

Université Montpellier II

Master Sciences et Technologies

Mention BGAE - Biologie, Géosciences, Agro-ressources, Environnement

Spécialité BIMP – Biodiversité et Interactions Microbiennes et Parasitaires

Parcours SM – Systèmes Microbiens

Année 2007-2008

Rapport de Stage M2

Soutenance 9 – 10 juin 2008

Etude du système de sécrétion de type III de *Xanthomonas albilineans*, l'agent causal de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre

Par Jérôme PUIG

Directeur de stage : Monique ROYER

Laboratoire d'accueil : UMR CIRAD-Montpellier SupAgro-INRA
Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite
Campus International de Baillarguet, Montpellier

Université Montpellier II

Master Sciences et Technologies

Mention BGAE - Biologie, Géosciences, Agro-ressources, Environnement

Spécialité BIMP – Biodiversité et Interactions Microbiennes et Parasitaires

Parcours SM – Systèmes Microbiens

Année 2007-2008

Rapport de Stage M2

Soutenance 9 – 10 juin 2008

Etude du système de sécrétion de type III de *Xanthomonas albilineans*, l'agent causal de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre

Par Jérôme PUIG

Directeur de stage : Monique ROYER

Laboratoire d'accueil : UMR CIRAD-Montpellier SupAgro-INRA
Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite
Campus International de Baillarguet, Montpellier

CIRAD-DIST
Unité bibliothèque
Lavalette



0000118164

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement Monique Royer et Philippe Rott pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe. Un très grand merci pour leur encadrement, leur très grande disponibilité pour les différents travaux effectués au laboratoire et pour la réalisation de ce rapport.

Un merci particulier à Mélanie Marguerettaz pour ces innombrables conseils et pour son soutien et son encouragement au cours de ce stage. Merci également à Stéphane Cociancich pour les corrections apportées au manuscrit.

Merci à Sandrine Duplan et Isabelle Pieretti pour leur gentillesse et les services rendus.

Je remercie également toutes les personnes de l'UMR BGPI que j'ai pu côtoyer au long de ce stage, pour leur gentillesse et leur intérêt, et qui ont contribué à faire de ces quelques mois une expérience très enrichissante.

Sommaire

I. Introduction

II. Matériel et Méthode

1. Souches bactériennes et milieux de culture.
2. Criblage d'une banque cosmique de la souche Xa23R1.
3. Amplification des gènes du système de sécrétion de type III SPI-1 de la souche Xa23R1 de *X. albilineans* par PCR (Polymerase Chain Reaction).
4. Etude de la variabilité du gène *xipD* chez des souches représentatives de la diversité de *X. albilineans*.
5. Séquençage des produits PCR
6. Traitement des séquences
7. Techniques de clonage.
8. Tests d'induction du promoteur bidirectionnel des gènes *xsaM* et *xsaN*

III. Résultats

1. Etude de la variabilité des gènes codant le système de sécrétion de type TTSS SPI-1 au sein de plusieurs de souches de *Xanthomonas albilineans*
2. Etude de l'expression d'un gène rapporteur fusionné à la séquence nucléotidique comprise entre les gènes *xsaM* et *xsaN*

IV. Discussion

1. Etude de la variabilité des gènes codant le système de sécrétion de type TTSS SPI-1 au sein de plusieurs souches de *Xanthomonas albilineans*
2. Etude de l'induction du promoteur du TTSS SPI-1 de *X. albilineans*

V. Perspectives

Support bibliographique

Annexe 1 : Composition des milieux de culture

Annexe 2 : Préparation et caractéristiques de cellules d'*Escherichia coli* DH5 α compétentes

Annexe 3 : Caractéristiques des amorces utilisées

Annexe 4 : Tableau détaillé de la comparaison de chaque ORF du TTSS SPI-1 entre les souches GPE PC73 et Xa23R1

I. Introduction

Xanthomonas albilineans est une bactérie Gram négatif, en forme de bâtonnet de 1 x 5 μm , aérobie et mobile grâce à un unique flagelle polaire lui permettant de se déplacer dans des milieux liquides (figure 1 A). Elle produit des pigments xanthomonadines et des acides aminés à partir de divers substrats carbonés (Rott *et al.*, 1988). Elle produit également de l'hydrogène sulfuré, utilise le glucose par voie oxydative et dégrade les acides organiques. Bien que présentant les caractéristiques du genre *Xanthomonas*, *X. albilineans* se distingue des autres espèces de *Xanthomonas* par un spectre caractéristique de résistance aux antibiotiques, par une production de mucus très faible et par un temps de génération élevé en comparaison avec les autres *Xanthomonas* (24 heures en général ; Vauterin *et al.*, 1993). En culture sur milieu gélosé, elle forme des colonies circulaires, convexes, lisses, brillantes et translucides de couleur jaune miel (figure 1 B). Sa température maximale de croissance est de 37 °C.

A.



B.

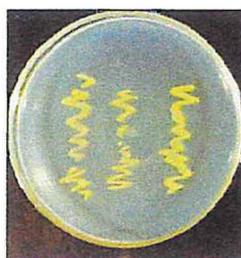


Figure 1 : *Xanthomonas albilineans*. A, aspect d'une cellule bactérienne en microscopie électronique à transmission en contraste négatif (Birch, 2001). B, aspect de cultures bactériennes sur milieu gélosé (<http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasCientificas/Agronomia%20Tropical/at2702/imagen/272a0602.jpg>)

Ce micro-organisme est responsable d'une maladie appelée l'échaudure des feuilles de la canne à sucre. Cet agent pathogène envahit les vaisseaux du xylème des feuilles et de la tige de la canne à sucre (Birch, 2001). Le premier signalement de l'échaudure des feuilles date des années 1910 en Australie par North (Martin et Robinson, 1961). Néanmoins, la maladie serait apparue aux îles Fidji en 1908, voire beaucoup plus tôt (Rott, 1995). La canne à sucre est l'hôte principal de *X. albilineans*, mais d'autres plantes comme le maïs ou des graminées sauvages poussant à proximité des plantations de cannes ont été décrits comme hôtes occasionnels de la bactérie (Orlan, 1942). Aujourd'hui, cette maladie est recensée dans au moins 61 zones géographiques à travers le monde (figure 2, Rott, 1995).

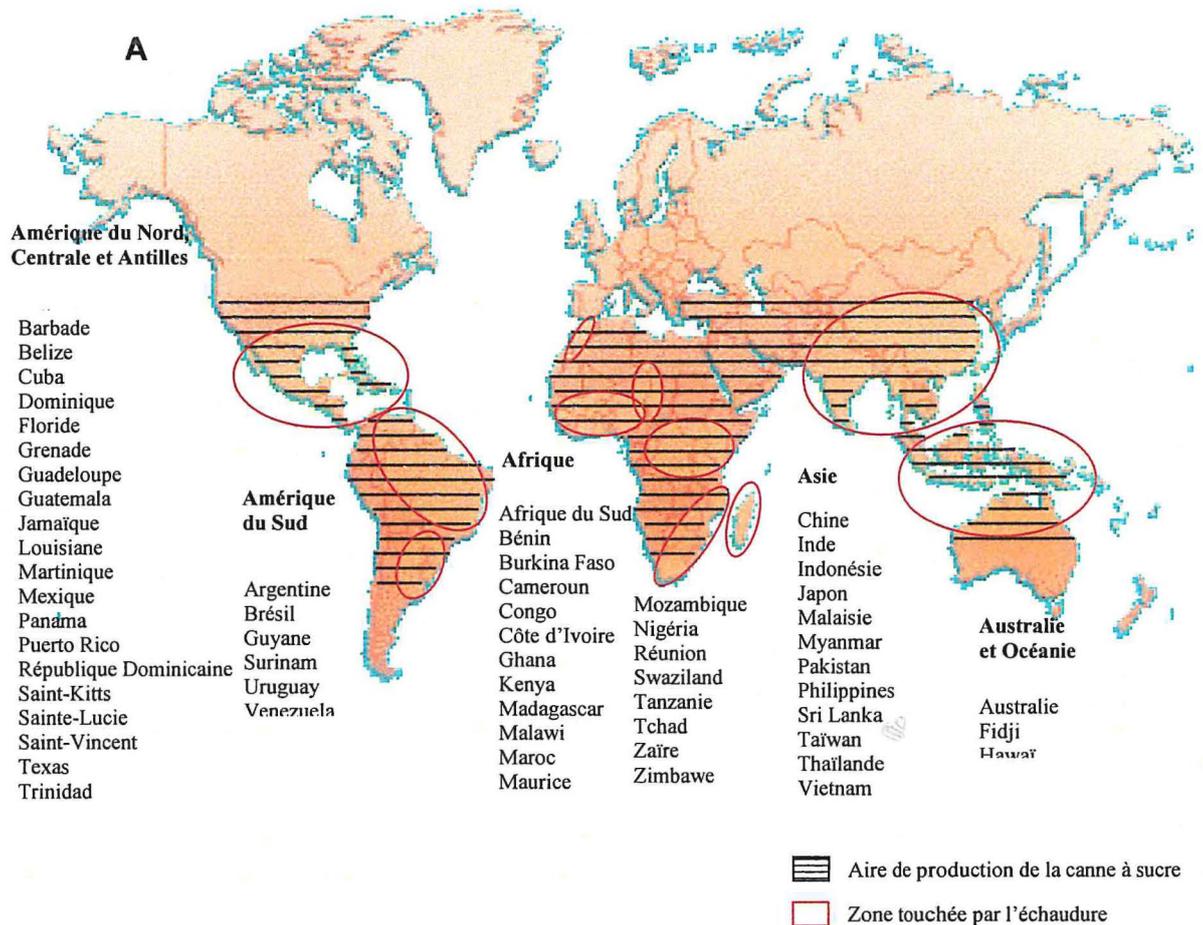


Figure 2 : Zones géographiques contaminées par l'échaudure des feuilles de la canne à sucre (d'après Rott, 1995).

La maladie se caractérise par la présence de symptômes foliaires tels que des lignes blanches parallèles aux vaisseaux des feuilles envahies, des chloroses et des nécroses, ainsi que des symptômes dans la tige qui se manifestent par un rougissement des tissus vasculaires colonisés (figure 3 A et B).

La transmission mécanique par l'homme est le principal mode de transmission de *X. albilineans*, et elle est essentiellement réalisée par les instruments de coupe et les boutures utilisées lors des plantations (Rott et Davis, 2000).

A.



B.



Figure 3 : Symptômes foliaires et symptômes dans la tige de canne à sucre causés par *X. albilineans*. A, blanchiment des feuilles. B, rougissement du xylème observé sur une coupe longitudinale de tiges de canne à sucre (Clichés : P. Rott).

La pouvoir pathogène de *X. albilineans* repose en grande partie sur sa capacité à produire une pathotoxine, l'albicidine, qui diffuse vers les parenchymes chloroplastiques. Cette toxine, synthétisée par des enzymes appartenant à la famille des « Non Ribosomal Peptide Synthase » (Royer *et al.*, 2004), bloque la différenciation des chloroplastes au stade de proplastides, en inhibant la réplication de l'ADN et provoquant ainsi la chlorose des feuilles (Birch et Patil, 1987). L'albicidine, qui est spécifique à *X. albilineans*, possède également des propriétés antibiotiques lui permettant probablement d'avoir un avantage par rapport à d'autres bactéries lors de la conquête de nouvelles niches écologiques. En effet, l'albicidine bloque la réplication de l'ADN procaryote (Hashimi *et al.*, 2007). Cependant, la pathogénie de *X. albilineans* ne repose pas uniquement sur la production d'albicidine : des mutants Tox-, c'est-à-dire des mutants ne produisant plus d'albicidine et incapables de provoquer des symptômes foliaires, sont toujours capables de coloniser efficacement la canne à sucre.

Malgré l'utilisation de méthodes de lutte, comme la culture de variétés résistantes, des recrudescences de l'échaudure des feuilles ont eu lieu depuis les années 1980 dans plusieurs zones de cultures de la canne à sucre (Rott et Davis, 2000). Par ailleurs, une grande diversité génétique a été mise en évidence au sein de souches originaires de divers pays producteurs de canne à sucre, et plusieurs groupes génotypiques ont été décrits (Champoiseau *et al.*, 2006 ; Davis *et al.*, 1997).

Une transmission de l'échaudure des feuilles par voie aérienne a été mise en évidence dans plusieurs zones géographiques, notamment en Floride (Comstock, 2001), en Guadeloupe (Daugrois *et al.*, 2003) et à Maurice (Autrey *et al.*, 1995). Dans ces zones, des plants de canne à sucre sains, éloignés des zones traditionnelles de culture, ont été contaminés par *X. albilineans*. La contamination aérienne serait liée à la formation d'aérosols du fait de la

présence de grandes quantités de bactéries dans l'environnement. En effet, les bactéries sont aisément exsudées à la surface de feuilles infectées (Klett et Rott, 1994). Les souches bactériennes isolées à partir de l'eau retrouvée sur les feuilles de canne à sucre (rosée le matin ou suite à une pluie) appartiennent au même groupe génotypique (PFGE B) qui serait associé à la recrudescence de la maladie. La contamination aérienne a pu être associée à l'existence d'une « phase épiphyte » dans le cycle infectieux de la maladie, notamment en Guadeloupe (Daugrois *et al.*, 2005).

X. albilineans occupe une position particulière au sein des bactéries phytopathogènes, notamment au sein du genre *Xanthomonas*. D'un point de vue évolutif, en se basant sur les ITS (Gonçalves et Rosato, 2002) ou sur le gène de ménage *gyrB* (Parkinson *et al.*, 2007), elle appartient à un groupe phylogénétique particulier. Par ailleurs, toutes les tentatives d'identifier par PCR ou par hybridation le groupement de gènes *hrp* («hypersensitive response and pathogenicity»), indispensable à la pathogénie chez les autres *Xanthomonas* (Gürlebeck *et al.*, 2006), ont été un échec (Champoiseau *et al.*, 2006). La pathogénie de *X. albilineans* semble donc reposer sur des gènes et des mécanismes bien particuliers.

Pour identifier d'autres gènes de pathogénie que ceux impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine, ainsi que pour étudier de manière plus approfondie les interactions entre *X. albilineans* et la canne à sucre, le génome de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* a été séquencé (<http://www.genoscope.cns.fr/spip/Xanthomonas-albilineans-sequencage.html>). Cette souche originaire de Guadeloupe appartient au groupe génotypique PFGE B (Champoiseau *et al.*, 2006).

L'annotation récente de la séquence du génome de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* a permis de révéler quelques particularités (Pieretti *et al.*, données non publiées). En effet, la taille du génome *X. albilineans* (3,7 Mb) est réduite par rapport à celle du génome des autres espèces de *Xanthomonas* (environ 5 Mb). Cette bactérie ne possède pas le groupement de gènes codant le système de sécrétion de type III Hrp qui permet aux bactéries phytopathogènes d'injecter des protéines effectrices dans la cellule végétale. De plus, aucun effecteur de type III connu n'a été retrouvé. Ces effecteurs permettent le contournement de la réponse de défense des plantes au profit de la bactérie phytopathogène. En revanche, le génome de *X. albilineans* contient un groupement de gènes codant un système de sécrétion de type III de la famille SPI-1, pour «*Salmonella* Pathogenicity Island -1» (figure 4). Les systèmes de sécrétion de type III SPI-1 (TTSS SPI-1) sont presque exclusivement retrouvés chez les bactéries pathogènes de l'homme ou symbiontes d'animaux (Cornelis, 2006). Le

groupement de gènes TTSS SPI-1 de *X. albilineans* de 37 kb est encadré par deux séquences d'insertion et présente un pourcentage en (G+C) de 51 %, nettement inférieur à celui de l'ensemble du génome (63 %), ce qui sous-entendrait une acquisition récente par transfert horizontal. Ce groupement de gènes TTSS SPI-1 présente de fortes similarités avec celui de *Burkholderia pseudomallei*, agent causal de la leucémie myéloïde chez l'homme (figure 5). L'analyse *in silico* du groupement de gènes TTSS SPI-1 de *X. albilineans* a permis de montrer que presque tous les gènes codant les protéines impliquées dans la formation de l'injectisome sont conservés entre *X. albilineans* et *B. pseudomallei* : c'est le cas des gènes codant les protéines BsaL (qui constitue la seringue de *B. pseudomallei*) et BipB, BipC et BipD (qui sont impliquées dans la formation du translocon de *B. pseudomallei*). De même, le groupement de gènes du TTSS SPI-1 de *X. albilineans* contient le même gène codant un régulateur de transcription AraC que le TTSS SPI-1 de *B. pseudomallei*. Seuls les gènes codant les protéines de *B. pseudomallei* BsaU et BsaT ne sont pas conservés chez *X. albilineans*. BsaU ressemble à la protéine YscP de *Yersinia* qui est impliquée dans le contrôle de la longueur de la seringue de l'injectisome et dans la reconnaissance spécifique des effecteurs sécrétés (Agrain et al., 2005). La fonction de BsaT reste inconnue et pourrait être liée à celle de BsaU. Chez *Yersinia*, des mutations de YscP n'abolissent pas complètement la sécrétion et l'effet de ces mutations peut être supprimé par d'autres substitutions dans d'autres composants de l'injectisome (Agrain et al., 2005). Pour cette raison, l'absence des gènes codant les protéines BsaU et BsaT de *B. pseudomallei* chez *X. albilineans* ne signifie pas forcément que l'injectisome codé par *X. albilineans* est non fonctionnel. En revanche, les gènes de *B. pseudomallei* codant pour des effecteurs tels que BopA ou BopE ne sont pas conservés chez *X. albilineans*. Les gènes codant ces effecteurs sont remplacés par 12 gènes codant des protéines hypothétiques qui ne présentent aucune similarité avec les protéines décrites dans les bases de données.

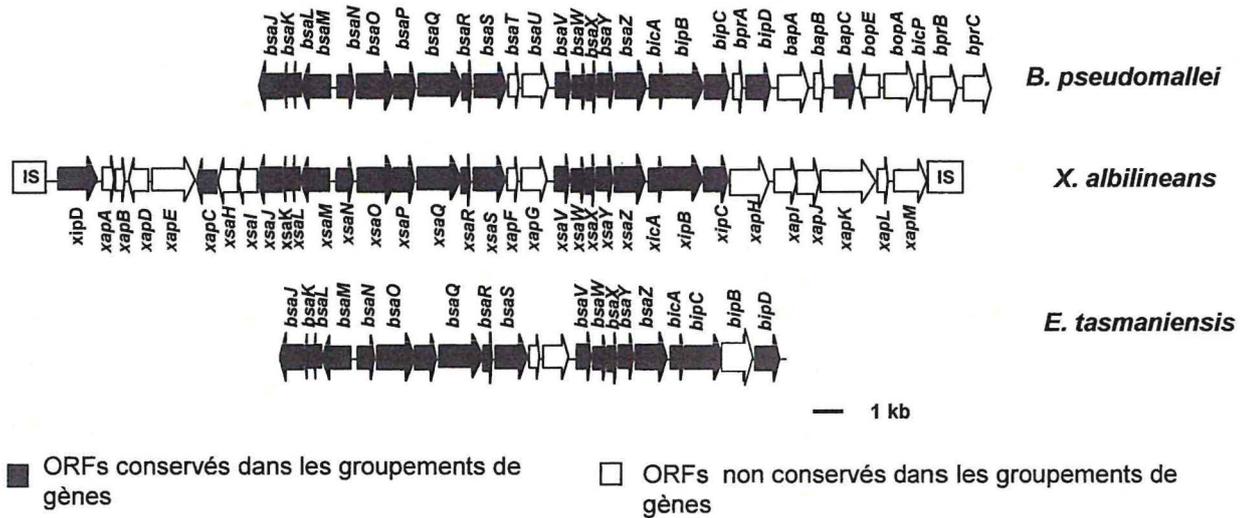


Figure 4 : Comparaison des groupements de gènes de *Burkholderia pseudomallei*, *Xanthomonas albilineans* et *Erwinia tasmaniensis* codant un système de sécrétion de type III SPI-1. Le groupement de gènes T3SS-SPI-1 de *B. pseudomallei* a été décrit par Stevens *et al.* (2002). Les gènes codant les protéines formant l'appareil de sécrétion (la seringue) sont appelés *bsa* (pour « *Burkholderia* secretion apparatus ») ou *xsa* (pour « *Xanthomonas* secretion apparatus »). Les gènes codant les protéines du translocon sont appelés *bip* (pour « *bsa*-invasion protein ») ou *xip* (pour « *xsa*-invasion protein »). Les gènes codant des protéines chaperones sont appelés *bic* (pour « *bsa*-invasion chaperone ») ou *xic* (pour « *xsa*-invasion chaperone »). Les gènes codant des protéines dont la fonction est inconnue sont appelés *bap* (pour « *bsa*-associated protein ») or *xap* (pour « *xsa*-associated protein »). Le groupement de gènes TTSS d'*E. tasmaniensis* (Kube *et al.*, 2008) est également représenté. Les gènes homologues à ceux de *B. pseudomallei* sont appelés *bsa* (pour « *Burkholderia* secretion apparatus »).

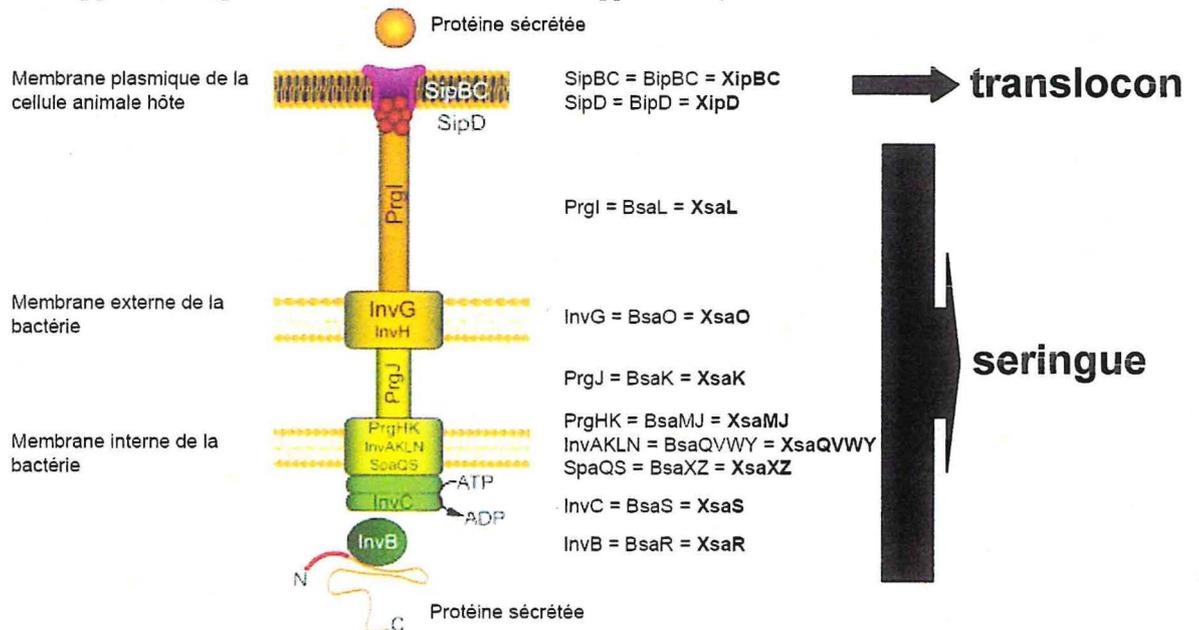


Figure 5 : Représentation schématique du système de sécrétion de type III de *Salmonella enterica* et appartenant à la famille des injectisomes SPI-1 (d'après Gerlach et Hensel, 2007). Les protéines de *S. enterica* conservées chez *Burkholderia pseudomallei* (protéines Bsa ou Bip) et chez *Xanthomonas albilineans* (protéines Xsa et Xip) sont indiquées à droite de la figure.

L'interruption de l'expression de gènes par mutagenèse dirigée a permis de montrer que le TTSS SPI-1 de *X. albilineans* n'est pas nécessaire à la colonisation du xylème de la canne à sucre (Royer *et al.*, résultats non publiés). Le rôle de ce TTSS SPI-1 dans le cycle de vie de *X. albilineans* reste inconnu. Ce TTSS SPI-1 pourrait être impliqué dans des interactions avec un hôte animal. Cependant, aucune relation entre *X. albilineans* et un hôte animal n'a été décrite à ce jour.

Par ailleurs, le groupement de gènes TTSS SPI-1 de *X. albilineans* présente des homologies avec celui d'*Erwinia tasmaniensis*, une bactérie isolée de fleurs de pommier et de poirier. En effet, les gènes *bsaU* et *bsaT* sont également absents dans ce groupement de gènes (figure 4, Kube *et al.*, 2008). *E. tasmaniensis* est une bactérie épiphyte mais pas phytopathogène. Le rôle du TTSS SPI-1 dans le cycle de vie d'*E. tasmaniensis* reste inconnu. Il a été proposé que le groupement de gènes TTSS SPI-1 soit impliqué, non pas dans la sécrétion de protéines, mais plutôt dans l'adhésion de la bactérie aux tissus végétaux (Kube *et al.*, 2008). Cette hypothèse est uniquement basée sur le fait que le génome d'*E. tasmaniensis* ne possède pas de gènes codant les adhésines de la famille Hec que l'on retrouve dans le génome des autres espèces d'*Erwinia*. Le TTSS SPI-1 de *X. albilineans* pourrait avoir un rôle identique et être associé à l'existence d'une phase épiphyte dans le cycle infectieux de *X. albilineans*.

L'objectif de ce stage était de répondre aux deux questions suivantes : le système de sécrétion de type III SPI-1 est-il conservé au sein des souches représentatives de la diversité de *X. albilineans* et est-il fonctionnel ?

Afin de répondre à la première question, nous avons travaillé avec la souche Xa23R1 de *X. albilineans* qui appartient au groupe génotypique PFGE A. Contrairement aux souches de *X. albilineans* appartenant au groupe PFGE B, les souches du groupe PFGE A ne sont pas associées à la recrudescence de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre ou à la transmission aérienne de l'agent pathogène. Nous avons amplifié par PCR la totalité de la séquence du groupement de gènes du TTSS SPI-1 de la souche Xa23R1 en utilisant 28 couples d'amorces dessinés à partir de la séquence de la souche GPE PC73. Les séquences des 28 produits PCR de 1,2 kb obtenus ont été utilisées pour reconstituer la séquence du groupement de gènes TTSS SPI-1 de la souche Xa23R1. Nous avons alors identifié les ORFs (« Open Reading Frames ») conservées chez les deux souches.

La régulation de l'expression des gènes des TTSS SPI-1 est très fine et inductible. En effet, les gènes sont activés lorsque la bactérie entre en contact avec la cellule hôte et perçoit

des signaux particuliers. Une cascade de régulation est activée et aboutit à l'expression des gènes de structure du TTSS et des gènes codant les effecteurs. C'est pourquoi, afin de répondre à la deuxième question, nous avons choisi d'étudier l'activité d'un promoteur bidirectionnel localisé entre deux opérons du groupement de gènes TTSS SPI-1 de la souche de *X. albilineans* GPE PC73. Pour cela, nous avons fusionné la séquence comprise entre les 2 opérons avec un gène rapporteur et nous avons étudié l'expression du gène rapporteur dans la souche GPE PC73 dans différentes conditions expérimentales, notamment lorsque la souche a été cultivée au contact de différents extraits d'animaux provenant de cellules d'insectes ou de mammifères. Afin d'explorer le rôle éventuel du TTSS SPI-1 dans la colonisation épiphyte, nous avons également réalisé cette étude quand la bactérie a été cultivée au contact d'extraits de feuilles de canne à sucre.

Tableau 1 : Caractéristiques des 16 souches de *X. albilineans* utilisées dans cette étude.

| Souche | Origine géographique | Année | Auteur | Haplotype PFGE* |
|---------|----------------------|-------|----------------|-----------------|
| HVO005 | Burkina Faso | 1980 | M. Chatenet | F |
| TWN052 | Taiwan | 1988 | C.T. Chen | B |
| GLP056 | Guadeloupe | 1988 | P. Rott | B |
| MTQ058 | Martinique | 1989 | P. Rott | I |
| LKA070 | Sri Lanka | 1962 | A.C. Hayward | G |
| MTQ078 | Martinique | 1957 | J.A. Spence | B |
| FIJ080 | Fidji | 1961 | D.W. Dye | E |
| HVO082 | Burkina Faso | 1989 | M. Granier | C |
| DOM097 | Rép. Dominicaine | 1991 | M.J. Davis | A |
| PNG130 | Papouasie-N-G | 1993 | M. Chatenet | H |
| BRA115 | Brésil | 1993 | C.O.N. Cardoso | B |
| PC73 | Guadeloupe | 2003 | P. Champoiseau | B |
| REU173 | Réunion | 1995 | J-C. Girard | D |
| REU174 | Réunion | 1995 | J-C. Girard | D |
| REU209 | Réunion | 1995 | J-C. Girard | J |
| Xa23R1 | Floride/USA | 1993 | M.J. Davis | A |
| LS156R1 | Australie | Nd | R. Birch | nd |

*Davis et al, 1997.

nd = non déterminé

II. Matériel et méthodes :

1. Souches bactériennes et milieux de culture.

Les souches de *X. albilineans* sont issues de la collection de bactéries phytopathogènes du Cirad de Montpellier. Ces 16 souches sont d'origines géographiques diverses et représentatives de la diversité génétique connue au sein de l'espèce *albilineans*, et notamment des groupes PFGE (Tableau 1). Les cultures bactériennes sur milieu Wilbrink modifié (Annexe 1) ont été obtenues à partir de suspensions denses conservées à -80 °C.

2. Criblage d'une banque génomique de la souche Xa23R1

Une banque génomique de la souche *Xanthomonas albilineans* Xa23R1 construite en 1993 et conservée à - 80 °C, a été repiquée sur de grandes boîtes de Pétri contenant du milieu LB solide avec kanamycine (50 µg.mL⁻¹). Les boîtes de Pétri ont été placées à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures. Des membranes de la même taille que les boîtes ont été découpées, et humidifiées quelques minutes sur du milieu LB solide. Elles sont ensuite déposées pendant 60 secondes sur la boîte de Pétri contenant les colonies d'*E. coli* transformées, puis dans une solution de NaOH-NaCl (0,5 M NaOH et 1,5 M NaCl) pendant 3 minutes. Plusieurs lavages ont été effectués dans une solution de Tris-NaCl stérile (1 M Tris, 1,25 M NaCl, pH 7,5). Les membranes ont alors été déposées dans une solution de SSC 2 X (3 mM de Tri-sodium citrate et 30 mM de NaCl), puis laissées 2 heures à 80 °C et enfin conservées à - 20 °C.

Pré-hybridation : les membranes ont été humidifiées dans une solution de SSC 2 X. Elles ont été ensuite placées dans des tubes à hybridation contenant 10 mL de tampon de pré-hybridation (Tris-HCl 0,05 M pH 8, EDTA 0,01 M, SDS 0,2 %, SSC 5 X, Denhart buffer 2,5 X, ADN de sperme de saumon 0,2 mg.mL⁻¹dénaturé), puis placées dans un four à hybridation avec agitation à 65 °C pendant 3 heures et demie.

Marquage de la sonde : Ce marquage a été réalisé en utilisant le kit Megaprime (GE Healthcare, Royaume Uni). Pour chaque marquage, un mix suivant a été préparé: 15 µL de sonde dénaturée (100ng), 2 µL de BSA 25X, 10 µL de tampon de marquage 10X, 2 µL de dNTPs 25X, 0,6 µL du fragment Klenow de l'ADN polymérase I, 2 µL de ^{α32}dCTP (50 µCi) et 18,4 µL d'H₂O. Les mix ont été incubés pendant 1 heure à température ambiante derrière un écran de pexiglass .

Les sondes utilisées proviennent des fragments respectivement de 1 et 2 kb issus de la digestion par l'enzyme *HindIII* du plasmide pYOAAB 24AD07 (issu d'une banque

génomique de la souche GPE PC73, contient les gènes du système de sécrétion de type III de *X. albilineans*).

Hybridation : Une solution d'hybridation (Tris-HCl 0,05 M pH 8, EDTA 0,01 M, SSC 5 M, SDS 0,2 %, Denhart 2,5 X, AND de sperme de saumon dénaturé 10 mg.mL⁻¹, Dextran sulfate 10 %) a été pré-incubée à 65 °C. La solution de pré-hybridation a été éliminée des tubes. L'ADN de sperme de saumon et la sonde ont été dénaturés et ajoutés en dernier dans la solution d'hybridation. Dans chaque tube ont été versés 10 mL de cette solution et les tubes sont alors placés dans le four à hybridation une nuit à 65 °C.

Rinçage : Deux rinçages de 10 minutes à 65°C ont été réalisés avec une solution A (SSC 0,5 X et SDS 0,1 %) suivis de deux rinçages de 30 minutes à 65°C avec une solution B (SSC 0,2 X et SDS 0,1 %).

Révélation : Les membranes sont placées dans des cassettes avec un film photographique. Après une période 4 à 24 heures les films sont développés en utilisant un liquide révélateur et un liquide fixateur.

Criblage des clones positifs par PCR : Les clones qui se sont révélés positifs suite au marquage radioactif sont criblés avec différents couples d'amorces disponibles au laboratoire (Annexe 3) pour vérifier la présence de la totalité des gènes du système de sécrétion.

3. Amplification des gènes du système de sécrétion de type III SPI-1 de la souche Xa23R1 de *X. albilineans* par PCR (Polymerase Chain Reaction).

Pour chaque échantillon testé, les réactions d'amplification par PCR ont été conduites dans des microtubes de 0,2 mL avec 4 µL de suspension bactérienne ou 1 µL de plasmide extrait, 0,5 mM de chaque amorce, 0,12 mM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 1 X de tampon de réaction et 2,5 U.µL⁻¹ de Taq polymérase dans un volume final de 50 µL.

Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un thermocycleur PTC-100 (MJ Research, Inc, Watertown, MA, USA). Les conditions d'amplification comprenaient d'abord une étape de dénaturation à 95 °C pendant 5 min, puis 29 cycles à 95 °C pendant 1 min, 1 min 30 à la température d'hybridation et 72 °C pendant 1 min. Enfin, l'amplification était terminée par une étape d'extension finale de 72 °C pendant 10 min.

Les révélations se font sous UV après migration par électrophorèse dans un gel d'agarose (1 %) d'un aliquot de 10 µL dans du TBE 0,5 X (Tris 44,5 mM, Acide borique 44,5 mM et EDTA 1 mM) pendant 26 minutes.

Les amorces utilisées pour l'amplification du système de sécrétion de type III de la souche Xa23R1 de *X. albilineans* ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer 3 à partir de la séquence génomique de la souche GPE PC73 (Annexe 3). Elles permettent d'amplifier des

fragments de 1,2 kb avec un recouvrement d'environ 0,2 pb entre chaque fragment. L'amorce XipDF était déjà disponible au laboratoire. Les amorces TTSS_28 et XipDF permettent l'amplification d'un fragment de 1,9 kb.

Les amorces TTSS_11 et TTSS_11biscorr d'une part et les amorces TTSS_20 et TTSS_20bis d'autre part ont été utilisées pour amplifier l'ADN de la souche Xa23R1 à partir d'un cosmide d'une banque génomique de cette souche alors que les autres couples d'amorces ont été utilisées pour amplifier l'ADN à partir d'une suspension bactérienne de la souche Xa23R1.

Les produits PCR obtenus ont été respectivement appelés de PCR 1 à PCR 28.

4. Etude de la variabilité du gène *xipD* chez des 13 souches représentatives de la diversité de *X. albilineans*.

La séquence nucléotidique se trouvant au niveau de la région du gène *xipD* du système de sécrétion de type III de *X. albilineans* a été amplifiée par PCR à l'aide des amorces TTSS_28 et XipDF chez 13 souches représentatives de la diversité de *X. albilineans*.

5. Séquençage des produits PCR

Les produits PCR ont été séquencés avec les amorces utilisées pour leur amplification respective. Le séquençage a été réalisé par la société Cogenics-Genome Express (Meylan, Isère, France).

6. Traitement des séquences

Les séquences de chaque produit PCR ont été alignées en utilisant le logiciel SeqMan 2.55 (DNASTAR). Les séquences alignées de chaque produit PCR ainsi obtenues ont été assemblées avec ce même logiciel afin de reconstituer la séquence totale du groupement de gènes du TTSS SPI-1 de la souche Xa23R1. Cette séquence totale a été alignée avec la séquence du groupement de gènes du TTSS SPI-1 de la souche GPE PC73 sur le serveur de l'UMR LIPM de Toulouse (accès réservé aux personnes participant à l'annotation de la séquence génomique de la souche GPE PC73). Les différentes ORFs ont été localisées et la séquence nucléotidique et protéique de chaque ORF a été déterminée.

7. Techniques de clonage.

7a. Extraction d'ADN plasmidique à partir de 6 mL d'une culture bactérienne.

L'ADN plasmidique des souches d'*E. coli* a été extrait et purifié sur microcolonne selon le protocole SVPlus prep Miniprep (Madison, Wisconsin, USA). Après la lyse alcaline des bactéries et la précipitation des débris cellulaires, l'ADN plasmidique a été adsorbé sur la membrane en silica-gel d'une minicolonne en condition de haute force ionique, et après une étape de lavage, l'ADN plasmidique a été élué en condition de faible force ionique.

7b. Digestions par des endonucléases de restriction.

Les digestions d'ADN plasmidiques ont été réalisées dans un volume final de 30 μ L, avec 3 unités d'enzymes par μ g d'ADN et 1/10 du volume final de tampon 10x de réaction. Les réactions de digestion ont été placées pendant 1h30 à 37 °C. Les enzymes de restriction utilisées sont fournies par la société Promega (Madison, Wisconsin, USA)

Pour le criblage de colonies par analyse du profil de restriction obtenu après extraction de l'ADN plasmidique, les réactions de digestion ont été conduites dans un volume final de 15 μ L avec les mêmes proportions d'enzyme, d'ADN et de tampon de réaction.

7c. Réaction de ligation

Les réactions de ligation ont été réalisées dans un volume final de 10 μ L, avec 0,3 μ L d'ADN ligase T4 Promega (Madison, Wisconsin, USA), 1 μ L de tampon de réaction 10X, et une quantité molaire en insert au moins cinq fois plus importante qu'en vecteur pour favoriser les ligatures intermoléculaires et non intramoléculaires. Les réactions ont été placées à 14 °C toute la nuit pour limiter les mouvements browniens.

7d. Transformation d'*E. coli* compétentes.

Un mélange de 10 μ L de produit de ligation et de 100 μ L de bactéries *E. coli* DH5 α compétentes a été incubé 30 minutes dans de la glace. Un choc thermique a été effectué pour permettre l'introduction de l'ADN dans les bactéries compétentes : 90 secondes à 37 °C puis deux minutes dans de la glace. Les bactéries ont été reprises dans 400 μ L de LB sans antibiotique et transférées dans un tube de 10 mL laissé sous agitation à 37 °C pendant 1h30. Des volumes de 100 et 200 μ L de suspension bactérienne ont été étalés sur milieu LB gélosé contenant l'antibiotique approprié.

7e. Stratégie de clonage : préparation d'une construction de fusion du promoteur bidirectionnel des gènes *xsaM* et *xsaN* avec un gène codant la Yellow Fluorescent Protein ou YFP (figure 6).

- Introduction d'un site *EcoRI* au niveau du site *NotI* de la construction *pUC18-YFP* : Le plasmide *pUC18-YFP* a été préparé à partir d'une souche d'*E. coli* conservées dans du glycérol à -80 °C. Ce plasmide porte une résistance à l'ampiciline. Un adaptateur *NotI*

contenant un site *EcoRI* a été préparé en mélangeant 20 μL d' H_2O , 7 μL d'amorce NotI/*EcoRI* (5'- GGCCGAATTC -3') à 100 μM et 3 μL de tampon 10X D (Promega). Ce mélange a ensuite été placé 15 minutes à 75 $^\circ\text{C}$, puis laissé à refroidir lentement toute une nuit. Le plasmide pUC18-YFP a été digéré par l'enzyme de restriction *NotI*. Une ligature a ensuite été réalisée avec 1 μL de plasmide digéré par *NotI* et 1 μL de l'adaptateur. La réaction de ligature a été digérée par *NotI*. Une transformation d'*E. coli* a ensuite été réalisée avec 10 μL de la réaction de ligature digérée. Trois colonies transformées ont étéensemencées dans 6 mL de LB additionné d'ampicilline (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Les plasmides ont été extraits et digérés par *EcoRI* et *XhoI*. Les plasmides présentant les bons profils (1 bande à 0,7 kb) sont alors sélectionnés.

- *Préparation du promoteur* : La séquence de 267 pb comprise entre les gènes *xsaN* et *xsaM* a été amplifiée par PCR à partir de la souche GPE PC73 en utilisant les amorces ATGXsaM (5'-GGCCATGGGAATCGGGTGCAGGAATAAT -3') et ATGXsaN (5'- GGCCATGGGAATTATGGCTTATGGCATTG -3'). Le produit PCR a ensuite été cloné dans le plasmide Strataclone (Stratagene) selon les instructions données par le manuel « StrataCloneTM PCR cloning kit ». Deux colonies ont étéensemencées dans 6 mL de LB additionnée de kanamycine (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Les plasmides ont été extraits et ceux portant le bon insert, validé par séquençage, ont été sélectionnés.

- *Clonage du promoteur en amont de la YFP dans les deux orientations* : Le plasmide Strataclone contenant la séquence du promoteur bidirectionnel a été digéré par l'enzyme *NcoI*. Les fragments obtenus ont été révélés sous UV après électrophorèse dans un gel d'agarose low-melting 1 % dans du TAE 0,5 X. Le fragment de 0,3 kb, correspondant à l'amplification du promoteur bidirectionnel, a été découpé. Le plasmide pUC18-YFP contenant l'adaptateur *NotI/EcoRI* a été digéré par *NcoI*. Une ligature a été réalisée en utilisant le fragment *NcoI-NcoI* et le plasmide digéré par *NcoI*. Une vingtaine de colonies transformées ont été criblées en utilisant d'une part les amorces ATGXsaM et M13-rev, et d'autre part les amorces ATGXsaN et M13-rev. Les colonies présentant une amplification de 0,7 kb ont alors été sélectionnées et leurs plasmides extraits.

- *Clonage de la fusion dans le vecteur pUFR043* : Le plasmide pUC18-Promoteur-YFP a été digéré par *XhoI* et *EcoRI*. Le plasmide pUFR043, disponible au laboratoire, a été digéré par *SaII* et *EcoRI*. Une ligature a été réalisée en utilisant le plasmide pUC18-Promoteur-YFP digéré par *XhoI* et *EcoRI* et le plasmide pUFR043 digéré par *SaII* et *EcoRI*. La réaction de ligature a été digérée par *SaII*. Les colonies transformées obtenues ont été repiquées sur milieu solide LB/kanamycine, et reprises dans 100 μL d' H_2O stérile. Elles ont été criblées par PCR en utilisant soit les amorces ATGXsaM et M13-rev, ou soit les amorces ATGXsaN et M13-rev. Les colonies présentant une amplification de 0,7 kb ont alors été sélectionnées et leurs

plasmides extraits. Les constructions obtenues ont respectivement été appelées PromXsaM et PromXsaN.

- *Transformation dans la souche GPE PC73* : Les plasmides PromXsaM et PromXsaN contenant le promoteur en amont du gène codant pour la YFP ont été introduits par électroporation dans des cellules bactériennes de la souche PC73 préalablement rendues compétentes. Un μL de plasmide a été ajouté dans les cellules compétentes, puis le tout a été placé dans une cuve à électroporation où un champ électrique (2,50 kV, 25 μFD , 400 Ohms) a été appliqué pendant 8 à 12 ms. Les bactéries ont été alors recouvertes par 1 mL de milieu Wilbrink sans antibiotique puis placées dans une étuve à 28 °C sous agitation pendant 2 à 4 heures. 100 μL de suspension préalablement diluée au 1/100^{ème} ont alors été étalés sur du milieu Wilbrink gélosé additionné de kanamycine (20 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) et placé à l'étuve à 28 °C.

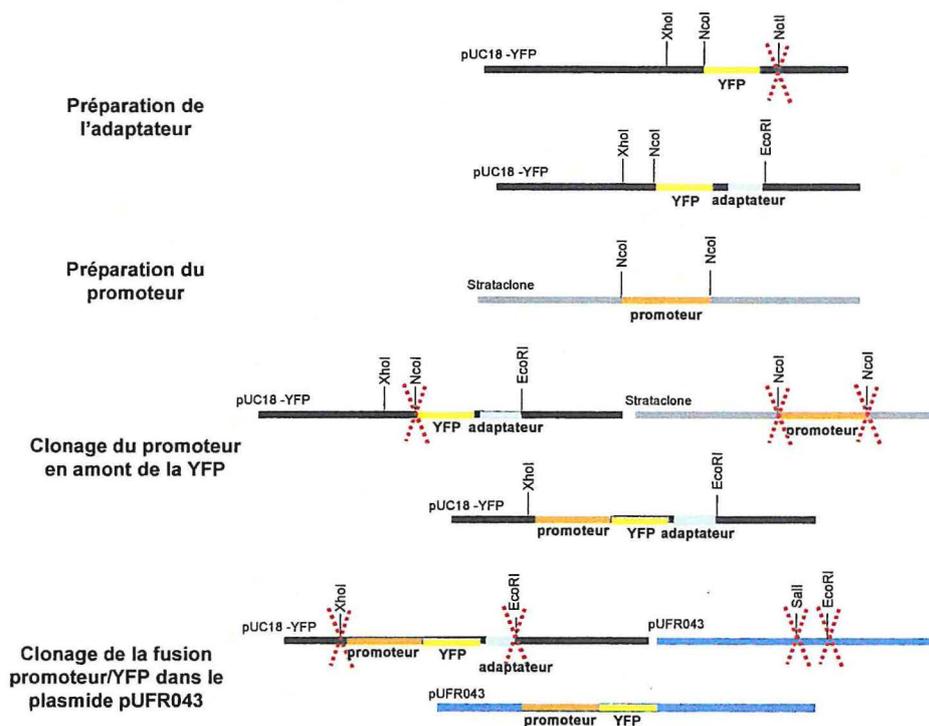


Figure 6 : Schéma des différentes étapes de la construction de fusion de promoteur bidirectionnel des gènes *xsaM* et *xsaN* avec la YFP.

8. Tests d'induction du promoteur bidirectionnel des gènes *xsaM* et *xsaN*

Les souches GPE PC73 de *X. albilineans* transformées avec les plasmides PromXsaM ou PromXsaN ont été cultivées en milieu riche Wilbrink pendant 48h, puis les bactéries ont été récupérées par centrifugation à 3000 rpm et reprises dans 10 mL de milieu minimum XaPR (Annexe 1).

Ces suspensions bactériennes ont été réparties à raison de 0,2 mL par tube de 2 mL. Puis différents échantillons d'origine animale (mammifères ou insectes) ou végétale (extrait de feuille de canne à sucre) récoltés au sein de laboratoires du CIRAD (Montpellier ou Guadeloupe) ont été rajoutés dans ces tubes de 2 mL. Les tubes ont ensuite été placés pendant 4 heures à 37°C (pour les prélèvements de souris) ou à 28°C (pour les autres échantillons). Les échantillons d'origine animale testés sont les suivants : Surnageant d'une culture de cellules d'insecte Sf9, cellules d'insecte Sf9 obtenues après centrifugation d'une culture, surnageant de culture d'un hybridome de souris, hybridome de souris récupéré après centrifugation d'une culture, surnageant d'une culture de cellules de primates VERO, cellules de primates VERO adhérees sur boîte de culture, broyat de pucerons (*Brevicoryne brassicae*, *Aphis gossypii*, *Acyrtosiphon pisum*, *Myzus persicae*, *Melanaphis sacchari*, *Sipha flava*), broyat de *Plutella xylostella* au stade adulte et larvaire, intestins de *P. xylostella*, prélèvements de poumons de souris, prélèvements de différentes parties d'intestins de souris, prélèvements de reins de souris et un prélèvement de sang de souris.

16 µL des mélanges suspension bactérienne-échantillons d'animaux ont été déposés sur lame et observés au microscope à fluorescence (Olympus BX60 équipés de filtres adéquats).

III. Résultats

1. Etude de la variabilité des gènes codant le système de sécrétion de type TTSS SPI-1 au sein de plusieurs de souches de *Xanthomonas albilineans*

a. Comparaison de la séquence du groupement de gènes du système de sécrétion de type III SPI-1 de la souche GPE PC73 avec celle du groupement de gènes TTSS SPI-1 de la souche Xa23R1

La séquence complète du groupement de gènes du TTSS SPI-1 de la souche Xa23R1 a été déterminée par le séquençage de 28 produits PCR obtenus à partir d'une suspension bactérienne ou d'un cosmide issu d'une banque génomique de la souche Xa23R1. Cette séquence (37 kb) a été reconstituée à partir des 28 produits PCR numérotés de 1 à 28. La séquence de chaque ORF identifiée dans cette séquence a été comparée avec celle des gènes annotés dans la séquence du génome de la souche GPE PC73.

Tous les gènes codant les protéines constitutives de la seringue moléculaire de la souche GPE PC73 existent chez la souche Xa23R1. Il en est de même pour les gènes *xsaP* et *xica* codant des protéines chaperones décrites chez d'autres bactéries comme nécessaires à l'assemblage de l'injectisome. Les gènes *xipB* et *xipC*, codant des protéines constitutives du

translocon, sont également conservés entre les souches GPE PC73 et Xa23R1. Tous les gènes codant des protéines dont le rôle reste inconnu sont également présents dans la séquence de la souche Xa23R1.

En revanche, le gène *xipD* qui code une protéine du translocon est incomplet chez la souche Xa23R1. En effet, la séquence nucléotidique du produit PCR 28 est très différente de la séquence correspondante de la souche GPE PC73 (figure 7).

```

1 TCCGCCCACT TTCGCACAGA GTCGGAAGAT TTTGAACAGG CTCTAAATCG
51 ACTATGCAGA TGCACGTTTT TTGAGCGCCA AGACCGGGAG CTAGCAGCTA
101 TAAAAAATT TCCGATCAGA CCCAGAGAAC AGTCTCAATG AAACCGTTGG
                                codon 1
151 AAAGCATGAT TCAACGCGCG ACCCCACAAA GCGAGCCATA TGCTATGGTA
201 CGCGCCACGA TAAAATCGTC GGCCGATGCA CCACACACAA GTGGTGCCAA
251 TCACTCGGAT GACATTGCGC CAGTTCAGCA CCTGCAATCA AATGGCAGAG
301 TGAGTGACGT GCTTCGCGAG GCTACGCGTG TTGCACTAGG GCTGTGCCG
351 CCGGATGCGG ACGAGCTGCG GGAGTTGGAT ATGACGTCGC TCGGTAAAGC
401 GGGTGACATC GTGCAGCGTG TGGTTAACGA CGCCGCAACG GGAATGCGC
451 ACAACCTCGC GTTTGCGTTG AAGATGCAAT CGGAGGCTCG TGCTGACCG
                                codon 121
501 TTTTGAATA TTAGTTCGCG AATTCAGAAT CATCAAATGG CGAAGTTCA
551 AGCCATGPTC CCATTGCGTG AGCAGTTGAT GACGAAGTCG GATCTTGACC
601 ATCAACATGA GATGGTGCAA TCATCAGCGG GCGGTGCGGA ACACGGGCTC
651 GGCGCATCGG CAAGCTCGGC TACACAGAAC GATGCCACGT CTGATGCAAA
701 AACACTCGGT GCATCGCCGG CAGACGGTCC GGATGTCAGC ACCCCAGCGG
751 ATGTTGATGC AATCAGCATC AATTGCTGCG AAGACCTCAA GGCCTATTAC
801 GCGCAATATG CCGCGGACTA TGGAGTCTTT CTTGCGTACA TCCAAGAGTA
851 TGCCGAGACA GACCCGAGCG GTTGCAGTGA GAAGCTCCAA ACATTGCGCT
901 CGAAGTACAG CCGCGCGCTG ATCGTGAACG CTGGTATTGA TCCTGCTTAT
951 GCCTGTGCGC ATTGGGCGGG ATTGGGAGAT TAGCGAAATC AACTTGCCGG
1001 GAAAGGGCAC TTTTCGAGCG TATCGACTCG ACCTTGCCAG CCTGGAATCC
1051 TGTTTCGAGG ACTTTGCATT CTGCGATCGA TTGCAAGACG ATATGAAAGA
1101 TGCCGGAATA CTATGGTTGG CGTTCGCCGG ATGGGCCAGG GATAAGGCTG
1151 ACACCCCCCC CCCCTATTCA GAGGTCTTGG CTGTCTTCCA GAAAAAGAAA
1201 AGTCATCCG AGAAAATCTC CCATGTGAGC GTCATTCCCG AAAACCTTCC
1251 AGACTTCTAT ACGGTTGCGC CCGATCCTGC GGGCGGATAT TTTGTCGAAC
1301 CATCGGACAA GTTTAAGAAA ATTGTCAGTG ATTGCGATGC CTACCTTGCA
1351 GCGTGGCGTA AAAAAACGCG TGGCAGGCCA ACAGACGATC AAACCTTTGA
1401 TCAGGGTAGC ACACAGGGTG ATGTAAGTGA GCCAACCGCT CAACAAGTTT
1451 ATGCTGACGC TGGATCCTGG TTGGAACAAT CGATTGATAA TCAGGCATGG
1501 CTATCGAAGA TAATTGAAAA TGCCTTGGTG ATATTGAAAA GCAAGACTTT
1551 TGATGTTGCC TCGGCAAAATG AAAAAATCGA TAGTCTGGCG CGATCGGACG
1601 CTGCTCGATA CCGTGGTCTC AAAACGACAG TCAGCGCCGC CAAGGCTAGC
1651 ATTATCGATC CCTATGGTTC GCTGCTGCAA GAGTACATGC AGTATGTGCA
                                codon 446
1701 GTCTATCACC GATCTCTTAT CGAATCTTTC AAAATATGTC ACAGCATCTG
1751 GAGACGGAAAC GACGGTTAAT TTCAAGGCGG ACGATTGAA AAGTGTGATC
1801 AACAATATGC TGAAGAGGA CGGCCATTTC AAAGAATGGT CGCTTACCTT
1851 GCCGGGCACG TTTTCGCTAT CCGCGAG

```

Figure 7 : Séquence nucléotidique de 1876 pb obtenu à partir du séquençage du produit PCR 28. La séquence nucléotidique identique à la séquence de la souche GPE PC73 est indiquée en rouge. Les nucléotides, correspondant dans le gène *xipD* de GPE PC73, au codon d'initiation de la traduction (codon 1) et aux codons 121 et 446 sont indiqués en gras et soulignés en rouge. La séquence spécifique de Xa23R1 est indiquée en noir. La première ORF spécifique de Xa23R1 se trouve entre le codon 1 et le codon TAG souligné. La seconde ORF se situe entre le codon TTG en gras et la fin de la séquence.

La séquence du gène *xipD* comprise entre les codons 121 et 446 n'est pas présente chez Xa23R1. Cette séquence de 972 pb, qui comprend les domaines spécifiques des protéines de cette famille, est remplacée par une séquence de 1148 pb qui ne s'aligne avec aucune des séquences répertoriées dans les bases de données. L'insertion de la séquence de 1148 pb chez Xa23R1 conduit à la création de deux nouvelles ORFs dont la séquence protéique ne présente aucune identité en acides aminés avec les bases de données.

Le pourcentage d'identité en nucléotides entre les gènes de GPE PC73 et les gènes de Xa23R1 est très élevé, quelle que soit la fonction de ces gènes (tableau 2). De même, le pourcentage d'identité en acides aminés entre les séquences protéiques des gènes de GPE

PC73 et les séquences protéiques des gènes de Xa23R1 est très élevé (tableau 2). Par ailleurs, tous les gènes ont la même longueur chez les deux souches sauf les gènes *xapB* et *xapH* qui sont plus courts chez la souche Xa23R1. En effet, le gène *xapB* de Xa23R1 code une protéine tronquée de treize acides aminés par rapport à celle codée par la souche GPE PC73. Ceci résulte d'une mutation au niveau du codon d'initiation qui entraîne un déplacement du début de l'ORF. Le gène *xapH* de la souche Xa23R1 présente, quant à lui, une délétion interne de 30 nucléotides.

Tableau 2 : Récapitulatif de la comparaison des séquences des ORFs du système de sécrétion de type III SPI-1 de la souche GPE PC73 avec celles de la souche Xa23R1

| | Identité en acides nucléiques ¹ | Identité en acides aminés ² | Nombre total de mutations ³ | Nombre total de mutations synonymes ⁴ |
|---|--|--|--|--|
| Gènes codant les protéines constitutives de la seringue | 97 à 99 % | 96 à 100 % | 111 | 69 |
| Gène <i>xicA</i> (chaperone) | 99 % | 99 % | 1 | 0 |
| Gène <i>xsaP</i> (chaperone) | 98 % | 99 % | 13 | 8 |
| Gènes codant des protéines dont la fonction est inconnue (exceptés <i>xapB</i> et <i>xapH</i>) | 97 à 100 % | 95 à 100 % | 71 | 34 |
| Gène <i>xipB</i> (translocon) | 99 % | 99 % | 2 | 1 |
| Gène <i>xipC</i> (translocon) | 99 % | 100 % | 1 | 1 |

¹ Identité en acides nucléiques entre les séquences nucléotidiques des gènes de la souche GPE PC73 et des gènes de la souche Xa23R1.

² Identité en acides aminés entre les séquences protéiques des gènes de la souche GPE PC73 et des gènes de la souche Xa23R1.

³ Nombre total de nucléotides mutés dans la séquence nucléotidique des gènes de la souche Xa23R1 par rapport à la séquence nucléotidique des gènes de la souche GPE PC73.

⁴ Nombre total d'acides nucléiques mutés dans la séquence nucléotidique des gènes de la souche Xa23R1 par rapport à la séquence nucléotidique des gènes de la souche GPE PC73 dont la mutation est synonyme.

La détermination du nombre de mutations dans les séquences nucléotidiques et dans les séquences protéiques a permis d'évaluer le nombre de mutations synonymes pour chaque gène (tableau 2, données détaillées fournies en annexe 4). Le nombre de mutations synonymes est important surtout pour les gènes dont la fonction est connue (tableau 2).

b. Analyse de la séquence du produit PCR 28 au sein d'une collection de souches représentatives de la diversité de *X. albilineans*

Nous avons essayé d'obtenir le produit PCR 28 à partir de 14 souches de *X. albilineans* appartenant à différents groupes génotypiques PFGE (tableau 3) et qui sont représentatives de la diversité génétique de cette espèce bactérienne. Le produit PCR 28 a été amplifié chez toutes ces souches (à l'exception de la souche PNG 130) et chaque séquence nucléotidique correspondante a été analysée. L'identité de la séquence obtenue pour cinq de ces souches est supérieure à 98 % à la séquence de la souche Xa23R1 qui ne contient pas le gène *xipD* complet. Pour les autres souches, cette séquence est identique à plus de 98 % à la séquence de la souche GPE PC73 et constitue un gène *xipD* complet.

Tableau 3 : Comparaison de la séquence nucléotidique du produit PCR 28 chez des souches représentatives de la diversité génétique de *Xanthomonas albilineans*.

| Souche de <i>X. albilineans</i> (origine géographique) | Groupe PFGE | Séquence identique à plus de 98 % à la |
|--|---------------|--|
| HVO082 (Burkina Faso) | C | Séquence de Xa23R1 appartenant au groupe PFGE A (<i>xipD</i> absent) |
| REU209 (Réunion) | J | |
| HVO005 (Burkina Faso) | F | |
| LKA070 (Sri Lanka) | G | |
| LS156 (Australie) | Non déterminé | |
| TWN052 (Taiwan) | B | Séquence de GPE PC73 appartenant au groupe PFGE B (<i>xipD</i> présent) |
| GLP056 (Guadeloupe) | B | |
| MTQ078 (Martinique) | B | |
| BRA115 (Brésil) | B | |
| REU173 (Réunion) | D | |
| REU174 (Réunion) | D | |
| FIJ080 (Fidji) | E | |
| MTQ058 (Martinique) | I | |

2. Etude de l'expression d'un gène rapporteur fusionné à la séquence nucléotidique comprise entre les gènes *xsaM* et *xsaN*

La séquence nucléotidique entre les gènes *xsaM* et *xsaN* est supposée contenir un promoteur bidirectionnel responsable de la régulation de l'expression des deux opérons comprenant l'ensemble des gènes codant les protéines constitutives de la seringue. Cependant, cette séquence ne contient aucune séquence consensus caractéristique de promoteurs décrite dans les bases de données. Notamment, cette séquence ne comprend pas

les séquences consensus caractéristiques des promoteurs σ_{70} (la région -35 TTGACAT et la région -10 TATAAT). Cette séquence ne comprend pas non plus de structure en épingle à cheveux susceptible d'être reconnue par des ARN polymérases. Cette séquence a été fusionnée au gène rapporteur codant la protéine YFP (Yellow Fluorescent Protein) dans les deux orientations dans le plasmide pUFR043 qui se réplique chez *X. albilineans* (figure 8). Les plasmides correspondants ont été appelés PromXsaM et PromXsaN.

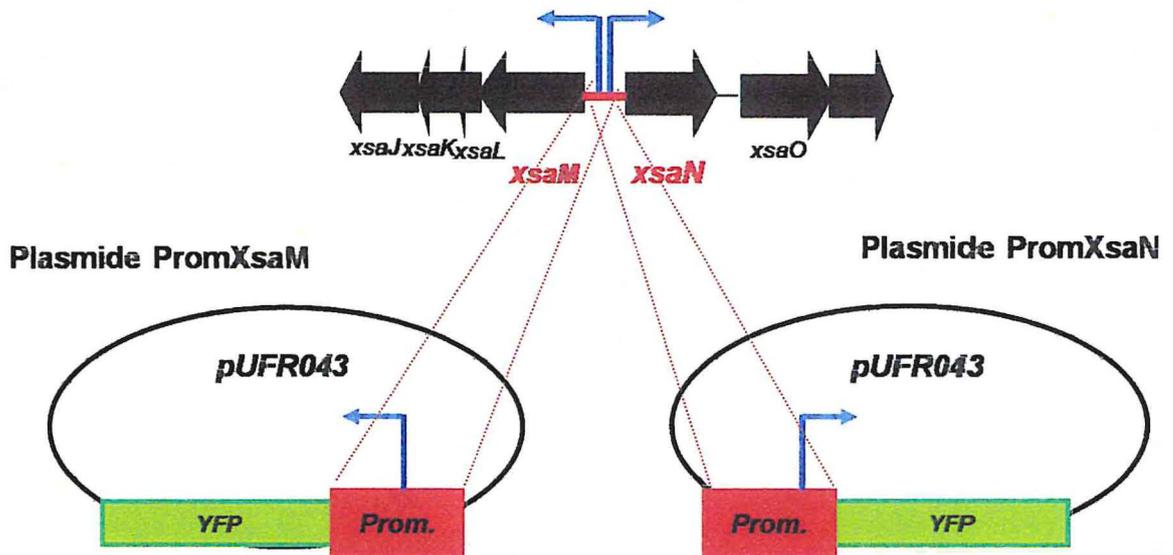


Figure 8 : Représentation schématique des constructions de fusion du promoteur bidirectionnel avec le gène codant la YFP.

YFP : Yellow Fluorescent Protein

Prom. : Promoteur bidirectionnel des gènes *xsaM* et *xsaN*.

Les plasmides PromXsaM et PromXsaN ont été introduits dans la souche GPE PC73. Les souches correspondantes, appelées PC73-PromXsaM et PC73-PromXsaN, ont été cultivées dans un milieu minimum liquide pendant 4 heures en présence de différents échantillons d'origine animale. L'objectif de cette expérimentation était de mettre en évidence une éventuelle induction du promoteur par des signaux moléculaires présents dans ces échantillons. Aucune induction de l'expression du gène rapporteur n'a été observée pour les échantillons suivants : surnageant d'une culture de cellules d'insecte Sf9, cellules d'insecte Sf9 obtenues après centrifugation d'une culture, surnageant de culture d'un hybridome de souris, hybridome de souris récupéré après centrifugation d'une culture, surnageant d'une culture de cellules de primates VERO, cellules de primates VERO adhérentes sur boîte de culture, broyat de pucerons (*Brevicoryne brassicae*, *Aphis gossypii*, *Acyrtosiphon pisum*, *Myzus persicae*, *Melanaphis sacchari*, *Sipha flava*), broyat de *Plutella xylostella* au stade adulte et larvaire, intestins de *P. xylostella*, prélèvements de poumons de souris, prélèvements

de différentes parties d'intestins de souris, prélèvements de reins de souris et prélèvement de sang de souris.

Les souches PC73-PromXsaM et PC73-PromXsaN ont également été cultivées dans un milieu minimum auquel a été rajouté un extrait de feuille de canne à sucre. Aucune induction de l'expression du gène rapporteur n'a été observée.

IV. Discussion :

1. Etude de la variabilité des gènes codant le système de sécrétion de type TTSS SPI-1 au sein de plusieurs souches de *Xanthomonas albilineans*

Afin de déterminer si le groupement de gènes du TTSS SPI-1 est conservé au sein des souches de *X. albilineans*, nous avons choisi de comparer la séquence de ces gènes entre deux souches appartenant à deux groupes génotypiques différents, la souche GPE PC73 appartenant au groupe PFGE B et la souche Xa23R1 appartenant au groupe PFGE A. Cette comparaison a mis en évidence deux types de variabilité génétique.

Le premier type de variabilité génétique, appelé variabilité de type I, se traduit par l'absence d'une séquence de 972 pb dans le gène *xipD* chez Xa23R1. Le deuxième type de variabilité génétique, appelé variabilité de type II, correspond à la présence de mutations ponctuelles (substitutions) réparties sur l'ensemble de la séquence du groupement de gènes du TTSS SPI-1. Pour simplifier la discussion, ces deux types de variabilité seront abordés séparément.

La variabilité de type I est liée à l'absence de 972 pb dans le gène *xipD* chez la souche Xa23R1 (figure 7). L'étude de cette variabilité a été élargie à 13 autres souches de *X. albilineans* appartenant à 10 groupes génotypiques différents (PFGE A à PFGE J). Cette étude a montré que la séquence du gène *xipD* complet de la souche GPE PC73 est conservée chez quatre autres souches du groupe PFGE B, ce qui suggère que cette séquence est conservée dans toutes les souches de ce groupe. Elle a également été montré que la séquence de Xa23R1, qui comprend un gène *xipD* incomplet, n'est pas spécifique des souches du groupe A car elle est également présente dans des souches appartenant à quatre autres groupes (tableau 3). Malheureusement, cette étude ne permet pas de déterminer la répartition des

séquences de Xa23R1 et de GPE PC73 dans les autres groupes génotypiques que PFGE B car un seul individu de chacun des autres groupes a été analysé.

Des analyses phylogénétiques antérieures réalisées à partir du gène de ménage *atpD* ont permis de classer les souches analysées dans notre étude en deux groupes I et II (Renier *et al.*, 2007). La figure 9A montre que les séquences du gène *xipD* de GPE PC73 (gène complet) et de Xa23R1 (gène incomplet) se répartissent indifféremment dans ces deux groupes. Ce résultat démontre que la séquence présente chez Xa23R1 (gène *xipD* incomplet) a été acquise de façon indépendante chez au moins deux souches de *X. albilineans* (une souche du groupe I et une souche du groupe II). Ces deux acquisitions, bien qu'indépendantes, ont permis l'acquisition de la même séquence. En effet, la séquence du produit PCR 28 de la souche Xa23R1 (souche du groupe I) décrite sur la figure 7 est identique à la séquence du produit PCR 28 de la souche HVO005 (souche du groupe II) notamment au niveau des jonctions entre la séquence de *xipD* et la séquence spécifique de Xa23R1. Deux hypothèses peuvent expliquer qu'une même séquence ait pu être acquise de façon indépendante chez deux souches de *X. albilineans*. Selon la première hypothèse, ces deux acquisitions résulteraient d'une même recombinaison homologue entre un TTSS SPI-1 complet initialement présent dans le génome de toutes les souches *X. albilineans* avec un même plasmide portant la séquence présente dans le produit PCR 28 de Xa23R1. Selon la deuxième hypothèse, les deux acquisitions résulteraient de deux transferts horizontaux indépendants de la séquence entière du TTSS SPI-1 à partir de deux souches différentes d'une même espèce de bactérie, l'une possédant un TTSS SPI-1 avec un gène *xipD* complet et l'autre possédant un TTSS SPI-1 avec un gène *xipD* incomplet.

Par ailleurs, le groupement de gènes de biosynthèse de l'albicidine se trouve dans le même îlot génomique que le groupement de gènes du TTSS SPI-1 aussi bien chez GPE PC73 que chez Xa23R1. La séquence nucléotidique comprise entre le groupement de gènes de biosynthèse de l'albicidine et le groupement de gènes du TTSS SPI-1 a été déterminée chez Xa23R1 à partir du séquençage du cosmide pALB540 issus d'une banque génomique de Xa23R1 et utilisé pour le séquençage d'une partie des gènes de biosynthèse de l'albicidine (Royer *et al.*, 2004). Cette séquence présente une identité en acide nucléique de 98 % avec la séquence nucléotidique correspondante de la souche GPE PC73. Ce résultat démontre que, dans le cas de deux transferts horizontaux indépendants de la séquence entière du TTSS SPI-1, les gènes de biosynthèse d'albicidine et les gènes du TTSS SPI-1 auraient été acquis en même temps. Donc, si l'acquisition du gène *xipD* incomplet respectivement par une souche du groupe I et une souche du groupe II résulte de deux transferts horizontaux indépendants du

TTSS SPI-1, alors l'acquisition du groupement de gènes de biosynthèse de l'albicidine par ces mêmes souches résulte de ces mêmes transferts horizontaux. Or, des analyses phylogénétiques antérieures réalisées sur une séquence d'un gène de biosynthèse d'albicidine (séquence appelée NRPS2, figure 9B) montrent que la répartition de cette séquence est identique à celle observée avec le gène de ménage *atpD*. Pour cette raison, l'hypothèse de deux transferts horizontaux indépendants des gènes de biosynthèse de l'albicidine et donc du groupement de gènes du TTSS SPI-1 paraît peu probable. L'analyse de la variabilité d'un gène codant une protéine constitutive du TTSS au sein de 13 souches représentatives de la diversité de *X. albilineans* devrait permettre de confirmer que la phylogénie de ce gène est identique à celle du gène de ménage *atpD* et de la séquence NRPS2, ainsi que la délétion du gène *xipD* dans plusieurs souches de *X. albilineans* résulte bien d'une même recombinaison à partir d'un même plasmide.

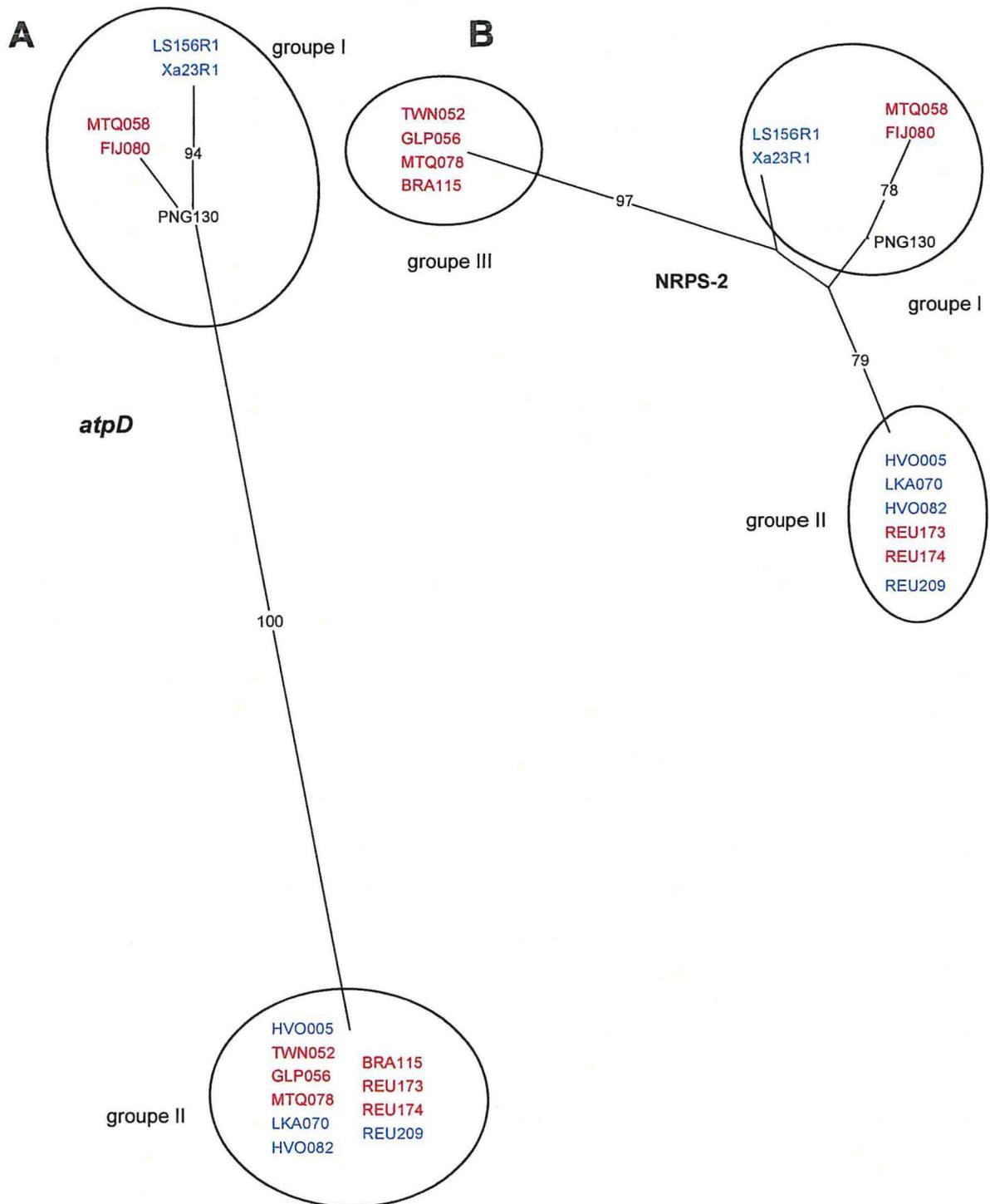


Figure 9 : Analyse phylogénétique réalisée à partir du gène de ménage *atpD* (A.) et des modules de gènes de biosynthèse de l'albicidine (B.) sur des souches représentatives de la diversité de *X. albilineans* et générées par Neighbor-Joining avec corrections de Jukes et Cantor. Les souches présentant la séquence de GPE PC73 (*xipD* complet) sont indiquées en rouge. Les souches présentant la séquence de Xa23R1 (*xipD* incomplet) sont indiquées en bleu. La souche PNG130 n'a pas été étudiée dans le cadre de la présente étude. (d'après Renier *et al.*, 2007)

Concernant la variabilité de type II, la plupart des gènes du TTSS SPI-1 sont très conservés entre les souches GPE PC73 et Xa23R1, puisque la séquence nucléotidique et la séquence protéique des gènes de ces deux souches sont très conservées (tableau 4). De plus, la

comparaison de la séquence de GPE PC73 avec celle de Xa23R1 a mis en évidence 211 mutations ponctuelles dans l'ensemble des séquences codantes du TTSS SPI-1. Ces mutations ne modifient pas les cadres de lecture des ORFs codant les protéines nécessaires à la formation d'un injectisome. En effet, les seules ORFs dont la taille est réduite chez Xa23R1 par rapport à GPE PC73 sont les ORFs *xapB* et *xapH*, dont la fonction est inconnue et qui ne sont sans doute pas nécessaires à l'assemblage d'un injectisome.

Puisque le groupement de gènes du TTSS SPI-1 et le groupement de gènes de biosynthèse de l'albicidine se trouvent dans le même îlot génomique et étaient sans doute présents avant la divergence des groupes PFGE A et PFGE B, nous avons comparé le taux de mutations dans les gènes du TTSS SPI-1 dont la fonction est connue (ces gènes correspondent à une séquence totale de 18 594 pb) avec le taux de mutations dans un des gènes de biosynthèse de l'albicidine (*albI* dont la longueur est de 20 640 pb). Pour cela, nous avons estimé le rapport ω , qui est le rapport entre le taux de substitutions non synonymes (Ka) et le taux de substitutions synonymes (Ks) par la méthode de Li JME, implémentée dans le logiciel Phylo_win de Galtier *et al.*. Plus ce rapport est inférieur à 1, plus les contraintes sélectives sur les gènes étudiées sont importantes. Le taux ω (Ka/Ks) des gènes du TTSS SPI-1 est de 0,2619 alors que celui de *albI* est de 0,4242. Ces faibles taux ω suggèrent fortement que ces deux groupements de gènes sont soumis à une contre sélection liée au maintien de la fonction. La contre sélection liée au maintien de la fonction des gènes du TTSS SPI-1 semble plus forte que celle liée au maintien de la fonction des gènes de biosynthèse de l'albicidine. Ce résultat suggère fortement que les gènes du TTSS SPI-1 sont exprimés ou ont été exprimés chez *X. albilineans* depuis la divergence des groupes génotypique PFGE A et PFGE B.

En conclusion, l'analyse de la variabilité de type I et de type II suggère fortement que les gènes du TTSS SPI-1 sont ou ont été exprimés chez *X. albilineans*. Il reste à déterminer le rôle de ces gènes dans le cycle de vie de *X. albilineans*. Si le TTSS-SPI-1 est impliqué dans des interactions de *X. albilineans* avec un hôte animal, alors les souches possédant un gène *xipD* incomplet ne sont plus capables de se multiplier chez cet hôte. Mais la présence d'un gène *xipD* incomplet chez plusieurs souches pourrait être liée au fait que ce gène n'est pas indispensable à la fonction du TTSS SPI-1 chez *X. albilineans*. Dans ce cas, le TTSS SPI-1 pourrait jouer un rôle dans l'adhésion de la bactérie à la surface des feuilles de la canne à sucre comme cela a été proposé pour le TTSS SPI-1 d'*E. tasmaniensis* (Kube *et al.*, 2008) qui par ailleurs est également incomplet puisqu'il ne possède pas le gène codant une des protéines du translocon (gène *bipB*, figure 4). Le translocon ne serait donc pas indispensable pour l'adhésion de *X. albilineans* et d'*E. tasmaniensis* aux tissus végétaux. Des travaux antérieurs

ont montré que le TTSS SPI-1 n'est pas nécessaire à la colonisation du xylème de la canne à sucre par *X. albilineans* (Royer *et al.*, résultats non publiés). Cependant nous ne pouvons pas exclure que le TTSS SPI-1 est impliqué dans l'adhésion de *X. albilineans* à la surface des feuilles de la canne à sucre. L'étude de l'induction du promoteur bidirectionnel responsable du contrôle de la transcription des gènes codant les protéines constitutives de l'injectisome est une première étape dans l'exploration du rôle de gènes du TTS SPI-1 chez *X. albilineans*.

2. Etude de l'induction du promoteur du TTSS SPI-1 de *X. albilineans*

Les études réalisées avec les souches PC73-PromXsaM et PC73-PromXsaN ont montré que l'activité du promoteur bidirectionnel n'est pas constitutive et n'est pas induite lorsque la bactérie est cultivée dans un milieu minimum. De plus, elles ont montré que les extraits de feuilles de canne à sucre n'activent pas l'activité de ce promoteur, ce qui suggère que le TTSS SPI-1 n'est pas impliqué dans les interactions de *X. albilineans* avec la canne à sucre. D'autres expérimentations seraient nécessaires pour confirmer ce résultat, notamment l'étude de l'induction de l'expression du gène rapporteur chez les souches PC73-PromXsaM et PC73-PromXsaN inoculées sur des feuilles de canne à sucre.

Les études menées n'ont malheureusement pas permis d'identifier un échantillon animal capable d'induire l'activité du promoteur bidirectionnel dans les conditions expérimentales testées. Les constructions de fusion du promoteur bidirectionnel avec le gène rapporteur ont été malheureusement obtenues tardivement, ne permettant pas de tester tous les échantillons disponibles et de faire varier différents paramètres tels que la température ou le temps de contact de la bactérie avec les échantillons. En effet, il aurait été intéressant d'étudier l'induction du promoteur lorsque la bactérie est au contact d'autres extraits d'animaux comme par exemple des échantillons de nématodes, de rats ou d'autres cellules d'animaux en culture telles que les cellules d'insectes ou humaines d'origine épithéliale.

En conclusion, les études de la variabilité de la séquence du groupement de gènes TTSS SPI-1 au sein des souches de *X. albilineans* suggèrent fortement que ce groupement de gènes est ou a été exprimé chez *X. albilineans*. Ce groupement de gènes semblerait plutôt impliqué dans les interactions de *X. albilineans* avec un hôte animal. La multiplication de *X. albilineans* chez cet hôte pourrait expliquer la présence de la bactérie dans l'eau de pluie qui serait à l'origine des contaminations aériennes de la canne à sucre observées dans plusieurs régions. La présence d'un gène *xipD* complet chez toutes les souches du groupe génotypique PFGE B analysées est en accord avec cette hypothèse puisque les souches de *X. albilineans* à

l'origine des contaminations aériennes appartiennent toutes à ce même groupe. Des expérimentations supplémentaires seront nécessaires pour identifier cet hôte animal.

V. Perspectives

Une trop faible activité du promoteur TTSS SPI-1 pourrait expliquer les résultats négatifs obtenus lors des tests d'induction du promoteur lorsque les bactéries étaient cultivées en présence d'échantillons d'origine animale. En effet, la détection en microscopie à fluorescence de l'expression du gène rapporteur utilisé nécessite une production très importante de la protéine YFP chez les bactéries. Afin de mettre en évidence des activités très faibles de ce promoteur, deux constructions supplémentaires ont été préparées dans le cadre de ce stage. Elles permettront d'intégrer dans le génome de *X. albilineans*, en aval du promoteur TTSS SPI-1, un gène codant la recombinaison Tnpr. La souche recombinante ayant intégré ce gène sera alors transformée avec un plasmide portant le gène *sacB* encadré par deux séquences permettant l'excision de ce gène lorsque la transposase Tnpr est exprimée. Le gène *sacB* qui code une saccharose 6-fructosyl transférase bloque la croissance des bactéries sur un milieu contenant du saccharose. La souche recombinante portant le plasmide, cultivée dans un milieu ne contenant pas de saccharose, pourra être utilisée dans les tests d'induction du promoteur en présence de différents échantillons d'origine animale. En effet, l'induction d'une faible activité du promoteur conduira alors à une production de la transposase Tnpr très faible mais suffisante pour permettre l'excision du gène *sacB*. L'induction très faible du promoteur pourra donc être mise en évidence par l'apparition de bactéries capables de pousser sur un milieu contenant du saccharose. Malheureusement, ces constructions ont été obtenues tardivement et ce système n'a pas pu encore être utilisé pour étudier l'induction du promoteur TTSS SPI-1.

Par ailleurs, d'autres expérimentations peuvent être proposées pour démontrer la fonctionnalité du groupement de gènes TTSS SPI-1 de *X. albilineans*. Dans un premier temps, nous proposons d'induire une expression constitutive de ce groupement de gènes en exprimant le gène *xsaN* sous contrôle d'un promoteur constitutif (promoteur *lacZ*). *xsaN* code un régulateur de transcription de la famille AraC. Son expression constitutive devrait donc conduire à une induction de l'expression du groupement de gènes TTSS SPI-1.

Pour étudier, la fonctionnalité de ce TTSS SPI-1 exprimé constitutivement, nous proposons de démontrer que le TTSS SPI-1 de *X. albilineans* est capable d'injecter des effecteurs identifiés chez d'autres bactéries. Deux effecteurs pourront être testés : la protéine SipA, produite par *Salmonella typhimurium*, capable de modifier le réseau d'actine des cellules animales (Lyndsey et al., 2007) et l'effecteur YopN, produit par *Yersinia pestis*, qui est phosphorylé

lorsqu'il entre dans la cellule eucaryote (Day et *al.*, 2003). Des marqueurs spécifiques seront utilisés pour confirmer leur injection dans les cellules animales par une souche de *X. albilineans* exprimant constitutivement le gène *xsaN* et un des effecteurs. Pour l'effecteur SipA ce marqueur mettra en évidence une modification du réseau d'actine. Pour l'effecteur YopN ce marqueur mettra en évidence sa phosphorylation.

Supports bibliographiques

Agrain C, Sorg I, Paroz C et Cornelis G. 2005. Secretion of YscP from *Yersinia enterocolitica* is essential to control the length of the injectisome needle but not to change the type III secretion substrate specificity. *Molecular Microbiology*. 57:1415-1427.

Autrey L, Saumtally S, Dookunc A, Sullivan S et Dhayan S. 1995. Aerial transmission of the leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*. *Proceedings International Society of Sugar Cane Technologists*. 21:508-526.

Birch R. 2001. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. *Molecular Plant Pathology*. 2:1-11.

Birch R et Patil S. 1987. Evidence that an albicidin-like phytotoxin induces chlorosis in sugarcane leaf scald disease by blocking plastid DNA replication. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 30:207-214.

Champoiseau P, Daugrois J-H, Pieretti I, Cociancich S, Royer M and Rott P. 2006. High variation in pathogenicity of genetically closely related strains of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen, in Guadeloupe. *Phytopathology*. 98:1081-1091.

Comstock J. 2001. Foliar symptoms of sugarcane leaf scald. *Sugar Journal* 64:23-32.

Cornelis G. 2006. The type III secretion injectisome. *Nature Review Microbiology*. 4:811-825.

Daugrois JH, Dumont V, Champoiseau P, Costet L, Boisne-Noc R et Rott P. 2003. Aerial contamination of sugarcane in Guadeloupe by two strains of *Xanthomonas albilineans*. *European Journal of Plant Pathology*. 109:445-458.

Daugrois JH, Champoiseau P et Rott P. 2005. Epiphytic colonisation and infection by *Xanthomonas albilineans* of two sugarcane cultivars differing in resistance to leaf scald disease. *Proceedings International Society of Sugar Cane Technologists*. 25:678-684.

Davis M, Rott P, Warmuth C, Chatenet M et Baudin P. 1997. Intraspecific genomic variation within *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology*. 87:316-324.

Day J, Ferracci F, Plano G. 2003. Translocation of YopE and YopN into eukaryotic cells by *Yersinia pestis* yopN, tyeA, sycN, yscB and lcrG deletion mutants measured using a phosphorylatable peptide tag and phosphospecific antibodies. *Molecular Microbiology*. 47(3):807-23.

Galtier N, Gouy M., Gautier C. 1996. Seaview and phylo_win : two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Cabios*. 6:543-548.

Gerlach RG et Hensel M. 2007. Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 297(6): 401-415.

Gonçalves E et Rosato Y. 2002. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S-23S rDNA intergenic spacer sequences. *Internal Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52(Pt 2):355-361.

Gürlebeck D, Thieme F et Bonas U. 2006. Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *Journal of Plant Physiology*. 163:233-255.

Hashimi S, Wall M, Smith A, Maxwell A et Birch R. 2007. The phytotoxin albicidin is a novel inhibitor of DNA gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51(1):181-187.

- Klett P et Rott P. 1994. Inoculum sources for the spread of leaf scald disease of sugarcane caused by *Xanthomonas albilineans* in Guadeloupe. *Phytopathology*. 142:283-291.
- Kube M, Migdoll A, Müller I, Kuhl H, Beck A, Reinhardt R et Geider K. 2008. The genome of *Erwinia tasmaniensis* strain Et1/99, a non-pathogenic bacterium in the genus *Erwinia*. *Environmental Microbiology*. May 6. [Epub ahead of print].
- Lyndsey C. Brawn, Richard D. Hayward and Vassilis Koronakis. 2007. *Salmonella* SPI1 Effector SipA Persists after Entry and Cooperates with a SPI2 Effector to Regulate Phagosome Maturation and Intracellular Replication. *Cell Host and Microbe*. 1:1:63-75.
- Martin J et Robinson P. 1961. Leaf scald. P. 79-101 in : Sugarcane diseases of the world. Martin J, Abbot E et Hughes C, eds. Elsevier Publishing Compagny, Amsterdam, Netherlands.
- Orian G. 1942. Artificial hosts of the sugarcane leaf scald organism. *Revue Agricole et Sucrière de l'Ile Maurice*. 21:285-304.
- Parkinson N, Aritua V, Heeney J, Cowie C, Bew J et Stead D. 2007. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57(Pt 12):2881-2887.
- Renier A, Vivien E, Cociancich S, Letourmy P, Perrier X, Rott PC et Royer M. 2007. Substrate specificity-conferring regions of the nonribosomal peptide synthetase adenylation domains involved in albicidin pathotoxin biosynthesis are highly conserved within the species *Xanthomonas albilineans*. *Applied Environmental Microbiology*. 73(17):5523-5530.
- Rott P. 1995. L'échaudure des feuilles de la canne à sucre. *Agriculture et Développement*. 6 :49-55.
- Rott P, Chatenet M, Granier M et Baudin P. 1988. L'échaudure des feuilles de la canne à sucre provoquée par *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson : II. Diagnostic et spectres d'hôtes de l'agent pathogène en Afrique tropicale. *L'Agronomie Tropicale*. 43 :244-251.
- Rott P et Davis M. 2000. Leaf scald. P. 38-44 in: A Guide to Sugarcane Diseases. Rott P, Bailey R, Comstock J, Croft B et Saumatilly A, eds. CIRAD et ISSCT, Montpellier, France.

Royer M, Costet L, Vivien E, Bes M, Cousin A, Damais A, Pieretti I, Savin A, Megessier S, Viard M, Frutos R, Gabriel D et Rott P. 2004. Albicidin pathotoxin produced by *Xanthomonas albilineans* is encoded by three large PKS and NRPS genes present in a cluster also containing several putative modifying, regulatory and resistance genes. *Molecular Plant-microbe Interaction*. 17: 414-427.

Stevens M, Wood M, Taylor L, Monaghan P, Hawes P, Jones P, Wallis T et Galyov E. 2002. An Inv/Mxi-Spa-like type III protein secretion system in *Burkholderia pseudomallei* modulates intracellular behaviour of the pathogen. *Molecular Microbiology*. 46:649-659.

Vauterin L, Hoste B, Yang P, Alvarez A, Kersters A et Swings J. 1993. Taxonomy of the genus *Xanthomonas*. P. 157-192 in: *Xanthomonas*. Swings J et Civerolo E, eds. Chapman et Hall. London, U.K.

Annexe 1 : Composition des milieux de culture

Milieu Wilbrink modifié:

| | |
|--------------------------------------|--------|
| Saccharose | 10 g |
| Bacto-peptone | 5 g |
| Extrait de levure | 5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,05 g |
| MgCl ₂ -6H ₂ O | 0,25 g |
| Na ₂ SO ₃ | 0,05 g |
| Agar | 15 g |
| Eau distillée | 1 L |

Remarques :

- ✓ Ajustement du pH à 6,9-7,0
- ✓ Pas d'ajout d'agar lors de l'utilisation du milieu sous forme liquide

Milieu Luria-Bertani :

| | |
|-------------------|------|
| Bactotryptone | 10 g |
| Extrait de levure | 5 g |
| NaCl | 10 g |
| Agar | 15 g |
| Eau distillée | 1 L |

Remarques :

- ✓ Ajustement du pH à 6,9-7,0
- ✓ Pas d'ajout d'agar lors de l'utilisation du milieu sous forme liquide

Milieu de culture minimum XaPR (pour *X. albilineans*)

| | |
|---------------------------------------|-------|
| Saccharose | 10 g |
| CaCl ₂ (2H ₂ O) | 5 g |
| Citrate de fer ammoniacal | 50 mg |
| NH ₄ Cl | 1 g |
| MgSO ₄ (7H ₂ O) | 0,5 g |
| Eau distillée | 1 L |

Annexe 2 : Préparation et caractéristiques de cellules d'*Escherichia coli* DH5 α compétentes

- Faire une préculture de bactéries dans 6 mL de LB et laisser agiter toute la nuit à 37 °C.
- Prélever 75 μ L de cette préculture et les ajouter à 10 mL de milieu LB liquide. Laisser croître les bactéries jusqu'à une DO de 0,3 pour une longueur d'onde de 600 nm. Les bactéries doivent être au début de leur phase de croissance exponentielle.
- Incuber 10 minutes dans de la glace fondante.
- Centrifuger 15 minutes à 3 000 rpm à 4 °C.
- Eliminer le surnageant.
- Reprendre le culot bactérien dans 2 mL de tampon Tfb I froid et homogéniser.
- Centrifuger 10 minutes à 3 000 rpm à 4 °C.
- Eliminer le surnageant.
- Reprendre le culot bactérien avec 400 μ L de tampon Tbf II.
- Aliquoter 100 μ L dans des microtubes de 1,5 mL et les conserver à -80 °C.

Tfb I pour 400 mL : 1,17 g d'acétate de potassium, 4,48 g de RbCl₂, 0,58 g de CaCl₂, 3,95 g de MnCl₂, 60 mL de glycérol, compléter à 400 mL avec de l'eau, pH ajusté à 5,8 avec de l'acide acétique.

Tfb II pour 400 mL : 208 g de Mops , 121 mg de RbCl₂, 1,1 g de CaCl₂, 15 mL de glycérol, compléter à 100 mL avec de l'eau, pH ajusté à 6,5 avec KOH.

Tableau 3 : Caractéristiques des cellules d'*Escherichia coli* compétentes.

| Souche bactérienne | Caractéristiques | Résistance aux antibiotiques | Référence bibliographique |
|-----------------------------|--|------------------------------|---------------------------|
| <i>E. coli</i> DH5 α | endA1 hsdR17(r _k ⁻ m _k ⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal ^r) relA1 Δ (lacZYA- argF) _{u169} (m80lacZM15) | - | Gibco-BRL ® |

Annexe 3 : Caractéristiques des amorces utilisées

Tableau 1 : caractéristiques des amorces employées pour amplifier les gènes codant le système de sécrétion de type III de la souche Xa23R1 de *X. albilineans*.

| Nom de l'amorce | Séquence de l'amorce | Température d'hybridation des amorces |
|-----------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| TTSS_1 | 5'- CATCATCGGATCGTCGCCAGGAT -3' | 56 °C |
| TTSS_1bis | 5'- CGGTCTTCATCGTTGGGCCT -3' | 56 °C |
| TTSS_2 | 5'- GCTTATTCAGTGCTAAATTGA -3' | 56 °C |
| TTSS_2bis | 5'- ATATTAATAAGCGATCTGAGCTGG -3' | 56 °C |
| TTSS_3 | 5'- GACCGTTCGCCGGATGAAT -3' | 56 °C |
| TTSS_3bis | 5'- ATTATGCGAAGGCTGACCTG -3' | 56 °C |
| TTSS_4 | 5'- TGACACTTCTGCTGATTCTGATC -3' | 56 °C |
| TTSS_4bis | TGTCAGATGCACTGAAGAACG -3' | 56 °C |
| TTSS_5 | 5'- TATCCAGACGAATAGTGTCTTCCGA -3' | 56 °C |
| TTSS_5bis | 5'- TCTGCAACTGCAATCCTGAC -3' | 56 °C |
| TTSS_6 | 5'- TGCGACCTTGGCTGCATATTCGTC -3' | 56 °C |
| TTSS_6bis | 5'- GCTGGCAAAGGATGACTTG -3' | 56 °C |
| TTSS_7 | 5'- TCGGCATGGCGCAAATCCTT -3' | 56 °C |
| TTSS_7bis | 5'- CGCTTTGTTTCAGAGCTAGGG -3' | 56 °C |
| TTSS_8 | 5'- GGACAGTTGCCGTTGCCTCGA -3' | 56 °C |
| TTSS_8bis | 5'- TGATTGTGGCGAGTCCATTCT -3' | 56 °C |
| TTSS_9 | 5'- GCAAACATCAGATTCAGGAAC -3' | 56 °C |
| TTSS_9bis | 5'- ATCACATCGACGTTTCATGC -3' | 56 °C |
| TTSS_10 | 5'- AAGAATTCCACAAGCTCCT -3' | 56 °C |
| TTSS_10bis | 5'- TTCGCGACCTCGGTATATGT -3' | 56 °C |
| TTSS_11 | 5'- ATCGTGCCATCGCTCTCGAT -3' | 56 °C |
| TTSS_11bis corr | 5'- ACGTGGTTATATAGTCAA -3' | 56 °C |
| TTSS_12 | 5'- CGGTATCACGTCCAGCCATA -3' | 56 °C |
| TTSS_12bis | 5'- ACGAATTCGCTCATTGCTT -3' | 56 °C |
| TTSS_13 | 5'- CCTGATATCTCGCAAGCTGC -3' | 56 °C |
| TTSS_13bis | 5'- GGCTGCTTGATCTGACACAAC -3' | 56 °C |
| TTSS_14 | 5'- GCGCCATACCGATCGGCTCA -3' | 56 °C |
| TTSS_14bis | 5'- ATTGCAGGATATTGGCATCG -3' | 56 °C |
| TTSS_15 | 5'- GCGGCTATCCAGCATATCGAG -3' | 56 °C |
| TTSS_15bis | 5'- TTCATCGTCATCACGAAAGG -3' | 56 °C |
| TTSS_16 | 5'- CGCGTACACCGTCTCCATCA -3' | 56 °C |
| TTSS_16bis | 5'- CATTGCCGGACCTGTATGAC -3' | 56 °C |
| TTSS_17 | 5'- ACACCGCCTGCTCGCAACTC -3' | 56 °C |
| TTSS_17bis | 5'- AGACGGAGAGGTGCAAATGA -3' | 56 °C |
| TTSS_18 | 5'- CGGTAATGATTTGAGTGTCGCC -3' | 56 °C |
| TTSS_18bis | 5'- TGCGATCCAGGAAAGATAG -3' | 56 °C |
| TTSS_19 | 5'- TAATCCCATCGTACGGATGAG -3' | 56 °C |
| TTSS_19bis | 5'- GCCAATGACCACCTTGATG -3' | 56 °C |
| TTSS_20 | 5'- ATAGTCGGTCCACGCCGATA -3' | 56 °C |
| TTSS_20bis | 5'- TGGAAAGCGTCTTTTCTCGT -3' | 56 °C |
| TTSS_21 | 5'- CATAGACGAGCCTGAATTAATTC -3' | 56 °C |
| TTSS_21Bbis | 5'- GTAAGCCCGGATAGCAGTGA -3' | 56 °C |
| TTSS_22 | 5'- ATGCGCTCGTAAGCGGTGTCG -3' | 56 °C |
| TTSS_22bis | 5'- GCGCTGACTGAATAGGCCAG -3' | 56 °C |
| TTSS_23 | 5'- CATCCTCTTCGACACGTACGA -3' | 56 °C |

| | | |
|------------|-------------------------------|-------|
| TTSS_23bis | 5'- TCGTCCTGGCTCATCTCAGT -3' | 56 °C |
| TTSS_24 | 5'- AGCCCATCAGCCAGACGAA -3' | 56 °C |
| TTSS_24bis | 5'- TACAGCACATTAAGCGGGTTC -3' | 56 °C |
| TTSS_25 | 5'- TCCGAGCATCACGTTGCAACG -3' | 56 °C |
| TTSS_25bis | 5'- GGC ACTATTGACGAACTC -3' | 56 °C |
| TTSS_26 | 5'- AGATGATGGCTGCAAATCGA -3' | 56 °C |
| TTSS_26bis | 5'- TGCACGATGGATAGCTGAAG -3' | 56 °C |
| TTSS_27 | 5'- ATTGCGCCCTGCCAATTAAT -3' | 56 °C |
| TTSS_27bis | 5'- TTCAAGGCGGACGATCTGAA -3' | 56 °C |
| TTSS_28 | 5'- ATTCTGCGTCACGTTGAAATT -3' | 56 °C |
| XipDF | 5'- CTTGCTCGAACTGCTTACCAC -3' | 56 °C |

Tableau 2 : Caractéristiques des amorces employées pour vérifier si le système de sécrétion de type III était complet dans les clones révélés positifs suite au marquage radioactif.

| Nom | Séquence | Tm (°C) |
|----------|----------------------------------|---------|
| Bsa M F | 5'- ACCTCGAGTGACGATCTCCGG -3' | 58 |
| Bsa M R | 5'- AGACTAGTCGTGTCGATATCT -3' | 58 |
| Bsa O F | 5'- AGCTCGAGCGATGTGATCGATG -3' | 58 |
| Bsa O R | 5'- GATACTAGTGTGTCGTCAGGGTTG -3' | 58 |
| Xip D F | 5'- CTTGCTCGAACTGCTTACCAC -3' | 58 |
| Xip D R | 5'- CCACACGCTGCACGATGTCAC -3' | 58 |
| xalb I F | 5'- GGCGGTGCAATATTGAATCA5G -3' | 58 |
| xalb IR | 5'- GCATACATCCTTGACCTGGCG -3' | 58 |

Annexe 4 : Tableau détaillé de la comparaison de chaque ORF du TTSS SPI-1 entre les souches GPE PC73 et Xa23R1

| Gènes | Fonction | Identité en acides nucléiques (en pourcentage) | Nombre de mutations sur la séquence nucléotidique | Taille de la séquence protéique chez la souche GPE PC73 (en acides aminés) | Taille de la séquence protéique chez la souche Xa23R1 (en acides aminés) | Identité en acides aminés (en pourcentage) | Nombre de mutations sur la séquence protéique | Nombre de mutations synonymes | Pourcentage de mutations synonymes |
|-------------|--------------------|--|---|--|--|--|---|-------------------------------|------------------------------------|
| <i>xipD</i> | translocon | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>xapA</i> | inconnue | 98 | 4 | 69 | 69 | 98 | 1 | 3 | 75 |
| <i>xapB</i> | inconnue | 100 | 0 | 77 | 63 | 100 | 0 | 0 | - |
| <i>xapD</i> | inconnue | 97 | 6 | 123 | 123 | 95 | 5 | 1 | 17 |
| <i>xapE</i> | inconnue | 99 | 10 | 505 | 505 | 98 | 4 | 6 | 60 |
| <i>xapC</i> | inconnue | 99 | 1 | 148 | 148 | 99 | 1 | 0 | - |
| <i>xsaH</i> | seringue | 99 | 1 | 220 | 220 | 99 | 1 | 0 | - |
| <i>xsaI</i> | seringue | 99 | 4 | 198 | 198 | 99 | 1 | 3 | 75 |
| <i>xsaJ</i> | seringue | 99 | 1 | 295 | 295 | 100 | 0 | 1 | 100 |
| <i>xsaK</i> | seringue | 99 | 2 | 94 | 94 | 97 | 2 | 0 | - |
| <i>xsaL</i> | seringue | 99 | 1 | 97 | 97 | 100 | 0 | 1 | 100 |
| <i>xsaM</i> | seringue | 98 | 20 | 467 | 467 | 96 | 12 | 8 | 40 |
| <i>xsaN</i> | seringue | 98 | 5 | 210 | 210 | 99 | 1 | 4 | 80 |
| <i>xsaO</i> | seringue | 98 | 18 | 626 | 626 | 99 | 5 | 13 | 72 |
| <i>xsaP</i> | protéine chaperone | 98 | 13 | 371 | 371 | 99 | 5 | 8 | 62 |
| <i>xsaQ</i> | seringue | 98 | 23 | 703 | 703 | 99 | 6 | 17 | 74 |
| <i>xsaR</i> | seringue | 99 | 2 | 136 | 136 | 98 | 2 | 0 | - |
| <i>xsaS</i> | seringue | 99 | 5 | 449 | 449 | 99 | 1 | 4 | 80 |
| <i>xapF</i> | inconnue | 99 | 3 | 150 | 150 | 98 | 2 | 1 | 33 |
| <i>xapG</i> | inconnue | 98 | 14 | 382 | 382 | 97 | 9 | 5 | 36 |
| <i>xsaV</i> | seringue | 98 | 15 | 346 | 346 | 97 | 9 | 6 | 40 |
| <i>xsaW</i> | seringue | 99 | 2 | 231 | 231 | 99 | 1 | 1 | 50 |
| <i>xsaX</i> | seringue | 97 | 6 | 88 | 88 | 98 | 1 | 5 | 83 |
| <i>xsaY</i> | seringue | 99 | 2 | 256 | 256 | 100 | 0 | 2 | 100 |
| <i>xsaZ</i> | seringue | 99 | 4 | 358 | 358 | 100 | 0 | 4 | 100 |
| <i>xicA</i> | protéine chaperone | 99 | 1 | 171 | 171 | 99 | 1 | 0 | - |
| <i>xipB</i> | translocon | 99 | 2 | 534 | 534 | 99 | 1 | 1 | 50 |
| <i>xipC</i> | translocon | 99 | 1 | 348 | 348 | 100 | 0 | 1 | 100 |
| <i>xapH</i> | inconnue | 97 | 34 | 637 | 627 | 93 | 16 | 18 | 53 |
| <i>xapI</i> | inconnue | 99 | 4 | 327 | 327 | 99 | 1 | 3 | 75 |
| <i>xapJ</i> | inconnue | 99 | 5 | 280 | 280 | 98 | 4 | 1 | 20 |

| | | | | | | | | | |
|-------------|----------|----|----|-----|-----|----|---|---|----|
| <i>xapK</i> | inconnue | 99 | 10 | 857 | 857 | 99 | 4 | 6 | 60 |
| <i>xapL</i> | inconnue | 99 | 2 | 239 | 239 | 99 | 1 | 1 | 50 |
| <i>xapM</i> | inconnue | 99 | 12 | 566 | 566 | 98 | 5 | 7 | 59 |

Résumé :

Xanthomonas albilineans est une bactérie phytopathogène qui colonise efficacement le xylème de la canne à sucre et qui est responsable d'une maladie appelée l'échaudure des feuilles. Cette bactérie produit une toxine particulière, l'albicidine, qui bloque la différenciation des chloroplastes. Les analyses phylogénétiques montrent que *X. albilineans* occupe une position particulière au sein des bactéries phytopathogènes, notamment au sein du genre *Xanthomonas*. Le séquençage récent de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* a révélé la présence d'un groupement de gènes codant un système de sécrétion de type III (TTSS) de la famille SPI-1. Les TTSS SPI-1 permettent l'injection d'effecteurs protéiques dans des cellules animales et ils sont presque exclusivement présents chez les bactéries pathogènes de l'homme ou symbiontes d'insectes. L'objectif de ce stage était de contribuer à l'étude du rôle du TTSS SPI-1 de *X. albilineans* dans le cycle de vie de la bactérie, sachant qu'aucune interaction de *X. albilineans* avec un hôte animal n'a jamais été décrite à ce jour.

Dans un premier temps nous avons étudié la variabilité des gènes codant le TTSS SPI-1 au sein des souches de *X. albilineans*. Pour cela, nous avons amplifié par PCR et séquencé la totalité du groupement de gène TTSS SPI-1 de la souche Xa23R1 de *X. albilineans* qui appartient à un autre groupe génotypique que la souche GPE PC73 et dont la séquence du groupement des gènes de biosynthèse de l'albicidine (XALB1) est connue. Les analyses comparatives des séquences du TTSS SPI-1 et de XALB1 montrent que ces deux groupements de gènes évoluent sous une sélection purificatrice liée au maintien de la fonction des gènes. Ce résultat suggère fortement que les gènes du TTSS SPI-1 sont exprimés chez *X. albilineans*.

Dans un deuxième temps nous sommes intéressés à l'induction du promoteur responsable de l'activation de la transcription des gènes du TTSS SP-1 afin de démontrer que ce promoteur est fonctionnel et afin de contribuer à l'identification du rôle du TTSS SPI-1 dans le cycle de vie de *X. albilineans*. Malheureusement aucune des conditions expérimentales testées n'a permis de mettre en évidence une induction de ce promoteur.

Ce rapport propose également plusieurs hypothèses concernant le rôle du TTSS SPI-1 dans le cycle de vie de *X. albilineans*.

Mots clés : *Xanthomonas albilineans*, canne à sucre, Système de sécrétion de type III, Echaudure des feuilles