

The *Xanthomonas* type-III effector XopS stabilizes CaWRKY40a to regulate defense responses and stomatal immunity in pepper (*Capsicum annuum*)

Margot Raffeiner ¹, Suayib Üstün ^{1,†}, Tiziana Guerra ¹, Daniela Spinti ^{1,2}, Maria Fitzner ¹, Sophia Sonnewald ³, Susanne Baldermann ^{1,4} and Frederik Börnke ^{1,2,*‡}

Amandine Rigaud
Dorcas Lin
Valentin Goupille

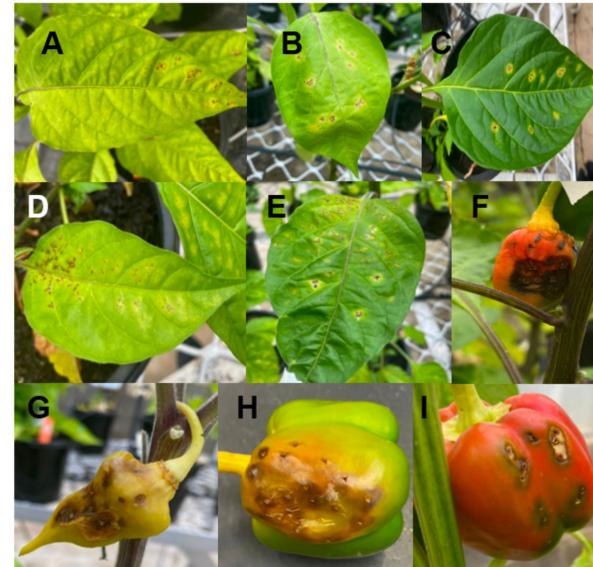
UE4 - Signalisation des plantes cultivées



Introduction

Matériel biologique

- *Capsicum annuum* (Solanaceae)
- *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*
⇒ Bacterial Leaf Spot (BLS)



BLS symptoms on leaves and fruits of *Capsicum annum*
(Utami et al, 2022)

Mécanisme pathogénique

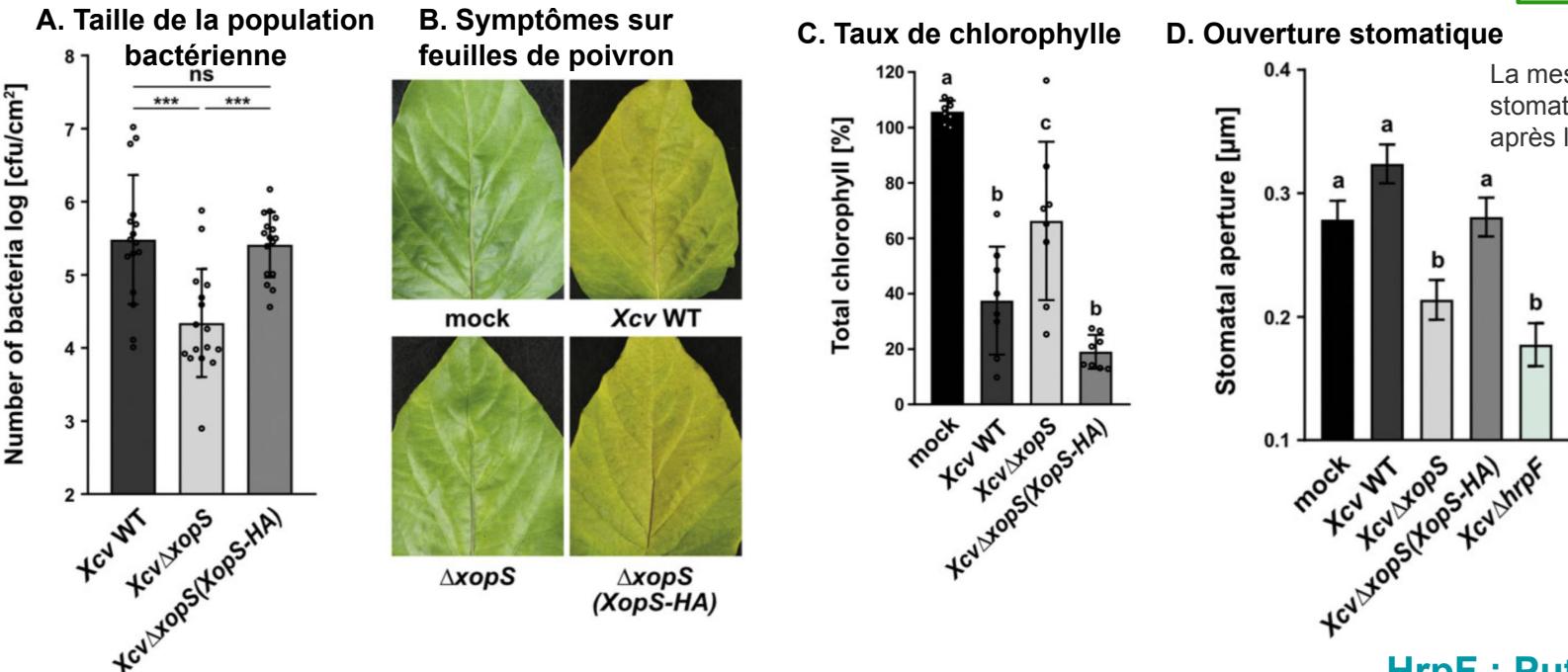
- Manipulation de la transcription (Boch et Bonas, 2010)
- Facteurs de virulence :
 - **35 protéines effectrices sécrétées de type III (T3E)**

⇒ **Protéine externe S de *Xanthomonas* (effecteur XopS)**

I - Vérification du rôle de XopS dans le pouvoir pathogène de Xcv face au poivron

La mesure a été effectuée à 7 dpi

Capsicum annuum



La mesure de l'ouverture stomatique a été effectuée 2h après le traitement

Figure 1 : Action de XopS dans le développement de Xcv et son action sur *Capsicum annuum*

HrpF : Putative Type III
Translocon Protein

XopS est un facteur de virulence bactérien et supprime la défense du poivron

II-Identification de(s) cible(s) potentielle(s) de l'effecteur Xops :

Yeast two-Hybrid (Y2H) cDNA library de *Nicotiana tabacum*

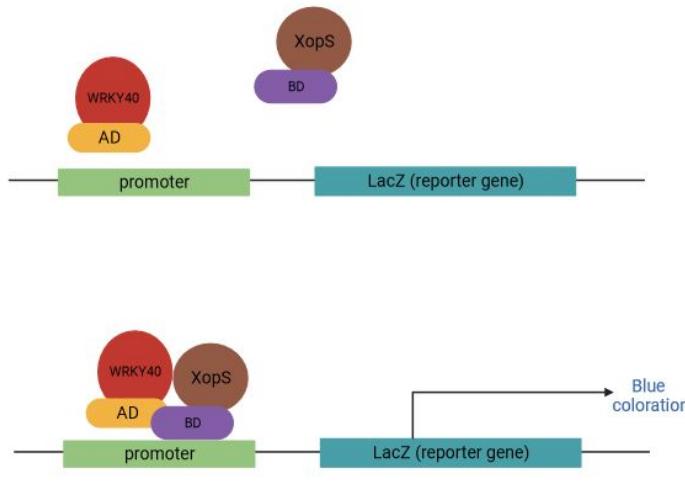


Figure 2 : Principe de la technique Yeast Two-Hbrids
(réalisé par Amandine Rigaud)

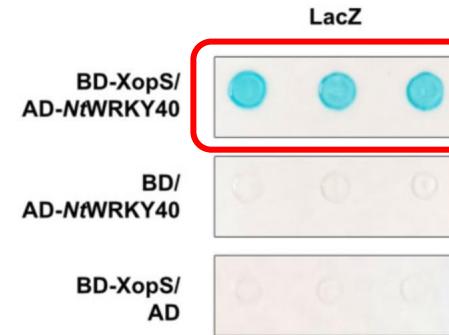
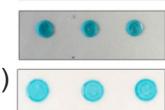


Figure 3 : Etude de l'interaction *in vitro* XopS et WRKY40 par la technique Y2H

XopS interagit avec *NtWRKY40* dans la levure

Teste la capacité de XopS à se lier aux orthologues WRKY40 d'autres espèces :

- *Nicotiana benthamiana* : *NbWRKY40* (100 % identité)
- *Capsicum annuum* : *CaWRKY40a* (82,2 % de similitude)



XopS interagit également avec *NbWRKY40* et *CaWRKY40a* dans la levure

II-Identification de(s) cible(s) potentielle(s) de l'effecteur Xops :

Nicotiana benthamiana

- transformé via *Agrobacterium* pour exprimer :

- 1 ○ **Xops-GFP et NbWRKY40-HA**
- 2 ○ **Xops-GFP et NbWRKY8-HA**
- 3 ○ **GFP et NbWRKY40-HA**
- 4 ○ **GFP et NbWRKY8-HA**

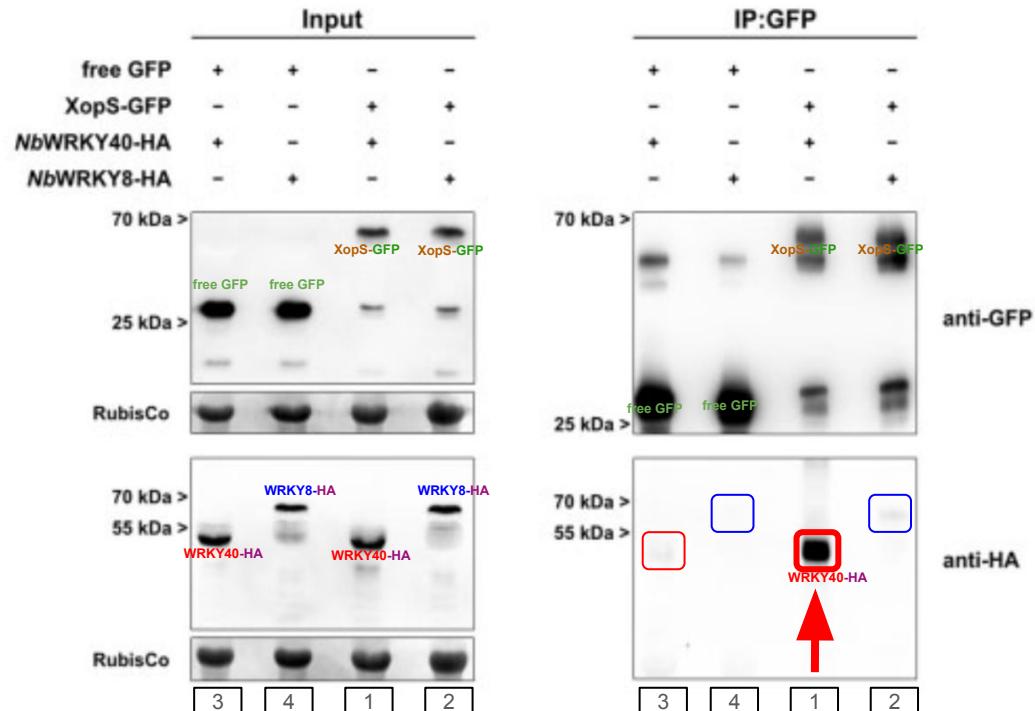
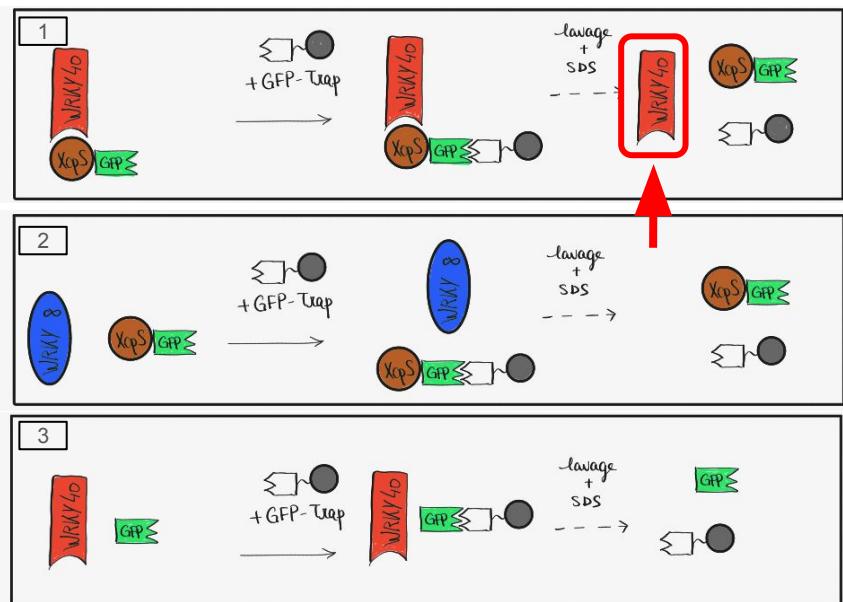
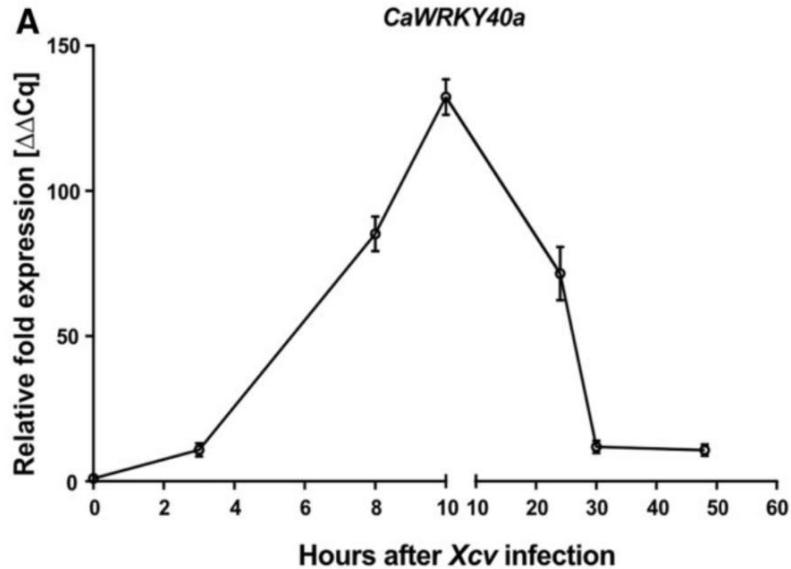


Figure 5 : Interaction *in planta* de XopS et WRKY40 par la CO-IP GFP-Trap (immunoblotting)

XopS interagit avec WRKY40 *in planta*

III - Détermination du rôle du FT WRKY40 dans l'interaction entre *le poivron* et *Xcv*

Capsicum annuum



Augmentation rapide et
transitoire de l'expression de
CaWRKY40a après l'infection
par *Xcv*

Figure 6 : Expression de *CaWRKY40a* en fonction du temps après infection par *Xcv*

Les niveaux d'ARNm respectifs ont été comparés aux niveaux d'ARNm *CaWRKY40a* à 0 hpi
La tubuline a été utilisée comme gène de référence

III - Détermination du rôle du FT WRKY40 dans l'interaction entre le poivron et Xcv

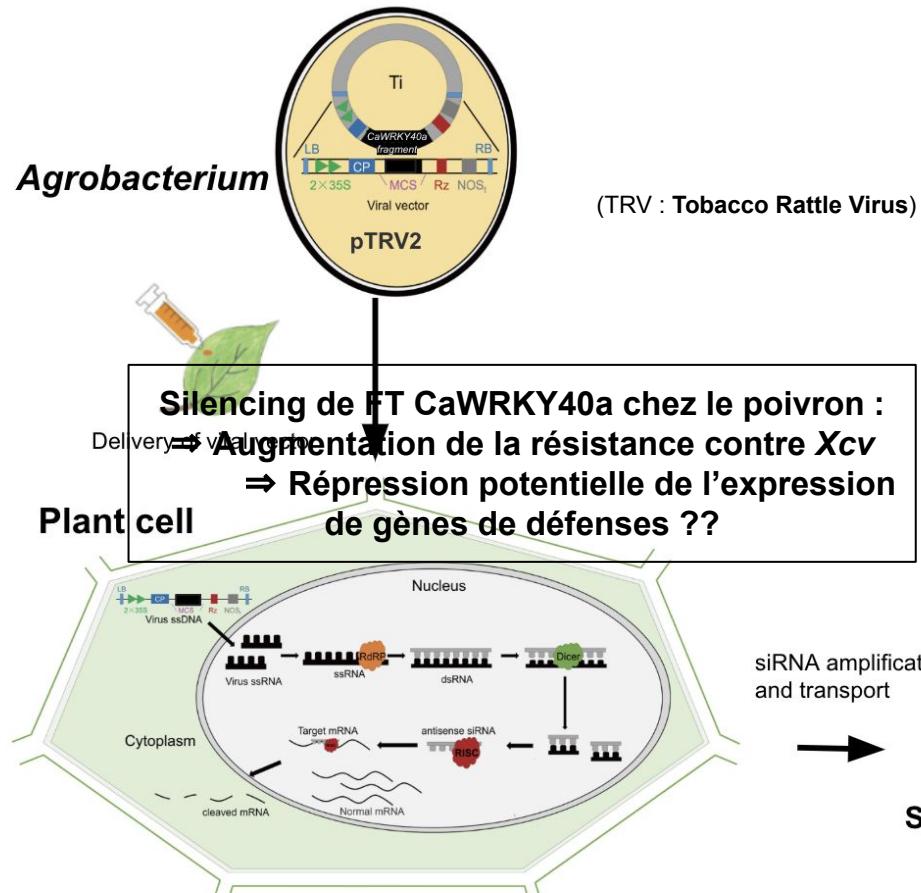
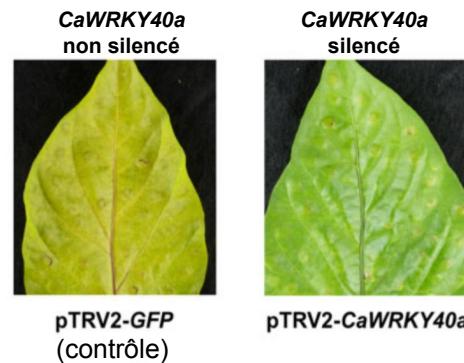
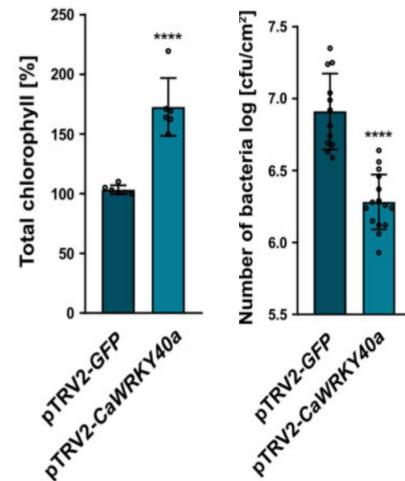


Figure 7 : Mécanisme de silencing génique induit par un virus (VIGS)
(schéma adapté par Valentin Goupille à partir de Shi et al, 2021)



Capsicum annuum

A. Symptômes sur feuilles de poivron avec CaWRKY40a silencé ou non



B. Taux de chlorophylle

C. Taille de la population bactérienne

Figure 8 : VIGS de CaWRKY40a dans le poivron améliore sa résistance contre l'infection par Xcv

III - Détermination du rôle du FT WRKY40 dans l'interaction entre *le poivron* et *Xcv*

Nicotiana benthamiana

- transformé via *Agrobacterium* pour exprimer :

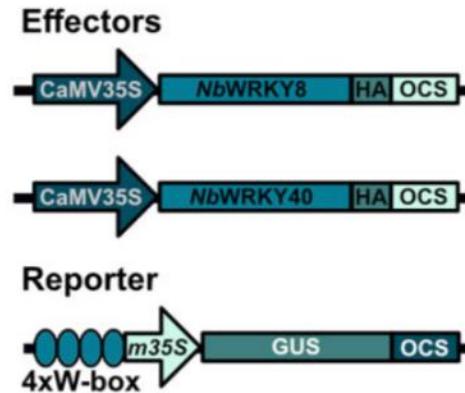


Figure 9 : Représentation des constructions effectrices et du rapporteur GUS utilisé dans le test d'expression transitoire de l'activité du promoteur entraînée par des boîtes W

m35S : promoteur CaMV35S minimal

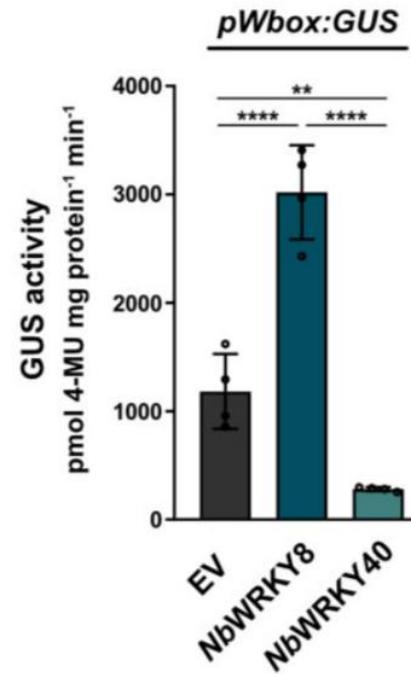


Figure 10 : Activité de la GUS déterminé 48 h après l'infiltration d'Agrobacterium
(pmol 4-Methylumbelliféron mg protéines⁻¹ min⁻¹)

NbWRKY40 joue un rôle de répresseur de l'activité génique

GUS : β -glucuronidase
EV : Vecteur vide

III - Détermination du rôle du FT WRKY40 dans l'interaction entre *le poivron* et *Xcv*

Nicotiana benthamiana

- transformé via *Agrobacterium* pour exprimer :

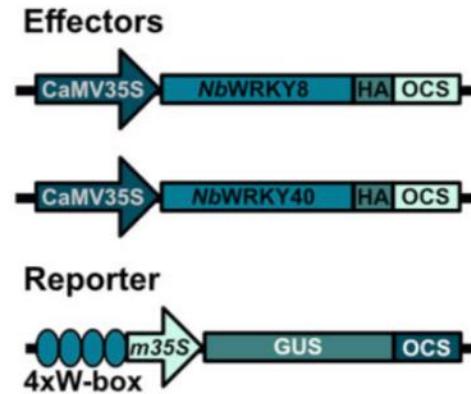


Figure 9 : Représentation des constructions effectrices et du rapporteur GUS utilisé dans le test d'**expression transitoire** de l'activité du promoteur entraînée par des boîtes W

m35S : promoteur CaMV35S minimal

Rappel : FT de la famille des WRKY :

- impliqué dans **régulation voies de signalisation** face à des stress (notamment biotiques)
- possèdent un **domaine WRKY** qui se lie à l'élément cis de la boîte W des promoteurs de leurs gènes cibles
⇒ peuvent jouer rôle :
 - Activateur (**WRKY8**)
 - Répresseur

***NbWRKY40* joue un rôle de répresseur de l'activité génique**

III - Détermination du rôle du FT WRKY40 dans l'interaction entre le poivron et Xcv

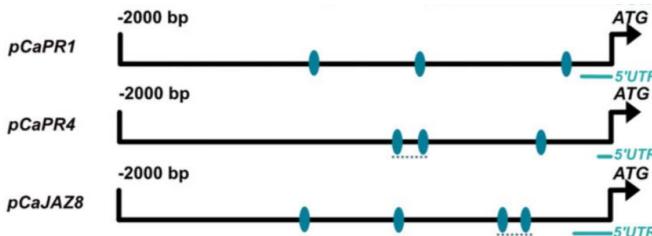


Figure 11 : Schéma des promoteurs des gènes de défense étudiés avec leurs boîtes W

- pTRV2-GFP
- pTRV2-CaWRKY40a

WRKY40 régule négativement l'expression des gènes de défense

Capsicum annuum

Répresseur de la voie du JA

MTI response genes

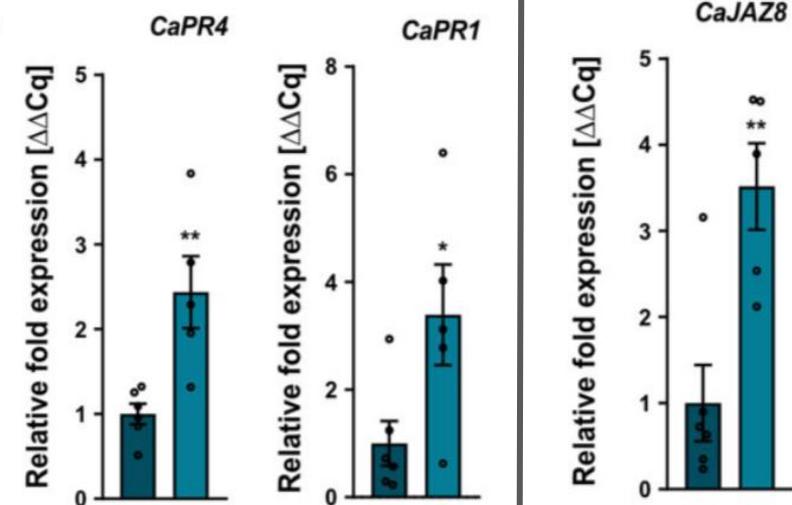


Figure 12 : Expression relative de différents gènes de défense de la plante en fonction de *CaWRKY40a*

III - Détermination du rôle du FT WRKY40 dans l'interaction entre le poivron et Xcv

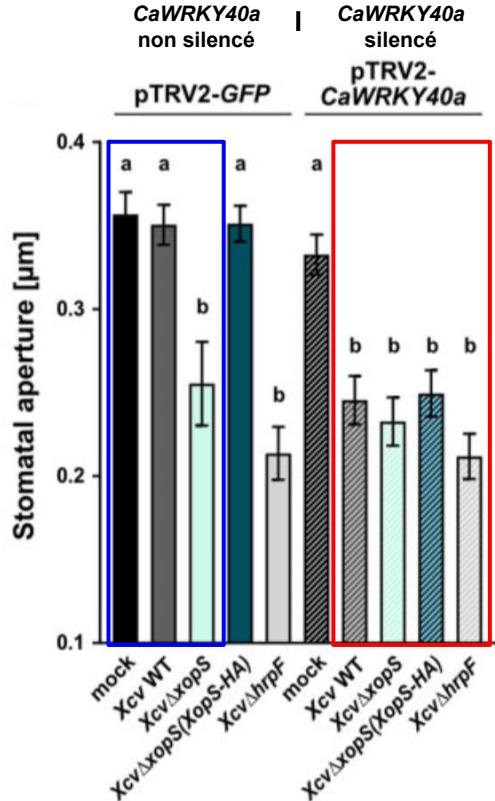


Figure 13 : Ouvertures stomatiques des plants de poivron pTRV2-GFP et pTRV2-CaWRKY40a VIGS. Les disques de feuilles ont été flottés sur de l'eau (mock) ou sur de l'eau contenant des souches Xcv WT, XcvΔxopS, XcvΔxopS(XopS-HA) ou XcvΔhrpF à un OD600 = 0.2.

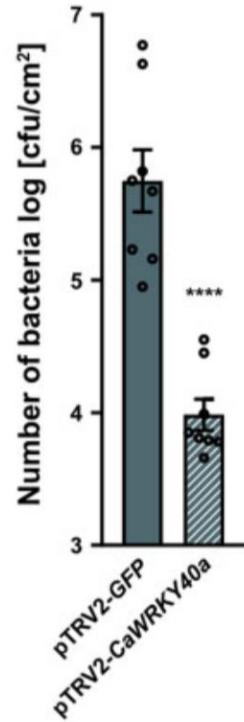


Figure 14 : Croissance bactérienne de Xcv WT inoculé en surface dans les feuilles de pTRV2-CaWRKY40a par rapport aux plantes témoins pTRV2-GFP.

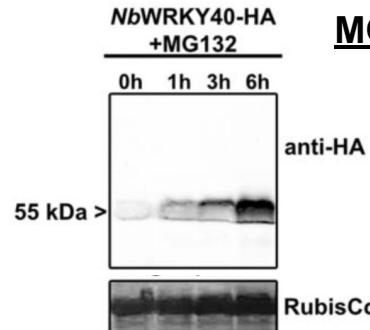
La capacité de XopS à interférer avec l'immunité stomatique nécessite WRKY40

III - Détermination du rôle du FT WRKY40 dans l'interaction entre *le poivron* et *Xcv*

Nicotiana benthamiana

- transformé via *Agrobacterium* pour exprimer :

NbWRKY40-HA



MG132 : Inhibiteur du protéasome

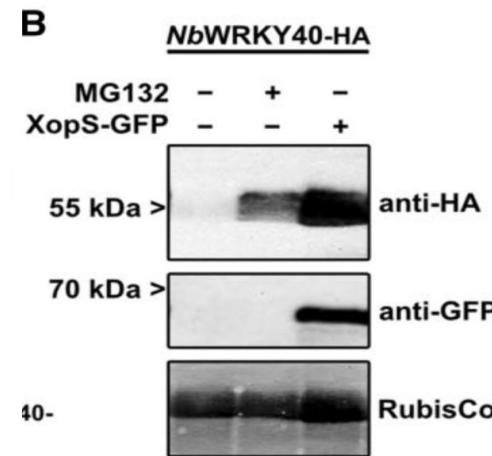


Figure 15 : L'inhibition du protéasome 26S entraîne l'accumulation de WRKY40

Figure 16 : la co-expression avec XopS-GFP entraîne une augmentation des niveaux de protéines *NbWRKY40-HA*.

XopS interfère avec la dégradation de WRKY40 par le protéasome dans la plante

IV - Action de Xcv lors de l'infection de *C. annuum*

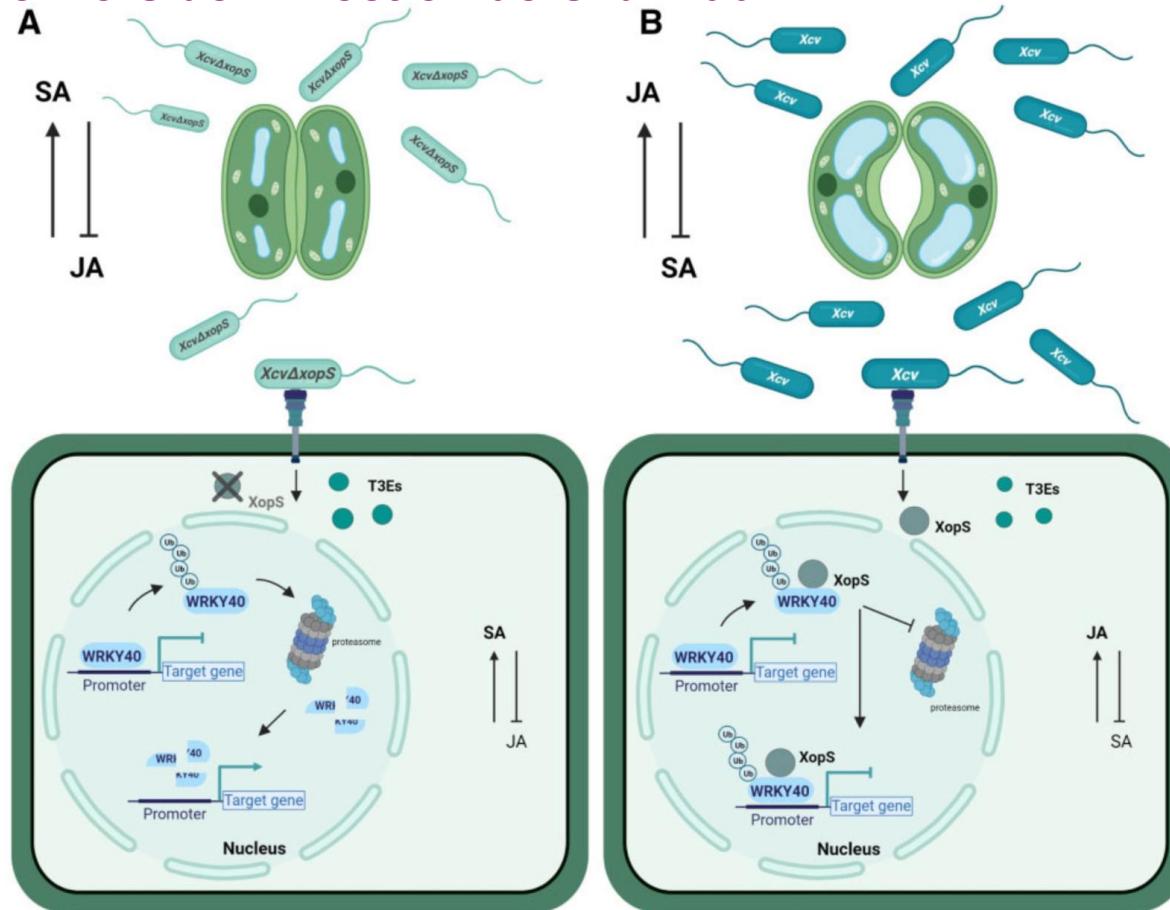


Figure 17 : Schéma bilan de l'infection de *C. annuum* par *Xcv*

Conclusion et perspectives

I - Conclusion

Concernant l'article

- Expériences et résultats complets
- Compliqué et long à comprendre
- IF = 35

Limites de l'article

- Technique Y2H

Conclusion et perspectives

II - Perspectives

Activité de XopS

- Mécanismes biologiques de l'inhibition de la dégradation ?
- Activité enzymatique de l'effecteur ?

Mécanisme de stabilisation de FT

- Utilisation par d'autres pathogènes ?

Y2H analysis

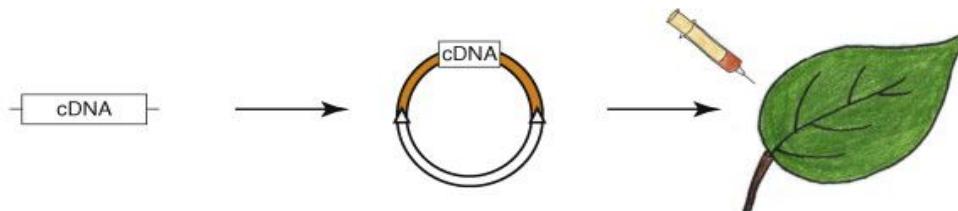
Y2H techniques were performed according to the yeast protocols handbook and the Matchmaker GAL4 Two-hybrid System 3 manual (both Clontech, Heidelberg, Germany) using the yeast reporter strains AH109 and Y187. To identify XopS interacting proteins, a GAL4 AD-domain tagged cDNA library from *N. tabacum* (Börnke, 2005) was screened as detailed in Üstün et al. (2013).

Yeast transactivation assay

WRKY proteins used for this experiment were fused into the pGBT9 vector (containing GAL4 DNA-BD) and transformed into yeast strain Y190. Transformed clones were selected on SCAD yeast growth medium (6.7 g/L yeast nitrogen base, 20 g/L glucose, 0.67 g/L amino acid mix, 200 mg/L adenine hemisulfate; pH 5.8) lacking Trp (-T) and growing cells were spotted onto selective medium lacking Trp and His (-TH), supplemented with 10 mM 3-amino-1,2,4-triazole. Three days later, *HIS3* reporter gene activity was monitored by the ability of transformed cells to grow on SCAD-TH plates. Additionally, cells growing on selective medium were further tested for their ability to induce the *lacZ* reporter gene using a filter lift assay. The empty pGBT9 vector was used as a negative control and the pGAL4 vector containing full length GAL4 was used as a positive control. Yeast cells were grown at 30°C.

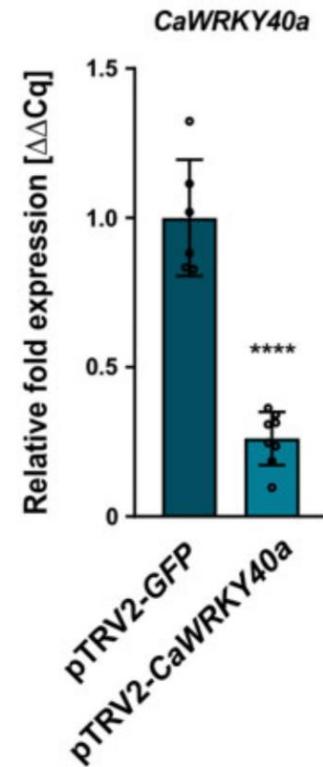
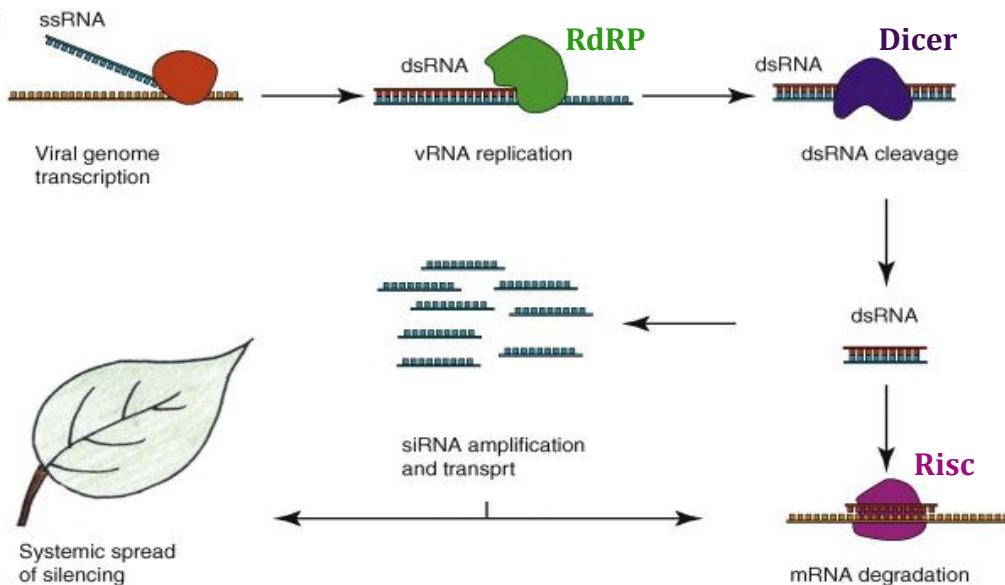
III- Détermination du rôle du FT WRKY40 dans l'interaction entre *Capsicum annuum* et Xcv :

(a)



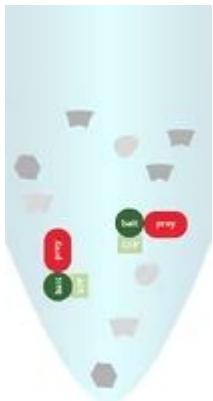
traitement : 5 mM SA pendant 4h

(b)



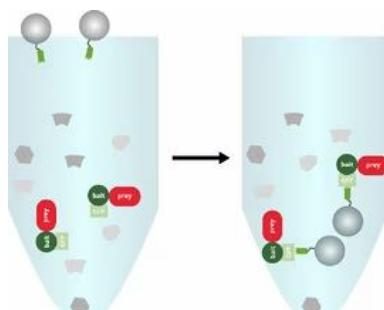
Mécanisme de silencing génique induit par un virus (VIGS)

1. Préparation du lysat cellulaire



2. Liaison de l'appât et de la proie par GFP-Trap®

GFP-Trap® est ajouté au lysat cellulaire et incubé 1 h à +4°C.



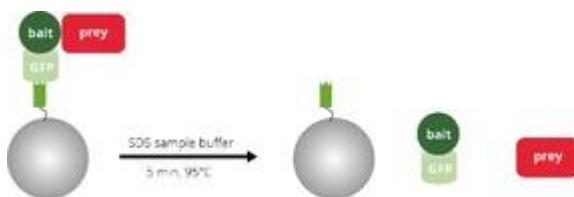
3. En éliminant les molécules non liées, les proies doivent rester liées à l'appât.

Les billes sont lavées plusieurs fois pour éliminer les molécules non liées tandis que la protéine proie doit rester liée à la protéine appât.



4. Élution des appâts et des proies liés aux perles

Les protéines d'appât et de proie sont libérées des billes à l'aide d'un tampon d'échantillon SDS ou d'un tampon d'élution acide.



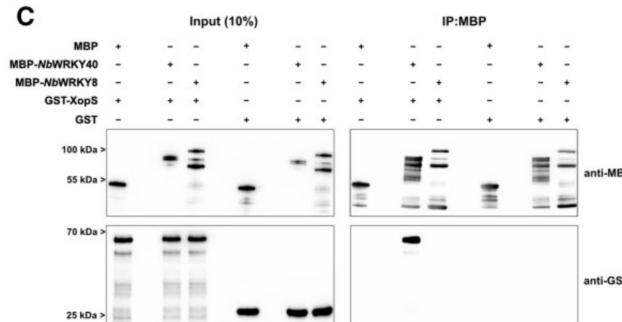
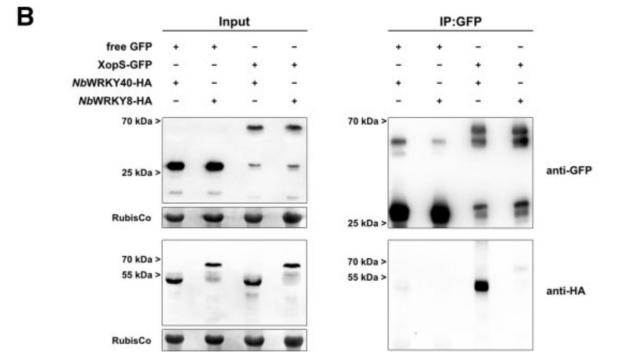
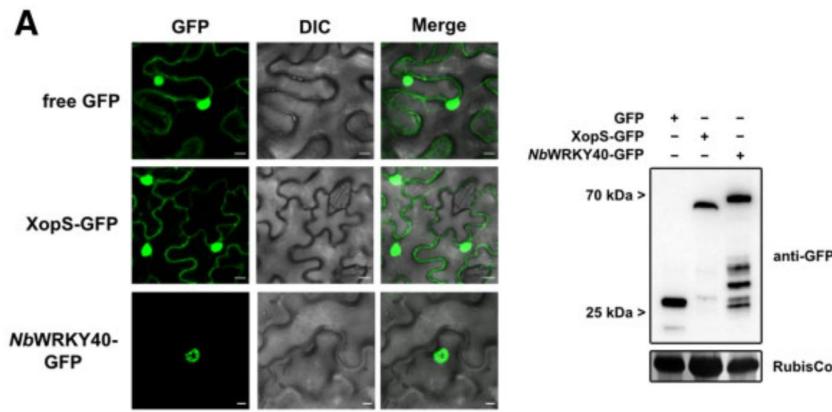
5. Analyse des appâts et des proies par SDS-PAGE, Western blot ou par spectrométrie de masse

L'éluat contenant les protéines d'appât et de proie est analysé par SDS-PAGE, Western blot (WB) ou spectrométrie de masse (MS).

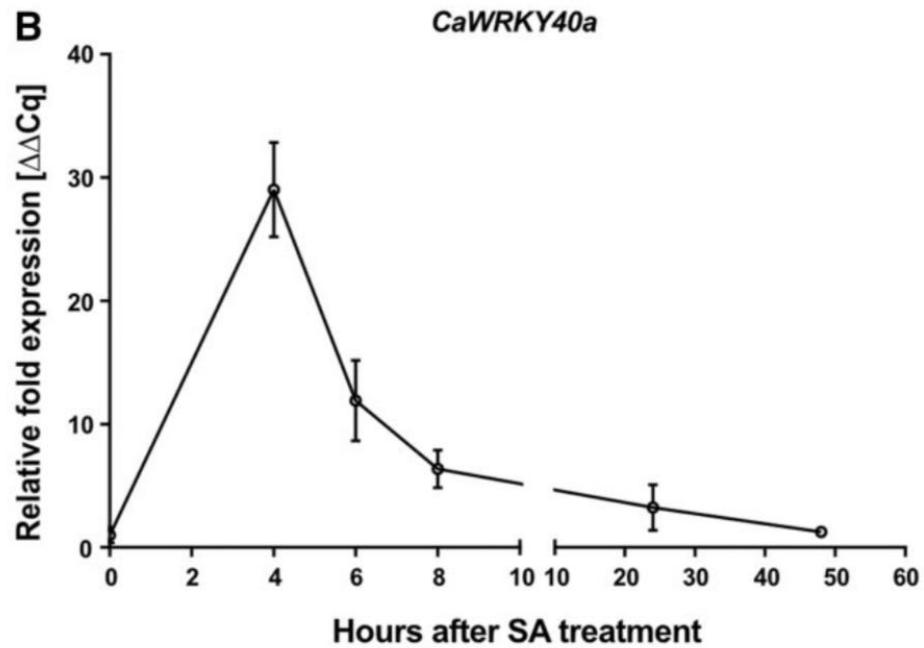
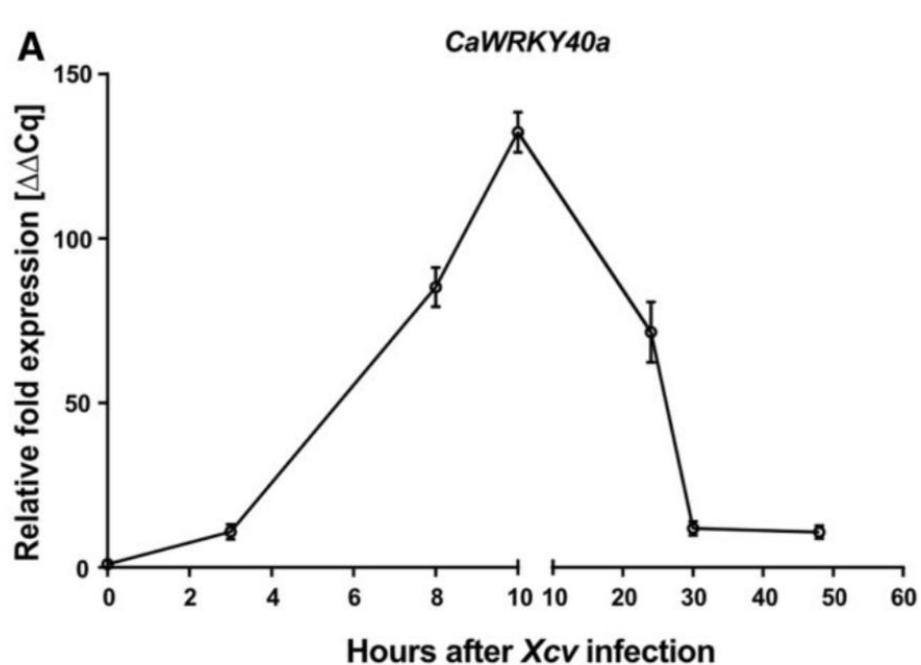


Analyse par transfert Western de Co-IP, sondée avec un anticorps anti-GFP (voie de gauche) et un anticorps anti-proie (voie de droite)

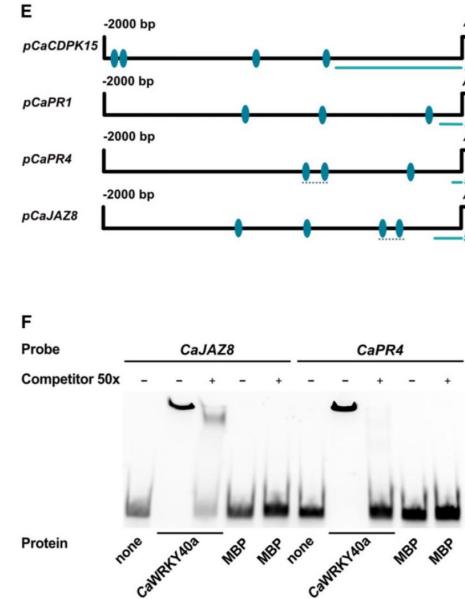
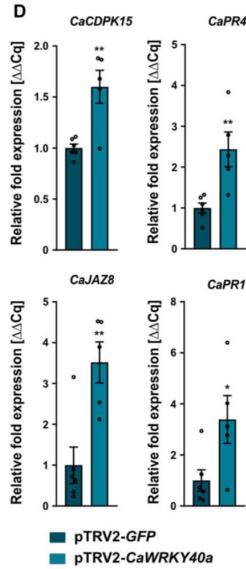
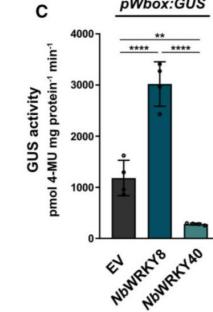
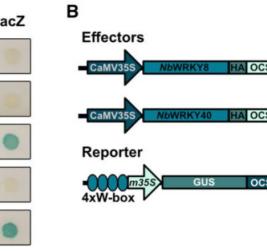
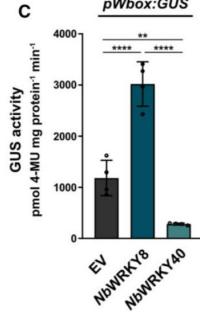
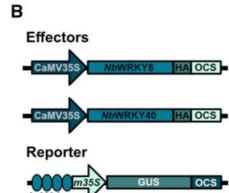
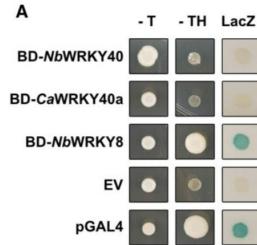
XopS interagit avec WRKY40 in planta



Augmentation transitoire de l'expression de WRKY40 chez *Capsicum annuum* lors de l'infection par Xcv



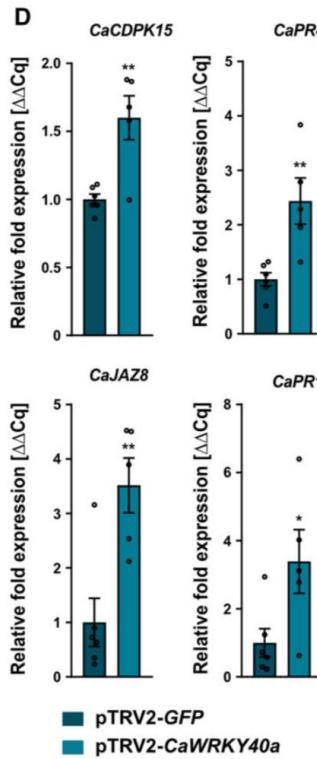
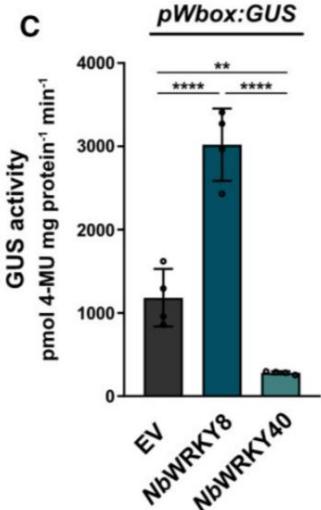
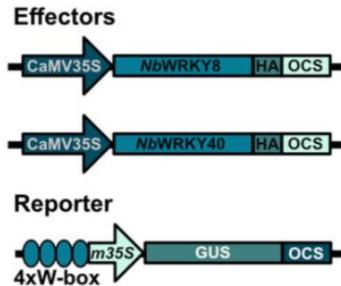
WRI défense



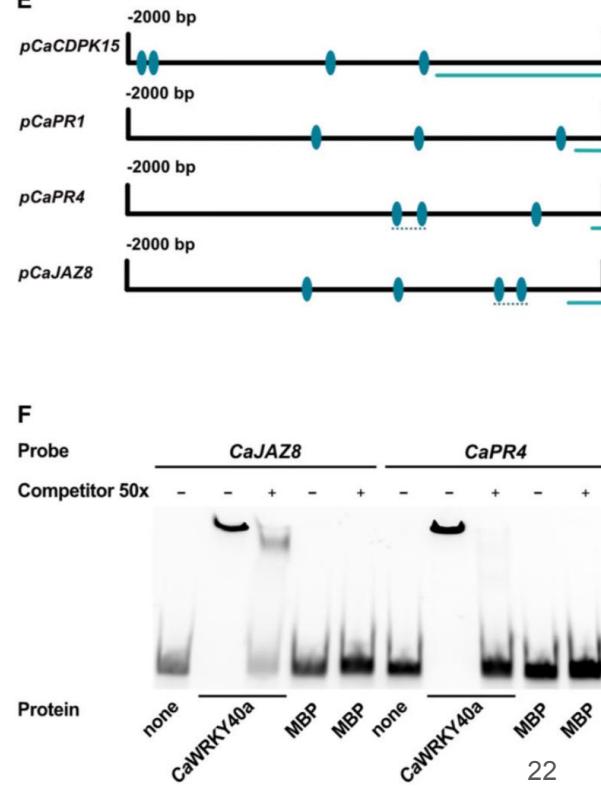
de

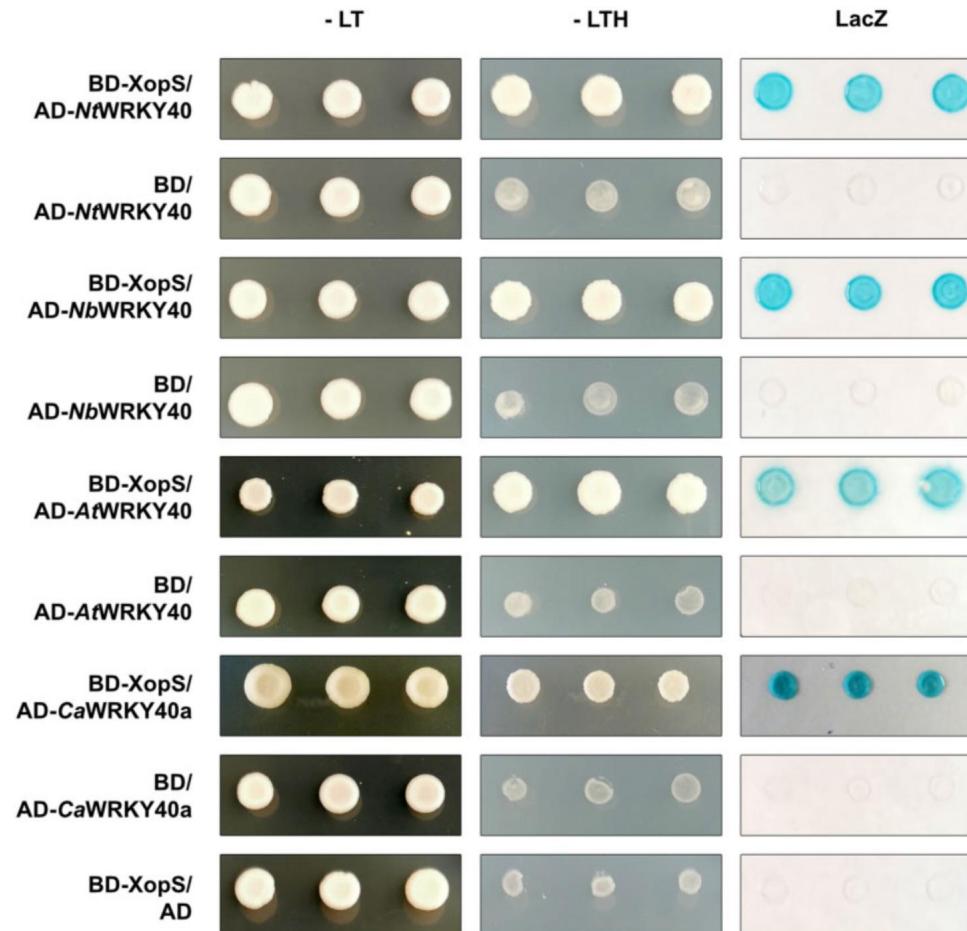
WRKY40 régule négativement l'expression des gènes de défense

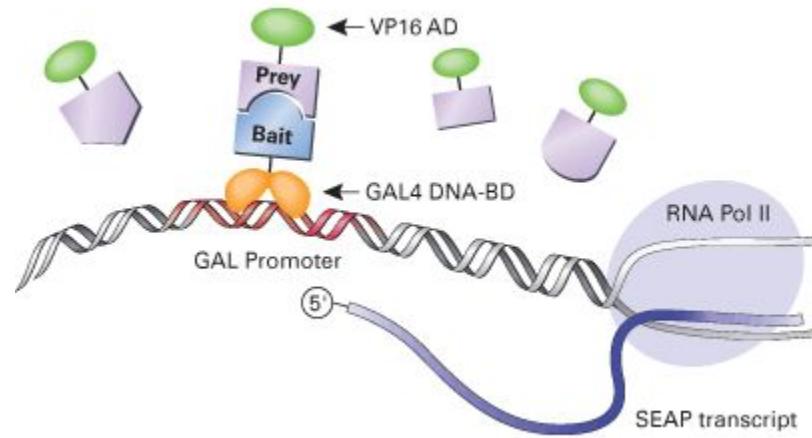
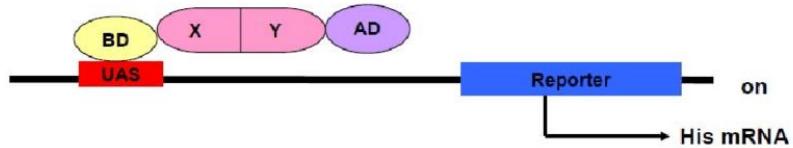
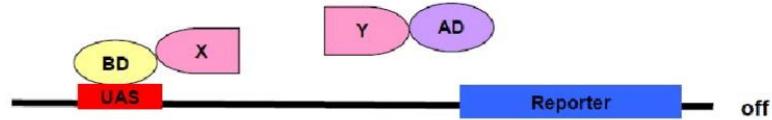
B



E







III - Détermination du rôle du FT WRKY40 dans l'interaction entre le poivron et Xcv

Nicotiana benthamiana

- transformé via *Agrobacterium* pour exprimer :

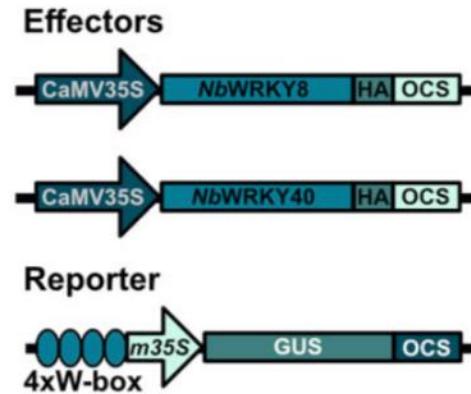


Figure 9 : Représentation des constructions effectrices et du rapporteur GUS utilisé dans le test d'expression transitoire de l'activité du promoteur entraînée par des boîtes W

m35S : promoteur CaMV35S minimal

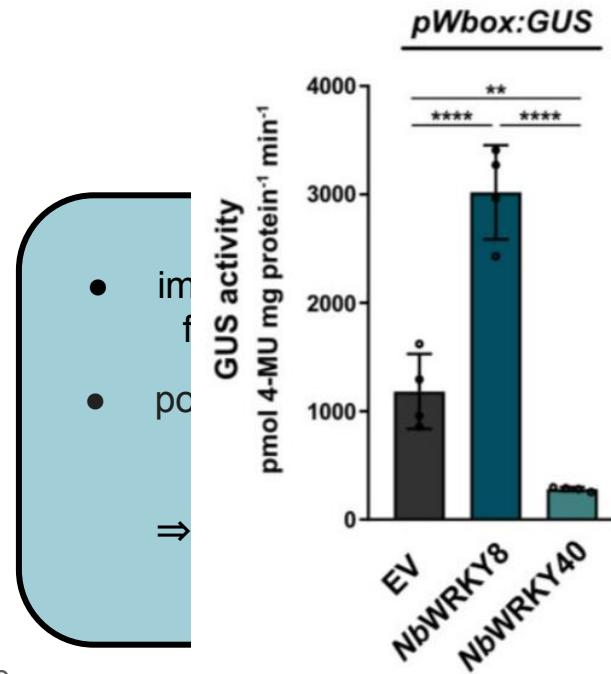


Figure 10 : Activité de la GUS déterminé 48 h après l'infiltration d'Agrobacterium
(pmol 4-Methylumbelliféron mg protéines⁻¹ min⁻¹)

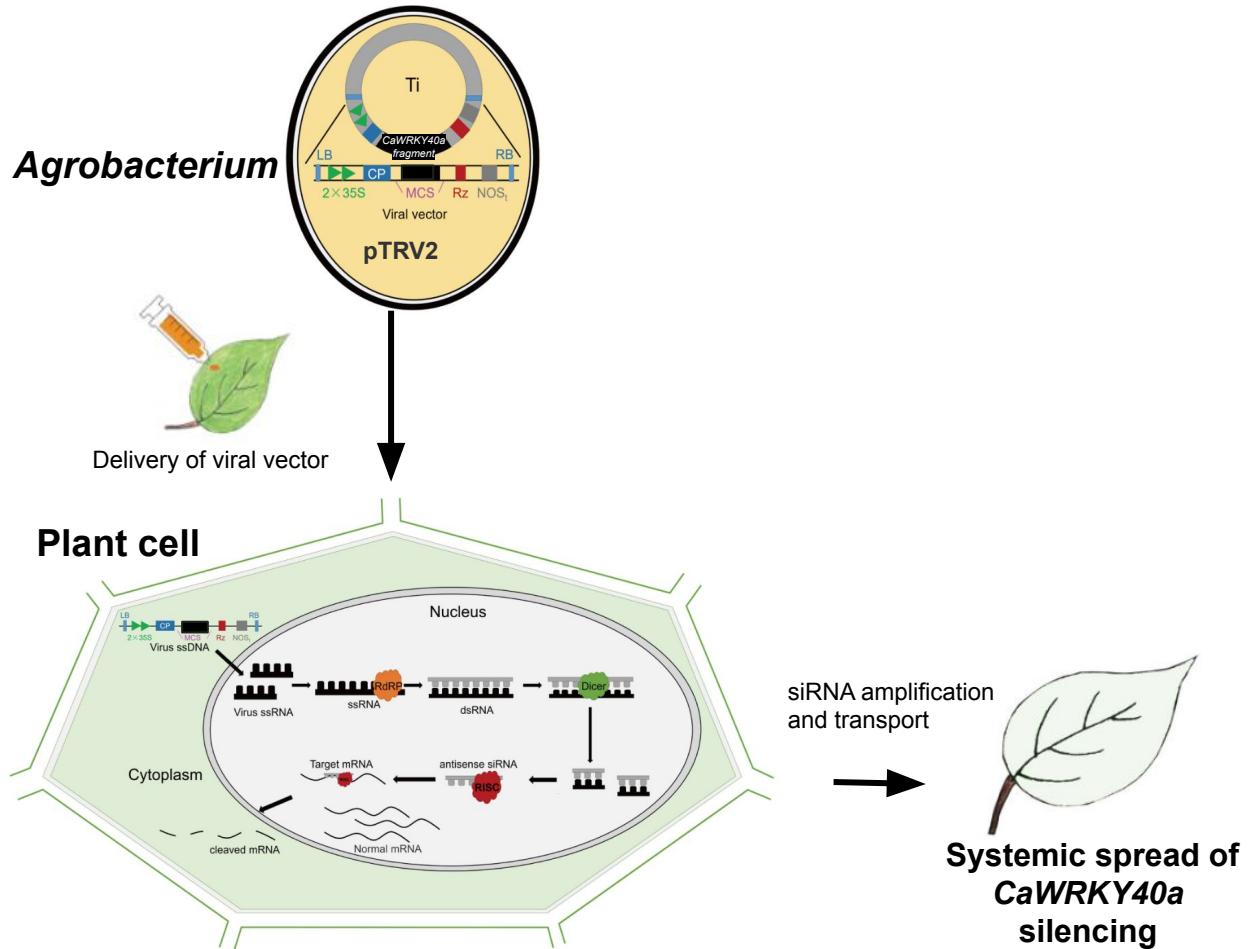
GUS : β -glucuronidase

EV : Vecteur vide

WRKY :
e signalisation
optiques)

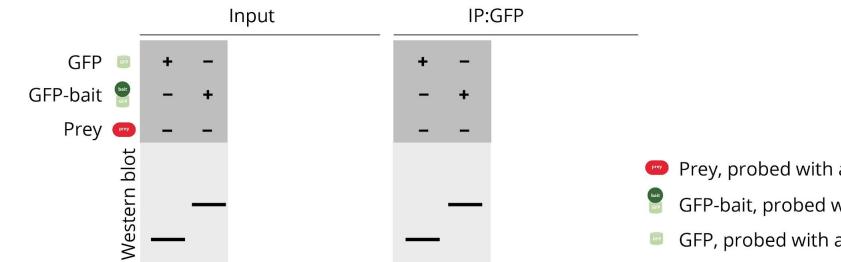
la boîte W
ènes cibles

NbWRKY40 joue un rôle de répresseur de l'activité génique



1. Contrôle positif

Le contrôle positif consiste en un pulldown de la protéine GFP-appât et de la protéine GFP en l'absence de la protéine proie. GFP-bait et GFP sont censés être trouvés dans les fractions d'entrée et liées (IP:GFP). Cette expérience est menée pour confirmer que l'immunoprécipitation de la protéine GFP-appât fonctionne dans les conditions choisies, ce qui est un prérequis à chaque Co-IP.



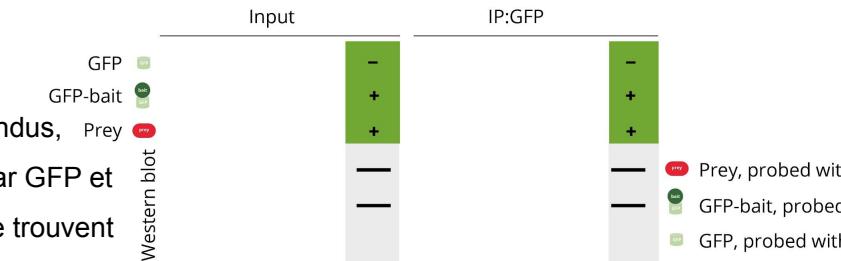
2. Contrôle négatif

Le contrôle négatif consiste en une extraction de la protéine proie en l'absence de protéine appât. Si la protéine d'appât contient une étiquette plus grande comme la GFP, un deuxième pulldown est souvent effectué avec la protéine de proie et l'étiquette uniquement. Les expériences de contrôle négatif doivent confirmer que la protéine de la proie n'est pas précipitée en l'absence d'appât GFP ou si seule la GFP est présente. La protéine proie est censée être présente dans la fraction d'entrée mais pas dans la fraction liée.



3. Expérience Co-IP

Si les expériences de contrôle positif et de contrôle négatif montrent les résultats attendus, l'expérience Co-IP finale peut être menée. Dans l'expérience finale, l'appât marqué par GFP et la protéine de proie sont incubés ensemble dans l'entrée. Si la proie et l'appât GFP se trouvent tous deux dans la fraction liée, on peut en conclure que la proie n'est précipitée que si la protéine de l'appât est présente. Cette expérience, ainsi que les contrôles positifs et négatifs, démontrent que les protéines des proies et des appâts interagissent les unes avec les autres.



Pour exclure la possibilité que des protéines végétales supplémentaires médient l'interaction entre XopS et WRKY40, nous avons effectué un test de traction in vitro en utilisant des protéines recombinantes. La protéine recombinante de liaison à la maltose (MBP) étiquetée *NbWRKY40* ou *NbWRKY8* liée à une matrice d'affinité MBP a été incubée avec soit la glu-tathion S-transférase (GST) marquée XopS, soit avec la TPS libre. Après le lavage, la formation du complexe protéique a été analysée par immunoblotting à l'aide d'anticorps anti-GST et anti-MBP. L'immunoblot a révélé que MBP-*NbWRKY40*, mais pas MBP-*NbWRKY8* ou MBP libre, a été en mesure de réduire GST-XopS, démontrant une interaction physique directe et spécifique entre XopS et sa protéine cible potentielle sans aucun facteur eu-caryote supplémentaire ([Figure 4C](#)).

XopS interfère avec les réponses de défense préin- vasives et post-invasives et qu'il représente un facteur de virulence majeur qui agit pour surmonter l'immunité stomatique chez les plants de poivre. XopS interagit avec le régulateur négatif de la transcription du gène de défense WRKY40, ce qui entraîne une atténuation de l'expression génique dépendante de la SA en faveur des réponses médiées par JA. La liaison XopS à WRKY40 stabilise le TF en inhibant sa dégradation protéasomateuse, perpétuant ainsi son activité répressive pour atténuer l'induction des gènes cibles WRKY40.

ouverture : facteurs de virulence sécrétés pour vaincre l'immunité stomatique, tels que les phytotoxines et les protéines effectrices sécrétées de type III (T3E) qui ouvrent le pore stomatique (Melotto et al., 2006; Gimenez- Ibanez et al., 2014; Hurley et al., 2014). L'exemple le mieux caractérisé de ces facteurs est la petite molécule de coronatine (COR) produite par Pst DC3000 pour rouvrir les stomates fermés

