


**Evolution expérimentale d'un pathogène vers un symbiote, de la  
microscopie champ large, confocale à l'analyse d'image en passant  
par la microscopie électronique.**

**Marta Marchetti**

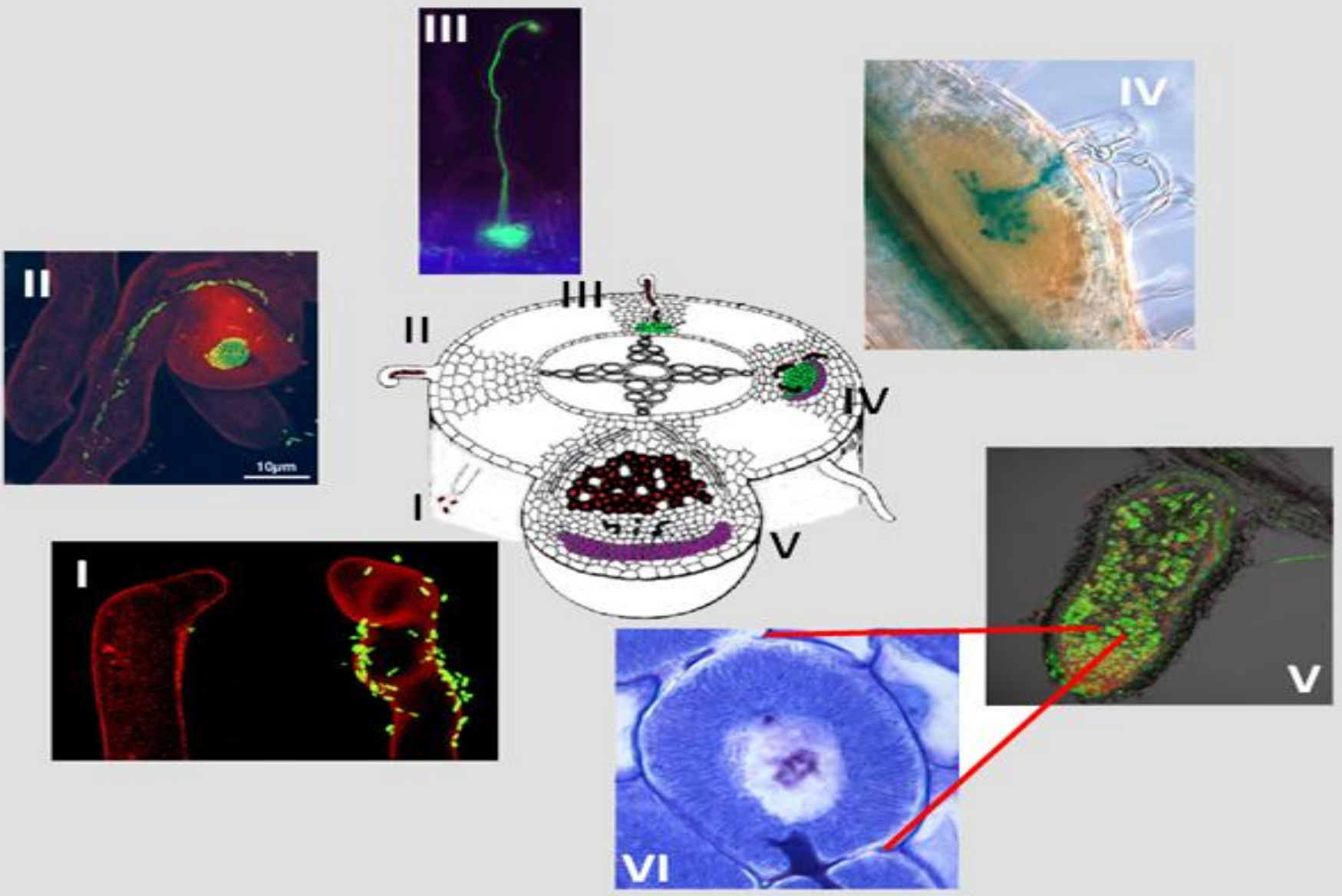
Groupe de Catherine Masson et Jacques Batut

**LIPM - Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes  
Chemin de Borde Rouge - 31320 Castanet Tolosan**

---

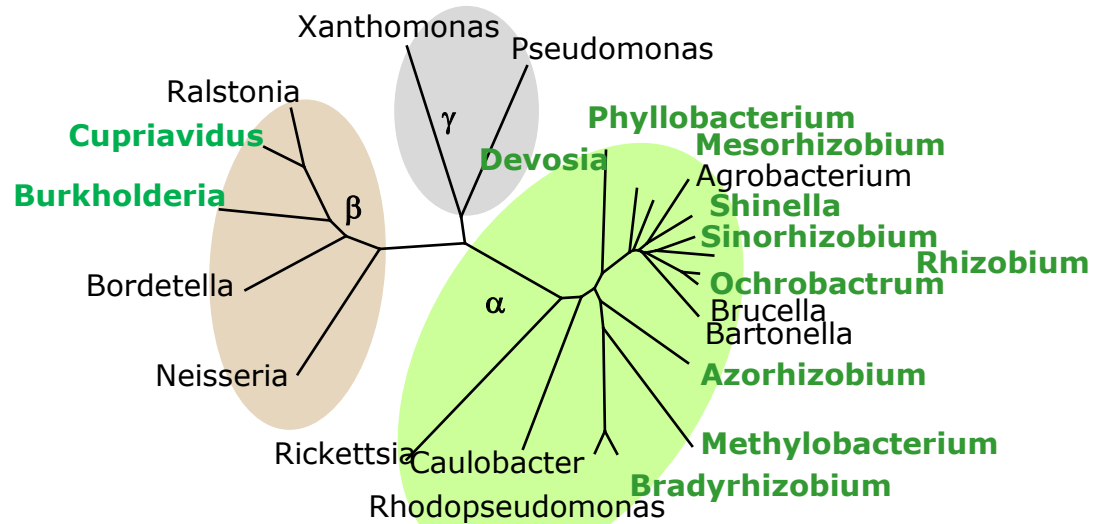
- **Contexte scientifique**
  - **L' hypothèse de travail**
  - **Le projet scientifique**
    - **La question scientifique**
  - **Méthodes & Résultats**
- 

# Le processus symbiotique

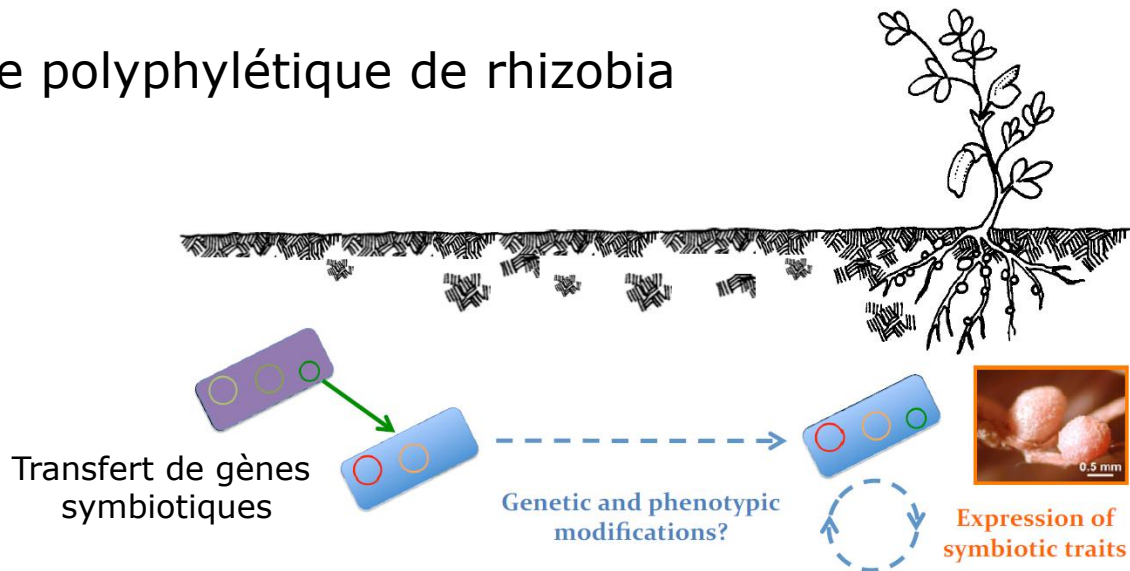


• L' hypothèse de travail

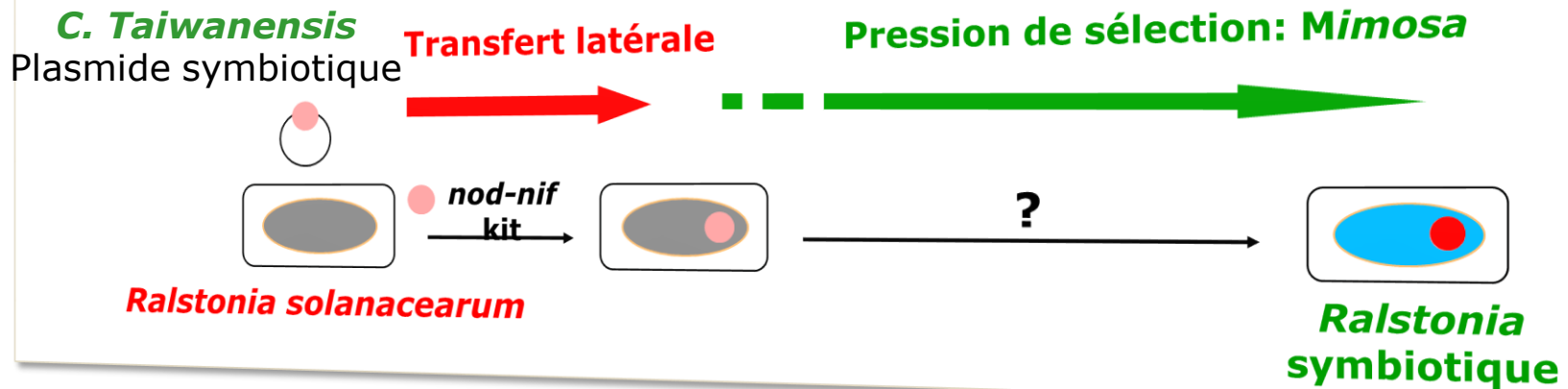
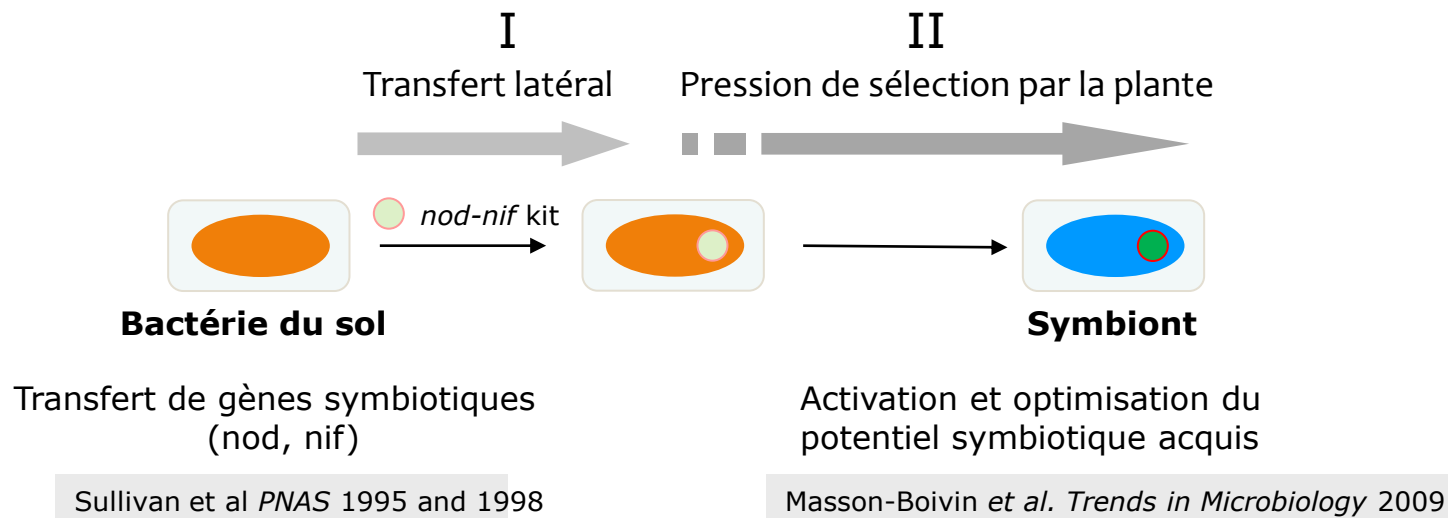
# Rhizobia, un modèle d' étude pour l' évolution du mutualisme



➔ Origine polyphylétique de rhizobia



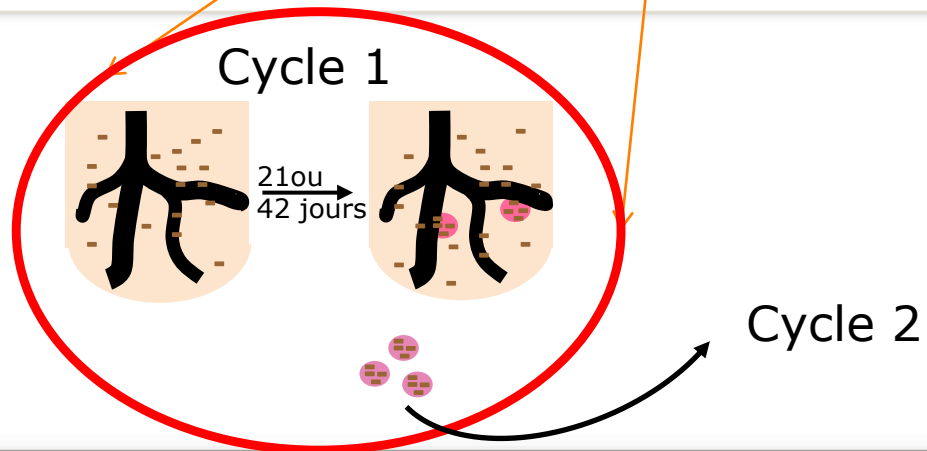
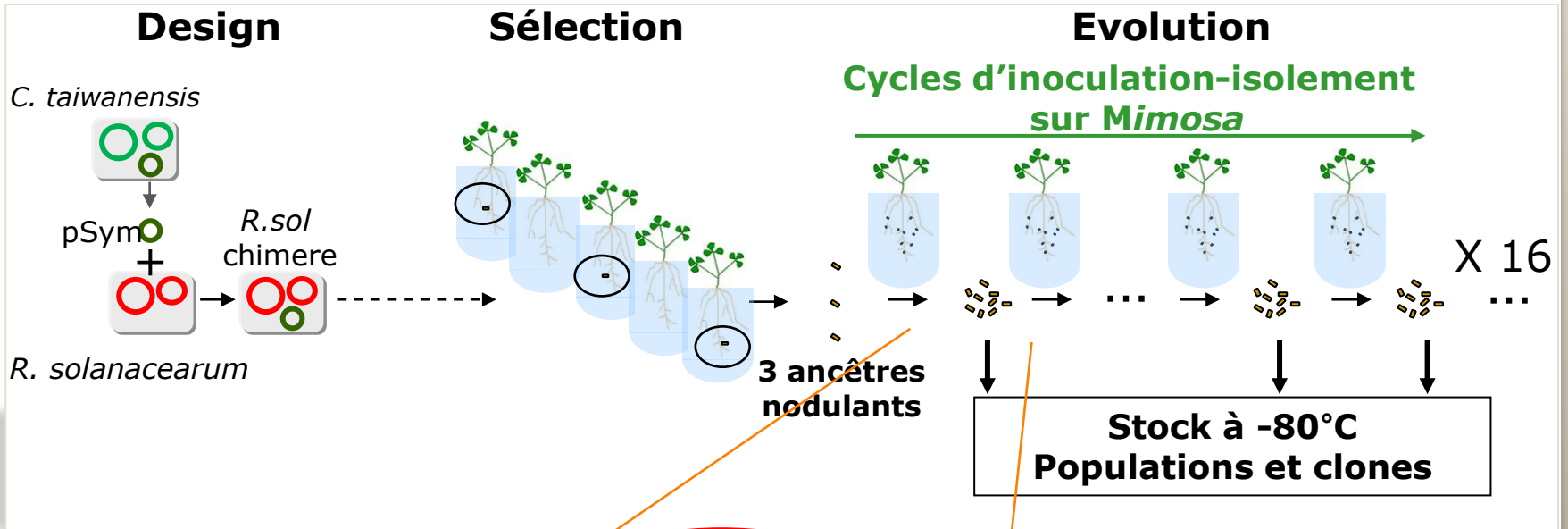
• L' hypothèse de travail • Le projet scientifique



Biologie synthétique:  
Transfert de gènes symbiotiques

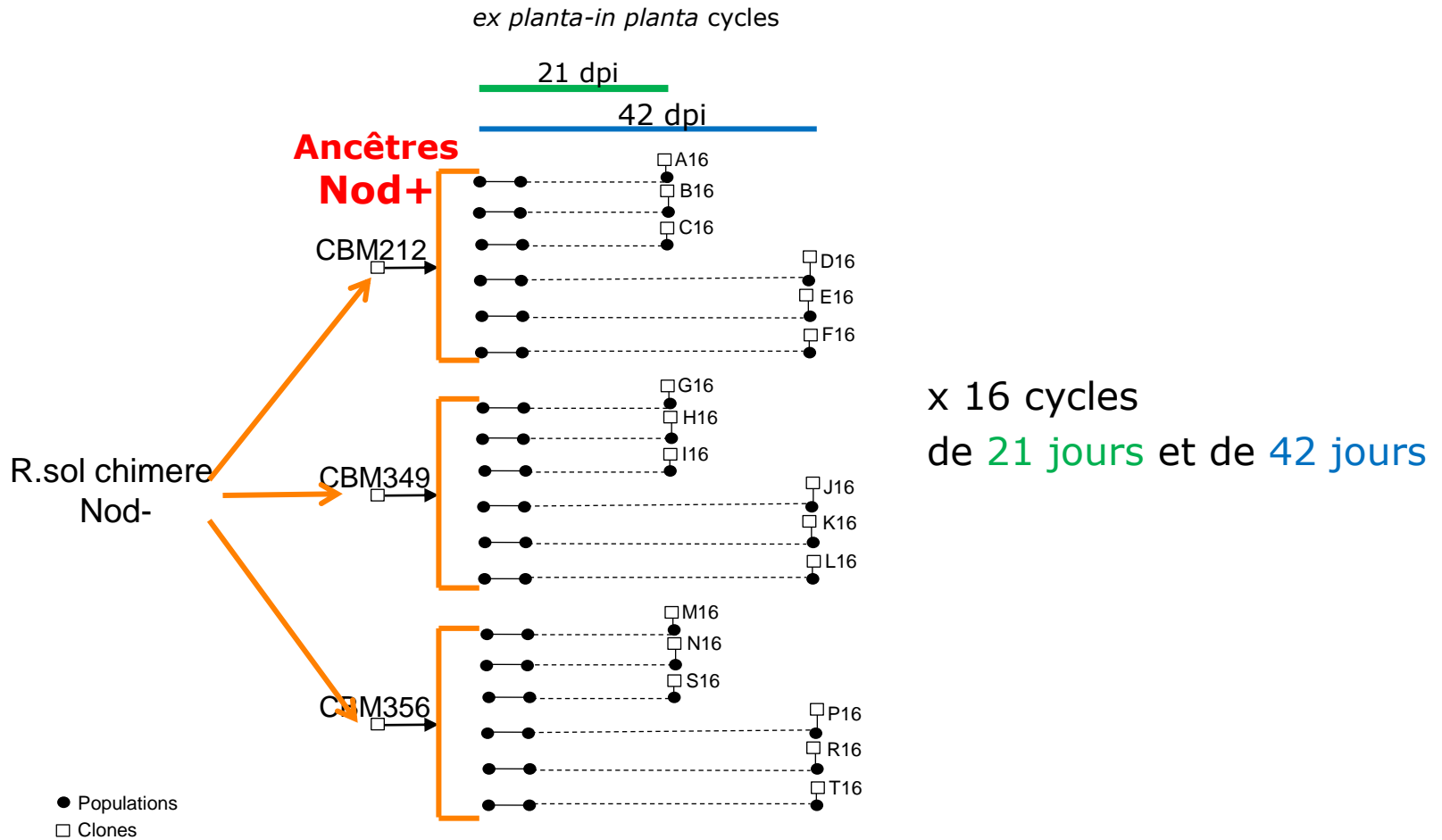
Evolution expérimentale:  
activation et optimisation  
du potentiel symbiotique

# Le projet d'évolution expérimentale



# • Le projet scientifique

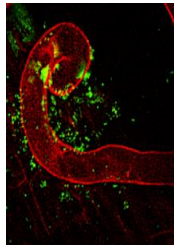
## Le projet d' évolution expérimentale



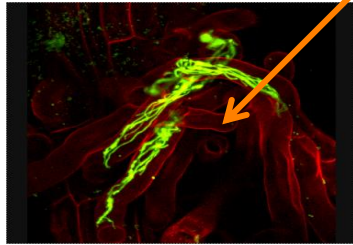
- ❑ Est-ce-qu' il y a eu évolution ?
- ❑ Quels sont les critères à analyser et comment les analyser...??

## Analyse du processus symbiotique

*C. taiwanensis* / *M. pudica*



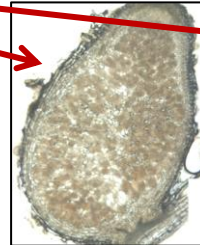
Formation du site d'infection



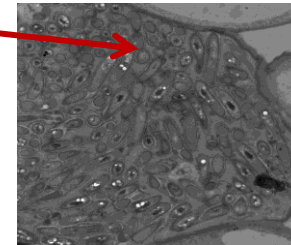
Cordon d'infection



Formation du nodule



Infection intracellulaire et différenciation en bactéroïdes



Cordon d'infection et formation du nodule

Infection intracellulaire du nodule

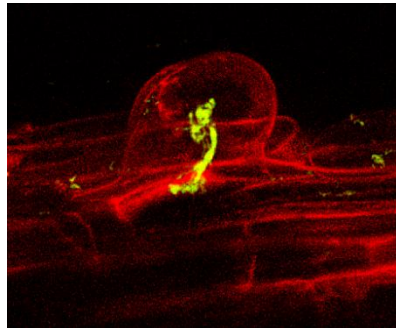




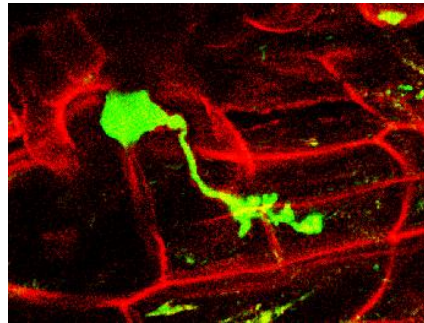
## Le processus infectieux de la chimère ancêtre

*R. solanacearum* chimère ancêtre

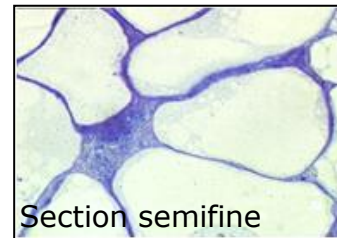
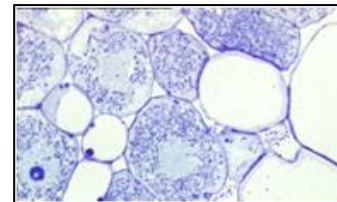
L'infection se réalise par le cordon d'infection



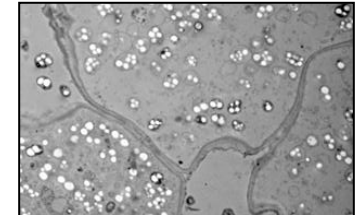
Microscopie confocale



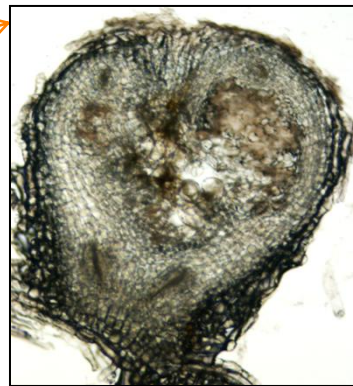
T. timmers



Section semifine



Micr. électronique



Zone de nécrose dans le nodule, l'infection est partielle, intra et extracellulaire, la persistance est réduite

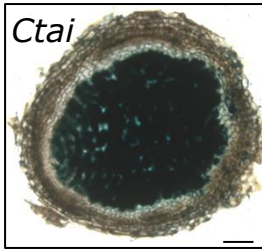
## Critères pour l'analyse du phénotype symbiotique

- ↗ Infection du nodule
- ↗ Nécrose dans le nodule
- ↗ Persistance

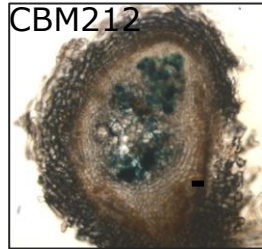
# Visualisation de l'infection par microscopie

*pnodB-GUS*

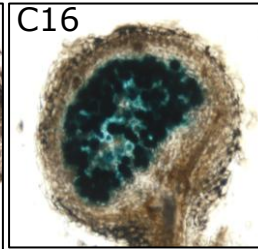
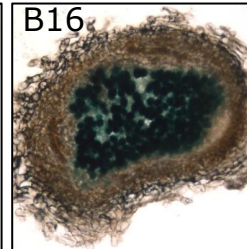
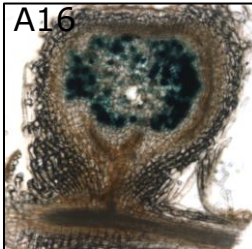
Référence



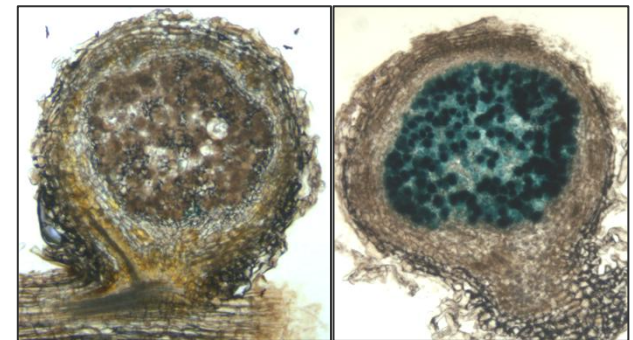
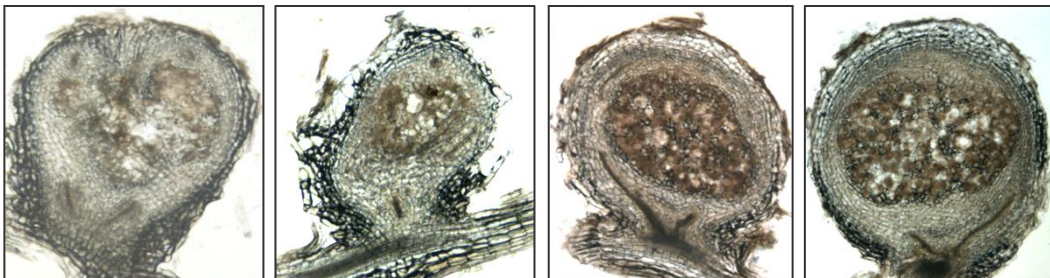
Ancêtres



Clones évolués finaux

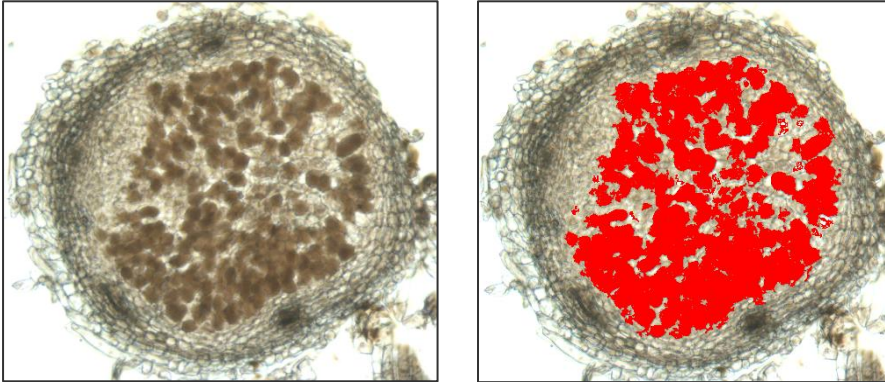


Question suivante : comment mieux apprécier cette amélioration??

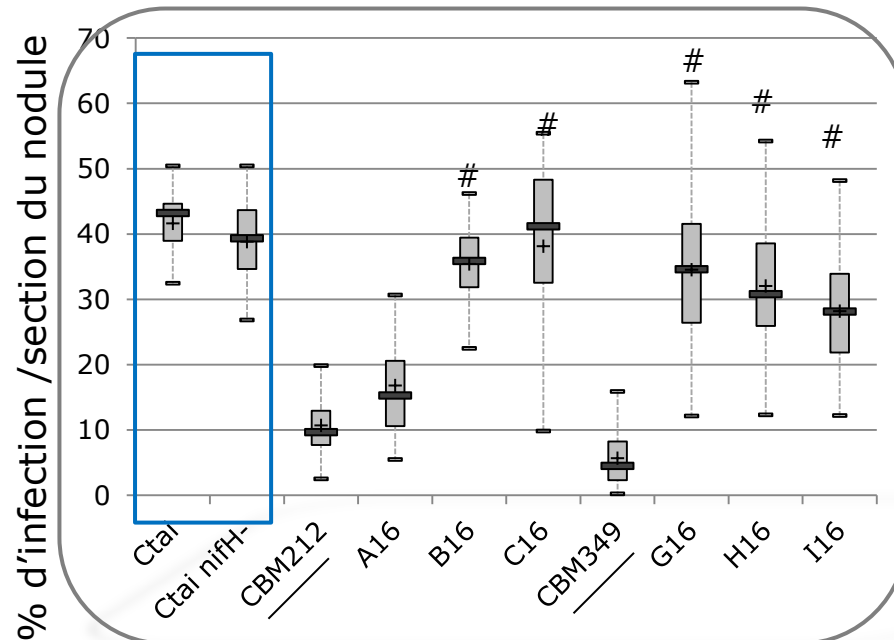


## Quantification de l'infection

Méthode HIS (Hue, Intensity, Saturation)



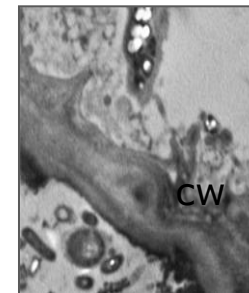
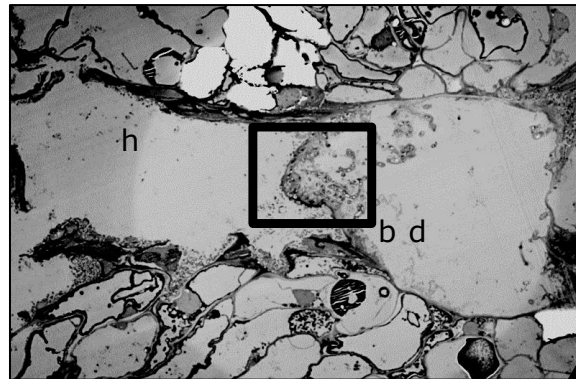
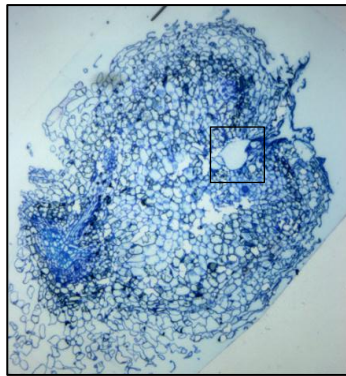
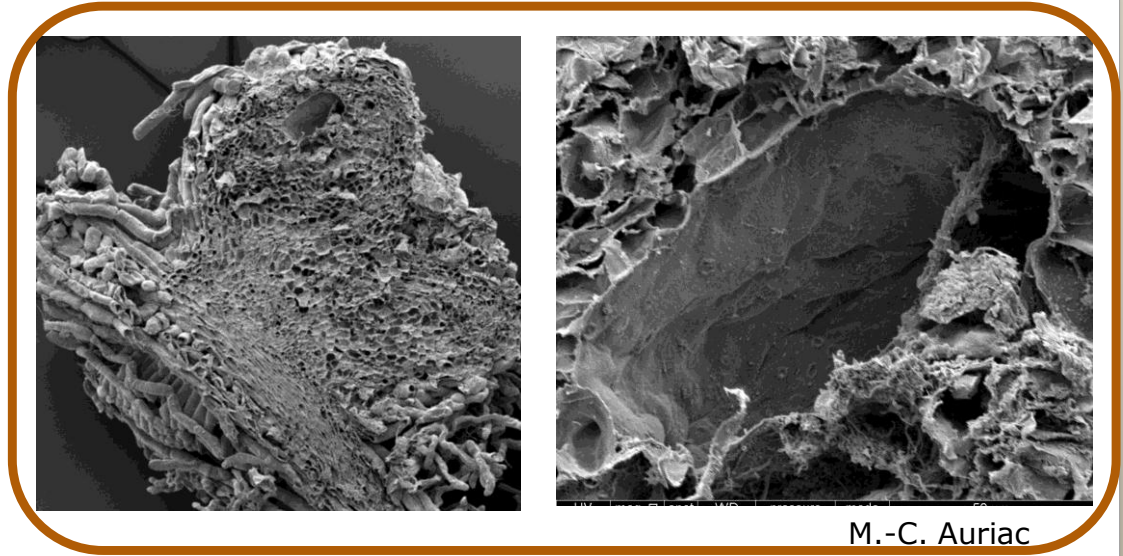
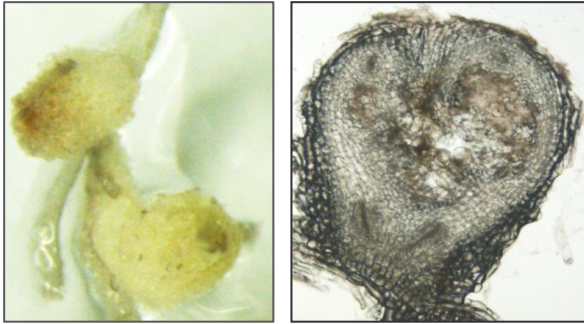
➔ Les clones évolués ont amélioré l'infection intracellulaire



(A. Jauneau, C.Briere)

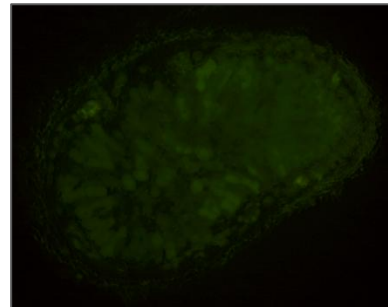
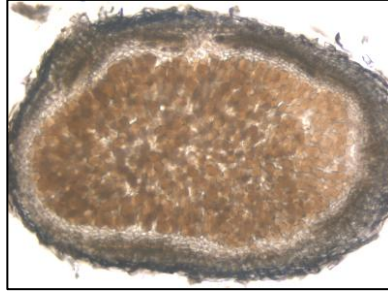
# La zone de nécrose dans le nodule

Ancêtre CBM212

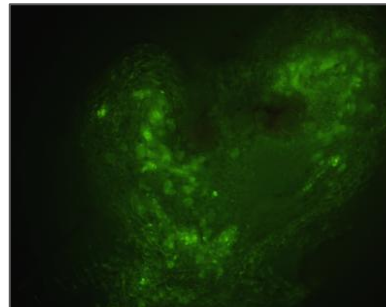
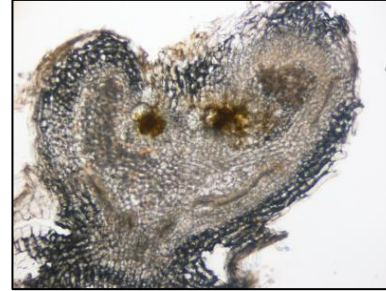


# La nécrose est associée aux réactions de défense

Symbionte *C. taiwanensis*



Ancêtre CBM212

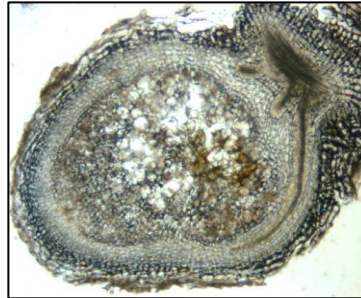


DCF probe

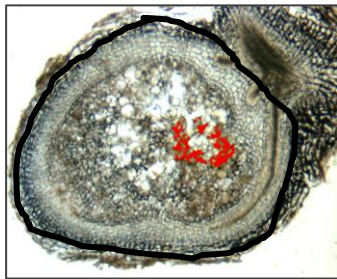
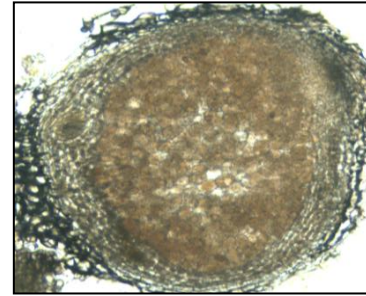
## Analyse de la nécrose dans le nodule

### Méthode (HIS)

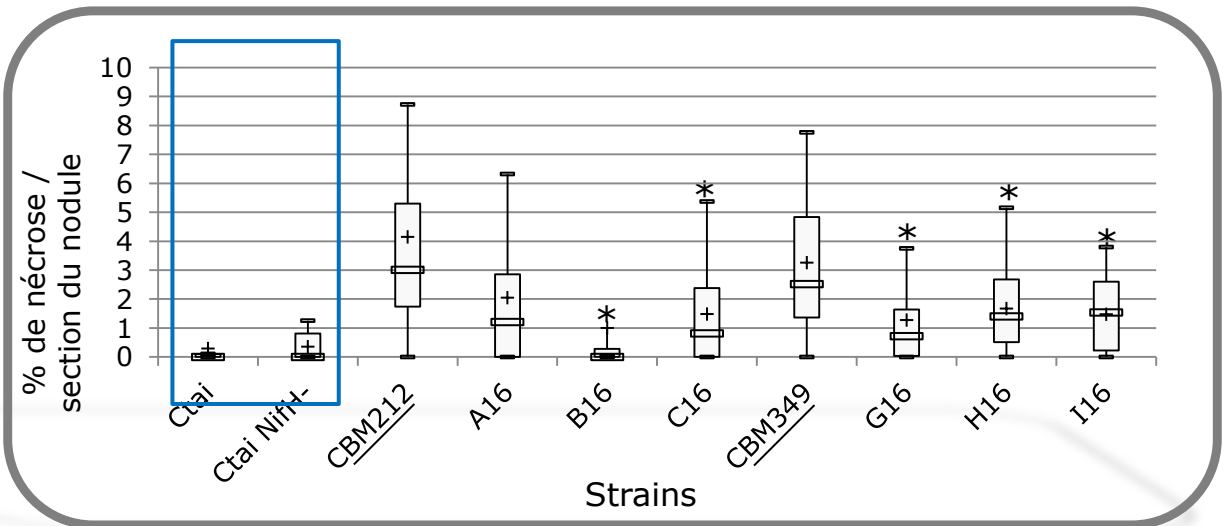
Ancêtre CBM212



Clone évolué B16



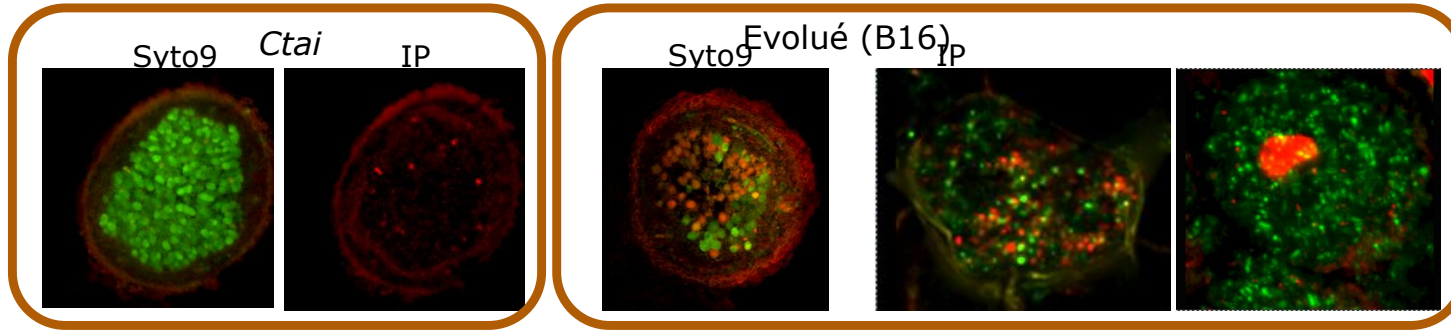
### Quantification de la nécrose



(A. Jauneau, C. Briere)

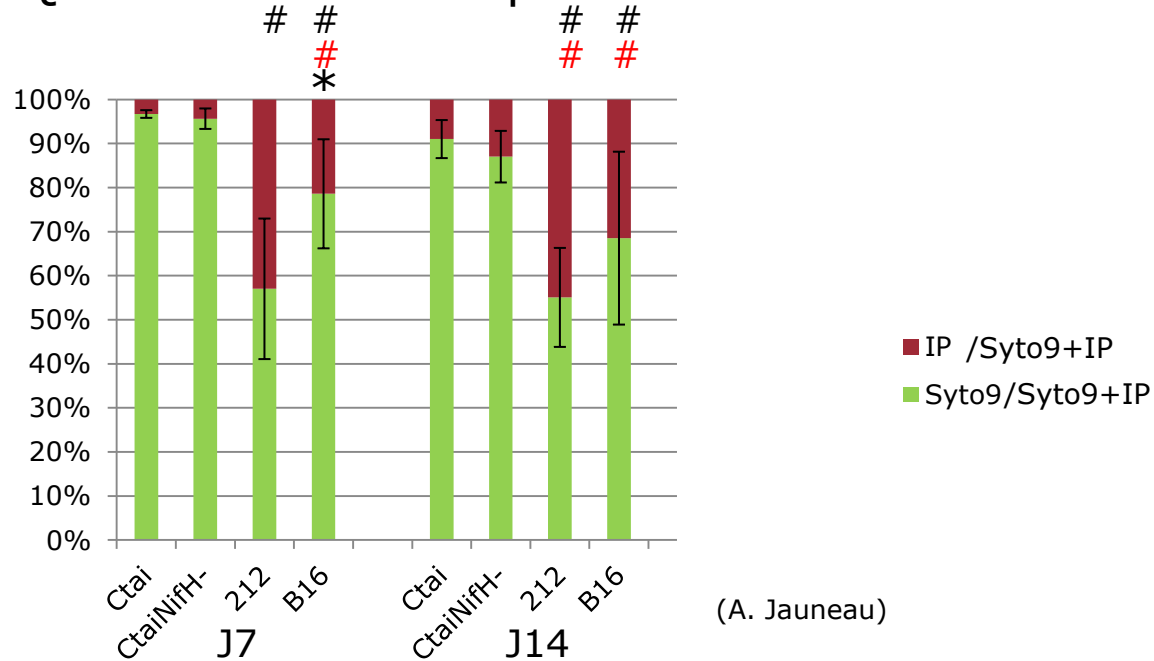
➔ Les clones évolués induisent moins de réactions de défense

# Analyse de la persistance



Syto9 =live bacteria  
IP=dead bacteria

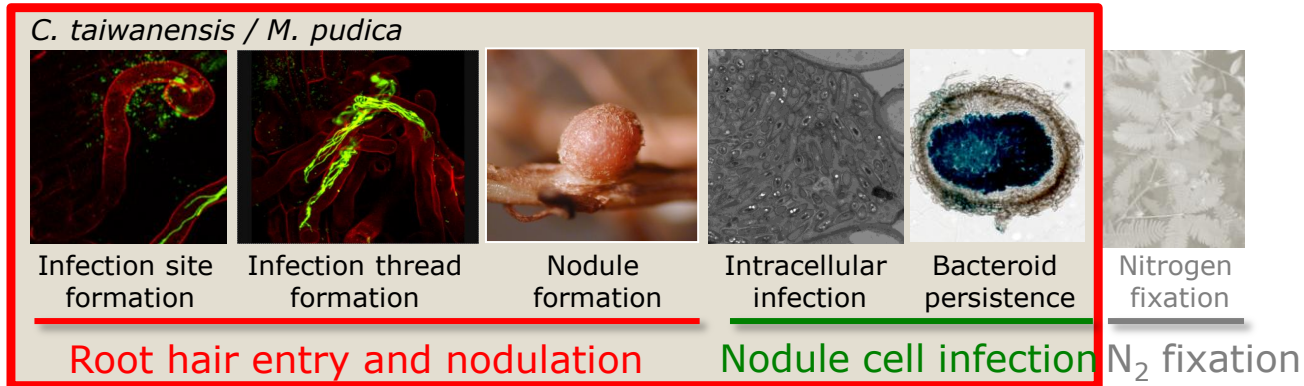
## Quantification de la persistance



(A. Jauneau)

➔ La persistance est améliorée après 16 cycles d'évolution





- Les différentes étapes de nodulation et infection ont été acquises et améliorées au cours de l'expérience d'évolution
- aucun des clones finaux est fixateur d'azote: manque de persistance (?)

Comment les clones ont évolué?

**Analyse de la dynamique de l'évolution**

# Analyse de la dynamique de l'évolution

Analyse phénotypique

↗ Infection intracellulaire

↗ Persistance

↘ Réactions de défense

**CBM212**

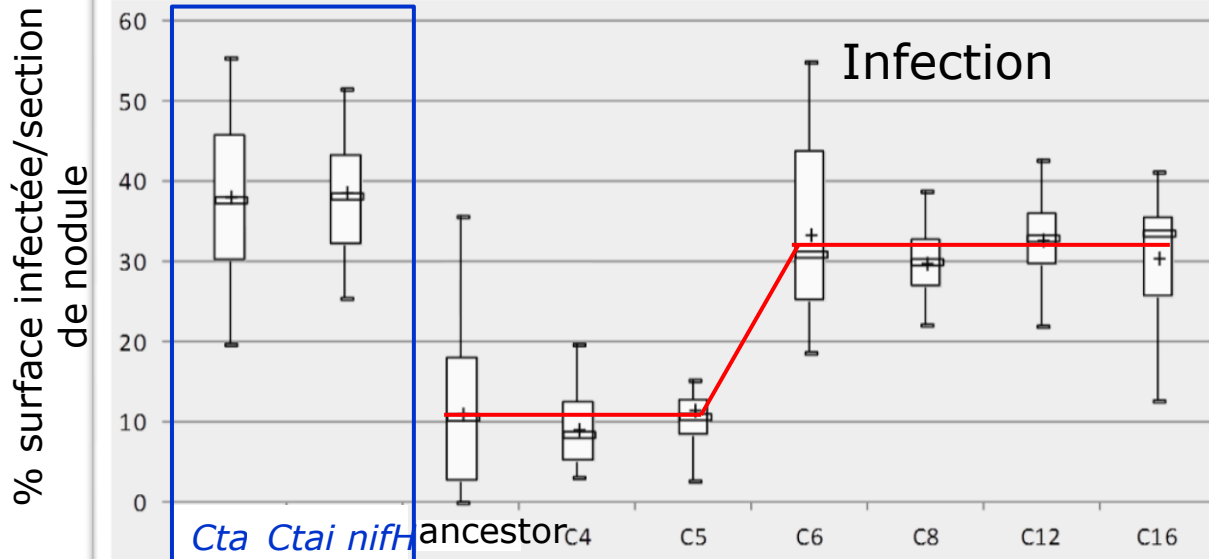
A1-A2-A3-A4-A5- A6-A7-A8-A9- A10-A12-A11-A12-A13-A14-A15 → **A16**

B1-B2-B3-B4-B5- B6-B7-B8-B9- B10-B12-B11-B12-B13-B14-B15 → **B16**

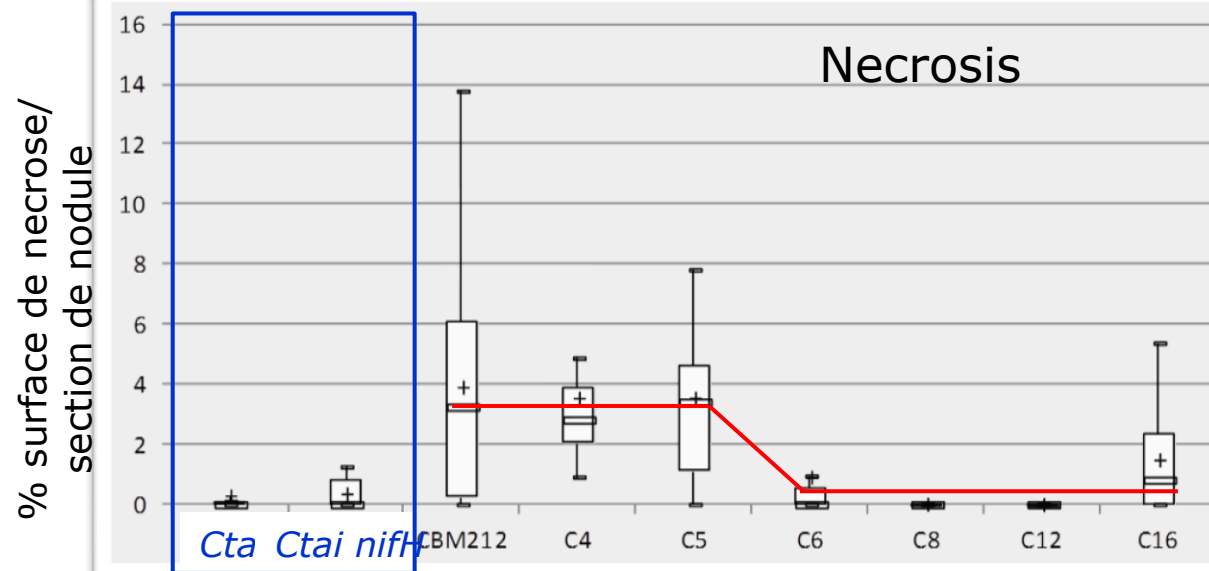
C1-C2-C3-C4-C5C6 -C7-C8- 9-C10-C12-C11-C12-C13-C14-C15 → **C16**

.....

# Analyse de la dynamique d'évolution



→ Identification de sauts majeurs d'amélioration de l'infection



→ ...et diminution simultanée de réactions de défense

## • L' hypothèse de travail

- ❑ L' évolution nécessite l' activation et l' optimisation du potentiel symbiotique

- ❖ Identification de mutations adaptatives pour l'infection intracellulaire
- ❖ Modification du système de régulation de *Ralstonia solanacearum* pour l' évolution en symbiote de légumineuse

## • La question scientifique

- ❑ Est-ce-que il y a eu évolution ?
  - ❖ L'infection intracellulaire a été rapidement acquise et fortement améliorée
  - ❖ L' amélioration de l'infection s'est réalisée par des sauts phénotypiques majeurs

## • Méthode & Résultats

- ❑ Quels sont les critères à analyser et comment les analyser...??
  - ❖ Approches de microscopie et d'analyse d'image

## Equipe

Catherine Masson-Boivin      Jacques Batut  
Delphine Capela  
Marta Marchetti  
Dorian Guetta  
Camille Clerissi  
Carine Gris

Michelle Glew, Lena Tasse, Suhua Guan, Philippe Remigi

## Collaborations



A. Jauneau  
C. Pouzet  
A. Leru  
Marie-Christine Auriac



O. Bouchez



E. Rocha

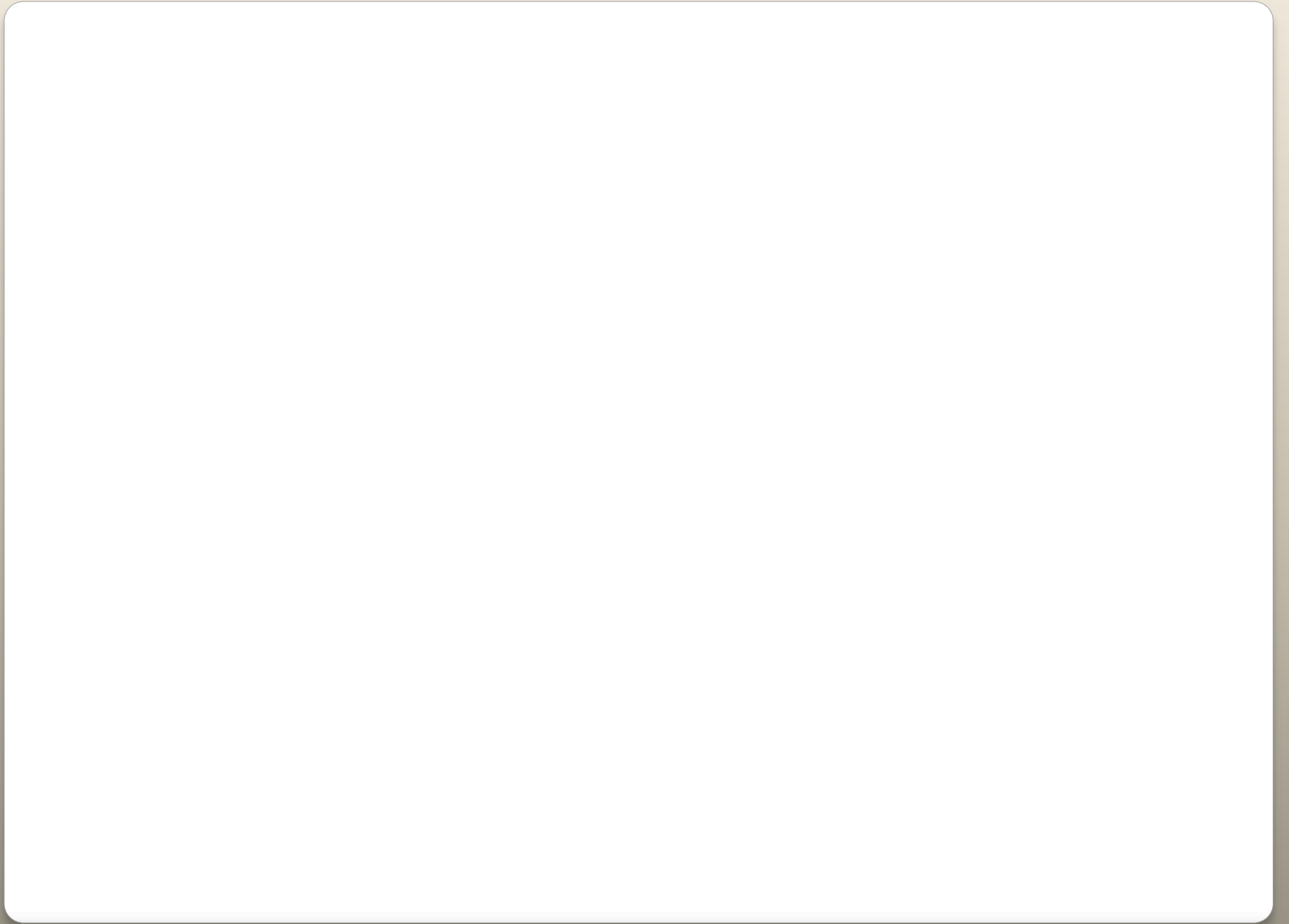


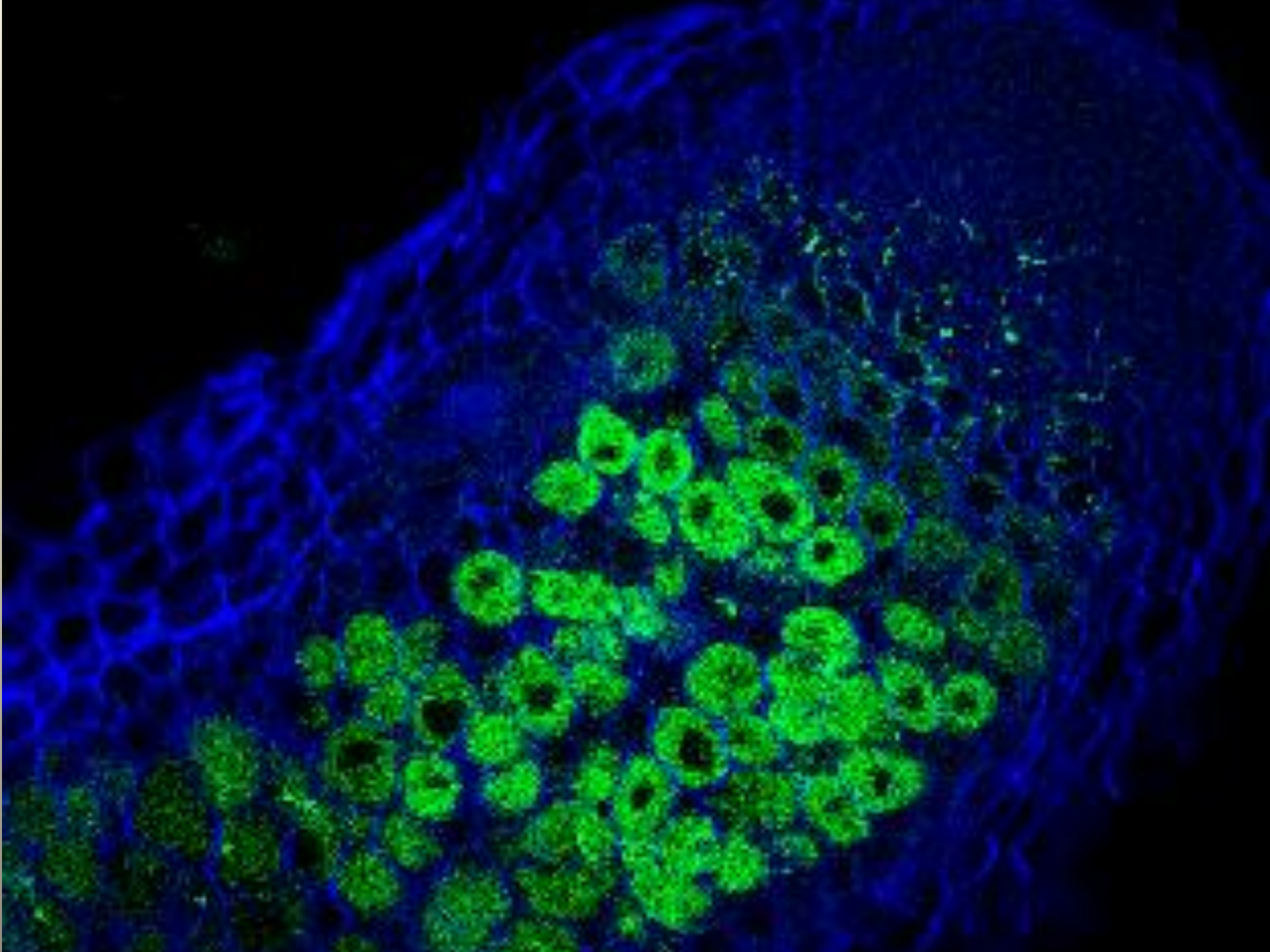
C. Médigue  
S. Cruveiller  
R. Torchet

## Funding



SYMPA 2009-2012  
SHAPE 2013-2016





## Equipe

Catherine Masson-Boivin      Jacques Batut  
Delphine Capela  
Marta Marchetti  
Dorian Guetta  
Camille Clerissi  
Carine Gris

Michelle Glew, Lena Tasse, Suhua Guan, Philippe Remigi

## Collaborations



A. Jauneau  
C. Pouzet  
A. Leru  
Marie-Christine Auriac



O. Bouchez



E. Rocha



C. Médigue  
S. Cruveiller  
R. Torchet

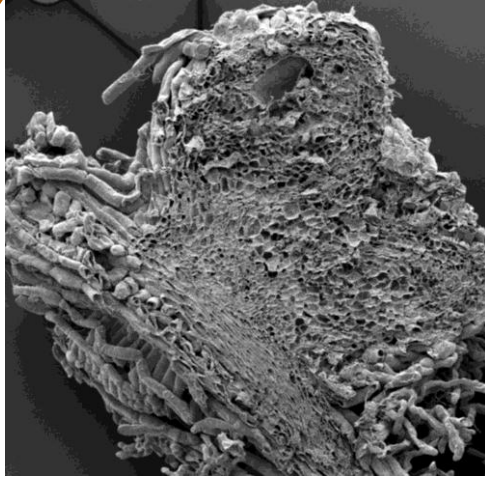
## Fundings



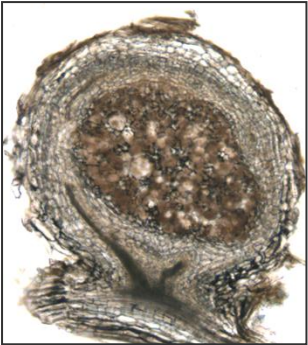
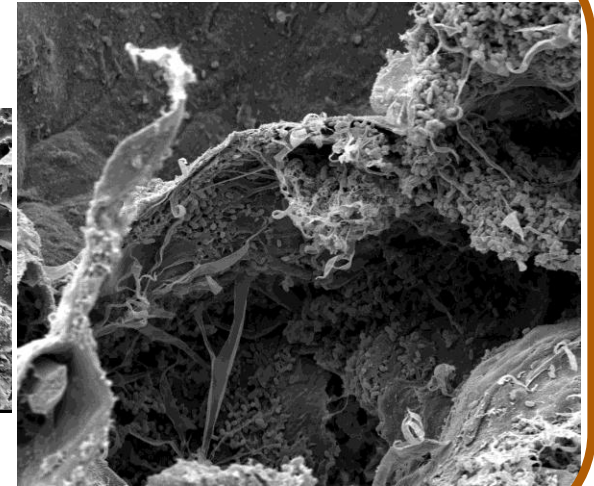
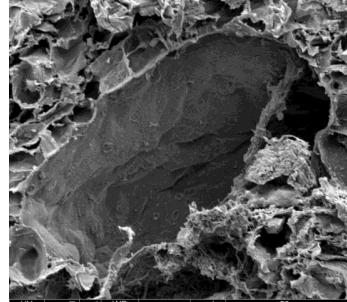
SYMPA 2009-2012  
SHAPE 2013-2016



## La zone de nécrose dans le nodule



Ancêtre  
CBM212



Clone évolué B16

