS T (FT) par liaison directe sur le site du promoteur contenant les boites CAACA et CACCTG. (Castillejo and Pelaz, 2008). De plus, TEM1 et TEM2 jouent un rôle dans la régulation négative de gènes de biosynthèse de la gibbérelline nécessaire à la floraison en photopériode courte (Osnato et al., 2012). Ainsi TEM1 et TEM2 sont des répresseurs de la floraison dans deux voies différentes en photopériode longue comme en photopériode courte (Matías-Hernández et al., 2014).

Müller and Munné-Bosch, 2015 récapitulent l'implication des ERF dans différents systèmes dans les réponses aux stress abiotiques. L'expression de certains ERF est induite par différents stimuli : stress salin, sécheresse, températures froides ou chaudes et changement dans la disponibilité de la lumière. Des plantes transgéniques surexprimant certains de ces gènes montrent leur implication dans ces différents stress (Müller and Munné-Bosch, 2015).

D'autre part, certains gènes ERF sont impliqués à la fois dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques. Des plantes surexprimant le gène ERF1 d'*Arabidopsis thaliana* deviennent résistantes à l'infection par les champignons nécrotrophes *Botrytis cinerea* et *Plectosphaerella cucumerina* mais ne sont pas plus résistantes à l'infection par *Pseudomonas syringae* qui est une bactérie pathogène (Berrocal-Lobo et al., 2002). Il a été montré par la suite que l'expression de ce gène est induite par l'éthylène et le jasmonate et qu'il induit lui-même l'expression de nombreux autres gènes liés à la défense contre les pathogènes tels que certains gènes PR (Pathogenesis Related qui sont des

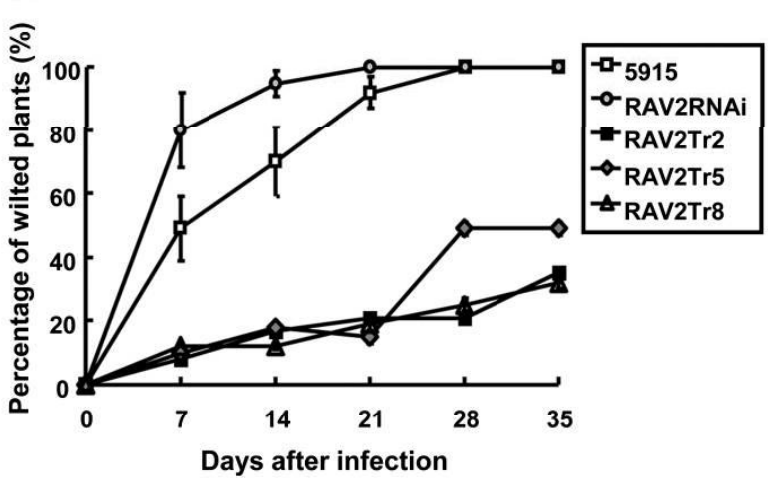


Figure 37, de Li. et al. 2011. Phénotypage de tomates surexprimant RAV2/TOM2 ou dans lesquelles l'expression de RAV2/TOM2 a été diminuée par RNAi. Pourcentage de tomates sauvages (5925) et transgéniques flétries après inoculation par *R. solanacearum* PSS4. Les tomates qui permettent la diminution de l'expression de RAV2 par RNAi (RAV2RNAi) flétrissent plus vite que le contrôle sauvage 5915. Les 3 lignées surexprimant RAV2 sous un promoteur 35S (RAV2Tr2,5,8) sont plus tolérantes.

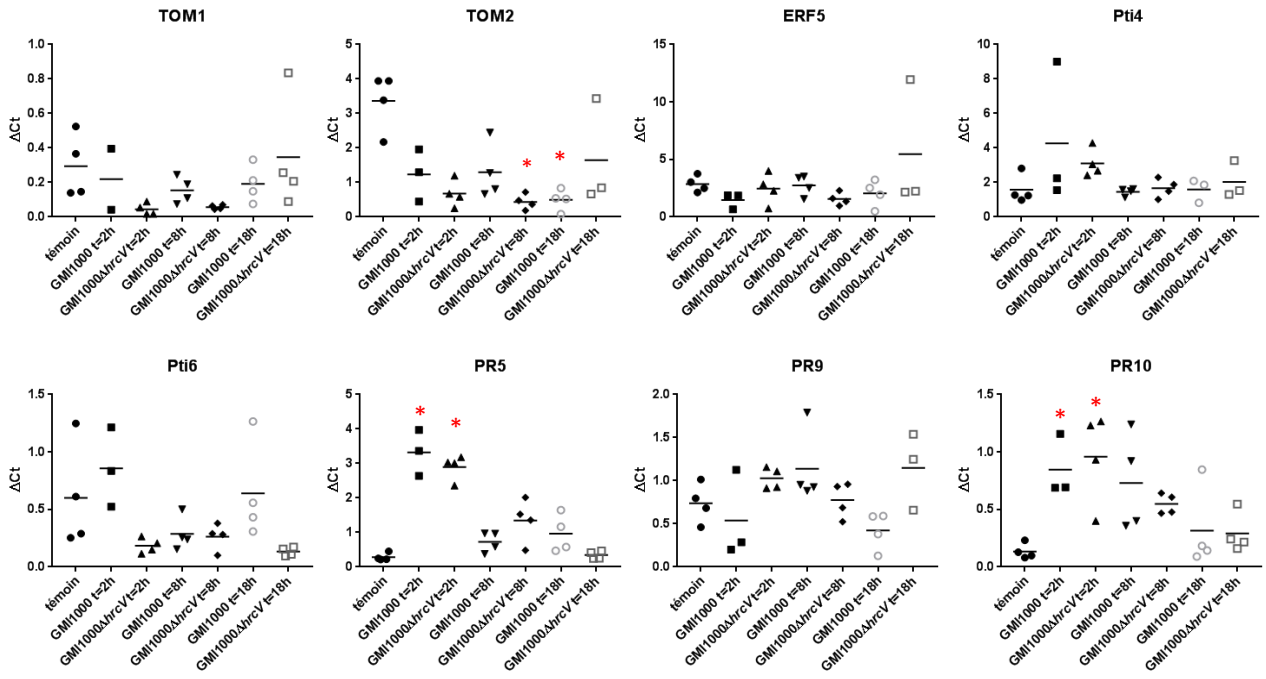


Figure 38. **Expression des gènes TOM1, TOM2, ERF5, Pti4, Pti6, PR5, PR9 and PR10 2h, 8h et 18h après inoculation par la souche GMI1000 de *R. pseudosolanacearum* et le mutant du SST3 GMI1000Δ*hrcV***. Les ARN ont été extraits de racines de tomates M82 inoculées par arrosage. Les identifiants des gènes et les oligonucléotides utilisés sont détaillés dans le matériel et methode. La différence d'expression de chaque gène après inoculation a été comparée au témoin non inoculé, les étoiles rouges marquent une différence significative d'expression.

gènes fortement induit lors de l'infection et participent à la mise en place de la défense des plantes) (Lorenzo et al., 2003). Par ailleurs la surexpression de ce gène améliore la tolérance à la sécheresse et au stress salin (Cheng et al., 2013).

D'autres gènes ERF sont impliqués dans la réponse contre *Botrytis cinerea*, c'est le cas de ERF5 et ERF6 qui sont des régulateurs positifs de la défense contre ce pathogène dans *A. thaliana* et impliqués dans la voie de défense du jasmonate (Moffat et al., 2012).

4.4. Implication dans la réponse au stress biotiques de certains gènes RAV

Chez le manioc (*Manihot esculenta*), 7 gènes RAV possédant un domaine AP2 et un domaine B3 ont été identifiés. L'expression de certains de ces gènes est induite lors de l'inoculation par *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis*. Après diminution de l'expression de deux de ces gènes *MeRAV1* et *MeRAV2* par VIGS (Virus Induced Gene Silencing), la multiplication bactérienne de *X. axonopodis* pv *manihotis* après infiltration dans les feuilles est plus importante, montrant leur l'implication comme régulateurs positifs de la défense. *MeRAV1* et *MeRAV2* peuvent se lier à la région promotrice de trois gènes impliqués dans la biosynthèse de la mélanine qui eux-mêmes sont des régulateurs positifs de la défense contre *X. axonopodis* pv *manihotis* dans le manioc. (Wei et al.)

Dans *Arabidopsis thaliana*, RAV2 (At1g68840.1) est requis pour la suppression de l'extinction de l'ARN (supression du silencing) induit par deux protéines de deux virus différents, HC-Pro du TuMV « Turnip mosaic virus » et P38 du TCV « Turnip Crinkle Virus » (Endres et al., 2010).

4.5. Le gène RAV2 est décrit chez la tomate comme un régulateur positif de la défense contre *Ralstonia pseudosolanacearum*

Lors d'une étude de 2011, l'implication de RAV2 dans la tolérance de tomates à l'infection par *R. pseudosolanacearum* a été montrée (Li et al., 2011a). Des tomates transgéniques du cultivar taiwanais « cv. 5915 » décrites comme sensible surexprimant RAV2 sous le contrôle d'un promoteur 35S sont tolérantes au flétrissement bactérien. Des tomates cv. 5915 dont l'expression de RAV2 a été diminuée grâce à une construction ARNi flétrissent plus vite après infection par *R. pseudosolanacearum* (figure 37). L'expression de RAV2 et de ERF5 est régulée positivement dans des

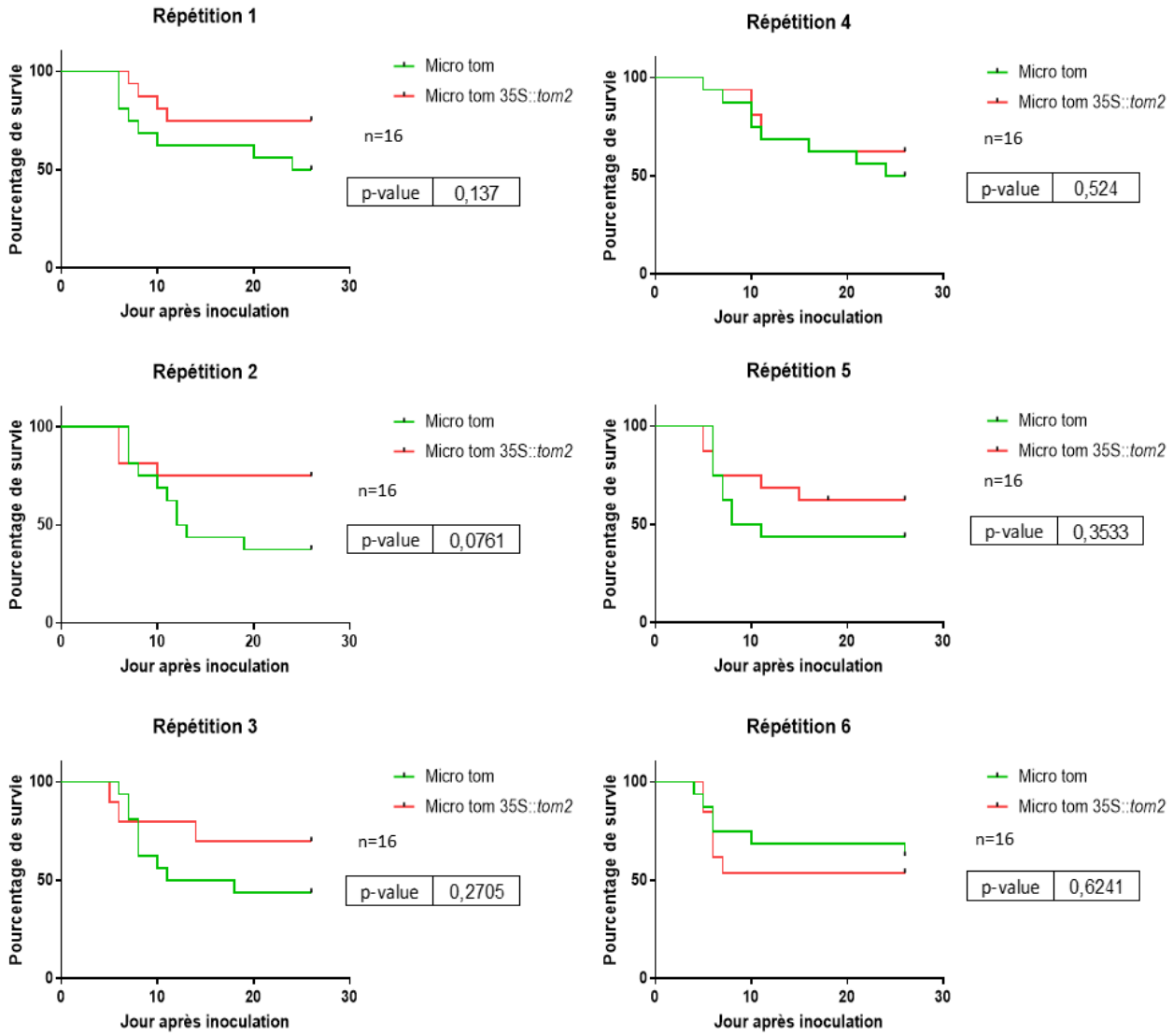


Figure 39. **Courbe de survie après inoculation de tomates cv Micro tom et Micro tom 35S::*tom2* (Li et al. 2011).** Les tomates ont été inoculées avec la souche GMI1000 par arrosage du sol avec une concentration bactérienne de 5.10^7 cfu/ml pour les répétitions 1 à 3 et 10^8 cfu/ml pour les répétitions 4 à 6. La p-value a été déterminée par un test de Mantel-cox (Remigi et al., 2011).

M82 RNAi-tom2		
Code transformant	Numéro de lignée	Notes
A6D	T1	
B1-3	T2	
B8-2	T3	Germination faible
B1A	T4	
B3A	T5	
B8B	T6	
C5A	T7	
C18B	T8	
E1A	T9	
E12A	T10	Germination faible
E12B	T11	
F12A	T12	

M82 35S::*tom2*		
Code transformant	Numéro de lignée	Notes
A6A	T1	
A6C	T2	
A6D	T3	
A6G	T4	
A19A	T5	
C3A	T6	Germination faible
E1B	T7	

Tableaux 9 et 10. Liste des lignées obtenues après transformation de tomates M82 par les vecteurs utilisés dans Li et al. 2011. Dans le code transformant, la première lettre et le premier chiffre indiquent l'explant d'origine.

plantes témoins cv. 5915 inoculées par *R. pseudosolanacearum.* De plus, des tomates Hawaï7996 (décrites comme tolérantes à l'infection par *R. pseudosolanacearum* (Wang et al., 2000)) dont l'expression de RAV2 a été diminuée par VIGS ont une plus importante multiplication bactérienne dans la tige après inoculation que des tomates Hawaï7996 contrôle (Li et al., 2011a). Ces résultats ont permis aux auteurs d'émettre l'hypothèse que RAV2 est un régulateur positif de la défense de la tomate contre *R. pseudosolanacearum*.

Dans ce même travail, le rôle d'autres gènes pouvant être lié à RAV2 a aussi été étudié. En particulier, la co-expression de RAV2 sous le contrôle d'un promoteur 35S dans des protoplastes d'*A. thaliana* et du promoteur de ERF5 (Solyc03g093560.1) fusionné au gène codant pour la luciférase induit une plus forte activité de ce gène rapporteur, ce qui montre la régulation positive de ERF5 par RAV2. (Li et al., 2011a). La famille des ERF est connue pour réguler positivement l'expression de gènes PR tels que PR1, PR2, PR3 et PR5 en se liant à la boîte GCC présente dans le promoteur de ces gènes (Zhang et al., 2004).

4.6. Une expérimentation de qRT-PCR ne permet pas de confirmer les résultats trouvés par Li et al. 2011

Dans leur étude de 2011, Li et al. montrent par RT-PCR semi-quantitative que RAV2/TOM2 ainsi que ERF5 sont surexprimé dans les tomates cv. 5915 12h après inoculation par *R. pseudosolanacearum* GMI1000. Pour vérifier si nous pouvions retrouver ces résultats avec nos conditions expérimentales, nous avons prélevé des racines de tomates cv. M82 2h, 8h et 18h après inoculation par *R. pseudosolanacearum* GMI1000 et un mutant du système de sécrétion de type III, GMI1000Δ*hrcV* puis étudié l'expression de RAV2/TOM2 et ERF5 en comparant à des plantes non inoculées (figure 38). L'expression des gènes Pti4, Pti6 ainsi que des gènes PR5, PR9 et PR10 a aussi été mesurée (figure 38).

Deux heures après inoculation, nous pouvons observer une induction des gènes PR5 et PR10, montrant qu'il y a une réponse immunitaire des plantes suite au contact avec les bactéries pour la souche GMI1000 comme pour le mutant du *SST3*. Il n'y a cependant pas à ce moment d'induction détectable de l'expression de RAV2/TOM2 ni de ERF5. Une légère diminution de l'expression de TOM2/RAV2 semble être observée 8h après inoculation par le mutant *SST3* ainsi que 18h après inoculation par GMI1000 (Figure R6). Cette absence d'induction des gènes RAV2/TOM2 et ERF5 pourrait s'expliquer par le choix de la méthode d'inoculation et de prélèvement : pour que notre système se rapproche au mieux des conditions naturelles du début de l'infection par *R. pseudosolanacearum* nous avons fait le

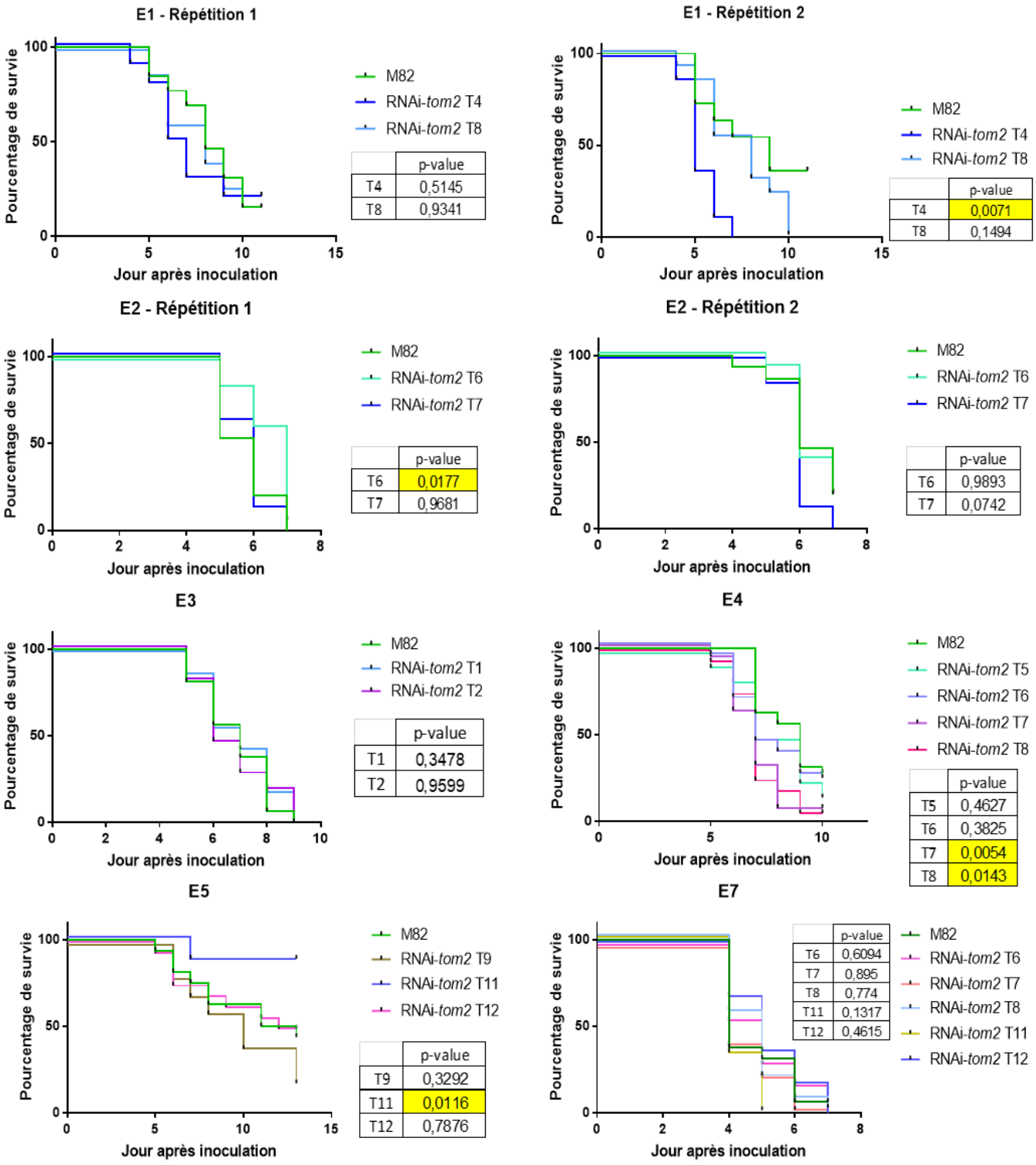


Figure 40. **Courbe de survie après inoculation de tomates M82 et M82 transformées par un plasmide contenant une construction visant à éteindre l'expression de tom2/rav2 (Li et al. 2011).**
Pour les répétitions E1 et E2, les semis de la première génération de transformants ont été effectués sur hygromycine. Pour les répétitions E3 à E7, les semis ont été effectués directement en terre en faisant l'hypothèse que si le phénotype était fort, il serait possible d'observer une différence avec ¾ des plantes ayant le transgène. Les tomates ont été inoculées avec la souche GMI1000 par arrosage du sol avec une concentration bactérienne de 5.10^7 cfu/ ml. La p-value a été déterminée par un test de Mantel-cox en comparant avec la survie des tomates M82 (Remigi et al., 2011).

choix d'inoculer par arrosage du sol et de prélever ensuite les racines, mais de cette manière nous ne sommes pas certains de la quantité exacte de bactéries pouvant entrer en contact de ces racines ou commencer à les pénétrer ou se multiplier à l'intérieur – la réponse immunitaire est possiblement plus faible et « diluée » que si l'inoculation avait été faite par infiltration des feuilles.

4.7. Des tomates Micro-tom surexprimant RAV2/TOM2 ne sont pas significativement plus tolérantes que des Micro-tom sauvages.

Pour continuer d'étudier le rôle de RAV2/TOM2 lors de l'infection par *R. pseudosolanacearum*, nous avons voulu obtenir les tomates transgéniques utilisées lors de l'étude faite par Li. et al 2011, nous leur avons donc demandé de nous faire parvenir leur matériel végétal. Malheureusement, les tomates transgéniques cv. 5925 n'étaient plus disponible mais il nous a été envoyé des tomates du cultivar Micro-tom sous forme de boutures issues de cultures *in vitro*. Il a été possible de multiplier seulement une lignée transgénique surexprimant RAV2/TOM2 (Micro tom 35S::*tom2*). Les tomates Micro-tom présentent naturellement une certaine tolérance à l'infection par *R. pseudosolanacearum* (Takahashi et al., 2005). Les Micro-tom 35S::*tom2* n'étaient pas significativement plus tolérantes à l'infection après inoculation par arrosage avec un inoculum de 5.10^7 cfu/ml ou 10^8 cfu/ml (figure 39). Nous avons donc fait le choix de transformer à nouveau des tomates, en utilisant cette fois le cultivar M82 ayant servi à la construction de la banque pour le criblage par double hybride dans la levure avec les vecteurs de transformation qui nous ont aussi été fournis.

4.8. Des tomates M82 TOM2 ARNi ne sont pas significativement plus sensible à l'infection par *R. pseudosolanacearum*

Après transformation par le vecteur RAV2-RNAi (matériel reçu de Li et al.) 12 lignées de M82 transgéniques ARNi *tom2* ont pu être obtenues (tableau 9) et l'insertion de l'ADN-T transgène vérifié par PCR. Sur ces 12 lignées, 10 ont pu être phénotypées après inoculation par arrosage de *R. pseudosolanacearum.* Certains transformants n'ont pas pu être phénotypés car le taux de germination des graines était trop faible pour avoir un nombre suffisant de plantes. Aucune de ces lignées n'a montré de différence significative de survie comparées à la variété sauvage M82 après inoculation par *R. pseudosolanacearum* (figure 40).

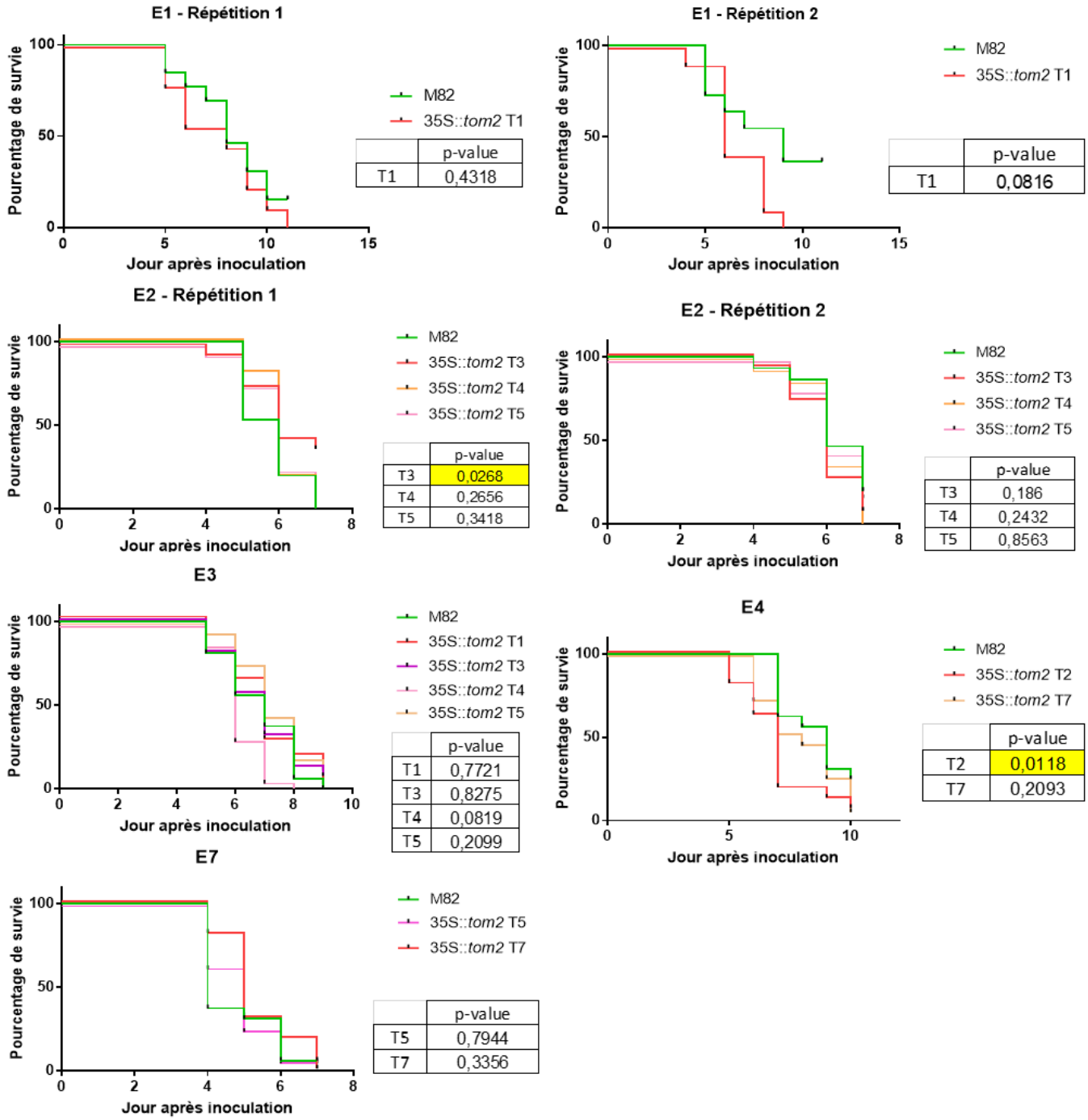
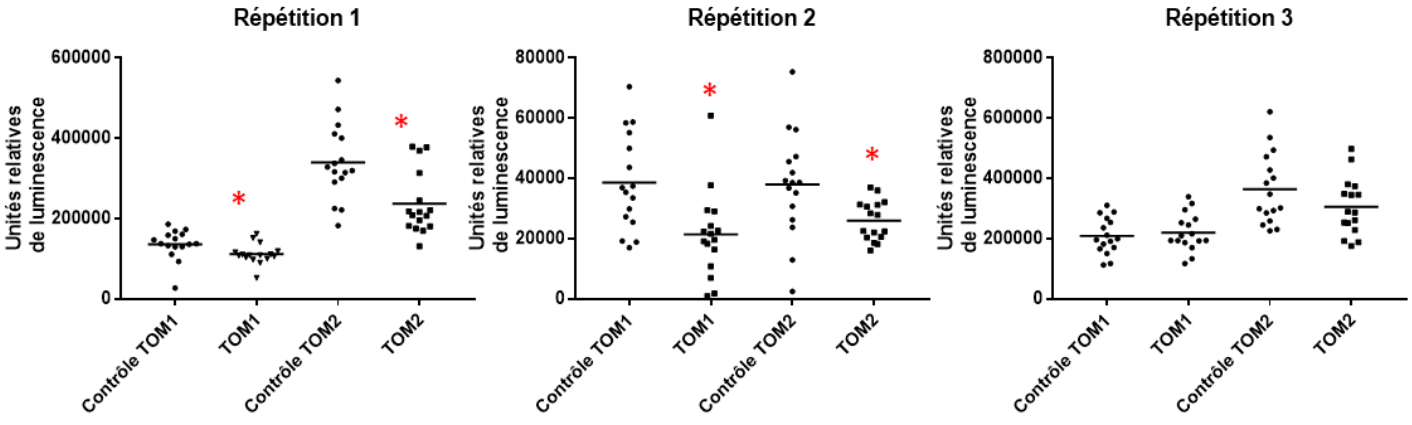


Figure 41. **Courbe de survie après inoculation de tomates M82 et M82 transformées par un plasmide contenant une construction permettant de surexprimer tom2/rav2 (Li et al. 2011).**
Pour les répétitions E1 et E2, les semis de la première génération de transformants ont été effectués sur hygromycine. Pour les répétitions E3 à E7, les semis ont été effectués directement en terre en faisant l'hypothèse que si le phénotype était fort, il serait possible d'observer une différence avec ¾ des plantes ayant le transgène. Les tomates ont été inoculées avec la souche GMI1000 par arrosage du sol avec une concentration bactérienne de 5.10^7 cfu/ ml. La p-value a été déterminée par un test de Mantel-cox en comparant avec la survie des tomates M82 (Remigi et al., 2011).

4.9. Des tomates M82 35S::*tom2* ne sont pas significativement plus résistantes à l'infection par *R. pseudosolanacearum*

Après transformation par le vecteur 35S::*tom2* (matériel reçu de Li et al.), 7 lignées de M82 transgéniques avec RAV2/TOM2 sous un promoteur 35S ont été obtenues (tableau 10) et l'insertion du T-DNA transgène vérifié par PCR. Il est à noter que les lignées T1, T2, T3 et T4 ne sont pas indépendantes, elles proviennent d'un même explant. Une de ces lignées (T6) n'a pas pu être phénotypée car le taux de germination des graines obtenues était trop faible. Pour les 6 autres lignées (représentant donc 3 évènements de transformation indépendants), aucune différence significative de survie après inoculation par arrosage de *R. pseudosolanacearum* GMI1000 n'a été observée (figure 41).

Pour ces deux expérimentations sur le phénotypage de tomates transgéniques, certaines considérations sont à prendre en compte. Tout d'abord, pour les répétitions de phénotypage E3 à E7, le semi des transformants de première génération n'a pas été fait sur un antibiotique de sélection (hygromycine). Le choix de ne pas faire le semi sur hygromycine a été fait pour plusieurs raisons : 1) les graines des mutants résistants à l'hygromycine semés sur hygromycine n'avaient pas tout à fait le même phénotype que les plantes sauvages ayant été semées dans un milieu de culture sans antibiotique (les plantes étaient plus petites), ce qui aurait pu entrainer une différence de développement et donc de phénotype de réponse à l'infection par *R. pseudosolanacearum* ; 2) nous avons constaté par PCR la présence d'un certain nombre de faux négatifs (possédant le transgène mais ayant un phénotype sensible à l'hygromycine) ; 3) nous avons considéré qu'un phénotype aussi fort que celui montré par Li. et al. 2011 aurait été visible même avec ¾ des plantes possédant le transgène dans le cas d'une insertion du T-DNA ou d'une plus grande proportion dans le cas de plusieurs insertions. Ensuite, ces transformations de tomates ayant été parmi les premières effectuées dans notre laboratoire, nous n'avons pas vérifié la ploïdie des transformants ni si les transformants possédaient plusieurs insertions par southern blot (ce que nous effectuons maintenant systématiquement pour nos tomates transgéniques). Malgré ces réserves, aucun phénotype différentiel entre un transformants et M82 qui se retrouve sur plusieurs répétitions n'a pu être observé, ce qui contraste avec les résultats trouvés par Li. et al. 2011.



	p-value
TOM1	0,0085
TOM2	0,0017

	p-value
TOM1	0,0039
TOM2	0,0058

	p-value
TOM1	0,642
TOM2	0,1596

Figure 42. Unités relatives de luminescence après induction des ROS par Flg22 dans des feuilles de *N. benthamiana* exprimant les protéines TOM1 et TOM2. Chaque point représente la somme sur une heure de la luminescence mesurée pour chaque échantillon. Certaines données ne suivant pas une distribution normale (test de Shapiro-Wilk), un test de Mann-Whitney a été effectué pour chaque paire de conditions contrôle/protéine TOM pour tester si les moyennes étaient différentes. Les étoiles rouges représentent un test indiquant une différence significative. Les p-values sont indiquées en dessous.

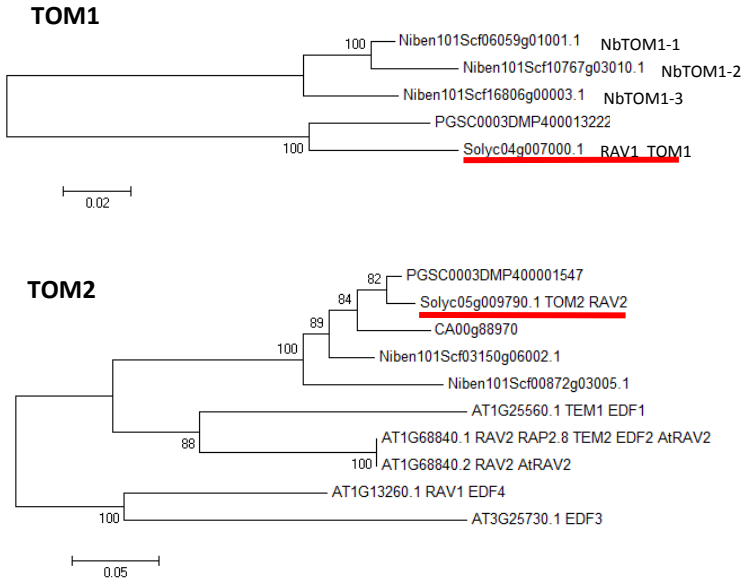


Figure 43. Arbres phylogénétiques de TOM1/RAV1 et TOM2/RAV2 crées à partir des séquences des gènes orthologues retrouvés par orthoMCL. La méthode utilisée est celle du neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) et le
logiciel utilisé MEGA X (Kumar et al. 2018). Des gènes orthologues ont été trouvés dans *Solanum tuberosum* (PGSC), *Capsicum annuum* (CA), *Arabidopsis thaliana* (At) et *Nicotiana benthamiana* (Niben).

4.10. L'expression de RAV1/TOM1 et RAV2/TOM2 semble diminuer la production de ROS après induction par flg22 dans *N. benthamiana*

Dans le cadre de l'étude du rôle potentiel des différentes cibles TOM dans l'immunité, l'effet de la surexpression des différentes protéines TOM sur le « ROS burst » induit par flg22 a été mesuré (voir partie 2 des résultats). L'expression de TOM1 et TOM2 semblent diminuer ce ROS bust, dans deux répétitions biologiques sur trois (figure 42). Plus de répétitions seraient nécessaire pour confirmer ou infirmer ces résultats, mais cette diminution signifierait que TOM1 et TOM2 ont potentiellement un effet de régulateurs négatifs des défenses liées à la production de ROS, ce qui pourrait être en contradiction avec les résultats de Li. et al. 2011 qui trouvent que TOM2/RAV2 est un régulateur positif des défenses. Le système éloigné (test de la réaction de *N. benthamiana* après induction des défenses par Flg22), ou les différentes voies de défenses impliquées dans la production de ROS par rapport aux voies potentiellement liées à TOM1 et TOM2 pourraient expliquer cette différence.

4.11. Étude de l'orthologie des gènes TOM1/RAV1 et TOM2/RAV2

Des groupes d'orthologie ont été constitués à partir des séquences de *Solanum lycopersicum*, *Arabidopsis thaliana*, *Capsicum annuum*, *Nicotiana benthamiana* et *Solanum tuberosum* par orthoMCL (Li et al., 2003). Cette base de données a ensuite été interrogée pour trouver les groupes d'orthologies auxquels appartenaient TOM1/RAV1 et TOM2/RAV2. Un arbre phylogénétique a été construit à partir de l'alignement des séquences protéiques par le logiciel MEGAX (Kumar et al., 2018) (Jones et al., 1992). Les résultats sont présentés sur la figure 43. Les liens d'orthologies nous ont permis d'identifier des gènes orthologues d'*Arabidopsis thaliana* et de *Nicotiana benthamiana*, qui ont été utilisés par la suite pour des expérimentations.

4.12. Des mutants T-DNA dans *A. thaliana* de deux gènes orthologues à TOM2/RAV2 n'ont pas de phénotype différent des plantes sauvages après inoculation par *R. pseudosolanacearum*

Dans Arabidopsis thaliana, deux mutants du gène *tem1* et un mutant du gène *rav2* tous deux orthologues à TOM2/RAV2 de la tomate, ont été phénotypés après inoculation par arrosage de

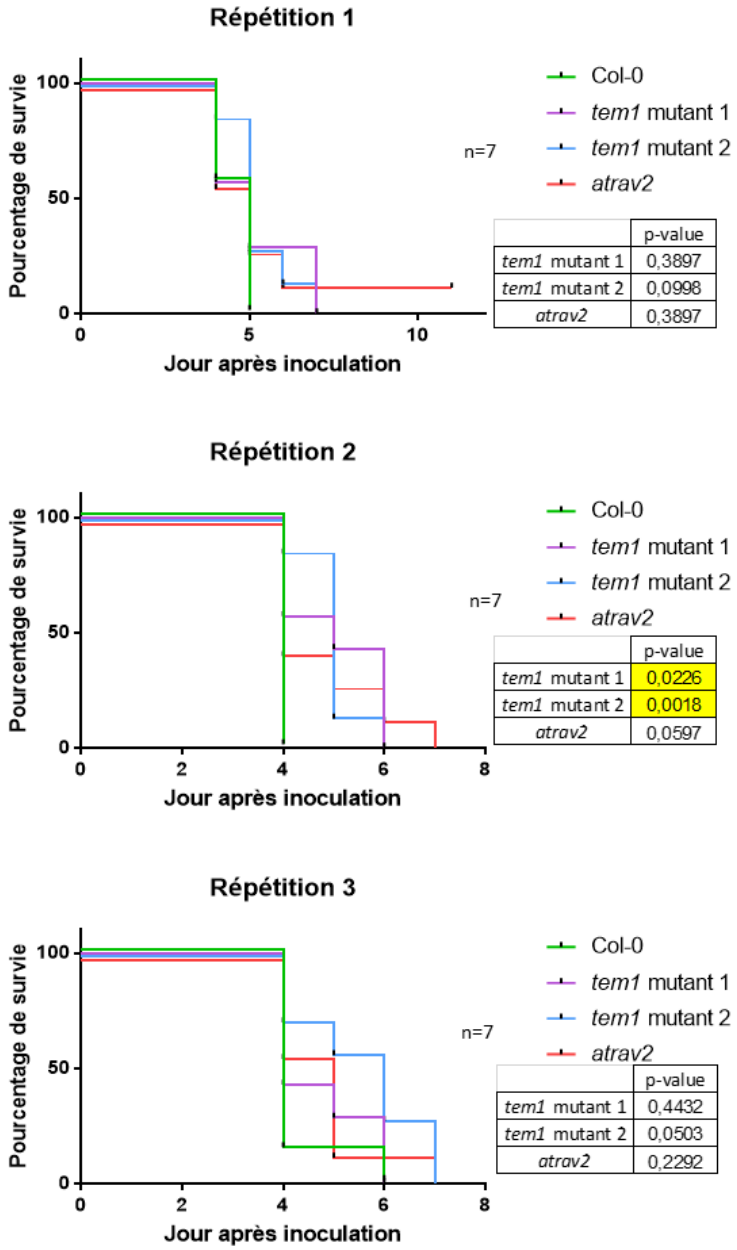


Figure 44. **Courbe de survie après inoculation de mutants de gènes orthologues de TOM2 dans *A. thaliana.***

Des mutants T-DNA de *tem1* et un mutant de *atrav2* ont été inoculés par *R. solanacearum* GMI1000 puis leur survie notée. La p-value a été déterminée par un test de Mantel-cox en comparant avec la survie des arabettes Col-0 (Remigi et al., 2011).

GMI1000 (figure 44). Ces inoculations n'ont pas permis de montrer l'existence d'un phénotype de flétrissement différent en comparant avec le sauvage Col-0.

4.13. Dans *N. benthamiana*, la diminution de l'expression des orthologues de TOM1/RAV1 et TOM2/RAV2 n'impacte pas la multiplication de *R. pseudosolanacearum* après infiltration dans les feuilles

La méthode du VIGS (« Virus induced gene silencing ») permet de diminuer l'expression de gènes dans les plantes et est efficace dans *Nicotiana benthamiana* (Lu et al., 2003). Deux constructions permettant de diminuer l'expression des trois gènes orthologues à TOM1/ RAV1 et des deux gènes orthologues à TOM2/RAV2 de *N. benthamiana* (figure 45A) ont été clonées dans le vecteur TRV2 (Kumagai et al., 1995a). Trois semaines après inoculation par le virus, des plantes dont l'expression de ces gènes ont été diminuées (figure 45B) et des plantes contrôles ont été inoculées par infiltration des feuilles par la souche GMI1000Δ*ripP1*Δ*ripAA* capable d'infecter *N. benthamiana* (Poueymiro et al., 2009). Après 48h, aucune différence de multiplication bactérienne n'a pu être observée entre les plantes dont l'expression des orthologues de TOM1 et TOM2 a été diminuée et les plantes contrôles (figure 45).

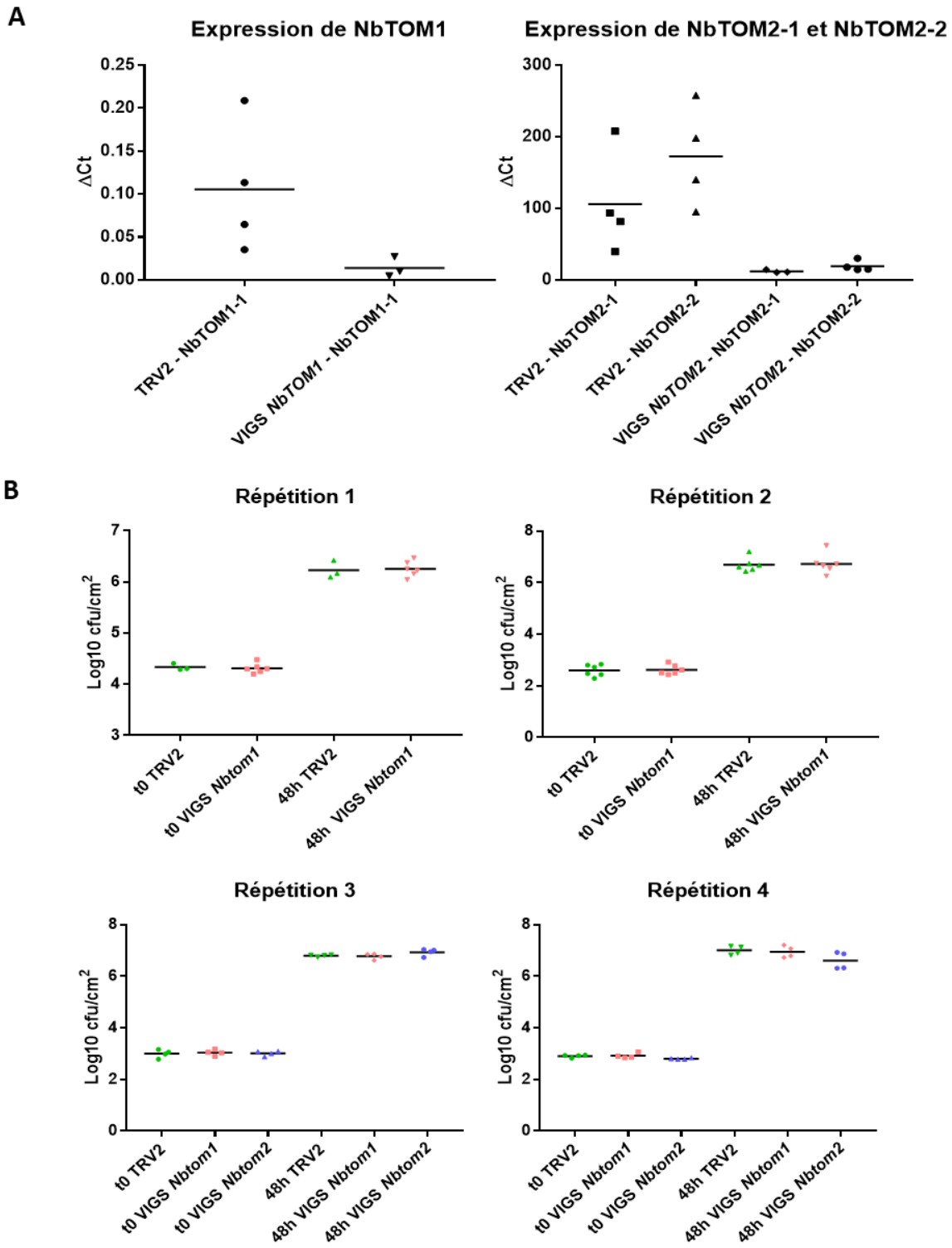


Figure 45. **Multiplication bactérienne après infiltration dans des feuilles de *N. benthamiana* dont l'expression de gènes orthologues de TOM2 a été diminuée.** Une construction contrôle avec le TRV2 sans gène inséré (notée TRV2) a été utilisée.

A) Expression des gènes orthologues déterminée par qRT-PCR après diminution de l'expression par VIGS. La construction VIGS *Nbtom1* permet de diminuer l'expression de un gène orthologue à TOM1 : NbTOM1-1. La qRT-PCR n'a pas permis de déterminer le niveau d'expression des deux autres gènes orthologues, NbTOM1-2 et NbTOM1-3 . La construction VIGS *Nbtom2* permet de diminuer l'expression de deux gènes orthologues à TOM2, NbTOM2-1 et NbTOM2-2.

B) Une suspension bactérienne à 10^4 cfu/ml (répétition 1) ou à 10^3 cfu/ml (répétitions suivantes) de GMI1000Δ*ripP1*Δ*ripAA* a été infiltrée dans les feuilles. Des disques foliaires ont été prélevés immédiatement pour le t0 puis 48h après.

Il n'y a pas de différence statistique ni à t0 ni à 48h de quantité de bactéries par surface de feuille entre les plantes VIGS TRV2, *Nbtom1* et *Nbtom2* dans aucune des répétitions (test de student en comparant avec les plantes VIGS TRV2).

4.14. Discussion et perspectives

TOM1/RAV1 et TOM2/RAV2 interagissent par double hybride dans la levure avec RipH1. Les résultats obtenus par Li. et al. 2011 semblaient très prometteurs : TOM2/RAV2 serait un régulateur positif de la défense de la tomate à *Ralstonia pseudosolanacearum* contrôlant l'expression de nombreux gènes de défense, et RipH1 aurait pu interagir avec ce régulateur pour en diminuer l'action. Malheureusement nous n'avons pas été capable de vérifier cette hypothèse dans chacun des systèmes testés, ni de retrouver certains phénotypes décrit par Li. et al. 2011. Certains de ces résultats négatifs auraient cependant besoin de plus de contrôles pour augmenter leur fiabilité mais ils semblent converger vers l'hypothèse que RAV2/TOM2 est moins central à la réponse de la tomate à *R. pseudosolanacearum* que précédemment décrit.

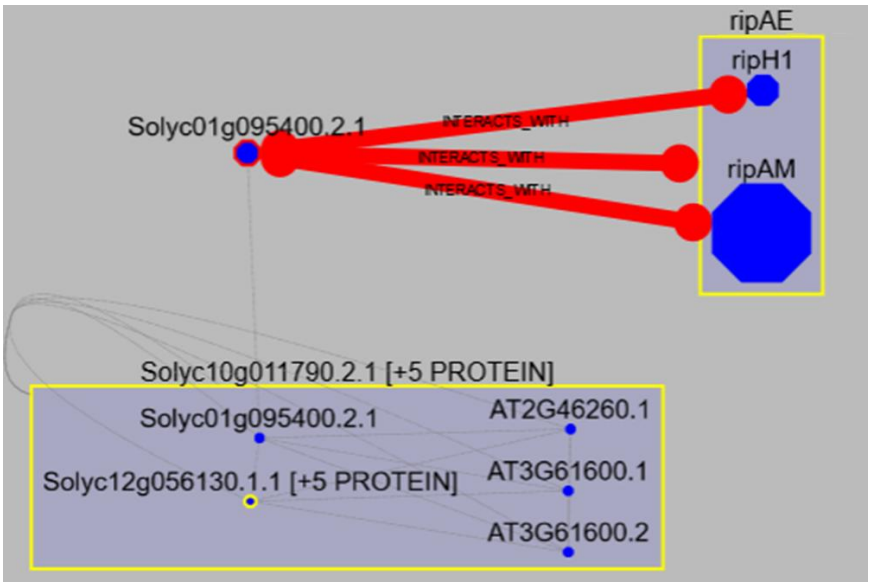


Figure 46. **Visualisation dans la base de données effectorK de TOM3, de ses orthologues dans *A. thaliana* et de leurs interactions.** Seulement les interactions de distance 1 sont montrées (les protéines apparaissant sur la figure ont un lien direct avec soit TOM3 soit un de ses orthologues). La protéine à partir de laquelle a été construit l'arbre d'interaction est représentée avec un liseré rouge. La taille des hexagones bleus par lesquels sont représentés les protéines est proportionnelle au nombre d'interactions avec cette protéine dans la base de données totale. L'épaisseur des liens rouge représente un meilleur niveau de confiance dans l'interaction. La boite jaune regroupe des interactions du même type que celle de la protéine dont le nom est marqué en haut de la boite. Les liens d'orthologie sont représentés en traits fin gris.

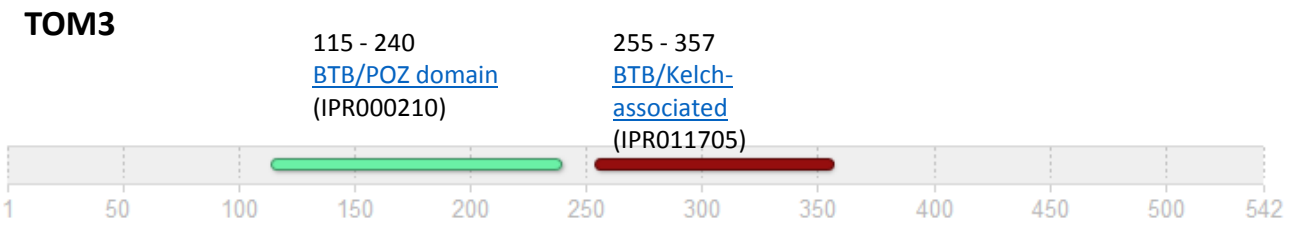


Figure 47. Domaines prédit par InterPro (Finn et al. 2017) à partir de la séquence d'acides aminés de TOM3.

5. La protéine TOM3 interagit avec l'effecteur RipH1 et ses orthologues dans *Nicotiana benthamiana* jouent un rôle dans la réponse immunitaire

L'interaction de TOM3 (Solyc01g095400.2) et RipH1 a été identifiée grâce au criblage par double hybride dans la levure avec RipH1 comme appât. Par la suite, des expérimentations de double hybride dans la levure en matriciel ont permis de mettre en évidence l'interaction de TOM3 et de deux autres effecteurs de type III de *R. pseudosolanacearum* : RipAM et RipAE (figure 46).

5.1. TOM3 est une protéine contenant un domaine BTB/POZ

La séquence d'acides aminés de TOM3 a été analysée grâce à la base de donnée de motifs protéiques en ligne InterPro (Finn et al., 2017). Cette protéine possède un domaine BTB/POZ (IPR00210) et un domaine BTB/Kelch-associated (IPR011705), voir figure 47.

Le domaine BTB (broad-complex, tramtrack et bric à brac), aussi appelé POZ (Pox virus and Zinc finger) est décrit comme un domaine permettant les interactions protéines-protéines, y compris pour des interactions de type homodimères. Les protéines contenant un domaine BTB sont classées en différentes famille à partir de la présence d'autres domaines en C-terminal (Stogios et al., 2005). TOM3 contient un domaine « Kelch associated » qui correspond au domaine BACK (BTB and C-terminal Kelch). Le domaine BACK est présent dans la plupart des protéines possédant à la fois un domaine BTB et des répétitions Kelch en C-terminal (Stogios and Privé, 2004). Mais le cas de TOM3 est particulier : elle possède un domaine BTB et un domaine « Kelch associated » /BACK mais pas de répétitions Kelch en C-terminal d'après les analyses InterPro (figure 47).

Diverses fonctions liés au domaine BTB de protéines ont été décrites dans différents organismes, par exemple la répression de la transcription pour une protéine possédant un domaine BTB et un domaine « zinc finger » chez l'humain (Melnick et al., 2000). Certaines protéines possédant un domaine BTB peuvent interagir avec la culline Cul3 et former des complexes E3 ligases avec d'autres sous-unités. Les E3 ligases permettent la reconnaissance de protéines substrats visées par la voie de dégradation

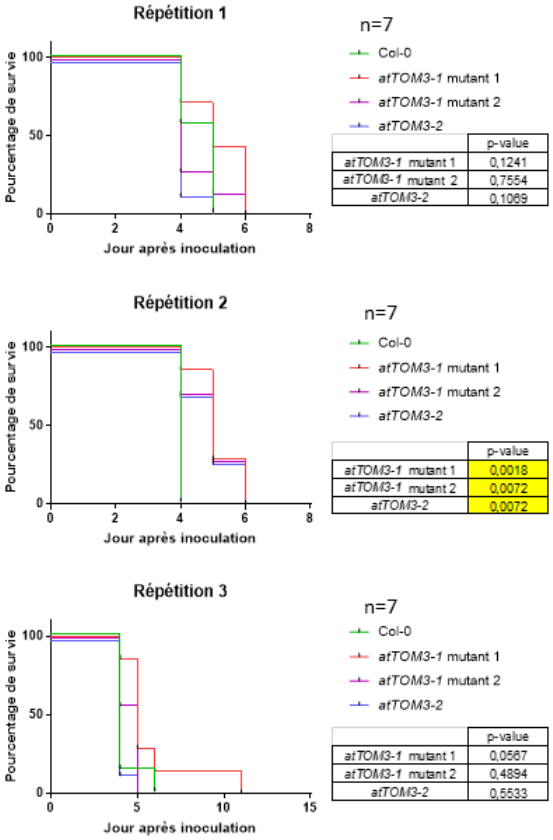


Figure 48. **Courbe de survie après inoculation de mutants de gènes orthologues de TOM3 dans *Arabidopsis thaliana.***
Des mutants T-DNA de deux gènes orthologues de TOM3 dans *A. thaliana* ont été inoculés par *R. solanacearum* GMI1000 puis leur survie notée. La p-value a été déterminée par un test de Mantel-cox en comparant avec la survie des Arabettes Col-0 (Remigi et al., 2011).

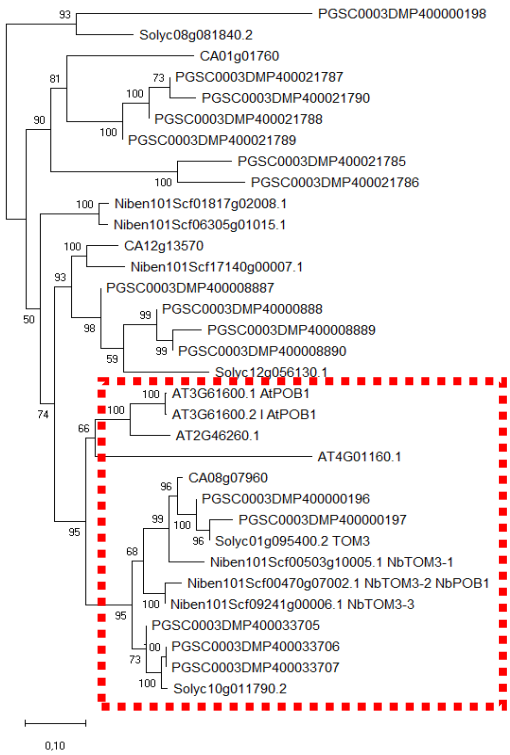


Figure 49. Arbre phylogénétique des gènes paralogues et orthologues à TOM3 retrouvés par orthoMCL. La méthode utilisée est celle du neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) et le logiciel utilisé MEGA X (Kumar et al. 2018). Des gènes orthologues ont été trouvés dans *Solanum tuberosum* (PGSC), *Capsicum annuum* (CA), *Arabidopsis thaliana* (AT) et *Nicotiana benthamiana* (Niben).

ubiquitine/protéasome 26S (Pintard et al., 2004). C'est aussi le cas dans les plantes, en effet dans *A. thaliana* AtCUL3A peut s'associer avec plusieurs protéines contenant un domaine BTB (Figueroa et al., 2005).

Dans *A. thaliana*, l'expression du gène *AHT1* codant pour une protéine possédant un domaine BTB est induite par l'acide abscissique et semble avoir un rôle sur les réponses à la voie de signalisation de l'acide abscissique (Kim et al., 2016).

5.2. Des mutants des gènes orthologues de TOM3 dans *Arabidopsis thaliana* n'ont pas de phénotype différentiel

Dans *A. thaliana*, deux gènes orthologues à TOM3 ont été trouvés : At3g61600 (noté *AtTOM3-1*) et At2g46260 (noté *AtTOM3-2*). Deux mutants du premier gène et un mutant du deuxième ont été inoculés par *R. pseudosolanacearum*. Le flétrissement de ces mutants n'est pas statistiquement différent du flétrissement de l'écotype Col-0 sur deux répétitions (figure 48). Sur la deuxième répétition, le test indique que le flétrissement est moins rapide mais cela est probablement dû à un biais car l'ensemble des plantes Col-0 a flétri très rapidement (4 jours). En conclusion, il ne semble pas y avoir de phénotype différentiel de ces mutants après inoculation par *R. pseudosolanacearum*.

5.3. TOM3 possède trois orthologues dans *Nicotiana benthamiana* qui jouent un rôle dans la réponse de cette plante à l'infection par *Ralstonia pseudosolanacearum*

Les gènes orthologues et paralogues de TOM3 ont été recherchés par orthoMCL et les séquences des protéines obtenues ont été alignées pour construire un arbre phylogénétique (figure 49).

Trois gènes paralogues de *N. benthamiana* les plus proches phylogénétiquement de TOM3 (nommés par la suite *NbTOM3-1, NbTOM3-2* et *NbTOM3-3*) ont été sélectionnés pour faire des expérimentations de diminution d'expression par VIGS. Deux constructions permettant d'effectuer la diminution d'expression pour une de *NbTOM3-1* et pour l'autre de *NbTOM3-2* et *NbTOM3-3* d'après l'outil VIGS en ligne de « Sol Genomics Network » (Fernandez-Pozo et al., 2015) ont été construites. L'expression des trois gènes dans des plantes transformés avec chacune des deux constructions a été étudiée. Dans des plantes VIGS *NbTOM3-1*, l'expression de *NbTOM3-1* et de *NbTOM3-3* était diminuée. Dans des

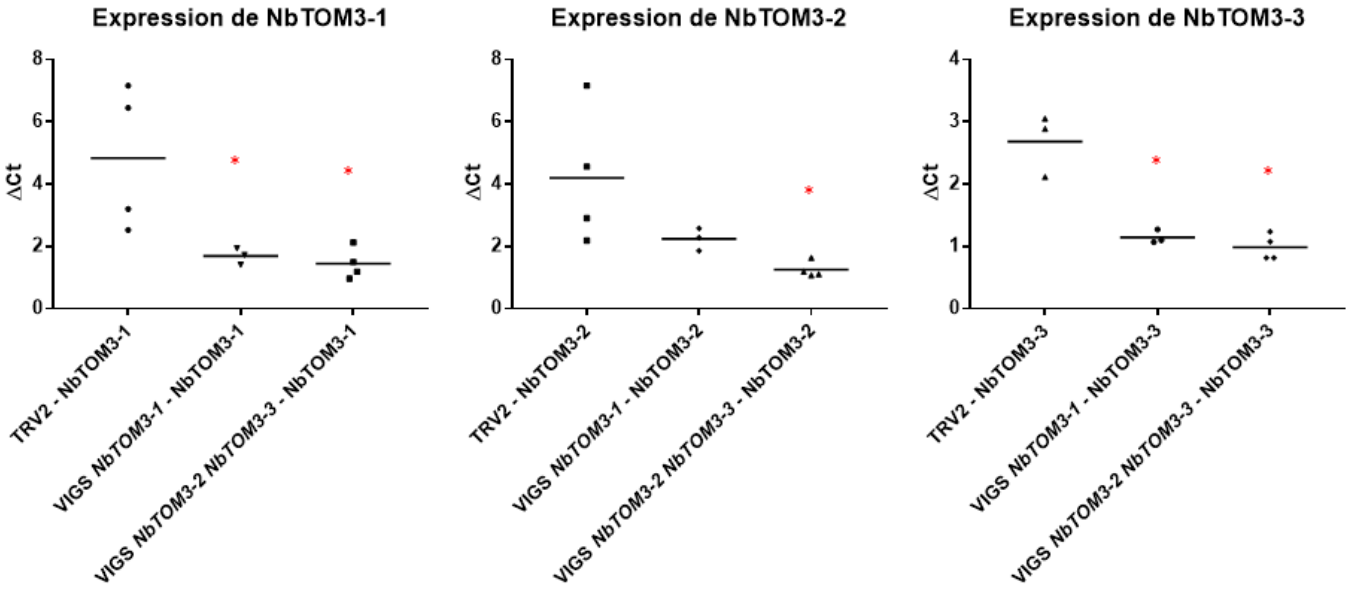


Figure 50. Expression des gènes *NbTOM3-1*, *NbTOM3-2* et *NbTOM3-3* après diminution de l'expression par VIGS. Deux constructions ont été utilisées : une ciblant NbTOM3-1 et une ciblant NbTOM3-2 et NbTOM3-3. Les étoiles représentent un niveau d'expression significativement différent en comparant avec les plantes contrôles TRV2 (ANOVA, p-value<0,05). Pour le détail des gènes, se rapporter au tableau 8.

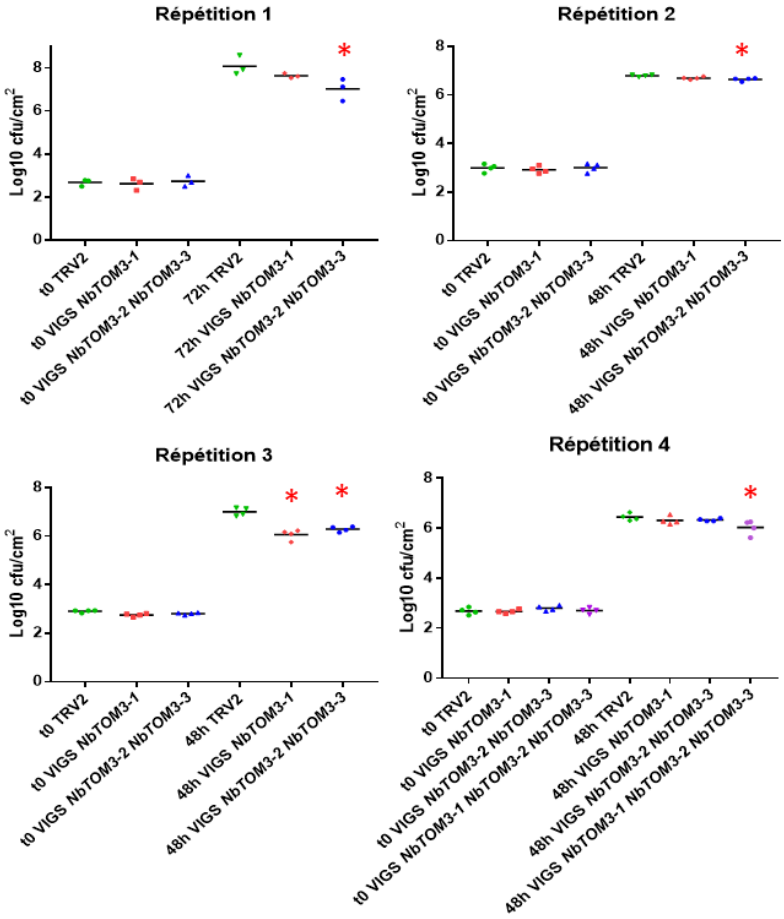


Figure 51. Réduction de la multiplication bactérienne dans des *N. benthamiana* dont l'expression des gènes orthologues à TOM3 a été diminuée.
Une suspension bactérienne de GMI1000Δ*RipP1*Δ*RipAA* à 10^4 cfu/ml a été infiltrée dans les feuilles. Des prélèvements ont été effectués immédiatement après puis à 72h (répétition1) ou 48h (répétitions suivantes). Un test non-paramétrique de comparaison multiples de moyenne (Kruskal-Wallis) a été réalisé pour comparer la quantité de bactéries dans les plantes par rapport au contrôle TRV2. Les étoiles rouges représentent une quantité de bactéries significativement différente.

plantes VIGS *NbTOM3- 2 NbTOM3-3*, l'expression de ces trois gènes était diminuée (figure 50). Cela montre qu'il existe un effet de diminution de l'expression hors des gènes strictement visés par ces constructions, qui peut avoir lieu car ces gènes sont proches.

Pour déterminer si la diminution de l'expression de ces gènes avait un effet sur l'infection par *R. pseudosolanacearum*, des suspensions bactériennes de la souche GMI1000Δ*RipP1*Δ*RipAA* capable de causer la maladie chez *N. benthamiana* (Poueymiro et al., 2009) ont été infiltrées dans les feuilles et la multiplication bactérienne mesurée après un temps d'incubation. Celle-ci était réduite dans les *N. benthamiana* agroinfiltrées par la construction VIGS *NbTOM3-2 NbTOM3-3* dans 3 répétitions sur 4. Elle était aussi réduite dans une répétition dans des plantes agroinfiltrées par la construction VIGS *NbTOM3-1*. Une expérimentation a été faite avec des *N. benthamiana* agroinfiltrées avec les deux constructions VIGS et cette diminution de la multiplication bactérienne était conservée (figure 51). Pris ensembles, ces résultats montrent que lorsque l'expression des trois gènes *NbTOM3-1*, *NbTOM3-2* et *NbTOM3-3* est diminuée, les bactéries se multiplient moins bien dans les feuilles que dans les plantes contrôles. Cela nous amène vers l'hypothèse que ces gènes sont des régulateurs positifs de la multiplication de *R. pseudosolanacearum* dans les feuilles et peuvent donc être considérés comme des gènes de sensibilité.

Nous avons ensuite testé si cet effet était aussi présent après une inoculation par arrosage (plus proche des conditions d'infection naturelle). Des plantes dont l'expression de *NbTOM3-1, NbTOM3-2* et *NbTOM3-3* avait été diminuée par VIGS ont été inoculées par arrosage et leur survie notée. Contrairement à l'inoculation par infiltration, aucune différence de phénotype n'a pu être observée (figure 52). Le phénotype observé pourrait donc dépendre du mode d'inoculation, NbTOM3 est possiblement actif à certains stades de l'infection ou dans certains organes.

5.4. NbTOM3 dans le tabac et dans *Nicotiana benthamiana* joue un rôle dans la suppression de la HR et dans la réponse à plusieurs pathogènes

Une publication décrit le rôle de *NbPOB1* dans la régulation négative de la réponse hypersensible (HR) (Orosa et al., 2017). Après blast de la séquence de ce gène, *NtPOB1* semble correspondre de façon la plus proche au gène *NbTOM3-2* orthologue de TOM3, avec une délétion de quelques acides aminés qui pourrait correspondre à un variant d'épissage. Lorsque l'expression de *NbPOB1* est diminuée par VIGS, *N. benthamiana* semble plus résistante aux infections par la bactérie *Pseudomonas syringae* pv.

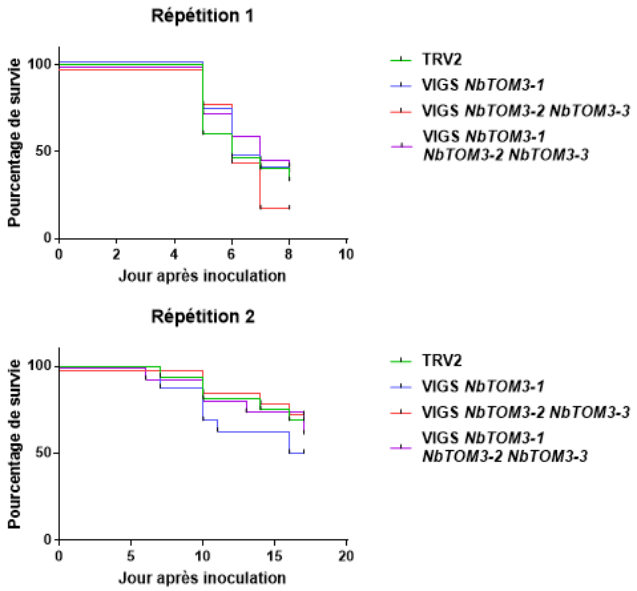


Figure 52. Courbe de survie après inoculation *N. benthamiana* dont l'expression de *NbTOM3-1 NbTOM3-2* et *NbTOM3-3* a été diminué. La souche utilisée pour l'inoculation est la souche GMI1000Δ*ripP1*Δ*ripAA* à une concentration de 10^8 cfu/ml. Il n'y a pas de différence significative de survie entre les différentes conditions.

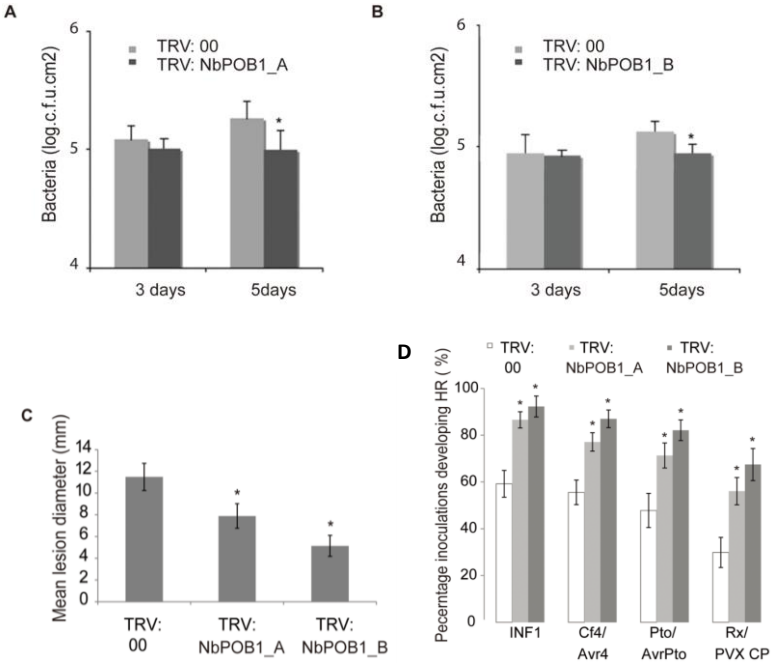


Figure 53, de Orosa et al., 2017. NbPOB1 est un régulateur négatif de la défense basale et de la réponse hypersensible associée à la mort cellulaire programmée induite par différents pathogènes et effecteurs. A et B Croissance de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 3 ou 5 jours après inoculation dans des plantes dont l'expression de *NbPOB1* a été diminuée par les constructions TRV:NbPOB1_A (**A**), ou TRV:NbPOB1_B (**B**). **C** Taille des lésions après inoculation par *Pytophtora infestans* de plantes pour lesquelles l'expression de *NbPOB1* a été diminuée par les constructions TRV:NbPOB1_A ou TRV:NbPOB1_B. **D** Histogrammes indiquant le pourcentage des sites d'infiltration montrant une mort cellulaire claire 4 jours après agroinfiltration du MAMP INFI ou de paires de gènes de résistance / effecteurs reconnus dans des N. benthamina dont l'expression de *NbPOB1* a été diminuée par les constructions TRV:NbPOB1_A ou TRV:NbPOB1_B. Les étoiles * représentent une différence statistique (ANOVA) comparé au contrôle TRV:GFP.

tabaci et par l'oomycète *Phytophthora infestans.* De plus, la HR induite par l'expression du PAMP INF1 ou de plusieurs paires de gènes de résistance / effecteurs associés est induite plus systématiquement sur des *N. benthamiana* dont l'expression de *NbPOB1* a été diminuée (figure 53 d'après Orosa et al., 2017)

D'autre part, la surexpression de *NbPOB1* augmente la colonisation des feuilles par *Phytophthora infestans* et supprime la HR induite par INF1 ou plusieurs paires de gènes de résistance / effecteurs associés (Orosa et al., 2017).

La protéine du tabac NtPOB1 interagit avec NtPUB17 qui est une protéine U-box connue pour avoir un rôle de régulateur positif de la HR lors de l'infection de tomates par l'oomycète *Phytophthora infestans* (He et al., 2015). De plus, dans un système d'expression transitoire, la plus grande abondance de NtPOB1 diminue celle de PUB17 lorsque ces protéines sont exprimées ensemble transitoirement. La localisation nucléaire de NtPOB1 et sa dimérisation sont essentielles pour son rôle de suppression de la HR (Orosa et al., 2017).

5.5. Discussion et perspectives

Nous avons montré que les orthologues de TOM3 dans *N. benthamiana* jouent certainement un rôle de régulation négative de la réponse à l'infection par *R. pseudosolanacearum*. De plus, un de ces gènes semble impliqué dans la réponse à d'autres stress biotiques lors de l'infection par *Phytophtora infestans* et *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci* (Orosa et al., 2017). Pris ensemble, ces résultats semblent montrer que les gènes orthologues à TOM3 dans *N. benthamiana* sont des gènes de sensibilité contrôlant la réponse à plusieurs pathogènes qui pourraient potentiellement être utilisés pour obtenir des mutants de ces gènes plus tolérants à diverses maladies.

Une entreprise partenaire dans le projet de criblage par double hybride dans la levure, Syngenta, s'est montré très intéressée par nos résultats sur la plus forte tolérance à *R. pseudosolanacearum* dans *N. benthamiana* après la diminution de l'expression de *NbTOM3-1,2,3*. Pour déterminer si ce phénotype est conservé dans la tomate, des mutants CRISPR-Cas9 de TOM3 et de son paralogue le plus proche Solyc10g011790.2 sont en cours de réalisation.

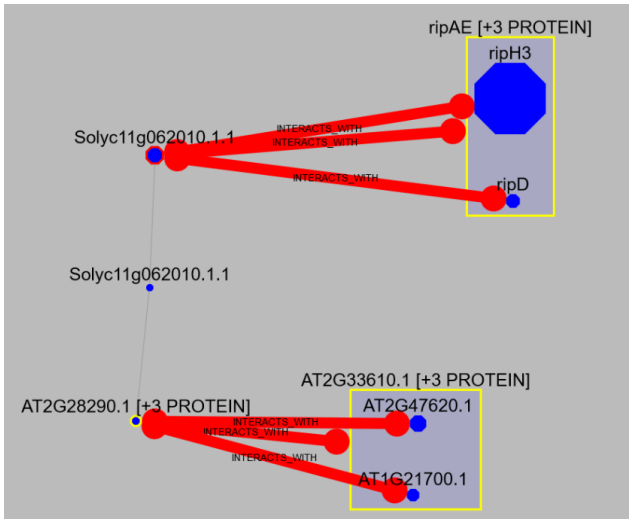


Figure 54. Visualisation dans la base de données effectorK de TOM9 , de son orthologue dans *A. thaliana* et de leurs interactions. TOM9 (Solyc11g062010.1.1) interagi avec RipH3, RipD et RipAE en double hybride dans la levure. TOM9 possède un orthologue dans *Arabidopsis thaliana* (At2g28290.1) dont la protéine interagi elle-même avec trois autres protéines de *A. thaliana.*

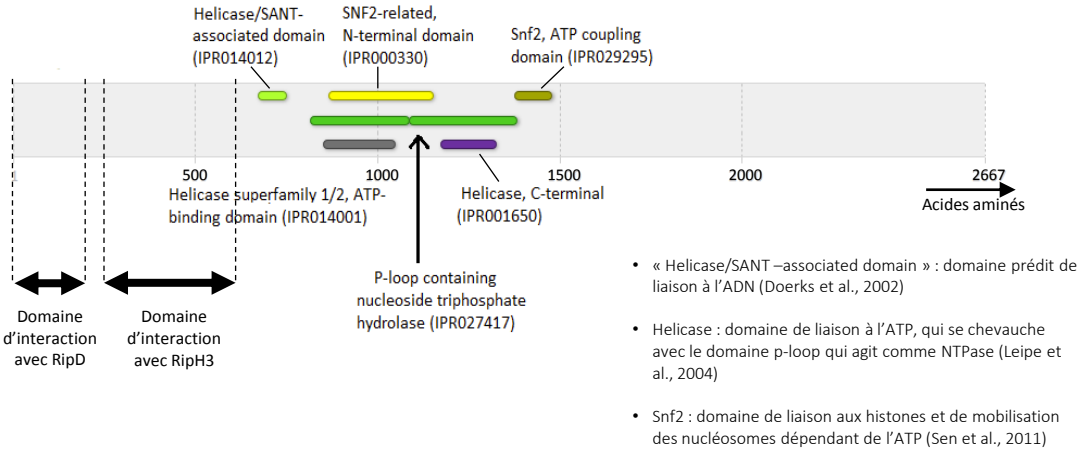


Figure 55. Domaines prédit par InterPro (Finn et al. 2017) à partir de la séquence d'acides aminés de TOM9. Les domaines d'interaction avec RipH3 et RipD trouvé par criblage par double hybride dans la levure ont été schématisés.

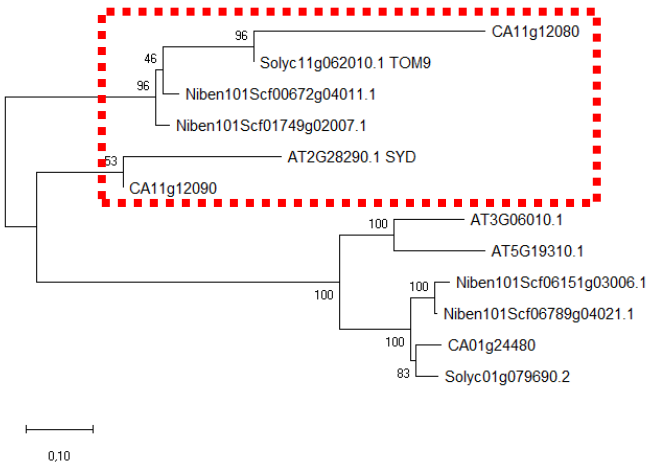


Figure 56. Arbre phylogénétique des gènes paralogues et orthologues à TOM9 retrouvés par orthoMCL. La méthode utilisée est celle du neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) et le logiciel utilisé MEGA X (Kumar et al. 2018). Des gènes orthologues ont été trouvés dans *Capsicum annuum* (CA), *Arabidopsis thaliana* (AT) et *Nicotiana benthamiana* (Niben). Des gènes orthologues ont été trouvés dans *Capsicum annuum, Arabidopsis thaliana* et *Nicotiana benthamiana.*

6. TOM9 interagit avec RipH3 et RipD et possède un orthologue dans *Arabidopsis thaliana* impliqué dans la réponse à l'infection par *R. pseudosolanacearum*

TOM9 a tout d'abord été identifiée par un criblage par double hybride dans la levure comme interagissant avec l'effecteur RipH3. Par la suite, un autre criblage fait dans l'équipe par un autre doctorant, Cyrus Sabbagh a permis d'identifier cette protéine cette fois-ci comme un interacteur de RipD (figure 54). TOM9 interagit aussi avec l'effecteur RipAE. De façon intéressante, les domaines trouvés par ces deux criblages par double hybride dans la levure ne sont pas les mêmes et n'ont pas de partie commune (représentés sur la figure 55)

6.1. TOM9 appartient à une famille de protéine connues pour jouer un rôle dans la remodélisation de la chromatine

La séquence d'acide aminés de TOM9 a été analysée par InterPro (Finn et al. 2017), figure 55. TOM9 appartient à la famille des Snf2 ATPases qui ont pour rôle la remodélisation de la chromatine, c'est-à-dire la modification de l'organisation des nucléosomes sur l'ADN. Ce mécanisme est essentiel pour la régulation de l'expression des gènes (Flaus and Owen-Hughes, 2011). Les ATPases Snf2 peuvent faire partie d'un complexe de protéines ou agir seules (Bargsten et al., 2013). Les ATPases Snf2 peuvent faire partie de différentes sous familles, y compris la sous famille Snf2 qui comporte 3 membres dans la tomate et 4 membres dans *A. thaliana* (Bargsten et al., 2013).

6.2. Un mutant d'un orthologue de TOM9 dans *Arabodopsis thaliana* a été décrit comme ayant une réponse altérée à un stress biotique

Le gène orthologue le plus proche de TOM9 dans *A. thaliana* est At2g28290.1 aussi appelé SYD (un arbre phylogénétique est représenté sur la figure 56). Les mutants *syd* ont des phénotypes de développement fort : plantes naines, dominance apicale réduite, modification des méristèmes. Ces

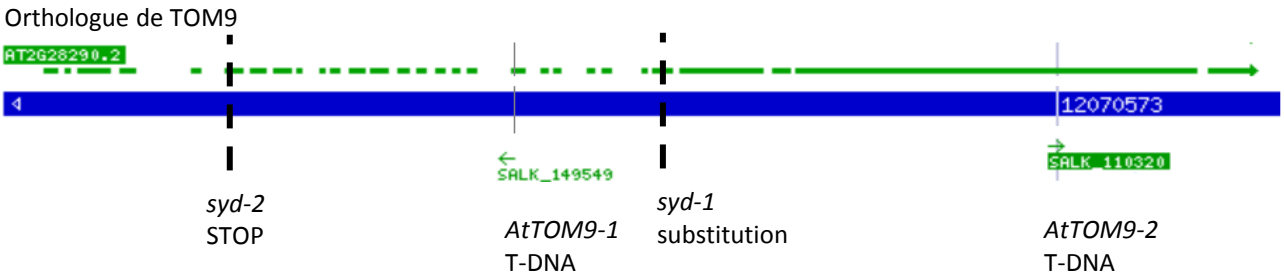


Figure 57. Schéma représentant la position relative des insertions T-DNA et des mutants ponctuels *syd* des mutants du gène *SYD/AtTOM9*

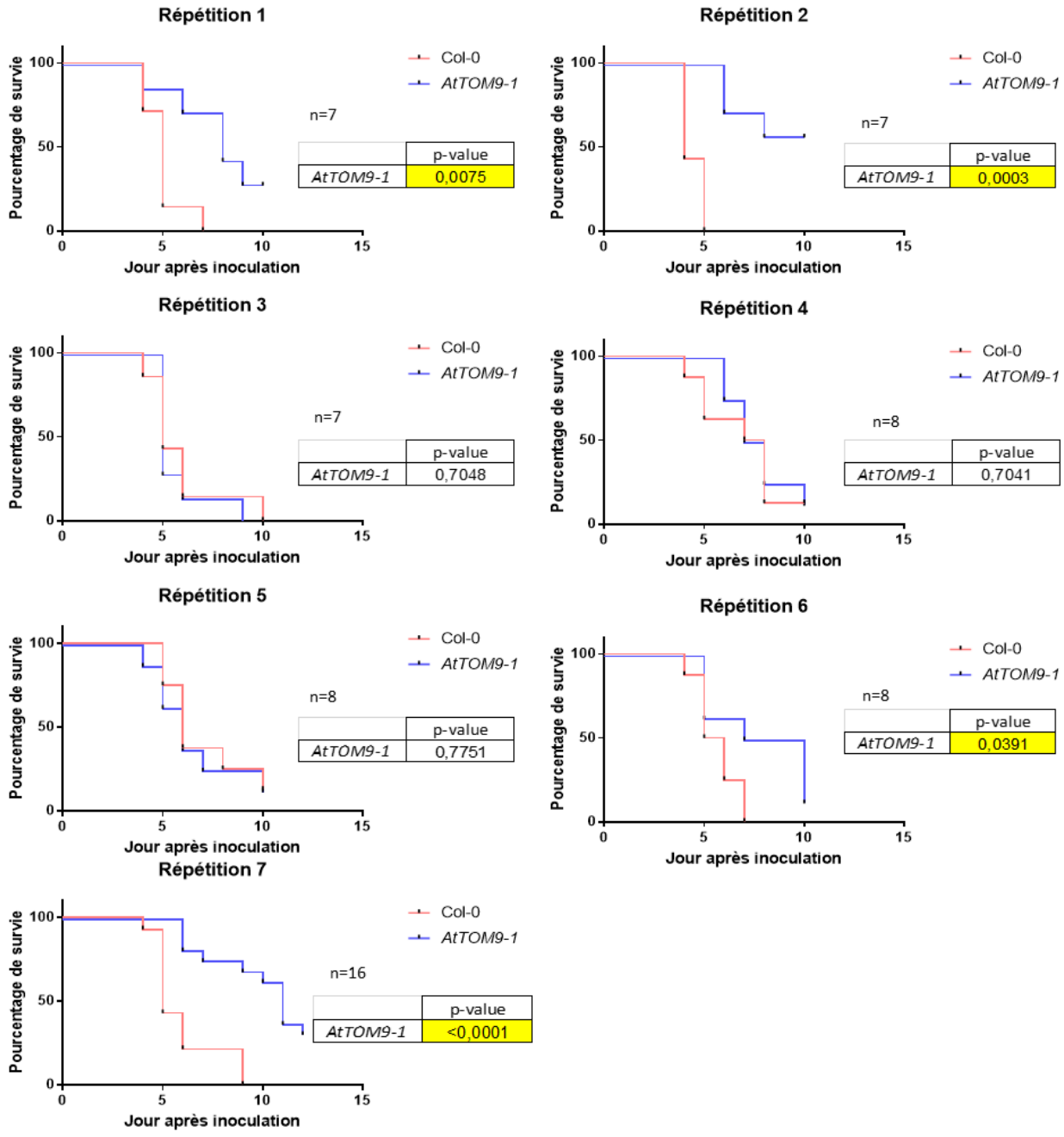


Figure 58. Courbe de survie après inoculation par *R. pseudosolanacearum* de *A. thaliana* Col-0 et du mutant *AtTOM9-1* d'un orthologue de TOM9. Ce mutant est un mutant T-DNA du gène At2g28290 avec l'insertion située vers l'extrémité N-terminale du gène. La p-value a été déterminée par un test de Mantel-cox en comparant avec la survie des Arabettes Col-0 (Remigi et al., 2011).

mutants sont aussi stériles car SYD est nécessaire pour le développement des carpelles et des ovules (Bezhani et al., 2007).

L'expression de SYD est régulée positivement par une blessure mécanique (Walley et al., 2008). Le rôle de ce gène dans la réponse à d'autres stress par ailleurs été étudié. Tout d'abord, l'expression de *PDF1.2a* qui est un gène marqueur du bon fonctionnement des voies de signalisations de l'éthylène et de l'acide jasmonique est supprimée dans des mutants *syd-2.* L'expression d'un gène marqueur de la voie de signalisation de l'acide salicylique, *PR1*, n'est pas modifiée. Ces données ont permis de faire l'hypothèse que SYD est requis pour la voie de signalisation de l'acide jasmonique et de l'éthylène mais pas celle de l'acide salicylique (Walley et al., 2008).

De plus, les mutants *syd-2* sont plus sensibles à l'infection par *Botrytis cinerea* ce qui peut être lié à une voie de signalisation liée à l'acide jasmonique et à l'éthylène compromise. Ces mutants n'ont pas de réponse modifiée après infection par le pathogène *Pseudomonas syringae* (Walley et al., 2008).

6.3. Les mutants *Arabidopsis thaliana* de l'orthologue à TOM9 sont plus tolérants à l'infection par *Ralstonia pseudosolanacearum*

Pour déterminer si le gène orthologue de *A. thaliana* de TOM9 (correspondant au gène SYD) joue un rôle dans la réponse à l'infection par *R. pseudosolanacearum*, nous avons commandé des mutants T-DNA de ce gène dans un fond génétique Col-0. Deux mutants homozygotes ont été obtenus : *AtTOM9-1* et *AtTOM9-2* (figure 57).

Le mutant *AtTOM9-1* présentait un phénotype foliaire : feuilles légèrement plus petites, foncées et recroquevillées. Après inoculation par *R. pseudosolanacearum* GMI1000, ce mutant flétrissait moins vite que l'écotype sauvage Col-0 (figure 58). Pour confirmer le rôle de ce gène en particulier dans la réponse à *R. pseudosolanacearum*, un deuxième mutant *AtTOM9-2* a été inoculé. Ce deuxième mutant ne présentait cette fois pas de phénotype visuel sur les feuilles ou sur le développement général, et pas non plus de phénotype différentiel après inoculation (figure 59). Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'insertion du T-DNA est située plus loin dans le gène que celle du mutant *AtTOM9-1*. La protéine tronquée pourrait donc être fonctionnelle.

Des mutations de AtTOM9 ont déjà été décrites dans un autre fond génétique que Col-0. Deux mutants *syd-1* et *syd-2* qui sont des mutants ponctuels dans un écotype Landsberg erecta ont été commandés.

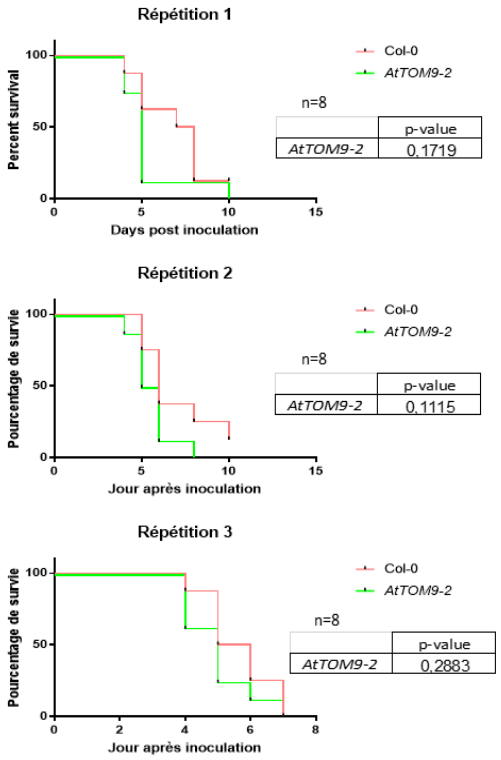


Figure 59. Courbe de survie après inoculation par *R.* pseudo*solanacearum* de *A. thaliana* Col-0 et du mutant *AtTOM9-2* d'un orthologue de TOM9. Ce mutant est un mutant T-DNA du gène At2g28290 avec l'insertion située vers l'extrémité C-terminale du gène. La p-value a été déterminée par un test de Mantel-cox en comparant avec la survie des Arabettes Col-0 (Remigi et al., 2011).

A

Allèle	Mutation	Position de la mutation sur l'ADNc (paires de bases)
syd-1	substitution G1152E	3572 G**G**A - GAA
syd-2	Q248=>stop	856 **C**AG - TAG

D'après Bezhani et al., 2007

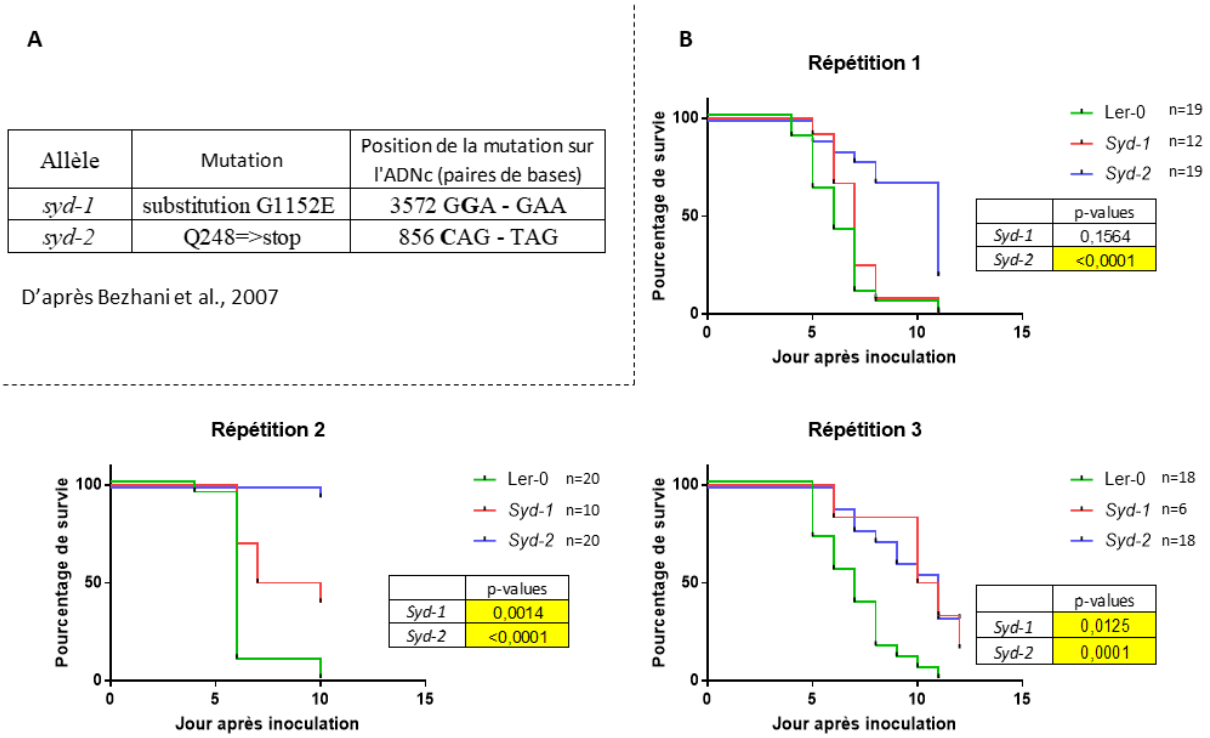


Figure 60. Survie après inoculation par *R. pseudosolanacearum* des mutants *syd-1* et *syd-2*. A) Détails des mutations de *syd-1* et *syd-2*. B) Survie après inoculation par GMI1000 par arrosage du sol d'une suspension bactérienne à 10^8 cfu/ml des mutants *syd-1* et *syd-2* et de l'écotype sauvage Landsberg erecta. Le nombre de plantes *syd-1* est inférieur car leur génotypage a été effectué par PCR et les plantes dont le résultat était ambigu ont été éliminées. La p-value a été déterminée par un test de Mantel-cox en comparant avec la survie des Arabettes Col-0 (Remigi et al., 2011).

Le mutant *syd-2* est décrit comme ayant un phénotype plus fort que *syd-1,* la mutation introduisant un codon stop au niveau de l'acide aminé 248 (Bezhani et al., 2007), figure 60A. Les mutants homozygotes *syd-1* et *syd-2* étant stériles, les semis ont été fait à partir de graines provenant d'un hétérozygote puis les plantes obtenues sélectionnées pour garder les homozygotes : *syd-2* en utilisant le phénotype de retard de croissance de ce mutant (après avoir validé l'association stricte de ce phénotype avec le caractère homozygote de la mutation) et *syd-1* par PCR. Le mutant *syd-2* est plus résistant après inoculation par *R. pseudosolanacearum* (figure 60). Le mutant *syd-1* semble plus résistant mais seulement sur deux répétitions sur trois (figure 60). De plus, le nombre de plantes *syd-1* était inférieures au nombre de plantes du contrôle Ler-0 et *syd-2* lors de ces expérimentations car le génotypage par PCR donnait un résultat ambigu pour certaines plantes qui ont dues être éliminées.

L'ensemble de ces résultats semble confirmer que AtTOM9/SYD joue un rôle dans la réponse de *A. thaliana* à l'infection par *R. pseudosolanacearum* mais plus d'expérimentations seraient nécessaire pour comprendre le rôle de cette protéine et de son interaction avec RipH3 et RipD.

6.4. L'inoculation d'une construction VIGS visant à diminuer l'expression des orthologues de TOM9 dans *Nicotiana benthamiana* cause un fort phénotype de nanisme

Une construction VIGS permettant de diminuer l'expression des deux orthologues de TOM9 dans *N. benthamiana* a été faite. Les plantes inoculées avec cette construction présentaient un phénotype fort de réduction de croissance. La multiplication bactérienne de *R. pseudosolanacearum* dans les feuilles n'a donc pas pu être testée car la surface de feuille disponible était trop faible. Ce phénotype pourrait être expliqué par un rôle important de ce gène dans le développement.

6.5. Discussion et perspectives

Nous avons pu montrer que deux parties différentes de TOM9 interagissent avec les effecteurs RipH3 et RipD en double hybride dans la levure. De plus, un gène orthologue à TOM9 dans *A. thaliana* AtTOM9/SYD joue un rôle dans la remodélisation de la chromatine et semble jouer un rôle dans la réponse à l'infection par *R. pseudosolanacearum*. Ce gène est important pour des fonctions centrales

du développement de la plante comme le montrent les phénotypes visuels très forts et des résultats publiés. Par la suite, il serait intéressant d'étudier si TOM9 dans la tomate joue un rôle similaire : dans la réponse à l'infection par *R. pseudosolanacearum*, par d'autres pathogènes et dans la remodélisation de la chromatine. Dans *N. benthamina*, il n'a pas été possible d'étudier le rôle de ce gène en en diminuant l'expression à cause des effets trop forts sur le phénotype : pour cette même raison il risque d'être difficile d'étudier le rôle de ce gène lors de l'infection par *R. solanacearum* dans ses plantes hôtes en séparant les phénotypes liés à l'infection de ceux liés au développement. De même des mutants de ce gène, même si ils sont plus résistants, risquent de ne pas pouvoir être utilisés en sélection variétale si les propriétés agronomiques des plantes ne sont pas conservés. Une des difficultés par ailleurs est le clonage de cette grande protéine de 3574 acides aminés, qui n'a pas été possible jusqu'à présent et qui aurait pu nous permettre de faire plus d'expérimentations nécessitant l'expression transitoire de cette protéine. Des mutants de ce gène dans la tomate sont en cours de construction par la méthode du CRISPR-Cas9 (contribution à ce travail de David Landry, un autre membre de l'équipe). Il pourrait aussi être pertinent de continuer l'étude de AtTOM9/Syd : est-ce que l'interaction avec RipH3 et RipD est conservée ? Si oui, quel rôle joue cette interaction ?

Chapitre II : La variété d'aubergine AG91-25 reconnait l'effecteur RipAX2 de *Ralstonia pseudosolanacearum* ce qui permet sa résistance

Introduction du chapitre

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion de participer à un projet concernant le rôle d'un autre effecteur de type III de *Ralstonia pseudosolanacearum* : RipAX2. La présence de cet effecteur permet la résistance à l'infection des aubergines de la variété AG91-25 dans lesquelles le locus de résistance EBWR9 a précédemment été identifié. Un mutant de cet effecteur dans la souche GMI1000 peut causer la maladie sur AG91-25 alors que cette variété est résistance à l'infection par la souche sauvage. De plus, RipAX2 n'est pas présent dans souche PSS4 de *R. pseudosolanacearum* qui est capable d'infecter AG91-25 – et la complémentation de PSS4 avec *ripAX2* de GMI1000 rend cette souche non pathogène sur AG91-25. RipAX2 possède un domaine putatif « zinc-binding » HELIH qui est nécessaire au déclenchement de la HR sur une les feuilles d'une plante parente de l'aubergine, *Solanum torvum.* Ce domaine n'est pas nécessaire à la résistance des aubergines AG91-25. La distribution du gène *ripAX2* a été étudiée dans différentes souches du RSSC.

Ma contribution aux expérimentations menant à cette publication a concerné la réalisation de mutants bactériens et de leur complémentation, ainsi que leur phénotypage sur aubergine.

Molecular Plant Pathology

MOLECULAR PLANT PATHOLOGY DOI: 10.1111/mpp.12724

The eggplant AG91-25 recognizes the Type III-secreted effector RipAX2 to trigger resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum* species complex)

ARRY MOREL[1,‡], JÉRÉMY GUINARD[2,3,‡], FABIEN LONJON[1], LAKSHMI SUJEEUN[3], PATRICK BARBERIS[1], STÉPHANE GENIN[1], FABIENNE VAILLEAU[1], MARIE-CHRISTINE DAUNAY[4], JACQUES DINTINGER[3], STÉPHANE POUSSIER[1], NEMO PEETERS [1,*,‡] AND EMMANUEL WICKER [3,5,*,†,‡]

[1]*LIPM, Université de Toulouse, INRA, CNRS, F-31326, Castanet-Tolosan, France*
[2]*Université de La Réunion, UMR PVBMT, F-97410, Saint-Pierre, La Réunion, France*
[3]*CIRAD, UMR PVBMT, F-97410, Saint-Pierre, La Réunion, France*
[4]*INRA, Génétique et Amélioration des Fruits et Legumes, UR, Montfavet, France*
[5]*IPME, Université de Montpellier, CIRAD, IRD, F-34394, Montpellier, France*

SUMMARY

To deploy durable plant resistance, we must understand its underlying molecular mechanisms. Type III effectors (T3Es) and their recognition play a central role in the interaction between bacterial pathogens and crops. We demonstrate that the *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC) T3E *ripAX2* triggers specific resistance in eggplant AG91-25, which carries the major resistance locus *EBWR9*. The eggplant accession AG91-25 is resistant to the wild-type *R. pseudosolanacearum* strain GMI1000, whereas a *ripAX2* defective mutant of this strain can cause wilt. Notably, the addition of *ripAX2* from GMI1000 to PSS4 suppresses wilt development, demonstrating that RipAX2 is an elicitor of AG91-25 resistance. RipAX2 has been shown previously to induce effector-triggered immunity (ETI) in the wild relative eggplant *Solanum torvum*, and its putative zinc (Zn)-binding motif (HELIH) is critical for ETI. We show that, in our model, the HELIH motif is not necessary for ETI on AG91-25 eggplant. The *ripAX2* gene was present in 68.1% of 91 screened RSSC strains, but in only 31.1% of a 74-genome collection comprising *R. solanacearum* and *R. syzygii* strains. Overall, it is preferentially associated with *R. pseudosolanacearum* phylotype I. $RipAX2_{GMI1000}$ appears to be the dominant allele, prevalent in both *R. pseudosolanacearum* and *R. solanacearum*, suggesting that the deployment of AG91-25 resistance could control efficiently bacterial wilt in the Asian, African and American tropics. This study advances the understanding of the interaction between RipAX2 and the resistance genes at the *EBWR9* locus, and paves the way for both functional genetics and evolutionary analyses.

* *Correspondence*: Email: wicker@cirad.fr, nemo.peeters@inra.fr
† *Present address*: IPME, Université de Montpellier, CIRAD, IRD, F-34394, Montpellier, France.
‡These authors contributed equally to this work.

Keywords: bacterial wilt, disease resistance, functional genetics, host–pathogen interactions, plant immunity, plant-pathogenic bacteria, *Solanum melongena*

INTRODUCTION

In agrosystems, plants are constantly challenged by various pathogens, such as bacteria, viruses, fungi and nematodes. Monoculture as it is currently practised in modern agro-ecosystems not only leads to a reduction in plant genetic variability, but also to the selection of highly specialized and aggressive pathogens (Stukenbrock and McDonald, 2008). The use of plant resistant germplasm appears to be the best strategy to control plant diseases, as it is cost-effective and environmentally friendly (Boyd *et al.*, 2013). However, an increasing number of studies have regularly reported cases of resistance breakdown (Daverdin *et al.*, 2012; Kiyosawa, 1982; Montarry *et al.*, 2006; Moury, 2010; Palloix *et al.*, 2009; Zeigler *et al.*, 1994), which have questioned the durability of plant resistance. The prediction of this durability can be achieved by deciphering the evolutionary potential of the pathogen (McDonald and Linde, 2002). However, first, we need to understand the molecular bases of plant–microbe interactions in order to assess the evolutionary constraints on their stability and dynamics. Bacterial type III effectors (T3Es) are key components in this interaction as they can both subvert and trigger the plant immune system (Buttner, 2016). As such, these molecules are players in the identification, description and therefore development of sustainable resistance strategies (Clarke *et al.*, 2015; Vleeshouwers and Oliver, 2014).

Bacterial wilt affects more than 54 botanical families, including several crops of major interest (tomato, potato,

© 2018 BSPP AND JOHN WILEY & SONS LTD

banana, groundnut, eucalyptus) (Hayward, 1991, 1994). Its causative agent is the soil-borne Betaproteobacterium *Ralstonia solanacearum*, a species complex composed of four phylotypes of specific geographical origins: Asia and Africa for phylotype I, Africa for phylotype III, America for phylotype II and Indonesia for phylotype IV (Fegan and Prior, 2005; Wicker *et al.*, 2012). A recent taxonomic update (Safni *et al.*, 2014) has proposed that *R. solanacearum* should be renamed the *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC), subdivided into three distinct species: *R. pseudosolanacearum* (phylotypes I and III), *R. solanacearum* (phylotypes IIA and IIB) and *R. syzygii* (phylotype IV and BDB).

The search for and breeding for plant resistance against RSSC are critical for food security in numerous countries. However, the genetic bases of plant resistance to this major plant pathogen still remain unknown, except for the model species *Arabidopsis thaliana* (Bernoux *et al.*, 2008; Deslandes and Genin, 2014; Deslandes *et al.*, 2002; Le Roux *et al.*, 2015; Tasset *et al.*, 2010) and *Medicago truncatula* (Ben *et al.*, 2013; Lohou *et al.*, 2014; Turner *et al.*, 2009; Vailleau *et al.*, 2007). Interactions between RSSC strains and Solanaceae genotypes (tomato, eggplant and pepper) have already been investigated (Lebeau, 2010; N'Guessan, 2013) and formalized into six patterns, called pathoprofiles (Lebeau *et al.*, 2011). This screening established that the highest resistance levels against RSSC were found in the eggplant germplasm. The resistance of the AG91-25 accession (Ano *et al.*, 1991, 2002) has been mapped and led to the identification of the major resistance locus *ERs1* (Lebeau *et al.*, 2013), later named *EBWR9* (Salgon *et al.*, 2017). In order to characterize the durability of AG91-25 resistance, it is necessary to understand the molecular basis of the interaction between RSSC and the AG91-25 eggplant immune system.

In this work, we validated the contribution of the GMI1000 allele of *ripAX2* to the control of disease by AG91-25. We showed that the immunity triggered by RipAX2 does not require a putative zinc (Zn)-binding motif, previously shown to be critical to trigger immunity on *Solanum torvum* leaves (Nahar *et al.*, 2014). Finally, we investigated the prevalence and allelic variability of *ripAX2* alleles in pathogen populations in order to predict the durability of *EBWR9* resistance if it were to be deployed in specific *R. solanacearum*-infested areas.

RESULTS

RipAX2$_{GMI1000}$ triggers AG91-25 resistance

Disease control by a single resistance (*R*) gene is often caused by the specific recognition of a single pathogen effector, which elicits plant defences (Buttner, 2016). In order to investigate whether AG91-25 resistance is associated with an effector from GMI1000, 41 single mutants of effectors described in Cunnac *et al.* (2004) were screened for disease appearance on a few GMI1000-resistant AG91-25 plants, after inoculation by soil drenching [10^8 colony-forming units (CFU)/mL, 10 mL per plant]. Susceptible MM738 plants were also included in the tests. From this screen, only the *ripAX2* mutant GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 was found to cause disease on AG91-25 plants. To confirm the role of RipAX2 in AG91-25 disease resistance, a complemented strain was made by introducing a wild-type copy of *ripAX2* in the mutant (GMI1000 *ripAX2*::pCZ367::*ripAX2*). The GMI1000 wild-type strain and the GMI1000 *ripAX2*::pCZ367::*ripAX2* strain were not able to trigger disease on AG91-25, whereas the *ripAX2* mutant caused disease 4 days after inoculation (Fig. 1). The strains GMI1000, GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 and GMI1000 *ripAX2*::pCZ367::*ripAX2* were still able to induce disease on the susceptible control MM738, with similar wilting rates (Fig. 1). Biological replicates performed on AG91-25 and on the MM738 susceptible control gave similar results (Figs S1 and S2, see Supporting Information).

The eggplant pathogenic strain PSS4 expressing ripAX2$_{GMI1000}$ becomes avirulent on AG91-25

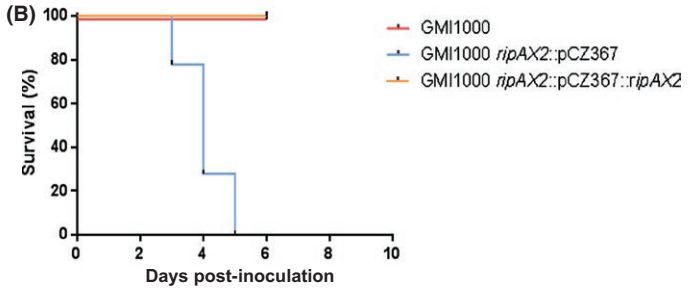
The PSS4 strain is pathogenic on AG91-25 and its genome lacks any *ripAX2* allele (Guinard *et al.*, 2016). In order to investigate whether the presence of *ripAX2* is sufficient for AG91-25 to control disease, a PSS4 strain expressing *ripAX2*$_{GMI1000}$ was generated, and inoculated by soil drenching as mentioned above. This strain was not able to cause disease on AG91-25, but still able to wilt the MM738 susceptible control (Fig. 2). Thus, we established that the expression of *ripAX2*$_{GMI1000}$ in an AG91-25 pathogenic strain is sufficient to trigger AG91-25 resistance. Biological replicates performed on AG91-25 and on the MM738 susceptible control gave similar results (Figs S1 and S2).

RipAX2-triggered AG91-25 resistance restricts plant colonization only after root infection

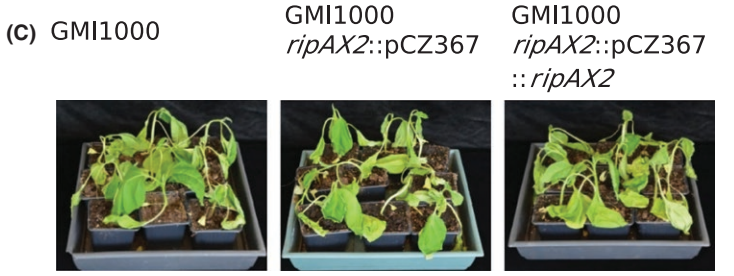
From the soil, *R. solanacearum* can enter the root system by wounds or lateral root emerging points. It then colonizes the cortex, invades the xylem and spreads to aerial parts, where it causes wilting (Denny, 2006). This multistep infection process makes it challenging to determine where resistance actually occurs.

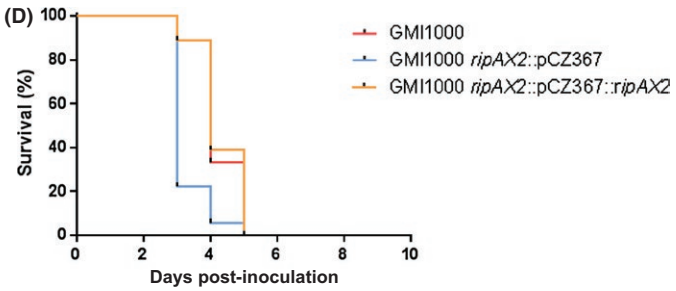
In order to better characterize AG91-25 resistance, bacterial multiplication in the stem was quantified after root inoculation and stem injection. After root inoculation, the bacterial load (log_{10} CFU/g fresh weight) reached high levels in AG91-25 infected with PSS4 and GMI1000 *ripAX2*::pCZ367, 5 days after inoculation (means of 10.3 and 9.7, respectively; Fig. 3). No bacteria were detected in the stems of plants inoculated with PSS4 expressing *ripAX2* and with GMI1000 *ripAX2*::pCZ367::*ripAX2* at 5 or 10 days post-inoculation. A few plants inoculated with GMI1000 showed some bacterial multiplication in their stem at 5 or 10 days post-inoculation (Fig. 3); one of





Log-rank (Mantel-Cox) Test		
P values	GMI1000 *ripAX2*::pCZ367	GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 ::*ripAX2*
GMI1000	< 0.0001	< 0.0001





Log-rank (Mantel-Cox) Test		
P values	GMI1000 *ripAX2*::pCZ367	GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 ::*ripAX2*
GMI1000	0.0002	0.7693

Fig. 1 The RipAX2 type III effector of *Ralstonia pseudosolanacearum* is necessary for resistance in AG91-25 eggplants. (A) Photographs taken at 6 days post-inoculation. The *R. pseudosolanacearum* GMI1000 wild-type strain and the GMI1000 *ripAX2*::pCZ367::*ripAX2* complemented strain are not able to trigger disease on AG91-25, whereas the GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 mutant is able to do so. (B) Survival curves representing the wilting of AG91-25 eggplants after root inoculation with the GMI1000 wild-type strain, GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 mutant and the complemented strain [10^8 colony-forming units (CFU)/mL, 10 mL per plant, 18 plants per strain]. Log-rank (Mantel–Cox) test *P* values compared with GMI1000 are shown below the graph. (C) Photographs taken at 6 days post-inoculation. The strains GMI1000, GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 and GMI1000 *ripAX2*::pCZ367::*ripAX2* are all able to wilt MM738 susceptible eggplants. (D) Survival curves representing the wilting of MM738 eggplants after root inoculation. Log-rank (Mantel–Cox) test *P* values compared with GMI1000 are shown below the graph.

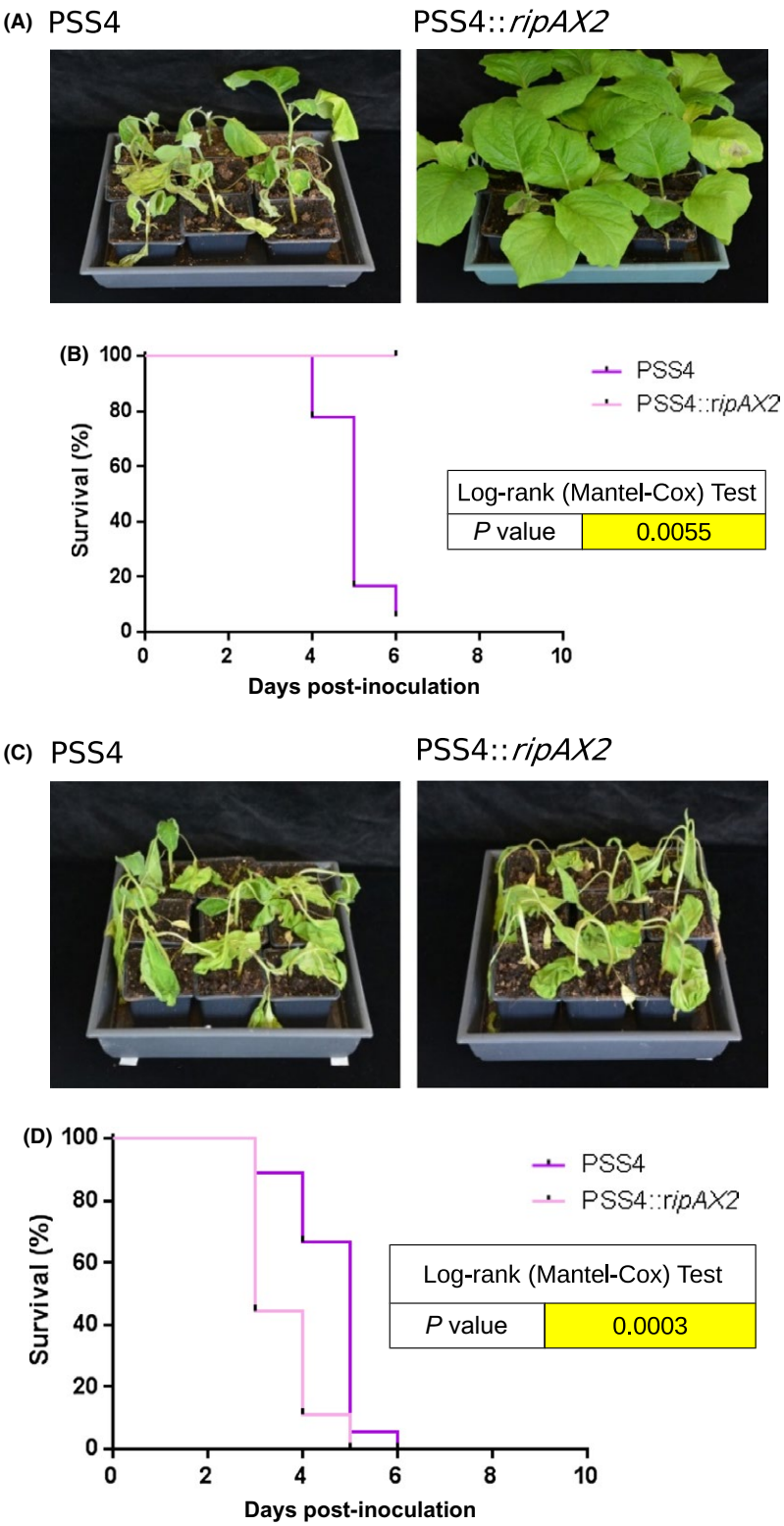


Fig. 2 The trans-complementation of the AG91-25 pathogenic strain PSS4 by RipAX2 permits AG91-25 resistance. (A) Photographs taken at 6 days post-inoculation. (B) Survival curves representing the wilting of AG91-25 eggplants after soil drenching inoculation [10^8 colony-forming units (CFU)/mL, 10 mL per plant] with wild-type PSS4 and PSS4::*ripAX2*. (C) Photographs taken at 6 days post-inoculation. The strains PSS4 and PSS4::*ripAX2* are able to wilt MM738 susceptible eggplants. (D) Survival curves representing the wilting of MM738 eggplants after root inoculation. Log-rank (Mantel–Cox) test *P* values compared with GMI1000 are shown beside the graphs for (B) and (D).

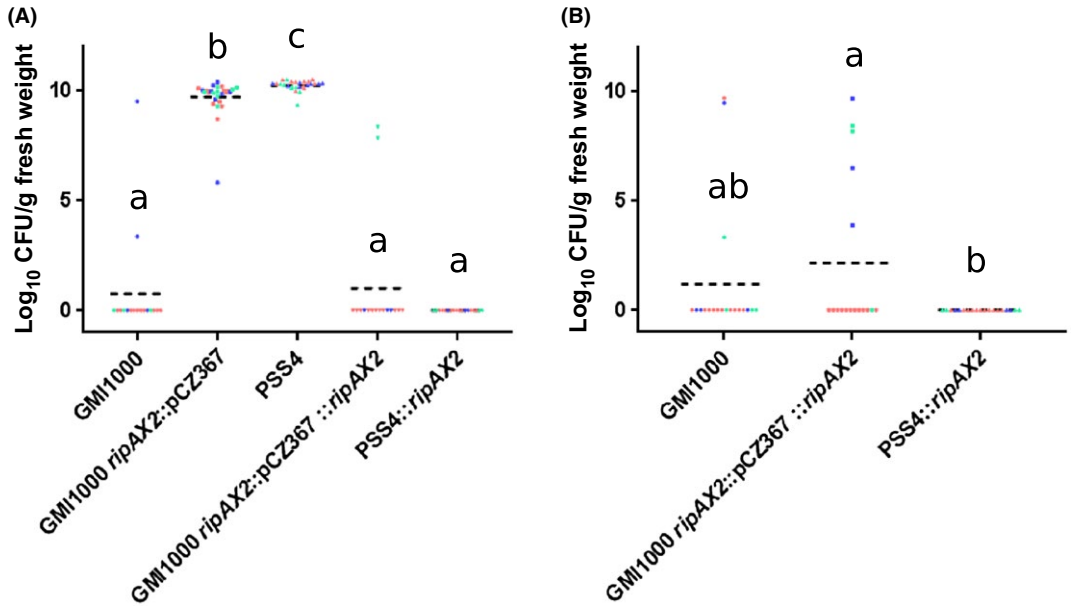


Fig. 3 *In planta* growth of *Ralstonia pseudosolanacearum* strains GMI1000, GMI1000 *ripAX2*::pCZ367, PSS4, GMI1000 *ripAX2*::pCZ367::*ripAX2* and PSS4::*ripAX2* inoculated on AG91-25 eggplants at 5 days (A) and 10 days (B) post-inoculation. Each strain was inoculated by soil drenching [~10^8 colony-forming units (CFU)/mL, 10 mL per plant]. Each point corresponds to the value obtained from a single plant. The three biological replicates are shown in different colours. If bacterial colonies were counted on plates, but their number was inferior to 10, the points were taken off as the actual bacterial quantity could not be assessed precisely. Statistical analyses for grouping were performed by Kruskal–Wallis test with $\alpha = 0.05$.

these plants showed wilting symptoms, suggesting that resistance did not occur in some rare cases. After stem injection, a high bacterial load was detected after 3 days in AG91-25 inoculated with GMI1000, GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 and GMI1000 *ripAX2*::pCZ367::*ripAX2* (Fig. 4). The levels of bacteria were not significantly different between plants injected with GMI1000 and GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 and high in all plants sampled, contrasting strongly with the results after root inoculation shown in Fig. 3. Furthermore, we observed wilting symptoms at 3 days after stem injection by all strains on some of the plants before destructive sampling (33% of AG91-25 inoculated with GMI1000, 53% of AG91-25 inoculated with GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 and 40% of AG91-25 inoculated with GMI1000 *ripAX2*::pCZ367::*ripAX2*), indicating that the bacteria had reached, colonized and clogged the xylem vessels of the stem after injection.

Collectively, these results indicate that the key biological process inducing resistance to bacterial multiplication most probably occurs before the stem multiplication stage.

The conserved putative Zn-finger domain is not critical for RipAX2-triggered immunity

The putative Zn-finger domain has been shown to be required for the immunity triggered by $RipAX2_{RS1000}$ (initially named Rip36) on *S. torvum* (Nahar *et al.*, 2014). $RipAX2_{RS1000}$ and $RipAX2_{GMI1000}$ have exactly the same amino acid sequence (Fig. S3, see Supporting Information). We generated the same point mutant (E149A) and showed that the integration of this mutated version (through the integrative plasmid pAM123) in both GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 and PSS4 backgrounds (inoculated by soil drenching) restored the avirulence phenotype on AG91-25 eggplant (Fig. 5A,B), unlike on *S. torvum* (Nahar *et al.*, 2014).

Biological replicates performed on AG91-25 and on the MM738 susceptible control gave similar results, as detailed in Figs S4 and S5 (see Supporting Information), respectively.

ripAX2 is highly prevalent in RSSC and is preferentially associated with phylotype I

The *ripAX2* gene was successfully amplified and sequenced in 68.1% of the world RSSC collection considered ($n = 91$). This proportion was lower (31.1%) in the RSSC genomes available in the RalstoT3E database ($n = 74$), most probably as a result of the difference in phylotype composition: our collection contains a majority of *R. pseudosolanacearum* phylotype I, whereas the RalstoT3E database contains a majority of *R. solanacearum* phylotype II and *R. syzygii* phylotype IV (Table 1). Based on the 15 strains common to both collections, polymerase chain reaction (PCR)-based and genome sequencing-based screenings gave highly concordant results (Table S3, see Supporting Information).

Because both collection compositions were unbalanced across phylotypes, we compared *ripAX2*-per-phylotype distributions using χ^2 tests. We observed that *ripAX2* was significantly

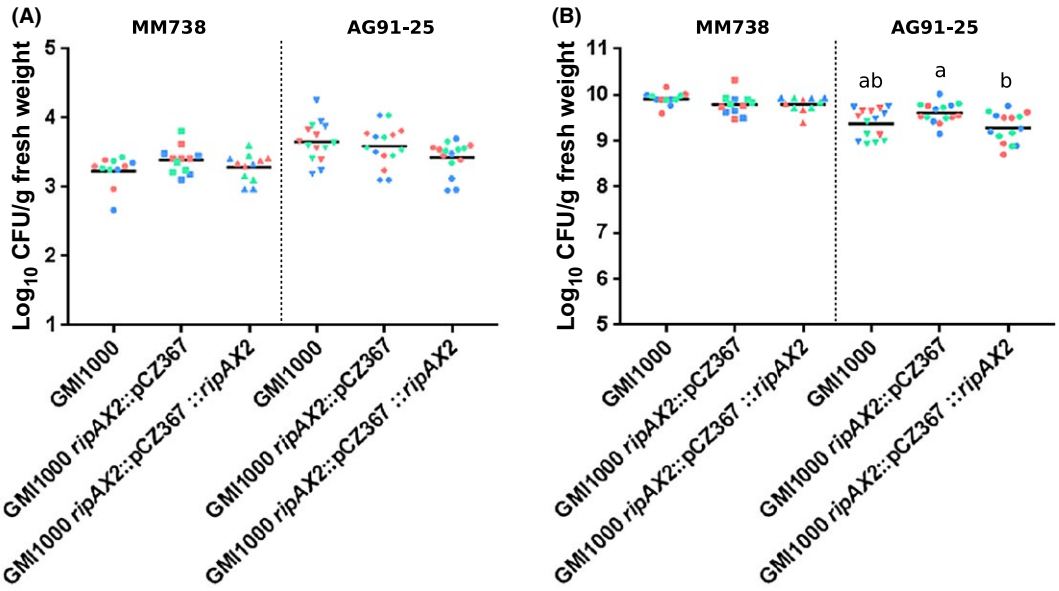


Fig. 4 *In planta* growth of *Ralstonia pseudosolanacearum* after stem injection of strains GMI1000, GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 and GMI1000 *ripAX2*::pCZ367::*ripAX2* on MM738 and AG91-25 eggplants, just after injection (A) and 3 days after injection (B). Each strain was inoculated by injection into the stem [10^6 colony-forming units (CFU)/mL, 10 µL per plant]. Each point corresponds to the value obtained from a single plant. The three biological replicates are shown in different colours. Statistical analyses for grouping were performed by Kruskal–Wallis test with $\alpha = 0.05$. No statistical differences were found just after injection by the different strains in MM738 and AG91-25. No statistical difference was found 3 days after injection in MM738.

more present in *R. pseudosolanacearum* phylotype I than expected in both collections, whereas it was significantly more absent in *R. syzygii* phylotype IV (Table 1). *ripAX2* was less commonly present in *R. solanacearum* phylotypes IIA and IIB, but this difference was not statistically supported. Hence, *ripAX2* seemed to be preferentially associated with phylotype I.

Focusing on phylotype I, in which sample sizes were highest, we assessed whether the *ripAX2* distribution could be associated with region of origin (defined as Africa, Asia or South America). Despite the low sample size, *RipAX2* seemed to be significantly less prevalent in South America (six strains of 12; χ^2 $P = 0.004$**).

Among 19 RipAX2 identified alleles, RipAX2$_{GMI1000}$ is the most prevalent

Although most *ripAX2* DNA sequences were 657 base pairs in length (219 amino acids), four were highly divergent (608 to 666 amino acids) and could not be aligned with the others. After the first 103 base pairs, the sequence amplified in RUN1546, RUN1740 and RUN1743 contained a very long insertion and several early stop codons, suggesting that these alleles code for non-functional proteins (Fig. S6, see Supporting Information). Meanwhile, the RUN1994 sequence was incomplete (206 amino acids), with also several early stop codons. Fifteen other RipAX2 alleles were identified (Fig. 6), among which seven could be considered as non-functional because of early stop codons generating a truncated protein by more than 20% of the reference effector protein (RipAX2$_{GMI1000}$). Amongst these 19 alleles, the 11 non-functional alleles were not considered in the analysis below.

Amongst the eight probably functional alleles, RipAX2$_{GMI1000}$ (coded HapAA22; Table S5, see Supporting Information) was the most prevalent, and found in both *R. pseudosolanacearum* phylotype I ($n = 40$) and *R. solanacearum* phylotype IIA ($n = 1$). Apart from RipAX2$_{GMI1000}$, all seven alleles were phylotype specific: three were specifically found in phylotype I (HapAA02, HapAA07, HapAA20), whereas two alleles were phylotype III specific (HapAA05 and HapAA08) and two were phylotype IIA specific (HapAA03 and HapAA06).

The analysis of the geographical distribution of the different RipAX2 alleles was hampered by the large sample imbalances between countries. To take into account these sample unbalances, we looked not only at the number of alleles per region, but also at the genotype-per-strain rate (also named G/N). Across the three regions represented in the collection, Africa displayed the highest G/N (meaning that, with a set amount of strains, more different alleles were found), followed by Asia and then South America (Fig. S7, see Supporting Information). The RipAX2$_{GMI1000}$ allele was prevalent within each region, and its distribution was not significantly associated with any country or region (Table S6, see Supporting Information). Apart from RipAX2$_{GMI1000}$, no other allele was found to be present in more than one region.

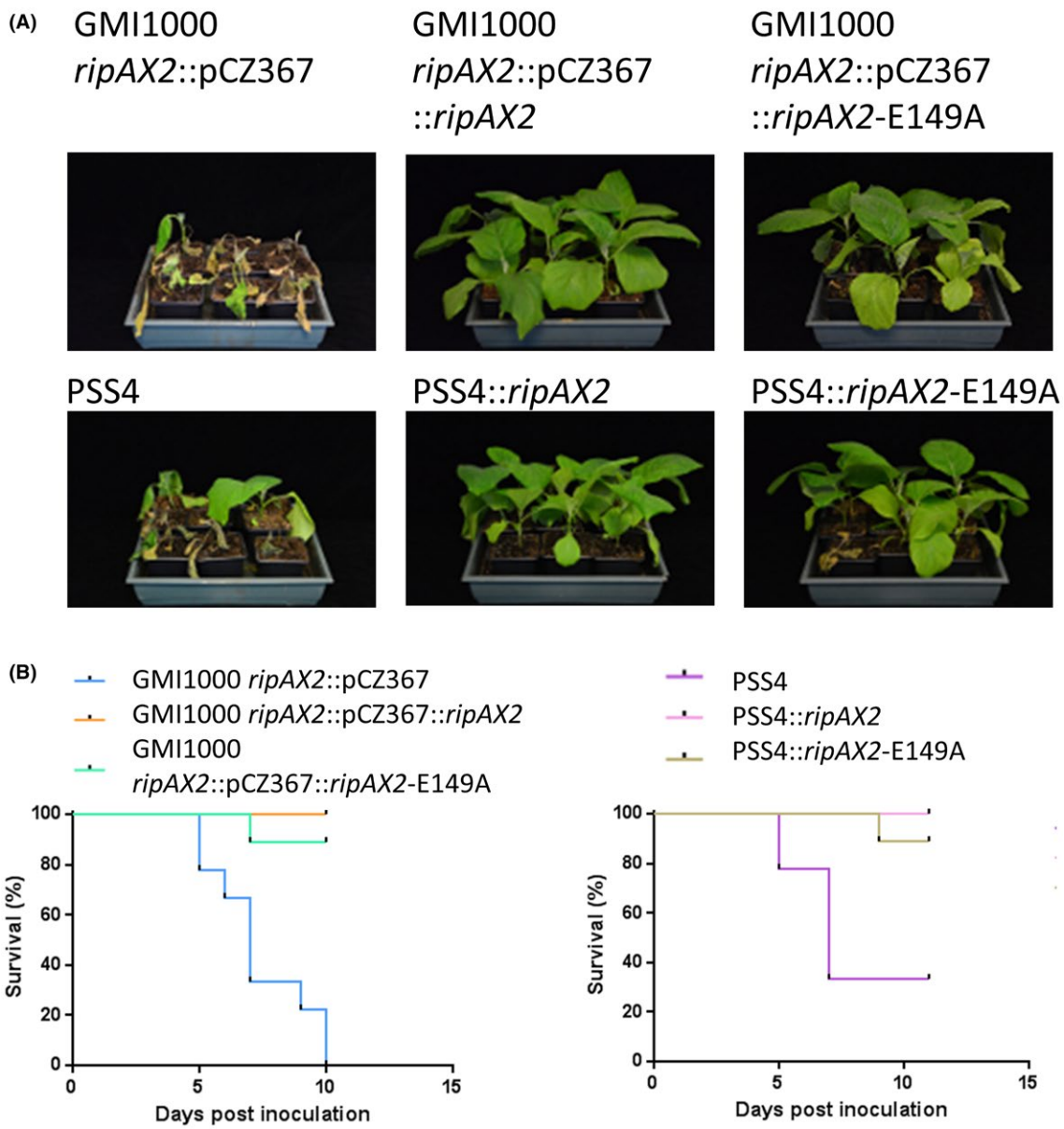


Fig. 5 RipAX2-triggered immunity does not require the conserved putative zinc-finger domain. (A) Photographs taken at 14 days post-inoculation for GMI1000 *ripAX2*::pCZ367, GMI1000 *ripAX2*::pCZ367::*ripAX2* and GMI1000 *ripAX2*::pCZ367::*ripAX2*-E149A, and at 15 days post-inoculation for PSS4, PSS4::*ripAX2* and PSS4::*ripAX2*-E149A, inoculated by soil drenching [~10^8 colony-forming units (CFU)/mL, 10 mL per plant]. Strains complemented with RipAX2 mutated in the putative zinc-finger domain (point mutation E149A) were not able to trigger disease on AG91-25 eggplants. (B) Survival curves representing the wilting of AG91-25 eggplants after *Ralstonia pseudosolanacearum* inoculation. Log-rank (Mantel–Cox) test shows that the wilting rates of plants inoculated with the GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 mutant and the two complemented strains (with RipAX2 or with RipAX2-E149A) are significantly different (*P* values of 0.004 and 0.009, respectively). The wilting rates of the plants inoculated with PSS4 and the two trans-complemented strains (with RipAX2 or with RipAX2-E149A) are also significantly different ($P < 0.0001$ and 0.0003, respectively). Each strain was inoculated by soil drenching on three replicates of nine plants.

DISCUSSION

We have demonstrated that $ripAX2_{GMI1000}$ is the determinant triggering resistance to RSSC in the AG91-25 eggplant line. Moreover, the naturally virulent PSS4 strain no longer triggers disease once it expresses the $RipAX2_{GMI1000}$ allele, without significantly affecting its aggressiveness on the susceptible control MM738. Our research was supported by previous results indicating that RipAX2 is associated with resistance in solanaceous plants (eggplant AG91-25, tomato Hawaii 7996; Pensec *et al.*, 2015).

Furthermore, we showed that plants recognizing RipAX2 largely excluded bacteria from entering the stems after root colonization, suggesting that the resistance occurs in the early

Table 1 Distribution of *ripAX2* within the *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC) world collection as estimated by polymerase chain reaction (PCR) sequencing (A), and within the RalstoT3E database of genomic sequences as estimated by automatic annotation (B). The gene was considered to be present if annotated as functional (PROT), frameshifted (FS) or pseudogene (PS). Results are expressed in strain numbers (percentage). Sample distributions per state (presence/absence) and phylotype were compared using a χ^2 test.

Phylotype	Absence	Presence	Total *(% of the collection)*	*P* value (χ^2 test)[†]
RSSC world collection (*n* = 91)				
I	12 (18.2)	54 (81.8)	66 (*72.5*)	0.017*
IIA	5 (55.6)	4 (44.4)	9 (*9.9*)	0.127^{NS}
IIB	10 (100.0)	0 (0)	10 (*11.0*)	<0.0001***
III	2 (33.3)	4 (66.7)	6 (*6.6*)	0.938^{NS}
Total	29 (31.9)	62 (68.1)	91	
P value (χ^2 test)[‡]	0.0002***	0.025*		
RSSC genomes (*n* = 74)				
I	13 (48.1)	14 (51.9)	27 (*36.5*)	0.019*
IIA	5 (83.3)	1 (16.7)	6 (*8.1*)	0.445^{NS}
IIB	16 (66.7)	8 (33.3)	24 (*32.4*)	0.811^{NS}
III	2 (100)	0 (0)	2 (*2.7*)	0.342^{NS}
IV	15 (100)	0 (0)	15 (*20.3*)	0.009**
Total	51 (68.9)	23 (31.1)	74	
P value (χ^2 test)[‡]	0.37^{NS}	0.05^{NS}		

[†]The H0 tested is: 'Respective frequencies of *ripAX2* presence and absence within each phylotype are equal to their expected values based on the total frequencies'.

[‡]The H0 tested is: 'Respective distributions of phylotypes within each *ripAX2* state (presence, absence) are equal to their expected values based on the total frequencies'.

NS, not significant; *significant ($0.05 > P \geq 0.01$); **highly significant ($0.01 > P \geq 0.001$); ***very highly significant ($P < 0.001$).

stages of infection. This resistance could occur anywhere from the infected roots to further root and lower stem colonization.

Recently, an orthologue of $ripAX2_{GMI1000}$ in the RS1000 strain ($ripAX2_{RS1000}$) has been shown to induce a strong hypersensitive response (HR) in the leaves of a wild relative of eggplant (*S. torvum* cv. *torubamubiga*), but not on eggplant (*Solanum melongena* cv. *senryo-nigou*) (Nahar *et al.*, 2014). However, as no *R* gene has been characterized to date in these two cultivars, the *R* gene involved in the recognition of $RipAX2_{RS1000}$ has not yet been identified. In this model, the recognition of the effector was dependent on the putative Zn-binding domain HEXXH. More precisely, the glutamic acid at position 149 was critical for the recognition of RipAX2 by the *S. torvum* immune system. We observed that this HEXXH domain was conserved within all the likely 'functional' alleles (i.e. predicted to code for a 219-amino-acid protein) identified in the RSSC, whereas the corresponding strains differed in virulence on AG91-25 eggplant. In addition, we experimentally demonstrated that the mutation E149A did not change its ability to trigger resistance on AG91-25 eggplant, indicating that this residue was not critical for this phenotype. Collectively, these results suggest that the RipAX2 elicitation of defences may involve different mechanisms in *S. torvum* leaves and *S. melongena* root infection. It will be interesting to study RipAX2 residues under selective pressure in order to test which protein features are critical for *S. melongena* AG91-25 resistance.

RipAX2 is the second known RSSC effector triggering eggplant resistance, the first being RipP2 (formerly named PopP2) recognized by *RE-bw* (Xi'ou *et al.*, 2014).

It remains to be determined which plant proteins specifically recognize RipAX2. It is tempting to speculate that the direct or indirect recognition of RipAX2 involves one of the genes located within the major resistance locus *EBWR9* (Salgon *et al.*, 2017). Indeed, strains controlled by the *EBWR9* locus tested so far (GMI1000, CMR134) carry a functional allele of *ripAX2*, whereas all *EBWR9*-uncontrolled strains carry no *ripAX2* (CFBP2957, CFBP3059, PSS4), or a non-functional copy of *ripAX2* (To10). *EBWR9* is located in a 3-cM zone, corresponding to an approximately 3-Mb (Lebeau *et al.*, 2013) interval, which has been reduced to 1.77 Mb and located on the long arm of chromosome 9 (Salgon *et al.*, 2017). Five candidate *R* genes have been identified in this region. The fine genetic mapping of this quantitative trait locus (QTL) is currently in progress (Salgon, 2017) to pave the way to gene cloning. Another way to determine the

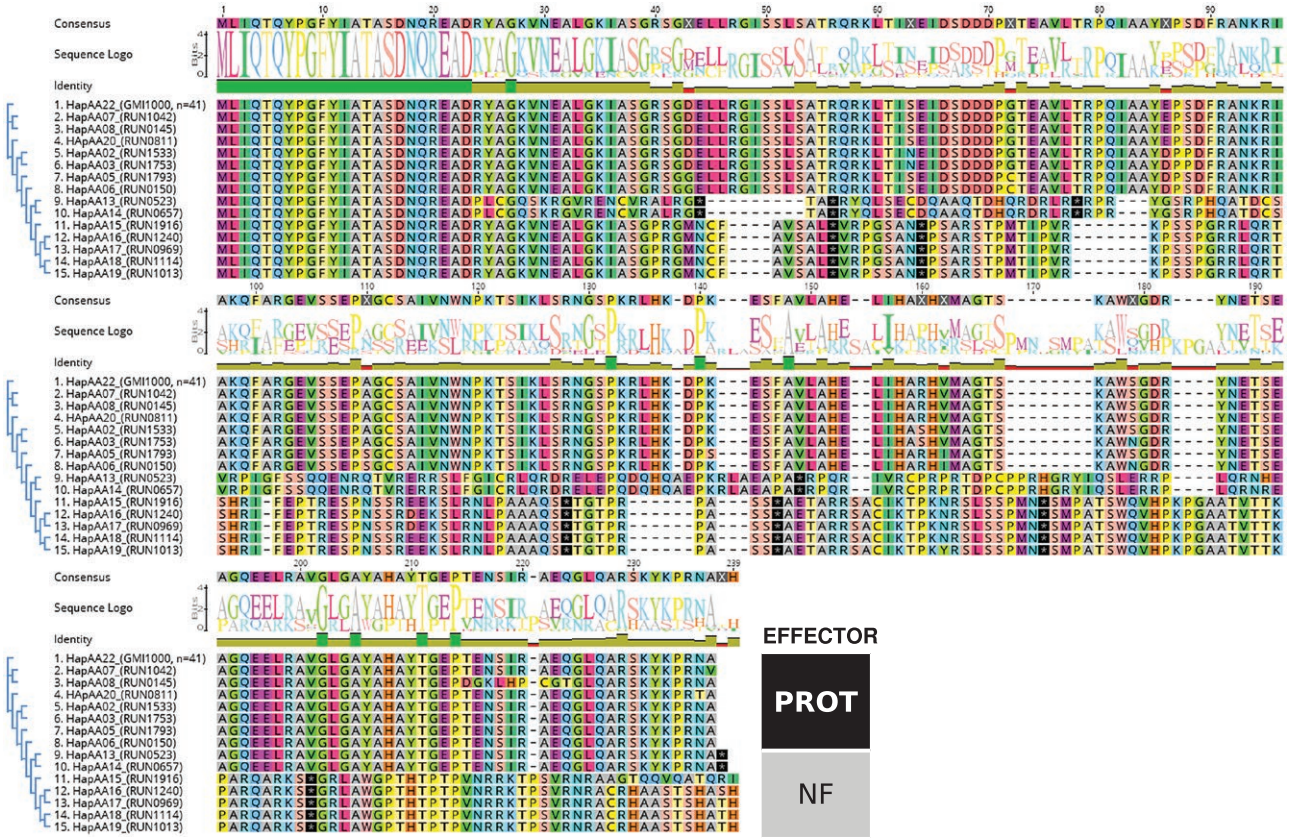


Fig. 6 Proteic alignment of 15 RipAX2 alleles (of 19) identified within the world *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC) collection. Each allele number is linked to its representative strain and to the number of strains in which it was found. Proteic sequences were aligned (MUSCLE with default settings) and clustered using the FastTree method, with optimization of the Gamma20 likelihood at 20 rate categories of sites. The zinc (Zn)-binding motif (HEXXH) described by Nahar et al. (2014) is marked by dark shading (positions 152–158). The effector sequence is considered to be non-functional (NF) if its length is less than 80% of the GMI1000 reference sequence (219 amino acids).

candidate genes involved in the recognition of RipAX2 would be to use reverse genetics: virus-induced gene silencing (VIGS) on eggplant (Liu *et al.*, 2012) and RNA interference (RNAi) have been used successfully to find the *R* genes involved in effector recognition in *Nicotiana benthamiana* (Brendolise *et al.*, 2017).

ripAX2 is a rather highly prevalent effector in the RSSC, as reflected by the observation that 68.1% of our strain collection carried an allele of this gene, but seems to be preferentially associated with phylotype I, absent in phylotype IV and rare in phylotype II. It is important to stress that future screenings of much larger collections, balanced across the different phylotypes infecting the Solanaceae, will allow a much more precise assessment of the distribution of *ripAX2* in natural diversity. Moreover, $RipAX2_{GMI1000}$ is the dominant allele in every region probed, suggesting that a large proportion of the pathogen population is controlled by AG91-25 eggplant. One may thus speculate that the deployment of the AG91-25 line or derived eggplant cultivars would provide efficient control of the prevalent populations. However, seven other potentially functional alleles have been found that may modulate the plant defence response. From our data, one strategy built by RSSC strains to bypass RipAX2-triggered plant resistance includes the loss of *ripAX2* (the PSS4 case) and the inactivation of the gene through frameshifts (the 11 probably non-functional alleles identified), but it is plausible that point mutations within the gene coding sequence or the alteration of gene expression through mutations in the promoter region could also lead to a loss of RipAX2 recognition. A deeper understanding of the RipAX2–eggplant interaction is needed: (i) to identify the critical residues for AG91-25 recognition and resistance, taking into account the natural variability detected; and (ii) to assess the possible variations in effector expression. Moreover, a global surveillance of RSSC populations will help to assess the respective frequencies of the different functional alleles. As this global screening considered RSSC populations that were not challenged by AG91-25 resistance, future research should address the evolution of RipAX2-containing populations submitted to AG91-25 resistance selection pressure.

To conclude, we have shown that RipAX2 triggers resistance on AG91-25 resistant eggplant, whose recognition occurs in the

early infection stages and may be mediated by an *R* gene present in the *ERs1*/*EBWR9* locus. This latter statement needs to be investigated further thanks to the generation of near-isogenic lines (NILs) carrying (or not) *EBWR9*, or by reverse genetic methods. Both approaches could allow the cloning of this gene and a better characterization of AG91-25 resistance to the RSSC.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant material

Two eggplant accessions (*S. melongena*) were used: the resistant eggplant AG91-25, also called MM960, and the susceptible eggplant MM738 (Ano *et al.*, 1991, 2002; Doganlar *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2009). Eggplant seeds were sown 4 weeks before inoculation and were then transplanted into $7 \times 7 \times 6\text{-cm}^3$ black plastic pots at 1 week after sowing. Four-week-old plants were transferred to a growth chamber at 90% relative humidity, with a day/night thermoperiod of 28 °C/24 °C and a 12-h light/12-h dark photoperiod.

Bacterial strains

The distribution of the *ripAX2* coding sequence within the RSSC was assessed on a world collection of 91 bacterial strains, gathering representatives of the species *R. pseudosolanacearum* (phylotypes I and III) and *R. solanacearum* (phylotypes IIA and IIB) (see Table S1 in Supporting Information). Because of its limited epidemiological importance in Solanaceae, *R. syzygii* ssp. *indonesiensis* (phylotype IV) was not considered in this screening. Strains were chosen following two criteria: (i) they were sampled from 13 geographical areas of agronomic importance, and/or containing international breeding stations, in Africa (Burkina Faso, Cameroon, Ivory Coast, South Africa), Asia and Indian Ocean (Reunion Island, India, Indonesia, Thailand, Philippines, Taiwan, Australia), and Caribbean and South America (French Guiana, Martinique); and (ii) they were mostly isolated from the Solanaceae. Some of these strains were screened for pathogenicity on MM738 and AG91-25, following the methodology described in N'Guessan *et al* (2012). All were able to trigger disease on MM738, but displayed different interaction profiles on AG91-25 resistant eggplant, ranging from being unable to colonize and wilt AG91-25 to highly pathogenic strains (Table S1).

Bacterial cultures and DNA extraction

From stock tubes stored at −80 °C, strains were revived in nutrient broth (one to two beads per 3 mL of broth) for 48 h at 28 °C, and then quadrant streaked (50 µL of broth) on Kelman's medium. Cultures were then multiplied from a single colony and suspended (one 10-µL loopful) in 1 mL of NaCl (0.5 M) for rinsing. Suspensions were then centrifuged (6000 g for 3 min) and pellets were stored at −20 °C until DNA extraction. Genomic DNA was extracted using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Charbonnières, France) following the manufacturer's recommendations. DNA concentration and quality were assessed using a NanoDrop® 8000 device. Bacterial DNAs were then diluted to 2 ng/µL and stored at −20 °C until use.

ripAX2 cloning and complementation constructs

The strain GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 has been obtained previously (Cunnac *et al.*, 2004). The complementation was generated by a double crossing-over insertion using a plasmid derived from the pRC toolkit (Monteiro *et al.*, 2012). The pNP329 plasmid (Wang *et al.*, 2016) was modified (*Acc*65i-*Bsr*GI fragment was removed) to generate pNP380. The *ripAX2* gene [coding sequence (CDS) flanked in 5′ by 300 bp and in 3′ by 949 bp] was subcloned from GMI1000 genomic DNA into pNP380 to generate the pNP384 plasmid. Starting from pNP384, the *ripAX2* CDS was point mutated to generate the equivalent of Rip36E149A (Nahar *et al.*, 2014) by site-directed mutagenesis using the following oligonucleotides: oAM277 (GGGCATGGATCAGTGCATGGGCGAGGACA) and oAM278 (TGTCCTCGCCCATGCACTGATCCATGCCC). This generated the plasmid pAM123. These plasmids were used to transform both GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 and the PSS4 strain.

Plant infection

Bacterial strains were grown overnight in BG medium and then diluted to an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 0.1 (~10^8 CFU/mL) with water to obtain the inocula. For each plant, a deep 'L'-shaped cut was made in the soil with a sharp scalpel in order to cut the roots. Ten millilitres of inoculum were poured into the 'L'-shaped open soil surface. The symptoms were scored daily on a 0–4 scale (no wilting to complete wilting). For stem bacterial load quantification, 1 cm of stem was sampled above the cotyledons, weighed and the surface was disinfected in a 70% alcohol solution, followed by rinsing in water. It was then cut into six parts and placed into 1 mL of water for a minimum of 30 min to allow the bacteria to diffuse. Appropriate dilutions were then plated in order to evaluate the bacterial load.

For stem injection, 10 µL of a bacterial suspension at 10^6 CFU/mL were injected above the cotyledons with a microsyringe. The microsyringe was sterilized between each plant by pumping up and down with ethanol and then four times with water. For sampling, 1 cm of stem surrounding the injection point was taken, weighed, surface sterilized, cut into pieces and placed into 1 mL of water to diffuse. Appropriate dilutions were plated.

ripAX2 prevalence and allele diversity in RSSC

The prevalence and diversity of the *ripAX2* gene were addressed on a 91-strain RSSC collection described above, taking advantage of the available genomic sequences (Ailloud *et al.*, 2015;

Guinard *et al.*, 2016; Remenant *et al.*, 2010; Salanoubat *et al.*, 2002), as well as using PCR screening.

The distribution of the *ripAX2* coding sequence within the RSSC was also assessed on a world collection of 74 whole-genome sequences (Table S2, see Supporting Information), publicly available and harboured in the RalstoT3E database (https://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/site/prj/T3Ev3/). *ripAX2* was assessed as 'present in the strain as one copy', 'present but frameshifted in the strain', 'missing in the strain' or 'present as a pseudogene copy in the strain'.

Design of *ripAX2* PCR primers

The $ripAX2_{GMI1000}$ coding sequence was downloaded from the website 'RalstoT3E' (https://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/site/prj/T3Ev3/) and BLAST-queried on the MaGe interface (Magnifying Genomes, https://genoscope.cns.fr/microscope/mage) to search for gene orthologues and to extract the 400-bp upstream and downstream regions. Orthology search was performed using the following parameters: (i) sequence identity above 80%; and (ii) minimal (MinLrap) and maximal (MaxLrap) ratios of alignment lengths above 90%.

Gene and flanking regions of $ripAX2_{GMI1000}$, $ripAX2_{Y45}$ and $ripAX2_{MOLK2}$ were concatenated using Geneious v5.5 (https://www.geneious.com, Kearse *et al.*, 2012) and then aligned using ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). External primers were designed on the consensus sequences of the flanking regions of $ripAX2_{GMI100}$ and $ripAX2_{Y45}$ only (phylotype I) using the Primer3 algorithm under Geneious, with the following parameters: annealing temperature around 60 °C and primer sizes ranging from 18 to 25 nucleotides. Details of the primer sequences are given in Table S4 (see Supporting Information).

Gene amplification and sequencing

For each strain, putative effectors were PCR amplified on 20 ng of sample DNA template. PCRs (total volume of 25 µL) consisted of 1 U of Red Goldstar Taq DNA polymerase, 25 pmol of each primer, 1 × PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM of each deoxynucleotide (dNTP) and 1 × Q-solution. The reaction was cycled in an Eppendorf (Montesson, France) Mastercycler Gradient thermocycler or an Applied Biosystems (Villebon-sur-Yvette, France) GenAmp PCR System 9700 thermocycler with a first denaturation step at 96 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 30 s at 95 °C, 60 s at 55–57 °C (see Table S2) and 60 s at 72 °C, and a final elongation step of 10 min at 72 °C. All PCR products were resolved on a 2% agarose gel and visualized with UV light after ethidium bromide staining (5 µg/mL); fragment sizes were estimated in comparison with a 100-bp DNA ladder (New England BioLabs, Evry, France).

PCR products were vacuum dehydrated and sent to Beckman Coulter Genomics (Takeley, Essex, UK) for further purification and double-strand sequencing using PCR primers as sequencing primers. Raw sequences from both strands were assembled using Geneious v5.5 to generate consensus sequences; all ambiguous sequences were reamplified and resequenced. Alignments were carried out using the ClustalW alignment tool under Geneious, together with the reference sequences (GMI1000, RS1000, MOLK2).

Sequence extremities were trimmed on the basis of the sequence quality and reading frame, and to match the gene entire length. In some cases, the entire gene sequence was obtained by assembling sequences obtained from both external and internal primers. Each strain was amplified at least twice.

ACCESSION NUMBERS

The DNA sequences described in this article were deposited in GenBank under the numbers MF055715–MF055746. Details are given in Table S3.

ACKNOWLEDGEMENTS

Edith Lallemand-Mamosa, Sylvain Lebon and Jean-Michel Baptiste are greatly acknowledged for their excellent technical support. We wish to thank Professors Yuki Ichinose (Okayama University, Okayama, Japan) and Takafumi Mukaihara [Research Institute for Biological Sciences (RIBS), Okayama, Japan] for sharing their anti-RipAX2 antibody. We also thank Sebastien Cunnac for critical reading of the first version of this article.

J.G.'s PhD grant was financially supported by a fellowship from both CIRAD and the University of la Réunion, by the projects 'GENETOM3' and 'BSV2.1' (FEDER project financed by the European Union and Région Réunion), by the CASDAR project RESAUBER ('Sustainable management of eggplant resistances to bacterial wilt', French Ministry of Agriculture) and by the Agreenium Foundation through the EIR-A program. A.M. and F.L. were funded by a grant from the French Ministry of National Education and Research. This work was also supported by the French Laboratory of Excellence project 'TULIP' (ANR-10-LABX-41).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

Ailloud, F., Lowe, T., Cellier, G., Roche, D., Allen, C. and Prior, P. (2015) Comparative genomic analysis of Ralstonia solanacearum reveals candidate genes for host specificity. *BMC Genomics*, **16**(1), 270. https://doi.org/10.1186/s12864-015-1474-8.

Ano, G., Hebert, Y., Prior, P. and Messiaen, C.M. (1991) A new source of resistance to bacterial wilt of eggplants obtained from a cross – Solanum-aethiopicum L × Solanum-melongena L. *Agronomie*, **11**, 555–560.

Ano, G., Anais, G. and Chidiac, A. (2002) Creation and use of disease-resistant varieties in Guadeloupe [France]. - Creation de varietes resistantes aux maladies en Guadeloupe [France]. Elements indispensables de diversification agricole. *Phytoma-La Défense des Végétaux,* **551**, 36–37.

Ben, C., Debelle, F., Berges, H., Bellec, A., Jardinaud, M., Anson, P., Huguet, T., Gentzbittel, L. and Vailleau, F. (2013) *MtQRRS1*, an R-locus required for *Medicago truncatula* quantitative resistance to *Ralstonia solanacearum*. *New Phytol.* **199**, 758–772.

Bernoux, M., Timmers, T., Jauneau, A., Briere, C., de Wit, P., Marco, Y. and Deslandes, L. (2008) RD19, an *Arabidopsis* cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum PopP2* effector. *Plant Cell*, **20**, 2252–2264.

Boyd, L.A., Ridout, C., O'Sullivan, D.M., Leach, J.E. and Leung, H. (2013) Plant–pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends Genet.* **29**, 233–240.

Brendolise, C., Montefiori, M., Dinis, R., Peeters, N., Storey, R.D. and Rikkerink, E.H. (2017) A novel hairpin library-based approach to identify NBS-LRR genes required for effector-triggered hypersensitive response in Nicotiana benthamiana. *Plant Methods*, **13**, 32. https://doi.org/10.1186/s13007-017-0181-7.

Buttner, D. (2016) Behind the lines—actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. *FEMS Microbiol. Rev.* **40**, 894–937.

Clarke, C.R., Studholme, D.J., Hayes, B., Runde, B., Weisberg, A., Cai, R., Wroblewski, T., Daunay, M.C., Wicker, E., Castillo, J.A. and Vinatzer, B.A. (2015) Genome-enabled phylogeographic investigation of the quarantine pathogen *Ralstonia solanacearum* Race 3 Biovar 2 and screening for sources of resistance against its core effectors. *Phytopathology*, **105**, 597–607.

Cunnac, S., Occhialini, A., Barberis, P., Boucher, C. and Genin, S. (2004) Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in Ralstonia solanacearum: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. *Mol. Microbiol.* **53**, 115–128.

Daverdin, G., Rouxel, T., Gout, L., Aubertot, J.N., Fudal, I., Meyer, M., Parlange, F., Carpezat, J. and Balesdent, M.H. (2012) Genome structure and reproductive behaviour influence the evolutionary potential of a fungal phytopathogen. *PLoS Pathog.* **8**(11), e1003020. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003020.

Denny, T.P. (2006) Plant pathogenic *Ralstonia* species. In: Plant-associated bacteria (Gnanamanickam, S.S. ed.), pp. 573–644. Dordrecht: Springer.

Deslandes, L. and Genin, S. (2014) Opening the *Ralstonia solanacearum* type III effector tool box: insights into host cell subversion mechanisms. *Curr. Opin. Plant Biol.* **20C**, 110–117.

Deslandes, L., Olivier, J., Theulieres, F., Hirsch, J., Feng, D., Bittner, E.P, Beynon, J., Marco, Y. and Feng, D. (2002) Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2404–2409.

Doganlar, S., Frary, A., Ku, H.M. and Tanksley, S.D. (2002) Mapping quantitative trait loci in inbred backcross lines of Lycopersicon pimpinellifolium (LA1589). *Genome* **45**(6), 1189–1202.

Fegan, M. and Prior, P. (2005) How complex is the "Ralstonia solanacearum species complex". In: Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex (Allen, C., Prior, P. and Hayward, A.C. eds.), pp. 449–462. Madison, WI: APS Press.

Guinard, J., Vinatzer, B.A., Poussier, S., Lefeuvre, P. and Wicker, E. (2016) Draft genome sequences of nine strains of *Ralstonia solanacearum* differing in virulence to eggplant (*Solanum melongena*). *Genome Announc.* **4**(1), e01415–15. https://doi.org/10.1128/genomeA.01415-15.

Hayward, A.C. (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **29**, 65–87.

Hayward, A.C. (1994) The hosts of Pseudomonas solanacearum. In: Bacterial wilt – the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum (Hayward, A.C. and Hartman, G.L., ed.), pp. 9–24. Wallingford, Oxfordshire: CAB International.

Jones, J.D. and Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature*, **444**, 323–329.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P. and Drummond, A. (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, **28**(12), 1647–1649. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199.

Kiyosawa, S. (1982) Genetics and epidemiological modeling of breakdown of plant disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **20**, 93–117.

Le Roux, C., Huet, G., Jauneau, A., Camborde, L., Tremousaygue, D., Kraut, A., Zhou, B., Levaillant, M., Adachi, H., Yoshioka, H., Raffaele, S., Berthome, R., Coute, Y., Parker, J.E. and Deslandes, L. (2015) A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity. *Cell*, **161**, 1074–1088.

Lebeau, A. (2010) Résistance de la tomate, l'aubergine et le piment à *Ralstonia solanacearum*: interactions entre les géniteurs de résistance et la diversité bactérienne, caractérisation et cartographie des facteurs génétiques impliqués chez l'aubergine. PhD Thesis, Université de la Réunion. Saint Denis de la Réunion, Reunion Island, France.

Lebeau, A., Daunay, M.C., Frary, A., Palloix, A., Wang, J.F., Dintinger, J., Chiroleu, F., Wicker, E. and Prior, P. (2011) Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology*, **101**, 154–165.

Lebeau, A., Gouy, M., Daunay, M., Wicker, E., Chiroleu, F., Prior, P., Frary, A. and Dintinger, J. (2013) Genetic mapping of a major dominant gene for resistance to *Ralstonia solanacearum* in eggplant. *Theor. Appl. Genet.* **126**, 143–158.

Liu, H., Fu, D., Zhu, B., Yan, H., Shen, X., Zuo, J., Zhu, Y. and Luo, Y. (2012) Virus-induced gene silencing in eggplant (Solanum melongena). *J. Integr. Plant Biol.* **54**, 422–429.

Lohou, D., Turner, M., Lonjon, F., Cazalcb, A., Peeters, N., Genin, S. and Vailleau, F. (2014) HpaP modulates type III effector secretion in *Ralstonia solanacearum* and harbours a substrate specificity switch domain essential for virulence. *Mol. Plant Pathol.* **15**, 601–614.

McDonald, B.A. and Linde, C. (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **40**, 349–379.

Montarry, J., Corbiere, R., Lesueur, S., Glais, I. and Andrivon, D. (2006) Does selection by resistant hosts trigger local adaptation in plant–pathogen systems? *J. Evol. Biol.* **19**, 522–531.

Monteiro, F., Sole, M., van Dijk, I. and Valls, M. (2012) A chromosomal insertion toolbox for promoter probing, mutant complementation, and pathogenicity studies in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **25**, 557–568.

Moury, B. (2010) A new lineage sheds light on the evolutionary history of *Potato virus Y*. *Mol. Plant Pathol.* **11**, 161–168.

Nahar, K., Matsumoto, I., Taguchi, F., Inagaki, Y., Yamamoto, M., Toyoda, K., Shiraishi, T., Ichinose, Y. and Mukaihara, T. (2014) *Ralstonia solanacearum* type III secretion system effector Rip36 induces a hypersensitive response in the nonhost wild eggplant *Solanum torvum*. *Mol. Plant Pathol.* **15**, 297–303.

N'Guessan, A.C. (2013) Phylogénie, structure génétique et diversité de virulence de *Ralstonia solanacearum*, agent du flétrissement bactérien, en Côte d'Ivoire. PhD Thesis, Université Félix Houphouët-Boigny (Cocody)-Abidjan. Abidjan, Côte d'Ivoire.

N'Guessan, C.A., Abo, K., Fondio, L., Chiroleu, F., Lebeau, A., Poussier, S., Wicker, E. and Kone, D. (2012) So near and yet so far: the specific case of *Ralstonia solanacearum* populations from Cote d'Ivoire in Africa. *Phytopathology*, **102**, 733–740.

Palloix, A., Ayme, V. and Moury, B. (2009) Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytol.* **183**, 190–199.

Pensec, F., Lebeau, A., Daunay, M., Chiroleu, F., Guidot, A. and Wicker, E. (2015) Towards the identification of type III effectors associated with *Ralstonia solanacearum* virulence on tomato and eggplant. *Phytopathology*, **105**, 1529–1544.

Remenant, B., Coupat-Goutaland, B., Guidot, A., Cellier, G., Wicker, E., Allen, C., Fegan, M., Pruvost, O., Elbaz, M., Calteau, A., Salvignol, G., Mornico, D., Mangenot, S., Barbe, V., Medigue, C. and Prior, P. (2010) Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics*, **11**(379), 1–16. https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-379.

Safni, I., Cleenwerck, I., De Vos, P., Fegan, M., Sly, L. and Kappler, U. (2014) Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii subsp. syzygii subsp.nov.*, *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii subsp. indonesiensis subsp. nov.*, banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii subsp. celebesensis subsp. nov.* and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**, 3087–3103.

Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J.C., Cattolico, L., Chandler, M., Choisne, N., Claudel Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., and Levy, M., Weissenbach, J. and Boucher, C.A. (2002) Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*, **415**, 497–502.

Salgon, S. (2017) Déterminisme génétique de la résistance au flétrissement bactérien chez l'aubergine et application en sélection variétale [Genetic determinism of resistance to bacterial wilt in eggplant and applications in plant breeding]. PhD Thesis, Université de la Réunion. Saint Pierre, Reunion Island.

Salgon, S., Jourda, C., Sauvage, C., Daunay, M.-C., Reynaud, B., Wicker, E. and Dintinger, J. (2017) Eggplant resistance to the *Ralstonia solanacearum* species complex involves both broad-spectrum and strain-specific quantitative trait loci. *Front. Plant Sci.* **8**, 828. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00828.

Stukenbrock, E.H. and McDonald, B.A. (2008) The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**, 75–100.

Tasset, C., Bernoux, M., Jauneau, A., Pouzet, C., Briere, C., Kieffer-Jacquinod, S., Rivas, S., Marco, Y. and Deslandes, L. (2010) Autoacetylation of the *Ralstonia solanacearum* effector PopP2 targets a lysine residue essential for RRS1-R-mediated immunity in *Arabidopsis*. *Plos Pathogens*, **6**(11), e1001202. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001202.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680.

Turner, M., Jauneau, A., Genin, S., Tavella, M.J., Vailleau, F., Gentzbittel, L. and Jardinaud, M.F. (2009) Dissection of bacterial wilt on *Medicago truncatula* revealed two type III secretion system effectors acting on root infection process and disease development. *Plant Physiol.* **150**, 1713–1722.

Vailleau, F., Sartorel, E., Jardinaud, M.F., Chardon, F., Genin, S., Huguet, T., Gentzbittel, L. and Petitprez, M.A. (2007) Characterization of the interaction between the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* and the model legume plant *Medicago truncatula*. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **20**, 159–167.

Vleeshouwers, V.G. and Oliver, R.P. (2014) Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **27**, 196–206.

Wang, K., Remigi, P., Anisimova, M., Lonjon, F., Kars, I., Kajava, A., Li, C.H., Cheng, C.P., Vailleau, F., Genin, S. and Peeters, N. (2016) Functional assignment to positively selected sites in the core type III effector RipG7 from Ralstonia solanacearum. *Mol. Plant Pathol.* **17**, 553–564.

Wicker, E., Lefeuvre, P., de Cambiaire, J.C., Lemaire, C., Poussier, S. and Prior, P. (2012) Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *ISME J.* **6**, 961–974.

Wu, F.N., Eannetta, N.T., Xu, Y.M. and Tanksley, S.D. (2009) A detailed synteny map of the eggplant genome based on conserved ortholog set II (COSII) markers. *Theor. Appl. Genet.* **118**, 927–935.

Xi'ou, X., Bihao, C., Guannan, L., Jianjun, L., Qinghua, C., Jin, J. and Yujing, C. (2014) Functional characterization of a putative bacterial wilt resistance gene (RE-bw) in eggplant. *Plant Mol. Biol. Rep.* **33**, 1058–1073.

Zeigler, R.S., Tohme, J., Nelson, R., Levy, M. and Correavictoria, F.J. (1994) Lineage exclusion – a proposal for linking blast population analysis to resistance breeding. In: (Zeigler, R.S., Leong, S.A. and Teng, P.S., eds.), pp. 267–292. Wallingford, Oxfordshire: CAB International.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site:

Fig. S1 Kaplan–Meier survival curves representing the wilting of AG91-25 plants inoculated with the strains GMI1000, GMI1000 *ripAX2*::pCZ367, GMI1000 *ripAX2*::pCZ367::*ripAX2*, PSS4 and PSS4::*ripAX2* in two supplemental replicates (12 and 22 plants per strain, respectively). Log-rank (Mantel–Cox) tests are given with *P* value.

Fig. S2 Kaplan–Meier survival curves observed on MM738 plants (susceptible control) inoculated with strains GMI1000, GMI1000 *ripAX2*::pCZ367, GMI1000 *ripAX2*::pCZ367::*ripAX2*, PSS4 and PSS4::*ripAX2* in one supplemental replicate. Log-rank (Mantel–Cox) tests are given with *P* value.

Fig. S3 Alignment of the RipAX2 protein alleles from GMI1000, RS1000 and MOLK2, and their percentages of identity.

Fig. S4 Kaplan–Meier survival curves observed on AG91-25 plants inoculated with strains GMI1000 *ripAX2*::pCZ367, GMI1000 *ripAX2*::pCZ367::*ripAX2*, GMI1000 *ripAX2*::pCZ367::*ripAX2*-E149A, PSS4, PSS4::*ripAX2* and PSS4::*ripAX2*-E149A in two supplemental replicates (22 plants and 18 plants per strain for each respective replicate). Log-rank (Mantel–Cox) tests are given with *P* value.

Fig. S5 Kaplan–Meier survival curves observed on MM738 plants inoculated with strains GMI1000 *ripAX2*::pCZ367, GMI1000 *ripAX2*::pCZ367::*ripAX2*, GMI1000 *ripAX2*::pCZ367::*ripAX2*-E149A, PSS4, PSS4::*ripAX2* and PSS4::*ripAX2*-E149A in

three replicates. Log-rank (Mantel–Cox) tests are given with *P* value.

Fig. S6 DNA alignment of the reference *ripAX2* alleles (GMI1000 and RS1000) with the long *ripAX2* alleles amplified within the phylotype I Ivorian strains RUN1546 (sequevar 13), RUN1740 and RUN1743 (sequevar 31), and in the Guianese phylotype IIA RUN1994 (sequevar 41). Alignments were performed using MUSCLE under GENEIOUS v5.5. Each strain is represented by its nucleotide sequence (upper line) and proteic sequence (lower line). Black squares indicate stop codons.

Fig. S7 Geographical distribution of the 19 RipAX2 alleles, either functional (PROT) or non-functional (NF), across regions within the phylotype I strains. The heatmap was built with the R package pheatmap, based on Euclidean distances between observations; the clusters were calculated using the Ward method. For each region, the number of RipAX2 alleles (G) and phylotype I strains (N) are presented. 'Africa' gathers Burkina-Faso, Cameroon, Ivory Coast, Reunion Island and South Africa; 'Asia' gathers Australia, India, Indonesia, Philippines, Taiwan and Thailand; 'South America' gathers French Guiana and Martinique. The heatmap values correspond to the numbers of strains.

Table S1 Bacterial strains of the *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC) tested for the presence of the *ripAX2* coding sequence. Phylotype I and III strains belong to the species *R. pseudosolanacearum*, and phylotype IIA and IIB strains belong to the species *R. solanacearum.*

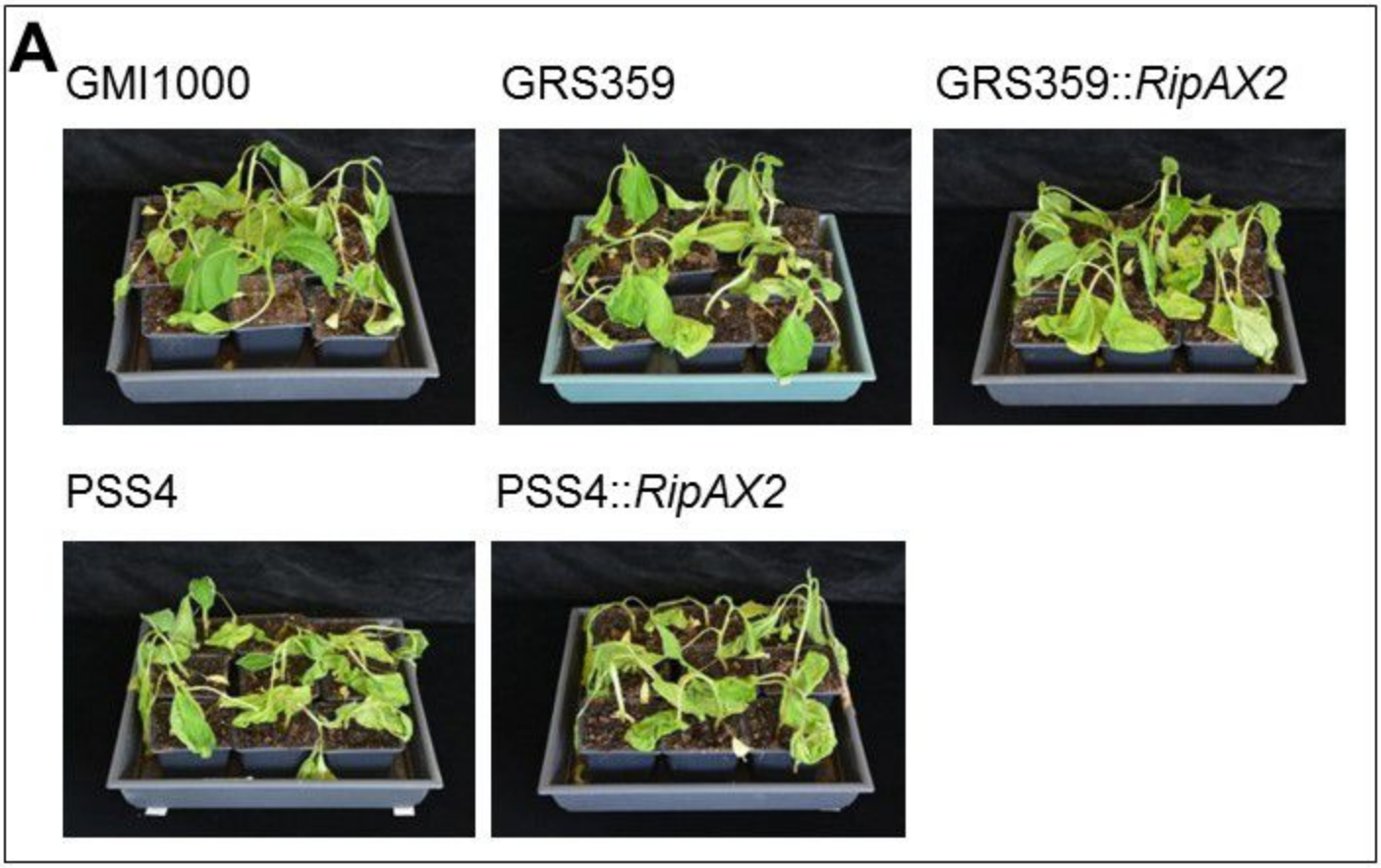
Table S2 Distribution of *ripAX2* within the 74 *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC) genomes harboured in the RalstoT3E database. Strains are ranked by phylotype and code. Phylotypes I and III are grouped within *R. pseudosolanacearum*, phylotypes IIA and IIB within *R. solanacearum* and phylotype IV within *R. syzygii*. The *ripAX2* type III effector is present as a complete sequence (PROT), frameshifted (FS), pseudogenized (PS) or absent (NO).

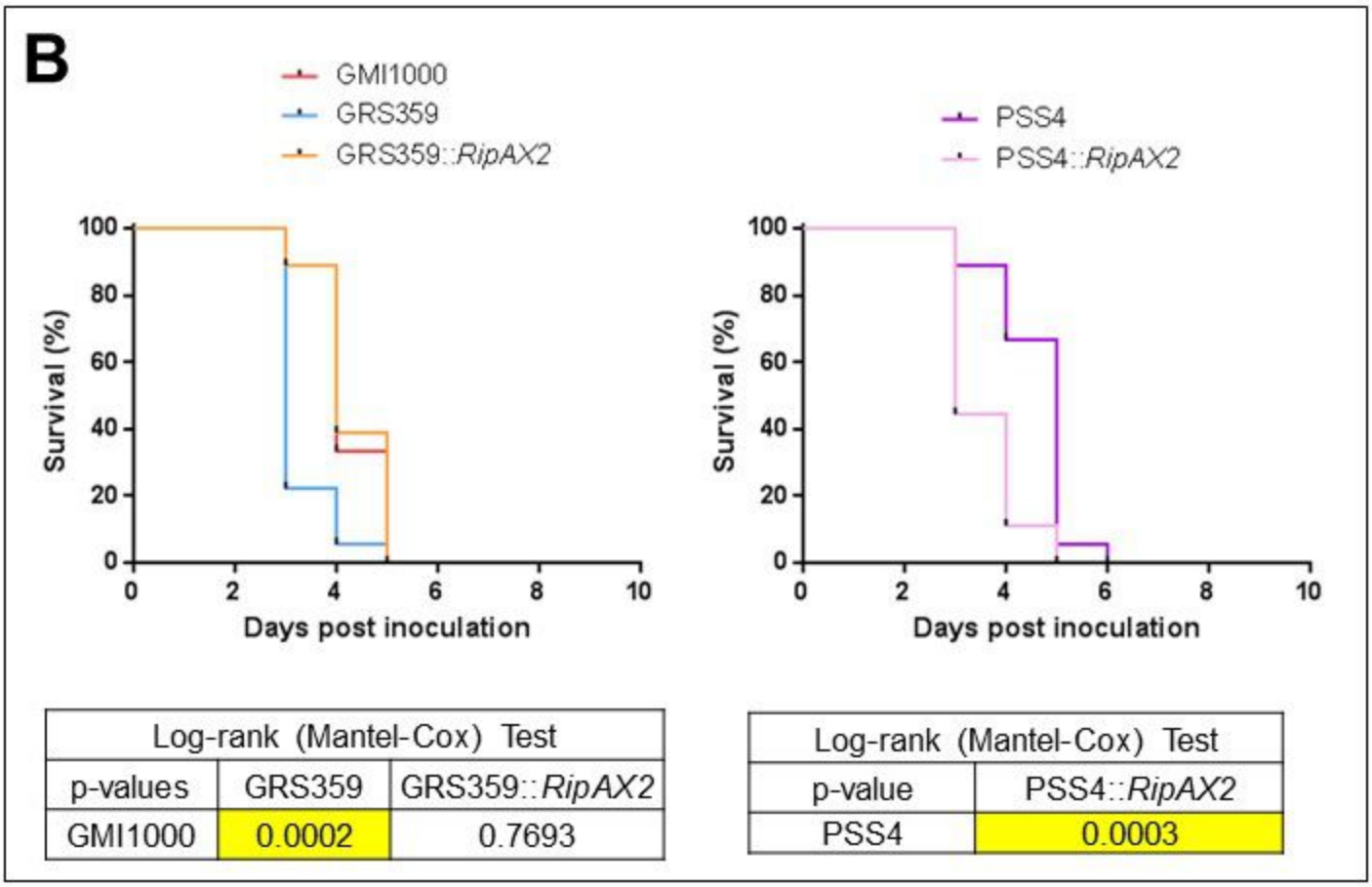
Table S3 Comparison of *ripAX2* distribution, assessed by polymerase chain reaction (PCR) amplification or genome sequencing, in the 15 strains common to our collection and the RalstoT3E database. The gene was present (1), frameshifted (FS) or absent (0).

Table S4 External and internal primers designed to amplify the *ripAX2* coding sequence. Both external and internal primers were designed on the alignment of GM1000 and RS1000 *ripAX2* gene and neighbouring regions.

Table S5 Bacterial strains of the *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC) with their host of isolation, nucleotidic and proteic RipAX2 alleles, and GenBank accession numbers.

Table S6 Specificities in distributions of the RipAX2 protein alleles (Hap_AA) across regions, as assessed by χ^2 tests. (A) Distribution of each allele across regions. Status is 'absence' (ABS), 'functional' (PROT) or 'non-functional' (NF). (B) Distribution of each region across alleles.



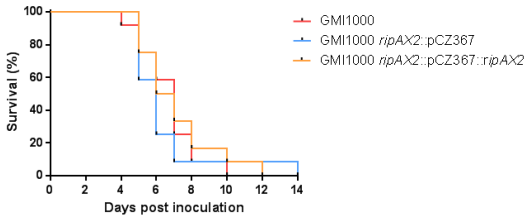


Log-rank (Mantel-Cox) Test		
p-values	GRS359	GRS359::*RipAX2*
GMI1000	0.0002	0.7693

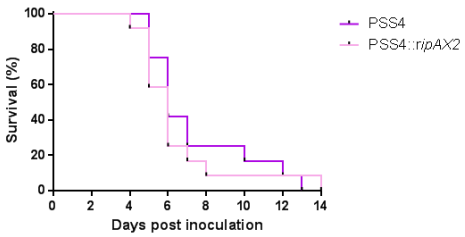
Log-rank (Mantel-Cox) Test	
p-value	PSS4::*RipAX2*
PSS4	0.0003

Figure S1. The RipAX2-triggered eggplant resistance is specific to AG91-25. (A) Pictures taken 6 DPI. All strains, whatever their RipAX2 content, are able to trigger disease on MM738 susceptible plants. (B) Kaplan-Meir survival curves representing the wilting of the MM738 eggplants after inoculation (18 plants per strain). Log-rank (Mantel-Cox) test shows that the wilting rates of the plants inoculated with the different strains are not significantly different.

Repetition 2



Log-rank (Mantel-Cox) Test		
p-values	GMI1000 *ripAX2*::pCZ367	GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 ::*ripAX2*
GMI1000	0.4511	0.6094



Log-rank (Mantel-Cox) Test	
p-value	PSS4::*ripAX2*
PSS4	0.6005

Figure S2. Kaplan-Meier survival curves observed on MM738 plants (susceptible control) inoculated with strains GMI1000, GMI1000 *ripAX2*::pCZ367, GMI1000 *ripAX2*::pCZ367::*ripAX2*, PSS4, and PSS4::*ripAX2*, in one supplemental replicate. Log-rank (Mantel-Cox) Test are given with p-value.

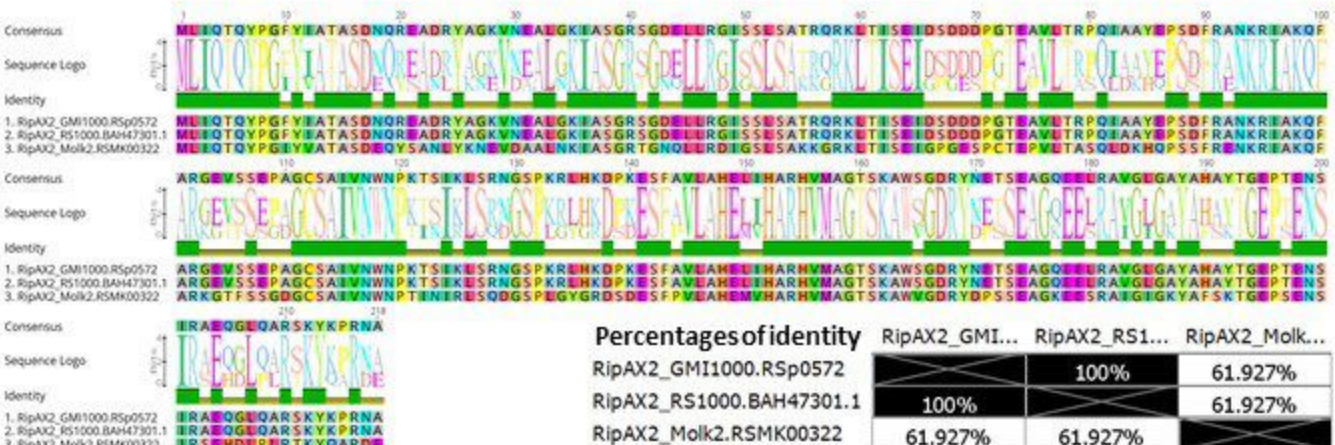
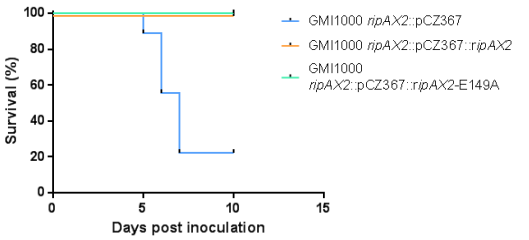
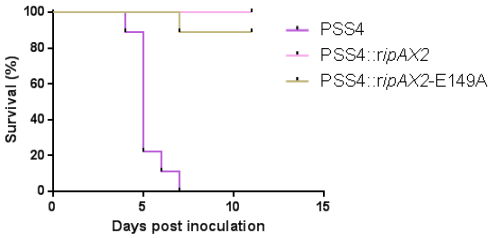


Figure S3. Alignment of the RipAX2 proteic alleles from GMI1000, RS1000, MOLK2, and their percentages of identity.

Repetition 2

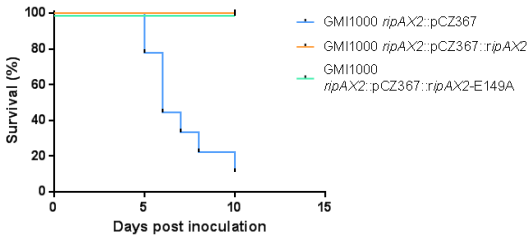


Log-rank (Mantel-Cox) Test		
p-values	GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 ::*ripAX2*	GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 ::*ripAX2*-E149A
GMI1000 *ripAX2*::pCZ367	0.0013	0.0013

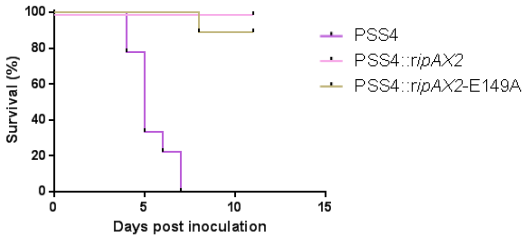


Log-rank (Mantel-Cox) Test		
p-values	PSS4::*ripAX2*	PSS4::*ripAX2*-E149A
PSS4	< 0.0001	< 0.0001

Repetition 3

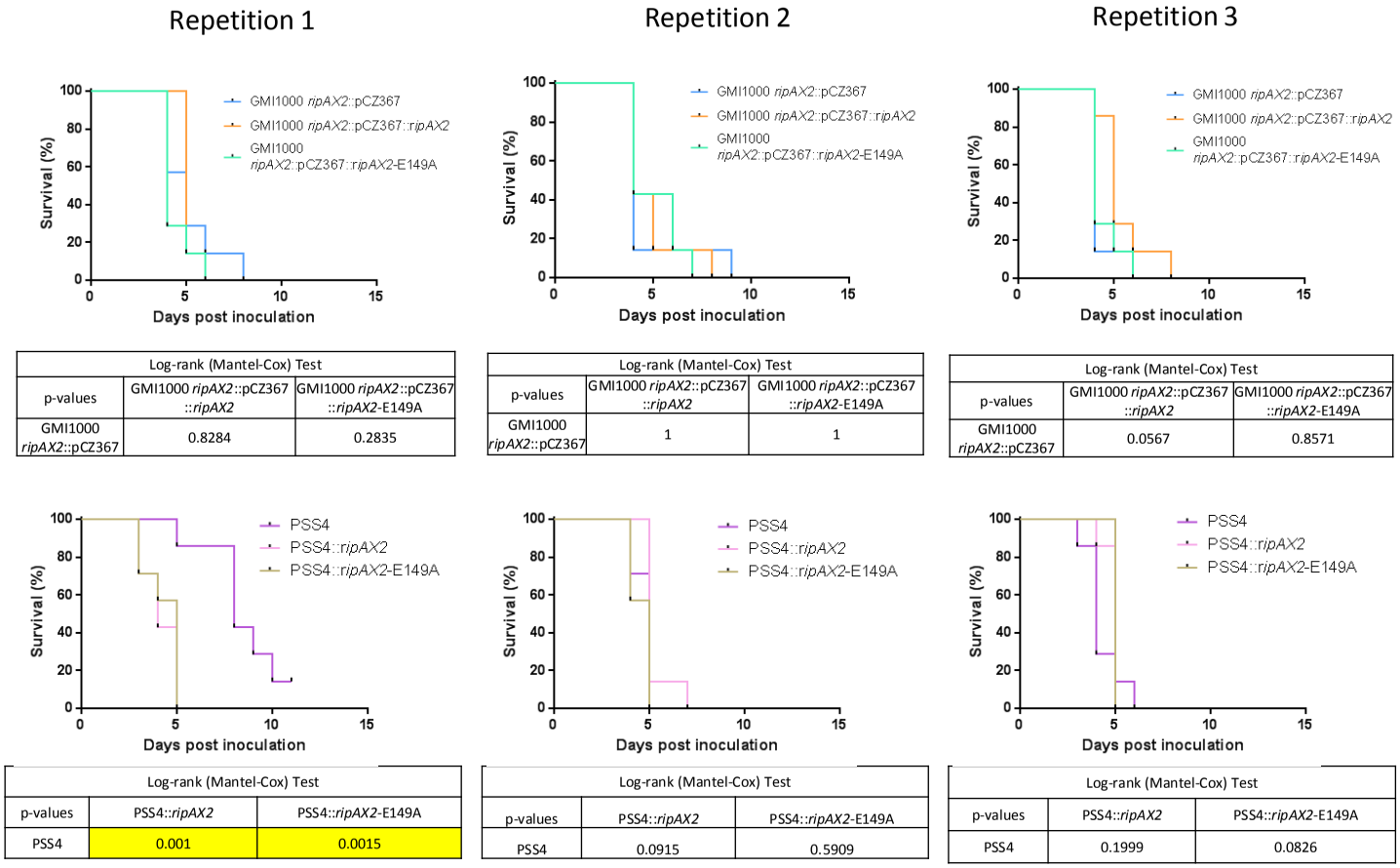


Log-rank (Mantel-Cox) Test		
p-values	GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 ::*ripAX2*	GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 ::*ripAX2*-E149A
GMI1000 *ripAX2*::pCZ367	0.0003	0.0003



Log-rank (Mantel-Cox) Test		
p-values	PSS4::*ripAX2*	PSS4::*ripAX2*-E149A
PSS4	< 0.0001	< 0.0001

Figure S4. Kaplan-Meier survival curves observed on AG91-25 plants inoculated with strains GMI1000 *ripAX2*::pCZ367, GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 ::*ripAX2*, GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 ::*ripAX2*-E149A, PSS4, PSS4::*ripAX2*, PSS4::*ripAX2*-E149A, in two supplemental replicates (22 plants and 18 plants per strain, for each respective replicate). Log-rank (Mantel-Cox) tests are given with p-value.



Log-rank (Mantel-Cox) Test		
p-values	GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 ::*ripAX2*	GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 ::*ripAX2*-E149A
GMI1000 *ripAX2*::pCZ367	0.8284	0.2835

Log-rank (Mantel-Cox) Test		
p-values	GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 ::*ripAX2*	GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 ::*ripAX2*-E149A
GMI1000 *ripAX2*::pCZ367	1	1

Log-rank (Mantel-Cox) Test		
p-values	GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 ::*ripAX2*	GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 ::*ripAX2*-E149A
GMI1000 *ripAX2*::pCZ367	0.0567	0.8571

Log-rank (Mantel-Cox) Test		
p-values	PSS4::*ripAX2*	PSS4::*ripAX2*-E149A
PSS4	0.001	0.0015

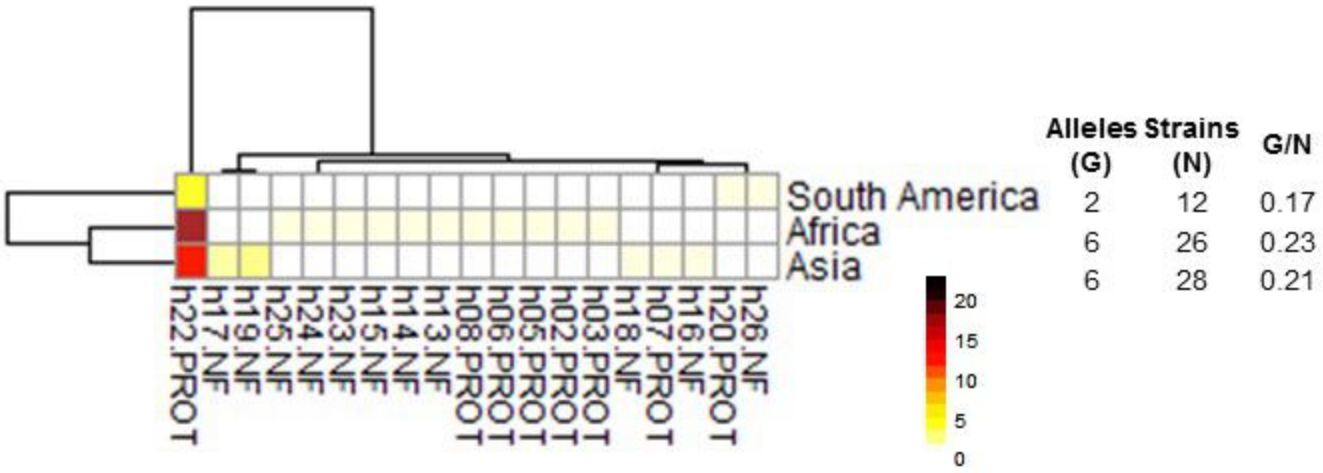
Log-rank (Mantel-Cox) Test		
p-values	PSS4::*ripAX2*	PSS4::*ripAX2*-E149A
PSS4	0.0915	0.5909

Log-rank (Mantel-Cox) Test		
p-values	PSS4::*ripAX2*	PSS4::*ripAX2*-E149A
PSS4	0.1999	0.0826

Figure S5. Kaplan-Meier survival curves observed on MM738 plants inoculated with strains GMI1000 *ripAX2*::pCZ367, GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 ::*ripAX2*, GMI1000 *ripAX2*::pCZ367 ::*ripAX2*-E149A, PSS4, PSS4::*ripAX2*, PSS4::*ripAX2*-E149A, in three replicates. Log-rank (Mantel-Cox) tests are given with p-value.



Figure S6. DNA alignment of the reference *ripAX2* alleles (GMI1000 and RS1000) with the long *ripAX2* alleles amplified within the phylotype I Ivorian strains RUN1546 (sequevar 13), RUN1740 and 1743 (sequevar 31), and in the Guianese phylotype IIA RUN1994 (sequevar 41). Alignments were done using MUSCLE under GENEIOUS v5.5. Each strain is represented by its nucleotide sequence (upper line) and proteic sequence (lower line). Black squares indicate stop codons.



	Alleles (G)	Strains (N)	G/N
South America	2	12	0.17
Africa	6	26	0.23
Asia	6	28	0.21

Figure S7. Geographic distribution of the 19 RipAX2 alleles, either functional (PROT) or non-functional (NF), across regions within the phylotype I strains. The heatmap was built with the R package pheatmap, based on Euclidean distances between observations; the clusters were calculated using the Ward method. For each region, are presented the number of RipAX2 alleles (G), and Phylotype I strains (N). "Africa" gathers Burkina-Faso, Cameroon, Ivory Coast, Reunion Isl., and South Africa; "Asia" gathers Australia, India, Indonesia, Philippines, Taiwan, and Thailand; "South America" gathers French Guiana and Martinique. The heatmap values correspond to numbers of strains.

Table S1. Bacterial strains of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex (RSSC) tested for presence of *ripAX2* coding sequence. Phylotype I and III strains belong to the species *R. pseudosolanacearum*, Phylotype IIA and IIB to the species *R. solanacearum*.

RUN	Strain Code	Phyl.[a]	Seqv.[a]	eST[b]	mST[b]	Clade [c]	Host of isolation	Country / Region	Location	Year of isolation	Virulence on E6[d]	Genomic sequence
17	CFBP6783	IIB	4NPB	16	3	4	*Heliconia caribea*	Martinique	Morne Rouge	2002	2	(Ailloud et al., 2015)
36	CFBP2957	IIA	36	33	1	2	*Solanum lycopersicum*	Martinique	Case Pilote	1987	2	(Remenant et al., 2010)
39	CFBP3059	III	23	2	5	6	*Solanum melongena*	Burkina Faso	Vallée du Kou	1990	4	(Guinard et al., 2016)
47	CIP365	I	45	42	11	1	*Solanum tuberosum*	Philippines	NA	1989	2	
54	GMI1000	I	18	60	22	1	*Solanum lycopersicum*	French Guiana	Kourou	1978	0	(Salanoubat et al., 2002)
58	JQ1143	IIA	39	78	1	2	*Solanum tuberosum*	Reunion Isl.	Bois Court	NA	1	
59	JT510	IIB	1	10	7	5	*Solanum tuberosum*	Reunion Isl.	Notre Dame de La Paix	1993	0	
85	PSS190	I	15	15	22	1	*Solanum lycopersicum*	Taïwan	Taipei	1995	NA	RalstoT3E
104	UW395	I	31	43	22	1	*Solanum lycopersicum*	South Africa	Transvaal	1986	1	

RUN	Strain Code	Phyl.[a]	Seqv.[a]	eST[b]	mST[b]	Clade [c]	Host of isolation	Country / Region	Location	Year of isolation	Virulence on E6[d]	Genomic sequence
106	UW397	I	31	43	22	1	*Solanum melongena*	South Africa	Transvaal	1986	1	
108	UW399	I	31	43	22	1	*Nicotinia tabacum*	South Africa	Transvaal	1986	3	
133	CMR15	III	29	59	47	6	*Solanum lycopersicum*	Cameroon	Obala	2005	5	(Remenant et al., 2010)
145	CFBP6942	III	29	9	25	6	*Solanum scabrum*	Cameroon	Dschang	2005	0	
147	CFBP7029	IIB	1	10	26	5	*Solanum lycopersicum*	Cameroon	Baham	2005	4	
150	CFBP7032	IIA	41	11	27	2	*Solanum lycopersicum*	Cameroon	Dschang	2005	1	
155	PSS366	I	15	15	22	1	*Solanum lycopersicum*	Taïwan	Yunlin	2003	1	
156	PSS216	I	15	15	11	1	*Solanum lycopersicum*	Taïwan	Hsinchu	1996	NA	RalstoT3E
157	PSS4	I	15	15	28	1	*Solanum lycopersicum*	Taïwan	Tainan	1988	4	(Guinard et al., 2016)
158	ACH92	I	16	91	9	1	*Zingiber officinale*	Australia	Queensland	1966	1	

RUN	Strain Code	Phyl.[a]	Seqv.[a]	eST[b]	mST[b]	Clade [c]	Host of isolation	Country / Region	Location	Year of isolation	Virulence on E6[d]	Genomic sequence
159	PSS358	I	15	15	22	1	*Solanum lycopersicum*	Taïwan	Yunlin	2003	NA	
215	CFBP7058	I	13	19	30	1	*Solanum scabrum*	Cameroon	Bafia	2005	2	(Guinard et al., 2016)
353	02-035	I	18	60	22	1	*Capsicum annuum*	Martinique	Marigot	2002	NA	
356	02-045	I	18	60	22	1	*Solanum melongena*	Martinique	Morne-des-Esses	2002	NA	
523	CFBP4963	III	19	29	14	6	*Solanum tuberosum*	Reunion Isl.	NA	NA	0	
657	CFBP2146	III	19	29	14	6	*Pelargonium asperum*	Reunion Isl.	NA	1980	1	
811	02-048	I	18	60	22	1	*Solanum melongena*	Martinique	Morne-des-Esses	2002	NA	
928	JQ1023	IIB	1	10	7	5	*Solanum lycopersicum*	Reunion Isl.	Mont Vert	1993	3	
941	JQ1131	IIB	1	10	7	5	*Solanum tuberosum*	Reunion Isl.	Piton Hyacinthe	1992	4	
969	TO10	I	47	50	22	1	*Solanum lycopersicum*	Indonesia	Magelang	2003	4	(Guinard et al., 2016)
994	RS82	I	18	60	22	1	*Solanum lycopersicum*	Indonesia	Magelang	1998	NA	

RUN	Strain Code	Phyl.[a]	Seqv.[a]	eST[b]	mST[b]	Clade [c]	Host of isolation	Country / Region	Location	Year of isolation	Virulence on E6[d]	Genomic sequence
996	JCRS23	I	17	30	22	1	*Solanum lycopersicum*	Thailand	Chiang Rai	NA	NA	
997	JCRS35	I	13	119	22	1	*Solanum melongena*	Thailand	Chiang Rai	NA	1	
999	JCRS01	I	17	30	22	1	*Solanum lycopersicum*	Thailand	Chiang Rai	NA	NA	
1002	RS67	I	14	72	46	1	*Solanum melongena*	India	Chikballapur, Karnataka	1998	2	
1008	RS70	I	14	72	46	1	*Solanum melongena*	India	Chikballapur, Karnataka	1998	NA	
1013	RS53	I	48	32	22	1	*Solanum lycopersicum*	India	Hazaribagh,,Bihar	1997	NA	
1029	RS22	I	48	32	22	1	*Capsicum sp.*	India	Bhubaneshwar, Orissa	1996	4	
1032	JCRS26	I	18	60	22	1	*Solanum lycopersicum*	Thailand	Chiang Rai	NA	2	
1039	RS15	I	48	120	22	1	*Solanum lycopersicum*	Thailand	Chiang Rai	1995	NA	
1040	RS32	I	14	72	46	1	*Solanum lycopersicum*	India	Bangalore, Karnataka	1997	NA	

RUN	Strain Code	Phyl.[a]	Seqv.[a]	eST[b]	mST[b]	Clade [c]	Host of isolation	Country / Region	Location	Year of isolation	Virulence on E6[d]	Genomic sequence
1042	RS14	I	48	120	22	1	*Solanum lycopersicum*	Thailand	Chiang Rai	1995	NA	
1047	RS51	I	48	32	22	1	*Solanum lycopersicum*	India	Hazaribagh, Bihar	1997	NA	
1050	RS48	I	17	121	22	1	*Solanum lycopersicum*	Indonesia	Magelang, Centr. Java	1997	1	
1109	RS43	I	47	50	22	1	*Solanum lycopersicum*	Indonesia	Magelang, Centr. Java	1997	NA	
1114	RS66	I	14	14	22	1	*Solanum lycopersicum*	Indonesia	Magelang, Centr. Java	1998	1	
1143	02-047	I	18	60	22	1	*Solanum melongena*	Martinique	Morne-des-Esses	2002	NA	
1216	RS79	I	18	60	22	1	*Solanum lycopersicum*	Indonesia	Magelang, Centr. Java	1998	NA	
1234	RS35	I	31	43	22	1	*Solanum melongena*	India	Bangalore, Karnataka	1997	NA	
1240	RS44	I	47	50	22	1	*Solanum lycopersicum*	Indonesia	Magelang, Centr. Java	1997	2	
1251	RS69	I	14	72	46	1	*Solanum melongena*	India	Chikballapur, Karnataka	1998	NA	

RUN	Strain Code	Phyl.[a]	Seqv.[a]	eST[b]	mST[b]	Clade [c]	Host of isolation	Country / Region	Location	Year of isolation	Virulence on E6[d]	Genomic sequence
1533	CIV3	I	46	28	39	1	*Solanum lycopersicum*	Ivory Coast	Songon	2010	1	
1538	CIV8	I	14	14	22	1	*Solanum lycopersicum*	Ivory Coast	Songon	2010	1	
1539	CIV9	I	31	43	22	1	*Solanum lycopersicum*	Ivory Coast	Songon	2010	2	
1546	CIV16	I	13	19	22	1	*Solanum melongena*	Ivory Coast	Anguédédou	2010	3.1	
1739	CIV18	I	18	63	39	1	*Solanum lycopersicum*	Ivory Coast	Bonoufla	2010	2	
1740	CIV19	I	31	43	22	1	*Solanum melongena*	Ivory Coast	Daloa	2010	2	
1743	CIV22	I	31	43	22	1	*Solanum melongena*	Ivory Coast	Daloa	2010	2	
1744	CIV23	I	31	43	22	1	*Solanum melongena*	Ivory Coast	Man	2010	2	(Guinard et al., 2016)
1747	CIV26	I	46	28	39	1	*Solanum lycopersicum*	Ivory Coast	Sinfra	2010	4	
1753	CIV32	IIA	35	27	1	2	*Solanum lycopersicum*	Ivory Coast	Sinfra	2010	5	

RUN	Strain Code	Phyl.[a]	Seqv.[a]	eST[b]	mST[b]	Clade [c]	Host of isolation	Country / Region	Location	Year of isolation	Virulence on E6[d]	Genomic sequence
1756	CIV35	I	14	14	22	1	*Solanum lycopersicum*	Ivory Coast	Sinfra	2010	3.2	
1761	CIV40	IIA	35	27	1	2	*Solanum lycopersicum*	Ivory Coast	Datta	2010	4	
1762	CIV41	IIA	35	27	1	2	*Solanum lycopersicum*	Ivory Coast	Datta	2010	1	
1771	CIV49	I	18	63	39	1	*Solanum lycopersicum*	Ivory Coast	Souandala	2010	2	
1792	CIV55	I	13	122	22	1	*Solanum lycopersicum*	Ivory Coast	Djebonoua-Kondoukro	2010	5	
1793	CIV56	III	48	67	5	6	*Solanum melongena*	Ivory Coast	Djebonoua-Kondoukro	2010	2	
1802	CIV65	I	31	43	22	1	*Solanum lycopersicum*	Ivory Coast	Agnibilekro-Attobro	2010	1	
1854	CIV98	I	14	14	22	1	*Solanum lycopersicum*	Ivory Coast	Yamoussoukro Nanan	2011	2	
1861	CIV105	IIA	35	27	1	2	*Solanum lycopersicum*	Ivory Coast	Datta Houphouékro	2011	1	

RUN	Strain Code	Phyl.[a]	Seqv.[a]	eST[b]	mST[b]	Clade [c]	Host of isolation	Country / Region	Location	Year of isolation	Virulence on E6[d]	Genomic sequence
1867	CIV111	I	13	19	22	1	*Solanum lycopersicum*	Ivory Coast	Datta Houphouékro	2011	1	
1884	CIV128	IIA	35	27	1	2	*Solanum lycopersicum*	Ivory Coast	Pakobo (Tiassalé)	2011	1	
1898	CIV142	I	31	43	22	1	*Solanum lycopersicum*	Ivory Coast	Sinfra	2011	1	
1900	CIV144	I	18	63	39	1	*Solanum lycopersicum*	Ivory Coast	Sinfra	2011	5	
1916	CIV160	I	14	14	22	1	*Capsicum annuum*	Ivory Coast	Bassam	2011	1	
1924	CIV168	I	13	123	22	1	*Croton hirsutum*	Ivory Coast	Bassam	2011	2	
1947	CIR011-076	IIB	4NPB	16	3	4	*Capsicum annuum*	French Guiana	Cacao	2011	3,2	
1966	CIR011-152	IIB	4NPB	16	3	4	*Solanum melongena*	French Guiana	Wayabo	2011	2	
1976	CIR011-187	IIB	38	39	4	2	*Solanum melongena*	French Guiana	Corossoni	2011	2	
1984	CIR011-206	I	17	30	22	1	*Capsicum annuum*	French Guiana	Javouhey	2011	NA	
1985	CIR011-208	I	17	30	22	1	*Solanum melongena*	French Guiana	Javouhey	2011	5	(Guinard et al., 2016)

RUN	Strain Code	Phyl.[a]	Seqv.[a]	eST[b]	mST[b]	Clade [c]	Host of isolation	Country / Region	Location	Year of isolation	Virulence on E6[d]	Genomic sequence
1986	CIR011-209	I	17	30	22	1	*Solanum melongena*	French Guiana	Javouhey	2011	NA	
1987	CIR011-219	I	17	30	22	1	*Solanum melongena*	French Guiana	Javouhey	2011	2	
1992	CIR011-239	IIB	4NPB	16	3	4	*Cucurbita pepo*	French Guiana	Cacao	2011	2	
1994	CIR011-242	IIA	41	75	4	2	*Solanum lycopersicum*	French Guiana	Montsinéry	2011	2	
2004	CIR011-253	IIB	4NPB	16	3	4	*Solanum lycopersicum*	French Guiana	Corossoni	2011	2	
2174	012-011	I	14	80	22	1	*Solanum melongena*	French Guiana	Saint Laurent du Maroni	2012	4	
2175	012-012	I	14	80	22	1	*Solanum melongena*	French Guiana	Saint Laurent du Maroni	2012	4	
2176	012-013	I	14	80	22	1	*Solanum melongena*	French Guiana	Saint Laurent du Maroni	2012	3.1	
3012	TD1301	I	31	43	22	1	*Solanum melongena*	Reunion Isl.	Saint Pierre, Le Vallon	2013	2	(Guinard et al., 2016)
3013	RD1301	I	31	43	22	1	*Solanum melongena*	Reunion Isl.	Saint Pierre, Le Vallon	2013	1	(Guinard et al., 2016)

RUN	Strain Code	Phyl.[a]	Seqv.[a]	eST[b]	mST[b]	Clade [c]	Host of isolation	Country / Region	Location	Year of isolation	Virulence on E6[d]	Genomic sequence
3014	TF3108	I	31	43	22	1	*Solanum melongena*	Reunion Isl.	Saint Pierre, Le Vallon	2013	2	(Guinard et al., 2016)

[a] Phylotype and *egl*-based sequevar (Fegan & Prior, 2005, Wicker *et al.*, 2012)

[b] egl-Sequence Type (eST) and mutS-Sequence Type (mST) (Wicker et al., 2012, Wicker *et al.*, 2016)

[c] Clade, determined from *egl* and *mutS* phylogenetic trees, as defined in (Wicker et al., 2012)

[d] E6 is the code name of the eggplant accession AG91-25. The number assigned to each strain x accession combination represents the phenotype score, defined by the combination of final wilting incidence and colonization index and calculated as defined by Lebeau et al. (2011): 1, highly resistant; 2, moderately resistant; 3.1, partially resistant; 3.2, latent infection; 4, moderately susceptible; 5, highly susceptible. 0 is a incompatible interaction (no symptom and no colonization).

Fegan, M. and Prior, P. (2005) How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex". In: *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex.* (Allen, C., Prior, P. and Hayward, A. C., eds.). Madison: APS Press, pp. 449-462.

Lebeau, A., Daunay, M. C., Frary, A., Palloix, A., Wang, J. F., Dintinger, J., Chiroleu, F., Wicker, E. and Prior, P. (2011) Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology,* **101,** 154-165.

Wicker, E., Lefeuvre, P., Cambiaire, J. C. d., Lemaire, C., Poussier, S. and Prior, P. (2012) Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *ISME Journal,* **6,** 961-974.

Wicker, E., N'Guessan, A. C., Le Roux-Nio, A.-C., Deberdt, P., Sujeeun, L., Rivière, P. and Vinatzer, B. A. (2016) A reference database of *Ralstonia solanacearum* egl-mutS haplotypes for global epidemiological surveillance of bacterial wilts. Toulouse, The Laboratory for PLant -Microbes Interactions.

Table S2. Distribution of *ripAX2* within the 74 RSSC genomes harbored in the RalstoT3E database. Strains are ranked by Phylotype and code. Phylotypes I and III are grouped within *R.pseudosolanacearum*, Phylotype IIA and IIB within *R.solanacearum*, Phylotype IV within *R.syzygii*. The *ripAX2* type III effector is either present as a complete sequence (PROT), frameshifted (FS), pseudogenized (PS), or absent (NO).

Phylotype	Strain	RipAX2
I	161	PROT
I	244	FS
I	CMR134	PROT
I	FJAT-452	NO
I	FJAT-462	NO
I	FJAT-91	NO
I	FJAT1458	PS
I	FQY_4	NO
I	GMI1000	PROT
I	KACC10709	PROT
I	OE1-1	NO
I	PSS1308	NO
I	PSS190	NO
I	PSS216	NO
I	PSS4	NO
I	RD1301	PROT
I	RD15	FS
I	RUN1744	PROT
I	RUN1985	NO
I	Rs-T02	NO
I	SD54	NO
I	TD1301	PROT
I	TF3108	PROT
I	TO10	FS
I	Y45	PROT
I	YC40-M	FS
I	YC45	NO
III	CFBP3059	NO
III	CMR15	NO
IIA	B50	NO
IIA	CFBP2957	NO
IIA	Grenada91	PROT
IIA	IBSBF1900	NO
IIA	K60	NO
IIA	UW181	NO
IIB	23_10BR	PROT
IIB	CFBP1416	NO

Phylotype	Strain	RipAX2
IIB	CFBP3858	NO
IIB	CFBP6783	NO
IIB	CFBP7014	NO
IIB	CFIA906	NO
IIB	CIP417	PROT
IIB	IBSBF1503	NO
IIB	IPO1609	NO
IIB	KACC10722	NO
IIB	Molk2	PROT
IIB	NCPPB909	NO
IIB	NCPPB_282	FS
IIB	P673	PROT
IIB	POPS2	NO
IIB	Po82	NO
IIB	R52B	NO
IIB	UW163	PROT
IIB	UW179	NO
IIB	UW349B	PROT
IIB	UW365B	PROT
IIB	UW491B	NO
IIB	UW551	NO
IIB	UY031	NO
IV	BDBR229	NO
IV	BDB_RUN1314	NO
IV	BDB_RUN1347	NO
IV	BDB_RUN1348	NO
IV	BDB_RUN1349	NO
IV	BDB_RUN1350	NO
IV	BDB_RUN1351	NO
IV	Psi07	NO
IV	RUN1302	NO
IV	RUN1308	NO
IV	RUN1311	NO
IV	RUN1313	NO
IV	RUN702	NO
IV	RUN84	NO
IV	R24	NO

Table S3. Comparison of *ripAX2* distribution assessed by PCR amplification, or genome sequencing, on the 15 strains common to our collection and the RalstoT3E database. The gene was present (1), frameshifted (FS), or absent (0).

RUN code	Strain ID	Genome ID	Phylotype	Sequevar	Year	PCR	Genome
17	CFBP6783	CFBP6783	IIB	4NPB	2002	0	0
36	CFBP2957	CFBP2957	IIA	36	1987	0	0
39	CFBP3059	CFBP3059	III	23	1990	0	0
54	GMI1000	GMI1000	I	18	1978	1	1
85	PSS190	PSS190	I	15	1995	0	0
133	CMR15	CMR15	III	29	2005	0	0
156	PSS216	PSS216	I	15	1996	0	0
157	PSS4	PSS4	I	15	1988	0	0
215	CFBP7058	CMR134	I	13	2005	1	1
969	TO10	TO10	I	47	2003	1	FS
1744	CIV23	RUN1744	I	31	2010	1	1
1985	E16A2	RUN1985	I	17	2011	0	0
3012	TD13.01	TD1301	I	31	2013	1	1
3013	RD13.01	RD1301	I	31	2013	1	1
3014	TF31.08	TF3108	I	31	2013	1	1

Table S4. External and internal primers designed to amplify the *ripAX2*-coding sequence. Both external and internal primers were designed on the alignment of GM1000 and RS1000 *ripAX2* gene and neighbouring regions.

Target	Primer name	Sequence (5'->3')	Tm (°C)	Annealing temperature (°C)	PCR cycles	Expected size (pb)	Reference
Flanking regions	ripAX2-ph1_309F	TGTACTCGCCCCATCAGTTG	59.8	57	30	858	This study
	ripAX2-ph1_1167R	TTCAGGCGAGCCATTGACAA	60.3				
Internal sequence	RSp0572_60F	CGAAGCTGACCGTTATGCGGG	58.8	55	30	468	(Pensec et al., 2015)
	RSp0572_527R	CCTGCCTCGCTGGTTTCGTTG	59.3				

PCR reactions consisted in 5 min of initial denaturation at 96° ; 30 cycles of (i) 30 s at 94°, (ii) 60 s at the annealing temperature, (iii), 60 s at 72°; 10 min of final elongation at 72°.

Table S5. Bacterial strains of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex (RSSC) with their host of isolation, nucleotidic and proteic RipAX2 alleles, GenBank accession numbers.

RUN ID	Phylotype	Sequevar[a]	Clade egl[b]	Clade mutS[b]	eST[c]	mST[c]	Year	Region	Country	Host	Nucleotide allele[d]	Proteic allele[e]	PROT[f]	GENBANK number
RUN 0017	IIB	4NPB	4	4	16	NA	2002	South America	Martinique	*Heliconia caribea*	NA	NA	NA	
RUN 0036	IIA	36	2	2	33	1	1987	South America	Martinique	*Solanum lycopersicum*	NA	NA	NA	
RUN 0039	III	23	6	6	2	5	1990	Africa	Burkina Faso	*Solanum melongena*	NA	NA	NA	
RUN 0047	I	45	1	1	42	11	1989	Asia	Philippines	*Solanum tuberosum*	hapng01	HapAA22	PROT	MF055715
RUN 0054	I	18	1	1	60	22	1978	South America	French Guiana	*Solanum lycopersicum*	hapng02	HapAA22	PROT	MF055716
RUN 0058	IIA	39	2	2	78	1	NA	Africa	Reunion	*Solanum tuberosum*	hapng01	HapAA22	PROT	
RUN 0059	IIB	1	5	5	10	7	1993	Africa	Reunion	*Solanum tuberosum*	NA	NA	NA	
RUN 0085	I	15	1	1	15	22	1995	Asia	Taiwan	*Solanum lycopersicum*	NA	NA	NA	
RUN 0104	I	31	1	1	43	22	1986	Africa	South Africa	*Solanum lycopersicum*	NA	NA	NA	

RUN ID	Phylotype	Sequevar[a]	Clade egl[b]	Clade mutS[b]	eST[c]	mST[c]	Year	Region	Country	Host	Nucleotide allele[d]	Proteic allele[e]	PROT[f]	GENBANK number
RUN 0106	I	31	1	1	43	22	1986	Africa	South Africa	*Solanum melongena*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 0108	I	31	1	1	43	22	1986	Africa	South Africa	*Nicotinia tabacum*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 0133	III	29	6	6	59	47	2005	Africa	Cameroon	*Solanum lycopersicum*	NA	NA	NA	
RUN 0145	III	29	6	6	9	25	2005	Africa	Cameroon	*Solanum scabrum*	Hapng05	HapAA08	PROT	MF055719
RUN 0147	IIB	1	5	5	10	26	2005	Africa	Cameroon	*Solanum lycopersicum*	NA	NA	NA	
RUN 0150	IIA	41	2	2	11	27	2005	Africa	Cameroon	*Solanum lycopersicum*	Hapng06	HapAA06	PROT	MF055720
RUN 0155	I	15	1	1	15	22	2003	Asia	Taiwan	*Solanum lycopersicum*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 0156	I	15	1	1	15	11	1996	Asia	Taiwan	*Solanum lycopersicum*	NA	NA	NA	
RUN 0157	I	15	1	1	15	28	1988	Asia	Taiwan	*Solanum lycopersicum*	NA	NA	NA	
RUN 0158	I	16	1	1	91	9	1966	Asia	Australia	*Zingiber officinale*	NA	NA	NA	

RUN ID	Phylotype	Sequevar[a]	Clade egl[b]	Clade mutS[b]	eST[c]	mST[c]	Year	Region	Country	Host	Nucleotide allele[d]	Proteic allele[e]	PROT[f]	GENBANK number
RUN 0159	I	15	1	1	15	22	2003	Asia	Taiwan	*Solanum lycopersicum*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 0215	I	13	1	1	19	30	2005	Africa	Cameroon	*Solanum scabrum*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 0353	I	18	1	1	60	22	2002	South America	Martinique	*Capsicum annuum*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 0356	I	18	1	1	60	22	2002	South America	Martinique	*Solanum melongena*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 0523	III	19	6	6	29	14	NA	Africa	Reunion	*Solanum tuberosum*	Hapng09	HapAA13	NF	MF055723
RUN 0657	III	19	6	6	29	14	1980	Africa	Reunion	*Pelargonium asperum*	Hapng10	HapAA14	NF	MF055724
RUN 0811	I	18	1	1	60	22	2002	South America	Martinique	*Solanum melongena*	Hapng11	HapAA20	PROT	MF055725
RUN 0928	IIB	1	5	5	10	7	1993	Africa	Reunion	*Solanum lycopersicum*	NA	NA	NA	
RUN 0941	IIB	1	5	5	10	7	1992	Africa	Reunion	*Solanum tuberosum*	NA	NA	NA	
RUN 0969	I	47	1	1	50	22	2003	Asia	Indonesia	*Solanum lycopersicum*	Hapng13	HapAA17	NF	MF055727

RUN ID	Phylotype	Sequevar[a]	Clade egl[b]	Clade mutS[b]	eST[c]	mST[c]	Year	Region	Country	Host	Nucleotide allele[d]	Proteic allele[e]	PROT[f]	GENBANK number
RUN 0994	I	18	1	1	60	22	1998	Asia	Indonesia	*Solanum lycopersicum*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 0996	I	17	1	1	30	22	NA	Asia	Thailand	*Solanum lycopersicum*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 0997	I	13	1	1	119	22	NA	Asia	Thailand	*Solanum melongena*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 0999	I	17	1	1	30	22	NA	Asia	Thailand	*Solanum lycopersicum*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 1002	I	14	1	1	72	46	1998	Asia	India	*Solanum melongena*	Hapng14	HapAA22	PROT	MF055728
RUN 1008	I	14	1	1	72	46	1998	Asia	India	*Solanum melongena*	Hapng14	HapAA22	PROT	
RUN 1013	I	48	1	1	32	22	1997	Asia	India	*Solanum lycopersicum*	Hapng15	HapAA19	NF	MF055729
RUN 1029	I	48	1	1	32	22	1996	Asia	India	*Capsicum sp.*	Hapng15	HapAA19	NF	
RUN 1032	I	18	1	1	60	22	NA	Asia	Thailand	*Solanum lycopersicum*	hapng02	HapAA22	PROT	

RUN ID	Phylotype	Sequevar[a]	Clade egl[b]	Clade mutS[b]	eST[c]	mST[c]	Year	Region	Country	Host	Nucleotide allele[d]	Proteic allele[e]	PROT[f]	GENBANK number
RUN 1039	I	48	1	1	120	22	1995	Asia	Thailand	*Solanum lycopersicum*	Hapng16	HapAA22	PROT	MF055730
RUN 1040	I	14	1	1	72	46	1997	Asia	India	*Solanum lycopersicum*	Hapng14	HapAA22	PROT	
RUN 1042	I	48	1	1	120	22	1995	Asia	Thailand	*Solanum lycopersicum*	Hapng17	HapAA07	PROT	MF055731
RUN 1047	I	48	1	1	32	22	1997	Asia	India	*Solanum lycopersicum*	Hapng15	HapAA19	NF	
RUN 1050	I	17	1	1	121	22	1997	Asia	Indonesia	*Solanum lycopersicum*	NA	NA	NA	
RUN 1109	I	47	1	1	50	22	1997	Asia	Indonesia	*Solanum lycopersicum*	Hapng13	HapAA17	NF	
RUN 1114	I	14	1	1	14	22	1998	Asia	Indonesia	*Solanum lycopersicum*	Hapng18	HapAA18	NF	MF055732
RUN 1143	I	18	1	1	60	22	2002	South America	Martinique	*Solanum melongena*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 1216	I	18	1	1	60	22	1998	Asia	Indonesia	*Solanum lycopersicum*	hapng02	HapAA22	PROT	

RUN ID	Phylotype	Sequevar[a]	Clade egl[b]	Clade mutS[b]	eST[c]	mST[c]	Year	Region	Country	Host	Nucleotide allele[d]	Proteic allele[e]	PROT[f]	GENBANK number
RUN 1234	I	31	1	1	43	22	1997	Asia	India	*Solanum melongena*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 1240	I	47	1	1	50	22	1997	Asia	Indonesia	*Solanum lycopersicum*	Hapng19	HapAA16	NF	MF055733
RUN 1251	I	14	1	1	72	46	1998	Asia	India	*Solanum melongena*	Hapng14	HapAA22	PROT	
RUN 1533	I	46	1	1	28	39	2010	Africa	Ivory Coast	*Solanum lycopersicum*	Hapng20	hapAA02	PROT	MF055734
RUN 1538	I	14	1	1	14	22	2010	Africa	Ivory Coast	*Solanum lycopersicum*	Hapng21	HapAA22	PROT	MF055735
RUN 1539	I	31	1	1	43	22	2010	Africa	Ivory Coast	*Solanum lycopersicum*	Hapng21	HapAA22	PROT	
RUN 1546	I	13	1	1	19	22	2010	Africa	Ivory Coast	*Solanum melongena*	Hapng29	HapAA23	NF	MF055743
RUN 1739	I	18	1	1	63	39	2010	Africa	Ivory Coast	*Solanum lycopersicum*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 1740	I	31	1	1	43	22	2010	Africa	Ivory Coast	*Solanum melongena*	Hapng30	HapAA24	NF	MF055744

RUN ID	Phylotype	Sequevar[a]	Clade egl[b]	Clade mutS[b]	eST[c]	mST[c]	Year	Region	Country	Host	Nucleotide allele[d]	Proteic allele[e]	PROT[f]	GENBANK number
RUN 1743	I	31	1	1	43	22	2010	Africa	Ivory Coast	*Solanum melongena*	Hapng31	HapAA25	NF	MF055745
RUN 1744	I	31	1	1	43	22	2010	Africa	Ivory Coast	*Solanum melongena*	Hapng21	HapAA22	PROT	
RUN 1747	I	46	1	1	28	39	2010	Africa	Ivory Coast	*Solanum lycopersicum*	Hapng21	HapAA22	PROT	
RUN 1753	IIA	35	2	2	27	1	2010	Africa	Ivory Coast	*Solanum lycopersicum*	Hapng22	hapAA03	PROT	MF055736
RUN 1756	I	14	1	1	14	22	2010	Africa	Ivory Coast	*Solanum lycopersicum*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 1761	IIA	35	2	2	27	1	2010	Africa	Ivory Coast	*Solanum lycopersicum*	NA	NA	NA	
RUN 1762	IIA	35	2	2	27	1	2010	Africa	Ivory Coast	*Solanum lycopersicum*	NA	NA	NA	
RUN 1771	I	18	1	1	63	39	2010	Africa	Ivory Coast	*Solanum lycopersicum*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 1792	I	13	1	1	122	22	2010	Africa	Ivory Coast	*Solanum lycopersicum*	hapng02	HapAA22	PROT	

RUN ID	Phylotype	Sequevar[a]	Clade egl[b]	Clade mutS[b]	eST[c]	mST[c]	Year	Region	Country	Host	Nucleotide allele[d]	Proteic allele[e]	PROT[f]	GENBANK number
RUN 1793	III	48	6	6	67	5	2010	Africa	Ivory Coast	*Solanum melongena*	Hapng23	HapAA05	PROT	MF055737
RUN 1802	I	31	1	1	43	22	2010	Africa	Ivory Coast	*Solanum lycopersicum*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 1854	I	14	1	1	14	22	2011	Africa	Ivory Coast	*Solanum lycopersicum*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 1861	IIA	35	2	2	27	1	2011	Africa	Ivory Coast	*Solanum lycopersicum*	NA	NA	NA	
RUN 1867	I	13	1	1	19	22	2011	Africa	Ivory Coast	*Solanum lycopersicum*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 1884	IIA	35	2	2	27	1	2011	Africa	Ivory Coast	*Solanum lycopersicum*	NA	NA	NA	
RUN 1898	I	31	1	1	43	22	2011	Africa	Ivory Coast	*Solanum lycopersicum*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 1900	I	18	1	1	63	39	2011	Africa	Ivory Coast	*Solanum lycopersicum*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 1916	I	14	1	1	14	22	2011	Africa	Ivory Coast	*Capsicum annuum*	Hapng24	HapAA15	NF	MF055738

RUN ID	Phylotype	Sequevar[a]	Clade egl[b]	Clade mutS[b]	eST[c]	mST[c]	Year	Region	Country	Host	Nucleotide allele[d]	Proteic allele[e]	PROT[f]	GENBANK number
RUN 1924	I	13	1	1	123	22	2011	Africa	Ivory Coast	*Croton hirsutum*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 1947	IIB	4NPB	4	4	16	3	2011	South America	French Guiana	*Capsicum annuum*	NA	NA	NA	
RUN 1966	IIB	4NPB	4	4	16	3	2011	South America	French Guiana	*Solanum melongena*	NA	NA	NA	
RUN 1976	IIB	38	2	2	39	4	2011	South America	French Guiana	*Solanum melongena*	NA	NA	NA	
RUN 1984	I	17	1	1	30	22	2011	South America	French Guiana	*Capsicum annuum*	NA	NA	NA	
RUN 1985	I	17	1	1	30	22	2011	South America	French Guiana	*Solanum melongena*	NA	NA	NA	
RUN 1986	I	17	1	1	30	22	2011	South America	French Guiana	*Solanum melongena*	NA	NA	NA	
RUN 1987	I	17	1	1	30	22	2011	South America	French Guiana	*Solanum melongena*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 1992	IIB	4NPB	4	4	16	3	2011	South America	French Guiana	*Cucurbita pepo*	NA	NA	NA	
RUN 1994	IIA	41	2	2	75	4	2011	South America	French Guiana	*Solanum lycopersicum*	Hapng32	HapAA26	NF	MF055746
RUN 2004	IIB	4NPB	4	4	16	3	2011	South America	French Guiana	*Solanum lycopersicum*	NA	NA	NA	

RUN ID	Phylotype	Sequevar[a]	Clade egl[b]	Clade mutS[b]	eST[c]	mST[c]	Year	Region	Country	Host	Nucleotide allele[d]	Proteic allele[e]	PROT[f]	GENBANK number
RUN 2174	I	14	1	1	80	22	2012	South America	French Guiana	*Solanum melongena*	NA	NA	NA	
RUN 2175	I	14	1	1	80	22	2012	South America	French Guiana	*Solanum melongena*	NA	NA	NA	
RUN 2176	I	14	1	1	80	22	2012	South America	French Guiana	*Solanum melongena*	NA	NA	NA	
RUN 3012	I	31	1	1	43	22	2013	Africa	Reunion	*Solanum melongena*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 3013	I	31	1	1	43	22	2013	Africa	Reunion	*Solanum melongena*	hapng02	HapAA22	PROT	
RUN 3014	I	31	1	1	43	22	2013	Africa	Reunion	*Solanum melongena*	hapng02	HapAA22	PROT	

[a]Phylotype was determined based on *egl* and *mutS* partial sequence analysis, and sequevar based on *egl* only, based on reference sequences deposited on PAMDB (Wicker *et al.*, 2016).

[b]Clades determined as described in Wicker et al. (2012) (http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2011.160)

[c]**eST**: egl-Sequence Type; **mST**: mutS-Sequence Type (N'Guessan et al., 2012, Deberdt *et al.*, 2014, Wicker et al., 2016), as deposited in PAMDB (http://genome.ppws.vt.edu/cgi-bin/MLST/home.pl)

[d] Nucleotide alleles were determined using DNASPv5 (Librado & Rozas, 2009), with sites with gaps/missing being considered. 32 alleles were thus determined.

[e]Proteic alleles were translated from the nucleotide alleles (Bacterial, Archeal and Plant Plastid Code), using Geneious v8.1.

[f] Amino-acid sequences were scored as PROT if their length was above 80% of the reference RipAX2 protein ($RipAX2_{GMI1000}$). Sequences with early stop codons were considered non-functional (NF).

Table S6. Specificities in distributions of the RipAX2 protein alleles (Hap_AA) across regions, as assessed by Chi-Square tests. **A**: distribution of each allele across regions. Status is either "absence" (ABS), "functional" (PROT), or "not functional" (NF). **B**: Distribution of each region across alleles.

A.

Hap_AA	All phylotypes (n=91)			Phylotype I (n=66)	
	Status	Chi-square, P-value		Chi-square, P-value	
ABS	ABS	0.000606198	***	0.008138687	*
hapAA_02	PROT	0.927097065	NS	0.463369369	NS
hapAA_03	PROT	0.100558869	NS	NA	
HapAA_05	PROT	0.048295195	NS	NA	
HapAA_06	PROT	0.100558869	NS	NA	
HapAA_07	PROT	0.944718345	NS	0.507341248	NS
HapAA_08	PROT	0.048295195	NS	NA	
HapAA_13	NF	0.048295195	NS	NA	
HapAA_14	NF	0.048295195	NS	NA	
HapAA_15	NF	0.927097065	NS	0.463369369	NS
HapAA_16	NF	0.944718345	NS	0.507341248	NS
HapAA_17	NF	0.720717274	NS	0.257395142	NS
HapAA_18	NF	0.944718345	NS	0.507341248	NS
HapAA_19	NF	0.455365742	NS	0.130587173	NS
HapAA_20	PROT	0.473511317	NS	0.105399225	NS
HapAA_22	PROT	0.025831442	NS	0.353270235	NS
HapAA_23	NF	0.927097065	NS	0.463369369	NS
HapAA_24	NF	0.927097065	NS	0.463369369	NS
HapAA_25	NF	0.927097065	NS	0.463369369	NS
HapAA_26	NF	1.70983E-07	***	NA	

B.

All phylotypes (n=91)				Phylotype I (n=66)	
Phylotype	Region	Chi-square, P-value		Chi-square, P-value	
Phylotype I	Africa	0.1368124	NS	0.42279989	NS
	Asia	0.4803289	NS	0.70064089	NS
	South America	0.9616814	NS	0.33805894	NS
Phylotype IIA	Africa	0.11711797	NS		

All phylotypes (n=91)				Phylotype I (n=66)
Phylotype	Region	Chi-square, P-value		Chi-square, P-value
	South America	0.00067032	**	
Phylotype IIB	Africa	0.98020688	NS	
	South America	0.847279	NS	
Phylotype III	Africa	<0.0001	***	

Matériel et méthodes

1. Milieux de cultures

1.1. Milieu LB pour *E. coli* et *Agrobacterium tumefaciens*

« yeast extract » 5g/L, bacto tryptone 10g/L, chlorure de sodium 10g/L. Pour les milieux solides : agar agar 15g/L.

1.2. Milieu Φ pour *Ralstonia pseudosolanacearum*

Bacto-peptone 10g/L, « Casamino acid » 1g/L, « yeast extract » 1g/L. Pour les milieux solides : agar agar 15g/L. Pour une coloration rouge des colonies : glucose 5g/L, triphenyltetrazolium chloride (TTC) 0,05 g/L.

1.3. Milieu minimum MP pour *Ralstonia pseudosolanacearum*

$FeSO_4.7H_2O$ 1,25 $.10^{-4}$g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 0,5 g/L, $MgSO_4.7H_2O$ 0,05 g/L, 3,4g/L KH_2PO_4, pH=7, glycérol 2%.

1.4. Milieu complet YPGA pour levures :

10g/L de « yeast extract », 20g/L de bacto peptone, 20g/L de glucose, 30 mg/L d'adénine.

1.5. Milieu minimum DO pour levures

6,7g/L de « yeast nitrogen base », 0,62g/L de mélange d'acides aminés sans les acides aminés pour lesquels on veut sélectionner l'auxotrophie, 20g/L de glucose dans de l'eau purifiée ultra pure (mQ). Le pH est fait à 5,8.

2. Criblage par double hybride dans la levure

Banque : la banque d'ADNc a été construite par l'entreprise Hybrigenics à partir d'ARN de racines de tomates de cultivar M82 provenant de différentes conditions : 1) non inoculées 2) inoculées par *R. pseudosolanacearum* GMI1000 3) inoculées par *R. pseudosolanacearum* GMI1694 (le mutant *hrcV*

de GMI1000 ne sécrétant pas d'effecteurs de type III) 4) infectés par des nématodes *Meloidogyne incognita.*

Plasmides : les ADNc de la banque sont clonés dans le plasmide « proie » pP6 (Hybrigenics) possédant un marqueur permettant la synthèse de la leucine, en fusion N-Terminal avec le domaine Gal4-AD. Les effecteurs à cribler « appât » sont clonés dans le plasmide pB27 (Hybrigenics) possédant un marqueur permettant la synthèse du tryptophane en fusion N-terminal avec le domaine LexA-BD. L'interaction des protéines proies et appât permet la reconstitution d'un facteur de transcription qui permet l'expression d'un gène marqueur permettant la synthèse de l'histidine (Ptashne, 1988).

« Mating » : les plasmides « proies » sont transformées dans la souche de levure Y187 et les plasmides « appâts » dans la souche L40. Le « mating » est fait sur milieu complet solide. Le nombre de diploïdes est calculé en étalant un échantillon sur milieu minimum sans leucine ni tryptophane. La sélection des clones positifs montrant une interaction est faite sur milieu minimum sans leucine, tryptophane, histidine. Le séquençage des clones positifs est fait par PCR : amplification par des oligonucléotides externes oNP839 GCCTCCTCTAACGTTCAT et oNP840 GCGGGGTTTTTCAGTATC puis séquençage du produit PCR par oNP841 TCAAAACCACTGTCACCT et oNP842 CATAGATCAGGGTTTTCC.

3. Conditions de culture des plantes

Tomates : les plants de tomates destinés au phénotypage ont été repiquées après germination dans des bacs de terreau de dimension 30cm x 30cm, à raison de 16 plantes par bac puis ont été placées en serre pendant environ 4 semaines avant inoculation. La durée varie en fonction de la saison pour obtenir une même taille de plante finale lors de l'inoculation.

Nicotiana benthamiana : après germination, les plants ont été repiqués dans des pots de type « Jiffy » puis cultivés en chambre de culture à 21°C et 16h de jour.

Arabidopsis thaliana : les graines ont été semées directement dans des pots de type « Jiffy ». Après germination, une seule pousse a été conservée par pot. Les plants ont été cultivés 4 semaines en chambre de culture à 22°C, 9h de jour avant inoculation.

4. Agro infiltration pour expression transitoire

Après culture sur boite de milieu LB avec les antibiotiques de sélection, les agrobactéries ont été ressuspendues dans une solution de MES 10 mM, $MgCl_2$ 10mM, acétosyringone 150 µM, diluées à une

Nom	Plasmide de clonage	TOM
pAM91	pBIN-35S-GW-YFP	TOM7
pAM92	pBIN-35S-GW-YFP	TOM17
pAM93	pBIN-35S-GW-YFP	TOM19
pAM94	pBIN-35S-GW-YFP	TOM5
pAM95	pBIN-35S-GW-YFP	TOM13
pAM101	pBIN-35S-GW-YFP	TOM1
pAM102	pBIN-35S-GW-YFP	TOM4
pAM158	pBIN-35S-GW-YFP	TOM3

Tableau 11. Plasmides utilisés pour l'expression transitoire de protéines cibles fusionnées à la YFP

DO_{600}= 0,5, incubées dans le noir à température ambiante pendant au moins 2h puis infiltrées dans des feuilles des plantes à transformer à l'aide d'une seringue sans aiguille. Les plantes ont ensuite été placées en chambre de culture 48h ou 72h.

5. Observations en microscopie confocale

La fluorescence a été observée 48h après agro-transformation de feuilles de *N. benthamiana*. La localisation a été observée à partir de protéines fusionnées à la YFP. Les plasmides sont détaillés dans le tableau 11. Une construction mCherry-NLS a été co-transformée. La séquence NLS a été décrite dans Goldfarb et al., 1986. Le microscope utilisé est le Leica TCS SP2, le traitement des images a ensuite été fait par le logiciel LAS AF lite.

6. Transformation stable de tomates

Les gènes *ripH* recodés pour avoir un usage de codons plus proche de celui des solanacées (synthèse de gène Eurofins) ont été clonés dans un plasmide pER8 pour permettre leur expression sous le contrôle d'un promoteur inductible œstradiol XVE après intégration du T-DNA (Zuo et al., 2000). Un plasmide contrôle permettant d'exprimer le gène GUS sous le même promoteur a été construit. Ces plasmides ont été transformés dans *Agrobactérium tumefaciens* souche GV3101 pMP90 (Koncz and Schell, 1986). Les agrobactéries ont ensuite été mises en culture sur milieu L contenant les antibiotiques suivants : Rifampicine 40 µg/ml, Gentamycine 20 µg/ml, Kanamycine 20 µg/ml. Une culture sur la nuit précédant la transformation en milieu liquide a été faite, la concentration des antibiotiques étant divisée par deux. Les agrobactéries ont ensuite été centrifugées et ressuspendues dans une solution MS (Eck et al., 2006) avant transformation.

Après une semaine de culture en conditions stérile, environ 200 explants obtenus après découpage de cotylédons de tomate ont été immergés dans la suspension de transformation avec les agrobactéries contenant le plasmide de transformation en suspension à une densité optique à la longueur d'onde 600 (DO_{600}) entre 0.5 et 0.6. Les explants ont ensuite été incubés à 25°C à l'obscurité pendant 48h sur milieu solide KCMS (Eck et al., 2006), puis transférés sur milieux 2Z puis 1Z (Eck et al., 2006) avec l'antibiotique de sélection (hygromycine 6 µg/ml). Les repiquages ont été effectués sur milieu 2Z deux fois par semaines pendant 2 semaines puis toutes les deux semaines sur milieu 1Z jusqu'à régénération de plantules. Les différentes plantules regénérées ont été nommées en fonction de leur explant d'origine pour contrôler le risque d'obtenir des clones du même transformant (sur le code transformant, la première lettre et le premier chiffre ex. « E6 » correspondent à la notation de

Oligonucléotides pour les clonages des plasmides "SacB" pour construire des mutants de délétion des effecteurs RipH		
Fonction	Nom	Séquence
Clonage bras A - RipH1 - Forward	oAM281	ACCGGAATTCGGCGTCAAACTTCGGGCAT
Clonage bras A - RipH1 - Reverse	oAM282	ACCGAGATCTTCGTCCTCCTGCCATGGTG
Clonage bras B - RipH1 - Forward	oAM283	TATAAGATCTGCGTCGCTGTCGTGCGG
Clonage bras B - RipH1 - Reverse	oAM284	ATATAAGCTTTGCGTCTCGAAGCGGGC
Pour séquençage et PCR de vérification - RipH1 - bras A Forward	oAM285	CCGCTTTCCAGTGCAAC
Pour séquençage et PCR de vérification - RipH1 - bras B Reverse	oAM286	CGTACCGAAGATGATCTG
Clonage bras A - RipH2 - Forward	oAM287	ATATGAATTCGAAGGCGCCGCCCAGC
Clonage bras A - RipH2 - Reverse	oAM288	ACCGAGATCTGTTTCCGCCAAGCATGGTTC
Clonage bras B - RipH2 - Forward	oAM289	CGATAGATCTGGGATTTCAACGCCGTGCACC
Clonage bras B - RipH2 - Reverse	oAM290	ATCGAAGCTTAGCCATGTCATCTGGCAACG
Pour séquençage et PCR de vérification - RipH2 - bras A Forward	oAM291	GCGCTGATTTCGCATCC
Pour séquençage et PCR de vérification - RipH2 - bras B Reverse	oAM292	TGTTGGCGACGCTTAGAC
Clonage bras A - RipH3 - Forward	oAM293	ACCGGAATTCGTCGGTACAACCACGTCAAC
Clonage bras A - RipH3 - Reverse	oAM294	ATATAGATCTCGATGTCGGCCTCGATGC
Clonage bras B - RipH3 - Forward	oAM295	CGATAGATCTGAACCCGTGACGGCTGAC
Clonage bras B - RipH3 - Reverse	oAM296	ACCGAAGCTTCACACGACACCCTCAAGAAC
Pour séquençage et PCR de vérification - RipH3 - bras A Forward	oAM297	CACACGTGTGCGTGTTG
Pour séquençage et PCR de vérification - RipH3 - bras B Reverse	oAM298	ATCGGCCGGCGTGATTA

Tableau 12 – Oligonucléotides utilisés pour le clonage SacB

l'explant). L'insertion du T-DNA a été vérifiée par PCR. Les plantules regénérées ont été placées en milieu d'enracinement (Eck et al., 2006) puis cultivées en terre jusqu'à obtention de graines.

6.1. Cytométrie de flux pour déterminer la ploïdie des plants de tomates transformés

Les feuilles ont été prélevées sur les plantes à analyser et les noyaux extraits en les découpant avec une lame de rasoir dans un tampon de Galbraith (Galbraith et al., 1983). Ils ont ensuite été colorés avec de l'iodure de Propidium puis passés au cytomètre de flux (CyFlow Space, SYSMEX PARTEC). Un histogramme est obtenu indiquant le nombre de noyaux qui émettent une certaine quantité de fluorescence proportionnellement à la quantité d'ADN. La ploïdie a pu être déterminée en comparant ces histogrammes avec les histogrammes témoin d'une plante diploïde comme décrit dans Catrice, 2006.

7. Transformation de *R. pseudosolanacearum*

Transformation naturelle : après 48h de culture en milieu minimum MP, 5µL d'ADN plasmidique à une concentration d'environ 50ng/µL a été mélangé avec 100 µL de culture puis incubé 48h sur milieu solide Φ. Les bactéries transformées ont ensuite été sélectionnées sur milieu Φ avec l'antibiotique de sélection et réisolées.

Plasmides SacB pour la délétion de gènes : environ 800 bp et 1000 bp en amont et aval de la délétion ont été clonés dans le plasmide pK18 (Schäfer et al., 1994). Les oligonucléotides ayant permis le clonage des différents plasmides de délétion utilisés dans cette thèse sont détaillés dans le tableau 12. Pour les constructions de mutants de délétion SacB, les plasmides non linéarisés ont été transformés par transformation naturelle puis les colonies ont été sélectionnés sur kanamycine puis contre sélectionnées sur sucrose et vérifiés par PCR et enfin séquencés (les oligonucléotides utilisés sont détaillés dans le tableau 12). Cette méthode permet de construire des mutants de délétion sans trace du plasmide de mutation grâce à la contre sélection et à l'élimination du marqueur SacB par un nouveau crossing-over.

8. Mesure de la croissance bactérienne dans du matériel végétal

Des disques foliaires ont été prélevés et broyés à l'aide de billes en verre pendant 30 secondes à 30 Hz. Le broyat a été ressuspendu dans 1 ml d'eau. Des dilutions ont été réalisées et 50 µl ont ensuite été étalés grâce à un spiraleur easySpiral, Interscience sur du milieu Φ solide avec ou sans antibiotique

Gène TOM	Gènes orthologues N. benthamiana	Nom de la construction	Oligonucléotide de clonage "Forward"		Oligonucléotide de clonage "Reverse"	
TOM1	Niben101Scf16806g00003.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM1*	oAM108	ATGCGAATTCATGGGAAGTGGAACTAGC	oAM109	ATCGCTCGAGCAAGAAGGAAATTTCAATCTCC
TOM1	Niben101Scf06059g01001.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM1*	oAM108	ATGCGAATTCATGGGAAGTGGAACTAGC	oAM109	ATCGCTCGAGCAAGAAGGAAATTTCAATCTCC
TOM1	Niben101Scf10767g03010.1 (gène 3)	VIGS *NbTOM1*	oAM108	ATGCGAATTCATGGGAAGTGGAACTAGC	oAM109	ATCGCTCGAGCAAGAAGGAAATTTCAATCTCC
TOM2	Niben101Scf00872g03005.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM2*	oAM110	ATGCGAATTCATATATTGATGAGCTTGAACAA	oAM111	CTCGAGCGATTATCTAAATCTCCAAACTTTCC
TOM2	Niben101Scf03150g06002.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM2*	oAM110	ATGCGAATTCATATATTGATGAGCTTGAACAA	oAM111	CTCGAGCGATTATCTAAATCTCCAAACTTTCC
TOM3	Niben101Scf00503g10005.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM3-1*	oAM112	ATGCGAATTCTACCAAGTTTCAGGATGAG	oAM113	CTCGAGCGATGCCTCAGCTTTATAAAAGAG
TOM3	Niben101Scf00470g07002.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM3-2*	oAM114	ATGCGAATTCACCTCCAGGTGGCAT	oAM115	CTCGAGCGATGGGCCTCAGCTTTAAAA
TOM3	Niben101Scf09241g00006.1 (gène 3)	VIGS *NbTOM3-2*	oAM114	ATGCGAATTCACCTCCAGGTGGCAT	oAM115	CTCGAGCGATGGGCCTCAGCTTTAAAA
TOM7	Niben101Scf00831g00002.1	VIGS *NbTOM7*	oAM140	ATGCGAATTCCCTCGGAGAAAACTTCA	oAM141	CTCGAGCGATTTGTGCCTTTTCAGCG
TOM6	Niben101Scf03000g00011.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM6*	oAM122	ATGCGAATTCGTAAGCATGAACCATGTTC	oAM123	CTCGAGCGATGACAGGTGCATATTCATCT
TOM6	Niben101Scf18703g00007.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM6*	oAM122	ATGCGAATTCGTAAGCATGAACCATGTTC	oAM123	CTCGAGCGATGACAGGTGCATATTCATCT
TOM9	Niben101Scf01749g02007.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM9*	oAM124	ATGCGAATTCCAATGCTCAAGGAAATCG	oAM125	CTCGAGCGATGCTTTTTGCTGTTTCTCC
TOM9	Niben101Scf00672g04011.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM9*	oAM124	ATGCGAATTCCAATGCTCAAGGAAATCG	oAM125	CTCGAGCGATGCTTTTTGCTGTTTCTCC
TOM13	Niben101Scf00206g01004.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM13*	oAM142	ATGCGAATTCTCTCTTGCTACAGGTAATC	oAM143	CTCGAGCGATTTACCCACGCGCCTTA
TOM13	Niben101Scf08211g03007.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM13*	oAM142	ATGCGAATTCTCTCTTGCTACAGGTAATC	oAM143	CTCGAGCGATTTACCCACGCGCCTTA
TOM15	Niben101Scf06913g00002.1	VIGS *NbTOM15*	oAM128	ATGCGAATTCCAATGTTCCTCTGAAAAGTG	oAM129	CTCGAGCGATCCAGGCTTAGACGAAAA
TOM16	Niben101Scf01374g06016.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM16*	oAM130	ATGCGAATTCTAGTGCTGAGCAGGAT	oAM131	CTCGAGCGATTTCTGAGCATCAGCATG
TOM16	Niben101Scf09363g00006.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM16*	oAM130	ATGCGAATTCTAGTGCTGAGCAGGAT	oAM131	CTCGAGCGATTTCTGAGCATCAGCATG
TOM17	Niben101Scf01818g03019.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM17*	oAM132	ATGCGAATTCAATTGGAATTACCAGCGG	oAM133	CTCGAGCGATTTCCTCTAGGTGCTTTTC
TOM17	Niben101Scf15435g00012.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM17*	oAM132	ATGCGAATTCAATTGGAATTACCAGCGG	oAM133	CTCGAGCGATTTCCTCTAGGTGCTTTTC
TOM18	Niben101Scf02197g02002.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM18*	oAM186	ATGCGAATTCTGGAGGTCGACTTCCAC	oAM187	ATCGCTCGAGAATGCCTGAGAAATCTCAA
TOM18	Niben101Scf03710g11004.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM18*	oAM186	ATGCGAATTCTGGAGGTCGACTTCCAC	oAM187	ATCGCTCGAGAATGCCTGAGAAATCTCAA
TOM19	Niben101Scf00799g00011.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM19*	oAM136	ATGCGAATTCACTACCTATGTCGAAAATGT	oAM137	CTCGAGCGATTCGTCTTTTCTCCTTTTGG
TOM19	Niben101Scf03028g01011.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM19*	oAM136	ATGCGAATTCACTACCTATGTCGAAAATGT	oAM137	CTCGAGCGATTCGTCTTTTCTCCTTTTGG

Tableau 13 – Oligonucléotides utilisés pour le clonage des constructions VIGS

Gène TOM	Gènes orthologues N. benthamiana	Nom de la construction	Oligonucléotide pour qRT-PCR "Forward"		Oligonucléotide pour qRT-PCR "Reverse"	
TOM1	Niben101Scf16806g00003.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM1*	oAM168	GCAACATGCGGAGAGATACTTT	oAM169	CAGCGTCTCCAGCCTTCAAG
TOM2	Niben101Scf00872g03005.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM2*	oAM188	AGTCGCCGGTAAGTCTTTGC	oAM189	GTTGAGCCGCGACGTCATAA
TOM2	Niben101Scf03150g06002.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM2*	oAM190	AAGTCGCCGGAAAGTCTTTG	oAM191	CCTAACCAAACCCGCTGATG
TOM3	Niben101Scf00503g10005.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM3-1*	oAM192	GGGATGAGGGAGTCTGAGCA	oAM193	AACTTGTCGGCAGCCATGAG
TOM3	Niben101Scf00470g07002.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM3-2*	oAM194	CAGCCGGCTATTACGCAATTTG	oAM195	TGCCTCAATACCAGCAAGAGG
TOM3	Niben101Scf09241g00006.1 (gène 3)	VIGS *NbTOM3-2*	oAM196	TTGGACCTATTTGACCCGAGAAC	oAM197	GAGAATCAGCGGCGCCTTC
TOM7	Niben101Scf00831g00002.1	VIGS *NbTOM7*	oAM198	GATTACGTGGCAACCTGGGG	oAM199	TGAGGTTGACGCGTTGAGTG
TOM6	Niben101Scf03000g00011.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM6*	oAM239	TGGATGGGTTTGAAGCGACA	oAM240	ACTCAAAGAAGCGTGCCACT
TOM6	Niben101Scf18703g00007.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM6*	oAM241	TGTTGGGAATGAACGGAAGCT	oAM242	GCTTGAATTTGCTGCTTGGTG
TOM16	Niben101Scf01374g06016.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM16*	oAM243	AGCAGCTGTTTCCGCCTTAT	oAM244	TACTGGGGTTCTAGGGTCCG
TOM16	Niben101Scf09363g00006.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM16*	oAM243	AGCAGCTGTTTCCGCCTTAT	oAM244	TACTGGGGTTCTAGGGTCCG
TOM17	Niben101Scf01818g03019.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM17*	oAM245	TTGCACGGCGAAAAGGAATG	oAM246	AGCAGACCTGTCCACGTTAG
TOM17	Niben101Scf15435g00012.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM17*	oAM247	TCGACTCGCTAATGTGGACC	oAM248	ACTCCCTCGAAGCCCAAATG
TOM19	Niben101Scf00799g00011.1 (gène 1)	VIGS *NbTOM19*	oAM249	CGAGCTGCAGGAAATGGGTA	oAM250	TCAACACGAGCAAGCCGATA
TOM19	Niben101Scf03028g01011.1 (gène 2)	VIGS *NbTOM19*	oAM251	CGGCTTGCTCATGTTGATCG	oAM252	AACGGCATAATCTCCGGCTT

Tableau 14 – Oligonucléotides utilisés pour la qRT-PCR

de sélection selon la résistance de la souche. Les comptages bactériens ont été fait après 48h d'incubation à 28°C.

9. « Virus Induced Gene Silencing »

Après sélection de la meilleure région des gènes d'intérêts selon l'outil VIGS de « sol genomics network » (Fernandez-Pozo et al., 2015), des régions d'environ 300 paires de bases de ceux-ci ont été clonés par restriction dans le vecteur TRV2 (Kumagai et al., 1995b). La liste des oligonucléotides utilisés pour le clonage de ces vecteurs est disponible dans le tableau 13. Les vecteurs ont été transformés dans la souche souches GV3101 pMP90 de *Agrobacterium tumefaciens* (Koncz and Schell, 1986). Après culture sur milieu L solide des agrobactéries, elles ont été ressuspendues dans une solution de MES 10 mM, $MgCl_2$ 10mM, acétosyringone 150 µM. Après mesure de la densité optique, des dilutions ont été faites pour obtenir un mélange à une DO_{600}= 1 final des agrobactéries contenant les plasmides TRV2 avec la séquence d'intérêt et celles contenant le plasmide TRV1 (Kumagai et al., 1995b). Des constructions contrôles avec un TRV2 vide décrit dans (Buendia et al., 2016) et un TRV2 contenant une séquence partielle du gène PDS de *N. benthamiana* dont la diminution de l'expression cause un fort phénotype de blanchiment des feuilles exposées à la lumière ont été utilisées comme témoins. Après une incubation de 2h dans le noir de la suspension, des feuilles de plantules de *N. benthamiana* ont été infiltrées. Les plantules ont été rempotées dans des godets et placées au minimum 3 semaines en chambre de culture avant de réaliser des expérimentations.

10. Mesure de l'expression de gènes par qRT-PCR

L'extraction des ARNs a été effectuée par le kit NucleoSpin® RNA suivi d'un traitement des ARN à la DNAse « DNA-free™ DNA Removal Kit » (invitrogen). La transcription inverse est faite sur une quantité d'ARN comprise entre de 500µg et 2mg grâce à l'enzyme « Transcriptor Reverse Transcriptase » (Roche). Les oligos utilisés sont des oligos dégénérés NNNNNN.

La qPCR sur les ADNc dilués au 1/10 a été effectuée avec l'appareil « LightCycler480 » avec le mix SYBR green (Roche). La liste des oligonucléotides utilisés pour les gènes de ménage et les gènes d'intérêts est disponible dans le tableau 14. La méthode qui a été utilisée pour calculer l'expression des gènes est celle du « delta Ct » : la différence de Ct du gène d'intérêt et du gène de ménage de l'échantillon est mise à la puissance 2 pour obtenir une valeur d'expression relative ($2^{\wedge\text{-(Ctgène-Ctménage)}}$).

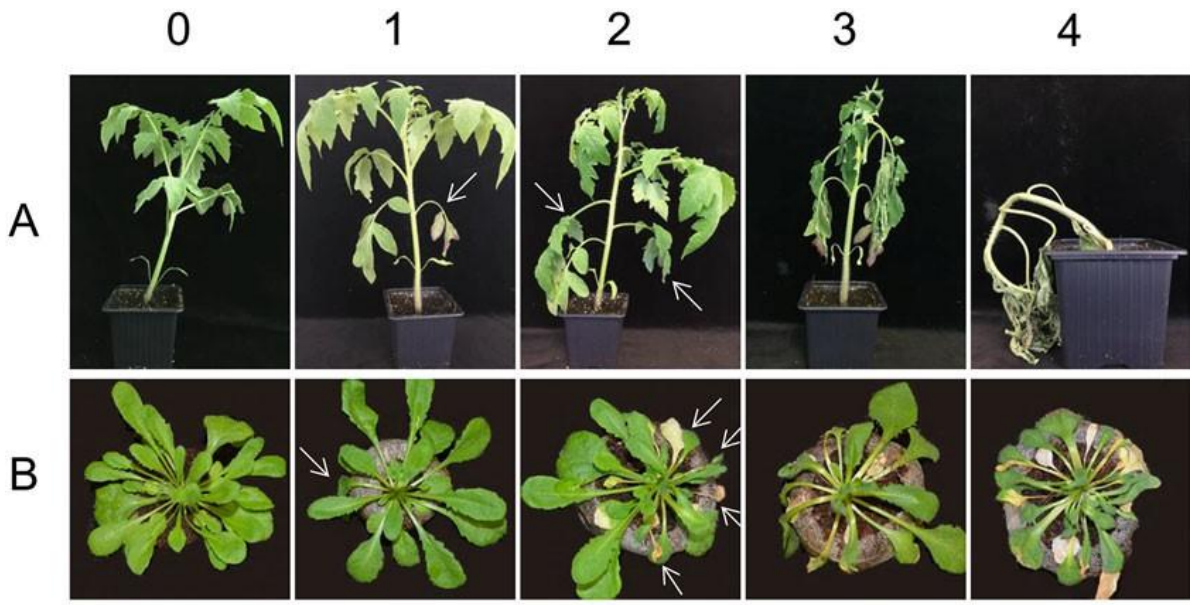


Figure 61. Échelle de notation des symptômes de flétrissement bactérien pour A) la tomate B) *Arabidopsis thaliana.* Les symptômes sont notés de 0 à 4 : « 0 » quand il n'y a pas de flétrissement visible, « 1 » quand les premiers symptômes de flétrissement apparaissent (une feuille flétrie), « 2 » quand environ la moitié des feuilles sont flétries, « 3 » quand la plupart des feuilles sont flétries et « 4 » quand la totalité des feuilles sont flétries. D'après Morel et al., 2018.

Gène TOM	Gène *A. thaliana*	Notation	Référence du mutant	LP		RP	
TOM2	At1g25560	*tem1* mutant 1	SALK_029626C	oAM204	TCAATAATATCGGGCGAAATG	oAM205	GATGTCGTAAGAAGACGCAGC
TOM2	At1g25560	*tem1* mutant 2	SALK_097513C	oAM204	TCAATAATATCGGGCGAAATG	oAM205	GATGTCGTAAGAAGACGCAGC
TOM2	At1g68840	*atrav2*	SALK_070847C	oAM206	GTGTTGTTCCTCAGCCTAACG	oAM207	TTTCCACAAAACCATTGTTCC
TOM3	At3g61600	*atTOM3-1* mutant 1	SALK_044446C	oAM208	CCAAAGCCAAAAGAGTAAGGG	oAM209	TCAAGAGCACATGAGATGGTG
TOM3	At3g61600	*atTOM3-1* mutant 2	SALK_033448C	oAM210	GCCAAAATGTCAAAAGGAAAAG	oAM211	CGAAGCAAACGATCAGAGAAG
TOM3	At2g46260	*atTOM3-2*	SALK_145146C	oAM212	TGGCATTAACGAACCTCTTTG	oAM213	GCGAGATGAACAAGAGCAAAC
TOM5	At2g44060	*atTOM5* mutant 1	SALK_092816C	oAM214	ACCATTCTGTCTCTGCAGCAC	oAM215	TCGACATCTGAGGATAAACCG
TOM5	At2g44060	*atTOM5* mutant 2	SALK_019156C	oAM216	TTGATGAATCTACTCTCGGCG	oAM217	AACCTCATCGTCGTCATCATC
TOM9	AT2G28290	*atTOM9* mutant 1	SALK_149549C	oAM218	TGAAGCTCTGACTTGCTCCTC	oAM219	GCTAGAGTACCTTGCATTGCG
TOM9	AT2G28290	*atTOM9* mutant 2	SALK_110320C	oAM236	TGAATCAGAGACACATGCTCG	oAM237	CCATTTGATCAACCAAAATGG
TOM14	At3g12390	*atTOM14-1* mutant 1	SALK_086658C	oAM222	CAGCATTTGGCCTAGACACTC	oAM223	GAAGAGAAAGAGATCCTCGCC
TOM14	At3g12390	*atTOM14-1* mutant 2	SALK_066829C	oAM224	CACTCTGCCTACGTATCCTCG	oAM225	TTTACCATCAGCCTCGTCATC
TOM14	At5g13850	*atTOM14-2*	SALK_092796C	oAM226	TTGGTCGGAGATTGAAACAAC	oAM227	ATGAATGGAACCAACCACATC
TOM16	At3g16310	*atTOM16* mutant 1	SALK_084252C	oAM228	GAGACAACAAGACAAGGACCG	oAM229	TGCGACTTTAATTCACTTGGG
TOM16	At3g16310	*atTOM16* mutant 2	SALK_024167C	oAM230	GCTTGTTGTAAAATCGTTGGG	oAM231	AAATAGCAGAGATTGCCTCCC
TOM18	At1g21730	*atTOM18-1*	SALK_057300C	oAM232	GCAAGATCAATAAGGTGCTGC	oAM233	GAACTGCGAAGAGACAATTGG
TOM18	At3g12020	*atTOM18-2* mutant 1	SALK_038138C	oAM234	AGCCTCAAAGCTTTTCCAAAG	oAM235	TTTGATTTGTTGGTGCCTCTC
TOM18	At3g12020	*atTOM18-2* mutant 2	SALK_048182C	oAM236	TGAATCAGAGACACATGCTCG	oAM237	CCATTTGATCAACCAAAATGG

Gène TOM	Gène *A. thaliana*	Notation	Référence du mutant	Amplification du mutant		Amplification du savage	
TOM9	AT2G28290	syd-1	N6937	oAM316	TTCAGCATTCGGGCTGGTGA	oAM315	TTCAGCATTCGGGCTGGTGG
				oAM312	GCAACACTACATTATGTAGC	oAM312	GCAACACTACATTATGTAGC
TOM9	AT2G28290	syd-2	N6938	oAM318	TCTATGGCAGTGTGGCTGGT	oAM317	TCTATGGCAGTGTGGCTGGC
				oAM314	AGGGCAATCTCTACGTGAAG	oAM314	AGGGCAATCTCTACGTGAAG

Tableau 15 – Oligonucléotides utilisés pour le génotypage des mutants *A. thaliana*

11. Inoculation par *R. pseudosolanacearum* et phénotypage des symptômes de flétrissement

Pour les inoculations par arrosage de *R. pseudosolanacearum*, une colonie bactérienne est mise en culture sur la nuit dans du milieu Φ liquide à 28°C avec agitation. La densité optique à 600 nm est mesurée et les dilutions appropriées sont faites en considérant qu'une DO_{600}=1 équivaut à une concentration bactérienne de 10^9 cfu/mL. Les dilutions appropriées sont faites dans de l'eau avant inoculation. Les procédures d'inoculations sont décrites plus en détail dans (Morel et al., 2018b).

Les symptômes de la maladie sont mesurés sur une échelle de 0 (aucun symptôme) à 4 (plante entièrement flétrie) comme représenté sur la figure 61 (Morel et al., 2018b).

Après inoculation, les plants de tomates et *N. benthamiana* sont transférés dans une chambre de culture à 28°C, humidité relative 80%, 12h de jour. Les plants de *Arabidopsis thaliana* sont transférés dans une chambre de culture 26°C, humidité relative 80%, 12h de jour.

12. Génotypage des mutants Arabidopsis thaliana

Les mutants T-DNA ayant été commandé sont des mutants « SALK » (Alonso et al., 2003). Pour vérifier l'insertion du T-DNA et l'homozygotie, des PCR ont été réalisées après semis sur les plantes ayant été utilisées par la suite pour obtenir plus de graines. L'oligonucléotide LBb1.3 (ATTTTGCCGATTTCGGAAC) situé sur le T-DNA a été utilisé de pair avec deux oligonucléotides spécifiques pour vérifier chaque insertion : un oligonucléotide « LP » et un oligonucléotide « RP » de chaque côté de l'insertion. Une amplification par LBb1.3 et « RP » indique la présence d'un génotype avec une insertion d'un T-DNA, une amplification par « LP » et « RP » indique un génotype sauvage et une amplification par les deux paires d'oligonucléotides indique que la plante testée est hétérozygote pour l'insertion. La liste des oligonucléotides utilisés pour le génotypage des différents mutants est indiquée dans le tableau 15.

Les mutants « Syd-1 » et « Syd-2 » qui sont des mutants ponctuels (figure 60 des résultats) ont été génotypés par PCR grâce à des oligonucléotides dont la dernière base correspond au nucléotide modifié de chaque mutant ou non (tableau 15).

Nom	Plasmide de clonage	Protéine d'intérêt
pAM136	pMDC43	RipH1
pAM137	pMDC43	RipH3
pAM143	pMDC43	RipH2
pAM144	pMDC43	TOM2
pAM145	pMDC43	TOM4
pAM146	pMDC43	TOM13
pAM147	pMDC43	TOM17
pAM148	pMDC43	TOM19
pAM149	pMDC43	TOM15
pAM150	pMDC43	TOM1
pAM157	pMDC43	TOM3

Tableau 16 – Plasmides utilisés pour l'expression de protéines d'intérêt fusionnées à la GFP

Nom	Protéine fusion
pAM159	cLuc-AtSGT1a
pAM160	RAR1-nLuc
pAM161	cLuc-RipH1
pAM162	cLuc-RipH3
pAM166	cLuc-RipH2
pAM167	nLuc-TOM9 (partie interagissant avec RipH3 en double hybride dans la levure)
pAM168	nLuc-TOM3

Tableau 17 – Plasmides utilisés pour l'expression de protéines d'intérêt fusionnées aux parties N et C terminales de la luciferase

13. « ROS burst »

Le « ROS burst » a été mesuré dans des feuilles de *N. benthamiana* ayant préalablement été transformées transitoirement par *Agrobacterium tumefaciens*. Sur la même feuille, un côté de la feuille a été transformé transitoirement par la construction contrôle GFP (pNP120) et l'autre côté par la construction d'intérêt gène-GFP. Le plasmide utilisé pour le clonage est le pMDC43 qui permet de cloner par gateway les gènes d'intérêts dans un plasmide binaire pour pouvoir transformer grâce à *Agrobacterium tumefaciens* un T-DNA avec le gène d'intérêt fusionné à la GFP sous le contrôle d'un promoteur 35S (Curtis and Grossniklaus, 2003). La liste des plasmides utilisés pour ces expérimentations est disponible dans le tableau 16. Deux jours après agroinfiltration, 16 disques de 4 mm de diamètres ont été prélevés pour chaque conditions et placé dans des puits contenant 100 µL d'eau dans une plaque blanche (OptiPlateTM-96, PerkinElmer). Les plaques ont ensuite été placées en chambre de culture sur une nuit. Pour l'induction de ROS et de la luminescence permettant de les détecter, l'eau a été remplacée par 100 µL de solution de peptide flg22 à 50 nM, luminol à 100 µM et HRP (« Horseradish Peroxidase », Sigma) à 20 ug/mL. La luminescence a été mesuré dans chaque puit toutes les minutes pendant une heure. Les procédures utilisées sont décrites plus en détails dans Sang and Macho, 2017.

14. Détection de la présence de protéines

Pour détecter la présence de protéines après expression transitoire dans les feuilles de *N. benthamiana*, des « Western blots » ont été réalisés. De 4 à 6 disques de 7 mm de diamètre ont été prélevés dans les feuilles, congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C. Ils ont ensuite été broyés dans un vibro-broyeur à l'aide de billes en métal, puis re-suspendus dans 60 µL de tampon Laemmli 2X (SDS 4%, glycérol 20%, β-mercaptoéthanol 10%, bleu de bromophénol 0.004% et Tris HCl 0,125 M) et chauffé 10 minutes à 85°C. Le surnageant contenant les protéines a été récupéré après 1 minute de centrifugation. La migration a été faite sur gel de polyacrylamide puis les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose. La détection a été faite avec les anticorps suivants : anti-GFP TP401 du fournisseur AMS pour la détection de protéines fusionnées à la YFP et anti-GFP 11814460001 du fournisseur Roche pour la détection de protéines fusionnées à la GFP.

15. « Split-Luciferase »

Les feuilles de *N. benthamiana* ont été agro-infiltrées pour permettre l'expression d'une paire de protéines fusionnées aux parties N-terminal et C-terminal de la luciferase (Kato and Jones, 2010). Les

différents plasmides utilisés sont détaillés dans le tableau 17. Après 48h, de la luciférine 1mM diluée dans de l'eau a été infiltrée sur une zone délimitée des feuilles. Une photographie à l'obscurité a été prise par un appareil G-box (Syngene) puis des disques de 4 mm prélevés sur ces mêmes feuilles et la luminescence mesurée dans un lecteur de microplaque (Omega FLUOstar).

Méthode : article « Phénotypage de la pathogénicité de *Ralstonia solanacearum* sur les plantes »

Au cours de ma thèse, j'ai participé à la rédaction d'un article de méthodologie concernant le phénotypage de *R. solanacearum* après inoculation de plantes.

Résumé de l'article :

Dans ce chapitre, nous décrivons plusieurs méthodes pour phénotyper différentes souches ou mutants de l'agent pathogène du flétrissement bactérien, *Ralstonia solanacearum* sur quatre plantes différentes : *Arabidopsis thaliana*, la tomate (*Solanum lycopersicum*), le tabac (*Nicotiana benthamiana*) et *Medicago truncatula.* Les méthodes permettant d'obtenir de l'inoculum (en gros ou petit volume) sont tout d'abord décrites. Par la suite, les méthodes permettant d'inoculer des plantes par arrosage du sol, injection dans la tige ou infiltration dans les feuilles sont détaillées, ainsi que la notation des symptomes. Deux méthodes pour la mesure de la multiplication bactérienne sont proposées : (1) le comptage des colonie après étalement de séries de dilutions et (2) la détermination de la concentration bactérienne en utilisant une approche par qPCR. Dans ce chapitre, nous décrivons aussi un test de compétition permettant de comparer la fitness de deux souches. Enfin, des protocoles spécifiques concernant des inoculations in vitro et par hydroponie perettant de suivre le développement de la maladie et la multiplication bactérienne à la fois dans les parties aériennes et dans les racines sont détailés.

Chapter 18

Plant Pathogenicity Phenotyping of *Ralstonia solanacearum* Strains

Arry Morel, Nemo Peeters, Fabienne Vailleau, Patrick Barberis, Gaofei Jiang, Richard Berthomé, and Alice Guidot

Abstract

In this chapter, we describe different methods for phenotyping strains or mutants of the bacterial wilt agent, *Ralstonia solanacearum*, on four different host plants: *Arabidopsis thaliana*, tomato (*Solanum lycopersicum*), tobacco (*Nicotiana benthamiana*), or *Medicago truncatula*. Methods for preparation of high volume or low volume inocula are first described. Then, we describe the procedures for inoculation of plants by soil drenching, stem injection or leaf infiltration, and scoring of the wilting symptoms development. Two methods for measurement of bacterial multiplication in planta are also proposed: (1) counting the bacterial colonies upon serial dilution plating and (2) determining the bacterial concentration using a qPCR approach. In this chapter, we also describe a competitive index assay to compare the fitness of two strains coinoculated in the same plant. Lastly, specific protocols describe in vitro and hydroponic inoculation procedures to follow disease development and bacterial multiplication in both the roots and aerial parts of the plant.

Key words *Ralstonia solanacearum*, Phenotyping on plants, In planta bacterial growth measurements, Tomato, *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*

1 Introduction

Ralstonia solanacearum is the causal agent of bacterial wilt of more than 250 plant species and is responsible for one of the most devastating bacterial plant disease in the world [1]. *R. solanacearum* is a soilborne plant pathogen which naturally infects plants through root tips and lateral root cracks, invades the xylem vessels and spreads rapidly to aerial parts of the plant through the vascular system [2, 3]. In susceptible plants, *R. solanacearum* population can reach up to 10^{10} colony-forming units (CFU) per gram of fresh weight, inducing clogging of the vascular system and causing the wilting symptoms and eventual plant death [4].

Many pathogenicity determinants are required by *R. solanacearum* for successful infection of its hosts [4]. An

Carlos Medina and Francisco Javier López-Baena (eds.), *Host-Pathogen Interactions: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 1734, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7604-1_18, © Springer Science+Business Media LLC 2018

Uncorrected Proof

essential pathogenicity determinant is the type 3 secretion system (T3SS) as the corresponding mutant strains produce no disease symptoms on plants and their multiplication in plant tissues is considerably reduced, up to 10^4-fold less than the wild-type strain [3]. The T3SS enables the translocation of type 3 effector (T3E) proteins into the plant cell [5]. A total of 74 T3Es have been identified in the sequenced strain GMI1000 [6]. Several of these T3Es are avirulence factors since they can induce plant defense response on some specific plant lines. This is the case for both RipP1 (formerly PopP1) and RipAA (formerly AvrA) on various *Nicotiana* spp. [7], for RipP1 on a petunia line [8] and for RipP2 (formerly PopP2) on some *Arabidopsis* ecotypes [9]. However, the contribution to the overall virulence of most of the T3E is not clear as most single T3E mutant strains do not significantly differ from the wild-type strain. One notable exception is the strong contribution of RipG7 (formerly GALA7) for the virulence of *R. solanacearum* specifically on the model legume *Medicago truncatula* [2, 10, 11]. Furthermore, several multiple T3E mutants have been shown to be less aggressive than their wild-type strain, suggesting functional overlap between these T3Es [10, 12, 13].

The absence of a detectable difference between the virulence phenotype on plants of a mutant and a wild-type strain may reflect a lack of sensitivity of the experimental procedure used. A more sensitive assay to compare the phenotype on plants is to measure the capacity of the bacteria to multiply within the host plants. This can be achieved by counting the numbers of CFU in plant material upon serial dilution plating [13]. Determination of the bacterial multiplication in the plant material is also possible using a quantitative-PCR (qPCR) approach with *R. solanacearum* specific primers [9, 14]. More recently, a competitive index assay has been developed that allows quantifying a differential fitness of two *R. solanacearum* strains in planta [15]. In such assay, the wild-type and mutant strains are coinoculated in the same proportion but at very low concentration, in the same plant tissue. This inoculation method reduces the plant-to-plant variation and enhances thus the detection power of a differential fitness between the two strains. Using this approach, the contribution of several T3Es in *R. solanacearum* in planta fitness has been demonstrated, while previous experiments based on disease symptom development failed to reveal a role in virulence for these T3Es [15]. There are thus many methods for phenotyping *R. solanacearum* wild-type strains and mutants on plants. The method chosen depends on the objective of the experiment and on the required sensitivity to compare the phenotypes of several bacterial strains on different plants.

In this chapter, we describe seven different methods for phenotyping *R. solanacearum* strains and mutants on plants. It should be stressed that these methods can also be used to assay several

Uncorrected Proof

plant genotypes, variants or mutants with a wild-type *R. solanacearum* strain, to assess the contribution to susceptibility or resistance of specific plant genes. After description of the procedures for high volume and low volume inoculum preparation, this chapter describes methods for (1) inoculation of plants by soil drenching, (2) stem injection or (3) leaf infiltration and (4) measurement of bacterial multiplication in planta. It also describes (5) competitive index assays to compare the fitness in planta of two strains. Lastly, specific protocols are described to follow disease development and bacterial multiplication under (6) in vitro or (7) hydroponic conditions, two procedures that allow an access to the plant roots.

2 Materials

1. Glycerol stock of *R. solanacearum* wild-type strains or mutants stored at −80 °C.
2. Complete BG medium (for 1 L): 10 g Bacto peptone, 1 g Casamino acids, 1 g yeast extract. For solid BG medium, add 5 g glucose, 0.05 g triphenyltetrazolium chloride, and 15 g agar.
3. Antibiotics: Gentamicin (10 mg/L), Kanamycin (50 mg/L), Spectinomycin (40 mg/L), Tetracycline (10 mg/L). Half the antibiotic concentration for liquid cultures.
4. Fåhraeus medium [16]: Prepare stock solutions of macroelements and microelements. Make five solutions for macroelements (for 100 mL): 13.20 g $CaCl_2{\cdot}2H_2O$, 12 g $MgSO_4{\cdot}7H_2O$, 10 g KH_2PO_4, 7.5 g $Na_2HPO_4{\cdot}2H_2O$, and 0.5 g ammonium iron (III) citrate. Make five solutions at 1 mg/mL for each microelement: $MnCl_2{\cdot}4H_2O$, $CuSO_4{\cdot}5H_2O$, ZnCl, H_3BO_3, and $Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$. For 1 L of Fåhraeus medium: 1 mL of each stock solution of macroelements except for $Na_2HPO_4{\cdot}2H_2O$ (2 mL) and 100 µL of each stock solution of microelements; add 0.33 g/L $(NH_4)_2SO_2$; adjust to pH 7.5 and incorporate 15 g Difco Agar before autoclaving.
5. Araponics medium: mix FloraGro and Floramicro solutions (General Hydroponics). For solid araponics medium, add 0.65% Difco Agar.
6. Plant materials:
   (a) 4-week-old tomato plants (*Solanum lycopersicum* cultivar Super Marmande VR) grown in a classic greenhouse, 1 plant per 7 × 7 cm pot or 16 plants per 30 × 30 cm tray containing 2 L potting soil (*see* **Note 1**).

Uncorrected Proof

(b) 4-week-old tobacco plants (*Nicotiana benthamiana*) grown in the green house in 7 × 7 cm pot, or 16 plants in a 30 × 30 cm tray.

(c) 4-week-old *Arabidopsis* plants (*Arabidopsis thaliana* Col-0 ecotype) grown in a growth chamber (22 °C, 70% humidity, 9 h light) in jiffy pots.

(d) 4-week-old *Arabidopsis* plants (*Arabidopsis thaliana* Col-0 ecotype) grown in hydroponic conditions (*see* Subheading 3) in a growth chamber (22 °C, 70% humidity, 9 h light).

(e) 10-day-old *Medicago truncatula* Gaertn. Genotype A17 (derived from cultivar Jemalong) grown in a growth chamber (22 °C, 70% humidity, 9 h light) in jiffy pots.

(f) 3-day-old *Medicago truncatula* Gaertn. Genotype A17 grown in square petri dishes (12 × 2 cm) containing Fåhraeus medium with an interface of CYG™ seed growth paper (Mega International, St. Paul, MN, U.S.A.) between plantlets and Fåhraeus agar medium.

7. Growth chamber.
8. 28 °C incubator.
9. Rotary shaker.
10. Spectrophotometer.
11. 7 mm diameter punch borer.
12. Disposable 1 mm diameter glass beads.
13. Ceramic beads.
14. 1 mL disposable syringes.
15. 25 µL Exmire microsyringe.
16. Mill grinder.
17. 13 cm aquarium air pump with a ceramic diffuser.
18. 10 L Plastic bins (Athena series, Fami storage system).
19. qPCR machine.
20. 95% anhydrous H_2SO_4.
21. 12% sodium hypochlorite.
22. 70% and absolute ethanol.
23. TRIzol reagent.
24. Chloroform–isoamyl alcohol (24:1).
25. 5 M NaCl.
26. RNAse free water.
27. Black 96-well plates (clear bottom).
28. Quant-iT Picogreen dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

Uncorrected Proof

29. 2× SYBR Green master mix.
30. Scalpel and extra fine tip tweezers.

3 Methods

3.1 High Volume Inoculum Preparation

1. Under sterile conditions, streak out the strains on BG medium with the appropriate antibiotics from their −80 °C glycerol stock.
2. Incubate at 28 °C for 48 h.
3. Take an isolated colony and inoculate 50 mL liquid BG medium with the appropriate antibiotics in a 250 mL sterile Erlenmeyer flask.
4. Incubate at 28 °C under agitation at 180 rpm in a rotary shaker for more than 16 h.
5. Take 1 mL to measure the OD_{600nm} with a spectrophotometer.
6. Calculate the bacterial concentration, knowing that $OD_{600nm} = 1$ corresponds to 10^9 CFU/mL.
7. Dilute the bacterial suspension to 10^8, 5×10^7 or 10^7 CFU/mL. The dilution can be performed by mixing the original BG medium grown bacteria with water (for a large inoculum, room-temperature tap water can also be used).
8. Take 1 mL to check the dilution by measuring the OD_{600nm} (*see* **Note 2**).

3.2 Low Volume Inoculum Preparation

1. Under sterile conditions, streak out the strains on BG medium with appropriate antibiotics from their −80 °C glycerol-stock.
2. Incubate at 28 °C for 48 h.
3. Take an isolated colony and inoculate 10 mL liquid BG medium with the appropriate antibiotics in a 50 mL sterile Erlenmeyer flask.
4. Incubate at 28 °C under agitation at 180 rpm in a rotary shaker for more than 16 h.
5. Transfer 1.8 mL of the bacterial suspension in a 2 mL Eppendorf.
6. Centrifuge for 2 min at 13,000 rpm in a table top centrifuge.
7. Resuspend the pellet in 1.8 mL sterile water.
8. Take 1 mL to measure the OD_{600nm} with a spectrophotometer.
9. Calculate the bacterial concentration knowing that $OD_{600nm} = 1$ corresponds to 10^9 CFU/mL.
10. Dilute the bacterial suspension to 10^8 CFU/mL in a final volume of 1.8 mL.

Uncorrected Proof

11. Take 1 mL to check the dilution by measuring the OD_{600nm} which should be = 0.1 (*see* **Note 2**).
12. Depending on the bioassay considered, dilute the bacterial suspension to 10^6, 5×10^4 or 10^4 CFU/mL using the suspension dilution procedure in a final volume of 1 mL.

3.3 Soil Drenching Infection of Arabidopsis or Medicago Plants

1. Prepare a high volume inoculum (2 L per 50 plants to analyze) to a final concentration of 10^8 CFU/mL.
2. Place the *Arabidopsis*- or *Medicago*-containing jiffy pots in a large container to soak in the inoculum for 20 min (2 L of inoculum per 50 plants) (*see* **Note 3**).
3. Transfer the *Arabidopsis*- or *Medicago*-containing jiffy pots to a new tray (alternatively place on large sheets of disposable aluminum foil).
4. Pour enough fine potting soil onto the remaining inoculum in order to obtain a firm surface and place the plants back (*see* **Note 4**).
5. Incubate in the growth chamber for 10–20 days with the following conditions: 27 °C the day/26 °C the night, 80–85% relative humidity, 12 h light.
6. Once per day, score the wilting symptoms on a visual scale of 1–4 (Fig. 1) (*see* **Note 5**).
7. Repeat the experiment at least three times to draw conclusions (*see* **Note 6**).

3.4 Soil Drenching Infection of Tomato Plants and Measurement of Bacterial Multiplication In Planta

1. Transfer the tomato plants in the growth chamber (28 °C day/27 °C night, 80–85% relative humidity, 12 h light) 2 days before the inoculation.
2. Prepare a high volume inoculum (500 mL per strain to analyze, for a 16-plant tray or for ten individually potted plants) to a final concentration of 5×10^7 CFU/ mL (*see* **Note 7**).
3. Pour the inoculum onto the soil surrounding the tomato plants: 50 mL in pots with 1 plant or 500 mL in trays with 16 plants (*see* **Note 8**).
4. Incubate in the growth chamber for 10–20 days.
5. Once per day, score the wilting symptoms on a visual scale of 1–4 (Fig. 1) (*see* **Notes 5** and **6**).
6. Measure the bacterial multiplication in planta as follows: Sample 1 cm of the stem above the cotyledons and weight it (*see* **Note 9**). Sterilize the surface by putting it in 70% ethanol for 30 s, then rinse the stem in sterile water for 30 s (individual petri dishes can be used for the ethanol and water baths). Cut the stem in six parts (one centered longitudinal section and three transversal sections) with a sterile scalpel and transfer the

Uncorrected Proof

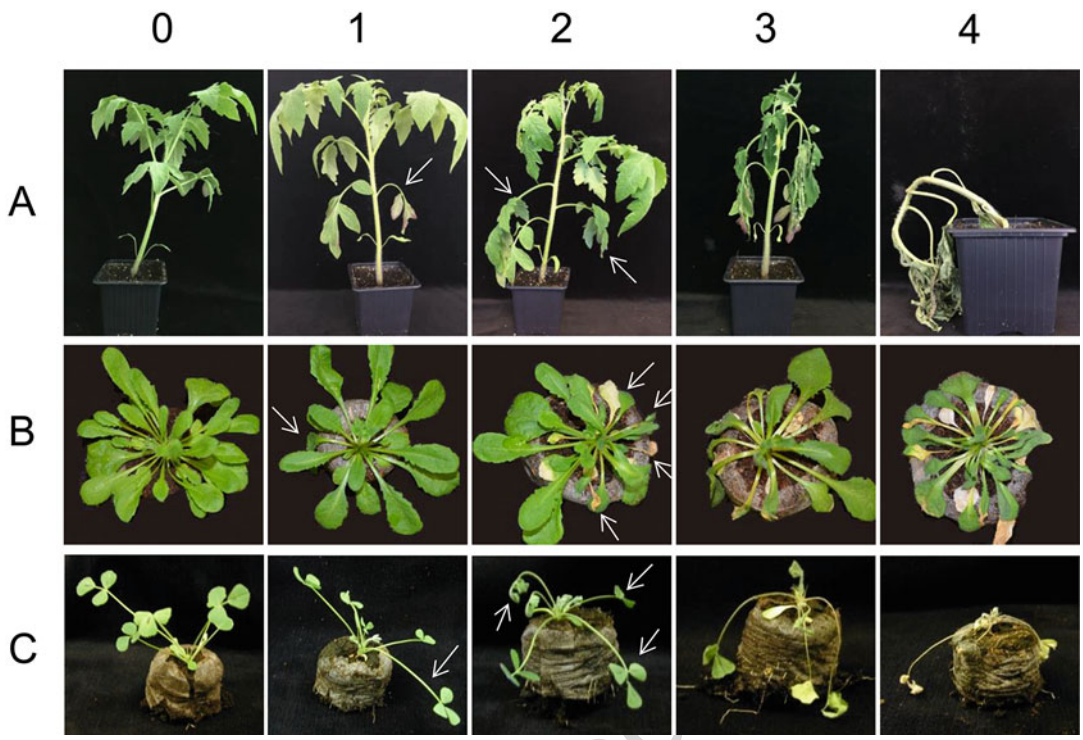


Fig. 1 Symptoms notation scale for (**a**) tomato (*Solanum lycopersicum*), (**b**) *Arabidopsis thaliana*, and (**c**) *Medicago truncatula.* (**c**) Symptoms notation scale is reprinted from Vailleau et al., 2007, Characterization of the Interaction Between the Bacterial Wilt Pathogen *Ralstonia solanacearum* and the Model Legume Plant *Medicago truncatula*, Molecular Plant-Microbe Interactions Vol. 20: pp. 159–167. 0 = No wilting. 1 = First wilting symptoms appears. 2 = Wilting of half of the plant. 3 = Wilting of most of the plant. 4 = Complete wilting. White arrows show leaves that are wilting

Uncorrected

sections into a 2 mL Eppendorf tube containing 1 mL sterile water. Incubate at room temperature for at least 30 min and less than 2 h so that the bacteria can diffuse from the stem sections into the sterile water. Generate serial 10× dilutions of the bacterial suspension and plate 100 µL of the appropriate dilutions on solid BG medium with antibiotics corresponding to the strain (*see* **Note 10**). Incubate at 28 °C for 48 h and count bacterial colonies. Calculate the bacterial concentration into the stem using the following formula:

Bacterial concentration (CFU/g fresh matter) = [(number of colonies × 10)/dilution factor]/weight of the sampled stem.

7. Repeat the experiment at least three times to draw conclusions, each experiment containing either one tray with 16 plants or 10 plants in individual pots. If the bacterial load is assessed over the course of the disease development rather than at the end of the wilting, randomly select individual tomato plants to assess their bacterial load.

3.5 Stem Injection of Tomato Plants and Measurement of Bacterial Multiplication In Planta

1. Transfer the tomato plants in the growth chamber (28 °C day/27 °C night, 80–85% relative humidity, 12 h light) 2 days before the inoculation.
2. Prepare a small volume inoculum (1 mL per ten plants to inject) to a final concentration of 10^6 CFU/mL.
3. Inject 10 µL of the bacterial suspension into the stem 0.5 cm above the cotyledons using a microsyringe. Between each strain or mutant, sterilize the microsyringe by pumping up and down 70% ethanol three times and then sterile water three times.
4. Incubate in the growth chamber for 6–10 days.
5. Once per day, score the wilting symptoms on a visual scale of 1–4 (Fig. 1) (*see* **Notes 5** and **6**).
6. Measure the bacterial multiplication in planta: sample 1 cm of the stem 1 cm above the inoculation point, weight it and follow the procedure to measure the bacterial multiplication in planta after soil drenching infection of tomato plants (*see* Subheading 3.4).
7. Repeat the experiment at least three times to draw the conclusions, each experiment containing either one tray of 16 plants or 10 plants in individual pots.

3.6 Assay for In Planta Growth of R. solanacearum by Leaf Infiltration of Nicotiana benthamiana Plants

1. Prepare a small volume inoculum (5 mL per plant to infiltrate) to a final concentration of 5×10^4 CFU/mL (*see* **Note 11**).
2. Chose a single leaf per plant and infiltrate the bacterial suspension with a blunt 1 mL disposable syringe (*see* **Note 12**). Gently wipe the excess inoculum from the abaxial and adaxial leaf surfaces.
3. Immediately after infiltration, sample four discs (7 mm diameter punch borer) from one half side of the inoculated leaf, in order to measure the original inoculum per square cm of leaf surface.
4. Incubate the plants in the growth chamber for 1–3 days with the following conditions: 28 °C day/27 °C night, 80–85% relative humidity, 12 h light.
5. Put the leaf discs in a 2 mL Eppendorf tube and grind them with a fixed amount of disposable 1 mm diameter glass beads at 30 Hz for 30 s with a mill-grinder. Place the tubes in a centrifuge and do a short spin to pellet all plant debris stuck on the Eppendorf lids.
6. Add 1.8 mL sterile water, vortex and dilute it.
7. Plate the appropriate 10× dilutions on solid BG medium with the antibiotics corresponding to the mutant used.
8. Incubate at 28 °C for 48 h.
9. Count the bacterial colonies.

Uncorrected Proof

10. After 48–72 h, depending of the experiment, sample again four discs of the other half of the same leaf with a punch borer and repeat **steps 5–9** (*see* **Note 13**).

3.7 Competitive Index Assays in Tomato Plants

1. Transfer the tomato plants in the growth chamber (28 °C day/27 °C night, 80–85% relative humidity, 12 h light) 2 days before the inoculation.
2. Prepare a small volume inoculum for each strain used for competitive index assay.
3. Mix 100 µL of a 10^8 CFU/mL suspension of strain A with 100 µL of a 10^8 CFU/mL suspension of strain B (Fig. 2) (*see* **Note 14**).
4. Serial-dilute the mixed inoculum to a final concentration of 10^6 CFU/mL and 10^4 CFU/ mL in 1 mL final volume.
5. Plate 100 µL of the 10^4 CFU/mL suspension on solid BG medium with the appropriate antibiotic for strain A and on solid BG medium with the appropriate antibiotic for strain B (Fig. 2) (*see* **Note 14**).

Uncorrected Proof

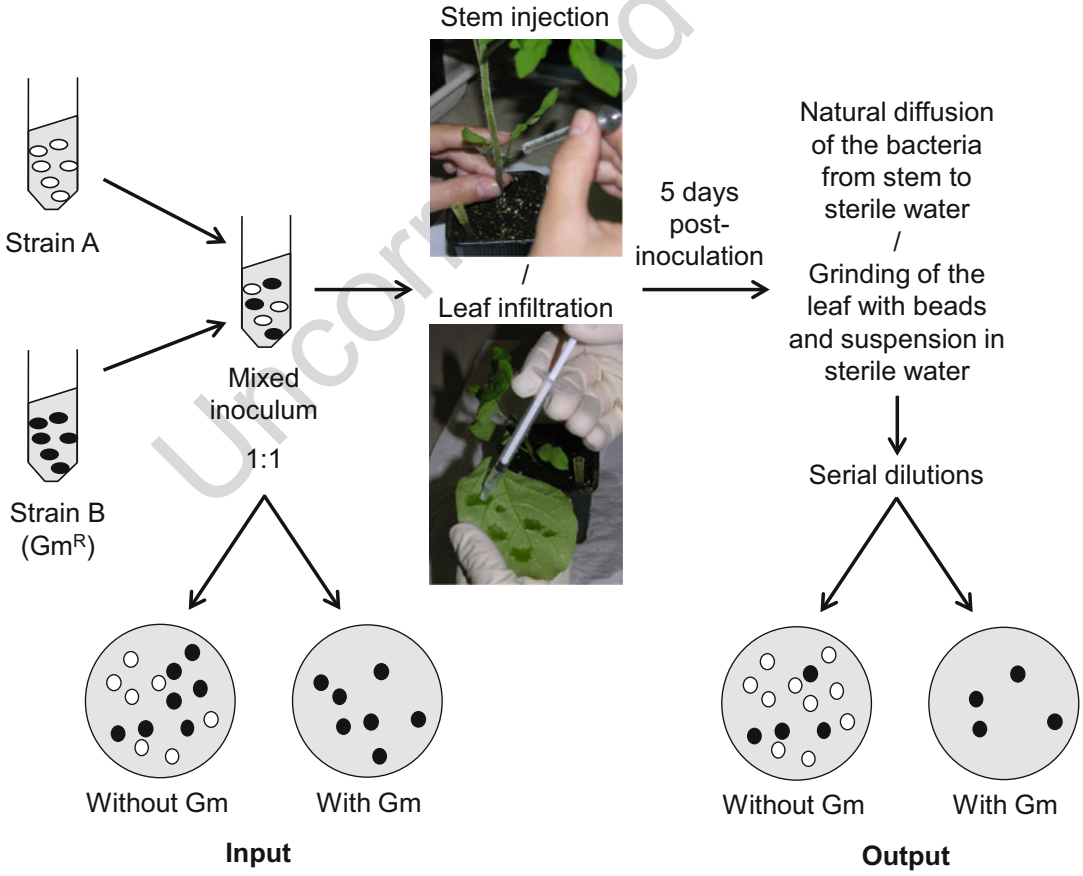


Fig. 2 Schematic representation of the competitive index assays

6. Incubate at 28 °C for 48 h.
7. Count the bacterial colonies and calculate the ratio of strains A and B in the mixed inoculum which should be close to one (Input; Fig. 2).
8. For competitive index assays in tomato stem: inject 10 µL of the 10^6 CFU/mL mixed inoculum into the stem 0.5 cm above the cotyledons using a microsyringe. Between each mixed inoculum, sterilize the microsyringe by pumping up and down 70% ethanol three times and then sterile water three times. For competitive index assays in tomato leaf: infiltrate 50 µL of the 10^4 CFU/mL mixed inoculum into the leaf using a blunt syringe.
9. Incubate the plants in the growth chamber for 5 days.
10. After incubation, recover the bacteria in the inoculated plant material as follow (Fig. 2):

    For inoculated stems, sample the whole stem and petioles (without the leaves) 1 cm above the inoculation point. Sterilize the surface by putting the stem and petioles in 70% ethanol for 30 s, then rinse the stem and petioles by putting them in sterile water for 30 s. Truncate the stem and petioles into 1 cm segments with a sterile scalpel and put them in a Falcon tube containing 3 mL sterile water. Incubate at room temperature at least 30 min and less than 2 h so that the bacteria naturally diffuse from stem and petiole to sterile water.
    For inoculated leaves, sample four discs (7 mm diameter punch borer). Put the leaf discs in a 2 mL Eppendorf tube and grind them with a fixed amount of disposable 1 mm diameter glass beads at 30 Hz for 30 s with a mill-grinder. Place the tubes in a centrifuge and do a short spin to pellet all plant debris stuck on the Eppendorf lids. Add 1.8 mL sterile water and vortex.
11. Serial dilute the bacterial suspension and plate 100 µL of the 10^{-4}, 10^{-5} and 10^{-6} dilutions on solid BG medium with the appropriate antibiotic for strain A and on solid BG medium with the appropriate antibiotic for strain B (Fig. 2) (*see* **Note 14**).
12. Incubate at 28 °C for 48 h.
13. Count the bacterial colonies and calculate the ratio of strains A and B in the Output (Fig. 2).
14. Calculate the competitive index (CI) as follow:

    CI = [Strain B CFU/Strain A CFU (output)]/[Strain B CFU/Strain A CFU (input)].
    CI = 1: B fitness = A fitness; CI < 1: B fitness < A fitness; CI > 1: B fitness > A fitness
15. Repeat at least five independent experiments to draw the conclusions.

Uncorrected Proof

16. Calculate the mean CI with SD and SE and perform a Wilcoxon test to conclude on differences between mean CI values [17].

3.8 Disease Development on Medicago truncatula Plantlets After R. solanacearum Root Inoculation Under In Vitro Conditions

1. Scarify the *Medicago* seeds with concentrated anhydrous H_2SO_4 (95%) for 7 min, and wash three times in sterile water.
2. Under a hood, sterilize the seeds for 2 min with a 12% sodium hypochlorite solution, and rinse six times with sterile water. Keep the seeds 30 min in the last water bath for an imbibition step.
3. Sow the seeds onto 0.8% (wt/vol) water agar in petri dishes (around 50 seeds per plate), seal it with Parafilm, and put the plates upside down for germination in the dark for 3 days at 4 °C, then 24 h at 14 °C.
4. Transfer germinating seeds (6–10 plants) on slanted agar in square petri dishes (12 × 12 cm) containing Fåhraeus medium and CYG seed growth paper. For this, transfer carefully the plantlets with curved extra fine tip tweezers, putting the hypocotyls at the upper paper/agar delimitation (Fig. 3). Seal the plates with Parafilm (on three sides, leaving the upper part without Parafilm), and incubate with an 45° angle for 3 days with the following conditions: 23 °C, 75% humidity, 16 h light at 100 μmol/m^2/s.
5. Inoculate 3-day-old plantlets in square petri dishes with 300 μL of a bacterial suspension at 10^7 CFU/mL brought to the tip of the root. Seal plates with Parafilm like previously.
6. Incubate the plants with a 45° angle in the growth chamber for 10–20 days with the following conditions: 28 °C the day/28 °C the night, 75% humidity, 12 h light at 100 μmol/m^2/s.

Uncorrected Proof

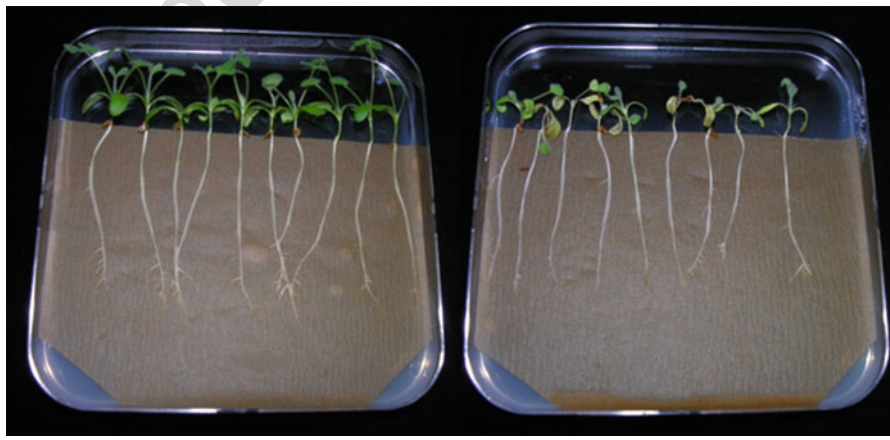


Fig. 3 Disease development on *Medicago truncatula* plantlets after *Ralstonia solanacearum* root inoculation under in vitro conditions. Inoculation with a virulent (right, chlorosis and wilting symptoms) or avirulent strain (left). Pictures taken 14 days after inoculation

7. Monitor disease development every day (chlorosis and wilting) from 10 to 20 days after inoculation (Fig. 3) (*see* **Note 6**).
8. Measure the bacterial multiplication in planta from 10 to 17 days after inoculation as follows: Surface sterilize at least three pools of three plantlets in a ethanol 70% bath for 1 min and rinse three times in sterile water baths for 1 min each. Per pool of three plantlets: weight, grind with a mortar and pestle and resuspend in 4 mL sterile water. Plate serial dilutions (10^{-1} to 10^{-5}) on solid BG medium with appropriate antibiotic. For statistical analyses, use a non parametric Mann Whitney test on series of biological repetitions to determine if the in planta bacterial multiplication of two strains can be considered different or not.

3.9 Inoculation of Arabidopsis Hydroponic Cultures

1. Surface sterilize *Arabidopsis* seeds. Mix 20 mg of seeds with 1 mL of 10% bleach solution in 95% ethanol solution in a 1.5 mL Eppendorf tube for 5–10 min, then wash twice with 95% ethanol and dry in the laminar flow hood for 1–2 h.
2. Prepare hydroponic culture units: cut the caps and 1 cm from the bottom of 0.5 mL Eppendorf tubes (Fig. 4a) and glue them on adhesive tape (Fig. 4a, b). Fill the culture units with half strength araponics solid medium diluted in water to a 1/4000 final concentration.
3. Transfer the hydroponic culture units in tip trays of a 1000 µL tip boxes filled with half strength araponics liquid medium diluted in water to a 1/4000 final concentration (*see* **Note 15**).
4. Sow 1–2 seeds in each hydroponic culture units. Close the tip box with transparent cover (Fig. 4c).
5. Grow *Arabidopsis* seedling for 10 days in a growth chamber with the following conditions: 22 °C, 70% relative humidity, 9 h light.
6. Transfer healthy seedlings (*see* **Note 16**) in pierced Plexiglas trays on 10 L bins filled with full strength araponics liquid medium diluted in water to a 1/2000 final concentration.
7. Grow *Arabidopsis* plantlets for 3 weeks in a growth chamber with the following conditions: 22 °C, 70% relative humidity, 9 h light. Change medium every 4 days.
8. Transfer the plants in the growth chamber for *R. solanacearum* inoculation with the following conditions: 27 °C the day/26 °C the night, 80–85% relative humidity, 12 h light. Replace araponics liquid medium by Fåhraeus liquid medium 7 h before inoculation.
9. Prepare a high volume inoculum to a final concentration of 10^8 CFU/mL in 10 L Fåhraeus liquid medium. The medium is aerated and the bacteria are kept in suspension using a 13 cm aquarium air pump with a ceramic diffuser (Fig. 4e).

Uncorrected Proof

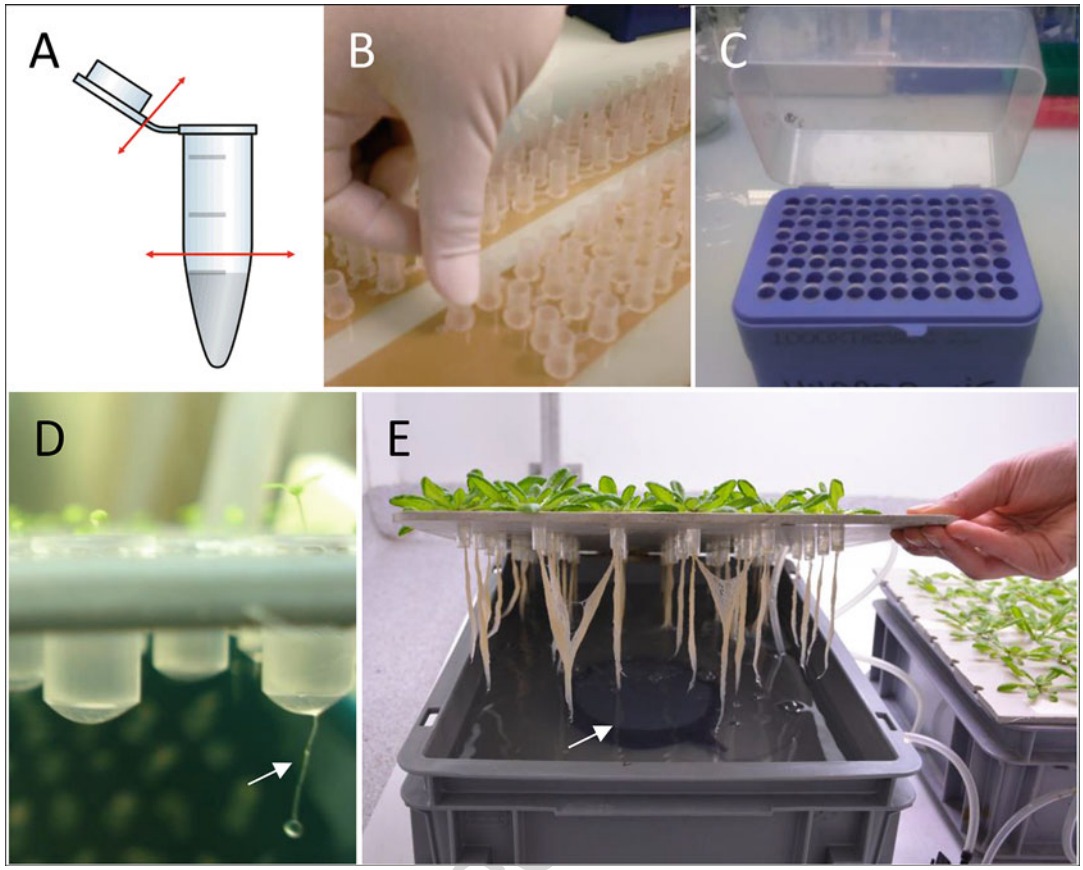


Fig. 4 *Arabidopsis* hydroponic culture setup and inoculation. 0.5 mL Eppendorf tubes are cut following red arrows (**a**) and glued on adhesive tape (**b**). Once filled with half strength araponics solid medium, hydroponic culture unit are displayed in trays of 1000 μL tip box filled with half strength araponics liquid medium (**c**). Healthy seedling for which root went through the solid medium (**d**; arrow) are transferred in pierced Plexiglas trays on 10 L bins filled with full strength araponics liquid medium (**e**). Inoculations are performed on 4-week-old *Arabidopsis* seedlings with a 10^8 CFU/mL bacterial suspension in Fåhraeus medium. Bacteria are kept in suspension using 13 cm aquarium air pump with a ceramic diffuser (e, arrow)

Uncorrected

10. Incubate in the growth chamber for 10–20 days.
11. Once per day, assay wilting symptoms on a scale of 1–4 (Fig. 1) (*see* **Note 5**).

3.10 Measurement of Bacterial Multiplication in Roots Using a qPCR Method

1. Harvest the whole root system, wash the roots twice in two different sterile water baths for 1 min each, dry and transfer in a 2 mL Eppendorf tube containing a ceramic bead and 20 mg of sterile sand. Keep the samples frozen in liquid nitrogen until DNA extraction.
2. Generate two independent concentration ranges of bacteria (from 0 to 10^8 CFU/mL) by dilution from two independent overnight liquid cultures. Check the quantity of bacteria in each concentration range point by plating serial dilutions on solid BG

medium. Vacuum-infiltrate for 10 min 100 µL of each concentration range point in 100 mg fresh root tissue harvested from plant cultivated in hydroponic condition, in a 2 mL Eppendorf tube containing a ceramic bead and 20 mg of sterile sand. Centrifuge 10 min at 14,000 rpm in a tabletop centrifuge. Discard supernatant. Keep the samples frozen in liquid nitrogen until DNA extraction.

3. Grind the frozen samples with a Mill grinder (2 × 30 s at 30 Hz vibrational frequency) and extract the nucleic acids with Trizol reagent using manufacturer's instructions. Perform an additional chloroform–isoamyl alcohol (24:1) extraction on 500 µL of aqueous phase. Add 1.25 mL absolute EtOH and 50 µL NaCl 5 M. Mix by inversion and incubate at −80 °C for 1 h. Precipitate nucleic acids by centrifugation at 13,000 rpm for 15 min at 4 °C in a refrigerated tabletop centrifuge. Discard supernatant and rinse pellet with 1 mL 75% Ethanol (diluted with RNase-free water). Vortex and centrifuge at 13,000 rpm for 30 min at 4 °C in a tabletop centrifuge. Discard supernatant, dry pellets at 65 °C for 2–5 min. Resuspend nucleic acids in 400 µL RNase-free water.
4. Measure DNA concentrations in black 96 well assay plates with clear flat bottom using quant-iT Picogreen dsDNA Assay Kit according to manufacturer's instruction. Adjust the DNA concentration of each sample to 4 ng/µL.
5. Perform qPCR in a 7 µL final volume containing 2 µL DNA, 36 pM final concentration of each primer, 3.5 µL LightCycler 480 SYBR Green 2× Master mix and 1.4 µL sterile water. Two primer pairs are used: EGL1ChF (5′-GCCGAAAGCAGACTACAACC-3′)/EGL1ChR (5′-TGGACAAATAGGGCTTGCT-3′) and AtEF1-F (5′-CTGGAGGTTTTGAGGCTGGTAT-3′)/AtEF1-R (5′-CCAAGGGTGAAAGCAAGAAGA-3′) (*see* **Note 17**). Perform qPCR in triplicate with the following conditions: 95 °C for 5 min; 40 × (95 °C for 10 s and 60 °C or 66 °C for 30 s for AtEF1-F/AtEF1-R or EGL1ChF/EGL1ChR primer pairs respectively) and a final dissociation step to perform melting curve analyses in order to assess the quality of qPCR products. The optimal cycle threshold (Ct) is determined by the LightCycler 480 Software version 1.5 provided by the manufacturer. Ct results obtained using EGL1ChF/EGL1ChR primers are normalized using results obtained with AtEF1-F/AtEF1-R primers.
6. Use the average qPCR Ct results from the two concentration ranges and the corresponding average bacterial quantity to establish a logarithmic regression curve. Use this curve to deduce the bacterial quantity in the root samples from the qPCR Ct results obtained from this root samples.
7. Repeat at least three independent experiments to draw the conclusions, each experiment containing 25 plants.

Uncorrected Proof

4 Notes

1. The 30 × 30 cm tray is not punctured for drainage and can thus contain the *R. solanacearum* inoculum.
2. It can be useful to dilute 100 µL of culture in 900 µL liquid BG medium to perform a accurate OD_{600nm} measurement with a spectrophotometer and plate the inoculum in order to have the exact bacterial concentration.
3. For some experiments, wounding of the root system is required. Cut the bottom third of the jiffy pots with scissors before soaking.
4. If assessing different strains, the minimal number of plants will depend on the difference in aggressivity among the reference and the tested strain. As a rule of thumb, when the relative aggressivity is not known or expected to be close, we perform each assay with a minimum of 20 plants. When different plant genotypes are assessed, we encourage randomizing the relative position of the different genotypes in order to do the visual scoring without knowledge of the relative position of the different plant genotypes.
5. The first symptoms should appear 3 or 4 days after inoculation for most experiments with optimal inoculation.
6. To compare the disease development of two given strains, the Kaplan–Meier survival analysis can be used with the Gehan–-Breslow–Wilcoxon test done with the Prism version 5.00 (GraphPad Software) [11, 18, 19].
7. A higher concentration of 10^8 CFU/mL can be used if symptoms apparition seem delayed.
8. Be careful to correctly water the plants the day before inoculation as dry soil tends to be more difficult to soak leading to a nonhomogenous inoculation.
9. The bacterial load when assessed in the whole aerial part of the plant is well estimated by the bacterial load in this 1 cm stem section (unpublished data).
10. If wilting symptoms are observed, then plate the dilutions from 10^{-4} to 10^{-6}. If no wilting symptoms are observed, then plate the dilution 0 to 10^{-6} as important bacterial multiplication can occur before the first visual symptoms.
11. The wild type strain GMI1000 cannot be used for this experiment because *N. benthamiana* plants are resistant to this strain. The double mutant GRS473 (*popP1*::Ω *avrA*::Ω) has to be used [7].
12. Use the first big leaf starting from the top, as the older and younger leaves are sometimes difficult to infiltrate. If needed

Uncorrected Proof

poke a hole in the leaf with a needle to make the infiltration easier.

13. After 48 h, plate the dilutions 10^{-3} to 10^{-5}.
14. Competitive index assays are used to compare the fitness of two strains either into the stem or into the leaf of a plant. Usually, this approach is used to compare the fitness of a mutant and the corresponding wild-type strain. In order to differentiate the two strains, at least one must carry a specific marker such as an antibiotic resistance (gentamycin or spectinomycin resistance) or express of a fluorochrome (GFP or mCherry). When the two strains express different fluorochromes, it is possible to plate them on the same solid BG medium for the Input and the Output calculation (Fig. 2).
15. The bottom of the tubes must be soaked in the medium.
16. Healthy seedlings are seedlings with roots going through the solid medium and soaking in liquid medium (Fig. 4d).
17. The primer pair EGL1ChF/EGL1ChR, which amplifies a region of the unique endoglucanase gene (*EGL1*) localized on the *R. solanacearum* chromosome (EMBL AL646052), was designed in the present work with Primer3Plus online software. The primer pair AtEF1-F/AtEF1-R [9], which amplifies a region of the *AT5G60390* nuclear gene (GTP binding EFTu elongation factor), is used to normalize the results.

Uncorrected Proof

References

1. Mansfield J, Genin S, Magori S et al (2012) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. Mol Plant Pathol 13:614–629
2. Turner M, Jauneau A, Genin S et al (2009) Dissection of bacterial Wilt on *Medicago truncatula* revealed two type III secretion system effectors acting on root infection process and disease development. Plant Physiol 150:1713–1722
3. Vasse J, Genin S, Frey P et al (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
4. Peeters N, Guidot A, Vailleau F, Valls M (2013) *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. Mol Plant Pathol 14:651–662
5. Cunnac S, Occhialini A, Barberis P et al (2004) Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. Mol Microbiol 53:115–128
6. Poueymiro M, Genin S (2009) Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. Curr Opin Microbiol 12:44–52
7. Poueymiro M, Cunnac S, Barberis P et al (2009) Two type III secretion system effectors from *Ralstonia solanacearum* GMI1000 determine host-range specificity on tobacco. Mol Plant-Microbe Interact 22:538–550
8. Lavie M, Shillington E, Eguiluz C et al (2002) PopP1, a new member of the YopJ/AvrRxv family of type III effector proteins, acts as a host-specificity factor and modulates aggressiveness of *Ralstonia solanacearum*. Mol Plant-Microbe Interact 15:1058–1068
9. Le Roux C, Huet G, Jauneau A et al (2015) A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity. Cell 161:1074–1088
10. Angot A, Peeters N, Lechner E et al (2006) *Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants. Proc Natl Acad Sci U S A 103:14620–14625

11. Wang K, Remigi P, Anisimova M et al (2016) Functional assignment to positively selected sites in the core type III effector RipG7 from *Ralstonia solanacearum*. Mol Plant Pathol 17:553–564
12. Chen L, Shirota M, Zhang Y et al (2014) Involvement of HLK effectors in *Ralstonia solanacearum* disease development in tomato. J Gen Plant Pathol 80:79–84
13. Solé M, Popa C, Mith O et al (2012) The *awr* gene family encodes a novel class of *Ralstonia solanacearum* type III effectors displaying virulence and avirulence activities. Mol Plant-Microbe Interact 25:941–953
14. Chen Y, Zhang W-Z, Liu X et al (2010) A real-time PCR assay for the quantitative detection of *Ralstonia solanacearum* in the horticultural soil and plant tissues. J Microbiol Biotechnol 20:193–201
15. Macho AP, Guidot A, Barberis P et al (2010) A competitive index assay identifies several *Ralstonia solanacearum* type III effector mutant strains with reduced fitness in host plants. Mol Plant-Microbe Interact 23:1197–1205
16. Fåhraeus G (1957) The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. Microbiology 16:374–381
17. Guidot A, Jiang W, Ferdy J-B et al (2014) Multihost experimental evolution of the pathogen *ralstonia solanacearum* unveils genes involved in adaptation to plants. Mol Biol Evol 31:2913–2928
18. Remigi P, Anisimova M, Guidot A et al (2011) Functional diversification of the GALA type III effector family contributes to *Ralstonia solanacearum* adaptation on different plant hosts. New Phytol 192:976–987
19. Lonjon F, Turner M, Henry C et al (2016) Comparative secretome analysis of *ralstonia solanacearum* type 3 secretion-associated mutants reveals a fine control of effector delivery, essential for bacterial pathogenicity. Mol Cell Proteomics 15:598–613
20. Vailleau F, Sartorel E, Jardinaud M-F et al (2007) Characterization of the interaction between the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* and the model legume plant Medicago truncatula. Mol Plant-Microbe Interact 20:159–167

Uncorrected Proof

Conclusion générale

Au cours de ces travaux de thèse, j'ai eu l'occasion de participer à l'étude de la fonction de plusieurs effecteurs de *Ralstonia pseudosolanacearum*. En ce qui concerne les effecteurs RipH1, RipH2 et RipH3, 19 protéines cibles de tomates ont été identifiées comme interagissant avec au moins un de ces effecteurs. Parmi ces cibles, certaines ont été plus étudiées. TOM1 et TOM2 sont des facteurs de transcription de type RAV. TOM2 a été décrit comme jouant un rôle de régulateur positif de la défense à *R. pseudosolanacearum* (Li et al., 2011a). Nous n'avons pas trouvé plus de preuves concernant le rôle éventuel de ce gène en lien avec notre système. TOM9 est un gène impliqué dans la remodélisation de la chromatine. Un orthologue de ce gène dans *A. thaliana*, le gène *syd* est impliqué dans de nombreux processus biologiques y compris la floraison et des réponses à certains stress (Walley et al., 2008). Nous avons montré que deux mutants différents de ce gène chez deux écotypes de *A. thaliana* semblaient plus tolérants à l'infection par *R. solanacearum*. Ce gène pourrait donc être potentiellement utilisé comme gène de sensibilité en utilisant des mutants de celui-ci plus résistants. Il est cependant impliqué dans de nombreux processus essentiel au développement de la plante ; il pourrait donc être difficile d'obtenir des mutants qui à la fois sont moins sensible à l'infection par *R. solanacearum* et à la fois n'ont pas de phénotype développemental détrimental pour la croissance ou le rendement. De plus, le rôle de ce gène a seulement été montré dans la plante modèle *A. thaliana*, il faudrait donc aussi étudier son rôle dans d'autres plantes y compris d'intérêt agronomique. TOM3 est un gène lui aussi impliqué dans la sensibilité à *R. solanacearum* mais aussi à d'autres pathogènes (Orosa et al., 2017) dans *N. benthamiana* et le tabac. Le rôle de ce gène dans d'autres plantes d'interêt agronomique devra donc être étudié car l'utilisation de mutants pourrait être une piste prometteuse pour permettre d'avoir des plantes résistantes à plusieurs pathogènes. De plus, le mécanisme précis impliquant la protéines TOM3/POB1 pourrait être étudiée plus dans différents systèmes végétaux y compris la tomate, ainsi que le rôle de l'interaction des effecteurs RipH1, RipAM et RipAE avec cette protéine, par exemple en étudiant si ces effeteurs stabilisent cette protéine ou augmentent son activité enzymatique potentielle. Enfin, dans une deuxième partie de ces traveaux de thèse, le rôle de l'effecteurs RipAX2 dans la résistance des aubergines AG91-25 a été montré. La répartition de cet effecteur dans les différentes souches du complexe d'espèce de *R. solanacearum* a été étudiée en lien avec leur répartition géographique. Cela permet donc de montrer à quel endroit la résistance AG91-25 pourrait être déployée, par exemple à la Réunion où les souches possèdent cet effecteur. De plus, des expérimentations pour identifier le gène précis lié à la résistance AG91-25 vont être réalisées.

Pour conclure, les travaux réalisés au cours de ma thèse s'inscrivent dans la recherche de résistance durable à *R. pseudosolanacearum* en prenant en compte les mécanismes précis d'action des effecteurs au cours de l'infection et leur lien avec les gènes de plante cibles ou de résistance.

Références

Aldon, D., Brito, B., Boucher, C., and Genin, S. (2000). A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of Ralstonia solanacearum pathogenicity genes. EMBO J *19*, 2304–2314.

Allen, C., Prior, P., and Hayward, A.C. (2005). Bacterial wilt disease and the #Ralstonia solanacearum# species complex.

Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., et al. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. Science *301*, 653–657.

Andolfo, G., Sanseverino, W., Rombauts, S., Van de Peer, Y., Bradeen, J.M., Carputo, D., Frusciante, L., and Ercolano, M.R. (2013). Overview of tomato (Solanum lycopersicum) candidate pathogen recognition genes reveals important Solanum R locus dynamics. New Phytol. *197*, 223–237.

Angot, A., Peeters, N., Lechner, E., Vailleau, F., Baud, C., Gentzbittel, L., Sartorel, E., Genschik, P., Boucher, C., and Genin, S. (2006). Ralstonia solanacearum requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 14620–14625.

Apel, K., and Hirt, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. Annual Review of Plant Biology *55*, 373–399.

Arabidopsis Interactome Mapping Consortium (2011). Evidence for Network Evolution in an Arabidopsis Interactome Map. Science *333*, 601–607.

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.-L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., and Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. Nature *415*, 977–983.

Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P. (2002). The RAR1 Interactor SGT1, an Essential Component of R Gene-Triggered Disease Resistance. Science *295*, 2073–2076.

Baltrus, D.A., Nishimura, M.T., Romanchuk, A., Chang, J.H., Mukhtar, M.S., Cherkis, K., Roach, J., Grant, S.R., Jones, C.D., and Dangl, J.L. (2011). Dynamic Evolution of Pathogenicity Revealed by Sequencing and Comparative Genomics of 19 Pseudomonas syringae Isolates. PLOS Pathogens *7*, e1002132.

Bargsten, J.W., Folta, A., Mlynárová, L., and Nap, J.-P. (2013). Snf2 Family Gene Distribution in Higher Plant Genomes Reveals DRD1 Expansion and Diversification in the Tomato Genome. PLoS One *8*.

Bergsma-Vlami, M., van de Bilt, J.L.J., Tjou-Tam-Sin, N.N.A., Westenberg, M., Meekes, E.T.M., Teunissen, H. a. S., and Van Vaerenbergh, J. (2018). Phylogenetic Assignment of Ralstonia pseudosolanacearum (Ralstonia solanacearum Phylotype I) Isolated from Rosa spp. Plant Dis. PDIS09171345RE.

Berrocal-Lobo, M., Molina, A., and Solano, R. (2002). Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. The Plant Journal *29*, 23–32.

Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N., and Scheel, D. (2000). Receptor-Mediated Increase in Cytoplasmic Free Calcium Required for Activation of Pathogen Defense in Parsley. Plant Cell *12*, 1425–1440.

Boer, K.D., Tilleman, S., Pauwels, L., Bossche, R.V., Sutter, V.D., Vanderhaeghen, R., Hilson, P., Hamill, J.D., and Goossens, A. (2011). APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR and basic helix–loop–helix tobacco transcription factors cooperatively mediate jasmonate-elicited nicotine biosynthesis. The Plant Journal *66*, 1053–1065.

Boudsocq, M., Willmann, M.R., McCormack, M., Lee, H., Shan, L., He, P., Bush, J., Cheng, S.-H., and Sheen, J. (2010). Differential innate immune signalling via Ca^{2+} sensor protein kinases. Nature *464*, 418–422.

Bradley, D.J., Kjellbom, P., and Lamb, C.J. (1992). Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. Cell *70*, 21–30.

Brito, B., Aldon, D., Barberis, P., Boucher, C., and Genin, S. (2002). A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling Ralstonia solanacearum hrp genes. Mol. Plant Microbe Interact. *15*, 109–119.

Buendia, L., Wang, T., Girardin, A., and Lefebvre, B. (2016). The LysM receptor-like kinase SlLYK10 regulates the arbuscular mycorrhizal symbiosis in tomato. New Phytol. *210*, 184–195.

Bufe, A., Spangfort, M.D., Kahlert, H., Schlaak, M., and Becker, W.-M. (1996). The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. Planta *199*, 413–415.

Büschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., van Daelen, R., van der Lee, T., Diergaarde, P., Groenendijk, J., et al. (1997). The Barley Mlo Gene: A Novel Control Element of Plant Pathogen Resistance. Cell *88*, 695–705.

Büttner, D. (2012). Protein Export According to Schedule: Architecture, Assembly, and Regulation of Type III Secretion Systems from Plant- and Animal-Pathogenic Bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *76*, 262–310.

Cao, Y., Tian, B., Liu, Y., Cai, L., Wang, H., Lu, N., Wang, M., Shang, S., Luo, Z., and Shi, J. (2013). Genome Sequencing of Ralstonia solanacearum FQY_4, Isolated from a Bacterial Wilt Nursery Used for Breeding Crop Resistance. Genome Announc *1*.

Castillejo, C., and Pelaz, S. (2008). The Balance between CONSTANS and TEMPRANILLO Activities Determines FT Expression to Trigger Flowering. Current Biology *18*, 1338–1343.

Castillo, J.A., and Greenberg, J.T. (2007). Evolutionary Dynamics of Ralstonia solanacearum. Appl Environ Microbiol *73*, 1225–1238.

Catanzariti, A.-M., Dodds, P.N., Ve, T., Kobe, B., Ellis, J.G., and Staskawicz, B.J. (2010). The AvrM Effector from Flax Rust Has a Structured C-Terminal Domain and Interacts Directly with the M Resistance Protein. Mol Plant Microbe Interact *23*, 49–57.

Catrice, O. (2006). Applications en biologie végétale : contraintes, succès, espoirs. 18.

Causier, B., Ashworth, M., Guo, W., and Davies, B. (2012). The TOPLESS Interactome: A Framework for Gene Repression in Arabidopsis1[W][OA]. Plant Physiol *158*, 423–438.

Chen, L., Shirota, M., Zhang, Y., Kiba, A., Hikichi, Y., and Ohnishi, K. (2014). Involvement of HLK effectors in Ralstonia solanacearum disease development in tomato. Journal of General Plant Pathology *80*, 79–84.

Chen, L.-Q., Hou, B.-H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M.L., Qu, X.-Q., Guo, W.-J., Kim, J.-G., Underwood, W., Chaudhuri, B., et al. (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. Nature *468*, 527–532.

Cheng, M.-C., Liao, P.-M., Kuo, W.-W., and Lin, T.-P. (2013). The Arabidopsis ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Regulates Abiotic Stress-Responsive Gene Expression by Binding to Different cis-Acting Elements in Response to Different Stress Signals1[W][OA]. Plant Physiol *162*, 1566–1582.

Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R., and Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. Proceedings of the National Academy of Sciences *88*, 9578–9582.

Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., and Felix, G. (2006). The Arabidopsis Receptor Kinase FLS2 Binds flg22 and Determines the Specificity of Flagellin Perception. The Plant Cell *18*, 465–476.

Choi, J., Huh, S.U., Kojima, M., Sakakibara, H., Paek, K.-H., and Hwang, I. (2010). The Cytokinin-Activated Transcription Factor ARR2 Promotes Plant Immunity via TGA3/NPR1-Dependent Salicylic Acid Signaling in Arabidopsis. Developmental Cell *19*, 284–295.

Clough, S.J., Lee, K.E., Schell, M.A., and Denny, T.P. (1997). A two-component system in Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum modulates production of PhcA-regulated virulence factors in response to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. Journal of Bacteriology *179*, 3639–3648.

Coll, N.S., Epple, P., and Dangl, J.L. (2011). Programmed cell death in the plant immune system. Cell Death Differ *18*, 1247–1256.

Cunnac, S., Occhialini, A., Barberis, P., Boucher, C., and Genin, S. (2004). Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in Ralstonia solanacearum: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. Molecular Microbiology *53*, 115–128.

Curtis, M.D., and Grossniklaus, U. (2003). A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta. Plant Physiol *133*, 462–469.

Denny, T. (2006). Plant pathogenic Ralstonia species. In Plant-Associated Bacteria, S.S. Gnanamanickam, ed. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 573–644.

Deslandes, L., Pileur, F., Liaubet, L., Camut, S., Can, C., Williams, K., Holub, E., Beynon, J., Arlat, M., and Marco, Y. (1998). Genetic characterization of RRS1, a recessive locus in Arabidopsis thaliana that confers resistance to the bacterial soilborne pathogen Ralstonia solanacearum. Mol. Plant Microbe Interact. *11*, 659–667.

Dombrecht, B., Xue, G.P., Sprague, S.J., Kirkegaard, J.A., Ross, J.J., Reid, J.B., Fitt, G.P., Sewelam, N., Schenk, P.M., Manners, J.M., et al. (2007). MYC2 Differentially Modulates Diverse Jasmonate-Dependent Functions in Arabidopsis. The Plant Cell *19*, 2225–2245.

Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. Current Opinion in Plant Biology *7*, 547–552.

Dubreuil-Maurizi, C., and Poinssot, B. (2012). Role of glutathione in plant signaling under biotic stress. Plant Signal Behav *7*, 210–212.

Durner, J., Shah, J., and Klessig, D.F. (1997). Salicylic acid and disease resistance in plants. Trends in Plant Science *2*, 266–274.

Eck, J.V., Kirk, D.D., and Walmsley, A.M. (2006). Tomato (Lycopersicum esculentum). In Agrobacterium Protocols, K. Wang, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 459–474.

Ellul, P., Garcia-Sogo, B., Pineda, B., Ríos, G., Roig, L., and Moreno, V. (2003). The ploidy level of transgenic plants in Agrobacterium-mediated transformation of tomato cotyledons (Lycopersicon esculentum L.Mill.) is genotype and procedure dependent. Theor Appl Genet *106*, 231–238.

Endres, M.W., Gregory, B.D., Gao, Z., Foreman, A.W., Mlotshwa, S., Ge, X., Pruss, G.J., Ecker, J.R., Bowman, L.H., and Vance, V. (2010). Two Plant Viral Suppressors of Silencing Require the Ethylene-Inducible Host Transcription Factor RAV2 to Block RNA Silencing. PLoS Pathogens *6*, e1000729.

Feng, F., Yang, F., Rong, W., Wu, X., Zhang, J., Chen, S., He, C., and Zhou, J.-M. (2012). A *Xanthomonas* uridine 5′-monophosphate transferase inhibits plant immune kinases. Nature *485*, 114–118.

Fernandez-Pozo, N., Rosli, H.G., Martin, G.B., and Mueller, L.A. (2015). The SGN VIGS Tool: User-Friendly Software to Design Virus-Induced Gene Silencing (VIGS) Constructs for Functional Genomics. Molecular Plant *8*, 486–488.

Figueroa, P., Gusmaroli, G., Serino, G., Habashi, J., Ma, L., Shen, Y., Feng, S., Bostick, M., Callis, J., Hellmann, H., et al. (2005). Arabidopsis Has Two Redundant Cullin3 Proteins That Are Essential for Embryo Development and That Interact with RBX1 and BTB Proteins to Form Multisubunit E3 Ubiquitin Ligase Complexes in Vivo. Plant Cell *17*, 1180–1195.

Finn, R.D., Attwood, T.K., Babbitt, P.C., Bateman, A., Bork, P., Bridge, A.J., Chang, H.-Y., Dosztányi, Z., El-Gebali, S., Fraser, M., et al. (2017). InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. Nucleic Acids Res *45*, D190–D199.

Flaus, A., and Owen-Hughes, T. (2011). Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling: The means to the end. FEBS J *278*, 3579–3595.

Flor, H.H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. Annual Review of Phytopathology *9*, 275–296.

Fujiwara, S., Kawazoe, T., Ohnishi, K., Kitagawa, T., Popa, C., Valls, M., Genin, S., Nakamura, K., Kuramitsu, Y., Tanaka, N., et al. (2016). RipAY, a Plant Pathogen Effector Protein, Exhibits Robust γ-Glutamyl Cyclotransferase Activity When Stimulated by Eukaryotic Thioredoxins. J Biol Chem *291*, 6813–6830.

Furutani, A., Takaoka, M., Sanada, H., Noguchi, Y., Oku, T., Tsuno, K., Ochiai, H., and Tsuge, S. (2009). Identification of Novel Type III Secretion Effectors in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Molecular Plant-Microbe Interactions *22*, 96–106.

Galán, J.E., and Collmer, A. (1999). Type III Secretion Machines: Bacterial Devices for Protein Delivery into Host Cells. Science *284*, 1322–1328.

Galbraith, D.W., Harkins, K.R., Maddox, J.M., Ayres, N.M., Sharma, D.P., and Firoozabady, E. (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. Science *220*, 1049–1051.

Genin, S., and Denny, T.P. (2012). Pathogenomics of the Ralstonia solanacearum Species Complex. Annual Review of Phytopathology *50*, 67–89.

Gijsegem, F. van, Gough, C., Zischek, C., Niqueux, E., Arlat, M., Genin, S., Barberis, P., German, S., Castello, P., and Boucher, C. (1995). The hrp gene locus of Pseudomonas solanacearum, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. Molecular Microbiology *15*, 1095–1114.

Gijsegem, F.V., Vasse, J., Rycke, R.D., Castello, P., and Boucher, C. (2002). Genetic dissection of the Ralstonia solanacearum hrp gene cluster reveals that the HrpV and HrpX proteins are required for Hrp pilus assembly. Molecular Microbiology *44*, 935–946.

Gimenez-Ibanez, S., Boter, M., Fernández-Barbero, G., Chini, A., Rathjen, J.P., and Solano, R. (2014). The Bacterial Effector HopX1 Targets JAZ Transcriptional Repressors to Activate Jasmonate Signaling and Promote Infection in Arabidopsis. PLOS Biology *12*, e1001792.

Göhre, V., Spallek, T., Häweker, H., Mersmann, S., Mentzel, T., Boller, T., de Torres, M., Mansfield, J.W., and Robatzek, S. (2008). Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. Curr. Biol. *18*, 1824–1832.

Goldfarb, D.S., Gariépy, J., Schoolnik, G., and Kornberg, R.D. (1986). Synthetic peptides as nuclear localization signals. Nature *322*, 641–644.

González, E.T., and Allen, C. (2003). Characterization of a *Ralstonia solanacearum* Operon Required for Polygalacturonate Degradation and Uptake of Galacturonic Acid. Molecular Plant-Microbe Interactions *16*, 536–544.

Haegeman, A., Mantelin, S., Jones, J.T., and Gheysen, G. (2012). Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. Gene *492*, 19–31.

Hayward, A.C. (1991). Biology and Epidemiology of Bacterial Wilt Caused by Pseudomonas Solanacearum. Annual Review of Phytopathology *29*, 65–87.

He, Q., McLellan, H., Boevink, P.C., Sadanandom, A., Xie, C., Birch, P.R.J., and Tian, Z. (2015). U-box E3 ubiquitin ligase PUB17 acts in the nucleus to promote specific immune pathways triggered by Phytophthora infestans. J. Exp. Bot. *66*, 3189–3199.

Hikichi, Y., Nakazawa-Nasu, Y., Kitanosono, S., Suzuki, K., and Okuno, T. (1999). The Behavior of Lux-marked Ralstonia solanacearum in Grafted Tomato Cultivars Resistant or Susceptible to Bacterial Wilt. Japanese Journal of Phytopathology *65*, 597–603.

Hodgkinson, J.L., Horsley, A., Stabat, D., Simon, M., Johnson, S., Fonseca, P.C.A. da, Morris, E.P., Wall, J.S., Lea, S.M., and Blocker, A.J. (2009). Three-dimensional reconstruction of the *Shigella* T3SS transmembrane regions reveals 12-fold symmetry and novel features throughout. Nature Structural & Molecular Biology *16*, 477–485.

Horstman, A., Nougalli Tonaco, I.A., Boutilier, K., and Immink, R.G.H. (2014a). A Cautionary Note on the Use of Split-YFP/BiFC in Plant Protein-Protein Interaction Studies. Int J Mol Sci *15*, 9628–9643.

Horstman, A., Willemsen, V., Boutilier, K., and Heidstra, R. (2014b). AINTEGUMENTA-LIKE proteins: hubs in a plethora of networks. Trends in Plant Science *19*, 146–157.

Hou, X., Lee, L.Y.C., Xia, K., Yan, Y., and Yu, H. (2010). DELLAs Modulate Jasmonate Signaling via Competitive Binding to JAZs. Developmental Cell *19*, 884–894.

Ikeda, M., and Ohme-Takagi, M. (2009). A Novel Group of Transcriptional Repressors in Arabidopsis. Plant Cell Physiol *50*, 970–975.

Ishikawa, K., Yamaguchi, K., Sakamoto, K., Yoshimura, S., Inoue, K., Tsuge, S., Kojima, C., and Kawasaki, T. (2014). Bacterial effector modulation of host E3 ligase activity suppresses PAMP-triggered immunity in rice. Nature Communications *5*, 5430.

Jacob, F., Vernaldi, S., and Maekawa, T. (2013). Evolution and Conservation of Plant NLR Functions. Front. Immunol. *4*.

Jacobs, J.M., Milling, A., Mitra, R.M., Hogan, C.S., Ailloud, F., Prior, P., and Allen, C. (2013). Ralstonia solanacearum Requires PopS, an Ancient AvrE-Family Effector, for Virulence and To Overcome Salicylic Acid-Mediated Defenses during Tomato Pathogenesis. MBio *4*, e00875-13.

Jamir, Y., Guo, M., Oh, H.-S., Petnicki-Ocwieja, T., Chen, S., Tang, X., Dickman, M.B., Collmer, A., and Alfano, J.R. (2004). Identification of Pseudomonas syringae type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. The Plant Journal *37*, 554–565.

Janse, J.D. (1996). Potato brown rot in western Europe – history, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. EPPO Bulletin *26*, 679–695.

Janse, J.D., van den Beld, H.E., Elphinstone, J., Simpkins, S., Tjou-Tam-Sin, N.N.A., and van Vaerenbergh, J. (2004). INTRODUCTION TO EUROPE OF RALSTONIA SOLANACEARUM BIOVAR 2, RACE 3 IN PELARGONIUM ZONALE CUTTINGS. Journal of Plant Pathology *86*, 147–155.

Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., and Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. EMBO J *19*, 4004–4014.

Jiang, G., Wei, Z., Xu, J., Chen, H., Zhang, Y., She, X., Macho, A.P., Ding, W., and Liao, B. (2017). Bacterial Wilt in China: History, Current Status, and Future Perspectives. Front Plant Sci *8*.

Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. Nature *444*, 323–329.

Jones, D.T., Taylor, W.R., and Thornton, J.M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Bioinformatics *8*, 275–282.

Kachroo, A., and Robin, G.P. (2013). Systemic signaling during plant defense. Current Opinion in Plant Biology *16*, 527–533.

Kadota, Y., Sklenar, J., Derbyshire, P., Stransfeld, L., Asai, S., Ntoukakis, V., Jones, J.D., Shirasu, K., Menke, F., Jones, A., et al. (2014). Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity. Mol. Cell *54*, 43–55.

Kagaya, Y., Ohmiya, K., and Hattori, T. (1999). RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. Nucleic Acids Res *27*, 470–478.

Kai, K., Ohnishi, H., Shimatani, M., Ishikawa, S., Mori, Y., Kiba, A., Ohnishi, K., Tabuchi, M., and Hikichi, Y. (2015). Methyl 3-Hydroxymyristate, a Diffusible Signal Mediating phc Quorum Sensing in Ralstonia solanacearum. ChemBioChem *16*, 2309–2318.

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.

Kato, N., and Jones, J. (2010). The split luciferase complementation assay. Methods Mol. Biol. *655*, 359–376.

Khokhani, D., Lowe-Power, T.M., Tran, T.M., and Allen, C. (2017). A Single Regulator Mediates Strategic Switching between Attachment/Spread and Growth/Virulence in the Plant Pathogen Ralstonia solanacearum. MBio *8*, e00895-17.

Kim, H., Kim, S.-H., Seo, D.H., Chung, S., Kim, S.-W., Lee, J.-S., Kim, W.T., and Lee, J.-H. (2016). ABA-HYPERSENSITIVE BTB/POZ PROTEIN 1 functions as a negative regulator in ABA-mediated inhibition of germination in <Emphasis Type="Italic">Arabidopsis</Emphasis>. Plant Mol Biol *90*, 303–315.

Kim, M.G., Cunha, L. da, McFall, A.J., Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J.L., and Mackey, D. (2005). Two Pseudomonas syringae Type III Effectors Inhibit RIN4-Regulated Basal Defense in Arabidopsis. Cell *121*, 749–759.

Kobayashi, M., Ohura, I., Kawakita, K., Yokota, N., Fujiwara, M., Shimamoto, K., Doke, N., and Yoshioka, H. (2007). Calcium-Dependent Protein Kinases Regulate the Production of Reactive Oxygen Species by Potato NADPH Oxidase. The Plant Cell *19*, 1065–1080.

Koncz, C., and Schell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. Molec Gen Genet *204*, 383–396.

Kouzai, Y., Nakajima, K., Hayafune, M., Ozawa, K., Kaku, H., Shibuya, N., Minami, E., and Nishizawa, Y. (2014). CEBiP is the major chitin oligomer-binding protein in rice and plays a main role in the perception of chitin oligomers. Plant Mol. Biol. *84*, 519–528.

Kroj, T., Chanclud, E., Michel-Romiti, C., Grand, X., and Morel, J.-B. (2016). Integration of decoy domains derived from protein targets of pathogen effectors into plant immune receptors is widespread. New Phytologist *210*, 618–626.

Kumagai, M.H., Donson, J., della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K., and Grill, L.K. (1995a). Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. Proc Natl Acad Sci U S A *92*, 1679–1683.

Kumagai, M.H., Donson, J., della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K., and Grill, L.K. (1995b). Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. PNAS *92*, 1679–1683.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., and Battistuzzi, F.U. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol Biol Evol *35*, 1547–1549.

Kunkel, B.N., and Brooks, D.M. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. Current Opinion in Plant Biology *5*, 325–331.

Künstler, A., Bacsó, R., Gullner, G., Hafez, Y.M., and Király, L. (2016). Staying alive – is cell death dispensable for plant disease resistance during the hypersensitive response? Physiological and Molecular Plant Pathology *93*, 75–84.

Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., and Felix, G. (2004). The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in Arabidopsis Plants. The Plant Cell *16*, 3496–3507.

Kwak, M.-J., Kong, H.G., Choi, K., Kwon, S.-K., Song, J.Y., Lee, J., Lee, P.A., Choi, S.Y., Seo, M., Lee, H.J., et al. (2018). Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato. Nature Biotechnology.

Lacombe, S., Rougon-Cardoso, A., Sherwood, E., Peeters, N., Dahlbeck, D., Esse, H.P. van, Smoker, M., Rallapalli, G., Thomma, B.P.H.J., Staskawicz, B., et al. (2010). Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. Nature Biotechnology *28*, 365–369.

Lafortune, D., Béramis, M., Daubèze, A.-M., Boissot, N., and Palloix, A. (2005). Partial Resistance of Pepper to Bacterial Wilt Is Oligogenic and Stable Under Tropical Conditions. Plant Disease *89*, 501–506.

Lamb, C., and Dixon, R.A. (1997). The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology *48*, 251–275.

Lange, O. de, Schreiber, T., Schandry, N., Radeck, J., Braun, K.H., Koszinowski, J., Heuer, H., Strauß, A., and Lahaye, T. (2013). Breaking the DNA-binding code of Ralstonia solanacearum TAL effectors provides new possibilities to generate plant resistance genes against bacterial wilt disease. New Phytologist *199*, 773–786.

Lavie, M., Shillington, E., Eguiluz, C., Grimsley, N., and Boucher, C. (2002). PopP1, a new member of the YopJ/AvrRxv family of type III effector proteins, acts as a host-specificity factor and modulates aggressiveness of Ralstonia solanacearum. Mol. Plant Microbe Interact. *15*, 1058–1068.

Le Roux, C., Huet, G., Jauneau, A., Camborde, L., Trémousaygue, D., Kraut, A., Zhou, B., Levaillant, M., Adachi, H., Yoshioka, H., et al. (2015). A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity. Cell *161*, 1074–1088.

Lebeau, A., Daunay, M.-C., Frary, A., Palloix, A., Wang, J.-F., Dintinger, J., Chiroleu, F., Wicker, E., and Prior, P. (2011). Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the Ralstonia solanacearum species complex. Phytopathology *101*, 154–165.

Lewis, J.D., Lee, A.H.-Y., Hassan, J.A., Wan, J., Hurley, B., Jhingree, J.R., Wang, P.W., Lo, T., Youn, J.-Y., Guttman, D.S., et al. (2013). The Arabidopsis ZED1 pseudokinase is required for ZAR1-mediated immunity induced by the Pseudomonas syringae type III effector HopZ1a. PNAS *110*, 18722–18727.

Li, C.-W., Su, R.-C., Cheng, C.-P., Sanjaya, null, You, S.-J., Hsieh, T.-H., Chao, T.-C., and Chan, M.-T. (2011a). Tomato RAV transcription factor is a pivotal modulator involved in the AP2/EREBP-mediated defense pathway. Plant Physiol. *156*, 213–227.

Li, G., Froehlich, J.E., Elowsky, C., Msanne, J., Ostosh, A.C., Zhang, C., Awada, T., and Alfano, J.R. (2014). Distinct Pseudomonas type-III effectors use a cleavable transit peptide to target chloroplasts. The Plant Journal *77*, 310–321.

Li, L., Stoeckert, C.J., and Roos, D.S. (2003). OrthoMCL: Identification of Ortholog Groups for Eukaryotic Genomes. Genome Res. *13*, 2178–2189.

Li, Z., Wu, S., Bai, X., Liu, Y., Lu, J., Liu, Y., Xiao, B., Lu, X., and Fan, L. (2011b). Genome Sequence of the Tobacco Bacterial Wilt Pathogen Ralstonia solanacearum. J Bacteriol *193*, 6088–6089.

Liu, J., Elmore, J.M., Lin, Z.-J.D., and Coaker, G. (2011). A Receptor-like Cytoplasmic Kinase Phosphorylates the Host Target RIN4, Leading to the Activation of a Plant Innate Immune Receptor. Cell Host & Microbe *9*, 137–146.

Lohou, D., Turner, M., Lonjon, F., Cazalé, A.-C., Peeters, N., Genin, S., and Vailleau, F. (2014). HpaP modulates type III effector secretion in Ralstonia solanacearum and harbours a substrate specificity switch domain essential for virulence. Mol. Plant Pathol. *15*, 601–614.

Long, J.A., Ohno, C., Smith, Z.R., and Meyerowitz, E.M. (2006). TOPLESS Regulates Apical Embryonic Fate in Arabidopsis. Science *312*, 1520–1523.

Lonjon, F., Turner, M., Henry, C., Rengel, D., Lohou, D., van de Kerkhove, Q., Cazalé, A.-C., Peeters, N., Genin, S., and Vailleau, F. (2016). Comparative Secretome Analysis of Ralstonia solanacearum Type 3 Secretion-Associated Mutants Reveals a Fine Control of Effector Delivery, Essential for Bacterial Pathogenicity. Mol. Cell Proteomics *15*, 598–613.

van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M.J. (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. Annual Review of Phytopathology *44*, 135–162.

Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J.J., and Solano, R. (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense. The Plant Cell *15*, 165–178.

Lowe-Power, T.M., Hendrich, C.G., Roepenack-Lahaye, E. von, Li, B., Wu, D., Mitra, R., Dalsing, B.L., Ricca, P., Naidoo, J., Cook, D., et al. (2018). Metabolomics of tomato xylem sap during bacterial wilt reveals Ralstonia solanacearum produces abundant putrescine, a metabolite that accelerates wilt disease. Environmental Microbiology *20*, 1330–1349.

Lu, R., Martin-Hernandez, A.M., Peart, J.R., Malcuit, I., and Baulcombe, D.C. (2003). Virus-induced gene silencing in plants. Methods *30*, 296–303.

Luderer, R., Rivas, S., Nürnberger, T., Mattei, B., Van den Hooven, H.W., Van der Hoorn, R.A.L., Romeis, T., Wehrfritz, J.-M., Blume, B., Nennstiel, D., et al. (2001). No Evidence for Binding Between Resistance Gene Product Cf-9 of Tomato and Avirulence Gene Product AVR9 of *Cladosporium fulvum*. Molecular Plant-Microbe Interactions *14*, 867–876.

Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., and Ton, J. (2011a). Callose deposition: a multifaceted plant defense response. Mol. Plant Microbe Interact. *24*, 183–193.

Luna, E., Bruce, T.J.A., Roberts, M.R., Flors, V., and Ton, J. (2011b). Next Generation Systemic Acquired Resistance. Plant Physiology pp.111.187468.

Ma, W., Dong, F.F.T., Stavrinides, J., and Guttman, D.S. (2006). Type III Effector Diversification via Both Pathoadaptation and Horizontal Transfer in Response to a Coevolutionary Arms Race. PLOS Genetics *2*, e209.

Macho, A.P., and Zipfel, C. (2014). Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling. Molecular Cell *54*, 263–272.

Magnani, E., Sjölander, K., and Hake, S. (2004). From Endonucleases to Transcription Factors: Evolution of the AP2 DNA Binding Domain in Plants. The Plant Cell *16*, 2265–2277.

Matías-Hernández, L., Aguilar-Jaramillo, A.E., Marín-González, E., Suárez-López, P., and Pelaz, S. (2014). RAV genes: regulation of floral induction and beyond. Ann Bot *114*, 1459–1470.

Melnick, A., Ahmad, K.F., Arai, S., Polinger, A., Ball, H., Borden, K.L., Carlile, G.W., Prive, G.G., and Licht, J.D. (2000). In-depth mutational analysis of the promyelocytic leukemia zinc finger BTB/POZ domain reveals motifs and residues required for biological and transcriptional functions. Mol. Cell. Biol. *20*, 6550–6567.

Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S.Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. Cell *126*, 969–980.

Memelink, J. (2009). Regulation of gene expression by jasmonate hormones. Phytochemistry *70*, 1560–1570.

Mersmann, S., Bourdais, G., Rietz, S., and Robatzek, S. (2010). Ethylene Signaling Regulates Accumulation of the FLS2 Receptor and Is Required for the Oxidative Burst Contributing to Plant Immunity1[W]. Plant Physiol *154*, 391–400.

Mew, T.W., and Ho, W.C. (1977). Effect of soil temperature on resistance of tomato cultivarsto bacterial wilt. Phytopathology.

Meyer, D., Cunnac, S., Guéneron, M., Declercq, C., Van Gijsegem, F., Lauber, E., Boucher, C., and Arlat, M. (2006). PopF1 and PopF2, Two Proteins Secreted by the Type III Protein Secretion System of Ralstonia solanacearum, Are Translocators Belonging to the HrpF/NopX Family. J Bacteriol *188*, 4903–4917.

Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., and Michelmore, R.W. (2003). Genome-Wide Analysis of NBS-LRR–Encoding Genes in Arabidopsis. The Plant Cell *15*, 809–834.

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

Mittal, S., and Davis, K.R. (1995). Role of the phytotoxin coronatine in the infection of Arabidopsis thaliana by Pseudomonas syringae pv. tomato. Mol. Plant Microbe Interact. *8*, 165–171.

Mittal, R., Peak-Chew, S.-Y., and McMahon, H.T. (2006). Acetylation of MEK2 and IκB kinase (IKK) activation loop residues by YopJ inhibits signaling. PNAS *103*, 18574–18579.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., and Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave? Trends in Plant Science *16*, 300–309.

Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., and Shibuya, N. (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *104*, 19613–19618.

Moffat, C.S., Ingle, R.A., Wathugala, D.L., Saunders, N.J., Knight, H., and Knight, M.R. (2012). ERF5 and ERF6 Play Redundant Roles as Positive Regulators of JA/Et-Mediated Defense against Botrytis cinerea in Arabidopsis. PLOS ONE *7*, e35995.

Molina, L., and Kahmann, R. (2007). An Ustilago maydis gene involved in H2O2 detoxification is required for virulence. Plant Cell *19*, 2293–2309.

Morel, A., Guinard, J., Lonjon, F., Sujeeun, L., Barberis, P., Genin, S., Vailleau, F., Daunay, M.-C., Dintinger, J., Poussier, S., et al. (2018a). The eggplant AG91-25 recognizes the Type III-secreted effector RipAX2 to trigger resistance to bacterial wilt (Ralstonia solanacearum species complex). Mol. Plant Pathol.

Morel, A., Peeters, N., Vailleau, F., Barberis, P., Jiang, G., Berthomé, R., and Guidot, A. (2018b). Plant Pathogenicity Phenotyping of Ralstonia solanacearum Strains. In Host-Pathogen Interactions: Methods and Protocols, C. Medina, and F.J. López-Baena, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 223–239.

Mukaihara, T., Hatanaka, T., Nakano, M., and Oda, K. (2016). Ralstonia solanacearum Type III Effector RipAY Is a Glutathione-Degrading Enzyme That Is Activated by Plant Cytosolic Thioredoxins and Suppresses Plant Immunity. MBio *7*, e00359-16.

Mukhtar, M.S., Carvunis, A.-R., Dreze, M., Epple, P., Steinbrenner, J., Moore, J., Tasan, M., Galli, M., Hao, T., Nishimura, M.T., et al. (2011). Independently Evolved Virulence Effectors Converge onto Hubs in a Plant Immune System Network. Science *333*, 596–601.

Müller, M., and Munné-Bosch, S. (2015). Ethylene Response Factors: A Key Regulatory Hub in Hormone and Stress Signaling1. Plant Physiol *169*, 32–41.

Naito, K., Taguchi, F., Suzuki, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., and Ichinose, Y. (2008). Amino acid sequence of bacterial microbe-associated molecular pattern flg22 is required for virulence. Mol. Plant Microbe Interact. *21*, 1165–1174.

Occhialini, A., Cunnac, S., Reymond, N., Genin, S., and Boucher, C. (2005). Genome-Wide Analysis of Gene Expression in *Ralstonia solanacearum* Reveals That the *hrpB* Gene Acts as a Regulatory Switch Controlling Multiple Virulence Pathways. Molecular Plant-Microbe Interactions *18*, 938–949.

Ohme-Takagi, M., and Shinshi, H. (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. Plant Cell *7*, 173–182.

Orosa, B., He, Q., Mesmar, J., Gilroy, E.M., McLellan, H., Yang, C., Craig, A., Bailey, M., Zhang, C., Moore, J.D., et al. (2017). BTB-BACK Domain Protein POB1 Suppresses Immune Cell Death by Targeting Ubiquitin E3 ligase PUB17 for Degradation. PLoS Genet *13*.

Osnato, M., Castillejo, C., Matías-Hernández, L., and Pelaz, S. (2012). *TEMPRANILLO* genes link photoperiod and gibberellin pathways to control flowering in *Arabidopsis*. Nature Communications *3*, 808.

Passardi, F., Penel, C., and Dunand, C. (2004). Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. Trends in Plant Science *9*, 534–540.

Paul, M.J., Primavesi, L.F., Jhurreea, D., and Zhang, Y. (2008). Trehalose metabolism and signaling. Annu Rev Plant Biol *59*, 417–441.

Peeters, N., Carrère, S., Anisimova, M., Plener, L., Cazalé, A.-C., and Genin, S. (2013). Repertoire, unified nomenclature and evolution of the Type III effector gene set in the Ralstonia solanacearum species complex. BMC Genomics *14*, 859.

Perrier, A., Barlet, X., Peyraud, R., Rengel, D., Guidot, A., and Genin, S. (2018). Comparative transcriptomic studies identify specific expression patterns of virulence factors under the control of the master regulator PhcA in the Ralstonia solanacearum species complex. Microbial Pathogenesis *116*, 273–278.

Peyraud, R., Cottret, L., Marmiesse, L., Gouzy, J., and Genin, S. (2016). A Resource Allocation Trade-Off between Virulence and Proliferation Drives Metabolic Versatility in the Plant Pathogen Ralstonia solanacearum. PLOS Pathogens *12*, e1005939.

Pfeilmeier, S., George, J., Morel, A., Roy, S., Smoker, M., Stransfeld, L., Downie, J.A., Peeters, N., Malone, J.G., and Zipfel, C. (2018). Expression of the Arabidopsis thaliana immune receptor EFR in Medicago truncatula reduces infection by a root pathogenic bacterium, but not nitrogen-fixing rhizobial symbiosis. Plant Biotechnol. J.

Pieterse, C.M.J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., and Van Wees, S.C.M. (2012). Hormonal Modulation of Plant Immunity. Annual Review of Cell and Developmental Biology *28*, 489–521.

Pintard, L., Willems, A., and Peter, M. (2004). Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3–BTB complexes join the family. EMBO J *23*, 1681–1687.

Pitman, A.R., Jackson, R.W., Mansfield, J.W., Kaitell, V., Thwaites, R., and Arnold, D.L. (2005). Exposure to Host Resistance Mechanisms Drives Evolution of Bacterial Virulence in Plants. Current Biology *15*, 2230–2235.

Popa, C., Li, L., Gil, S., Tatjer, L., Hashii, K., Tabuchi, M., Coll, N.S., Ariño, J., and Valls, M. (2016). The effector AWR5 from the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* is an inhibitor of the TOR signalling pathway. Scientific Reports *6*, 27058.

Poueymiro, M., Cunnac, S., Barberis, P., Deslandes, L., Peeters, N., Cazale-Noel, A.-C., Boucher, C., and Genin, S. (2009). Two Type III Secretion System Effectors from Ralstonia solanacearum GMI1000 Determine Host-Range Specificity on Tobacco. MPMI *22*, 538–550.

Poueymiro, M., Cazalé, A.C., François, J.M., Parrou, J.L., Peeters, N., and Genin, S. (2014). A Ralstonia solanacearum Type III Effector Directs the Production of the Plant Signal Metabolite Trehalose-6-Phosphate. MBio *5*.

Prior, P., Ailloud, F., Dalsing, B.L., Remenant, B., Sanchez, B., and Allen, C. (2016). Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen Ralstonia solanacearum into three species. BMC Genomics *17*.

Ptashne, M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. Nature *335*, 683–689.

Ranf, S., Eschen-Lippold, L., Pecher, P., Lee, J., and Scheel, D. (2011). Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. The Plant Journal *68*, 100–113.

Remenant, B., Coupat-Goutaland, B., Guidot, A., Cellier, G., Wicker, E., Allen, C., Fegan, M., Pruvost, O., Elbaz, M., Calteau, A., et al. (2010). Genomes of three tomato pathogens within the Ralstonia solanacearum species complex reveal significant evolutionary divergence. BMC Genomics *11*, 379.

Remenant, B., de Cambiaire, J.-C., Cellier, G., Jacobs, J.M., Mangenot, S., Barbe, V., Lajus, A., Vallenet, D., Medigue, C., Fegan, M., et al. (2011). Ralstonia syzygii, the Blood Disease Bacterium and some Asian R. solanacearum strains form a single genomic species despite divergent lifestyles. PLoS ONE *6*, e24356.

Remenant, B., Babujee, L., Lajus, A., Médigue, C., Prior, P., and Allen, C. (2012). Sequencing of K60, type strain of the major plant pathogen Ralstonia solanacearum. J. Bacteriol. *194*, 2742–2743.

Remigi, P., Anisimova, M., Guidot, A., Genin, S., and Peeters, N. (2011). Functional diversification of the GALA type III effector family contributes to Ralstonia solanacearum adaptation on different plant hosts. New Phytol *192*, 976–987.

Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.-Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., et al. (2000). Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. Science *290*, 2105–2110.

Römer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauß, T., Bonas, U., and Lahaye, T. (2007). Plant Pathogen Recognition Mediated by Promoter Activation of the Pepper Bs3 Resistance Gene. Science *318*, 645–648.

Ron, M., and Avni, A. (2004). The Receptor for the Fungal Elicitor Ethylene-Inducing Xylanase Is a Member of a Resistance-Like Gene Family in Tomato. Plant Cell *16*, 1604–1615.

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

Ryan, R.P., Vorhölter, F.-J., Potnis, N., Jones, J.B., Van Sluys, M.-A., Bogdanove, A.J., and Dow, J.M. (2011). Pathogenomics of Xanthomonas: understanding bacterium–plant interactions. Nature Reviews Microbiology *9*, 344–355.

Safni, I., Cleenwerck, I., De Vos, P., Fegan, M., Sly, L., and Kappler, U. (2014). Polyphasic taxonomic revision of the Ralstonia solanacearum species complex: proposal to emend the descriptions of Ralstonia solanacearum and Ralstonia syzygii and reclassify current R. syzygii strains as Ralstonia syzygii subsp. syzygii subsp. nov., R. solanacearum phylotype IV strains as Ralstonia syzygii subsp. indonesiensis subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as Ralstonia syzygii subsp. celebesensis subsp. nov. and R. solanacearum phylotype I and III strains as Ralstonia pseudosolanacearum sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *64*, 3087–3103.

Saile, E., McGarvey, J.A., Schell, M.A., and Denny, T.P. (1997). Role of Extracellular Polysaccharide and Endoglucanase in Root Invasion and Colonization of Tomato Plants by *Ralstonia solanacearum*. Phytopathology *87*, 1264–1271.

Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., Abe, H., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). DNA-Binding Specificity of the ERF/AP2 Domain of Arabidopsis DREBs, Transcription Factors Involved in Dehydration- and Cold-Inducible Gene Expression. Biochemical and Biophysical Research Communications *290*, 998–1009.

Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J.C., Cattolico, L., et al. (2002). Genome sequence of the plant pathogen Ralstonia solanacearum. Nature *415*, 497–502.

Sang, Y., and Macho, A.P. (2017). Analysis of PAMP-Triggered ROS Burst in Plant Immunity. In Plant Pattern Recognition Receptors: Methods and Protocols, L. Shan, and P. He, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 143–153.

Sang, Y., Wang, Y., Ni, H., Cazalé, A.-C., She, Y.-M., Peeters, N., and Macho, A.P. (2018). The Ralstonia solanacearum type III effector RipAY targets plant redox regulators to suppress immune responses. Molecular Plant Pathology *19*, 129–142.

Sarris, P.F., Duxbury, Z., Huh, S.U., Ma, Y., Segonzac, C., Sklenar, J., Derbyshire, P., Cevik, V., Rallapalli, G., Saucet, S.B., et al. (2015). A Plant Immune Receptor Detects Pathogen Effectors that Target WRKY Transcription Factors. Cell *161*, 1089–1100.

Sarris, P.F., Cevik, V., Dagdas, G., Jones, J.D.G., and Krasileva, K.V. (2016). Comparative analysis of plant immune receptor architectures uncovers host proteins likely targeted by pathogens. BMC Biology *14*, 8.

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

Schandry, N., de Lange, O., Prior, P., and Lahaye, T. (2016). TALE-Like Effectors Are an Ancestral Feature of the Ralstonia solanacearum Species Complex and Converge in DNA Targeting Specificity. Front. Plant Sci. *7*.

van Schie, C.C.N., and Takken, F.L.W. (2014). Susceptibility Genes 101: How to Be a Good Host. Annual Review of Phytopathology *52*, 551–581.

Schoonbeek, H., Wang, H.-H., Stefanato, F.L., Craze, M., Bowden, S., Wallington, E., Zipfel, C., and Ridout, C.J. (2015). Arabidopsis EF-Tu receptor enhances bacterial disease resistance in transgenic wheat. New Phytologist *206*, 606–613.

Schultink, A., Qi, T., Bally, J., and Staskawicz, B. (2018). Using forward genetics in Nicotiana benthamiana to uncover the immune signaling pathway mediating recognition of the Xanthomonas perforans effector XopJ4. New Phytol.

Schweizer, P., Felix, G., Buchala, A., Müller, C., and Métraux, J.-P. (1996). Perception of free cutin monomers by plant cells. The Plant Journal *10*, 331–341.

Shaikhali, J., Heiber, I., Seidel, T., Ströher, E., Hiltscher, H., Birkmann, S., Dietz, K.-J., and Baier, M. (2008). The redox-sensitive transcription factor Rap2.4a controls nuclear expression of 2-Cys peroxiredoxin A and other chloroplast antioxidant enzymes. BMC Plant Biology *8*, 48.

Shan, L., He, P., Li, J., Heese, A., Peck, S.C., Nürnberger, T., Martin, G.B., and Sheen, J. (2008). Bacterial Effectors Target the Common Signaling Partner BAK1 to Disrupt Multiple MAMP Receptor-Signaling Complexes and Impede Plant Immunity. Cell Host & Microbe *4*, 17–27.

Shoji, T., Kajikawa, M., and Hashimoto, T. (2010). Clustered Transcription Factor Genes Regulate Nicotine Biosynthesis in Tobacco. The Plant Cell *22*, 3390–3409.

Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J., and Harper, J.W. (1997). F-Box Proteins Are Receptors that Recruit Phosphorylated Substrates to the SCF Ubiquitin-Ligase Complex. Cell *91*, 209–219.

Solé, M., Popa, C., Mith, O., Sohn, K.H., Jones, J.D.G., Deslandes, L., and Valls, M. (2012). The awr gene family encodes a novel class of Ralstonia solanacearum type III effectors displaying virulence and avirulence activities. Mol. Plant Microbe Interact. *25*, 941–953.

Stogios, P.J., and Privé, G.G. (2004). The BACK domain in BTB-kelch proteins. Trends in Biochemical Sciences *29*, 634–637.

Stogios, P.J., Downs, G.S., Jauhal, J.J., Nandra, S.K., and Privé, G.G. (2005). Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. Genome Biol *6*, R82.

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

Sun, Y., Li, L., Macho, A.P., Han, Z., Hu, Z., Zipfel, C., Zhou, J.-M., and Chai, J. (2013). Structural basis for flg22-induced activation of the Arabidopsis FLS2-BAK1 immune complex. Science *342*, 624–628.

Takahashi, H., Shimizu, A., Arie, T., Rosmalawati, S., Fukushima, S., Kikuchi, M., Hikichi, Y., Kanda, A., Takahashi, A., Kiba, A., et al. (2005). Catalog of Micro-Tom tomato responses to common fungal, bacterial, and viral pathogens. Journal of General Plant Pathology *71*, 8–22.

Takeaki Ozawa, †, Asami Kaihara, ‡, Moritoshi Sato, †, Kazunari Tachihara, ‡ and, and Yoshio Umezawa*, † (2001). Split Luciferase as an Optical Probe for Detecting Protein−Protein Interactions in Mammalian Cells Based on Protein Splicing.

Takken, F.L.W., and Tameling, W.I.L. (2009). To Nibble at Plant Resistance Proteins. Science *324*, 744–746.

Tampakaki, A.P., Skandalis, N., Gazi, A.D., Bastaki, M.N., Sarris, P.F., Charova, S.N., Kokkinidis, M., and Panopoulos, N.J. (2010). Playing the "Harp": evolution of our understanding of hrp/hrc genes. Annu Rev Phytopathol *48*, 347–370.

Tans-Kersten, J., Huang, H., and Allen, C. (2001). Ralstonia solanacearum Needs Motility for Invasive Virulence on Tomato. Journal of Bacteriology *183*, 3597–3605.

Tasset, C., Bernoux, M., Jauneau, A., Pouzet, C., Brière, C., Kieffer-Jacquinod, S., Rivas, S., Marco, Y., and Deslandes, L. (2010). Autoacetylation of the Ralstonia solanacearum Effector PopP2 Targets a Lysine Residue Essential for RRS1-R-Mediated Immunity in Arabidopsis. PLoS Pathog *6*.

Torres, M.A. (2010). ROS in biotic interactions. Physiologia Plantarum *138*, 414–429.

Tran, T.M., MacIntyre, A., Khokhani, D., Hawes, M., and Allen, C. (2016). Extracellular DNases of Ralstonia solanacearum modulate biofilms and facilitate bacterial wilt virulence. Environmental Microbiology *18*, 4103–4117.

Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J., and Katagiri, F. (2009). Network Properties of Robust Immunity in Plants. PLOS Genetics *5*, e1000772.

Vailleau, F., Sartorel, E., Jardinaud, M.-F., Chardon, F., Genin, S., Huguet, T., Gentzbittel, L., and Petitprez, M. (2007). Characterization of the interaction between the bacterial wilt pathogen Ralstonia solanacearum and the model legume plant Medicago truncatula. Mol. Plant Microbe Interact. *20*, 159–167.

Valls, M., Genin, S., and Boucher, C. (2006). Integrated Regulation of the Type III Secretion System and Other Virulence Determinants in Ralstonia solanacearum. PLoS Pathog *2*.

Voigt, C.A. (2014). Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. Front. Plant Sci. *5*.

Walley, J.W., Rowe, H.C., Xiao, Y., Chehab, E.W., Kliebenstein, D.J., Wagner, D., and Dehesh, K. (2008). The Chromatin Remodeler SPLAYED Regulates Specific Stress Signaling Pathways. PLoS Pathog *4*.

Wang, J.-F., Chen, N.-C., and Li, H.-M. (1998). Resistance Sources to Bacterial Wilt in Eggplant (Solanum melongena). In Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects, P. Prior, C. Allen, and J. Elphinstone, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 284–289.

Wang, J.F., Olivier, J., Thoquet, P., Mangin, B., Sauviac, L., and Grimsley, N.H. (2000). Resistance of tomato line Hawaii7996 to Ralstonia solanacearum Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus. Mol. Plant Microbe Interact. *13*, 6–13.

Wang, K., Remigi, P., Anisimova, M., Lonjon, F., Kars, I., Kajava, A., Li, C.-H., Cheng, C.-P., Vailleau, F., Genin, S., et al. (2016). Functional assignment to positively selected sites in the core type III effector RipG7 from Ralstonia solanacearum. Molecular Plant Pathology *17*, 553–564.

Wang, S., Boevink, P.C., Welsh, L., Zhang, R., Whisson, S.C., and Birch, P.R.J. (2017). Delivery of cytoplasmic and apoplastic effectors from Phytophthora infestans haustoria by distinct secretion pathways. New Phytologist *216*, 205–215.

Wei, Y., Chang, Y., Zeng, H., Liu, G., He, C., and Shi, H. RAV transcription factors are essential for disease resistance against cassava bacterial blight via activation of melatonin biosynthesis genes. Journal of Pineal Research *64*, e12454.

Wei, Z., Yang, X., Yin, S., Shen, Q., Ran, W., and Xu, Y. (2011). Efficacy of Bacillus-fortified organic fertiliser in controlling bacterial wilt of tomato in the field. Applied Soil Ecology *48*, 152–159.

Wei, Z., Huang, J., Tan, S., Mei, X., Shen, Q., and Xu, Y. (2013). The congeneric strain Ralstonia pickettii QL-A6 of Ralstonia solanacearum as an effective biocontrol agent for bacterial wilt of tomato. Biological Control *65*, 278–285.

Welsch, R., Maass, D., Voegel, T., DellaPenna, D., and Beyer, P. (2007). Transcription Factor RAP2.2 and Its Interacting Partner SINAT2: Stable Elements in the Carotenogenesis of Arabidopsis Leaves. Plant Physiol *145*, 1073–1085.

Wendehenne, D., Lamotte, O., Frachisse, J.-M., Barbier-Brygoo, H., and Pugin, A. (2002). Nitrate Efflux Is an Essential Component of the Cryptogein Signaling Pathway Leading to Defense Responses and Hypersensitive Cell Death in Tobacco. The Plant Cell *14*, 1937–1951.

Weßling, R., Epple, P., Altmann, S., He, Y., Yang, L., Henz, S.R., McDonald, N., Wiley, K., Bader, K.C., Gläßer, C., et al. (2014). Convergent targeting of a common host protein-network by pathogen effectors from three kingdoms of life. Cell Host Microbe *16*, 364–375.

Willmann, R., Lajunen, H.M., Erbs, G., Newman, M.-A., Kolb, D., Tsuda, K., Katagiri, F., Fliegmann, J., Bono, J.-J., Cullimore, J.V., et al. (2011). Arabidopsis lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. PNAS *108*, 19824–19829.

Worley, J.N., Pombo, M.A., Zheng, Y., Dunham, D.M., Myers, C.R., Fei, Z., and Martin, G.B. (2016). A novel method of transcriptome interpretation reveals a quantitative suppressive effect on tomato immune signaling by two domains in a single pathogen effector protein. BMC Genomics *17*.

Wu, C.-H., Belhaj, K., Bozkurt, T.O., Birk, M.S., and Kamoun, S. (2016). Helper NLR proteins NRC2a/b and NRC3 but not NRC1 are required for Pto-mediated cell death and resistance in Nicotiana benthamiana. New Phytologist *209*, 1344–1352.

Wu, C.-H., Abd-El-Haliem, A., Bozkurt, T.O., Belhaj, K., Terauchi, R., Vossen, J.H., and Kamoun, S. (2017). NLR network mediates immunity to diverse plant pathogens. Proc Natl Acad Sci U S A *114*, 8113–8118.

Wu, G., Shortt, B.J., Lawrence, E.B., Levine, E.B., Fitzsimmons, K.C., and Shah, D.M. (1995). Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H2O2-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. Plant Cell *7*, 1357–1368.

Xin, X.-F., Nomura, K., Aung, K., Velásquez, A.C., Yao, J., Boutrot, F., Chang, J.H., Zipfel, C., and He, S.Y. (2016). Bacteria establish an aqueous living space in plants crucial for virulence. Nature *539*, 524–529.

Xi'ou, X., Bihao, C., Guannan, L., Jianjun, L., Qinghua, C., Jin, J., and Yujing, C. (2015). Functional Characterization of a Putative Bacterial Wilt Resistance Gene (RE-bw) in Eggplant. Plant Mol Biol Rep *33*, 1058–1073.

Xu, J., Zheng, H., Liu, L., Pan, Z., Prior, P., Tang, B., Xu, J., Zhang, H., Tian, Q., Zhang, L., et al. (2011). Complete Genome Sequence of the Plant Pathogen Ralstonia solanacearum Strain Po82. Journal of Bacteriology *193*, 4261–4262.

Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., and Nishiuchi, Y. (1995). Transfer of two Burkholderia and an Alcaligenes species to Ralstonia gen. Nov.: Proposal of Ralstonia pickettii (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., Ralstonia solanacearum (Smith 1896) comb. Nov. and Ralstonia eutropha (Davis 1969) comb. Nov. Microbiol. Immunol. *39*, 897–904.

Yamada, K., Yamaguchi, K., Shirakawa, T., Nakagami, H., Mine, A., Ishikawa, K., Fujiwara, M., Narusaka, M., Narusaka, Y., Ichimura, K., et al. (2016). The Arabidopsis CERK1-associated kinase PBL27 connects chitin perception to MAPK activation. EMBO J. *35*, 2468–2483.

Zabala, M.D.T., Bennett, M.H., Truman, W.H., and Grant, M.R. (2009). Antagonism between salicylic and abscisic acid reflects early host–pathogen conflict and moulds plant defence responses. The Plant Journal *59*, 375–386.

Zhang, S., and Klessig, D.F. (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. Trends in Plant Science *6*, 520–527.

Zhang, H., Zhang, D., Chen, J., Yang, Y., Huang, Z., Huang, D., Wang, X.-C., and Huang, R. (2004). Tomato stress-responsive factor TSRF1 interacts with ethylene responsive element GCC box and regulates pathogen resistance to Ralstonia solanacearum. Plant Mol. Biol. *55*, 825–834.

Zhang, J., Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., Zou, Y., Long, C., Lan, L., Chai, J., et al. (2007). A Pseudomonas syringae Effector Inactivates MAPKs to Suppress PAMP-Induced Immunity in Plants. Cell Host & Microbe *1*, 175–185.

Zhang, J., Yin, Z., and White, F. (2015). TAL effectors and the executor R genes. Front Plant Sci *6*, 641.

Zhou, J., Wu, S., Chen, X., Liu, C., Sheen, J., Shan, L., and He, P. (2014). Pseudomonas syringae Effector HopF2 Suppresses Arabidopsis Immunity by Targeting BAK1. Plant J *77*, 235–245.

Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T., and Felix, G. (2006). Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts Agrobacterium-Mediated Transformation. Cell *125*, 749–760.

Zuo, J., Niu, Q.W., and Chua, N.H. (2000). Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. Plant J. *24*, 265–273.

Annexe 1 – Article

« Expression of the Arabidopsis thaliana immune receptor EFR in Medicago truncatula reduces infection by a root pathogenic bacterium, but not nitrogen-fixing rhizobial symbiosis. »

Résumé de l'article

Le transfert de PRR entre différentes familles botaniques de plantes est une approche biotechnologique prometteuse pour mettre en place une résistance potentiellement durable et à large spectre dans les plantes cultivées. Il n'est en revanche pas certain que l'introduction de ces PPR permettant la reconnaissance de nouveaux MAMPs n'affecte pas les interactions de la plante de destination avec les microorganismes bénéfiques pour elle. Pour tester cette hypothèse, le PRR EFR « ELONGATION FACTOR-THERMO UNSTABLE RECEPTOR » qui est spécifique aux brassicacée qui permet la reconnaissance de la protéine bactérienne EF-Tu a été transféré depuis *Arabidopsis thaliana* dans la légumineuse *Medicago truncatula*. L'expression constitutive de EFR a mené à son accumulation et à l'activation des défenses immunitaires dans les feuilles et les racines après traitement par le peptide elf18 dérivé de EF-Tu. L'interaction entre *M. truncatula* et le symbionte *Sinorhizobium meliloti* est caractérisé par la formation de nodosités qui permettent la fixation de l'azote atmosphérique. Le nombre de nodosités était légèrement réduit à un stade précoce dans les plantes EFR comparées aux plantes contrôles, mais aucune différence n'a été observée à un stade plus tardif. De plus la colonisation des nodosités par les rhizobactéries et la fixation de l'azote ne semblent pas influencées par l'expression d'EFR. En revanche, les lignées de *M. truncatula* exprimant EFR semblent plus tolérantes à l'infection par la bactérie pathogène du sol *Ralstonia pseudosolanacearum.* Ces données suggèrent que le transfert de EFR dans *M. truncatula* n'est pas au détriment de la symbiose nodulaire mais a un impact positif sur la tolérance contre un pathogène bactérien. De plus, cela montre que les Rhizobia peuvent soit éviter la reconnaissance de leurs PAMPs durant le processus d'infection soit qu'elles ont un moyen de supprimer les réponses immunitaires.

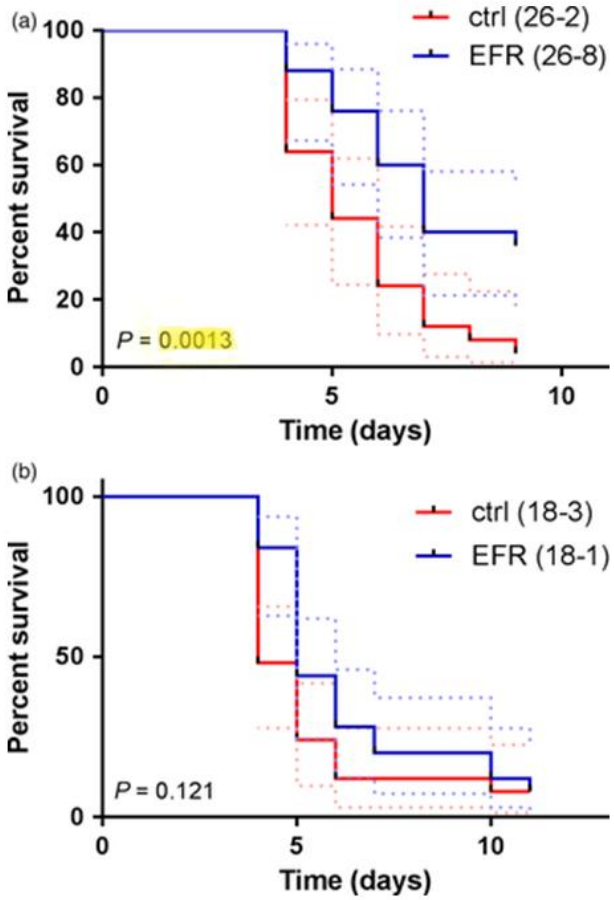


Figure supplémentaire 1. L'expression de *EFR* dans *Medicago truncatula* amène une résistance quantitative contre le pathogène *Ralstonia pseudosolanacearum.* (a) Des lignées de Medicago truncatula exprimant EFR 26-8 et contrôle 26-2 ont té inoculées par la souche GMI1000 de *R. pseudosolanacearum* et les symptômes de maladie notés chaque jour. La p-value a été calculée sur la différence de survie par un test de Mantel-cox (n = 25) (b) Des lignées de Medicago truncatula exprimant EFR 18-1 et contrôle 18-3 ont té inoculées par la souche GMI1000 de *R. pseudosolanacearum* et les symptômes de maladie notés chaque jour. La p-value a été calculée sur la différence de survie par un test de Mantel-cox (n = 25). Les pointillés représentent un intervalle de confiance de 95%.

Contribution

Lors de ma thèse, j'ai participé à cette publication en effectuant les inoculations par *R. pseudosolanacearum* des lignées de *M. trucatula* transformées ou non par EFR. La figure 4 de cet article provenant de ces expérimentations est présentée ici, avec une figure supplémentaire montrant l'ensemble des répétitions biologiques effectuées.

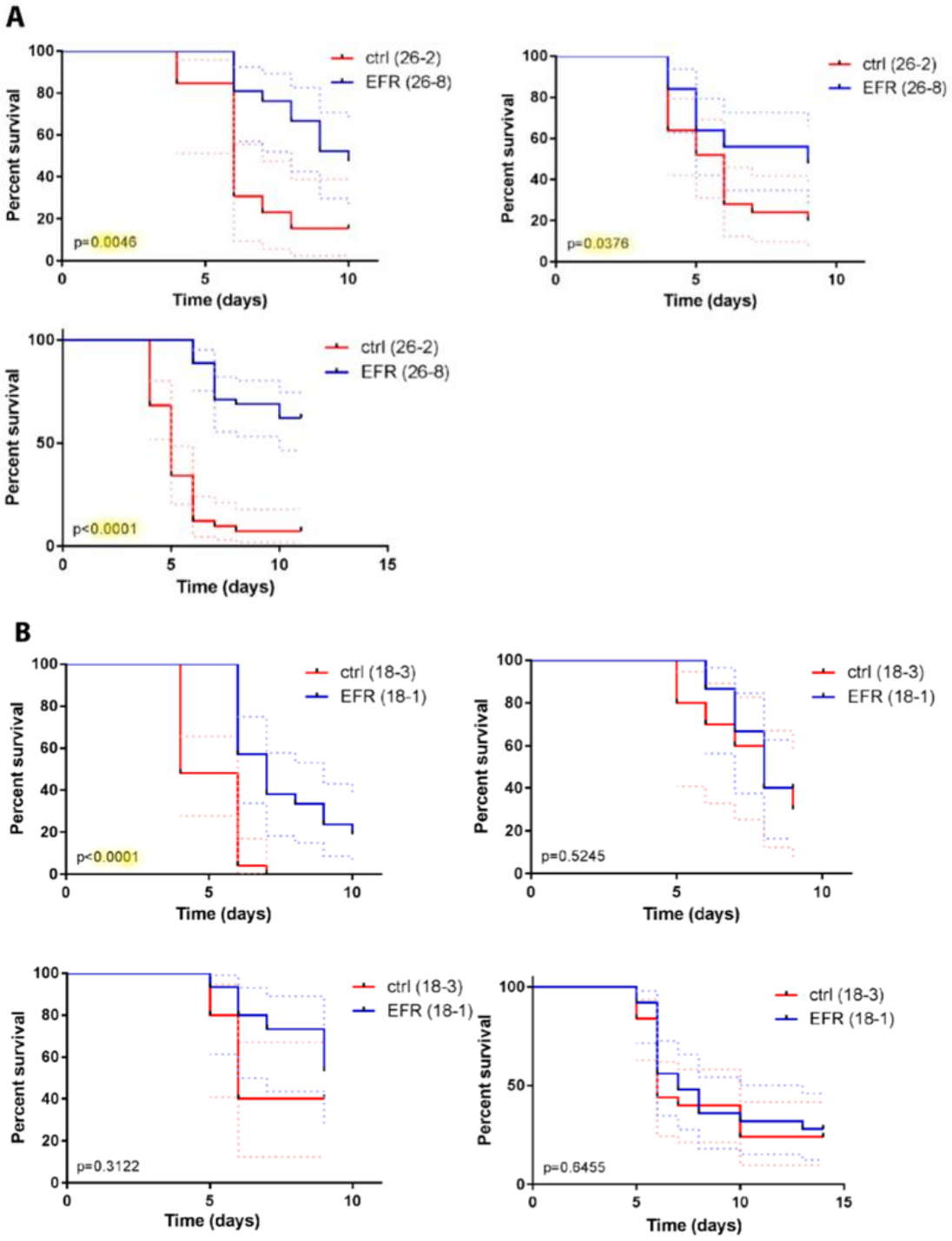


Figure supplémentaire 1.2. L'expression de *EFR* dans *Medicago truncatula* amène une résistance quantitative contre le pathogène *Ralstonia pseudosolanacearum.* Répétitions biologiques des inoculations montrées sur la figure supplémentaire 1.

Plant Biotechnology Journal
Open Access

Research Article | Open Access

Expression of the *Arabidopsis thaliana* immune receptor *EFR* in *Medicago truncatula* reduces infection by a root pathogenic bacterium, but not nitrogen-fixing rhizobial symbiosis

Sebastian Pfeilmeier, Jeoffrey George, Arry Morel, Sonali Roy, Matthew Smoker, Lena Stransfeld, J. Allan Downie, Nemo Peeters, Jacob G. Malone, Cyril Zipfel

First published: 18 August 2018 | https://doi.org/10.1111/pbi.12999

Summary

Interfamily transfer of plant pattern recognition receptors (PRRs) represents a promising biotechnological approach to engineer broad-spectrum, and potentially durable, disease resistance in crops. It is however unclear whether new recognition specificities to given pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) affect the interaction of the recipient plant with beneficial microbes. To test this in a direct reductionist approach, we transferred the *Brassicaceae*-specific PRR ELONGATION FACTOR-THERMO UNSTABLE RECEPTOR (EFR), conferring recognition of the bacterial EF-Tu protein, from *Arabidopsis thaliana* to the legume *Medicago truncatula*. Constitutive *EFR* expression led to EFR accumulation and activation of immune responses upon treatment with the EF-Tu-derived elf18 peptide in leaves and roots. The interaction of *M. truncatula* with the bacterial symbiont *Sinorhizobium meliloti* is characterized by the formation of root nodules that fix atmospheric nitrogen. Although nodule numbers were slightly reduced at an early stage of the infection in *EFR-Medicago* when compared to control lines, nodulation was similar in all lines at later stages. Furthermore, nodule colonization by rhizobia, and nitrogen fixation were not compromised by *EFR* expression. Importantly, the *M. truncatula* lines expressing *EFR* were substantially more resistant to the root bacterial pathogen *Ralstonia solanacearum*. Our data suggest that the transfer of EFR to *M. truncatula* does not impede root nodule symbiosis, but has a positive impact on disease resistance against a bacterial pathogen. In addition, our results indicate that *Rhizobium* can either avoid PAMP recognition during the infection process, or is able to actively suppress immune signaling.

Annexe 2 – Article

« NRG1-mediated recognition of HopQ1 reveals a link between PAMP and Effector-triggered Immunity. »

Résumé de l'article

Les membres de la famille d'effecteurs HopQ1/XopQ sont conservés dans différentes bactéries pathogènes, ce qui suggère qu'ils jouent un rôle important dans la virulence. L'identification de protéines R de résistance permettant de reconnaitre ces effecteurs est donc un moyen potentiel d'obtenir une résistance à large spectre utilisable dans la sélection de plantes cultivées. Des publications récentes ont montré que la reconnaissance de HopQ1/XopQ est dépendante de EDS1 et de la protéine TIR-NB-LRR Roq1. En utilisant notre banque de RNAi de gènes R récemment publiée, le mécanisme de la reconnaissance de HopQ1 et les autres composants du réseau de signalisation liés à cette reconnaissance ont été étudiés. La diminution de l'expression de la protéine de type CC-NB-LRR « helper » NRG1 empêche la reconnaissance de HopQ1 dans *Nicotiana benthamiana* alors que son expression dans *Arabidopsis thaliana* permet la reconnaissance de HopQ1 et réduit la multiplication de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. De plus, l'expression de NRG1 est induite de manière forte et brève à un stade précoce des réponses immunitaires de la plante, mettant en évidence un lien de dépendance entre la PTI et l'ETI.

Contribution

Lors de ma thèse, j'ai réalisé des expérimentations permettant de diminuer l'expression de NRG1 dans *N. benthamiana* et mesuré l'influence de cette diminution sur la multiplication de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 après inoculation dans les feuilles. La figure 2 de cette publication montrant les résultats obtenus est présentée ici.

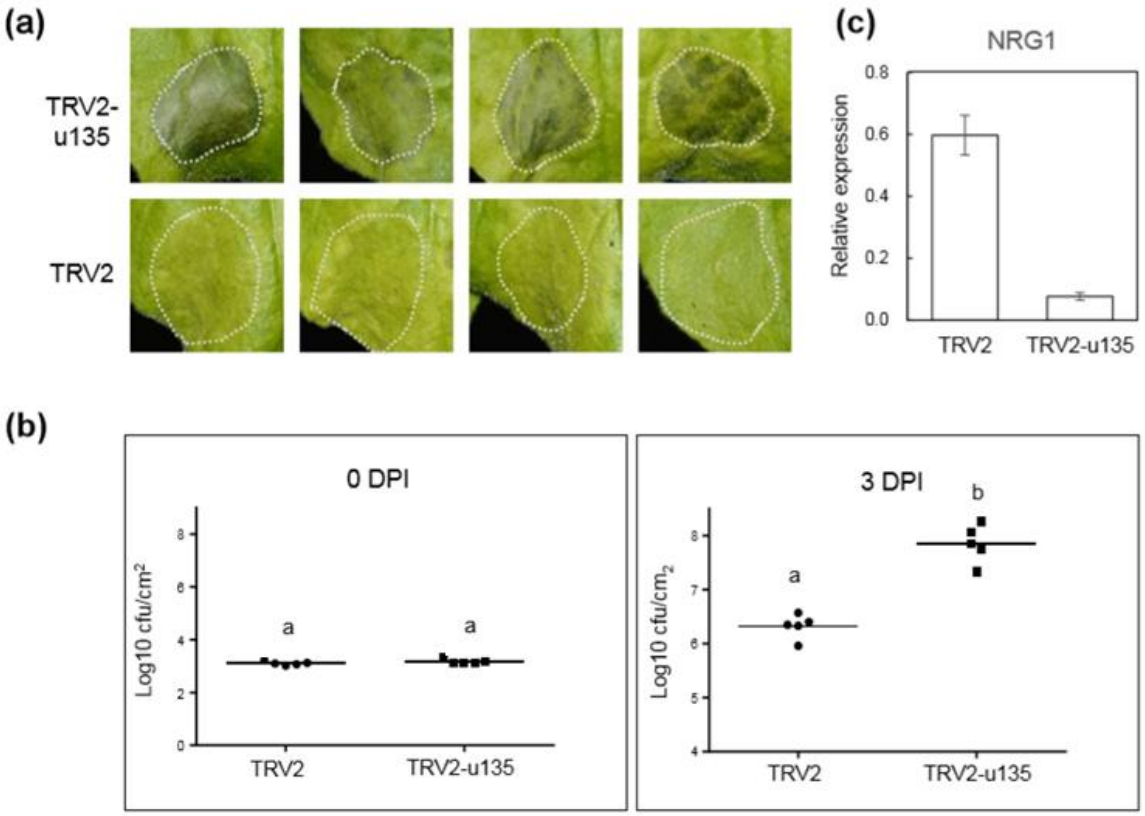


Figure supplémentaire 2. La diminution de l'expression de NRG1 augmente la multiplication de *Pseudomonas syringae* DC3000 dans les feuilles de *N. benthamiana.*

(a) Des plantes dont l'expression de NRG1 a été diminuée (TRV2-u135) ou des plantes contrôles transformées transitoirement par TRV2 ont été inoculées par une suspension de *Pseudomonas syringae* DC3000 à 5.10^6 cfu/ml. Des photographies ont été prises deux jours après inoculation. (b) La concentration bactérienne dans les feuilles a été mesurée immédiatement après inoculation et 72h après inoculation dans 5 échantillons de feuilles. Les lettres différentes représentent un nombre moyen de colonies significativement différent ($p<0,01$) d'après un test de student (c) Expression relative de *NRG1* avant inoculation dans les plantes dont l'expression a été diminuée par VIGS mesurée par qRT-PCR. La barre d'erreur représente l'erreur type.

Cold Spring Harbor Laboratory

bioRxiv

THE PREPRINT SERVER FOR BIOLOGY

New Results

NRG1-mediated recognition of HopQ1 reveals a link between PAMP and Effector-triggered Immunity.

Cyril Brendolise, Marcela Martinez-Sanchez, Arry Morel, Ronan Chen, Romain Dinis, Simon Deroles, Nemo Peeters, Erik H.A. Rikkerink, Mirco Montefiori

doi: https://doi.org/10.1101/293050

This article is a preprint and has not been peer-reviewed [what does this mean?].

Abstract | Info/History | Metrics | Supplementary material | Preview PDF

Abstract

Members of the HopQ1/XopQ family of effectors are conserved amongst pathogenic bacteria suggesting an important function in virulence. Therefore, the identification of R proteins recognising members of this family is potentially of high value to achieve broad-spectrum resistance in crops. Recent studies demonstrated that HopQ1/XopQ recognition is EDS1-dependant and is mediated by the TIR-NB-LRR protein Roq1. Using our recently described R gene RNAi library, we have investigated the mechanism of HopQ1 recognition and the other components of its signalling network. We show that silencing of the CCR-NB-LRR helper protein N Requirement Gene 1 (NRG1) prevents HopQ1 recognition in N. benthamiana and that NRG1 expression confers recognition of HopQ1 and restricts Pto DC3000 proliferation in the otherwise susceptible host Arabidopsis. Moreover NRG1 expression is briefly but strongly induced at a very early stage of the plant innate response, establishing a strong dependency link between PAMP-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI). Overall we demonstrate that in addition to Roq1, HopQ1 recognition in N. benthamiana requires the CCR-NB-LRR protein NRG1 and propose a model based on the dual requirement of a CCR-NB-LRR and a TIR-NB-LRR that could extend beyond HopQ1 detection and possibly be used to recognize other pathogen effectors.