

Université Montpellier II

Habilitation à Diriger des Recherches

Diversité et Evolution des Bactéries
Symbiotiques Fixatrices d'azote

Gilles Béna

Soutenue le 5 décembre 2008 à l'Université Montpellier 2

Jury : Isabelle Olivieri, Professeur Université Montpellier 2, Présidente
Marcelle Holsters, Professeur Université Gand, Rapporteur
Eric Denamur, Professeur Université Paris 7, Rapporteur
Philippe Normand, Directeur de Recherche CNRS Lyon, Rapporteur
Thierry de Mêeus, Directeur de Recherche CNRS Montpellier, Examineur

Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes
UMR 113

Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire
Université Mohammed V, Rabat

CURRICULUM VITAE

Gilles Béna

Né le 21 novembre 1969

CURSUS

- 01/08/2008** **Affectation** Université Mohammed V, Rabat, Maroc
Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire.
- 01/01/2005** Avancement **CR1**
- 01/11/2000** Recrutement **IRD, CR2**, Montpellier
Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes., UMR113,
Montpellier
- 1999-2000** **Séjour post-doctoral.** University of York, UK
"Coevolution and geographic speciation in the *Sinorhizobium* / *Medicago rigidula sensu lato symbiosis*"
Equipe de Peter Young, Financement bourse Marie Curie de l'Union Européenne
- 1998-1999** Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche, Univ. Montpellier II.
Recherche : "Coévolution et évolution de spécificité symbiotique dans la symbiose azotée *Sinorhizobium-Medicago* : Approches phylogénétiques"
- 1995-1998** Doctorat de Ressources Génétiques et Amélioration des Plantes de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon, soutenu le 19 novembre 1998.
"De la reconstruction phylogénétique aux hypothèses évolutives: Une histoire du genre *Medicago L.*"
Direction: Pr. **I. Olivieri** (ISEM, Université Montpellier II) et Pr. **B. Lejeune**. (IBP, Université Paris-Sud 11).
- 1994-1995** Coopérant au Service National en Côte d'Ivoire (CIRAD-Forêt / IDEFOR).
Suivi, analyses statistiques et choix de sélection des essais descendances de différentes essences forestière.
- 1992-1993** DEA Ressources Génétiques et Amélioration des Plantes, INA-PG
"Etude de la structuration spatiale des phénotypes sexuels et des cytotypes dans deux populations d'une espèce gynodioïque, *Beta vulgaris* ssp. *maritima*"
Encadrement : Pr. J. Cuguen (Génétique et Evolution des Populations Végétales, Université Lille I).
- 1990-1993** Diplôme d'Ingénieur Agronome. Institut National Agronomique Paris-Grignon (INA-PG)

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

PUBLICATIONS DANS LES REVUES A COMITES DE LECTURE

Un ♣ indique un étudiant pour lequel je me suis directement impliqué dans l'encadrement, thèse ou maîtrise.

23 - ♣ Cécile Rangin, Brigitte Brunel, Jean-Claude Cleyet-Marel, Marie-Mathilde Perrineau, **Gilles Béna**. Effects of *Medicago truncatula* genetic diversity, rhizobial competition and strain effectiveness on the diversity of a natural *Sinorhizobium* spp. Community. Applied and Environmental Microbiology. Sous-presse.

22 - Yann Marcy, Pierre-Yves Cousin, Maxime Rattier, Gordana Cerovic, Guilhem Escalier, **Gilles Béna**, Maurice Guéron, Lorcan McDonagh, Françoise le Boulaire, Henri Bénisty, Claude Weisbuch, Jean-Christophe Avarre. An innovative integrated system for real-time measurement of hybridization and melting on standard format microarrays. BioTechniques. Sous-presse.

21 - Céline Contesto, Guilhem Desbrosses, Cécile Lefoulon, **Gilles Béna**, Florie Borel, Marc Galland, Lydia Gamet, Fabrice Varoquaux, Bruno Touraine. Effects of rhizobacterial ACC deaminase activity on *Arabidopsis* indicate that ethylene mediates local root responses to plant growth-promoting rhizobacteria. Plant Science. Sous-presse.

20 - ♣ Xavier Bailly, Isabelle Olivieri, Brigitte Brunel, Jean-Claude Cleyet-Marel, and **Gilles Béna**. 2007. Horizontal gene transfer and homologous recombination drive the evolution of the nitrogen-fixing symbionts of *Medicago* species. J. bact. J. 189: 5223-5236

19- Eric Giraud, Lionel Moulin, David Vallenet, Valérie Barbe, Eddie Cytryn, Jean-Christophe Avarre, Marianne Jaubert, Damien Simon, Fabienne Cartieaux, Yves Prin, **Gilles Béna**, Laure Hannibal, Joel Fardoux, Mila Kojadinovic, Laurie Vuillet, Aurélie Lajus, Stéphane Cruveiller, Zoe Rouy, Sophie Mangenot, Béatrice Segurens, Carole Dossat, William L. Franck, Woo-Suk Chang, Elizabeth Saunders, David Bruce, Paul Richardson, Philippe Normand, Bernard Dreyfus, David Pignol, Gary Stacey, David Emerich, André Verméglio, Claudine Médigue, Michael Sadowsky. 2007. A New Paradigm for legumes Symbioses: Absence of Nod Genes in Photosynthetic Bradyrhizobia. Science. 316: 1307-1312.

18 - ♣ Riviere T, Diedhiou AG, Diabate M, Senthilarasu G, Natarajan K, Verbeken A, Buyck B, Dreyfus B, **Béna G**, Ba AM. 2007. Genetic diversity of ectomycorrhizal Basidiomycetes from African and Indian tropical rain forests. 2007. *Mycorrhiza*. Vol 17 (5), 415-428.

17 – J.C. Avarre, P. de Lajudie and **G. Béna**. 2007 Hybridization of genomic DNA to microarrays: a challenge for the analysis of environmental samples. *J. Microb. Meth.* 69: 242-248

16 - Sophie Mantelin, Marion Fischer-Le Saux, Frédéric Zakhia, **Gilles Béna**, Sophie Bonneau, Habib Jeder, Philippe de Lajudie, and Jean-Claude Cleyet-Marel Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, Apr 2006; 56: 827 - 839.

- 15 - Merabet, C., Bekki, A., Benrabah, N., Baba-Hamed Bey, M., Bouchentouf, L., Ameziane, H., Rezki, M.A., Domergue, O., Cleyet-Marel, J.-C. Avarre, J.-C., **Béna, G.**, Bailly, X., and P. de Lajudie. Distribution of *Medicago* species and their microymbionts in a saline region of Algeria. *Arid Land Research and Management*. Vol. 20 No. 2, 2006.
- 14 - ✿ Xavier Bailly, Isabelle Olivieri, Stéphane De Mita, Jean-Claude Cleyet-Marel, and **Gilles Béna**. 2006. Recombination and selection shape the molecular diversity pattern of nitrogen-fixing *Sinorhizobium* sp. associated to *Medicago*. *Mol. Ecol.* Sep;15(10):2719-34
- 13 - ✿ Xavier Bailly, **Gilles Béna**, Vanina Lenief, Philippe de Lajudie and Jean-Christophe Avarre. Development of a lab-made microarray for analyzing the genetic diversity of nitrogen fixing symbionts *Sinorhizobium meliloti* and *Sinorhizobium medicae*. *J. Microb. Meth.* Volume 67, Issue 1, October 2006, Pages 114-124.
- 12 - R. Rasolomampianina, X. Bailly, R. Fetiarison, R. Rabevohitra, **G. Béna**, L. Ramarason, M. Raherimandimby, L. Moulin, P. De Lajudie, B. Dreyfus and J.-C. Avarre. 2005. Nitrogen-fixing nodules from rose wood legume trees (*Dalbergia* spp.) endemic to Madagascar host seven different genera belonging to α - \propto and Proteobacteria. *Mol. Ecol.* 14, 4135–4146
- 11 - **Béna G.**, ✿ Lyet A., Huguet T. et Olivieri I. 2005. *Medicago* - *Sinorhizobium* symbiotic specificity evolution and the geographic expansion of *Medicago*. *J. Evol. Biology.* 18 : 1547-1558.
- 10 - Tomasz Stepkowski, Krzysztof Brzeziński Andrzej, Legockia Mariusz Jaskólski and **Gilles Béna**. 2005. Bayesian phylogenetic analysis reveals two-domain topology of S-adenosylhomocysteine hydrolase protein sequences. *Mol. Phyl. Evol.* Jan;34(1):15-28.
- 09 - P. Jourand, E. Giraud, **G. Béna**, A. Sy, A. Willems, M. Gillis, B. Dreyfus and P. de Lajudie. 2004. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylophilic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* ; 54 (6) : 2269-2273
- 08 - ✿ Moulin L., **Béna G**, Boivin-Masson C. and Stepkowski T. Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Mol. Phyl. Evol.* 30 (2004) 720–732
- 07 - Ducouso M, **Béna G**, Bourgeois C, Buyck B, Eyssartier G, Vincelette M, Rabevohitra R, Randrihasipara L, Dreyfus B, Prin Y. 2004. The last common ancestor of Sarcocaulaceae and Asian dipterocarp trees was ectomycorrhizal before the India-Madagascar separation, about 88 million years ago. *Mol Ecol.* 3(1):231-6.
- 06 - Chen WM, ✿ Moulin L, Bontemps C, Vandamme P, **Béna G**, Boivin-Masson C. Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. *J Bacteriol.* 2003 85(24):7266-72.
- 05 - **Béna, G.** Molecular phylogeny supports the morphological based taxonomic transfer of the medicagoid? *Trigonella* species to the genus *Medicago* L. *Plant Syst. Evol.* 2001. 223:217-236.
- 04 - Laporte V, Viard F, **Béna G**, Valero M, Cuguen J. The spatial structure of sexual and cytonuclear polymorphism in the gynodioecious *Beta vulgaris* ssp. *maritima*: I/ at a local scale. *Genetics.* 2001. Apr;157(4):1699-710.

03 - Béna G, Lejeune B, Prosperi JM, Olivieri I. Molecular phylogenetic approach for studying life-history evolution: the ambiguous example of the genus *Medicago* L. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1998. 265(1401):1141-51.

02 - Béna G, Jubier MF, Olivieri I I, Lejeune B. Ribosomal External and Internal Transcribed Spacers: Combined Use in the Phylogenetic Analysis of *Medicago* (Leguminosae). *J Mol Evol.* 1998. 46(3):299-306.

01 - Béna G, Prosperi JM, Lejeune B, Olivieri I. Evolution of annual species of the genus *Medicago*: a molecular phylogenetic approach. *Mol Phyl. Evol.* 1998. 9(3):552-9.

Synthèse des Publications

Journal	Nombre	1 ^{er} auteur	Dernier auteur	Facteur d'impact 2006
Science	1			30
Molecular Ecology	3		1	4,8
Genetics	1			4,2
Applied and Environmental Microb.	1		1	4
Journal of Bacteriology	2		1	4
Proc. R Soc. Lond. B Biol. Sci.	1	1		3,6
Molecular Phylogenetics Evolution	3	1	1	3,5
Journal of Evolutionary Biology	1	1		3
Journal of Molecular Evolution	1	1		2,8
IJSEM	2			2,7
BioTechniques	1			2,5
Journal of Microbiological Methods	2		1	2,4
Mycorrhiza	1			1,8
Plant Science	1	1		1,6
Plant Systematic Evolution	1	1		1,24
Arid Land Research and Management	1			0,5

Manuscrits en préparation ou soumis:

* C. Rangin and **Béna G**. Legume-rhizobia sanctions: Universal or not? A (re)soumettre.

* Gueye F, Moulin L, Sylla S, Ndoye I, **Béna G**. Genotypic characterization of rhizobia nodulating *Zornia glochidiata* in Senegal by 16S-23S rRNA Intergenic Gene Spacer and Amplified Fragment Length Polymorphism. (in prep).

* A. G. Diédhiou, M-A. Selosse, M. Diabaté, B. Dreyfus, A. M. Bâ, S. M. de Faria, A. Galiana, and **G. Béna**. The patterns of ectomycorrhizal host specificity and ¹⁵N and ¹³C natural abundance of understorey and canopy trees in a tropical rain forest. A (re)soumettre.

Actes de colloques

*Bailly X., De Mita S., Olivieri I., Prosperi J.M. et **Béna G.** (2005) Diversité génétique et transferts horizontaux chez *Sinorhizobium* sp., partenaire symbiotique de *Medicago* sp. pp 321-333. in 5^e colloque national, un dialogue pour la diversité, Bureau des Ressources Génétiques.

*L. Moulin, W.M. Chen, **G. Béna**, B. Dreyfus and C. Boivin-Masson (2002). Rhizobia : the family is expanding, in Nitrogen Fixation: Global Perspectives. (eds. T.M. Finan, M.R.O'Brian, D.B. Layzell, J.K. Vessey and W. Newton), CABI Publishing.

Y. Prin, B. Dreyfus, C. Le Roux, **G. Béna**, M. Diabaté, P. de Lajudie, A. Bâ, S. M. de Faria, A. Munive and A. Galiana (2008). Nodulated tree legumes and their symbiotic *Bradyrhizobium* African and South-American tropical rainforests, In Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation through Sustainable Agriculture. (eds: FD Dakora, SBM Chimphango, AJ Valentine, C Elmerich, WE Newton), Springer.

Rapports Internes à vocation scientifique:

G. Béna et N. Rouyrre, 1995 : Génétique quantitative. Aspects généraux et application à l'amélioration des plantes. IDEFOR-DFO, CIRAD-Forêt.

G. Béna, 1995 : Initiation au logiciel SAS. Premières étapes de programmation, présentation des procédures majeures, commentaires des tableaux de résultats. IDEFOR-DFO, CIRAD-Forêt. 52p.

G. Béna et I. Béhaghel, 1994 : Essai comparatif de provenances *Cedrela odorata*, Séguié 1969. Analyses des inventaires 1983 et 1989. 24p

G. Béna, 1994 : Parcelles conservatoires de provenances de *Cedrela odorata*, Mopri 1983. Fichiers des arbres-plus sélectionnés et implantés dans le parc à clones de l'Anguédédou. 32p.

G. Béna, 1995 : Essai comparatif de provenances-descendances d'*Eucalyptus urophylla*, San Pedro, Côte d'Ivoire, 1974. Analyse des inventaires menés depuis la mise en place, évaluation des différentes provenances et synthèse générale de l'essai. Rapport commandité par la FAO. 81p.

G. Béna, 1995 : Essais comparatifs de descendances de *Tectona Grandis*, Téné, Côte d'Ivoire, 1991. Analyse des inventaires 1992 et 1994. Synthèse des essais 3 ans après leur implantation. 26p.

G. Béna, 1995 : Essai comparatif de provenances-descendances de *Terminalia superba*, Sangoué, 1982, Côte d'Ivoire. Bilan et perspectives après incendie. 17p.

G. Béna, 1995 : Essais comparatifs de provenances et de descendances de *Terminalia ivorensis*, Téné, 1988, Côte d'Ivoire. Analyse des inventaires 1994. Estimations de la variabilité génétique des provenances et des progrès attendus en sélection..38p.

G. Béna, 1995 : Tests clonaux de Samba (*Triplochiton scléroxyton*) Sangoué 1990, Mopri 1991, Côte d'Ivoire. Analyse des inventaires 1995 et perspectives. 30p.

ACTIVITES DE FORMATION

Encadrement d'étudiants en thèse :

Fatou Gueye : 2005-2008. Université Cheikh Anta Diop de Dakar.
DEA Biologie Végétale, UCAD

Encadrement effectif : 66%. Thèse en alternance entre Montpellier et Dakar. J'encadre l'étudiante lors de ses séjours sur Montpellier, c'est-à-dire 24 mois sur l'ensemble de la thèse. Co-encadrement avec Samba Sylla, Professeur à l'UCAD. Fatou devrait soutenir sa thèse fin 2008 à Dakar.

Cécile Rangin : 2005-2008 Université Montpellier 2
M2 RPI, UM2

Encadrement effectif : 100%.

Un article accepté, un article soumis. Cécile devrait soutenir sa thèse fin 2008.

Xavier Bailly : 2002-2006 Université Montpellier 2
DEA RPI, UM2

Encadrement effectif : 75%. Co-encadrement avec I. Olivieri.

2 articles en commun avec l'étudiant sur sa thèse.

Xavier est en post doc à l'Université de York (UK) depuis octobre 2006 et vient d'être recruté en tant qu'IR à l'INRA de Clermont Ferrand.

Je me suis également investi dans l'encadrement de plusieurs étudiants en thèse, à raison d'environ 25% du temps d'encadrement : **L. Moulin** (2 articles en commun avec l'étudiant sur sa thèse, aujourd'hui CR2 à l'IRD), **T. Rivière** (Un article est paru en coauteur avec l'étudiante, en CDD à Montpellier), **A. Diedhiou** (un article est paru en coauteur avec l'étudiant, un autre article devant être soumis avec l'étudiant en premier auteur et moi en dernier auteur, en post doc à l'INRA Nancy).

Encadrement d'étudiant de Master

Cécile Rangin M2 RPI 2004-2005. Cécile est maintenant en thèse avec moi.

Xavier Bailly DEA RPI 2001-2002. Xavier a soutenu sa thèse en 2006

Arnaud Lyet DEA BEE 1998-1999. Arnaud travaille pour l'association des Espaces Naturels de Provence

J'ai participé à deux jurys de thèse :

Sylvain Boudon, BGPI, Montpellier

Taiana Rivière, LSTM, Montpellier

Enseignements

Hormis les activités d'enseignement liées à mon poste d'ATER en 1998-1999 (60h eqTD) et des heures de vacances au cours de ma thèse (de l'ordre de 30h/an pendant 2 ans) qui m'ont amené à enseigner en TP de Biologie végétale, de Biologie cellulaire (Deug) ainsi que des TD de génétique formelle (Deug) et de génétique des populations (maîtrise), j'ai également eu une activité d'enseignement depuis mon recrutement.

J'ai ainsi pu intervenir dans le DEA RPI et le M2 DEPS (Entre 2 et 4 heures sur l'évolution de la symbiose fixatrice d'azote, et sur les approches phylogénétiques). Je donne tous les ans un cours d'une heure et demi aux élèves ingénieurs de seconde année de l'Agro Montpellier (Evolution des génomes). Je suis également ponctuellement intervenu en Licence ou en première année d'Agro.

Je suis membre du jury de DEA RPI - M2 DEPS depuis 2002, ainsi que régulièrement dans le jury de maîtrise/master 1.

J'ai participé au jury de l'école doctorale en 2004.

ANIMATION DE LA RECHERCHE

Evaluations pour les journaux:

Journal of Applied Ecology, Canadian Journal of Microbiology, Genetique-Sélection-Evolution, Systematic and Applied Microbiology, Australian Journal of Agricultural Research, FEMS Microbiology Ecology.

Evaluations de projets :

ANR (Blanc, JC), Ecos-Sud, BRG, Appel d'offre région Bourgogne, ACI microbiologie.

Responsabilité Institutionnelle et Scientifique

Je suis responsable depuis 2006 de l'équipe *Biodiversité et Evolution des Symbioses* au sein du LSTM. Cette équipe regroupe aujourd'hui 9 chercheurs et enseignants chercheurs, 2 ingénieurs, et une technicienne, ainsi que 3 étudiantes en thèse et une post doc. J'ai mis en « stand by » cette responsabilité depuis mon départ au Maroc, Lionel Moulin assurant maintenant la direction effective de l'équipe à Montpellier.

J'ai été membre élu puis nommé au conseil d'unité du laboratoire. J'ai été directeur adjoint du LSTM du 1^{er} janvier au 31 juillet 2008.

J'ai été membre du conseil scientifique du REID (Réseau Ecologie et Interactions Durables) entre 2002 et 2008.

J'ai été membre nommé du comité scientifique d'arbitrage du DSF (Département Soutien et Formation de l'IRD) entre 2003 et 2006.

Je suis membre du conseil scientifique des Rencontres Plantes-Bactéries d'Aussois depuis 2005.

Coordination de Projets :

Co-responsable du projet Ecofor « Impacts des variations géographiques et temporelles sur le fonctionnement des communautés symbiotiques associés à *Acacia mangium* : Diversité en zone d'origine, évolution et adaptation en zone d'introduction ». (Co-responsable : Y. Prin, CIRAD, 2006-2009).

Responsable et coordinateur d'un financement ANR jeune chercheur « *Bradyrhizobium*, *Oryza* et *Aeschynomene* : Diversité, écologie et adaptation d'une relation tripartite » (2005-2008).

Coordinateur du Work Package 6 du projet européen Bacdivers « Developing a genomic toolbox for exploring and exploiting bacterial biodiversity ». (2002-2005, Porteur : M. Gilis, Université de Gand).

Co-responsable du projet BRG « Organisation spatiale fine de la diversité génétique des bactéries fixatrices d'azote associées à *Medicago* (*Sinorhizobium* sp.), selon le type de marqueurs, le type de piégeage, et en relation avec la structuration génétique de la diversité de la plante hôte *Medicago truncatula*. » (Co-responsable I. Olivieri, 2003-2005).

DOCUMENT DE SYNTHÈSE

**Diversité et Evolution des Bactéries
Symbiotiques Fixatrices d'Azote**

PREAMBULE

Bien qu'étant actuellement dans une unité ayant pour socle de recherche la microbiologie, je ne suis pas, de formation, microbiologiste, mais ingénieur agronome spécialisé en ressources génétiques et amélioration des plantes. De même, ma thèse avait pour cadre l'évolution et la diversification d'un genre végétal (*Medicago*) alors même que les aspects de « génétique évolutive » ne se sont développés que récemment dans l'unité où j'officie aujourd'hui. Tout cela pour dire que mon arrivée dans le monde de la microbiologie et de l'écologie microbienne s'est faite un peu par hasard, et que l'évolution de mes thématiques de recherche s'est également réalisée en fonction des opportunités se présentant.

Je passerai donc assez vite sur mes travaux de thèse portant sur l'évolution des traits d'histoire de vie du genre *Medicago*, pour me focaliser sur ce qui constitue mon cœur de recherche aujourd'hui, c'est-à-dire la diversité, l'évolution et l'adaptation des bactéries symbiotiques des légumineuses.

Par ailleurs, l'exercice de rédaction d'un dossier d'Habilitation à Diriger des Recherches me donne l'occasion de souligner combien le côtoiement de nombreuses personnes a pu être enrichissant et formateur. En particulier, et par ordre chronologique, Jean-Pierre Henri, Joël Cuguen, Isabelle Olivieri, Bernard Lejeune, Peter Young, Bernard Dreyfus, Catherine Boivin, Lionel Moulin, Xavier Bailly, et tous ceux avec lesquels j'ai pu, à un moment ou un autre, discuter, un peu, beaucoup, passionnément...

SOMMAIRE

INTRODUCTION

ACTIVITES DE RECHERCHES RECENTES

- 1- Evolution de la spécificité symbiotique dans le genre *Medicago*
- 2- Evolution des gènes de nodulation et transferts de gènes entre phylum bactériens.
- 3- Diversité, recombinaison et sélection dans les populations de *Sinorhizobium*.

ACTIVITES DE RECHERCHES ACTUELLES

- 1- Diversité de spécificité et phylogéographie dans la symbiose *Medicago-Sinorhizobium*.
- 2- Génomique évolutive des *Bradyrhizobiums* photosynthétiques
- 3- Diversité et adaptation des souches d'une légumineuse sahélienne, *Zornia glochidiata*.

PERSPECTIVES ET PROJETS

- 1/ Légumineuses traditionnelles, bactéries symbiotiques et adaptation aux contraintes édaphiques.
- 2/ Métagénomique des sols.

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Comme signalé en préambule, je n'appartiens pas à la caste des microbiologistes. Ma formation initiale a en effet porté sur les ressources génétiques et l'amélioration des plantes. Mes premières activités de recherche ont ainsi débuté en DEA au laboratoire « Génétique et Evolution des Populations Végétales » de l'université Lille I, sur la « *structuration cytoplasmique des populations gynodioïques de Beta maritima* ». Cette étude portait essentiellement sur des analyses de génétique des populations et tentait d'inférer des liens évolutifs entre les cytoplasmes de betterave maritime sauvages et leurs apparentés cultivés.

Mon service nationale, avec le Cirad-forêt en Côte d'Ivoire, a prolongé ces activités de végétaliste. J'avais pour mission l'analyse, par des approches de génétique quantitative, d'un ensemble d'essais descendances (essentiellement de familles demi-frères) mis en place au cours des années précédentes, de différentes essences exotiques, telles que le cèdre acajou (*Cedrela odorata*), le fraké (*Terminalia superba*) ou encore l'eucalyptus (*Eucalyptus urophylla*). A cette occasion, j'ai pu mettre en pratique, je le crains pour l'unique fois au cours de ma carrière, ma réelle formation, avec des analyses « classiques » de génétique quantitative en vue de préconiser des choix de sélection variétale aux forestiers (cf rapports internes Cirad).

Continuant mon chemin dans la botanique, les deux tiers de ma thèse, partagée entre Montpellier et Orsay, portaient sur l'évolution du genre *Medicago*. L'étude de l'évolution de caractères tels que les traits d'histoire de vie (cycle de vie, système de reproduction), la morphologie des graines ou des gousses, mais aussi une confirmation moléculaire de la systématique du genre, ont pu être réalisées grâce à l'obtention d'une phylogénie moléculaire du genre, notamment *via* le développement de nouveaux marqueurs moléculaires informatifs. Si depuis cette période mes thématiques se sont largement réorientées vers le monde microbien, les fondements même de ma formation et de ma thèse sont toujours présents, avec un choix de thèmes de recherche ayant pour cadre la génétique évolutive au sens large, et se fondant sur des approches phylogénétiques et de génétique des populations.

La dernière partie de ma thèse, conjointement avec l'année d'Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche ayant suivi, constitue le point de départ de mes recherches actuelles, à savoir l'immersion dans le monde, que dis-je l'univers, des symbioses fixatrices d'azote entre les légumineuses et les bactéries du sol. Je présenterai donc dans la suite de ce document ce que j'ai fait à compter de ce moment.

1- Evolution de la spécificité symbiotique dans le genre *Medicago*.

Ma principale thématique de recherche durant la fin de ma thèse et mon année d'ATER portait initialement sur l'étude de l'évolution de la symbiose azotée *Medicago-Sinorhizobium*. Cette thématique se plaçait assez naturellement dans la suite de mes premiers travaux phylogénétiques puisque nous retombions notamment dans une analyse phylogénétique de la coévolution (voir Page and Hafner (1996) pour des exemples dans les systèmes pathogènes). L'idée initiale de cette étude était de déterminer par une approche purement phylogénétique si nous pouvions mettre en évidence non seulement des variations majeures de spécificité symbiotique au cours de la diversification du genre *Medicago*, mais aussi potentiellement visualiser un historique de coévolution entre les deux partenaires symbiotiques. Rétrospectivement, et pour le coup après avoir baigné dans le domaine de la symbiose bactérie-légumineuse, cette aspiration à déterminer de la coévolution à cette échelle (d'espèces) par ces approches (phylogénétiques) paraissait illusoire.

Quelques études avaient auparavant été menées pour estimer les divergences de spécificité dans le genre *Medicago* (voir pour revue Provorov (1994)). Elles n'incluaient cependant que quelques espèces de plante, peu de souches des deux espèces bactériennes du genre *Sinorhizobium* alors même que les deux espèces *S. medicae* et *S. meliloti* n'avaient pas encore été définies, et avaient été réalisées avant l'obtention d'une phylogénie du genre *Medicago*. Ces études suggéraient que les espèces testées se rattachaient à trois groupes d'inoculation, selon qu'elles réalisent leur symbiose avec les deux espèces de bactéries (*Sinorhizobium medicae* et *S. meliloti*), avec uniquement *S. medicae*, ou bien ne réalise de fixation avec aucune de ces deux espèces.

Les travaux réalisés au cours de ma thèse et à sa suite suggèrent un système beaucoup plus complexe. La première série d'expérimentation consistait à réaliser un ensemble de tests de fixation d'azote, associant un grand nombre d'espèces de *Medicago* avec différentes souches bactériennes isolées de différentes espèces de *Medicago*. Nous avons testé 7 souches différentes (Figure 1). En parallèle à ces tests d'inoculations, nous avons étudié la variabilité moléculaire d'un plus grand nombre de souches également isolées de différentes espèces de *Medicago*, et reconstruit plusieurs phylogénies bactériennes, sur la base de séquences plasmidiques et chromosomiques.

Vingt deux souches ont été analysées. Sur la base de la séquence du gène chromosomique 16S (classiquement utilisé comme référence pour la détermination de l'espèce bactérienne), ces souches se classent toutes dans l'une des deux espèces, *S. meliloti* ou *S. medicae*. Il existe cependant une variabilité chromosomique (observée sur la base de la séquence intergénique 16S-23S) ainsi qu'une diversité plasmidique assez importante dans l'espèce *S. meliloti*, permettant de définir deux lignées évolutives distinctes. La confrontation des phylogénies plasmidiques et chromosomiques montrent l'existence de transferts plasmidiques entre souches présentant des fonds chromosomique très divergents.

Les résultats des tests d'inoculation ont mis en évidence, en prenant en compte les phénotypes de fixation (fix+ / fix-), l'existence d'au moins 5 groupes de spécificité. De plus, la retranscription de ces groupes sur la phylogénie du genre montre une instabilité majeure de la spécificité d'association symbiotique dans le genre *Medicago* (Figure 1).

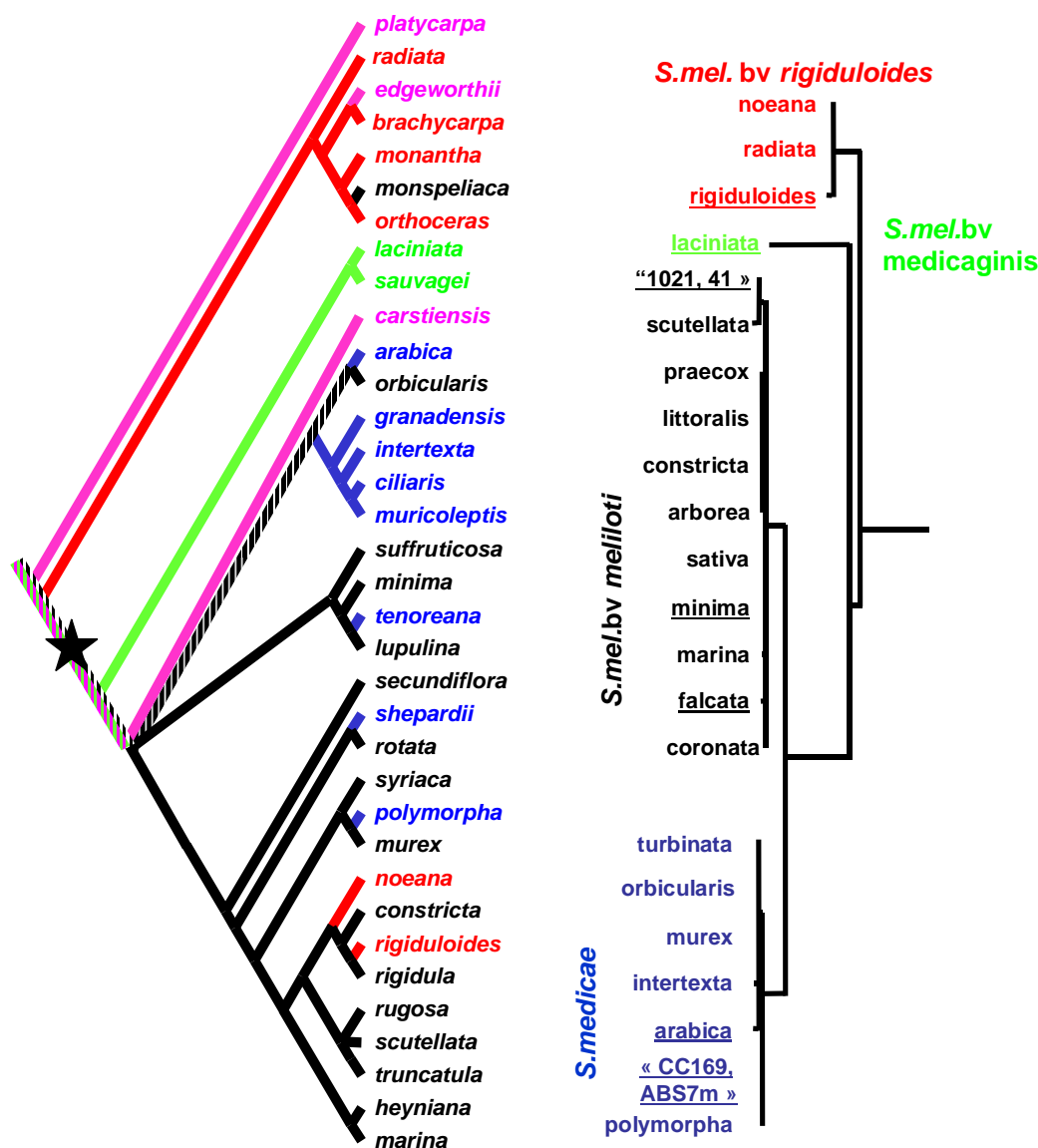


Figure 1: Phylogénies moléculaires des espèces végétales (à gauche) et des bactéries symbiotiques associées (à droite). Des couleurs identiques entre plantes et bactéries indiquent un résultat positif (fix+) en terme d'association symbiotique. La réciprocity d'association est exclusive pour les groupes 1 (rouge) et 2 (vert) de spécificité. Les espèces végétales en bleu s'associent uniquement avec les souches en bleu (en l'occurrence, *Sinorhizobium medicae*), alors que les espèces en noir s'associent efficacement avec les souches noires et bleues. Les espèces en rose n'ont montré aucune fixation effective lors des tests, et on ne connaît aujourd'hui pas leurs symbiotes associés (ou les conditions expérimentales où cette symbiose s'exprime effectivement). L'étoile suggère une modification majeure de spécificité au cours de l'évolution. Les souches soulignées sont celles ayant été utilisées pour les tests d'inoculation. D'après Bena *et al.*, 2005.

C'est la première fois que la spécificité symbiotique pour la fixation d'azote était explorée aussi systématiquement au sein d'un unique genre, et montrait une telle fréquence de changement au cours de sa diversification. N'ayant aucune étude similaire au sein d'autre genre comme point de comparaison, il est délicat de décider si une telle fréquence de modification de spécificité est particulièrement élevée au sein du genre *Medicago*, ou

inversement est dans la norme. Le seul genre pour lequel il existe plus que quelques espèces pour lesquelles une étude de caractéristiques de spécificité symbiotique ait été menée est le genre *Acacia*. Cependant, ce genre est extrêmement vaste (+ de 1200 espèces), et inclus des groupes d'espèces présentant apparemment une absence de capacité à la nodulation. Parmi les espèces d'*Acacia* pour lesquelles une caractérisation des souches symbiotiques a été réalisée, de nombreux genres bactériens ont été observés, incluant *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* ou *Bradyrhizobium*. Malheureusement, l'absence de tests d'inoculation croisés ne nous permet pas d'exclure la possibilité que ces genres, bien que phylogénétiquement divergents, partagent des gènes symbiotiques très proches comme cela avait été montré précédemment pour les deux espèces *S. teranga* bv. *acaciae* et *S. saheli* bv. *acaciae* qui possèdent une séquence *nodA* quasiment identique (Ba, Willems et al., 2002).

Evolution de la spécificité et sélection pour la migration

Nous avons essayé d'appréhender les forces évolutives ayant favorisé l'une ou l'autre de ces transitions de spécificité. La phylogénie suggère un changement majeur de spécificité au cours de l'évolution du genre (Figure 1, étoile). Le genre *Medicago* est a priori originaire de l'est du bassin méditerranéen, de l'Iran à la Turquie. Cette région comprend de nombreuses espèces du genre, appartenant à l'ensemble des 5 groupes de spécificité symbiotique définis. Inversement, la partie ouest Méditerranéenne montre une absence de l'ensemble des souches du groupe 1 de spécificité (en rouge sur la figure). Les espèces de *Medicago* de ce groupe de spécificité, lorsque mises en culture dans des sols ouest méditerranéens, montrent une absence sinon de nodulation, au moins de symbiose efficace, suggérant une absence (ou grande rareté) dans ces régions des souches de *Sinorhizobium* ayant l'aptitude à générer des nodules fixateurs pour ces espèces (Prosperi, com. pers.). Cette incapacité à réaliser une fixation effective dans ces sols doit être un facteur contre-sélectif majeur pour ces espèces, notamment dans des sols où l'azote assimilable est souvent un facteur limitant de croissance et de développement pour les plantes. La phylogénie suggère que l'état ancestral du genre *Medicago*, d'un point de vue symbiotique, ne permettait pas aux espèces « ancestrales » de migrer vers ces régions où leurs symbiotes étaient absents, et donc voyaient leur aire potentielle de répartition fortement limitée. Inversement, les espèces ayant acquis cette capacité ont vu leur aire de répartition considérablement élargie, et se retrouvent de fait pour certaines sur tout le pourtour méditerranéen. Des approches théoriques ont suggéré que les légumineuses pourraient échouer dans leur tentative de colonisation au sein d'habitats où leurs partenaires mutualistes sont rares ou absents (Parker 1999). Nos résultats suggèrent que cette contrainte a pu opérer dans le genre *Medicago*.

Cette hypothèse suggère cependant implicitement que les bactéries symbiotiques, et les gènes de nodulation spécifique de chaque groupe, préexistaient à la diversification du genre. Cette hypothèse est-elle lourde ou acceptable ? Difficile à dire. Cela supposerait que ces gènes de nodulation se soient maintenus dans ces sols avant l'arrivée d'espèces du genre *Medicago* en s'associant avec d'autres légumineuses. On sait ainsi que certaines espèces de *Trigonella*, genre fortement apparenté au genre *Medicago*, s'associent avec des souches de *Sinorhizobium meliloti* (Roumiantseva, Andronov et al., 2002), ce qui laisse ouverte cette hypothèse d'hôtes alternatifs. Nous sommes cependant confronté à un second dilemme face à cette hypothèse ; En effet, deux espèces, *M. noeana* et *M. rigiduloides*, ont suivi le chemin inverse, à savoir une réversion d'un statut de spécificité en association avec *S. meliloti* bv. *meliloti* et *S. medicae*, vers l'unique biovar *S. meliloti* bv. *rigiduloides* (Figure 1). Ces deux cas de réversion

suggèrent non seulement que les modifications de spécificités ne se jouent que sur quelques mutations, permettant des réversions, mais aussi que ces modifications doivent jouer sur d'autres pressions évolutives que la capacité à la colonisation de nouveaux environnements. La sélection pour une spécialisation plante-bactérie doit ainsi également jouer un rôle majeur, comme nous le suggérons dans le cas suivant.

Pertes, modifications de capacité symbiotique et spécialisation

L'évolution du genre s'est traduite par des pertes et modifications récurrentes de capacité à la fixation avec des souches de *S. meliloti*. Ces modifications peuvent se visualiser comme des spécialisations entre un hôte et une bactérie. Ainsi la souche isolée de *M. laciniata* ne réalise de symbiose qu'avec les deux espèces *M. laciniata* et *M. sauvagei* (espèces incluses dans le même clade), ces deux espèces ne réalisant, inversement, de symbiose qu'avec cette souche parmi toutes celles testées. On assiste donc dans ce cas à une réduction drastique du spectre d'hôte de la plante, réalisant sa symbiose uniquement avec un biovar donné. Une telle réduction de spectre est également observée de multiple fois pour des espèces dont l'état ancestral apparaît comme symbiotique avec les deux espèces *S. meliloti* *bv meliloti* et *S. medicae*, leur statut actuel révélant une symbiose efficace uniquement avec *S. medicae*. On peut s'interroger sur les pressions de sélection favorisant une réduction de spectre symbiotique. Si on met de côté l'idée, d'un point de vue microbiologie des sols, que tout est présent partout, alors une telle réduction se traduit par une diminution des sites colonisables par ces espèces végétales. De plus, le biovar s'associant avec *M. laciniata*, *S. meliloti* *bv medicaginis*, semble avoir une répartition géographique restreinte comparée aux souches de *S. meliloti* *bv meliloti*. Dans ce cas, une sélection pour plus d'efficacité semble avoir joué, une plante hôte récupérant a priori moins de bénéfice d'une population de symbiontes génétiquement diverses que d'une population génétiquement uniforme (Douglas 1998).

2- *Medicago-Sinorhizobium* : Transfert de gène et sélection en populations naturelles.

A la suite de ces résultats issus de ma thèse, nous avons affiné un certain nombre de résultats et initié de nouvelles approches en populations naturelles. Les objectifs de cette étude, en partie réalisée au cours de la thèse de Xavier Bailly, était d'analyser les relations génétiques entre les espèces et biovars de *Sinorhizobium* s'associant à *Medicago*, tant d'un point de vue évolutif qu'en terme d'isolement génétique. Nous souhaitions également estimer les différentes pressions de sélection s'exerçant sur plusieurs loci impliqués dans l'interaction symbiotique. Enfin, nous souhaitions avoir une première estimation des niveaux de différenciation entre populations bactériennes.

Isolement génétique et cohabitation des deux espèces

Des souches de *S. meliloti* et *S. medicae* ont été isolées à l'aide d'espèces du genre *Medicago* présentant des spécificités symbiotiques variées sur des sols français et tunisiens. L'étude de leur diversité génétique à l'aide d'une approche multilocus (MLST) a confirmé l'isolement sexuel entre *S. meliloti* et *S. medicae*, donc leur statut d'espèces à part entière (Rome, Fernandez et al., 1996). Ces deux espèces coexistent donc, avec des proportions respectives variables, et maintiennent un isolement génétique complet, bien qu'occupant des

niches écologiques similaires (tant en termes d'espèces hôtes colonisées que de types de sol). Les conditions de coexistence de ces deux espèces restent problématiques, les modèles théoriques prévoyant une compétition exclusive dans le cas d'une colonisation de niches similaires (voir Lane, St Mary et al., 2006, Bonsall, Hassell et al., 2002). Cependant, ces modèles ont toujours été développés pour des relations hôte-pathogène (parasite) et non pas mutualiste. De plus cette apparente similitude de niche n'est peut être pas si évidente. Enfin, des histoires évolutives différentes pourraient également jouer sur des répartitions différentes entre ces deux espèces bactériennes (voir plus bas).

Transfert de gènes au niveau intraspécifique, et mégaplasmide

Contrairement au niveau interspécifique, les transferts horizontaux de matériel génétique semblent jouer un rôle fondamental dans la diversification de chacun des taxons en population naturelle. Chez *S. meliloti*, ces transferts affecteraient préférentiellement les locus plasmidiques. Des analyses par mesure du déséquilibre de liaison, de comparaison de phylogénie et de tests de différenciation permettent d'arriver à ces conclusions (Figure 2 et Tableau 1). Des prédictions théoriques (Cohan 2002)) suggéraient que la colonisation d'hôtes différents par une même espèce bactérienne se traduirait à terme par une spéciation de ces souches bactériennes à spécificités divergentes. Nos résultats montrent qu'il n'en est rien dans le cas de *Sinorhizobium*.

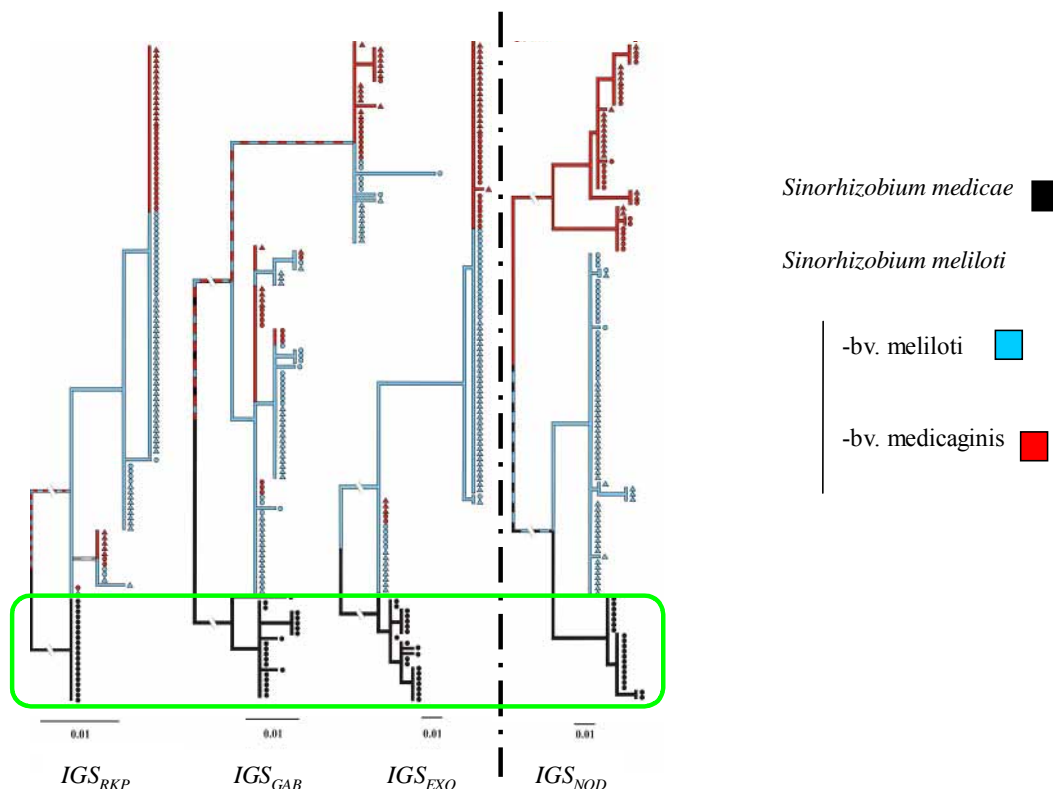


Figure 2. Visualisation des phénomènes de recombinaison ou d'isolement sexuel entre biovars et entre espèces bactériennes. Les quatre loci séquencés sont situés sur le chromosome (rpk), le plasmide pSymB (exo) ou pSymA (gab, nod). *S. medicae* apparaît en isolement sexuel complet vis-à-vis de *S. meliloti*. Les deux biovars de *S. meliloti* partagent du polymorphisme allélique, sauf pour le locus nod qui est directement impliqué dans la reconnaissance avec leurs plantes hôtes respectives. D'après Bailly et al., 2007).

Tableau 1: Déséquilibre de liaison entre marqueurs au sein du biovar *Sinorhizobium meliloti* bv *meliloti*. Seules les valeurs de D au sein du chromosome sont significativement différentes de zéro. Où l'on observe que la recombinaison entre replicons, mais également au sein des deux plasmides, est assez élevée pour faire disparaître tout déséquilibre de liaison significatif. D'après Bailly *et al.*, 2006

Marqueurs génétiques	Chromosome			PsymA		PsymB	
	<i>IGS_{RKP}</i>	<i>IGS_{FUM}</i>	<i>IGS_{HSS}</i>	<i>IGS_{NOD}</i>	<i>IGS_{GAB}</i>	<i>IGS_{EXO}</i>	<i>IGS_{THU}</i>
<i>IGS_{RKP}</i>	0.92***	0.83***	0.28	0.41	0.29	0.38	
<i>IGS_{FUM}</i>		0.86***	0.38	0.69	0.31	0.56	
<i>IGS_{HSS}</i>			0.30	0.53	0.13	0.43	
<i>IGS_{NOD}</i>				0.47	0.36	0.42	
<i>IGS_{GAB}</i>					0.49	0.65	
<i>IGS_{EXO}</i>						0.40	

Hormis le cluster symbiotique, il n'existe aucune différenciation significative entre biovars isolés d'un même site, ici au sein d'une population tunisienne et entre les biovars *meliloti* et *medicaginis*. De plus, nous ne pouvons mettre en évidence aucun déséquilibre de liaison entre les loci chromosomiques et plasmidiques, suggérant une intense recombinaison entre souches, maintenant ainsi l'homogénéité génétique de l'espèce. Il est notable de voir que si les expérimentations *in vitro* de transferts de mégaplasmide entre souches de *S. meliloti* s'était généralement soldé par des taux indétectables ou très bas, nos résultats montrent qu'en populations naturelles, les taux de transferts atteignent un niveau assez élevé pour éliminer toute trace de déséquilibre de sélection. L'influence d'exsudats racinaires du couvert végétal, mais aussi la promiscuité des souches dans les cordons d'infection et au sein des zones méristématiques dans les nodules, doivent très probablement jouer un rôle dans ce niveau élevé de recombinaison, notamment en inactivant des gènes répresseurs de conjugaison (voir Perez-Mendoza, Sepulveda *et al.*, 2005) pour la mise en évidence de déterminants de régulation de ces transferts).

Recherche de traces de sélection sur locus

Pour aller plus loin dans notre compréhension de la structuration de la diversité génétique des populations, nous avons appliqué des approches de recherche de sélection à l'ensemble du jeu de données obtenus sur une population échantillonnée en France. Sur les 7 loci séquencés chez 120 souches, nous avons recherché des écarts à l'évolution neutre *via* des tests de Tajima. Seuls les deux loci liés à des gènes impliqués dans la symbiose (l'intergène de gène *nod* et l'intergène de gène d'exopolysaccharides) ont présenté des écarts significatifs à une évolution neutre (Tableau 2). La séquence liée aux gènes *nod* présente, suivant en cela nos attendus théoriques, des traces de sélection purificatrice, les mutations modifiant les gènes *nod* (et donc la structure du facteur *nod* en découlant) étant alors contre-sélectionnées car limitant la reconnaissance de la bactérie par sa plante hôte. Cette sélection purificatrice est un autre élément renforçant l'idée que la symbiose est effectivement bénéfique pour la bactérie, pour laquelle il est relativement délicat d'estimer une valeur sélective. Par contre, nous mettons en évidence de la sélection diversifiante sur les séquences liées aux gènes d'exopolysaccharides, suggérant un maintien actif de plusieurs allèles à fréquences équivalentes. L'hypothèse que nous émettons pour expliquer ce résultat est que cette diversité permet aux bactéries d'éviter des sanctions précoces de la part de la plante. Le rôle des

exopolysaccharides dans la relation symbiotique et la spécificité avait déjà été mis en évidence dans différentes études (voir chez *S.meliloti* Jones, Sharopova et al. (2008)).

Marqueurs génétiques	Résultat de D de Tajima	
	<i>S. medicae</i>	<i>S. meliloti</i>
IGS_{RKP}	nt	1.211
IGS_{FUM}	-1.080	-1.409
IGS_{HSS}	0.459	1.129
IGS_{NOD}	-2.014*	-1.486 (min)
IGS_{GAB}	-0.334	-0.561
IGS_{EXO}	1.335 (max)	3.332***
IGS_{THU}	0.569	0.445

D'après Bailly, Olivieri et al. (2006).

Tableau 2 : Valeurs du D de Tajima obtenues pour les deux espèces au sein d'une population. Où l'on voit que les loci présentent des valeurs contrastées, donc rejetant l'idée d'un effet démographique. Que les seules valeurs significatives et extrêmes sont celles reliées aux loci symbiotiques. Et où les deux espèces présentent des patterns sélectifs très corrélés.

Une hypothèse est que les exopolysaccharides de surface soient reconnus par la plante et permettent la mise en place du cordon d'infection. Dans le cas contraire, où la plante ne reconnaîtrait pas ces polysaccharides comme « amicaux », des réactions de défense se mettraient en place, bloquant la colonisation par les bactéries symbiotiques.

Au final, du fait d'évènements de recombinaison, les processus de spécialisation et de spéciation sont profondément liés chez ces bactéries. L'équilibre entre recombinaison homologue et divergence génétique du fait de la spécialisation écologique sur différentes plantes hôtes des biovars bactériens semble pencher en faveur d'une homogénéisation récurrente des populations bactériennes, la recombinaison permettant à des pressions de sélections contrastées de s'appliquer sur différentes parties du génome. Différentes hypothèses phylogénétiques peuvent expliquer l'évolution de la spécificité symbiotique chez *S. meliloti*, et l'émergence de *S. medicae*. En effet, des données antérieures (Biondi, Pilli et al., 2003)) ainsi que la combinaison de l'ensemble des résultats obtenus au cours de la thèse de Xavier soutiennent l'idée d'une émergence de l'espèce *S. medicae* à partir d'une sous population de *S. meliloti* bv *meliloti*. Les conditions d'émergence d'une telle espèce ne sont pour l'instant pas claires (isolement géographique, mutations sur les systèmes de recombinaison ou de conjugaison...), mais une divergence génétique indépendante et une recombinaison entre souches de *S. meliloti* expliqueraient ensuite les patterns phylogénétiques actuels.

3- Evolution des gènes de nodulation et transferts de gènes.

Une partie des travaux quant à l'évolution du gène *nodA* a porté sur la mise en évidence de transferts de gènes et de leur récurrence entre souches symbiotiques. Le LSTM a découvert de nouvelles bactéries symbiotiques appartenant au groupe de beta-proteobactéries, alors que l'ensemble des bactéries symbiotiques de légumineuses connues jusqu'à présent appartenait au groupe des alpha-proteobactéries (Moulin, Munive et al., 2001). La découverte de ces bactéries symbiotiques a ouvert de nouvelles perspectives quant à l'origine et l'évolution de la symbiose fixatrice d'azote. Ainsi, les questions d'une origine unique ou multiple de l'aptitude à réaliser une symbiose avec les légumineuses, et de l'existence de transfert de matériel génétique entre lignées bactériennes très divergentes se sont reposées de manière cruciale.

Nous avons exploré, sur la base d'approches phylogénétiques, différentes hypothèses d'évènements récurrents ou uniques de transfert de gènes de nodulation entre alpha et beta proteobactéries, et ainsi essayer de comprendre l'évolution de la symbiose et des déterminismes de spécificité au sein de ces deux grands groupes. Nous mettons ainsi en évidence que les séquences *nodA* de *Burkholderia* se placent dans plusieurs clades différents, qu'il y a sans doute eu des évènements récurrents de transfert de gène *nod* entre lignées bactériennes, ainsi que des transferts inter génériques au sein des beta proteobactéries (Figure 3). Nous ne pouvons cependant actuellement émettre d'hypothèse quant à la branche microbienne ayant la première acquise cette fonction, même si la fréquence beaucoup plus élevée de présence des gènes *nod* au sein des différents clades d'alpha protéobactéries suggérerait une origine au sein de ce phylum. La notion de « fonction » apparaît par ailleurs aujourd'hui ambiguë, puisque des souches symbiotiques mais ne possédant pas les gènes *nod* ont été découvertes récemment (Giraud, Moulin et al., 2007). Il existe donc des souches réalisant une symbiose sans faire appel à la reconnaissance et l'interaction classiquement connue des facteurs *nod*. Cette reconnaissance sans facteur *nod*, et bien que très spécifique, est-elle ancestrale ou inversement plus « évoluée », il est délicat aujourd'hui de répondre à cette question.

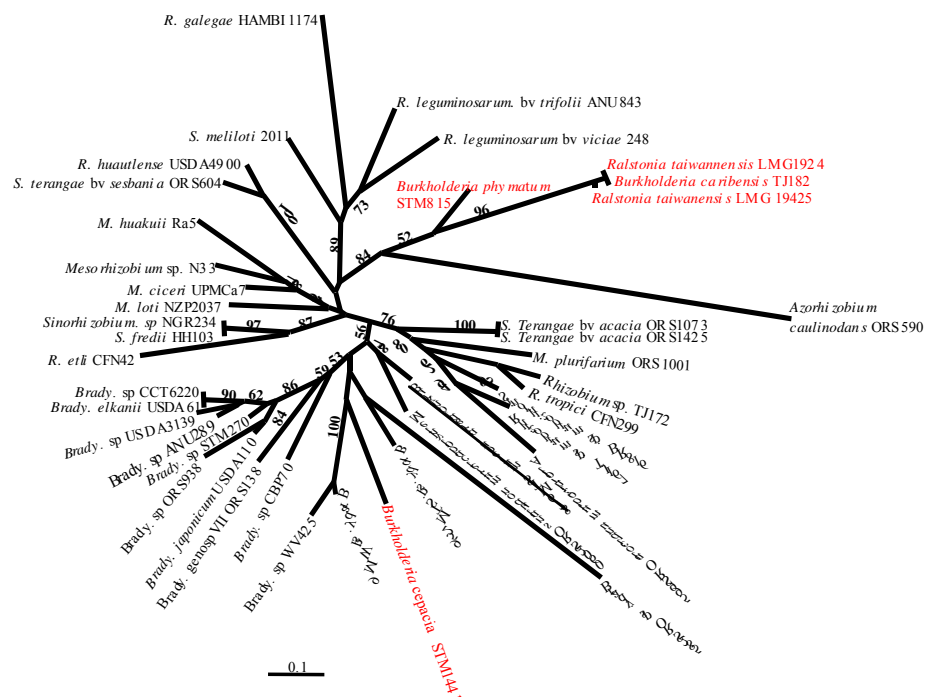


Figure 3. Phylogénie moléculaire basée sur le gène *nodA*, codant pour une acyle-transférase lors de la synthèse des facteurs Nod. Les espèces et genre en rouge appartiennent au phylum des beta-protéobactéries, au contraire de toutes les autres souches qui se répartissent au sein des alpha-protéobactéries. La distribution dans au moins deux clades indépendants des premières suggère fortement (et statistiquement confirmé) l'existence de plusieurs transferts d'ilots symbiotiques entre les deux phylums. D'après Chen *et al.*, 2003).

La question de l'origine des gènes *nod* s'est également posée. Les gènes *nod* se localisent en cluster, avec les gènes *nodABC* dits communs car présents chez toutes les

bactéries symbiotiques (celles avec des gènes *nod*..) et les gènes *nod* accessoires dont le rôle est essentiellement des modifications de la chaîne chitine du facteur NOD. On a trouvé des paralogues à l'ensemble des gènes *nod*. Ainsi, *nodE* résulte vraisemblablement d'une duplication du gène *fabB*. Une spécialisation vers la fonction symbiotique aurait joué sur l'évolution moléculaire ultérieure du paralogue, aboutissant à sa spécialisation à la fonction symbiotique (données non publiées). D'autres gènes, tel que *nodM*, présente une homologie de séquence tellement forte avec leur paralogue (*glmM*) que l'on doit faire l'hypothèse d'une remplacements ultérieure d'une copie par une autre, comme dans la souche séquencée de *Sinorhizobium meliloti*. La seule incertitude qui subsistait jusqu'à présent portait sur le gène *nodA*, pour lequel on ne trouvait aucune homologie de séquence avec tout ce qui était présent dans les banques de données. Récemment cependant, on a trouvé une séquence provenant de *Clavibacter michiganensis*, une actinobactérie (donc apparentée aux bactéries du genre *Frankia*, l'autre groupe de bactéries symbiotiques fixatrices d'azote avec les plantes...) présentant pour la première fois une homologie significative avec les séquences *nodA*. Sa très forte divergence nucléotidique et protéique ne permet pour l'instant pas vraiment de l'utiliser pour enraciner la phylogénie de l'ensemble des *nodA* connu, mais cela ouvre des perspectives quant à l'origine de ce gène et son adaptation à la fonction symbiotique.

1- Spécificité, sanction et polymorphisme dans la symbiose *Medicago-Sinorhizobium*.

La thématique de recherche sur la diversité et l'évolution des bactéries symbiotiques associées au genre *Medicago* se poursuit actuellement avec la thèse de Cécile Rangin (soutenance prévue fin 2008).

Une partie de cette thèse porte sur l'étude des diversités génétique et symbiotique de souches piégées sur un même sol à partir de 4 lignées fixées de *M. truncatula*. Un premier objectif était de déterminer le degré de divergence de spécificité entre des lignées végétales d'une même espèce confrontées à une population naturelle symbiotique, et donc en retour l'influence potentielle du couvert végétal sur la structuration génétique de la diversité de ces populations bactériennes.

Après typage sur 5 loci de 223 bactéries piégées, une très forte proportion (+ de 85%) des souches isolées se sont révélées appartenir à l'espèce *S. medicae*. Cette très forte proportion de l'espèce *S. medicae* résulte très vraisemblablement d'une disproportion au sein de la population initiale, les études précédentes n'ayant jamais suggéré une préférence marquée des lignées de *M. truncatula* pour cette espèce. Une telle disproportion entre les deux espèces n'est pas en soi surprenante dans la mesure où tous les cas de figure se sont présentés dans des études précédentes, que cela soit la présence unique d'une des deux espèces, ou une proportion plus ou moins équivalente entre elles. Ainsi à titre de comparaison une étude phylogéographique de Cécile sur près de 20 populations échantillonnées sur l'ensemble du pourtour méditerranéen couvre également une large gamme de variation entre les deux espèces, bien que nous n'ayons jamais obtenu une population à 100% *S. medicae* (mais sur une vingtaine d'isolats par population seulement, Figure 4).

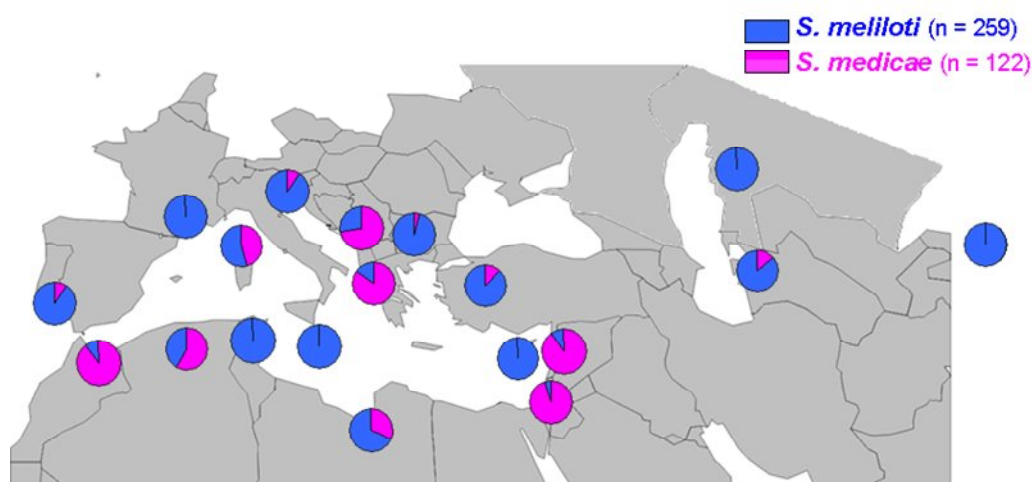


Figure 4: Proportions des deux espèces de *Sinorhizobium* (*medicae* et *meliloti*) échantillonnées sur 19 sites essentiellement localisés sur le pourtour méditerranéen. Les souches ont été isolées par piégeage sur sol à l'aide de *M.truncatula*. Où l'on observe que les proportions de chaque espèce sont très variables d'un site à l'autre, sans structuration évidente au niveau géographique.

On peut spéculer sur l'origine d'un tel déséquilibre de proportion d'espèce. Des explications liées au couvert végétal antérieur (présence de *M. polymorpha* qui s'associe spécifiquement avec *S. medicae* et qui aurait favorisé cette espèce dans le sol), aux conditions abiotiques (adaptation différentielle des deux espèces au pH du sol Garau, Reeve et al., 2005), ou démographique (effet de fondation récent) peuvent être avancées. Une analyse très rapide en utilisant le logiciel Lamarc suggère un taux d'accroissement de *S. medicae* beaucoup plus élevé que *S. meliloti*, ce qui pourrait être lié à la présence antérieure de *M. polymorpha* qui aurait ainsi pu favoriser une augmentation de la population. Cet échantillonnage retombe également sur un résultat déjà observé précédemment, à savoir une plus forte diversité génétique de *S. meliloti* comparée à *S. medicae* (H index : 2.03 vs 0.18). Une explication avancée à ce niveau serait que l'espèce *S. medicae* dériverait d'un sous ensemble de *S. meliloti* (voir précédemment), la spéciation ayant été concomitante avec un goulot d'étranglement dont les effets seraient toujours visibles aujourd'hui.

Pour revenir à l'étude initiale de Cécile, les 4 groupes bactériens isolés des quatre plantes-hôtes ont des compositions significativement différentes en terme de proportion des deux espèces. Des études précédentes avaient montré que les lignées de *M. truncatula* se comportaient différemment quand inoculées par des génotypes de *S. meliloti* différents. Ici nous montrons que ces divergences en terme de préférence symbiotique existent également lorsque ces lignées sont mises en contact avec une population naturelle bactérienne. Ce premier résultat reflète le fait que le génotype végétal présente des divergences de spécificité en terme quantitatif et non plus uniquement qualitatif, et peut ainsi avoir une influence sur la composition génétique et l'évolution des populations de ses partenaires bactériens. La diversité génétique existante entre les populations et sous-populations de différentes espèces de légumineuses, notamment *M. truncatula*, apparaît donc comme une force sélective pouvant faire évoluer de façon divergente la diversité microbienne symbiotique du sol, y compris en terme de composition/ratio d'espèces.

Nous avons dans un second temps exploré la diversité symbiotique à l'intérieur de chaque espèce bactérienne, pour ce qui est de leur compétitivité pour la nodulation et l'efficacité de fixation d'azote. Bailly, Olivieri et al. (2006) avaient montré que, dans une population échantillonnée par piégeage à l'aide de différentes lignées de *M. truncatula*, les deux espèces *S. meliloti* et *S. medicae* ne présentaient pas de déséquilibre de liaison (au sein de chaque espèce) entre des loci pris sur les différents replicons. Cela suggérait une intense activité de recombinaison en population naturelle. Nous nous attendions donc à trouver une faible divergence d'un point de vue symbiotique, tablant sur le fait que la sélection aurait éliminé les souches peu efficaces. Les études de compétition intra-spécifique, mais aussi d'estimation du niveau de fixation d'azote (par mesure du poids secs aérien) mettent pourtant en évidence une grande variation entre ces souches :

- Les tests montrent des variations entre les souches en termes de compétition, mais aussi en terme d'efficacité dans l'interaction avec les différentes lignées végétales (Figure 5). De plus, les souches de *S. meliloti* qui ressortent majoritairement dans l'expérimentation de compétition varient en fonction de la lignée végétale utilisée. On retrouve enfin une interaction lignée-bactérie significative pour le niveau de fixation d'azote. Les études précédentes démontraient des variations de spécificité et d'efficacité symbiotique sur ces mêmes lignées mais avec des souches génétiquement très divergentes et d'origines variées. Notre étude démontre qu'une telle variation se retrouve également au sein d'une seule population (bien que les souches présentent entre elles une divergence génétique très faible),

révélaient un réservoir de diversité génétique symbiotique important en comparaison avec une diversité nucléotidique « brute » apparemment faible. Cette diversité va même jusqu'au stade d'une souche présentant une variation extrême de fixation en fonction de la lignée végétale (souche ml7 fix⁻ avec F83, fix⁺ avec les autres lignées, voir discussion plus bas).

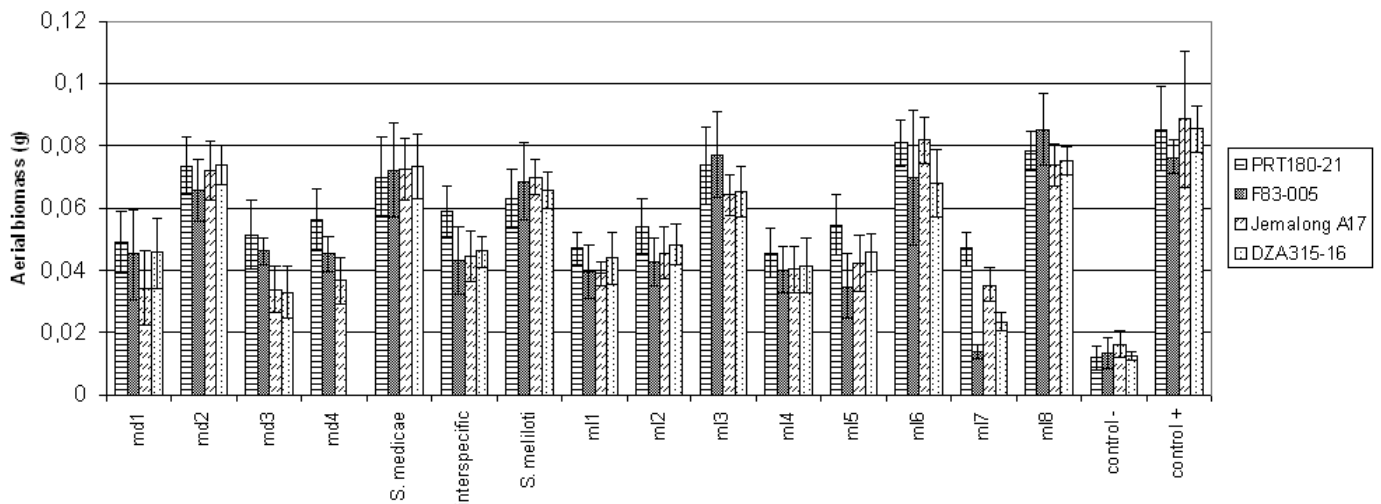


Figure 5 : Biomasses sèches aériennes des 4 lignées végétales inoculées séparément avec des souches de *S. medicae* (md), de *S. meliloti* (ml), un mix des souches de chaque espèce bactérienne (*S. medicae* ; *S. meliloti*) ou un mélange des deux meilleures souches en compétition (interspecific). Les souches ont été isolées d'une communauté d'un seul sol. On observe des variations entre souches, entre lignées végétales, ainsi que des interactions plantes-bactéries significatives. Où l'on voit qu'au sein d'une seule communauté, on observe une variation très importante de l'efficacité symbiotique des souches, allant jusqu'à une inefficacité (souche ml7, voir texte et figure 6), alors même que la diversité nucléotidique est très faible. D'après Rangin *et al.*, 2008.

Autour de cet ensemble de résultats, portant sur la diversité symbiotique des souches s'associant avec *M. truncatula* et la coexistence de deux espèces symbiotiques bactériennes, se repose le questionnement d'un tel maintien de diversité. La littérature a développé depuis plusieurs années un ensemble d'approches, tant théoriques qu'expérimentales, sur l'existence de sanctions réciproques afin d'expliquer le maintien d'un système mutualiste dans cette symbiose bactérie-légumineuse. Pour résumer, plusieurs expériences essentiellement menées sur le modèle Soja-*Bradyrhizobium* ont montré que la plante était capable de sanctionner un nodule où il n'y a pas de fixation d'azote, en réduisant l'apport en oxygène, limitant ainsi les capacités métaboliques et de reproduction des bactéries s'y trouvant. Cela se traduit par une baisse du nombre de bactéries au sein du nodule, et donc une diminution de la valeur sélective de ces bactéries comme contributrices de la génération suivante. Des auteurs ont également montré que la plante pouvait discerner les différents niveaux de fixation de ses nodules, et donc sanctionner une souche parmi d'autres au sein de son système racinaire. De plus, la sanction semble être proportionnelle au niveau de fixation, la plante pouvant de surcroît discerner un niveau relatif de fixation. Enfin, l'apport de nitrate directement assimilable par la plante se traduit par une sévérité accrue des sanctions, la plante ayant un niveau d'exigence plus élevé à mesure qu'elle a à sa disposition une source externe d'azote (West, Kiers *et al.*, 2002; Kiers, Rousseau *et al.*, 2003; Denison and Kiers, 2004; Kiers, Hutton *et al.*, 2007).

Dans ce cadre global, comment peut-on percevoir la diversité et le polymorphisme de réponse symbiotique observé dans le couple *M. truncatula* / *Sinorhizobium* sp? Si la

démonstration d'une sanction a été réalisée pour certains couples symbiotiques, nous ne pouvons rejeter l'hypothèse que ce mécanisme soit sinon absent, du moins peu marqué dans le couple *M. truncatula/Sinorhizobium*. Il faut noter que les expérimentations démontrant de la sanction ont toujours été réalisées sur des espèces à nodulation déterminée, alors que *Medicago* est une espèce à nodulation indéterminée. Le lien avec l'endoréplication des bactéroïdes, et leur incapacité à se différencier (Mergaert, Uchiumi et al., 2006), apparaît alors d'autant plus cruciale. Il semble cependant peu probable qu'il n'existe aucun mécanisme de sanction, ne serait ce que pour éviter que ce système mutualiste ne dérive vers un système parasitique.

L'étude nous a permis de faire ressortir le cas particulier d'une souche, STM5472 (ml7 sur figure précédente). Cette souche s'est avérée, tant dans la mesure du poids sec des parties aériennes que par mesure du niveau de réduction d'éthylène, comme non fixatrice avec la lignée F83000 de *M. truncatula* (Figure 6). Nous avons estimé le dénombrement de bactéries viables (pouvant être recultivées sur milieu) sur l'ensemble des nodosités récupérées sur le système racinaire, en combinaison avec les 4 lignées végétales, mais aussi d'une souche (STM5480) issue de la même population et fixatrice avec ces lignées.

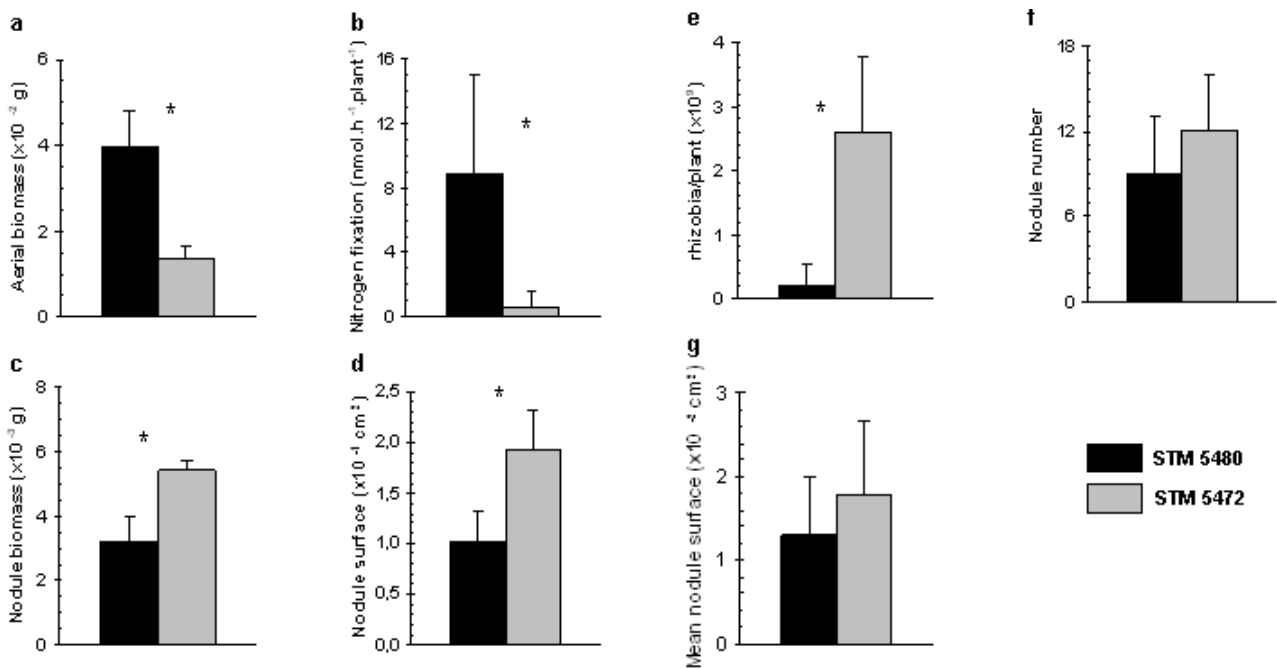


Figure 6 : Mesure des biomasses aériennes (a), de la fixation d'azote (b) de la masse de nodules/plantes (c), de la surface de nodules / plantes (d), du nombre de rhizobia/plantes (e), du nombre de nodule (f) et la surface moyenne de nodule (g) pour chaque combinaison lignée/souche : F83005 avec STM5480 et STM5472. * : Différence significative par test t. Où l'on voit que la souche non fixatrice présente une meilleure valeur sélective que la souche fixatrice, se rapprochant d'un statut purement parasitique, et posant la question d'une réelle sanction de la part de la plante sur ces nodules non fixateurs.

Les résultats sont surprenants. La souche STM5472 génère systématiquement un nombre beaucoup plus élevé de colonie que la souche STM5480, y compris lorsqu'elle est associée avec la lignée F83 avec laquelle il n'y a pas de fixation d'azote. Si on considère que le nombre de bactéries viables issues du système racinaire est un reflet direct de la valeur sélective bactérienne, alors nous observons un résultat ambigu d'une bactérie non fixatrice ayant une meilleure valeur sélective qu'une bactérie fixatrice sur une lignée végétale donnée.

De plus, même au sein de la souche 5472, le nombre de bactéries viables apparaît plus élevé en combinaison avec F83 (fix⁻), qu'avec JA17 (fix⁺). Le nombre de nodule est pourtant plus élevé avec JA17, mais leur biomasse apparaît plus faible (données non présentées).

Nous ne pouvons pas conclure quant à la réelle non-existence de sanction dans l'association F83000-STM300. En effet, l'existence d'interaction spécifique souche-lignée ne permet pas d'exclure une variation due essentiellement à ces effets d'interaction et non pas une réponse spécifique de type sanction de la part de la plante. De plus la sémantique sur la notion de sanction reste assez floue. Plusieurs auteurs (et reviewers..) considèrent que la mise en évidence de sanctions ne peut être réalisée que par des approches d'inoculations mixtes, où la plante est confrontée à deux populations bactériennes de niveaux d'efficacité différentes mais possédant un background génétique identique (type souche sauvage et souche mutée sur un gène de fixation). Dans ce cas, on considère que la sanction a bien lieu si la valeur sélective de la souche la moins performante est affectée. Cette vision écarte cependant la notion de sanction absolue, où la plante peut sanctionner une souche, même seule dans l'inoculum (West, Kiers et al., 2002).

Une approche similaire aux études précédentes, c'est-à-dire soit en utilisant un environnement gazeux sans azote (O₂-Ar) ou en testant le phénotype d'une souche fixatrice mutée sur un gène de fixation (comme *nifH*) permettrait d'éclaircir sur la réalité de sanction dans le couple *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium*. Quoiqu'il en soit, que cela soit dans un système où la lignée F83 serait associée à une population de souches incluant notamment la souche STM300, ou un système avec la seule souche 300 serait associée à plusieurs lignées végétales de *M. truncatula*, c'est l'association non fixatrice, plutôt que les associations fixatrices, qui résulterait pour la souche d'une meilleure valeur sélective, au moins à court terme. Il est sans doute probable que c'est le polymorphisme, tant végétal que bactérien en population naturelle, qui permet que ce système ne dérive pas vers une sélection des souches parasitiques. Une approche par modélisation serait à ce niveau intéressante (mais moi et la modélisation ça fait deux).

Phylogéographie des populations de S. meliloti et S. medicae

Une seconde partie de la thèse de Cécile, déjà abordée dans la figure 4, portait sur la structuration de la diversité génétique des populations de *Sinorhizobium* échantillonnées à l'aide de *M. truncatula*, sur tout le pourtour méditerranéen, donc l'aire de répartition original de l'espèce et du genre *Medicago*. L'idée était de voir si on pouvait mettre en évidence d'une part une structuration liée à la distance entre les populations et d'autre part un lien entre paramètres physico-chimique des sols prélevés et diversité génétique bactérienne. Ces analyses sont en cours, je ne m'étendrai donc pas trop dessus. Les premiers résultats montrent des différenciations hautement significatives entre les populations (F_{st} multiloci de 0.18 chez *S. medicae*, 0.40 chez *S. meliloti*). Cependant, aucune corrélation entre différenciation génétique et distance géographique n'a pu être mise en évidence, rejetant l'hypothèse d'un pattern phylogéographique. Des analyses discriminantes testant la proportion des deux espèces avec différents paramètres du sol suggèrent que l'acide phosphorique pourrait jouer un rôle. Ces résultats restent préliminaires, et demandent plus d'analyses. Vous pourrez en savoir plus en lisant la thèse de Cécile Rangin !

2- Génomique évolutive des *Bradyrhizobiums* photosynthétiques

Dans le cadre d'un projet ANR-Jeunes chercheurs, nous nous sommes intéressés à la diversité génétique des souches de *Bradyrhizobium* s'associant à *Aeschynomene*. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Lionel Moulin et Clémence Chaintreuil, membres du groupe jeunes chercheurs, et Lucie Miché, recrutée post doc sur ce projet.

Au sein des légumineuses, le genre *Aeschynomene* comprend de l'ordre de 90 espèces, bien que cette estimation reste peu précise. Il a une répartition géographique mondiale, certaines espèces se retrouvant notamment sur plusieurs continents. C'est le cas d'*A. sensitiva*, présente en Amérique, continent dont elle serait originaire selon les sites de ressources génétiques de l'USDA, mais aussi en Afrique et en Asie. *A. indica* serait également originaire d'Amérique et introduite en Afrique. Inversement, *A. afraspera* est originaire et exclusive au continent africain. L'évolution du genre *Aeschynomene* reste extrêmement floue, les rares approches phylogénétiques entreprises n'intégrant que très peu d'espèces du genre (Hughes, Lewis et al., 2004) mais une nouvelle phylogénie est en cours d'élaboration dans l'unité par C. Chaintreuil). Ces deux études suggèrent, sur la base d'une reconstruction basée sur des séquences chloroplastiques, la polyphilie de ce genre, notamment, et nous y reviendrons plus tard, en proche parenté avec le genre *Zornia*.

Plusieurs études ont porté sur la diversité des spécificités symbiotiques au sein de ce genre. Il présente en effet la caractéristique très rare au sein des légumineuses de former des nodosités de tige (nodulation caulinaire) en plus des nodosités de racines, cette capacité étant de plus restreinte à certaines espèces. Alazard (1990) a sur cette base pu définir trois groupes d'inoculation différents selon la capacité de nodulation, tant racinaire que caulinaire, de différentes souches bactériennes (appartenant toutes au genre *Bradyrhizobium*) isolées de 8 espèces différentes et testées sur 20 espèces d'*Aeschynomene*. Au final, une classification a été proposée, basée sur le spectre d'hôte des souches sur 4 espèces représentatives d'*Aeschynomene* (Figure 7): Les souches nodulant les racines d'*A. elaphroxylon* forment le groupe 1, celles nodulant les tiges et racines d'*A. afraspera* forment le groupe 2, celles nodulant tiges et racines d'*A. sensitiva* et *A. indica* le groupe 3. Cette classification en groupes symbiotiques implique donc des phénomènes de spécificité entre les *Bradyrhizobium* et les *Aeschynomene*.

Un second aspect fondamental de distinction des souches nodulant les différentes espèces d'*Aeschynomene* porte sur leur caractère photosynthétique (Molouba, Lorquin et al., 1999). En effet, certaines de ces bactéries présentent la propriété, unique parmi tous les rhizobiums connus, d'être photosynthétiques, cette propriété ne se distribuant pas également au sein des trois groupes d'inoculations définis. Ainsi, alors que le groupe 1 ne comporte que des souches non photosynthétiques, le groupe 2 est caractérisé par des souches dont une partie seulement est photosynthétique, alors que le groupe 3 ne comporte que des souches présentant une activité photosynthétique.

A l'interface entre photosynthèse et symbiose, le LSTM a d'ailleurs pu montrer que l'activité photosynthétique retrouvée spécifiquement chez ces bactéries jouait un rôle majeur au cours de la symbiose durant les premières étapes de l'interaction avec la plante, en facilitant la survie et l'infectivité de la bactérie au cours de la symbiose caulinaire, en fournissant à la bactérie de l'énergie pouvant être utilisée pour la fixation de l'azote (Giraud *et al.*, 2000).

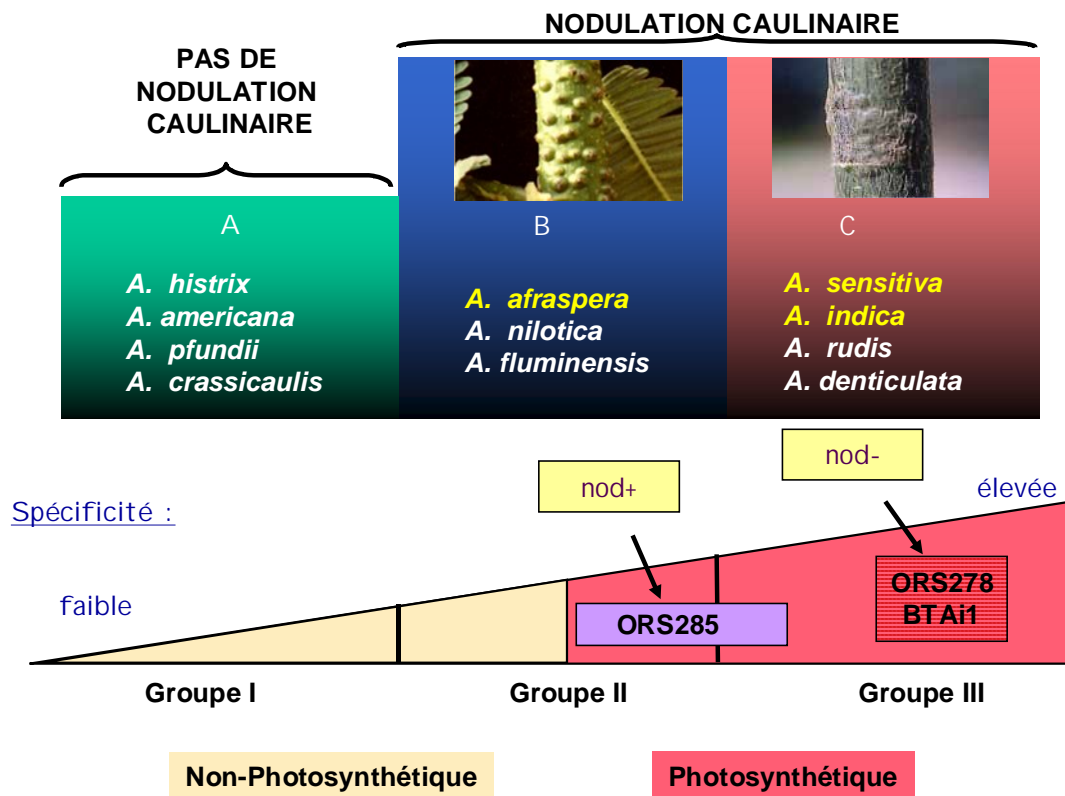


Figure 7. Spécificité et groupes d'inoculations dans l'association *Bradyrhizobium-Aeschynomene*. Les souches du groupe I sont toutes non photosynthétiques, celles du groupes II sont mixtes, celles du groupe III sont toutes photosynthétiques. Nos derniers résultats ont cependant tendance à remettre ce dogme en question. Les souches photosynthétiques du groupe II nodulent les *Aeschynomene* des groupes B et C, alors que les souches du groupe III ne nodulent que les espèces du groupe C. La nodulation du groupe B est dépendante de la présence de gènes *nod*, telle quand dans la souche ORS285. Les souches du groupe III ne possèdent pas de gènes *nod*. Les souches du groupe II mutées sur leurs gènes *nod* ne nodulent plus que les espèces du groupe C. D'après ???

Afin d'affiner nos connaissances génomique et moléculaires des bases de la symbiose et de la photosynthèse chez ces souches, notre unité a séquencé deux souches photosynthétiques du groupe 3, *Bradyrhizobium* sp. ORS278 et Btai1. L'analyse des deux génomes a permis de montrer l'étonnante absence des gènes *nod* de nodulation, révélant un nouveau processus d'interaction symbiotique dont les déterminants moléculaires sont à l'heure actuelle inconnus et aboutissant à la nodulation de tige. Les bases de cette spécificité restent obscures aujourd'hui, et il est à noter qu'il n'a jamais été découvert de gènes *nod* ou apparentés au sein des souches de *Bradyrhizobium* nodulant le groupe 3. Or les souches associées au groupe I et II présentent des gènes *nod* classiques, bien qu'atypiques pour celles du groupe II (Chaintreuil, Boivin et al., 2001; Moulin, Bena et al., 2004).

Les deux souches du groupe 3 entièrement séquencées ont été isolées d'espèces et de continents différents: ORS278, isolée d'*A. sensitiva* en Afrique, et Btai1, isolée d'*A. indica* en Amérique du nord. Les deux souches présentent des divergences génétiques marquées, que cela soit sur leur contenu en ADN (2 Mb de différence entre les 2 génomes) ou pour de nombreux gènes (dont l'ADN ribosomique 16S, Moulin, Bena et al., 2004). Nous ne savons pas si ces différences sont dues à une différence de plante hôte, à une structuration géographique de la diversité des souches associées à ce groupe d'inoculation, ou à un hasard de l'échantillonnage. Nous avons donc pour ce projet réalisé de nouveaux échantillonnages

dans des populations naturelles d'*Aeschynomene*, au sein de trois zones, Mexique, Guyane et Guadeloupe, ainsi qu'en reprenant des souches en collection isolées d'Afrique. Dans les trois premiers cas, des échantillonnages de nodules, tant caulinaires que racinaires, ont été réalisés en populations naturelles, sur plusieurs sites. Le nombre d'échantillons prélevés a été fonction de la densité en pieds d'*Aeschynomene* sp., de très rares (Mexique) à abondants (Guadeloupe).

L'ensemble des 110 souches ont été séquencées pour leur gène *recA*. La phylogénie (ML) obtenue est présentée dans la figure 8. Plusieurs éléments ressortent de cette phylogénie :

-L'ensemble des souches photosynthétiques symbiotiques des *Aeschynomene* forment un clade unique. La monophylie de ces souches suggère d'une part que la capacité photosynthétique a été acquise une unique fois. Cela suppose également que cette capacité est suffisamment importante pour ne pas avoir été perdue au cours de la diversification de ce groupe, l'ensemble des souches isolées dans cette étude et se positionnant dans ce clade ayant été testée positivement pour la capacité photosynthétique. Giraud, Hannibal et al. (2000) avaient montré que des souches mutées sur leurs gènes *puf*, et donc rendue non photosynthétique, présentaient une efficacité symbiotique moindre. L'importance de la fonction photosynthétique, qu'elle soit liée à la symbiose avec la plante ou la survie de la souche en vie libre, apparaît ici assez élevée pour maintenir une pression de sélection vers le maintien de la fonction dans ces souches. Une étude portant sur la recherche de traces moléculaires de sélection sur les gènes photosynthétiques serait sans doute pertinente.

-Les souches du groupe 2, c'est-à-dire possédant la capacité à noduler les *Aeschynomene* des groupes 2 et 3, et possédant des gènes *nod*, ne se positionne pas dans un unique clade. Ainsi, les souches ORS303, ORS285 ou ORS368 sont plus fortement apparentées à des souches du groupe 3 qu'entre-elles. Ainsi, les souches ORS303, ORS285 ou ORS368 sont plus fortement apparentées à des souches du groupe 3 qu'entre-elles. De plus, certaines souches, comme ORS320 et ORS300, possèdent des séquences *nodA* identiques à 100% en nucléotides bien que ne formant pas un groupe monophylétique en *recA*. On peut donc émettre l'hypothèse soit d'un unique transfert de gène *nod*, suivi par une dispersion de ces gènes vers d'autres souches du clade, soit une perte récurrente de ces gènes chez les souches du groupe 3 apparentées. Les phylogénies du gène *nodA* montre que ce gène chez ORS285 a subi une divergence nucléotidique très importante (figure 3). Je n'ai pour l'instant pas analysé si cette divergence était plutôt neutre (relâchement de pressions de sélection) ou positive (fixation de nouveaux acides aminés) en relation avec une reconnaissance adaptée au récepteur de facteurs Nod d'*Aeschynomene*, groupe B.

- La diversité et la divergence en terme nucléotidique du gène *recA* au sein du groupe des souches symbiotiques des *Aeschynomene* suggère la présence de plusieurs espèces distinctes. D'une façon assez surprenante, les deux souches présentant le plus de divergence nucléotidique sont les souches séquencées ORS278 et Btai1. Btai1 est originaire des USA, et apparaît seule en bout d'une longue branche. Inversement, ORS278 ne présente pas de caractéristique particulière vis-à-vis des autres souches isolées d'Afrique de l'ouest. Les 8.35% de divergence nucléotidique se situent dans une fenêtre de divergence où il est délicat de considérer les souches comme appartenant à la même espèce. La diversité entre les souches d'*Aeschynomene* apparaît ainsi aussi importante qu'entre les souches des autres espèces de *Bradyrhizobium* déjà décrites, suggérant un polymorphisme en termes d'espèces dans ce groupe.

-Nous ne mettons pas en évidence de structuration phylogénétique de la diversité en fonction de l'origine géographique des isolats. Ainsi les souches Africaines et Guyanaise, les plus représentées, se retrouvent sur l'ensemble de la phylogénie.

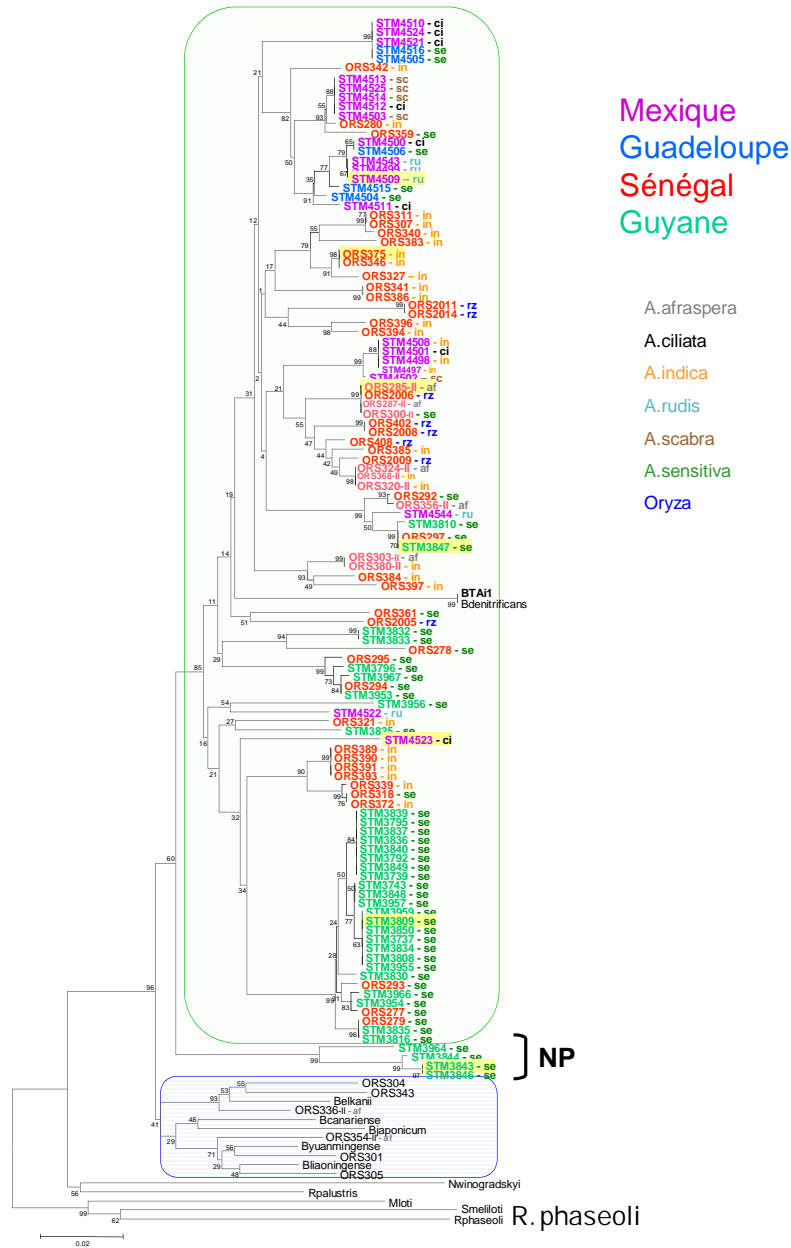


Figure 8: Arbre phylogénétique (ML) fondé sur la séquences du gène *recA* de souches de *Bradyrhizobium*. Les couleurs des noms de souches indiquent leur origine géographique. Les lettres après les noms de souches indiquent l'espèce de plante hôte d'origine lors de l'échantillonnage. Le cadre vert indique le clade de souches photosynthétiques nodulant *A. sensitiva*. Le cade NP indique des souches non photosynthétiques mais nodulant *A. sensitiva*. L'encadré bleu indique le clade des souches de *bradyrhizobium* « classiques » apparentées à *B. japonicum*, incluant des souches des groupes 1 et 2. Les souches ombragées en jaune sont celles pour lesquelles des séquençages de type 454 et/ou Solexa ont été réalisés.

Les souches Mexicaines, bien que prédominantes dans la partie haute de la phylogénie, sont également retrouvées dans la partie basse. Plusieurs clades regroupent solidement des souches de 2 ou 3 origines différentes. Cette absence de structuration phylogénétique en fonction de l'origine géographique suggère que les souches s'associant à *Aeschynomene* se dispersent sur l'ensemble de l'aire de répartition du genre. Ce résultat reprend une idée similaire, bien que non formulée, des données de van Berkum, Tully et al. (1995) qui avaient pu piéger des souches d'*Aeschynomene* (avec *A. indica*, sur racines) en utilisant des sols provenant du monde entier. De même, l'ancienne souche type de *Blastobacter denitrificans* (maintenant renommée *Bradyrhizobium denitrificans*) qui se positionne au sein du clade a été isolée d'un lac en Allemagne. Ces éléments suggèrent que l'écologie et la distribution spatiale des souches s'associant à *Aeschynomene* ne sont pas tributaires de la présence de la plante hôte, en tout cas pour tout ce qui concerne les souches nodulantes de racines. Ce résultat reprend plus généralement l'idée que les souches du genre *Bradyrhizobium* en général migrent facilement entre les sites et présentent une faible structuration liée à la distance (Vinuesa, Silva et al., 2005). Il convient cependant de noter que les deux souches Btai1, isolée de sol pollués de remblais de mine, et l'ancienne souche type de *B. denitrificans*, isolée d'un lac, qui se placent dans le même clade, présentent une divergence très forte d'un point de vue moléculaire vis-à-vis des autres souches. Il doit sans doute exister une structuration plus fine liée à l'écologie des souches, sur des paramètres que nous ne maîtrisons pas dans nos données.

-Nous mettons enfin en évidence un groupe de souches, isolées de Guyane, qui sont non seulement non-photosynthétiques, mais apparaissent comme extérieure au clade regroupant toutes les souches d'*Aeschynomene*. Ces souches ne nodulent pas *Aeschynomene afraspera* et ne possèdent pas les gènes *nod* (cf données solexa), ce qui positionnent des souches sans gènes *nod* en dehors du groupe de *Bradyrhizobium* photosynthétiques. Cette polyphylie justifierait deux événements indépendants de perte de gènes de nodulation, si on fait l'hypothèse d'un état ancestral des souches comme possédant des gènes *nod*. On peut par ailleurs se poser la question d'une similitude des mécanismes de reconnaissances entre ces souches ne possédant pas de gènes *nod*.

Cette image globale de la diversité des souches s'associant avec des accessions naturelles d'*Aeschynomene* ne simplifie pas notre connaissance du système. Nos données montrent que la diversité génétique des souches ne se structurent pas selon une origine géographique ou une origine d'espèce de plante hôte. Il est délicat de tester pour des différences significatives de composition génétique entre les différentes conditions (plantes d'origine, localisation), les échantillonnages ayant été réalisés dans des conditions variables, avec des tailles d'échantillons très différents. Un piégeage sur sol avec une même accession de plante permettrait de tester pour des différences de composition de populations entre sites et ainsi de tester à minima pour des différenciations populationnelles entre sites. Cela reste à faire...

Les notions de groupe d'inoculation définies précédemment sont bousculées par ces résultats, que cela soit des souches non photosynthétiques nodulant des espèces du groupe 3, ou des souches du groupe 2 se positionnant au sein des souches de *Bradyrhizobium* « classiques ». Nous ne pouvons par ailleurs pas exclure que les notions de groupe de spécificité soient différents selon que l'on regarde la nodulation de racine ou de tige, bien qu'il semble exister une bonne corrélation de résultats entre les deux types de nodulation.

Sur la base de cette phylogénie, nous avons souhaité analyser les divergences sur l'ensemble du génome et non plus sur un marqueur unique (*recA*) ou des données couvrant le génome mais fragmentaire (AFLP, données non montrées). Nous avons pour cela choisi 6 souches (entourées dans la figure 1, et tableau ci dessous) afin de représenter le maximum de divergence évolutive. L'idée initiale était, à l'aide d'une approche de séquençage de type Solexa, de comparer directement le contenu en gène de ces souches avec celui de 2 bactéries modèles dont les génomes étaient accessibles, ORS278 et Btai1. Le but étant de tirer une image globale de la diversité des souches s'associant avec *Aeschynomene*, mais aussi d'avoir une première idée sur l'adaptation génétique de ces souches aux conditions particulières de nodulation de tige, notamment en terme de contenu génomique commun. Pour effectuer cette analyse, nous pensions pouvoir nous appuyer sur les deux génomes entiers déjà en notre possession, pour aligner les fragments de 36bp obtenus sur ces génomes, et ainsi de visualiser d'un coup non seulement les gènes communs, mais aussi leur degré de divergence nucléotidique.

	BTAi1	ORS278	ORS285	ORS375	STM3809	STM3843	STM3847	STM4509	STM4523
Estimation séquençage 454 (Mb)	8.3 ^a	7.5 ^a	7.6	7.8	7.3	8.4	X	X	X
Estimation PFGE			7.5	7.5	7.6	8.4	7.1	7.9	7.5 ou +???
Nb reads Solexa				212.10 ⁶	210.10 ⁶	166.10 ⁶	198.10 ⁶	206.10 ⁶	186.10 ⁶
Couverture Solexa				28	28	20	28	26	25

Taille de génome estimé par séquençage 454 et PFGE, et couverture de lecture par approche Solexa.

^a : Les deux souches BTAi1 et ORS278 ont été entièrement séquencées. Leur taille de génome est donc parfaitement connue. X : Séquençage 454 non réalisé. La couverture Solexa est estimée en fonction du nombre de lecture et de la taille estimée en PFGE.

Cette approche s'est partiellement soldée par un échec, la partie alignement direct du moins, car seulement 20% des séquences obtenues ont pu être localisées sur ces deux génomes. , Le reste des données Solexa présentant, au choix, trop de divergence ou une réelle absence pour pouvoir être positionnées sur les génomes de référence. Si nos données nous permettent de rechercher par blast la présence ou l'absence de certains gènes dans les génomes séquencés (comme par exemple l'absence des gènes *nod* dans la souche STM3843), elles ne nous permettent pas de procéder à une analyse globale des contenus génomiques.

Nous avons alors choisi d'assembler nos données Solexa en contigs, afin d'une part de diminuer le volume des données à traiter (1Gb), et d'autre part avoir des séquences suffisamment longues pour pouvoir réaliser des blasts à grande échelle (*augmenter les scores*). Mais nous nous sommes confrontés ici à un problème méthodologique d'assemblage de contigs, aucun logiciel performant n'ayant encore été développé pour assembler ce type de données.. Pour contourner ce problème, nous avons utilisés deux scripts libres d'accès (SSAKE et VCAKE), spécialement dédiés à l'assemblage de millions d'oligonucléotides. (*Il a aussi fallu trouver un calculateur avec Linux*). En utilisant des données Solexa virtuelles d'ORS278 générées *in silico*, nous avons mis au point les paramètres d'assemblage de ces 2 scripts à utiliser pour nos données.

Cette approche nous a permis d'obtenir (en partant de $5,5 \cdot 10^6$ oligos par génome en moyenne) 25 000 contigs, avec 50% du génome compris dans des contigs de 500 à 4000 pb (N_{50}) : suffisant pour faire des blasts.

Par ailleurs, la couverture de lecture Solexa pour certaines souches s'est révélée parfois limitante. En effet, une couverture 28x est rétrospectivement apparue suffisante ; cela est facilement visible sur les premiers gènes conservés : BRADO0001 à BRADO0004 (*dnaA*, *poIII*, *recF* et *gyrB*), pour lesquels les résultats tBlastN sur les données Solexa assemblées donnent des hits avec 80-100% de couverture protéique, et plus de 95% d'homologie entre les protéines orthologues. Par contre, pour la souche STM4509, 3 de ces CDS sur 4 ne sont détectées que partiellement (50% de couverture protéique). La souche STM4523 présente également la même limite, avec un CDS sur 4 détecté avec seulement 50% de la séquence protéique couverte.

Nous avons donc relancé une approche de séquençage de génomes par approches 454 pour 3 des 6 souches initiales, afin de combiner ensuite les deux jeux de données (Solexa et 454). Nous présentons ici les premiers résultats issus de l'ensemble de ces données, sachant que ces analyses restent très préliminaires et se poursuivent actuellement.

Lorsque nous disposons des deux jeux de données (Solexa et 454) avec une couverture suffisante, les résultats sont fortement concordants. Ainsi, dans le cas d'ORS375, les deux méthodes permettent de détecter 5730 protéines d'ORS375 présentes aussi chez ORS278 et/ou BTAi1. L'approche Solexa en détecte 18 spécifiquement, le 454, 60 en plus. En terme de détection de gènes, ces deux approches semblent donc pertinentes. On peut cependant s'étonner que l'approche 454 « rate » des gènes visualisés dans les données Solexa, remettant en question l'idée de ces approches comme étant sans biais en terme de couverture.

En seconde approche « brutale », nous avons procédé à une analyse de présence absence de CDS entre l'ensemble des 6 souches, les deux souches entièrement séquencées BTAi1 et ORS278, la souche de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, une souche du genre le plus apparenté à *Bradyrhizobium*, *Rhodopseudomonas palustris*, et la souche de la bactérie symbiotique réalisant des nodules de tiges sur *Sesbania rostrata*, *Azorhizobium caulinodans*.

Les premiers résultats donnent :

- 1600 gènes en commun dans tous les génomes ; ce sont surtout, comme attendu, des gènes du métabolisme de base.
- Les souches de *Bradyrhizobium* partagent près de 1570 gènes, qui formeraient la base génomique commune du genre *Bradyrhizobium*.
- Enfin, l'ensemble des souches de *Bradyrhizobium* nodulant (sans gènes *nod*) les tiges partagent 210 gènes spécifiques. Beaucoup de ces gènes sont annotés comme sans fonction ni homologues connus mais pourraient se révéler comme des déterminants de la nodulation facteur Nod indépendante.

Il convient cependant de noter, dans ce dernier cas, que l'ensemble de nos souches nodulant les tiges formant un groupe monophylétique, nous avons deux paramètres se superposant, d'une part la fonction « nodulation de tiges », d'autres part un statut d'ancêtre commun partagé par toutes les souches. Il semble pour l'instant impossible de distinguer les deux.

Les analyses sur le contenu génomique se poursuivent, en affinant ces aspects de présence/absence notamment. Nous allons par ailleurs commencer à rentrer dans les détails de la divergence de gènes, tant sur une bases de divergence nucléotidique que sur une base de visualisation de concordance phylogénétique, afin de mettre en évidence de possible transferts de gènes.

3- Diversité et adaptation des souches d'une légumineuse sahélienne, *Zornia glochidiata*.

Ce projet de recherche a été initié depuis septembre 2005 via un co-encadrement de la thèse de Fatou Gueye, entre Samba Sylla, du Laboratoire Commun de Microbiologie de Dakar et moi-même en collaboration avec Lionel Moulin au LSTM. Le cadre de départ du projet porte sur l'utilisation d'espèces végétales adaptées aux faibles disponibilités en eau et en azote, caractéristiques des sols en zone soudano-sahéliens. *Zornia glochidiata* (Photo 1) est l'une de ces espèces de légumineuses herbacées prometteuses pour une bonne utilisation fourragère et restauratrice dans les systèmes écologiques au Sahel. En plus de son intérêt agronomique, elle présente un intérêt tout particulier comme modèle d'étude sur l'écologie et la diversité des rhizobiums du fait de sa large répartition géographique et notamment de sa densité souvent très forte en milieu naturel. C'est une espèce spontanément très répandue dans les régions tropicales de l'Afrique de l'Ouest formant par endroit un couvert végétal monospécifique extrêmement dense.

L'intérêt agronomique et écologique des bactéries symbiotiques, les rhizobiums, repose non seulement sur leurs propriétés symbiotiques mais aussi sur leurs capacités d'adaptation à des conditions biotiques et abiotiques variées. En effet, le rhizobium, indigène ou introduit, vivant à l'état libre dans le sol est le premier à subir les effets négatifs liés aux facteurs édapho-climatiques tels la température, l'humidité, la salinité et le pH du sol. Par ailleurs, la description moléculaire des structurations génétiques d'écosystèmes microbiens a mis en exergue leur extraordinaire diversité. Cette description comprend outre l'utilisation des outils de la biologie moléculaire, l'analyse de l'effet des facteurs de stress de l'environnement. Il apparaît donc comme capital, dans un objectif de sélection de souches et d'amélioration de la symbiose fixatrice d'azote (avec une perspective d'amélioration des partenaires symbiotiques dans le cadre d'une réhabilitation–revégétalisation des sols sahéliens), d'étudier la diversité des souches de rhizobiums sur la base de ces propriétés.

Photo 1: *Zornia glochidiata* au Sénégal. L'espèce peut atteindre des densités très importantes au moment de la saison des pluies, et ainsi former un couvert végétal continu monospécifique. Elle est alors utilisée comme fourrage naturel par les éleveurs. *Photo Fatou Gueye.*



Deux campagnes d'échantillonnage de sols ont été effectuées au Sénégal, en Octobre 2005 et Septembre 2006. Les sites de prélèvements sont représentés dans la carte du Sénégal (Figure 9). Les échantillons de sols ont été prélevés au milieu de prairie à *Zornia*, à 10 cm de profondeur, et pour chaque site un échantillon de sol d'environ 1 kg a été prélevé. Ces échantillons ont été recueillis dans des sachets stériles, placés à 4°C au laboratoire et utilisés pour réaliser du piégeage. Soixante dix huit souches ont été isolées au cours deux campagnes.

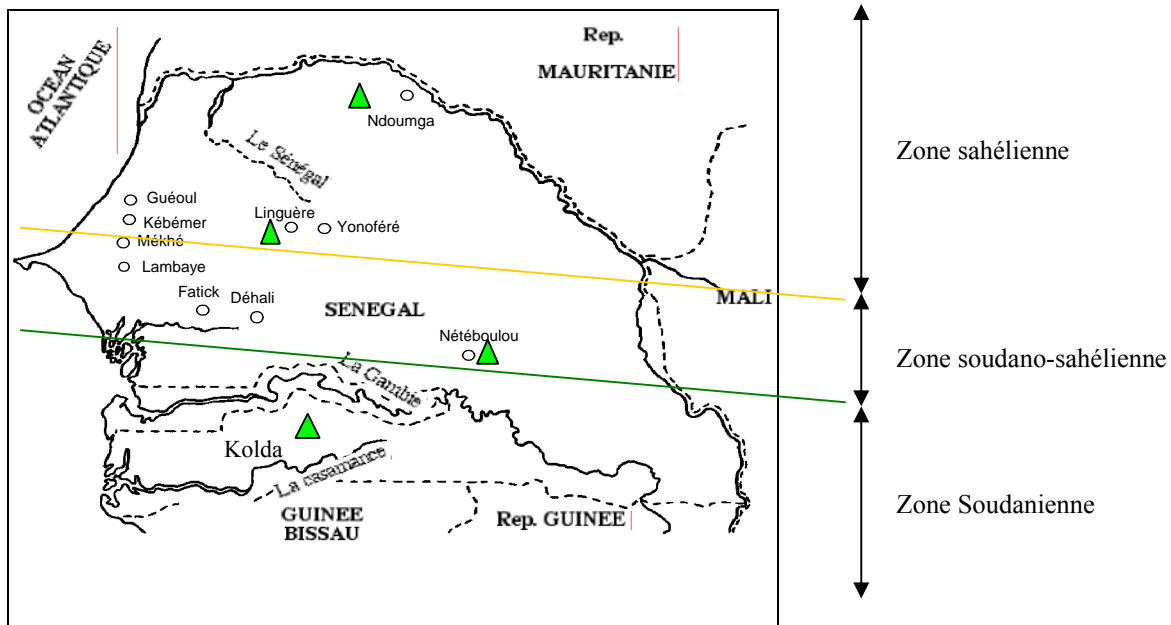


Figure 9: Lieux d'échantillonnages de sols au sein des populations de *Zornia glochidiata* naturellement présentes au Sénégal. Les deux figurés (ovales blancs et triangles verts) indiquent les échantillonnages de 2005 et 2006 respectivement.

Diversité génétique des souches associées à Zornia glochidiata

Nous avons caractérisé génétiquement les souches à l'aide de plusieurs loci : D'une part la séquence ITS de l'ADN ribosomal, connue pour être très variable dans le genre *Bradyrhizobium*, qui met en évidence 5 clusters, et d'autre part le gène *recA* (impliqué dans la recombinaison). Les données fournies par ces deux marqueurs sont congruentes (Figure 10 pour la phylogénie *recA*, données AFLP non montrées). Deux ensembles bien distincts émergent de cette phylogénie. D'une part des souches de *Bradyrhizobium* qui se placent dans 4 clades différents. Toutes ces souches ont été retestées pour leur capacité à noduler et fixer l'azote en association avec *Z. glochidiata*.

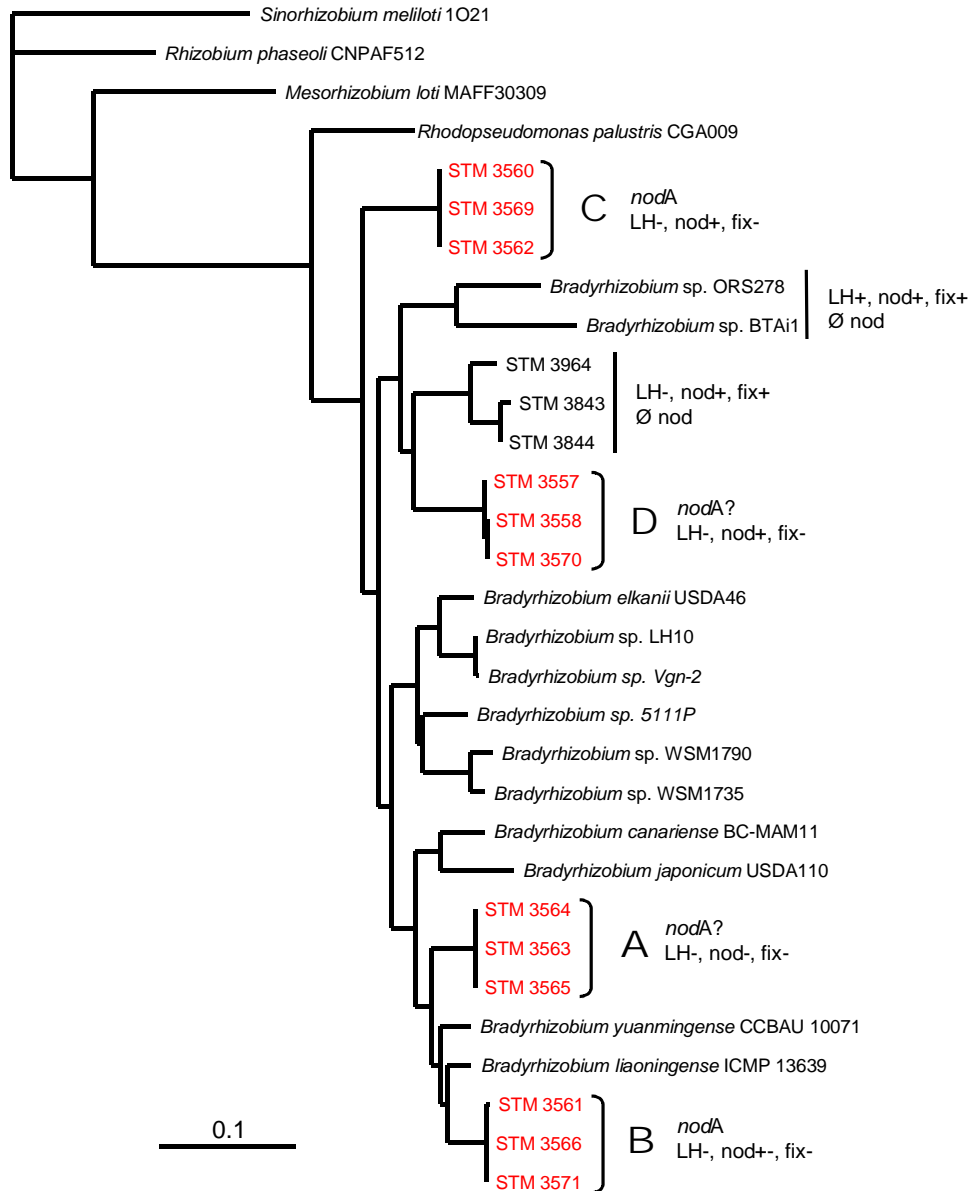


Figure 10: Phylogénie moléculaire (ML) de souches de *Bradyrhizobium* fondée sur le gène *recA*. Les 4 clades A à D sont ceux incluant des souches isolées de *Zornia glochidiata*.

nodA: Séquence du gène *nodA* obtenue; *nodA?*: pas de séquence obtenue; Ø nod: absence des gènes *nod* démontrée par séquençage des génomes; LH+/LH-: Présence/absence d'antennes collectrices LH, signe de présence d'un système photosynthétique. *nod+*/*nod-* *fix+*/*fix-*: Nodulation ou pas, fixation d'azote ou pas en inoculation sur *Aeschynomene indica*.

Les clades A à D se distinguent sur différents paramètres, tant symbiotiques que de réaction en présence de PEG.

Nous retrouvons donc un exemple de symbiose végétale où se maintient un polymorphisme important de souches symbiotiques, ici en terme d'espèces puisque la structuration observée et les divergences sur le gène *recA* laisse suggérer la présence d'au moins 4 espèces différentes.

Les clusters A et B forment deux clades bien différenciés, et apparentés à la souche de référence *Bradyrhizobium yuanmingense* (souche isolée en Chine). Le cluster B regroupe des souches très proches de la souche ORS3257 isolée à partir de nodosités du niébé (*Vigna unguiculata*) au Sénégal. D'une façon plus large, ces souches se placent dans un grand clade

incluant les souches de *Bradyrhizobium japonicum*. Le cluster C ne se groupe avec aucune souche connue (que cela soit en ITS ou *recA*), notamment aucune des espèces génomiques de *Bradyrhizobium* déjà décrites dans des études antérieures. Les souches du groupe D forment un clade frère de souches isolées d'espèces du genre *Aeschynomene*.

Cette diversité de symbiotes est exacerbée par l'isolement de souches appartenant au genre *Azorhizobium*. Jusqu'à présent, seules les bactéries du genre *Bradyrhizobium* avaient été décrites comme s'associant avec *Z. glochidiata*. Les tests de nodulation réalisés avec les souches d'*Azorhizobium* ont montré une très faible efficacité de ces souches par rapport aux souches de *Bradyrhizobium*, tant au niveau de la nodulation que de la fixation d'azote. Les souches d'*Azorhizobium* ont toujours montré une très forte spécificité d'hôte, ne s'associant jusqu'à présent qu'avec la légumineuse *Sesbania rostrata*. Ces souches présentent cependant dans notre cas une réelle capacité à initier des nodosités sur *Z. glochidiata*, bien que de petite taille et non fixateur

Zornia glochidiata apparaît donc comme une espèce à spectre de spécificité relativement large, acceptant non seulement une symbiose avec différentes souches de *Bradyrhizobium*, mais porteuse également de souches d'*Azorhizobium*, non mutualistes. Quel statut donner ici aux souches d'*Azorhizobium* ? Ces souches se sont révélées non fixatrices mais furent pourtant isolées de nodules. Nous serions donc en présence de souches à comportement plus parasitique que mutualiste. Il n'est pas spécialement surprenant de retrouver des souches à phénotype nodulant non fixateur (nod^+fix^-) lors de ces phases de piégeages. Cependant, les souches d'*Azorhizobium caulinodans* ont toujours été décrites comme très spécifiques de *Sesbania rostrata*, une légumineuse qui pousse pendant la saison des pluies dans les sols de bas-fond de la région du fleuve Sénégal. Le fait de retrouver des souches d'*Azorhizobium* sur des zones externes à l'aire de répartition de sa plante hôte élargit le propos quant à leur écologie, qui ne se cantonnerait pas aux zones humides, ainsi que du rôle potentiel de *Zornia* dans le maintien de ces populations. Dans le cas présent, les tapis herbacés de *Zornia* pourrait jouer un rôle « d'entretien » des populations d'*Azorhizobium* via la formation de nodules non fixateurs. Par ailleurs, des tests de croissance de plantes incluant une souche de *Bradyrhizobium* et une souche d'*Azorhizobium*, séparément ou en mélange, n'ont pas pu mettre en évidence d'effet délétère de la présence de la souche d'*Azorhizobium* (données non montrées). Cette association non mutualiste ne serait donc pas néfaste à *Zornia*, ce qui expliquerait sa présence sur l'ensemble des populations échantillonnées.

La notion de spécificité tourne autour de la capacité de la plante à accepter des souches produisant des facteurs Nod différents, et donc la diversité en retour des souches sur leur contenu en gènes nod. Cela dit, le modèle *Aeschynomene-Bradyrhizobium* photosynthétique (voir plus haut) montre également que la spécificité peut être forte sans faire appel aux gènes nod. Dans ce cas, on peut supposer que la spécificité peut s'exprimer *via* d'autres caractères, comme les exopolysaccharides par exemple. Nous avons recherché les gènes nod présents dans les 4 groupes de souches de *Bradyrhizobium* isolées de *Zornia* afin d'analyser leur diversité. Si les gènes *nodA* et *nodZ* ont pu être amplifiés sans problème pour les souches des clades B et C, nous n'avons obtenu aucun résultat pour les souches des clades A et D dans le cadre des tests d'amplification par PCR. Il convient à ce niveau de distinguer deux groupes de souches :

Les souches du groupe D forment un clade frère aux souches d'*Aeschynomene*. Nous serions donc en présence de souches apparentées aux souches symbiotiques d'*Aeschynomene*

indica, présentant également la caractéristique de ne pas posséder de gènes nod. Découle de ce point que *Zornia glochidiata* serait le second exemple de légumineuse ayant la capacité de réaliser une symbiose avec des souches ne possédant pas de gènes nod. Ou l'on revient alors sur la remarque précédente de la très proche parenté phylogénétique des deux genres *Zornia* et *Aeschynomene*. Par ailleurs, si nous confirmons l'absence de gènes nod au sein des souches du clade A, nous serions alors en présence de souches de *Bradyrhizobium* non directement apparentées aux souches d'*Aeschynomene* et ayant également perdu leurs gènes de nodulation, ce qui supposerait que la perte des gènes nod soit un évènement récurrent au sein du genre *Bradyrhizobium*. Ce résultat permettrait donc d'obtenir un second point de comparaison entre des génomes de souches sans gènes nod. Le polymorphisme des souches de *Bradyrhizobium* s'associant à *Zornia* serait donc mixte, d'une part d'un point de vue « génomique », avec des souches présentant une divergence entre elle, mais aussi fonctionnelle, avec des souches possédant, ou pas, des gènes de nodulation classiques. Il est clair qu'une telle absence de gènes nod serait à confirmer par des approches de séquençage de génome, l'approche PCR restant « critiquable » prise seule.

Forcément, face à ce résultat, nous avons tenté des inoculations croisées entre *Aeschynomene indica* et *Zornia glochidiata*. Les souches des 4 clades ont donc été testées sur *A. indica*, alors que la souche ORS278 a été testée sur *Zornia*. Les 4 groupes de souches présentent une gradation dans la réponse à l'inoculation d'*Aeschynomene indica*, de l'absence de nodulation (A) à la formation de nodule normaux mais non fixateurs (D). Il n'y a donc pas de lien entre la présence ou l'absence de gènes nod sur la nodulation, mais la proximité évolutive avec les souches classiques d'*Aeschynomene* semble avoir un effet sur l'efficacité de la nodulation. Il conviendra de poursuivre cet aspect dans l'avenir, si possible par des approches de génomique comparative de ces différentes souches. L'absence de réponse positive lors de l'inoculation d'ORS278 sur *Zornia* suggérerait que les mécanismes en place soit sensiblement différents entre les deux couples, et qu'il existerait une spécificité de nodulation racinaire par les souches ne possédant pas les gènes nod.

Diversité et résistance à la sécheresse

Dans le cadre de cette étude, nous avons également voulu savoir quel profil de résistance à la dessiccation les souches isolées présentaient. L'idée d'origine était de trouver des profils de résistance divergents sur des souches proches génétiquement, et ainsi, par des approches de type SSH, tenter de déceler des gènes impliqués dans la résistance à la sécheresse. Nous avons donc testé cette résistance en mesurant la croissance des souches en milieu liquide en présence de PolyEthyleneGlycol (PEG) qui mime une réduction d'eau accessible à la bactérie dans le milieu.

Les courbes de croissances sont présentées en figure 11.

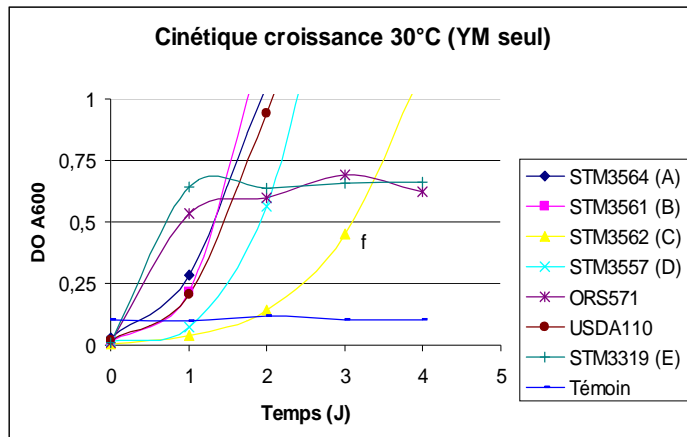
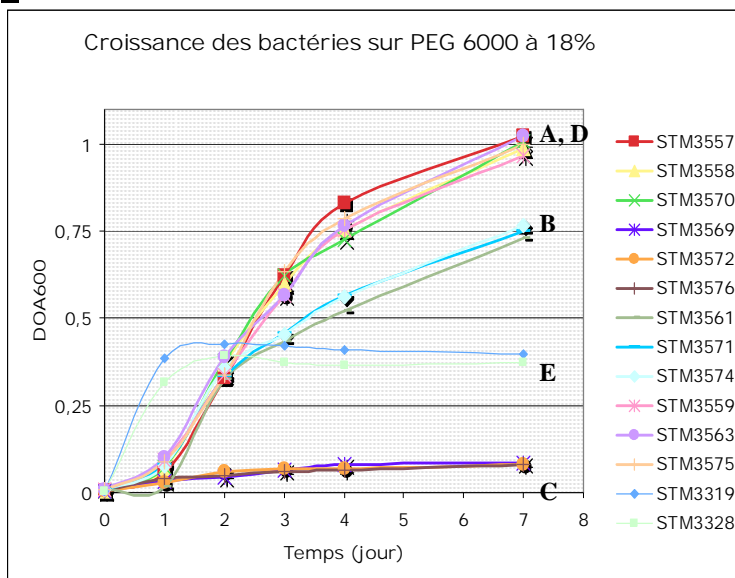
A

Figure 11. Evolution de la densité optique des souches en croissance, en fonction des milieux :

A : En milieu YM seul (non contraignant).

B : En présence de PEG 6000 à 18% mimant un stress hydrique.

Les lettres correspondent aux différents groupes phylogénétiques obtenues dans la phylogénie *recA*. Le groupe E correspond aux souches *d'Azorhizobium*. On peut noter le plateau rapidement atteint en milieu YM par les souches *d'Azorhizobium*. Les souches tolérantes au PEG présentent malgré tout un ralentissement majeur de leur croissance. Les souches du clade C sont sensibles au PEG et ne poussent plus.

B

- Pour les concentrations de PEG à 45 % et 30 %, la croissance des bactéries est complètement inhibée ; A 25 %, la croissance est faible et est homogène pour toutes les souches. À 18 %, on observe des différences de densité optique selon les isolats. Cette dernière concentration a été utilisée pour l'ensemble des souches. Nous observons 4 réponses différentielles.

Le groupe 1 (A, D) comporte uniquement des souches muqueuses, le maximum de croissance à 7 jours est obtenu pour une DO comprise entre 0,2 et 0,25. Bien que la croissance soit ralentie, ces souches montrent une certaine tolérance au PEG 6000. Une partie des souches se distinguent (groupe 2, B) en présentant une croissance au cours des deux premiers jours similaire aux souches du groupe 1, mais un décrochage ensuite, pour afficher une croissance régulière mais plus lente, avec une DO de l'ordre de 0,75. Pour les souches du groupe 3 (E), la croissance atteint une phase plateau à partir d'une DO comprise entre 0,13 et 0,15, au bout environ de 24–48h. Enfin les souches du groupe 4 (C) montrent une croissance très fortement ralentie pour ne pas dire inhibée.

En reliant ces résultats aux positionnements phylogénétique des souches, nous observons une parfaite concordance entre les phénotypes et les clades. L'ensemble des souches des clades A et D présente la meilleure résistance au PEG. Le type 2 rassemble uniquement les souches du clade B. Les souches d'*Azorhizobium* sont de type 3, avec une sensibilité présentant un plateau de croissance. Enfin le type 4, marqué par une quasi absence de croissance, regroupe les souches du clade C.

Ces résultats, ajoutés aux observations précédentes, indiquent que la production de polysaccharides semble jouer un rôle protecteur contre la dessiccation. Des études antérieures ont montré que les bactéries à gram négatifs telles que les rhizobiums synthétisent des lipopolysaccharides au niveau de leur paroi qui assurent un rôle protecteur contre la dessiccation (Garmiri, Coles et al., 2008). Dans notre cas, les seules souches ne présentant pas de production importante de polysaccharides sont celles qui ne présentent également pas de tolérance à la présence de PEG. Par contre, nous ne mettons en évidence aucune corrélation entre origine géographique des souches, conditions abiotiques des sites et résistance au PEG. Sous l'hypothèse où le PEG mime effectivement réellement une résistance à la dessiccation en conditions naturelles des souches bactériennes, il semble donc que la résistance à la sécheresse ne soit pas un facteur sélectif structurant la diversité de ces souches. Certains sites d'échantillonnage sont pourtant soumis à des périodes de sécheresse importante, notamment pour les sites situés dans la zone intermédiaires soudano-sahélienne (Figure 9), au sein desquels nous avons pu isoler des souches ne présentant aucune résistance au PEG. De même les deux sites de Kolda et Ndoumga, situés dans des zones humides (proche du fleuve Sénégal au nord, en Casamance au sud) présentent des souches résistantes des deux clades A et D. Ces résultats suggéreraient ainsi que des zones que nous avons considérées comme soumises à un fort stress hydrique ne sont pas en réalité, pour ces souches bactériennes, des zones à pressions de sélectives importantes, en tout cas vis-à-vis de ce paramètre. Est-ce à dire qu'il n'y a pas de marge d'amélioration et de sélection pour ces souches en zones de stress hydrique prononcé? De nouveau dans la mesure où nos tests reflètent effectivement une réelle résistance, cela veut dire que le paramètre de résistance à la dessiccation n'est sans doute pas le caractère qui doit être en premier pris en compte dans une approche d'amélioration de la symbiose. L'efficacité de la fixation d'azote ou la compétitivité des souches seraient sans doute des paramètres de sélection plus pertinents dans un premier temps. Mais les derniers résultats d'inoculation font planer un doute sur cette idée (voir plus bas).

L'absence de variabilité intra-clade nous a par ailleurs bloqués dans notre volonté de développer une approche SSH afin de mettre en évidence des déterminants potentiels de la résistance à la dessiccation.

Afin de revenir sur le questionnement appliqué, c'est-à-dire la recherche de souches conférant à la légumineuse une meilleure croissance dans des conditions de stress hydrique, Fatou a procédé à Dakar à des tests de croissance en pot, sous 4 conditions de stress hydrique croissant, de 0 apport d'eau 10 jours après inoculation (stress maximal), 25% et 50% de la capacité de rétention d'eau du milieu, à 100%, c'est-à-dire en conditions non limitantes. Ces 4 conditions d'arrosage ont été croisées avec 5 conditions d'inoculation, à savoir une absence d'inoculation (témoin négatif), ou l'inoculation de 4 souches appartenant aux 4 clades de *Bradyrhizobium* observés, les clades A et D (souches tolérantes au PEG), B (souche intermédiaire) et C (souche sensible au PEG).

Après deux mois de culture, la hauteur et le poids des parties aériennes ont été mesurés sur chaque plante, et l'effet inoculation a été testé.

A 100% d'eau, il n'y a pas de différences entre les 4 souches, qui sont toutes supérieures au témoin négatif. Il y a donc bien un intérêt à inoculer (ouf !). A 0% d'eau, toutes les plantes sont mortes, l'inoculum ne permet rien contre l'absence d'eau (résultat attendu...).

A 25% de rétention d'eau, il n'existe pas de différence entre les souches, et les différences avec le témoin semble minime, suggérant de nouveau qu'en fort stress hydrique le paramètre inoculation ne joue quasiment pas. Par contre, à 50% d'apport, nous observons des différences significatives non seulement entre les inoculums et le témoin négatif, mais aussi entre les souches (Figure 12). On observe ainsi que la souche sensible au PEG (SS) présente significativement une moins bonne croissance qu'une des deux souches dite tolérantes.

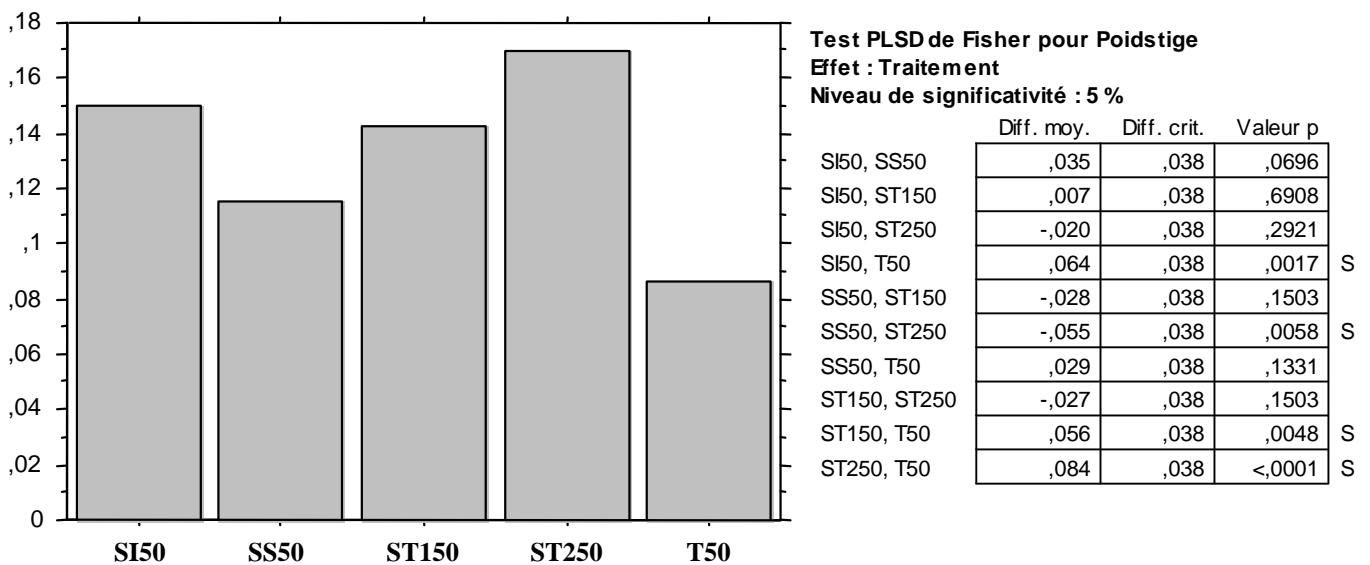


Figure 12 : Poids secs (en g) des parties aériennes des plantes sous 5 conditions d'inoculation, avec un stress hydrique modéré. Où l'on voit que des différences significatives apparaissent entre inoculums.

Il semble donc qu'en condition de stress modéré, la réponse du couple plante-bactérie n'est pas linéaire mais dépend de la souche utilisée. Il est clair que cela est trop tôt pour suggérer un lien de relation entre la réponse au PEG et ce résultat. Mais il est notable que, par hasard peut être certes, c'est la souche sensible qui présente le déficit de croissance le plus marqué, la meilleure croissance étant pour une souche tolérante. De plus, cette différence de réponse ne s'exprime que dans une fenêtre biologiquement compréhensible, à savoir sous un stress modéré. Ce résultat est à approfondir, et la corrélation entre résistance de la souche et meilleure croissance du couple symbiotique est à confirmer. Mais il laisse ouverte une piste prometteuse de développement et d'amélioration de la culture de *Zornia* via un choix de souches sélectionnées.

PROJET DE RECHERCHE

Les projets de recherche que je souhaite développer au cours des années à venir se place dans le cadre de mon affectation à Rabat, au sein du Laboratoire de Microbiologie et de Biologie Moléculaire de l'Université Mohammed V à compter du 1^{er} août 2008, équipe dirigée par le professeur Karim Filali-Maltouf. Ces projets vont faire sensiblement évoluer mes thématique de recherche, pour inclure les approches de métagénomique, et englober les contraintes pédoclimatiques liées à la sécheresse, mais en gardant un background de génétique évolutive et de génétique des populations.

1/ Légumineuses, bactéries symbiotiques et adaptation aux contraintes édaphiques.

Objectifs du projet

Dans le but de contribuer à la mise en place d'une agriculture durable et une gestion raisonnable et optimisée des ressources naturelles, nous nous proposons d'étudier des souches de rhizobium spécifiques des différentes légumineuses traditionnelles cultivées au Maroc, telles que la vesce (*Vicia sativa*), le pois (*Pisum sativum*), la lentille (*Lens culinaris*) ou le faux orobe (*Vicia ervilia*) (photo 2). Ces souches sont capables de fixer l'azote atmosphérique dans les conditions de stress édapho-climatiques prévalant dans les zones de production étudiées. Les propriétés symbiotiques sont encore insuffisamment exploitées pour améliorer la croissance et la productivité de ces plantes dans les environnements agroclimatiques difficiles (sécheresse et salinité).

Photo 2 : Diversité des légumineuses traditionnelles marocaines. Ces légumineuses, fourragères et alimentaires, sont cultivées dans la zone du rif, au nord du Maroc, et forment des populations composites locales cultivées dans les villages.



Vicia sativa (Vesce cultivée), Kerfala.



Pisum sativum (Pois), Kehla



Vicia ervilia (Faux orobe) Kersana

Photos : M. Ater

Les objectifs spécifiques de cette partie sont:

- Isoler et identifier de nouvelles souches de rhizobium spécifiques de différentes légumineuses traditionnelles du Maroc capables de tolérer les principaux stress prévalant dans les sols d'origine, notamment le stress hydrique.

- Etudier la diversité et la structuration des populations de rhizobia et de leurs plantes hôtes spécifiques
- Evaluer la co-évolution et la co-adaptation des souches bactériennes et des génotypes locaux de légumineuses
- Évaluer au laboratoire l'effet stimulateur éventuel des isolats sélectionnés sur l'efficacité à fixer l'azote sous condition de stress des génotypes de légumineuses spécifiques.

Les légumineuses alimentaires

La demande en protéines végétales pour la nutrition humaine ne cesse d'augmenter au Maroc, comme partout ailleurs dans les pays du pourtour méditerranéen. Ceci peut être en rapport avec i) l'augmentation démographique et l'urbanisation, ii) la diminution constante des surfaces utilisables pour la production des légumineuses riches en protéines qui sont remplacées par des productions très compétitives sur le marché, telles les céréales, et iii) la baisse dans la production de protéines animales due à la pénurie en eau d'irrigation et/ou eau de pluie, surtout dans les régions arides et semi arides. Vu le haut contenu en protéines de leurs graines, les légumineuses sont des candidates attrayantes pour combler le déficit de production de protéines végétales dans ces pays. Cependant, à quelques exceptions près, il y a eu très peu d'amélioration dans les pratiques agricoles ces dernières années pour rehausser la production des légumineuses marocaines à graines traditionnellement cultivées telles que la fève, le pois chiche, la lentille et le petit pois. L'instabilité du rendement étant la principale contrainte limitant la productivité de ces plantes, une attention spéciale devrait être accordée aux facteurs limitants le rendement des légumineuses, tels le manque d'eau en quantité ou en qualité, les maladies et ravageurs, les itinéraires techniques et l'utilisation par les agriculteurs de populations locales issues des récoltes précédentes souvent non adaptées aux contraintes des différentes zones agro-écologiques.

Au Maroc, les pratiques agricoles traditionnelles ont régressé au cours du siècle dernier et ne subsistent qu'au sein des agrosystèmes traditionnels. On peut citer comme exemples les agrosystèmes de type «oasis», des montagnes ou de type arganeraie. Leurs principales caractéristiques peuvent être résumées dans les points suivants : Agriculture à caractère vivrier, grande diversité des cultures, prédominance de la micro (< 0.5 ha) et petite propriété (< 5 ha), SAU réduite et utilisation presque exclusive des variétés locales. De part ces caractéristiques très particulières, ces unités renferment de grandes potentialités en matière de ressources génétiques et peuvent constituer un véritable refuge de l'agrobiodiversité. Ainsi, les agrosystèmes traditionnels des montagnes rifaines représentent un bon exemple de zone refuge d'agrodiversité, notamment caractérisées par un milieu physique particulièrement défavorable (relief, terrain accidenté, pauvreté des sols, manque d'eau...) ainsi qu'à des spécificités socioéconomiques. Du point de vue richesse de la flore, la région rifaine est considérée comme un «Hot-Spot» de la biodiversité dans la région méditerranéenne.

Les variétés locales sont entendues dans le sens d'unités définies et gérées par les agriculteurs sur une zone géographique déterminée. Il s'agit de variétés populations très hétérogènes et dont la caractérisation et l'identification par des noms spécifiques sont très rares. Le polymorphisme phénotypique de ces variétés au niveau des champs est très spectaculaire et laisse prévoir une diversité génétique importante. Les données disponibles pour les céréales et les légumineuses ont permis d'évaluer qualitativement l'état de conservation de ces ressources. En effet, d'une manière approximative on peut les classer

suivant le niveau de régression estimée à partir des enquêtes avec les agriculteurs en trois classes : des cultures dont le patrimoine génétique est fortement menacé (blé, seigle, pois et pois chiche) aux cultures moyennement menacées (maïs, sorgho, dolique et faux orobe) et faiblement menacées (orge, fève et lentille). L'intensité de la régression pourrait s'expliquer entre autres par l'introduction de variétés sélectionnées plus performantes.

Du point de vue biodiversité agricole, on est en présence d'un important patrimoine génétique méconnu et dont l'évaluation et la valorisation n'ont jamais été réalisées. Les transformations socio-économiques et le changement des habitudes alimentaires, constituent une menace sérieuse d'érosion et de perte de ce patrimoine phytogénétique. Cette importante diversité correspond à un véritable réservoir de ressources génétiques et constitue un réel défi pour la conservation.

Bactéries symbiotiques et résistance au stress

Un facteur important délaissé par la recherche agronomique et qui doit jouer un rôle fondamental dans la stabilisation des rendements sous conditions de stress est la fixation biologique de l'azote, qui constitue l'atout principal des légumineuses par rapport à d'autres cultures. L'efficacité de la symbiose à tolérer un stress donné est le résultat de la capacité combinée de la plante et du rhizobium spécifique à dépasser un tel stress. C'est une différence importante par rapport aux autres plantes telles que les céréales dont le rendement a pu par exemple être amélioré sous déficit hydrique modéré. Donc, toute approche visant à rehausser la tolérance aux stress des légumineuses doit considérer les deux cibles à améliorer : la légumineuse hôte et la souche de rhizobium.

Dans le cas du déficit hydrique par exemple, une variation génétique concernant la réponse de la fixation de l'azote à ce stress parmi les cultivars de légumineuses a été démontrée, ce qui ouvre une possibilité réelle pour augmenter la tolérance de la fixation de l'azote au déficit d'eau à travers la sélection et l'amélioration génétique. Bien que les rhizobia colonisant les racines soient plus adaptés au stress hydrique que leur légumineuse hôte, ils montrent aussi des variations importantes de tolérance à ce stress. La plupart des espèces de bactéries tolérant ce déficit dépassent les conditions d'hyper-osmolarité en accumulant des substances, généralement organiques. En plus de l'ajustement osmotique, les solutés compatibles présentent des propriétés biologiques supplémentaires, telles que la stabilisation et la protection des enzymes, les acides nucléiques et les organites cellulaires, contre les effets du stress. Par conséquent, ils peuvent jouer un rôle considérable dans l'entretien de l'activité de la nitrogénase dans les bactéroïdes soumis au stress hydrique. Parmi les *Rhizobiaceae*, la réponse osmoadaptative a été largement étudiée chez les souches de *Sinorhizobium meliloti* tolérant la salinité (Link 1998). Cependant, concernant le stress hydrique, seul un nombre très limité de rhizobia isolés de sols affectés par la sécheresse a été étudié pour identifier leur capacité à accumuler des solutés compatibles.

Projet de recherche

Le projet de recherche portera sur l'évolution et l'adaptation des bactéries symbiotiques, d'une part vis-à-vis des contraintes environnementales associées à la sécheresse (stress hydriques, salins et de températures), d'autre part dans l'analyse de la diversité et l'adaptation des souches symbiotiques à des légumineuses alimentaires et fourragères

traditionnelles. Ces thématiques se placent donc dans un contexte d'écologie microbienne, avec des objectifs agronomiques et de gestion des ressources génétiques. Ces études seront menées à bien à l'aide d'approches de génétique des populations, de génomique et de physiologie.

Ce projet s'articule autour de plusieurs modèles biologiques. D'une part, des travaux porteront sur des souches de *R. leguminosarum* biovar *viciae* associées à la tribu des **Viceae**, *i.e. Vicia spp, Lens spp, Pisum spp et Lathyrus spp.* L'intérêt de ces souches est non seulement leur association avec des légumineuses d'intérêt agronomique, mais aussi nos connaissances déjà importantes sur leur génome (souche 3841 entièrement séquencée). Enfin, le modèle *Sinorhizobium – Medicago* se positionnera à une interface fondamentale et appliquée. Ces différents genres bactériens se différencient sur leur spectre d'hôte, mais aussi par l'architecture de leur génome (mégaplasmides, petits plasmides, chromosome seul) ou leurs niveaux de tolérance aux différents stress abiotiques étudiés.

La première phase, dont seront tributaires l'ensemble des phases ultérieures, consiste à échantillonner les souches bactériennes en population naturelle. Dans le cas des études portant sur la diversité des souches associées aux légumineuses traditionnelles cultivées, nous échantillonnerons des souches à l'endroit où sont cultivées ces légumineuses, mais en utilisant pour chaque piégeage des graines issues de la population échantillonnée. Cela nous permettra de sélectionner les souches a priori les mieux adaptées aux cultivars locaux. Cette approche est fondamentale dans la mise en évidence de phénomènes de co-adaptation locale. Inversement, dans une analyse de comparaison de diversité globale entre différents sols, le piégeage des souches se fera en utilisant les mêmes génotypes de plantes, voir plusieurs lignées de différentes espèces végétales dont les spécificités divergentes sont connues. Dans le cas d'une étude conjointe des deux partenaires plante et bactérie, l'échantillonnage bactérien s'accompagnera d'un échantillonnage végétal dans chaque population, sous la forme de graines et/ou de feuilles, récoltées si possible par descendance.

Les différentes souches bactériennes isolées seront caractérisées, tant d'un point de vue génétique que phénotypique. D'un point de vue physiologique, les niveaux de résistance/tolérance de l'ensemble de ces souches en culture seule seront testés au sein des différents laboratoires, tant vis-à-vis de la température (croissance à des gradients croissants de température) que de la salinité (variation des teneurs en NaCl du milieu de culture) ou de sécheresse. Ces analyses de diversité des souches seront complétées par l'analyse de diversité de séquences de loci spécifiquement impliqués dans la thermo-tolérance (*e.g.* chaperonnes *groEL*) et la réponse au stress osmotique (*e.g.* gènes *bet*, impliqués dans la voie métabolique de la glycine-betaine). Cette première étape d'analyse génétique permettra de répondre à différentes questions, telles que le niveau de diversité des souches en population naturelle ou l'existence de corrélation entre niveau de diversité observé et les conditions édaphiques et pédoclimatiques du sol échantillonné.

Les accessions végétales des plantes hôtes, notamment les cultivars locaux, seront également analysées pour leur diversité. Selon les cas, nous serons amenés à développer des marqueurs microsatellites ou bien à utiliser ceux référencés dans la bibliographie. Ceux-ci sont disponibles pour la plupart des légumineuses traditionnelles que nous souhaitons étudier. Des analyses classiques de génétique des populations permettront de structurer cette diversité végétale, en relation notamment avec des accessions provenant des banques de ressources génétiques.

Nous testerons ensuite, par des inoculations croisées entre populations, l'existence potentielle d'adaptation locale des souches symbiotiques avec leurs plantes hôtes. Ces tests seront réalisés non seulement en conditions optimales de culture, mais également en conditions stressantes afin d'évaluer l'effet de l'adaptation réciproque des deux partenaires sur la résistance globale du couple symbiotique. La croissance des plantes sera estimée en absence d'inoculation (avec apport suffisant d'azote assimilable) et sous effets de stress. Nous pourrons ainsi découpler des effets de résistance intrinsèques aux plantes, à l'effet de la coadaptation et aux effets de résistance liés à la bactérie, et répondre ainsi à une question récurrente de l'apport des symbioses sur l'adaptation des légumineuses cultivées en conditions stressantes.

Ces approches permettront une meilleure appréhension des méthodes de gestion des ressources génétiques tant végétales que bactériennes. Nous pourrons ainsi répondre aux questions de la pertinence d'un isolement systématique de chacun des partenaires dans toutes les populations échantillonnées, ou inversement si une couverture moins dense reste suffisante. Cet aspect semble primordial dans une optique de préservation de la diversité en vue de schéma de sélection futur sur des légumineuses adaptées aux nouvelles conditions environnementales dues aux changements climatiques annoncés.

2/ Métagénomique des sols.

On considère généralement qu'un gramme de sol contient entre 1000 et 10 000 espèces génomiques bactériennes différentes. La grande majorité de ces bactéries ne sont pas cultivables, et de fait ne forment pas d'association symbiotique avec des légumineuses. Une grande part de la diversité génomique n'est donc pas accessible via des méthodes classiques d'isolement, alors que les bases génétiques bactériennes d'adaptation à des conditions particulières sont présentes dans ces communautés. Afin de prendre en compte et analyser d'un point de vue fonctionnel et structurel cette diversité génomique, des approches dites de métagénomique sont développées depuis quelques années. Ces approches, avec pour base une extraction de l'ADN génomique total d'une communauté microbienne, permettent de cribler la présence de gènes spécifiques et de fonctions d'intérêt en conditions sélectives (via la création d'une banque), ou d'analyser des variations de structuration de la diversité génomique entre différentes conditions (via des séquençages de type 454). Je souhaite m'investir dans ces approches de recherche de déterminants de résistance / tolérance à des conditions extrêmes telles que la sécheresse qui seront alors élargies à des communautés bactériennes totales du sol, en intégrant ces méthodologies et des analyses de diversité, novatrices par rapport aux approches classiques de mutagenèse ou de complémentation.

Des travaux ont déjà été réalisés sur la diversité des communautés bactériennes en zones désertiques. L'idée de ce programme de recherche, en collaboration avec l'équipe du LMBM qui a déjà une expérience de l'étude de sols issus de zones extrêmes, et de comparer des sols géographiquement extrêmement proches mais fortement contrastés d'un point de vue pédoclimatiques. De telles conditions se retrouvent dans et en bordure des oasis.

Les sols récupérés en zone désertique et sous couvert de légumineuse au sein de l'oasis seront analysés par deux façons. D'une part l'ADN bactérien sera extrait (après isolement de la phase bactérienne) et un séquençage de type 454 sera réalisé. Les analyses permettront de

comparer les diversités microbiennes globales des deux types de sols, de structurer cette diversité en terme de séquences et de leur fréquence selon les conditions d'origine des sols. Nous pourrions alors, en fonction de ces variations de fréquences, d'émettre des hypothèses sur certaines séquences impliquées dans l'adaptation au stress hydrique. Ces hypothèses pourront ensuite être testées via la création des banques.

En effet, en parallèle l'ADN métagénomique sera directement cloné dans un hôte bactérien domestique comme *E. coli* permettant de générer des banques d'ADN métagénomique. Ces banques seront alors criblées selon plusieurs protocoles, que cela soit de façon moléculaire par hybridation après que l'ADN ait été extrait et déposé sur membrane, ou par criblage dans des conditions sélectives de croissance, ne révélant que ceux dont l'expression des gènes de l'insert permet la croissance. Nous rechercherons dans cette banque les gènes connus pour être impliqués dans la résistance au stress considéré, et le criblage se fera par mesure de résistance à des contraintes thermiques, hydriques ou salines. Ce projet, notamment la partie de séquence 454, faisait l'objet d'une réponse à l'appel d'offre ANR métagénomique. Le résultat se trouvant, pour cette partie, négatif, nous recherchons les nouvelles opportunités de soumission.

Parallèlement, un projet, actuellement déposé auprès du Génomoscope, porte sur l'étude de l'évolution et la restauration de la diversité microbienne dans un sol soumis à des contraintes pédoclimatiques fortes.

Les microbes présents dans le sol jouent un rôle indispensable dans des processus biochimiques et biologiques, tels que la décomposition de matière organique, la fertilité du sol, la préservation d'éléments nutritifs ou la structure physique du sol. En lien avec ces rôles, certains des microorganismes présents jouent un rôle crucial dans l'établissement et la survie d'un couvert végétal dans des conditions stressantes. Les champignons sont connus pour être très importants dans la résistance des plantes à la sécheresse, et des bactéries symbiotiques sont indispensables dans la revégétalisation de sol pauvre via leur rôle de fixation d'azote avec des légumineuses pionnières. Ainsi, dans un cadre de programme de revégétalisation, l'un des problèmes majeur porte sur la régénération de la diversité microbienne de sols ayant subi des stress hydrique et thermal durant plusieurs années. On ne sait rien des conditions et de la vitesse avec lesquelles une diversité efficiente pour être régénérée. De même, on peut s'interroger sur la présence, ou l'absence, de certaines fonctions métaboliques clés qui devraient être réintroduites, ou pas, artificiellement.

Les objectifs du projet sont (i) d'estimer la diversité microbienne présente dans un sol dégradé, (ii) analyser comment la diversité microbienne se restaure en appliquant des conditions variables relaxant certains de ces stress, (iii) de se focaliser sur les gènes qui apparaissent sélectionnés et importants dans cette phase de restauration de la diversité du sol.

Partant d'un seul échantillon de sol en voie de désertification, situé dans le sud du Maroc, nous appliquerons trois conditions d'évolution expérimentale : Ajout d'eau, ajout d'eau et de graines de *M. truncatula*, ajout d'eau et graines d'une espèce adaptée aux conditions de stress hydrique *Acacia raddiana*. Nous suivrons l'évolution de la diversité microbienne après 2, 6 et 12 mois. Cette diversité (incluant champignon et bactérie) et son évolution seront analysées par une approche de pyroséquençage, d'une part des 16S et 18S amplifiés en bulk, d'autre part de l'ADN total. Les séquences, notamment d'ADN total, seront

analysées qualitativement (présence / absence de fonctions clé) et quantitativement (évolution de fréquences de certaines fonctions).

Les projets de recherche que je souhaite développer au cours des 4 années à venir dans le cadre de mon affectation au Maroc vont donc pour partie rester sur le domaine de la génétique des populations, en intégrant des modèles biologiques locaux. Si certains points sont dans la continuité directe de ce que je réalisais déjà, telle que les analyses de coadaptation locale plante-bactérie ou les mesures de différenciation génétique entre sites, l'ouverture vers l'analyse des contraintes pédoclimatiques et l'intégration de la diversité végétale vont sensiblement influencer sur mes activités. Par ailleurs, je crois fermement que les thèmes de recherche ne peuvent plus se cantonner aux seules bactéries symbiotiques en occultant l'immense diversité microbienne du sol. Cette évolution, qui passe par des approches d'écologie microbienne et de métagénomique, sont aujourd'hui indispensables pour appréhender la diversité et l'évolution des bactéries symbiotiques.

Enfin dans un cadre plus général de la gestion de la recherche, et de la gestion de mes activités, le choix de partir pour a priori quelques années dans un pays du sud résulte d'une volonté personnelle d'une part de m'investir directement et in situ dans des problématiques écologiques et développementales de ces pays. Elle résulte également d'une volonté de partiellement échapper aux problématiques de recherche purement fondamentale et se réorienter vers des activités de recherche ayant également une vocation, à plus ou moins long terme, d'application. L'avenir me dira si ce choix était pertinent et judicieux. Je reste aujourd'hui tout à fait optimiste !

Bibliographie

- Alazard, D. (1990). "Nitrogen-Fixation in Pure Culture by Rhizobia Isolated from Stem Nodules of Tropical Aeschynomene Species." *Fems Microbiology Letters* **68**(1-2): 177-182.
- Ba, S., A. Willems, et al. (2002). "Symbiotic and taxonomic diversity of rhizobia isolated from Acacia tortilis subsp. raddiana in Africa." *Syst Appl Microbiol* **25**(1): 130-45.
- Bailly, X., I. Olivieri, et al. (2006). "Recombination and selection shape the molecular diversity pattern of nitrogen-fixing Sinorhizobium sp. associated to Medicago." *Mol Ecol* **15**(10): 2719-34.
- Biondi, E. G., E. Pilli, et al. (2003). "Genetic relationship of Sinorhizobium meliloti and Sinorhizobium medicae strains isolated from Caucasian region." *FEMS Microbiol Lett* **220**(2): 207-13.
- Bonsall, M. B., M. P. Hassell, et al. (2002). "Ecological trade-offs, resource partitioning, and coexistence in a host-parasitoid assemblage." *Ecology* **83**(4): 925-934.
- Chaintreuil, C., C. Boivin, et al. (2001). "Characterization of the common nodulation genes of the photosynthetic Bradyrhizobium sp. ORS285 reveals the presence of a new insertion sequence upstream of nodA." *FEMS Microbiol Lett* **194**(1): 83-6.
- Cohan, F. M. (2002). "Sexual isolation and speciation in bacteria." *Genetica* **116**(2-3): 359-370.
- Denison, R. F. and E. T. Kiers (2004). "Lifestyle alternatives for rhizobia: mutualism, parasitism, and forgoing symbiosis." *FEMS Microbiol Lett* **237**(2): 187-93.
- Douglas, A. E. (1998). "Host benefit and the evolution of specialization in symbiosis." *Heredity* **81**: 599-603.
- Garau, G., W. G. Reeve, et al. (2005). "The symbiotic requirements of different Medicago spp. suggest the evolution of Sinorhizobium meliloti and S-Medicae with hosts differentially adapted to soil pH." *Plant and Soil* **276**(1-2): 263-277.
- Garmiri, P., K. E. Coles, et al. (2008). "Role of outer membrane lipopolysaccharides in the protection of Salmonella enterica serovar Typhimurium from desiccation damage." *Fems Microbiology Letters* **281**(2): 155-159.
- Giraud, E., L. Hannibal, et al. (2000). "Effect of Bradyrhizobium photosynthesis on stem nodulation of Aeschynomene sensitiva." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14795-800.
- Giraud, E., L. Moulin, et al. (2007). "Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia." *Science* **316**(5829): 1307-12.
- Hughes, C. E., G. P. Lewis, et al. (2004). "Maranonium. A new dalbergioid legume genus (Leguminosae, papilionoideae) from Peru." *Systematic Botany* **29**(2): 366-374.
- Jones, K. M., N. Sharopova, et al. (2008). "Differential response of the plant Medicago truncatula to its symbiont Sinorhizobium meliloti or an exopolysaccharide-deficient mutant." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(2): 704-709.
- Kiers, E. T., M. G. Hutton, et al. (2007). "Human selection and the relaxation of legume defences against ineffective rhizobia." *Proc Biol Sci* **274**(1629): 3119-26.
- Kiers, E. T., R. A. Rousseau, et al. (2003). "Host sanctions and the legume-rhizobium mutualism." *Nature* **425**(6953): 78-81.
- Lane, S. D., C. M. St Mary, et al. (2006). "Coexistence of attack-limited parasitoids sequentially exploiting the same resource and its implications for biological control." *Annales Zoologici Fennici* **43**(1): 17-34.
- Mergaert, P., T. Uchiumi, et al. (2006). "Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the Rhizobium-legume symbiosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(13): 5230-5.
- Molouba, F., J. Lorquin, et al. (1999). "Photosynthetic bradyrhizobia from Aeschynomene spp. are specific to stem-nodulated species and form a separate 16S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group." *Appl Environ Microbiol* **65**(7): 3084-94.
- Moulin, L., G. Bena, et al. (2004). "Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the Bradyrhizobium genus." *Mol Phylogenet Evol* **30**(3): 720-32.
- Moulin, L., A. Munive, et al. (2001). "Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria." *Nature* **411**(6840): 948-50.
- Page, R. D. M. and M. S. Hafner (1996). Molecular phylogenies and host-parasite cospeciation: gophers and lice as a model system. *New used for new phylogenies*. P. H. Harvey, A. J. Leugh Brown, J. Maynard Smith and N. S. New Yor, Oxford University Press: 255-270.
- Parker, M. A. (1999). "Mutualism in metapopulations of legumes and rhizobia." *Am Nat* **153**: S48-S60.
- Perez-Mendoza, D., E. Sepulveda, et al. (2005). "Identification of the rctA gene, which is required for repression of conjugative transfer of rhizobial symbiotic megaplasmids." *J Bacteriol* **187**(21): 7341-50.
- Provorov, N. A. (1994). "The Interdependence between Taxonomy of Legumes and Specificity of Their Interaction with Rhizobia in Relation to Evolution of the Symbiosis." *Symbiosis* **17**(2-3): 183-200.

- Rome, S., M. P. Fernandez, et al. (1996). "Sinorhizobium medicae sp. nov., isolated from annual Medicago spp." Int J Syst Bacteriol **46**(4): 972-80.
- Roumiantseva, M. L., E. E. Andronov, et al. (2002). "Diversity of Sinorhizobium meliloti from the central Asian alfalfa gene center." Applied and Environmental Microbiology **68**(9): 4694-4697.
- van Berkum, P., R. E. Tully, et al. (1995). "Nonpigmented and Bacteriochlorophyll-Containing Bradyrhizobia Isolated from Aeschynomene indica." Appl Environ Microbiol **61**(2): 623-629.
- Vinuesa, P., C. Silva, et al. (2005). "Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in Bradyrhizobium species cohesion and delineation." Mol Phylogenet Evol **34**(1): 29-54.
- West, S. A., E. T. Kiers, et al. (2002). "Sanctions and mutualism stability: why do rhizobia fix nitrogen?" Proc Biol Sci **269**(1492): 685-94.