

**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Evolution et Ecologie

Ecole Doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosiences et Environnement.

Présentée et soutenue publiquement le 5 Décembre 2008

Par

Cécile RANGIN

Titre :

**Phylogéographie, compétition et sélection chez les bactéries
symbiotiques *Sinorhizobium meliloti* et *Sinorhizobium medicae*.**

JURY

**M. Marc-André SELOSSE
M. Philippe NORMAND
M. Nicolas TORO
M. Philippe ROUMAGNAC
M. Gilles BENA**

**Professeur, Université Montpellier II
Directeur de Recherche CNRS, Lyon
Professeur, Université de Grenade, Espagne
Chargé de Recherche CEA, Aix – Marseille
Chargé de Recherche IRD, Montpellier**

**Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse**

**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Evolution et Ecologie

Ecole Doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosiences et Environnement.

Présentée et soutenue publiquement le 5 Décembre 2008

Par

Cécile RANGIN

Titre :

**Phylogéographie, compétition et sélection chez les bactéries
symbiotiques *Sinorhizobium meliloti* et *Sinorhizobium medicae*.**

JURY

**M. Marc-André SELOSSE
M. Philippe NORMAND
M. Nicolas TORO
M. Philippe ROUMAGNAC
M. Gilles BENA**

**Professeur, Université Montpellier II
Directeur de Recherche CNRS, Lyon
Professeur, Université de Grenade, Espagne
Chargé de Recherche CEA, Aix – Marseille
Chargé de Recherche IRD, Montpellier**

**Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse**

REMERCIEMENTS

Merci à tous me semble être le mot le plus approprié pour commencer non seulement cette partie « remerciements » mais aussi pour introduire cette thèse. En effet, les personnes citées ici ont été précieuses et c'est en grande partie grâce à elles que le travail présenté dans cette thèse a été possible.

Avant toute chose, je voudrais remercier les examinateurs de ce travail qui me font l'honneur de le juger. En l'occurrence, je remercie Philippe Normand, Nicolas Toro, Marc-André Sélosse et Philippe Roumagnac. Je voudrais aussi remercier Bernard qui m'a accueilli dans son laboratoire.

Mes plus sincères remerciements s'adressent à Gilles, mon directeur de thèse. Il a tout d'abord laissé sa chance à cette jeune étudiante, fraîchement arrivé de Paris via les Pays-Bas, qui ne connaissait rien en évolution ni aucun labo à Montpellier (mis à part le LSTM), et son encadrement irréprochable pendant mon DEA m'a permis d'obtenir le grâle qu'est la bourse de thèse. Pendant ces trois de thèse, il a présenté une disponibilité sans faille pour discuter des résultats et d'interprétations, ou même de choses bien plus pratiques ou futiles. Il a aussi su être là pour me remettre les pieds sur terre et éviter mes envolées hypothétiques, mais toujours avec le plus tact. Les nombreuses discussions scientifiques que nous avons pu avoir m'ont énormément aidé et formé, et je le remercie d'avoir toujours pris le temps et d'avoir été très présent, même depuis le Maroc. Je n'oublierai forcément pas sa bonne humeur, son optimisme, sa joie de vivre et sa tolérance qui m'ont permis de rester enthousiaste et qui ont rendu ces trois ans des plus agréables. Enfin, je voudrais le remercier pour la confiance qu'il m'a accordé, tant pour les expériences, les congrès ou les congés. Ses nombreuses qualités humaines et scientifiques ont fait que « non, si je n'ai pas envie de tuer le père ! ». Aujourd'hui, je considère qu'il est pour beaucoup dans l'obtention de cet autre grâle, la thèse elle-même. Un vrai immense merci à une personne que j'estime!

Mes remerciements les plus chaleureux s'adressent aussi à Jean-Claude, mon co-directeur de thèse. Sa disponibilité infaillible et son soutien ont été admirables ; son amabilité, sa confiance et sa sincérité m'ont aussi aidé quotidiennement pendant ces trois années. En plus des nombreuses connaissances agronomiques et microbiologiques qu'il m'a appris, je voudrais le remercier pour m'avoir expliqué le monde mystérieux des abeilles ainsi que le mode migratoire des graines de *Medicago* jusqu'en Australie.

J'ai eu la chance d'avoir d'autres interlocuteurs très avisés pour me conseiller pendant ces trois ans. Tout d'abord Xavier, qui m'a fait croire qu'il fallait utiliser des mots que peu de personnes comprennent pour faire de l'évolution. Vraiment merci d'avoir toujours pris du temps (même depuis l'Angleterre) pour parler sélection ou recombinaison. Merci aussi à Gisèle, qui s'est non seulement toujours rendue disponible pour discuter diversité ou tests statistiques, mais qui m'a aussi rendu de grands services par ses remarques très constructives. Mes remerciements se dirigent aussi vers Brigitte, qui a affiné mes raisonnements, tant sur les génomes bactériens ou sur la structuration de mes rédactions. Merci à Joëlle pour avoir participé à mes comités de thèse et pour avoir apporté ses connaissances d'évolution végétale. Un très grand merci à Jean-Marie et Magalie pour le nombre important de graines qu'ils m'ont fourni, toujours avec la plus grande gentillesse. Merci aussi à Marc qui m'a expliqué et aidé dans la mise en place du split-root. Je n'oublierais pas de remercier Gilles pour les ACP et les AD ainsi qu'Etienne pour les CCA.

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide de plusieurs personnes qui m'ont donné de bons coups de mains pour les manipulations. Hormis la majorité des gens cités ci-dessus, je voudrais tout particulièrement remercier d'autres personnes dont l'aide a été précieuse. Merci à Lucette, qui a été présente tant sur la croissance des plantes que sur l'isolement de bactéries. Merci à Marjorie, qui a travaillé avec rigueur et optimisme sur les manipulations, et qui, après avoir accepté de passer un été en chambre froide est même revenue travailler avec nous. Merci à Naima, qui m'a préparé tant de litres de milieu de culture et pour son thé à la menthe. Merci à Yves qui s'est extasié sur les cordons de *Medicago*.

Lionel fait partie des personnes que je tiens à remercier. Sa proximité géographique y est certainement pour quelque chose, mais c'est surtout son ouverture scientifique et son humour raffiné qui m'ont donné envie d'aller souvent discuter avec lui. Nico a l'avantage d'être remercié non seulement pour ses questions scientifiques sur l'intérêt de mon étude, mais aussi pour les sessions windsurf qui sont de très bons souvenirs. Nathalie pourrait avoir une ovation tant elle a su débrouiller toute situation et avec une telle gentillesse. Antoine le sportif, Katia la rêveuse, Fabienne la citadine, Lucie la malchanceuse, Agnieszka la voyageuse, Fatou l'élégante ont aussi égaillé mon quotidien. Merci aussi à Christine qui s'efforce à nous maintenir tous en sécurité. Enfin merci à tout le personnel du LSTM.

Forcément, je ne pourrais jamais oublier les stagiaires du bureau du fond, avec qui j'ai passé ces trois ans. Merci aux filles (Céline, Adeline, Marie-Mathilde, Laurie et Angèle) pour tous ces instants où nos rigolades ont vraiment été de bons moments. Bon courage et bonne chance à vous toutes pour l'avenir ! Les rares hommes qui ont osé s'installer dans cette salle aux hormones féminines ne seront pas en reste de remerciements, en particulier Diégane et Eddy.

Avant de remercier les étudiants de la fac pour leurs questions-pièges, je tiens à remercier Lydia, qui a toujours parfaitement préparé la salle de TP et Pierre, pour avoir organisé les enseignements de physiologie végétale. Je n'oublierais pas de remercier les personnes du LSTM de la fac : Guilhem qui m'a souvent aidé et conseillé sur l'enseignement, Bruno, qui m'a expliqué certaines réformes de l'université et enfin Marc et Fabrice pour leur amabilité.

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont fait aimer la science et/ou découvrir la vie au laboratoire et qui m'ont ainsi permis d'en arriver à la thèse. Plus particulièrement, merci à Hans, Peter, Michel, Myriam, Heather, Alba et Isabelle. Un grand merci aussi à Daphnée, pour nos longues discussions psycho-scientifiques.

Du côté plus personnel, je voudrais remercier ceux qui me sont chers. Rémi a été d'un soutien inébranlable malgré la distance géographique, m'a fait croire que prendre l'avion c'est comme prendre le bus et m'a procuré des bols d'air à répétition. Mes parents m'ont aussi beaucoup épaulé, non seulement pendant la thèse mais depuis toujours. Mon père m'a fait aimer la recherche, bien avant que je ne sache ce que cela signifiait et ma mère m'a fait comprendre que ce métier n'était pas incompatible avec le bonheur. Enfin, merci à toute ma famille et à tous mes amis qui m'ont permis d'être heureuse.

Merci à vous tous, même ceux que j'ai oublié, vraiment merci !

SOMMAIRE

I-	Introduction bibliographique	3
1-	Symbiose fixatrice d'azote.....	3
a-	Importance écologique et agronomique de la fixation d'azote	3
b-	La spécificité	5
2-	Quelques concepts de l'évolution bactérienne.....	9
a-	La population	9
b-	L'adaptation	13
c-	La compétition pour la nodulation.....	14
d-	La coévolution	15
3-	Biogéographie.....	17
a-	Définition et hypothèses.....	17
b-	Exemples d'analyses biogéographiques bactériennes.....	19
4-	Le couple <i>Sinorhizobium</i> sp. – <i>Medicago</i> sp.....	23
a-	Spécificité d'hôte des deux partenaires.....	23
b-	Diversité génétique des souches de <i>Sinorhizobium</i>	25
c-	Facteurs biotiques et abiotiques régissant la structuration des populations bactériennes ..	30
5-	Introduction de la thèse	32
II-	Compétition en population naturelle	33
1-	Introduction.....	33
2-	Manuscrit 1 (accepté)	34
3-	Discussion complémentaire	44
4-	Perspectives	46
III-	Sanction des bactéries tricheuses par la plante-hôte	48
1-	Introduction.....	48
2-	Manuscrit 2 (à resoumettre)	49
3-	Perspectives	59
a-	Sanction « populationnelle »	59
b-	Comparaison génomique et transcriptomique des souches	60
IV-	Analyse phylogéographique sur le pourtour du bassin méditerranéen	61
1-	Introduction.....	61
2-	Expérimentations préliminaires	62
a-	Différentiel de croissance des plantes issues du piégeage bactérien.....	62
b-	Efficacité symbiotique	64
3-	Manuscrit 3 (en préparation).....	65
4-	Perspectives	86
a-	Souches recombinantes atypiques	86
b-	Description et répartition spatiale de <i>S. meliloti</i> bv <i>rigiduloides</i>	86
c-	Spécificité d'hôte particulière	88
d-	Analyse des paramètres environnementaux.....	89

V-	Adaptation locale à l'échelle du Sud de la France et du bassin méditerranéen	91
1-	Introduction.....	91
2-	Manuscrit 4 (en préparation).....	92
3-	Perspectives	115
VI-	Comparaison des populations bactériennes issues des nodosités et de la rhizosphère	116
1-	Introduction.....	116
2-	Manuscrit 5 (en préparation).....	116
3-	Perspectives	130
a-	Nouvelle approche expérimentale	130
b-	Influence des rotations de culture sur la diversité des bactéries symbiotiques.....	131
VII-	Evolution expérimentale de <i>Sinorhizobium medicae</i>	132
1-	Introduction.....	132
2-	Manuscrit 6 (en préparation).....	133
3-	Perspectives	145
VIII-	Conclusion générale	147
1-	Modèle d'étude.....	147
2-	Structuration spatiale des deux espèces bactériennes	147
3-	Maintien des deux espèces bactériennes en interaction avec la même plante-hôte	149
4-	Comparaison de la diversité entre les deux espèces bactériennes	150
5-	Structuration spatiale de la diversité intraspécifique.....	151
6-	Polymorphisme symbiotique.....	154
7-	Coévolution chez le couple <i>Medicago sp</i> – <i>Sinorhizobium sp.</i>	155
8-	Futur du modèle.....	155
IX-	Références bibliographiques	156

CHAPITRE I :

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I- Introduction bibliographique

1- Symbiose fixatrice d'azote

a- Importance écologique et agronomique de la fixation d'azote

Parmi les éléments majeurs constitutifs de la matière vivante, l'azote est l'élément majoritaire de l'atmosphère, participant à plus de 80 % de l'air. Cependant, seuls quelques procaryotes ont la capacité d'assimiler cette forme d'azote libre (N_2), les eucaryotes en étant incapables. Ainsi, les plantes peuvent uniquement assimiler l'azote sous forme combinée (NH_4^+ , NO_3^{2-} , ...) ou intégrée dans des molécules organiques.

La fixation biologique de l'azote est une fonction accessoire très répandue dans le monde vivant. Les microorganismes fixateurs d'azote appartiennent aux deux règnes des procaryotes (sur les trois règnes existants) : les archaebactéries (archées) et les eubactéries (bactéries) (Young, 1992). Chez les eubactéries, les fixateurs d'azote se retrouvent dans la plupart des grands groupes bactériens comprenant des anaérobies (*Clostridium*), des aérobies (*Azobacter*), des photosynthétiques (*Bradyrhizobium*), des cyanobactéries (*Synechococcus*) ou encore des actinomycètes (*Frankia*). Les fixateurs d'azote peuvent être sous forme libre dans un environnement terrestre, marin ou extrême, ou peuvent être en étroite association avec des partenaires eucaryotes animaux (*Teredinibacter turnerae*) (Lechene *et al.*, 2007) ou végétaux.

Deux types de symbioses incluant un partenaire végétal et une bactérie fixatrice d'azote sont connus à ce jour : les symbioses *Frankia* – plante actinorhizienne et les symbioses rhizobium – légumineuse (encadré 1), développées ci-après.

Du fait de l'interaction symbiotique avec les rhizobia, les légumineuses sont capables de croître indépendamment de la présence de composés azotés dans le sol et sont donc des candidats potentiels pour l'agriculture en tant qu'engrais vert azoté ou pour l'enrichissement des sols. De plus, de nombreuses légumineuses constituent une source majeure de protéines et d'huiles végétales (Graham, Vance, 2003), sont intégrés à la nutrition animale et humaine, ou procurent un intérêt dérivé (chauffage, ornemental, ...). Ces intérêts agronomiques et écologiques font que ces plantes sont d'une part largement cultivées sur la planète mais aussi largement étudiées par les équipes de recherche scientifique. Comme exemple, nous pouvons citer le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le soja (*Glycine max*), le pois (*Pisum sativum*), la fève (*Vicia faba*), le pois-chiche (*Cicer arietinum*), la lentille (*Lens*

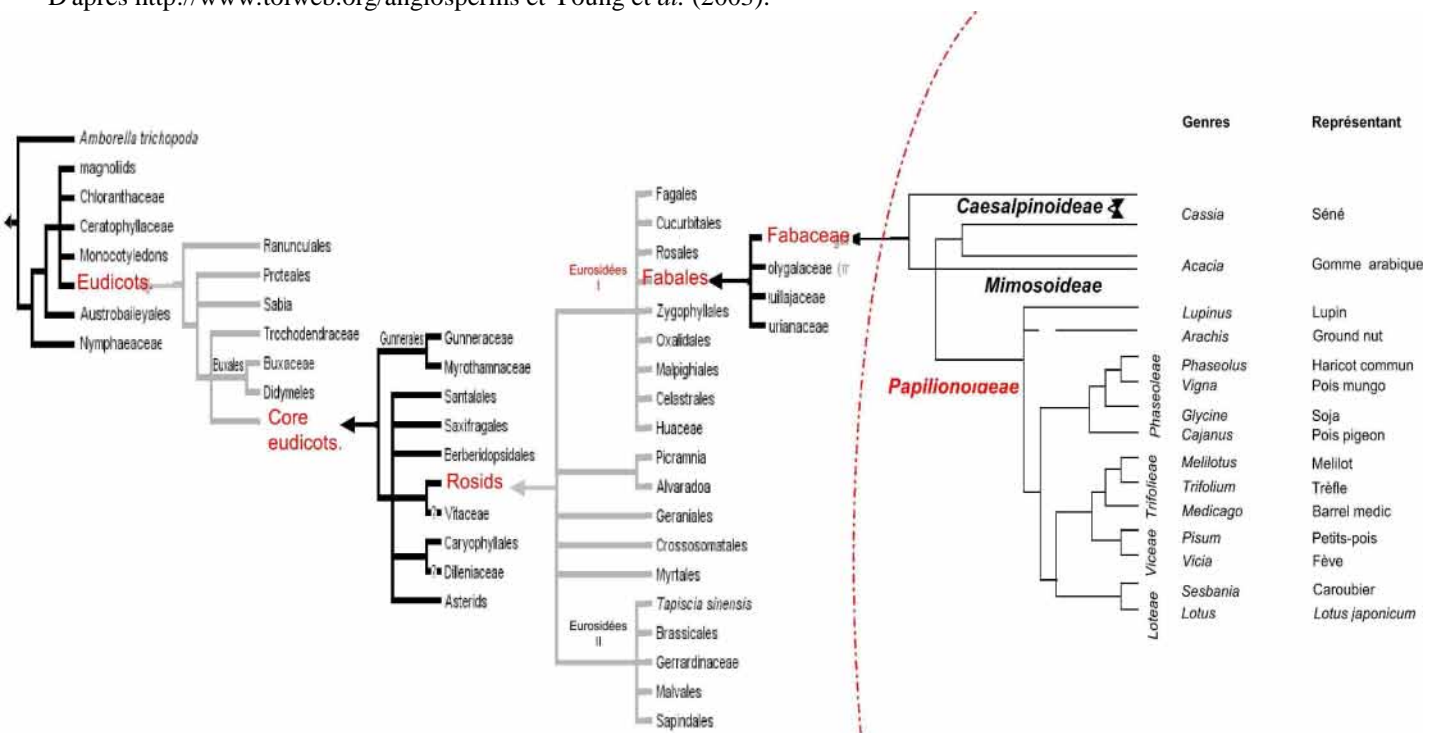
Encadré 1 : Brèves classifications des partenaires de la symbiose rhizobium – légumineuse.

Les légumineuses (Leguminosae ou Fabaceae), de l'ordre des Fabales forment une famille très diversifiée qui présente une répartition mondiale, démontrant ainsi une grande capacité d'adaptation à différentes conditions pédoclimatiques. Cette famille se subdivise en trois sous-familles : les Caesalpinoïdeae, les Mimosoïdeae et les Papilionoïdeae, cette dernière étant la sous famille la plus diversifiée (environ 430 genres et 12000 espèces) dont 97 % des espèces testées (21 % du total) sont nodulées par des rhizobia (Faria *et al.*, 1989) (figure I.1.1).

Les rhizobia sont des bactéries du sol capables d'induire une nodulation racinaires ou caulinaires et de coloniser les cellules végétales pour ensuite y fixer l'azote atmosphérique. Ce groupe n'a pas de fondement taxonomique. On exclut de cette définition les actinobactéries du genre Frankia qui présentent un spectre de nodulation en dehors des légumineuses. Les rhizobia ont été retrouvés jusqu'à présent uniquement dans le phylum des protéobactéries et les classes des alpha-proteobacteria et des beta-proteobacteria comprennent respectivement dix (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Phyllobacterium*, *Ochrobacterium*, *Blastobacter*, *Devosia*) et trois (*Burkholderia*, *Cupriavidus* et *Herbaspirillum*) genres répertoriés.

Les différents genres de rhizobia auraient divergé avant l'apparition des légumineuses, cette dernière datant 140 millions d'années (Turner, Young, 2000). Le premier ancêtre commun des rhizobia daterait de 500 millions d'années, soit bien avant l'apparition des plantes terrestres (Turner, Young, 2000). Il semble raisonnable de supposer que, pendant la majeure partie de cette période, les rhizobia n'étaient pas symbiotiques mais survivaient dans le sol sous forme libre ou en association non symbiotique avec les premières plantes terrestres, dans la rhizosphère par exemple. La symbiose entre les rhizobia et les légumineuses serait apparue il y a 60 millions d'années (Lavin *et al.*, 2005). Le manque de structures fossiles complique la datation de l'apparition de cette symbiose.

Figure I.1.1 : Phylogénie des légumineuses. Les Légumineuses sont regroupées en trois grandes sous-familles : *Mimosoïdeae*, *Caesalpinoïdeae* et *Papilionoïdeae*, comprenant de nombreuses espèces cultivées. D'après <http://www.tolweb.org/angiosperms> et Young *et al.* (2003).



esculenta), le niébé (*Vigna unguiculata*), la cacahuète (*Arachis hypogea*), le lotier (*Lotus japonicus*) ou la luzerne (*Medicago sativa*) sur lesquels de nombreux programmes de recherche, tant appliqués que fondamentaux, se poursuivent.

b- La spécificité

L'une des caractéristiques majeures de la symbiose rhizobium-légumineuse est sa spécificité. En effet, un rhizobium donné n'est capable d'établir une symbiose fixatrice d'azote qu'avec un nombre limité d'espèces végétales, défini comme son spectre d'hôte. Inversement, une espèce de légumineuse donnée ne pourra établir une association symbiotique qu'avec une ou plusieurs espèces ou genres de rhizobia, définissant ainsi un spectre d'hôte de la légumineuse. Les variations d'amplitude du spectre d'hôte bactérien et des légumineuses sont cependant très importantes. Ainsi les associations peuvent être très spécifiques (aussi appelées spécialistes) dans le cas d'un seul symbiote possible, jusqu'à généralistes, lorsque le spectre d'hôte est large. A titre d'exemples pour le partenaire bactérien, nous pouvons citer *Azorhizobium caulinodans* qui ne s'associe qu'avec *Sesbania rostrata* (Dreyfus *et al.*, 1988) ou inversement *Sinorhizobium* sp. NGR234 qui s'associe avec près de 120 genres végétaux (Pueppke, Broughton, 1999). En tenant compte des études de spectre d'hôte effectuées jusqu'alors, il semblerait que la diversité d'association symbiotique ne dépende ni de la taxonomie bactérienne, ni de celle des légumineuses, ni de la situation géographique ou de l'habitat écologique des légumineuses.

Lors du dialogue moléculaire entre les rhizobia et les légumineuses (encadré 2), au moins cinq niveaux de reconnaissance peuvent être considérés comme des étapes clefs de la spécificité symbiotique.

Parmi les 4000 flavonoïdes identifiés chez les plantes vasculaires, seules quelques classes particulières de flavonoïdes sont impliquées dans la spécificité d'hôte chez les légumineuses (Aoki *et al.*, 2000). Par exemple, la sous-classe des isoflavonoïdes est restreinte à la sous-famille des *Papilionoideae* (Dixon *et al.*, 2002). Ces flavonoïdes sont par la suite reconnus spécifiquement par des protéines régulatrices bactériennes (*NodD*). La protéine *NodD* ayant plus d'affinité pour le flavonoïde que pour l'ADN bactérien où elle se fixe, l'association libère cet ADN et permet la transcription des gènes *nod*. Ainsi, la reconnaissance des flavonoïdes est le premier niveau de spécificité.

Encadré 2 : Le dialogue moléculaire spécifique dans la symbiose rhizobium – légumineuse.

La symbiose rhizobium - légumineuse aboutit à la formation d'un organe au niveau des racines (et/ou des tiges), le nodule fixateur d'azote. Il existe deux modes d'infection chez les légumineuses.

Le premier mode, détaillé dans la figure I.1.2, s'effectue par voie intracellulaire par l'intermédiaire d'un cordon d'infection qui permet l'acheminement des bactéries vers les cellules du nodule fixateur. Ce mode d'infection est par exemple observé chez la luzerne (/ *Sinorhizobium meliloti*), le soja (/ *Bradyrhizobium japonicum*) ou le pois (/ *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*).

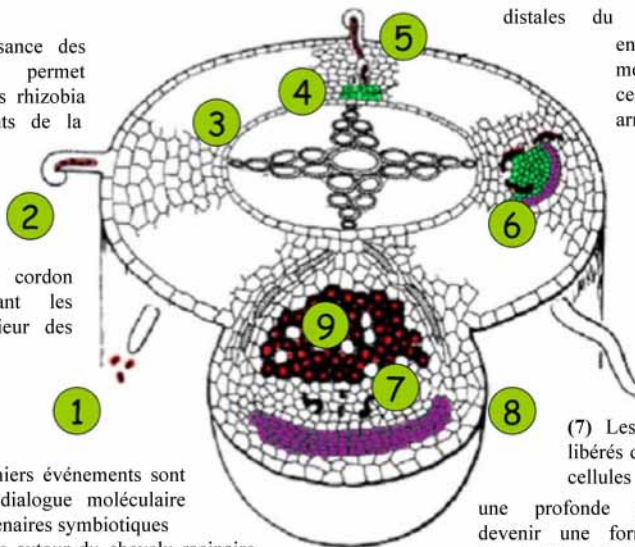
(4) Des divisions successives mènent à la formation d'un primordium nodulaire.

(5) Les cordons d'infection avancent vers le primordium.

(3) En même temps, des cellules corticales en face du site d'infection sont activées, se différencient et se divisent.

(6) Quand ils atteignent les cellules du primordium, les rhizobia sont libérés dans le cytoplasme des cellules hôte. Les cellules les plus distales du primordium, non envahies, forment un méristème tandis que les cellules infectées arrêtent de se diviser et débutent un processus de différenciation en cellules fixatrices d'azote.

(2) La reconnaissance des facteurs Nod permet "l'attachement" des rhizobia aux poils absorbants de la racine marquant ainsi le début de l'infection par la formation de structures tubulaires ou cordon d'infection guidant les rhizobia à l'intérieur des tissus de la plante.



(1) Les deux premiers événements sont amorcés par un dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques dans la rhizosphère autour du chevelu racinaire. Les flavonoïdes exsudés par la racine sont détectés par les rhizobia et mènent à la synthèse d'un signal réciproque bactérien nommé le facteur Nod.

(7) Les rhizobia récemment libérés dans le cytoplasme des cellules végétales subissent une profonde transformation pour devenir une forme mature fixatrice d'azote, le bactéroïde.

(8) L'activité du méristème est persistante et le processus d'infection continu. Par conséquent, le nodule formé est composé de différentes zones différentes : la zone I correspondant au méristème, la zone II correspondant à la zone de différenciation et l'infection, La zone III composée de cellules hôtes remplies de bactéroïdes fixateurs d'azote (9) et une zone IV ou zone de sénescence.

Figure I.1.2 : Schéma global du processus d'infection jusqu'à la formation du nodule fonctionnel chez *Medicago*. (http://www.isv.cnrs-gif.fr/ak/theme_symbios.html)

Le second mode d'infection s'effectue par crack-entry, c'est-à-dire par voie intercellulaire, souvent au niveau de l'émergence de racines latérales ou adventives. Ce mode d'infection est par exemple observé chez *Sesbania rostrata* ou *Aschynomene indica* ORS 278. Il est à noter qu'une étude récente (Giraud *et al.*, 2007) a montré l'absence des gènes communs *NodA* et *NodC* dans le génome de bactéries fixatrices d'azote (*Bradyrhizobium* sp. ORS 278 et BTai1), supposant une voie alternative du dialogue moléculaire conduisant à la nodulation.

Cette reconnaissance spécifique entraîne la transcription des gènes de nodulation, regroupés en cluster (gène *nod*, *noe* et *nol*). Les gènes *nod* peuvent être classés en deux familles : les gènes *nod* communs, présents dans le génome de tous les rhizobia (impliquant une voie de signalisation par les facteurs Nod) et impliqués dans la synthèse du squelette de base des facteurs Nod, et les gènes *nod* spécifiques codant pour des enzymes impliquées dans l'ajout de diverses substitutions chimiques autour du squelette de base des facteurs Nod, dont la nature et la présence varient d'une souche à l'autre (pour revue, voir Downie (1998)). Les produits des gènes *nod*, *noe* et *nol* sont impliqués dans la biosynthèse de lipochitoooligosaccharides appelés facteurs Nod. Cette grande variation structurale des facteurs Nod constitue le second niveau de spécificité, la réponse des plantes à ces facteurs étant variables selon leur structure.

Il semblerait que d'autres facteurs influencent l'établissement de la symbiose, à la fois pendant l'infection mais surtout au cours de ses étapes plus tardives (Broughton, Perret, 1999; Spaink, 2000; Stougaard, 2000). Les polysaccharides de surface, qui s'accumulent pour former un complexe macromoléculaire autour de la bactérie jouent un rôle important dans l'interaction bactérie – plante et constitue un autre niveau de spécificité. On distingue les exopolysaccharides (EPS), les lipopolysaccharides (LPS), les polysaccharides capsulaires (CPS et KPS), et les β glucanes cycliques. L'utilisation de mutants a montré que plusieurs polysaccharides de surface sont impliqués dans l'efficacité de l'invasion du nodule (Pellock *et al.*, 2000). De plus, les EPS interviennent dans l'initiation et l'élongation des cordons d'infection (Cheng, Walker, 1998) alors que les LPS jouent aussi un rôle dans la suppression des réactions de défenses de la plante au cours de l'infection (Tellstrom *et al.*, 2007).

Les systèmes de sécrétion des bactéries, qui permettent le contact et la sécrétion de protéines de virulence dans les interactions hôtes-pathogènes, participent aussi à la mise en place de la symbiose au moins chez *Sinorhizobium* sp. NGR234 (Marie *et al.*, 2003) et sont impliqués dans la spécificité de l'interaction. L'avancement des connaissances sur le rôle symbiotique des protéines sécrétées par les systèmes de sécrétion est décrit dans la revue de Fauvart et Michiels (2008).

Encadré 3 : Echange de métabolites dans la symbiose rhizobium – légumineuse.

Dans la symbiose fixatrice d'azote, la plante offre une niche écologique favorable au développement de la bactérie. Les deux partenaires échangent réciproquement des composés. L'azote fourni par la bactérie à la plante est sous forme d'ammonium. En retour, du carbone, sous forme d'acides dicarboxyliques (fumarate, succinate ou malate), est procuré à la bactérie par la plante (Poole, Allaway, 2000). Ces acides sont oxydés afin de produire l'énergie nécessaire à la fixation d'azote par les bactéroïdes. Un échange d'acides aminés entre les deux protagonistes serait nécessaire au bon fonctionnement du mutualisme (Lodwig *et al.*, 2003; Prell, Poole, 2006). Le modèle proposé est schématisé sur la figure I.1.3, mais les acides aminés pourraient plutôt être aliphatiques que ceux décrits dans la figure (Congrès fixation d'azote, Août 2008).

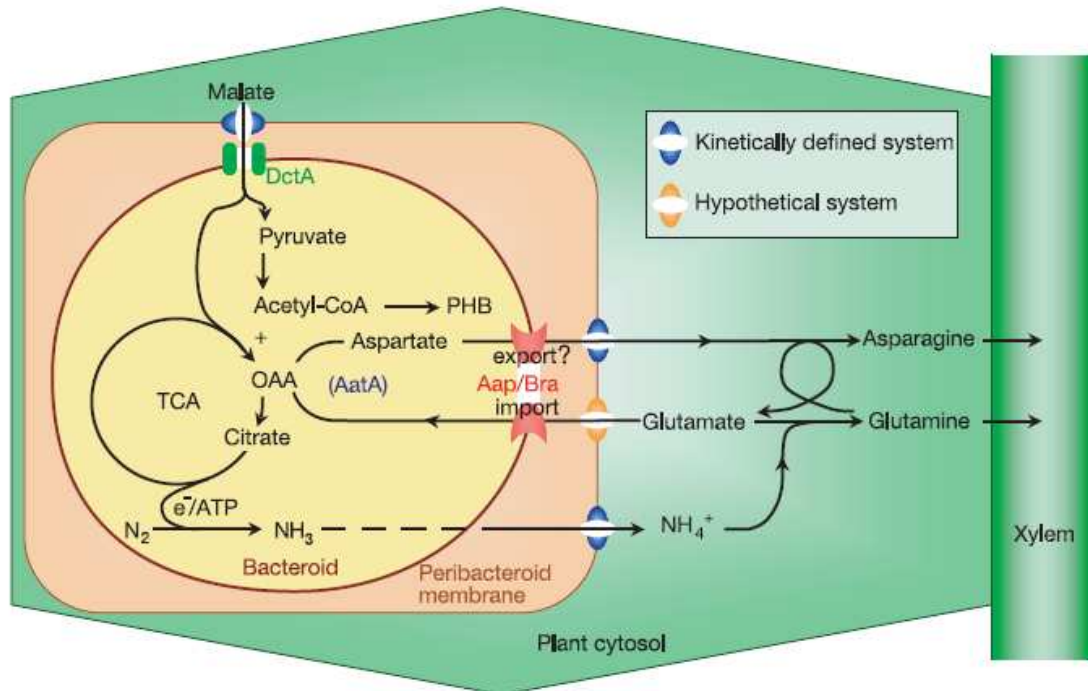


Figure I.1.3 : Rôle du cycle des acides-aminés dans la fixation d'azote (nodule de pois). Alors que le glutamate et l'aspartate sont probablement les acides aminés impliqués, d'autres (comme l'alanine) pourraient être importants. Issu de Lodwig *et al.* (2003).

Dans la plupart des cas, la formation de la nodosité n'a pas lieu entre une légumineuse et un microsymbionte non-compatible. Cependant, la nodosité peut parfois être formée, mais est alors une nodosité où la fixation d'azote n'a pas lieu, ce qui peut être expliqué par l'absence de pénétration des bactéries dans le nodule, par une absence de relargage à partir du cordon d'infection ou stade ultime de blocage, par le relargage intracellulaire par des bactéroïdes ne fixant pas l'azote. Par exemple, l'efficacité de nodulation est hôte – dépendante dans l'association trèfle – *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* (Greenwood, 1964), certaines souches formant des nodules fixateurs sur certaines espèces végétales mais pas sur d'autres. La régulation génétique de la fixation d'azote chez les rhizobia est étudiée depuis longtemps (Fischer, 1994) et les clusters des gènes *nif* et *fix* sont impliqués. Cependant, les bases génétiques de la fixation d'azote hôte-spécifique sont peu connues à ce jour (Miller *et al.*, 2007b). Lorsque les bactéroïdes ne peuvent pas fixer l'azote et donc ne participent pas à l'échange réciproque des composés (encadré 3), la plante (en tout cas les quelques espèces qui ont été étudiées) a la capacité de punir ou sanctionner la bactérie dite « tricheuse », qui profite de la niche écologique protectrice et de la nutrition carbonée fournit par la plante sans donner de nutriments en contre partie. Plusieurs modèles de sanctions ont été décrits théoriquement (Denison, 2000), mathématiquement (West *et al.*, 2002b) et expérimentalement sur des plantes formant des nodules déterminés (Kiers *et al.*, 2007; Kiers *et al.*, 2006; Kiers *et al.*, 2003; Simms, Taylor, 2002; Simms *et al.*, 2006) (encadré 4). Cette reconnaissance des génotypes bactériens ne fixant pas l'azote (ou ne fournissant pas l'azote à la plante) est le dernier niveau de spécificité connue à ce jour entre les deux partenaires symbiotiques.

2- Quelques concepts de l'évolution bactérienne

a- La population

La définition d'espèce chez les eucaryotes considère le critère de reproduction, et donc d'échange de gènes, pour définir l'unité taxonomique. La notion de population eucaryote a été introduite par Johannsen (1903) et est décrite comme un ensemble d'individus se reproduisant par la voie sexuée et vivant dans un même écosystème. On considère que deux populations sont différenciées lorsque les individus qui les composent n'échangent pas assez de matériel génétique entre eux pour maintenir une homogénéité génétique entre elles. Par contre, plusieurs populations de la même espèce, fragmentées spatialement, connectées entre elles (ou non) par de la migration d'individus, et sous une dynamique de colonisation-extinction sont regroupées sous le terme de métapopulation.

Encadré 4 : Nodules déterminés et indéterminés.

Au moins deux types de structure de nodules ont été décrits à ce jour: les nodules déterminés et les indéterminés (figure I.1.4).

Chez les indéterminés, le tissu central peut être divisé en cinq zones (Vasse *et al.*, 1990). Directement sous le méristème (zone I), les cellules de la zone de préfixation (zone II) deviennent infectées. Les rhizobia commencent alors leur différenciation en bactéroïdes, qui est la forme capable d'effectuer la fixation d'azote. Celle-ci débute dans l'interzone (II-III) et a réellement lieu dans la zone de fixation (zone III). Au niveau de la zone de sénescence (zone IV), les bactéries sont dégradées ou potentiellement relâchées dans la rhizosphère (Paau *et al.*, 1980). Du fait de la persistance du méristème, ces nodules prennent une forme allongée, au contraire des déterminés qui présentent une forme sphérique. Chez les déterminés, toutes les cellules centrales sont plus ou moins dans le même stade de développement

Une autre grande différence entre ces deux types de nodules concerne la dédifférenciation des bactéroïdes (en bactéries) chez les nodules déterminés, qui n'est pas possible chez les indéterminés du fait d'une endoréplication de leur génome (Mergaert *et al.*, 2006).

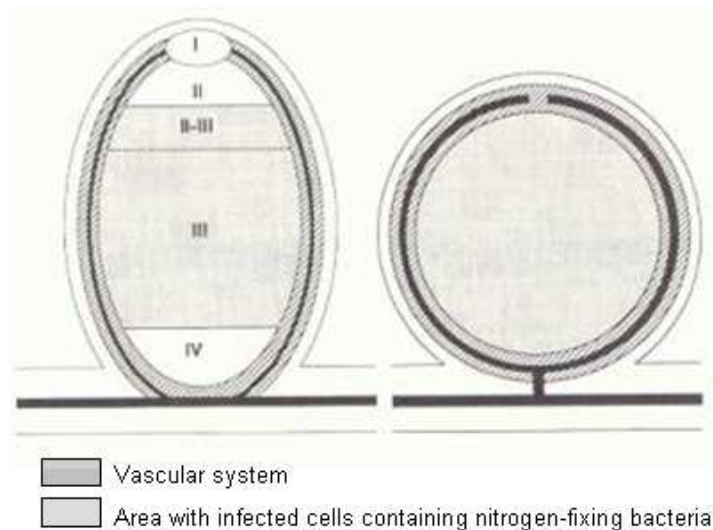


Figure I.1.4: Représentation schématique de la structure des nodules de légumineuses.

Nodule de type indéterminé présentant une zone méristématique (I), une zone de préfixation (II), une zone de fixation (III) et une zone de sénescence (IV) (A). Nodule de type déterminé (B). np, parenchyme nodulaire.

Issu de Pawlowski et Bisseling (1996).

Chez les bactéries, la notion d'espèce est actuellement discutée en terme de similarité globale entre souches. Ainsi deux souches seront considérées comme appartenant à la même espèce si des hybridations ADN / ADN entre leur deux génomes se révèlent supérieures à 70 % (Brenner, 1981) et si elles présentent des séquences de gènes ribosomiaux 16S avec plus de 97 % d'identité. Ainsi, la notion d'espèce repose indirectement sur la notion d'échange de gènes, mais à la différence des eucaryotes, les possibilités d'échanges génétiques entre souches de différentes espèces restent possibles, de même que l'acquisition par les souches bactériennes de matériel génétique via des phénomènes de transformation ou de transduction. Cependant, on assiste depuis quelques années à l'émergence de nouveaux critères afin de définir les espèces bactériennes, tels que l'approche phylogénétique incluant plusieurs marqueurs et reposant sur la monophylie des groupements de souches. Les nouveaux outils moléculaires permettent aujourd'hui le séquençage de bactéries sur plusieurs loci. Ces analyses MLST (Multilocus Sequence Typing) permettent de différencier plusieurs espèces soit par phylogénie, soit par mesure du déséquilibre de liaison, qui reflètent donc l'isolement sexuel entre les espèces.

Par ailleurs, une reprise en compte plus importante de leur écologie pour la définition de groupement taxonomique cohérent a été proposée (Cohan, Perry, 2007). Au sein des espèces, les groupes ayant des rôles écologiques distants sont appelés écotypes (et plusieurs écotypes possédant des répartitions géographiques différentes sont appelés géotypes). Alors que les méthodes actuelles de systématique bactérienne ne parviennent pas toujours à structurer le monde bactérien en unités ayant un sens du point de vue écologique et /ou évolutif, plusieurs auteurs se sont intéressés à la détection et description de nouveaux écotypes (Hunt *et al.*, 2008; Koeppel *et al.*, 2008).

Chez les bactéries, la définition de la population est moins stricte (et claire) que chez les eucaryotes. Cependant, une population naturelle représente tout de même l'ensemble des individus de la même espèce vivant dans le même site géographique. Bien entendu, plusieurs échelles peuvent être données au terme « site géographique », et chaque étude nécessite la définition du terme, afin d'éviter toute confusion. Certaines études considèrent la population à une échelle très réduite (parcelle de champ, rhizosphère d'une plante, voir même un cm³ de sol...) ou plus étendue (région départementale,...). Dans le cas de bactéries symbiotiques ou pathogènes strictes, la notion de population est plus évidente car dépend de la spécificité d'hôte. Ainsi, ce questionnement sur la notion d'espèce et d'isolement sexuel rejaillit sur la notion de population qui, si elle repose sur une définition de différenciation chez les eucaryotes, peut être beaucoup plus complexe chez les bactéries.

Encadré 5 : Bases de l'évolution génomique.

Les mutations et les recombinaisons génétiques sont les deux principaux mécanismes qui jouent un rôle dans l'évolution des génomes procaryotes et sont donc à la base de la création de la diversité (Cebula, Le Clerc, 1997).

. Les mutations génétiques

Du point de vue génétique, les mutations peuvent avoir différents impacts sur la valeur sélective d'un organisme, allant de délétères à bénéfiques en passant par neutres. Cependant, ces différents types de mutations apparaissent à différents taux et les mutations délétères sont bien plus importantes que les bénéfiques, comme cela a été démontré chez *Escherichia Coli* (Imhof, Schlotterer, 2001; Kibota, Lynch, 1996). Au sein du même génome, la position de la mutation a un impact ; l'effet d'une mutation est en effet maximal au sein d'un gène de ménage et minimal dans un gène requis plus rarement.

Les bactéries sont assez sensibles aux mutations du fait de leur génome haploïde, contrairement à un génome diploïde qui est plus protégé. Il est estimé que le taux de mutation chez les microbes est d'environ $3,4 \cdot 10^{-3}$ par génome par réplication (Drake *et al.*, 1998). De plus, le taux de mutation par base est inversement proportionnel à la taille du génome (Drake, 1991; Drake *et al.*, 1998) (figure I.2.1).

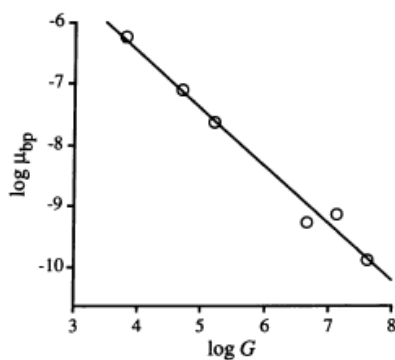


Figure I.2.1 : Taux de mutation moyen par paire de base (μ_{bp}) en fonction de la taille du génome (G). Chaque point représente la valeur moyenne obtenue pour plusieurs individus de la même espèce. Les organismes inclus dans cette étude sont : *Escherichia Coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa* et les bacteriophages M13, λ , T2 et T4 (ces deux derniers étant traités comme un seul organisme). Issu de Drake (1991).

. Les transferts génétiques

La recombinaison génétique est un échange de matériel génétique entre deux génomes. Le rôle des transferts horizontaux de matériel génétique pourrait être plus important que celui des mutations pour l'évolution de nouvelles fonctions (Lawrence, Ochman, 1998). Les transferts horizontaux peuvent intervenir dans le cadre de trois mécanismes distincts (Mazodier, Davies, 1991): i) la transformation, *i.e.* par acquisition d'un fragment d'ADN exogène libre ; ii) la transduction, au cours de laquelle l'ADN exogène est transféré par l'intermédiaire d'un phage ; iii) la conjugaison, c'est-à-dire par transfert d'un plasmide ou d'un fragment d'ADN intégratif entre deux bactéries.

La recombinaison entre espèces est réduite par différents facteurs, incluant l'isolation écologique, l'isolation comportementale, les obstacles à l'entrée d'ADN, l'activité des endonucléases de restriction, la résistance à l'intégration de fragments d'ADN divergents, la réversion de recombinaison par des réparations et l'incompatibilité fonctionnelle des segments recombinés. En fait, les espèces bactériennes sont génétiquement variables pour la plupart de ces facteurs (Cohan, 2001). Cependant, le transfert horizontal par conjugaison est facilité par la proximité génétique existant entre deux espèces bactériennes, comme cela a été démontré avec plusieurs entérobactéries présentant une divergence génomique jusqu'à 16 % (Vulic *et al.*, 1997) (figure I.2.2).

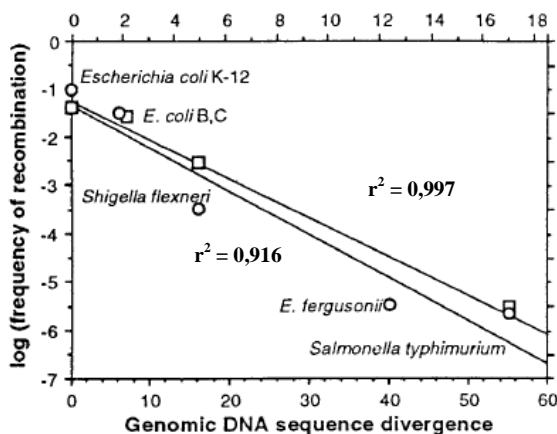


Figure I.2.2 : Relation entre la fréquence de recombinaison et la divergence génomique. La divergence génomique est indiquée comme la fraction de l'ADN des deux organismes qui n'hybrident pas à 60°C. L'échelle supérieure de l'axe des abscisses représente le pourcentage de divergence génétique. Les fréquences de recombinaison sont calculées en effectuant des croisements soit avec *E. Coli* K-12 en donneur (cercle) ou receveur (carré). Issu de Vulic *et al.* (1997).

b- L'adaptation

Les changements phénotypiques, qui sont visibles sur un temps évolutif, entre plusieurs environnements ou entre des taxons, reflètent souvent de l'évolution adaptative (Orr, 1998). Ainsi, dans un sens large, les adaptations peuvent être définies comme des traits phénotypiques qui ont été favorisés par la sélection naturelle et qui peuvent être identifiés comme étant variables, héréditaires et responsables de variation dans la valeur sélective (Howe, Brunner, 2005). Des variations génétiques induisent ces traits phénotypiques. De nombreuses études démontrent que la taille du génome ainsi que le contenu génique est variable chez les bactéries (Stepkowski, Legocki, 2001). Ces différences génomiques au sein de la même espèce ou même entre espèces contribuent souvent à l'adaptation écologique des souches, en agissant par exemple sur la spécificité d'hôte, l'utilisation des nutriments, la tolérance au stress ou la résistance aux antibiotiques (Guo *et al.*, 2005). Ainsi, les transferts génétiques et les mutations génétiques (encadré 5) sont inférés être à la base de l'adaptation des souches à un nouvel environnement, que celui-ci soit abiotique ou biotique.

Cependant, il y a un coût à l'adaptation. En effet, en s'adaptant à un environnement, les bactéries se spécialisent. Les bactéries qui se sont adaptées à une nouvelle niche ont moins de capacité à se diversifier, c'est-à-dire à s'adapter par la suite à d'autres niches (Buckling *et al.*, 2003). Ceci est illustré dans la figure I.2.3.

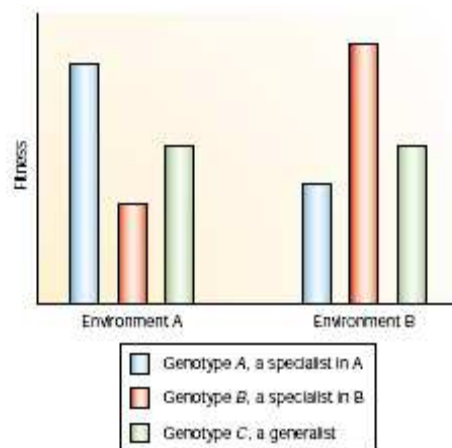


Figure I.2.3 : Coût et spécificité de l'adaptation. La fitness de trois génotypes (deux spécialistes et un généraliste) dans deux environnements est représentée sur ce graphe. Alors que chaque génotype spécialiste a une bonne valeur sélective dans son environnement, il est mal adapté à l'autre environnement. Une des explications possibles pour cette corrélation négative de valeur sélective est que les mutations qui sont bénéfiques dans un environnement ont des effets pléiotropiques antagonistes dans l'autre. Le généraliste a une valeur sélective moyenne dans chaque environnement. Cependant, si l'environnement changeait, le généraliste pourrait avoir un avantage sur les spécialistes. Issu de Elena et Lenski (Elena, Lenski, 2003).

Deux processus génétiques peuvent être à l'origine de cette spécialisation écologique : les mutations-accumulations et la pléiotropie antagoniste. Dans le processus de mutations-accumulations, l'adaptation à un environnement et la perte d'adaptation à un autre sont causées par des mutations différentes. Pour la pléiotropie antagoniste, la même mutation est bénéfique dans un environnement et néfaste dans l'autre. Cependant, il semblerait que la pléiotropie antagoniste aurait une plus large contribution au coût à l'adaptation que le processus de mutations-accumulations (Cooper, Lenski, 2000; Travisano, Lenski, 1996).

c- La compétition pour la nodulation

Du point de vue populationnel, lorsqu'une « nouvelle » bactérie est bien adaptée à l'environnement, sa fréquence dans la population bactérienne peut augmenter. Cependant, cette augmentation en fréquence est dépendante de sa compétitivité vis-à-vis des autres bactéries de la communauté. Des études basées sur des approches mécanistiques tentent d'expliquer les différents niveaux de compétition existant entre des souches bactériennes. Pour les rhizobia, la compétitivité est définie comme la capacité à dominer la nodulation (Toro, 1996). Dans ce groupe bactérien, la capacité de métaboliser un grand nombre de substrats de croissance (Wielbo *et al.*, 2007), la capacité à stocker du carbone sous forme de poly 3-hydroxybutyrate (PHB) intracellulaire (Aneja *et al.*, 2005), la présence du régulateur transcriptionnel *RosR* (Bittinger *et al.*, 1997), la fonctionnalité des gènes de chimiotactisme comme le cluster *cheI* (Miller *et al.*, 2007a), la capacité d'utilisation du tréhalose (Osei Yaw Ampomah, 2008), la production de trifolitoxine (peptide antibiotique) (Robleto *et al.*, 1997) ou la synthèse de glucomannane (Williams *et al.*, 2008) jouent un rôle dans la compétitivité des souches.

La compétition pour la nodulation entre les souches bactériennes a précédemment été étudiée dans plusieurs associations. A ce jour, de nombreuses études de compétition de rhizobia ont été utilisées dans un but appliqué, comme par exemple pour améliorer la croissance des légumineuses, en comparant la compétitivité d'inoculum potentiel à des souches indigènes (Athar, Johnson, 1996; Ben Romdhane *et al.*, 2007; Denton *et al.*, 2002; van Dillewijn *et al.*, 2001). Il a d'ailleurs été montré que la compétitivité d'une souche n'est pas corrélée à sa taille populationnelle (nombre d'individus intrinsèques) dans la rhizosphère de la plante hôte chez *Phaseolus vulgaris-Bradyrhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* (Frey, Blum, 1994) et chez *Glycine max-Rhizobium japonicum* (Moawad *et al.*, 1984). Inversement, la taille de la communauté rhizosphérique a été décrite comme un facteur important de la colonisation de la plante-hôte chez d'autres couples, comme *M. truncatula* –

Sinorhizobium sp. (Denton *et al.*, 2007). Par ailleurs, la question de la spécificité de la compétition a été étudiée dans plusieurs couples. La capacité de nodulation de différents isolats de *Bradyrhizobium japonicum* a été démontrée variable et la compétition pour la nodulation a été montrée dépendante du cultivar végétal de soja (Keyser, Cregan, 1987). Au contraire, aucune interaction souche bactérienne – lignée végétale n’a été détectée dans l’association *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* – trèfle rouge (Ames-Gottfred, Christie, 1989).

La compétition des rhizobia a été suggérée corrélée à l’efficacité de fixation des souches, comme par exemple dans les couples soja - *Bradyrhizobium japonicum* et le haricot - *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, où une souche de chaque espèce a été montrée la plus efficiente et souvent la plus compétitive des souches utilisées (Somasegaran, Bohlool, 1990). Cependant, cette corrélation n’a pas été démontrée dans les associations pois chiche - *Mesorhizobium loti* (Somasegaran, Bohlool, 1990) ou trèfle rouge - *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* (Ames-Gottfred, Christie, 1989). Il semblerait donc qu’il n’y ait pas de règle concernant la relation entre la compétitivité des souches et leur niveau d’efficacité de fixation.

d- La coévolution

L’évolution des organismes vivants est en partie une réponse à l’influence de variations géographiques abiotiques et de conditions biotiques avec, pour ce dernier cas, la mise en place de processus d’interactions avec d’autres organismes. De nombreuses espèces, sinon toutes, ont ainsi subi des changements évolutifs réciproques sous l’influence de la sélection naturelle, processus appelé coévolution (Ehrlich, Raven, 1964).

De nombreux couples symbiotiques, pour lesquels un processus de coévolution a été proposé comme un facteur important d’évolution, ont été et sont étudiés chez des taxons animaux, végétaux, microbiens ou viraux. On peut citer comme exemples classiques l’interaction yuccas-mites (*Tegeticula yuccasella*) (Leebens-Mack, Pellmyr, 2004), celle entre les pocket gophers et des poux (Hafner, Nadler, 1988), le système pollinisateur *Ficus carica*-*Agaonidae* (Jousselin *et al.*, 2003) ou encore *Phaseolus vulgaris*-*Colletotrichum lindemuthianum* (De Meaux *et al.*, 2003).

Un concept clef de coévolution proposé par Thompson (1999) a été d’introduire un facteur géographique qui découle de l’idée que les partenaires symbiotiques forment des interactions variables dans différentes populations géographiques étudiées. Cela est dû à la structuration spatiale des

génotypes des organismes impliqués dans la symbiose, ainsi qu'à l'intensité et à la nature des pressions de sélection qui varient géographiquement. Dans ce contexte, il décrit comme « points chauds de coévolution » les populations dans lesquelles les changements évolutifs réciproques menant à de la coévolution vont se dérouler. Les traits nouvellement sélectionnés y deviennent stables localement, puis sont échangés avec d'autres communautés par transferts horizontaux fréquents (flux de gènes *via* de la migration) ou perdus par dérive génétique ou par extinction locale de population. Ainsi, ce modèle suggère que l'analyse de la dynamique coévolutive entre deux organismes doit être effectuée à plusieurs échelles spatiales (métapopulation, population, individu...) afin de détecter le niveau pertinent de sélection réciproque. Dans cette idée, de la coévolution a été détectée à l'échelle de la population ou de la métapopulation, comme chez le couple *Linum marginale* et son parasite *Melampsora lini* (Burdon *et al.*, 1999). Certaines études ont même montré que cela pouvait aussi avoir lieu à l'échelle de l'individu (Mopper *et al.*, 2000).

La coévolution est souvent décrite en utilisant la métaphore de la « Reine Rouge » (Van Valen, 1973), où la constante dégradation de l'environnement (e.g. l'évolution de l'espèce en interaction) entraîne une course maximale pour rester à la même place. Ainsi, deux modèles de coévolution régissant la dynamique de la « Reine Rouge » sont souvent distingués. Le premier est la dynamique de « la course à l'armement », s'effectuant sans sélection fréquence dépendante, où les deux espèces accumulent constamment de nouvelles mutations. Le deuxième est la dynamique de la sélection fluctuante, où les fréquences des deux partenaires fluctuent en fonction du temps à cause d'une sélection fréquence dépendante négative. A partir de deux études analysant la vitesse de coévolution dans des systèmes hôte-parasite (Buckling, Rainey, 2002; Decaestecker *et al.*, 2007), Gandon *et al.* (2008) ont proposé deux modèles évolutifs de la dynamique coévolutive entre les deux partenaires permettant d'expliquer les deux modes adaptatifs observés (figure I.2.4).

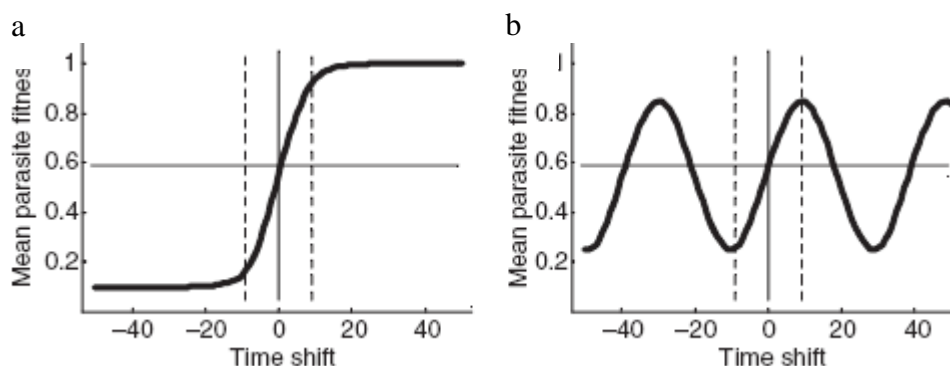


Figure I.2.4 : Dynamiques adaptatives dans la coévolution. Simulations de la valeur sélective de parasites en fonction du temps sous le modèle de la course à l'armement (a) et sous celui de la sélection fluctuante (b). Issu de Gandon *et al.* (2008).

3- Biogéographie

a- Définition et hypothèses

Alors que les biologistes se sont intéressés à la distribution géographique de la diversité des plantes et des animaux depuis le XVIII^e siècle, ce n'est que plus récemment que la distribution géographique des bactéries a été examinée. La biogéographie est l'étude de la distribution de la biodiversité en fonction de l'espace et du temps. Son but est de révéler où vivent les organismes, à quelle abondance et pourquoi ils se sont maintenus dans les sites où on les observe. L'étude de la biogéographie apporte des informations sur les mécanismes qui génèrent et maintiennent la diversité, comme la spéciation, l'extinction, la dispersion et l'interaction entre espèces.

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer les différentes structurations biogéographiques possibles des microorganismes. L'hypothèse nulle est que les microorganismes sont distribués spatialement de manière aléatoire, impliquant de fait une absence de structuration. Une seconde hypothèse est que la répartition spatiale des microorganismes reflète l'influence de variations environnementales récentes. Ce concept, selon lequel les microorganismes sont dispersés spatialement et sont capables de proliférer dans n'importe quel habitat proposant des conditions environnementales favorables, a été initié par Martinus Willem Beijerinck puis résumé sommairement par Gerhard Marinus Baas Becking dans la célèbre citation « everything is everywhere, but the environment selects » (1934). Cette hypothèse suppose que les bactéries ont des capacités de dispersion tellement importantes qu'elles effacent rapidement les effets des événements écologiques et évolutifs passés. Une dernière hypothèse suppose que les variations spatiales observées sont dues aux événements historiques, incluant les barrières à la dispersion et les conditions environnementales passées. La dernière hypothèse propose que la distribution des microorganismes reflète l'influence conjointe des événements passés et des conditions environnementales actuelles. Ces hypothèses amènent donc deux questions centrales : Les communautés bactériennes diffèrent-elles dans différentes localités ? Si oui, à quels facteurs est due cette variation spatiale ?

Les analyses biogéographiques s'intéressent donc aux abondances relatives des différents microorganismes considérés en fonction de l'espace et du temps. Le développement d'approches moléculaires a permis une vue plus complète de la diversité microbienne par rapport aux méthodes basées sur les cultures directes sur milieu. Les analyses statistiques de la diversité sont présentées en encadré 6.

Encadré 6 : les analyses statistiques de la diversité

. Les indices de diversité

De nombreux indices ont été utilisés pour décrire la diversité microbienne. Deux classes d'indices peuvent être considérées : celles décrivant la richesse d'organismes, soit le nombre de types différents identifiés et celles analysant l'abondance des organismes, soit la mesure de la proportion des différents types.

Dans la première classe, soit l'indice représente le nombre total de type (il est donc compris entre 1 et n) soit le nombre de types observé est divisé par le nombre total d'individus dans l'échantillon (l'indice est alors borné entre 0 et 1). La richesse ne peut être utilisée que lorsque la taille de l'échantillon est importante, soit lorsque toute la diversité réelle est détectée (Gotelli, Colwell, 2001).

Dans la seconde classe, les indices de Shannon-Weaver (H) et de Simpson (D) sont les plus fréquents et de nombreux dérivés de ces indices existent. L'indice de Shannon-Weaver est souvent utilisé et recommandé dans le cas des populations bactériennes de taille suffisante (Hill *et al.*, 2003). Cet indice est sensible aux changements d'abondance des types rares. L'indice de Simpson est moins sensible à la taille de l'échantillon mais est fortement influencé par les types dominants, reflétant ainsi surtout des variations dans les fréquences des types dominants.

. Les estimateurs de diversité

Dans toute communauté, le nombre de type d'organismes observé augmente avec l'effort d'échantillonnage jusqu'à ce que tous les types soient détectés. Ainsi, la relation entre le nombre de types observés et l'effort d'échantillonnage donne des informations sur la diversité de la communauté, qui peut être visualisée par une courbe d'accumulation des organismes. Puisque les communautés contiennent un nombre fini d'individus, ces courbes devraient atteindre une asymptote lors de la détection de tous les types et plus la courbe est concave, plus la diversité de la communauté échantillonnée est bien représentée.

Plusieurs approches statistiques ont été développées pour comparer et estimer la diversité de plusieurs échantillons. Tout d'abord, les courbes de raréfaction permettent de comparer la diversité observée entre plusieurs sites ou traitements qui possèdent un nombre d'individus différent. Au contraire des analyses de raréfaction, les estimateurs de diversité estiment la diversité au sein d'un échantillon et ces estimateurs peuvent être comparés. Trois classes d'estimateurs existent : ceux résultant de l'extrapolation de courbes d'accumulation, les estimateurs paramétriques et les estimateurs non-paramétriques. La première méthode consiste à estimer la valeur de l'asymptote de la courbe. Cette méthode est basée sur le fait que chaque organisme n'est compté qu'une seule fois, nécessitant donc un effort de détection des organismes rares, lorsque les fréquents ont déjà été détectés. Pour des communautés très diversifiées où seule une fraction de la diversité est détectée, différentes asymptotes peuvent être obtenues, n'estimant donc pas correctement la diversité réelle de l'échantillon. Cette méthode n'apparaît donc pas prometteuse dans le cas de certaines communautés microbiennes naturelles. En ce qui concerne les estimateurs paramétriques, ces méthodes sont basées sur l'estimation du nombre d'organismes non-observés dans la communauté et sur la comparaison des données de l'échantillon à des modèles d'abondance relative des organismes. Par exemple, Piélu (1975) utilise un estimateur qui suppose que l'abondance des organismes est distribuée selon une loi log-normale. Ainsi en comparant les données de l'échantillon à une loi log-normale, les paramètres de la courbe peuvent être évalués et sont utilisés pour calculer le nombre d'organismes non observés, permettant donc l'estimation de la diversité totale de la communauté. Les trois principaux inconvénients d'une telle méthode sont l'obtention des abondances relatives des organismes, l'hypothèse du modèle de la distribution de l'abondance des organismes dans la communauté et la taille importante de l'échantillon afin d'évaluer correctement les paramètres de distribution. Cependant, du fait de l'acquisition de données de plus en plus « en masse », une telle approche s'avère être prometteuse pour les microorganismes. Enfin, les estimateurs paramétriques semblent être les estimateurs les plus valables à ce jour. Ils sont adaptés des statistiques utilisées pour le comptage des populations d'animaux par marquage-relâchage-recapture (MRR). Ces estimateurs sont basés sur la comparaison de la proportion d'organismes observés plusieurs fois (recapturés) par rapport à ceux observés une seule fois. Dans une communauté très diversifiée, la probabilité qu'un organisme soit détecté plusieurs fois est faible, au contraire d'une communauté peu diversifiée. Les estimateurs Chao1 et ACE sont fréquemment utilisés. Ces estimateurs ajoutent un facteur de correction au nombre d'organismes observés. Leur principal inconvénient est de sous-estimer la diversité réelle pour des échantillons de petite taille. La figure I.3.1 (Hughes *et al.*, 2001; Kroes *et al.*, 1999) est un bon exemple de la comparaison de deux estimateurs à la diversité observée.

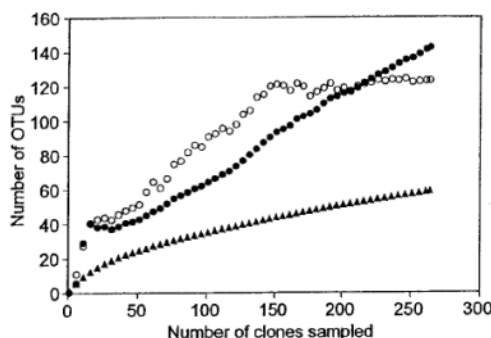


Figure I.3.1 : Richesse bactérienne des OTU observée et estimée dans une bouche humaine par rapport à la taille de l'échantillon. Le nombre d'OTU observé pour une taille donnée d'échantillon, ou la courbe d'accumulation, est moyenné sur 50 simulations (triangle). La richesse d'OTU estimée est reportée pour les estimateurs Chao1 (cercle plein) et ACE (cercle vide).

Issu de Hughes *et al.* (2001).

Cependant, Bengtsson avertit des limites de l'utilisation des différentes mesures de diversité dans cette phrase : « it is naïve to contemplate that one single number – species richness, a diversity index, the number of functional group or connection – can capture the complex relationships and interactions between many species and the functions performed by these interactions ».

Les microorganismes sont les organismes les plus abondants sur terre (Whitman *et al.*, 1998) et ceux présentant le plus de diversité (Torsvik *et al.*, 2002; Venter *et al.*, 2004). Par exemple, Roesch *et al.* (2007) ont estimé qu'un gramme de sol contenait entre 11 000 et 21 000 unités taxonomiques opérationnelles (OTU). Cependant, la distribution de cette vaste biodiversité reste partiellement incomprise. En effet, jusqu'au début du XXI^e siècle, une grande majorité des études portant sur la diversité bactérienne ont documenté comment les communautés bactériennes pouvaient être influencées par des changements environnementaux spécifiques, sans prendre en compte les variations entre sites. Depuis moins d'une décennie, la compréhension des facteurs structurant la composition bactérienne entre plusieurs écosystèmes et régions a pris un essor considérable.

b- Exemples d'analyses biogéographiques bactériennes

De nombreuses études ont montré que les microorganismes varient en abondance, en distribution et en diversité en fonction de l'espace, que cela soit au niveau de la distance spatiale ou de conditions environnementales différentes. Ces études se sont intéressées à des bactéries provenant de divers écosystèmes : terrestre (sol) ou marin (lac, estuaire, océan), et d'échelle spatiale très variable.

Le tableau I.3.1 (Martiny *et al.*, 2006) rapporte plusieurs exemples d'études de communautés bactériennes libres où une corrélation entre la composition de la communauté bactérienne et des caractéristiques environnementales ou géographiques fut trouvée. En ce qui concerne les bactéries libres, les facteurs abiotiques tels que la salinité, la latitude ou la profondeur s'avèrent être particulièrement importants.

D'autres études (en général plus récentes que celles rapportées dans le tableau précédent) ont mis en évidence que certains facteurs étaient corrélés à la composition des communautés bactériennes libres. Parmi ceux-ci, l'importance de facteurs abiotiques ont été montrés, comme par exemple le pH des sols (Fierer, Jackson, 2006) ou des cours d'eau (Fierer *et al.*, 2007), plusieurs facteurs lacustres (phosphore total, surface totale du lac et proximité du lac le plus proche) (Van der Gucht *et al.*, 2007), les changements climatiques globaux (simulés par l'augmentation en CO₂ atmosphérique, la précipitation, la température et la déposition d'azote) (Horz *et al.*, 2004), la sévérité climatique en environnement terrestre (gradient de latitude et de température en habitats antarctiques) (Yergeau *et al.*, 2007a; Yergeau, Kowalchuk, 2008), la latitude et la température en environnement marin (Fuhrman *et al.*, 2008), l'âge (maturité) du sol (Tarlera *et al.*, 2008), la saison et la concentration en nutriments (Herfort *et al.*, 2007) ou la combinaison de facteurs environnementaux, temporels et

géographiques (Yannarell, Triplett, 2005). Cependant, l'analyse d'échantillons prélevés dans 111 environnements physiques différents démontre que le facteur environnemental majeur jouant sur la composition des communautés microbiennes serait la salinité (Lozupone, Knight, 2007).

Tableau I.3.1 : Exemples d'études qui ont trouvées des distributions non-aléatoires de taxons microbiens libres. Les études sont classées en fonction de l'échelle géographique selon laquelle les échantillons furent prélevés, et la distance entre les points d'échantillonnage les plus éloignés est reportée. * Distribution non-aléatoire significative. ‡ absence de tests statistiques.

Issu de Martiny *et al.* (2006).

Organisms	Approximate scale (km)	Habitat	Unit	Correlated with
Pseudomonads*	20,000	Soil	BOX-PCR isolation	Linear distance
3-CBD bacteria‡	20,000	Soil	ARDRA isolation	
Aerobic, anoxygenic phototrophs‡	20,000	Marine	Dissociation curves	Latitude
SAR11 bacteria and archaea‡	13,000	Marine	16S/ITS sequence	Depth
Green sulphur bacteria‡	8,000	Lakes	16S sequence	Continental divide
N-fixing bacteria‡	700	Desert crusts	Sequence and TRFLP of <i>nifH</i> and 16S	Mature versus poorly developed crusts
Crenarchaeota*	200	Soil	PCR-SSCP of 16S	At small scales, distance
Crenarchaeota*	200	Soil	PCR-SSCP of 16S	Rhizosphere versus bulk soil
Bacteria‡	50	Marine	DGGE of 16S	Ocean front
Bacteria*	35	Marine	DGGE of 16S	Depth and ocean front
Bacteria‡	15	River plume	DGGE of 16S	River-marine transition
Bacteria*	5	River plume	DGGE of 16S	Salinity
Bacteria, archaea and eukaryotes*	3	Salterns	DGGE, TRFLP, RISA	Salinity
<i>Pseudomonas cepacia</i> *	3	Soil	Isolate allozymes	Vegetation
Bacteria and eukaryotes*	1	Soil	RNA hybridization	Cultivation history
Gram-negative bacteria*	0.8	Soil	sole carbon source	Latitude
Microorganisms*	0.2	Groundwater	RAPD	Oxygen zonation
Microorganisms*	0.1	Agricultural soil	AFLP	
Bacteria and archaea‡	0.02	Lake	DGGE of 16S	Depth
Bacteria*	0.01	Drinking water	TRFLP of 16S	Bulkwater versus pipe biofilm
Purple non-sulphur bacteria‡	0.01	Fresh marsh	BOX-PCR isolation	Linear distance
Bacteria*	0.01	Soil	RFLPs of 16S	
Microorganisms*	0.002	Salt marsh	RAPD	Marsh elevation

Nous pouvons remarquer que l'impact de la distance géographique sur la composition des communautés bactériennes, soit l'isolement par la distance entre populations, est faiblement documenté dans la littérature, comparativement aux facteurs environnementaux. Malgré tout, certains exemples sont reportés dans le tableau I.3.2 qui pourrait être complété avec d'autres exemples de l'influence de la distance spatiale comme sur les communautés marines de *Synechococcus* et *Prochlorococcus* à une échelle spatiale (Zwirgmaier *et al.*, 2008).

Certains facteurs biotiques influencent aussi la composition des communautés bactériennes libres. Par exemple, la présence d'un couvert végétal a un effet (Yergeau *et al.*, 2007a; Zul *et al.*, 2007) bien

que l'espèce végétale ne semble pas influencer la diversité, comme cela a été confirmé sur les communautés d'acidobactéries et de verrucomicrobes en utilisant 12 espèces de plantes (Kielak *et al.*, 2008). Cependant, il est toujours délicat d'extrapoler ce résultat à l'ensemble des communautés bactériennes du sol. Ainsi, chez les bactéries symbiotiques, le rôle de l'espèce végétale sur la composition de la communauté bactérienne associée a été largement décrit. Il a été souvent démontré que les microorganismes symbiotiques ou pathogènes sont associés de manière non aléatoire à leurs hôtes. Ces associations non-aléatoires ; tant végétale (genre ou espèce) que bactériennes (communautés ou intra-espèce) ont été étudiées à plusieurs niveaux taxonomiques. A titre d'exemple, différentes espèces de *Medicago* s'associent à différentes communautés de rhizobia (Jebara *et al.*, 2001; Thurman, Bromfield, 1988). Au sein d'une même espèce végétale, la diversité génétique de la plante-hôte influence la structure de la diversité génétique des populations de rhizobia associées (Carelli *et al.*, 2000; Depret, Laguerre, 2008; Paffetti *et al.*, 1998; Tian *et al.*, 2007). Le couvert végétal apparaît donc jouer un rôle primordial dans la structuration de certaines populations bactériennes.

Tableau I.3.2 : Etudes analysant les influences de la distance et de l'environnement sur la composition microbienne.

Organisms	Approximate scale (km)	Habitat	OTU	Effect of	
				dist.	env.
<i>Synechococcus</i>	20,000	Hot springs	16S/ITS sequence	Yes	No
<i>Sulfolobus</i>	12,000	Hot springs	MLS of isolates	Yes*	No*
Bacteria	3,000	Coral	16S sequence	No	Yes*
Bacteria	500	Lakes	ARISA	Yes*	Yes*
3-CBD bacteria	500	Soil	ARDRA	No	Yes*
Ascomycetes	100	Soil	ARISA	Yes*	Yes*
Bacteria	100	Aquatic	ARISA	No	Yes
Bacteria	10	Lakes	DGGE of 16S	Yes*	No*
Bacteria	0.3	Marsh sediment	16S sequence	No*	Yes*
Bacteria	0.1	Soil	TRFLP	No	Yes*

La prédiction de la structure de la communauté bactérienne à l'aide de mesures environnementales est un des objectifs de la biogéographie. Selon Furhman *et al.* (2006), les profils de distribution et d'abondance des taxons microbiens marins peuvent être prédits à l'aide de nombreux paramètres abiotiques et biotiques, du fait de la redondance saisonnière de ces communautés (time-series). En effet, il est considéré que chaque OTU (Operational Taxonomic Unit) possède sa propre niche écologique ce qui permet la prédiction de la diversité bactérienne à l'aide de plusieurs facteurs environnementaux. Cependant, une telle prédiction est sans doute sujette à une forte variance, et nécessite une base de données préalable extrêmement importante.

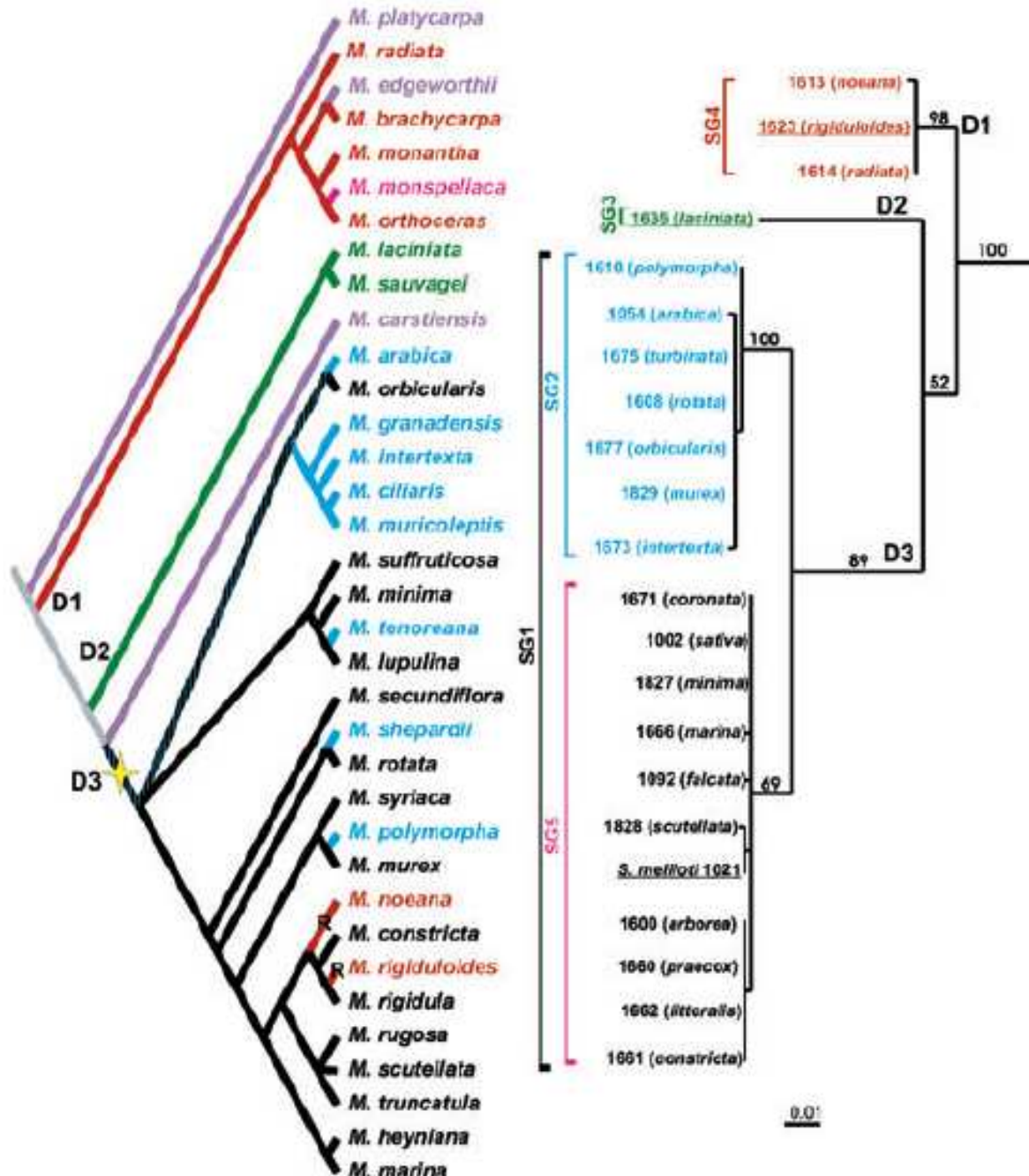


Figure I.4.1 : Association symbiotique entre les espèces de *Medicago* (gauche) et les souches de *Sinorhizobium* (droite). La longueur des branches de la phylogénie des *Medicago* est arbitraire. La même couleur entre une espèce de plante et un groupe de souches indique que l'association entre la plante et au moins une souche du groupe a été observée efficiente. Les cinq groupes de spécificité (SG) ont été définis selon les tests de fixation d'azote, avec les couleurs correspondantes. Les espèces de plantes écrites en noir forment une symbiose fixatrice d'azote efficiente avec les souches *S. meliloti* type 2, *S. meliloti* type 3 et *S. medicae*. Aucune souche testée n'a été efficiente avec les plantes écrites en violet. Les couleurs de branche dans la phylogénie de plantes indiquent l'état symbiotique putatif le long de la branche au cours de l'évolution. L'étoile indique une modification principale de l'association symbiotique, alors que le « R » indique une possible réversion de la spécificité. Les lettres similaires D1, D2 et D3 dans les deux phylogénies indiquent des évènements de divergence correspondants entre les deux arbres. Issu de Béna *et al.* (2005).

4- Le couple *Sinorhizobium* sp. – *Medicago* sp.

a- Spécificité d'hôte des deux partenaires

. Le partenaire végétal, *Medicago*

Le genre *Medicago* est composé de 83 espèces (Lesins, Lesins, 1979; Small, Jomphe, 1988). La phylogénie des espèces de *Medicago* (Béna *et al.*, 1998a; Béna *et al.*, 2005) est reprise en figure I.4.1. La plus connue de ces espèces par le grand public est peut-être *Medicago sativa*, car elle est cultivée comme fourrage, sous le nom commun de luzerne (alfalfa en anglais), dans de nombreux pays dans le monde. Pour les scientifiques, *Medicago truncatula* est une bien plus grande star, car elle est considérée comme espèce végétale modèle (Ané *et al.*, 2008; Cook, 1999; Frugoli, Harris, 2001), même si elle ne concurrence tout de même pas (encore ?) le statut d'*Arabidopsis thaliana*. La nécessité d'approfondir les connaissances sur les symbioses fixatrices d'azote, qui présentent un avantage agronomique majeur, a mené à choisir une légumineuse comme espèce modèle. La raison du détronement de *Medicago truncatula* sur *Medicago sativa* réside en leurs particularités génomiques : le génome de la plante annuelle *Medicago truncatula* est diploïde, de petite taille (~500 Mb) et son mode de reproduction est autogame (environ 96 % d'autofécondation) (Bonnin *et al.*, 2001), alors que celui de la plante pérenne *Medicago sativa* est tétraploïde et cette espèce est allogame. Ainsi, le génome de *Medicago truncatula* est en cours de séquençage (Young *et al.*, 2005) et de nombreux outils génétiques et génomiques existent désormais sur cette espèce (voir Ané *et al.* (2008) pour une revue).

Plusieurs espèces de *Medicago* ont été utilisées au cours de cette thèse ; leurs principales caractéristiques seront reprises ici (Small, Jomphe, 1988) et sont représentées dans la phylogénie des *Medicago* (figure I.4.1).

Medicago truncatula a la capacité de pousser sur une grande variété de types de sols (Small, Jomphe, 1988) et présente l'avantage de produire beaucoup de graines (Cook, 1999). Cette espèce serait originaire du croissant fertile situé dans la partie est du bassin méditerranéen, puis se serait ensuite dispersée en région méditerranéenne en divergeant génétiquement. Ainsi, les différentes lignées composant cette espèce seraient spatialement structurées sur son aire de répartition naturelle. Une core-collection a d'ailleurs été construite par Ronfort *et al.* (2006).

Medicago sativa, la luzerne cultivée est originaire d'Asie mineure, de Transcaucasie, du Turkménistan et d'Iran. L'espèce pousse à l'état endémique dans tout le bassin méditerranéen, en Afrique du Nord, au Moyen-Orient, dans la plus grande partie de l'Europe, en Sibérie et dans le nord de l'Inde et en Chine (Michaud *et al.*, 1988; Quiros, Bauchan, 1988).

Ces deux espèces, *Medicago truncatula* et *Medicago sativa* présentent le même spectre d'hôte symbiotique, elles peuvent former une association efficace avec *Sinorhizobium meliloti* bv. *meliloti* et *Sinorhizobium medicae*.

Medicago polymorpha est présente naturellement en Europe, Asie et Afrique, mais a beaucoup été introduite ailleurs et s'est adaptée, lorsque non limitée par le froid ou la sécheresse. Cette espèce annuelle s'associe efficacement avec *S. medicae* alors que *S. meliloti* peut former des nodules non fixateurs sur son système racinaire.

Medicago carstiensis Wulf a une aire de répartition s'étendant sur le nord-Est de l'Italie, le Sud-Est de l'Autriche, l'ex-Yougoslavie, l'Albanie et la Bulgarie. Elle pousse dans des environnements rocaillieux et boisés. Aucun symbiote de cette espèce n'a été décrit à ce jour.

Medicago laciniata est présente dans l'Est du bassin méditerranéen, en Afrique du Nord mais à aussi été introduite en Asie (Jordan, 1981). Cette espèce de plante s'associe efficacement à *S. meliloti* bv. *medicaginis* (Villegas *et al.*, 2006).

Medicago rigiduloides est principalement présente sur la partie Est du bassin Méditerranéen. Elle forme une symbiose efficace avec un biovar de *S. meliloti* non décrit à ce jour. Cette espèce est très fortement apparentée à *M. rigidula* qui s'associe efficacement avec *S. meliloti* bv. *meliloti*.

. Le partenaire microbien, *Sinorhizobium*

Officiellement, je devrais dans cette thèse modifier l'appellation de ce genre pour adopter le nom *d'Ensifer*, selon les normes de la taxonomie bactérienne (Tindall, 2008). Pour des raisons pratiques, notamment parce qu'un des manuscrits accepté utilise le nom de *Sinorhizobium*, je garderai ce dernier dans cette thèse.

Le genre *Sinorhizobium* appartient à la famille des Rhizobiaceae, à l'ordre des Rhizobiales, à la classe des alphaproteobacteria. Il est actuellement composé de 11 espèces (*S. arboris*, *S. americanum*, *S. fredii*, *S. kostiensis*, *S. kummerowiae*, *S. medicae*, *S. meliloti*, *S. morelense*, *S. saheli*, *S. terangaie* et *S. xinjiangense*). Ces espèces présentent des spectres d'hôtes différents, plus ou moins restreints. A ce jour, seules les espèces *S. medicae* (Rome *et al.*, 1996) et *S. meliloti* (De Lajudie *et al.*, 1994) ont été décrites capables d'entrer en symbiose avec les plantes du genre *Medicago* (figure 4).

Sinorhizobium meliloti présente un spectre d'hôte « modérément » spécifique puisque cette espèce peut s'associer avec les espèces végétales des genres *Medicago*, *Melilotus* et *Trigonella* (Krishnan, Pueppke, 1991) ainsi que *Phaseolus* (Mnasri *et al.*, 2007). Du fait de sa variation de spécificité, trois biovars ont été décrits pour *S. meliloti*, les souches des biovars *S. meliloti* bv. *meliloti*, *S. meliloti* bv. *medicaginis* (Villegas *et al.*, 2006) et *S. meliloti* bv. *mediterraneuse* (Mnasri *et al.*, 2007) étant respectivement efficaces avec *M. truncatula*, *M. laciniata* et *Phaseolus vulgaris*. Le spectre d'hôte de *S. medicae* peut apparaître plus restreint car limité à certaines espèces du genre *Medicago*, comme *M. polymorpha*, *M. ciliaris*, *M. polymorpha* ou *M. arabica* (Béna *et al.*, 2005; Rome *et al.*, 1996).

b- Diversité génétique des souches de *Sinorhizobium*

. Architecture génomique multipartite

Deux souches de référence de *Sinorhizobium* sp. ont été séquencées à ce jour: *S. meliloti* bv. *meliloti* 1021 (Galibert *et al.*, 2001) et *S. medicae* WSM419 (Reeve *et al.*, en préparation). Leur architecture génomique est assez proche, composée d'un chromosome et de deux ou trois mégaplasmides, respectivement pour Sm1021 et WSM419.

Les génomes bactériens sont des structures dynamiques. La recombinaison homologe entre des séquences d'ADN génère différents types de réarrangements génomiques (Romero, Palacios, 1997). Ces réarrangements ont été observés au sein du génome de plusieurs rhizobia dont *Rhizobium* sp. NGR234 (Mavingui *et al.*, 2002), *Azorhizobium* (Vial *et al.*, 2006) ou *Sinorhizobium* (Bromfield *et al.*, 1987; Broughton *et al.*, 1987; Guo *et al.*, 2003; Jebara *et al.*, 2001). Alors que le génome de *S. meliloti* 1021 fut décrit comme composé d'un chromosome de 3,65 Mb et de deux mégaplasmides, pSymA et pSymB, de 1,35 et 1,68 Mb respectivement, Guo *et al.* (2003) ont obtenus différentes structures allant de trois à un seul réplicon (contenant toute l'information génétique) et ces variations architecturales n'ont pas induit de différence d'efficacité symbiotique (en termes de nodulation et de fixation d'azote).

Une autre étude analysant 171 souches de *S. meliloti* ont mis en évidence 62 profils plasmidiques différents, avec certaines souches possédant plus de 7 plasmides (Silva *et al.*, 2007). Il est à noter que les souches de *S. meliloti* possèdent un grand nombre d'éléments génétiques mobiles comme les séquences d'insertions (IS), les transposons et les introns mobiles bactériens (Biondi *et al.*, 1999; Biondi *et al.*, 2003a; Selbitschka *et al.*, 1995; Selbitschka *et al.*, 1999) qui pourraient expliquer cette dynamique de réarrangement génomique.

La variabilité de l'architecture génomique a été analysée plus finement sur 59 souches naturelles de *S. meliloti* à l'aide d'une analyse multiloci, et cette étude a suggéré des taux élevés de gain et perte de portions génomiques, principalement au niveau des mégaplasmides, et dans une plus faible mesure au niveau du chromosome (Guo *et al.*, 2005). Différents mécanismes sont mis en avant pour expliquer ces variations de taille : la perte aléatoire de gènes, la duplication de portions d'ADN et le transfert horizontal de gènes entre souches. Cependant, au contraire des symbiotes obligatoires dont le génome subit une délétion des gènes inutiles dans le mode de vie hôte-dépendant (Hoffmeister, Martin, 2003; Moran, Wernegreen, 2000), le statut de symbiote facultatif de *S. meliloti* et *S. medicae*, et donc une alternance entre vie en symbiose et vie libre, a dû contre-sélectionner les pertes de matériel génétique indispensable à la vie libre dans le sol. De plus, lorsque des symbiotes bactériens survivent dans le sol sous forme libre, ces espèces ont tout intérêt à s'associer rapidement à une plante-hôte, au moins pour profiter des bénéfices de la niche écologique protectrice fournie. Ainsi, puisque chaque génotype bactérien peut être exposé à de nombreux hôtes potentiels, la spécialisation de leur génome à un hôte particulier serait néfaste pour leur survie à long terme, car la répartition des plantes-hôtes est variable, d'une saison sur l'autre, voir même d'une année sur l'autre (Jean-Marie Prosperi, communication personnelle). Ainsi, ces symbiotes doivent certainement contre-sélectionner les pertes de gènes dues à une spécialisation d'hôte.

. Polymorphisme génétique

De nombreuses études ont estimé la diversité existant au sein de *S. meliloti* et au sein de *S. medicae*. Ces études ont montré, à l'aide de marqueurs moléculaires, que les populations naturelles de rhizobia, et en particulier *S. meliloti*, présentaient un polymorphisme génétique important. A titre d'exemples nous pouvons citer les travaux réalisés par Badri *et al.* (2007), Bailly *et al.* (2007; 2006), Van Berkum *et al.* (2007; 2006), Carelli *et al.* (2000), Roumanstieva *et al.* (2002), Biondi *et al.* (2003b). Plusieurs études ont par ailleurs suggéré que l'espèce *S. medicae* semblait présenter moins de diversité que *S. meliloti* (Eardly *et al.*, 1990; Van Berkum *et al.*, 2007). Un scénario de la spéciation

des deux espèces pourrait expliquer une telle différence de diversité entre elles (figure I.4.2). Plusieurs auteurs (Bailly *et al.*, 2007; Biondi *et al.*, 2003b; Silva *et al.*, 2007) ont suggéré que *S. medicae* pourrait avoir émergé récemment d'une population de *S. meliloti* bv. *meliloti*. Une spéciation récente n'aurait donc pas permis l'accumulation de diversité génétique, par mutation, au sein de la nouvelle espèce, et cette hypothèse expliquerait donc la plus faible diversité observée.

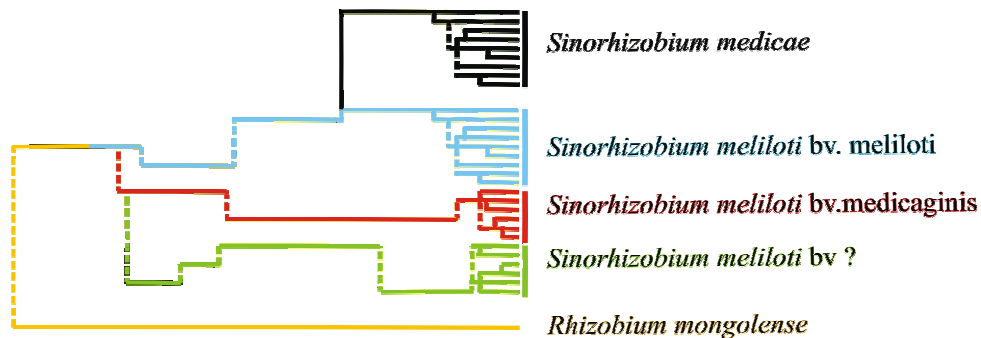


Figure I.4.2: Représentation schématique d'un scénario proposé pour expliquer les patrons de divergence entre *S. meliloti* et *S. medicae*. Dans l'arbre, les pointillés indiquent des événements de transfert horizontal. *S. meliloti* bv. ? correspond aux bactéries efficaces avec *M. rigiduloides*, *M. noeana* et *M. radiata*. Issu de la thèse de Xavier Bailly (2006).

. Recombinaison sexuelle entre espèces et entre biovars

La recombinaison, qu'elle se réalise par voie sexuelle ou par transfert latéral de matériel génétique entre souches n'appartenant pas à la même espèce, joue un rôle primordial dans l'évolution des bactéries. Plusieurs études ont cependant montré que le transfert horizontal de matériel génétique était facilité par la proximité génétique des espèces bactériennes. Dans ce cadre, les rhizobia ne dérogeraient pas à cette règle, ce qui laisse supposer que les différents genres de rhizobia sont isolés du point de vue reproductif et divergent indépendamment (Wernegreen, Riley, 1999). Par exemple, il est suggéré que les bactéries du genre *Sinorhizobium* auraient acquis le cluster des gènes *nod* par transfert horizontal à partir de *Rhizobium mongolense*.

L'isolement sexuel entre *S. meliloti* et *S. medicae* est fortement suggéré puisque, dans la majorité des études, on n'a jamais trouvé de polymorphisme partagé entre les deux espèces, que cela soit sur la base de profils électrophorétiques ou des séquences d'ADN identiques (Bailly *et al.*, 2007; Bailly *et al.*, 2006; Eardly *et al.*, 1990; Maynard Smith *et al.*, 1993; Van Berkum *et al.*, 2006). A ce jour, seules deux études génétiques ont démontré un probable partage allélique entre les deux espèces au niveau des gènes *gnd* (Van Berkum *et al.*, 2006) et *nuoE2* (Guo *et al.*, 2007). Dans ces deux derniers cas, l'hypothèse d'un polymorphisme ancestral partagé pourrait expliquer ces résultats. Ainsi,

indépendamment du fait que ces deux espèces partagent la même niche écologique, il existe une barrière génétique majeure qui maintient la distinction et l'existence des deux espèces.

Une divergence génétique élevée entre deux biovars de *S. meliloti* déjà décrits (*S. meliloti* bv. *meliloti* et *S. meliloti* bv. *medicaginis*) (Villegas *et al.*, 2006) a été montrée pour les gènes du cluster de nodulation mais pas pour d'autres marqueurs situés sur le chromosome ou sur le pSymB (Bailly *et al.*, 2007). Un partage allélique a en effet été détecté entre ces deux biovars, excepté pour l'*IGS_{nod}*. Ces données moléculaires confirment la spécificité symbiotique des deux biovars dont les gènes directement impliqués dans la reconnaissance symbiotique restent distincts, alors que le reste du génome, qui forme la base génétique de la notion d'espèce, est partagé entre les deux biovars.

. Analyse du déséquilibre de liaison et mesure de la recombinaison chez *Sinorhizobium*

D'une manière générale, deux types d'approches sont utilisées pour analyser la recombinaison : des méthodes multiloci, mesurant l'association statistique entre les génotypes au niveau de plusieurs marqueurs (indice d'association I_A) et des méthodes mesurant l'association statistique entre génotypes par paires de loci (indices D, D' et r^2). Dans le cas de bactéries présentant une architecture génomique multipartite, la méthode d'analyse par paire de loci présente l'avantage de mettre en évidence des différences de taux de recombinaison entre marqueurs alors que la méthode multiloci donnant une mesure d'association est obtenue pour l'ensemble des marqueurs, « moyennant » les différences potentielles. Ces deux types d'approches ont été effectués sur les bactéries du genre *Sinorhizobium*.

Le transfert horizontal a été démontré (à partir d'analyse MLST) chez de nombreuses bactéries, incluant des bactéries fixatrices d'azote (Silva *et al.*, 2005; Vinuesa *et al.*, 2005). Alors qu'aucune preuve directe (à l'aide de souches marquées) ne confirme *in vivo* l'existence de ce transfert de gènes chez *S. meliloti* et *S. medicae*, plusieurs études génétiques laissent supposer un tel mécanisme. De plus, l'existence d'un système de sécrétion de type IV chez Sm1021 a été observé (Galibert *et al.*, 2001) et celui-ci a été démontré nécessaire pour le transfert d'ADN par conjugaison dans cette souche (Jones *et al.*, 2007). Le fait que les unités plasmidiques de *S. meliloti* auraient une grande capacité de transferts entre différentes souches de cette espèce (Pistorio *et al.*, 2008) pourrait expliquer le faible déséquilibre de liaison observé entre les différentes unités de répllication (Bailly *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006).

Au sein de chacun des différents réplicons, de la recombinaison fut détectée chez *S. meliloti* et chez *S. medicae*, mais à différente intensité (Bailly *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006; Wong, Golding, 2003). Le taux de recombinaison semble en effet dépendre de l'unité de réplication considérée (Bailly *et al.*, 2006). Les marqueurs chromosomiques montrent une association élevée indiquant peu de recombinaison sur le chromosome, au moins chez *S. meliloti* (Bailly *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006), alors qu'au contraire, et chez les deux espèces, les marqueurs plasmidiques sont indépendants, à la fois entre les plasmides et au sein de chaque plasmide, indiquant un fort taux de recombinaison. Des segments d'ADN hypervariables ont été détectés dans plusieurs régions situées tout le long du génome mais leur localisation est prédominante au niveau des mégaplasmides et surtout du pSymA (Guo *et al.*, 2007). Ainsi, la plupart des différences génétiques s'accumulent sur le pSymA de *S. meliloti*, laissant supposer que le mégaplasmide symbiotique peut donc être considéré comme le « point chaud » majeur pour la différenciation intra-spécifique de *S. meliloti* (Bailly *et al.*, 2006; Giuntini *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006). Cela serait cependant à confirmer avec une densité plus élevée de marqueurs génétiques sur ce mégaplasmide.

Les mécanismes génétiques à la base de ces différences de recombinaison au sein des unités de réplication sont inconnus à ce jour ; cependant deux hypothèses peuvent être émises. La première suppose que les gènes plasmidiques sont sous de plus faibles contraintes fonctionnelles que les gènes chromosomiques, permettant ainsi une accumulation de mutation plus fréquente. Cette hypothèse est confortée par le fait que des délétions de portions géniques importantes sur les deux mégaplasmides n'entraînent pas ou peu de conséquences sur la valeur sélective des souches (Charles, Finan, 1991; Oresnik *et al.*, 2000). La seconde hypothèse est que les gènes plasmidiques pourraient être sous sélection positive. Il a été montré qu'un intergène du cluster de nodulation (pSymA) est en effet sous sélection purificatrice, et cela pourrait être expliqué par le fait que ces gènes interviennent dans la reconnaissance précoce avec la plante-hôte et donc que la divergence de ces gènes de nodulation est associée à la spécialisation de la bactérie à la plante hôte (Bailly *et al.*, 2006). Par contre, il apparaît clairement que tous les gènes plasmidiques ne sont pas sous sélection positive. En effet, Sun *et al.* (2006) ont observé que le gène qui présentait le plus de polymorphisme était un des gènes du cluster des exopolysaccharides (pSymB) et Bailly *et al.* (2006) ont détecté de la sélection diversifiante sur un intergène du même cluster. Il semblerait que ce maintien de diversité au niveau des exopolysaccharides permettrait d'éviter la sanction de la plante. Il est à noter que les deux espèces *S. meliloti* et *S. medicae* auraient évolué sous les mêmes pressions de sélections (Bailly *et al.*, 2006).

Ainsi, il est fortement suggéré que les échanges génétiques par transfert horizontal et la recombinaison au sein et entre les souches aient contribué à la diversité observée des populations naturelles de *S. meliloti* et *S. medicae*.

c- Facteurs biotiques et abiotiques régissant la structuration des populations bactériennes

La plupart des études menées à ce jour s'intéressent principalement aux variations de diversité selon différents gradients biotiques et abiotiques (voir le chapitre I-3). Comme cela a déjà été expliqué ci-dessus, l'un des facteurs biotiques majeurs sur la diversité des *Sinorhizobium* est le génotype de la plante-hôte, du fait de l'existence de spécificité symbiotique. Cet effet plante-hôte est facilement détectable par l'analyse des gènes de nodulations (Bailly *et al.*, 2007).

Il semblerait que les populations de *Sinorhizobium* soient spatialement structurées, autant au niveau inter-spécifique qu'au niveau intra-spécifique (à l'échelle des biovars). D'une part, des proportions très variables des deux espèces bactériennes, allant jusqu'à l'absence de détection de *S. medicae* ont été observées dans les sites échantillonnés (Bailly *et al.*, 2007; Roumiantseva *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2007; Zribi *et al.*, 2004). Les génotypes de rhizobia pourraient être différenciellement adaptés aux conditions de sols et pourraient ainsi être avantagés à la fois en nombre et en compétitivité sous de bonnes conditions, indépendamment de la réaction symbiotique avec leur hôte (Howieson, 1999). Par exemple, il semblerait que *S. medicae* se retrouve plus fréquemment dans des sols acides (Garau *et al.*, 2005). Cependant, à notre connaissance, l'impact d'autres paramètres du sol sur la diversité des *Sinorhizobium* n'a pas encore été étudié. D'autre part, la différenciation génétique des populations de *S. meliloti* en fonction de leur origine géographique (fig I.4.3) semblerait indiquer que la structuration de ces bactéries symbiotiques est plus influencée par la distance géographique que par l'effet plante-hôte au niveau inter-spécifique (Pavoine, Bailly, 2007), au moins à l'échelle du bassin méditerranéen.

Au niveau intra-spécifique, aucune structuration spatiale évidente n'est ressortie de l'analyse par MLST de 231 souches au niveau mondial (Van Berkum *et al.*, 2006). De la même manière, la comparaison génétique par séquençage sur plusieurs marqueurs chromosomiques (*recA* et *glnII*) et plasmidiques (*nodB*) de souches issues de différents continents (Australie, Europe, Amérique du Nord et du Sud) suggère qu'il existe une faible différenciation génétique entre les populations de *S. meliloti* et *S. medicae* à l'échelle mondiale (Silva *et al.*, 2007). Van Berkum *et al.* (2007) ont aussi émis

(succinctement) l'hypothèse que les sols africains pourraient posséder des génotypes de *Sinorhizobium* uniques à ce continent. A une échelle spatiale moins importante (populations distantes au maximum de 400 km), Silva *et al.* (2007) ont observé une absence de différenciation génétique entre 14 populations de *S. meliloti* localisées au Mexique. De plus, la présence dominante d'un génotype (ET1) sur les 14 sites échantillonnés suppose que certaines souches pourraient se comporter comme des clones épidémiques (Maynard Smith *et al.*, 1993; McInnes *et al.*, 2004). Ces différentes études suggèrent que la migration, les flux de gènes et la recombinaison sont des événements importants dans la structuration des populations de *Sinorhizobium*, comme cela a été rapporté chez d'autres rhizobia (Silva *et al.*, 2005; Vinuesa *et al.*, 2005).

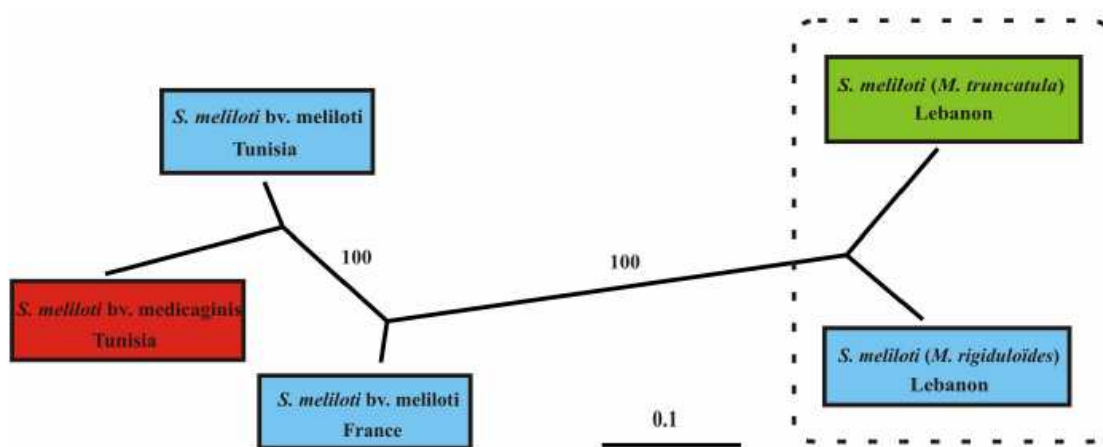


Figure I.4.3 : Arbre de Neighbor-Joining représentant la différenciation entre 5 populations de *Sinorhizobium meliloti* définies sur la base de l'origine géographique des souches et des plantes utilisées pour leur isolement. Les populations non différenciées ($p > 5\%$) sont entourées par une ligne pointillée. (bleu : hôte *M. truncatula*, rouge : hôte *M. laciniata* ; vert : hôte *M. rigiduloides*). Issu de la thèse de Xavier Bailly (2006).

La dispersion des rhizobia pourrait invoquer des processus humains par l'introduction de souches inoculées ou par transport des souches sur le tégument de graines introduites, comme suggéré pour les rhizobia du haricot (Perez-Ramirez *et al.*, 1998) et des processus naturels comme par le vent ou l'eau (Kellogg, Griffin, 2006; Silva *et al.*, 2005; Vinuesa *et al.*, 2005; Wang, Chen, 2004). La congruence des phylogénies des légumineuses et des gènes *nod* des rhizobia supporte l'hypothèse que la coévolution entre les deux types d'organismes a joué un rôle fondamental dans la diversification de la spécificité symbiotique, même si une stricte cocladogénèse n'a pas été observée (Bailly *et al.*, 2007). La coévolution entre *Medicago* et *Sinorhizobium* est donc supposée à ce jour, mais des études complémentaires sont nécessaires pour pouvoir l'affirmer.

Un autre aspect écologique et/ou historique de cette symbiose qui n'est pas encore réellement expliquée est la coexistence des deux espèces bactériennes en association avec *M. truncatula* ou *M. sativa*. Alors que la sélection fréquence-dépendante négative est souvent présumée pour le maintien de variation génétique (Bever, 1999), Heath and Tiffin (2007) ont suggéré que la diversité génétique pourrait aussi être maintenue par la sélection fréquence-dépendante positive dans les systèmes mutualistes, car une augmentation de la fréquence de l'hôte induirait une augmentation de la valeur sélective de l'hôte. Cependant, cette dernière hypothèse ne semble seulement possible que si les populations sont structurées spatialement.

5- Introduction de la thèse

Cette thèse a traité de l'analyse de la diversité et de la structuration de *S. meliloti* et *S. medicae* sous l'influence de différents paramètres environnementaux, biotiques et abiotiques. La « population bactérienne » a donc été une pièce maîtresse dans ce sujet, puisque l'influence de pressions de sélection ne peut être détectée statistiquement que sur un ensemble de souches. En ce qui concerne les conditions biotiques, j'ai étudié l'influence du génotype végétal à une échelle fine (niveau de la lignée végétale, soit de la sous-espèce) (chapitre II), l'influence de la compétition bactérienne entre les espèces et au sein de la même espèce (chapitre II), l'influence du niveau de fixation d'azote (chapitre II et III), l'influence de plantes-hôtes présentant des spectres d'hôtes différents (chapitre VI), l'influence de rotations de cultures (chapitre V). Pour les paramètres abiotiques, nous avons limité nos recherches à l'influence des paramètres physico-chimiques du sol (chapitre IV) et à l'influence de la distance géographique (chapitre IV). Enfin l'analyse de la coévolution a été abordée par des expériences d'adaptation locale (chapitre IV).

Pour plus de lisibilité, cette thèse est articulée sous forme de manuscrits, plusieurs étant encore en préparation. Bien entendu, certaines questions restent en suspens, et certains de ces manuscrits nécessitent des analyses supplémentaires mais voici l'avancée de ces travaux réalisés pendant ces trois ans. Bonne lecture.

CHAPITRE II :
COMPETITION EN POPULATION
NATURELLE

II- Compétition en population naturelle

1- Introduction

La présence d'un couvert végétal a une influence sur la diversité des microorganismes du sol (Yergeau *et al.*, 2007b; Zul *et al.*, 2007), notamment lorsqu'il s'agit de plantes s'associant à des bactéries symbiotiques (Kielak *et al.*, 2008). De nombreuses études ont comparé les populations de rhizobia associées à différentes espèces de plantes, montrant l'influence de l'espèce végétale, comme au sein du genre *Medicago* (Jebara *et al.*, 2001; Thurman, Bromfield, 1988) sur la composition des populations bactériennes. A une échelle plus fine (intra-espèce), il a pu être montré que les populations de rhizobia étaient parfois dépendantes du cultivar utilisé. Parmi ces travaux, Pafetti *et al.* (1998) ont ainsi montré que la diversité génétique des populations de *Sinorhizobium sp.* piégées était influencée par le choix de la lignée végétale de *Medicago sativa* utilisée pour le piégeage. Inversement, Bromfield (1984) n'a révélé aucune différence entre les populations avec d'autres cultivars de cette espèce, mais avec des techniques moléculaires moins précises. En utilisant différents cultivars de trèfle blanc, Harrison *et al.* (1989) n'ont observé aucune préférence symbiotique. Dans des études plus récentes, des variations significatives ont été détectées entre les populations de bactéries associées à différentes lignées de fève (Tian *et al.*, 2007) ou de pois (Depret, Laguerre, 2008). Ainsi, il semblerait qu'il existe effectivement une spécificité souche bactérienne - lignée végétale dans différentes interactions rhizobia – légumineuses, mais qu'une discrimination bactérienne aussi fine que possible soit nécessaire pour détecter des variations entre lignées végétales.

L'idée initiale de ce projet était d'étudier l'influence de la diversité végétale, en l'occurrence différentes lignées fixées de *M. truncatula* sur la diversité génétique des populations bactériennes symbiotiques, ici de *S. meliloti* et *S. medicae*. Pour ce faire, la technique de discrimination bactérienne choisie a été la PCR-CE-SSCP (Ren, 2000; Sunnucks *et al.*, 2000), du fait de sa rapidité d'application et de son prix raisonnable. Cette méthode est souvent utilisée pour analyser la diversité des communautés de bactéries du sol (Hong *et al.*, 2007; King *et al.*, 2005).

Le typage génétique des bactéries présentes dans les nodosités de différentes lignées de *M. truncatula* a indiqué une prédominance accrue de *S. medicae* comparativement à *S. meliloti*. Cette différence de nodulation entre les deux espèces végétales nous a conduits à comparer la compétitivité des deux espèces bactériennes de cet échantillonnage. Par ailleurs, une très faible diversité a été

détectée au sein de l'échantillonnage de *S. medicae*, contrastant avec la diversité obtenue pour *S. meliloti*. Afin d'éclaircir la compétition existant au sein de chaque espèce bactérienne, des expériences de compétition « intraspécifique » ont également été réalisées.

La complexité des approches de compétition réside essentiellement dans la discrimination des souches testées ensemble. Des études antérieures ont souvent utilisé les caractéristiques intrinsèques des souches bactériennes, comme la résistance aux antibiotiques (Amarger, 1981; Tas *et al.*, 1996), l'opacification du nodule (Eaglesham *et al.*, 1982), la production de pigments (Castro *et al.*, 2000) ou encore des marqueurs génétiques introduits, comme la résistance à la streptomycine, la production de trifolitoxine ou l'introduction de gènes rapporteurs (*gusA*, *celB*) (Athar, Johnson, 1996; Hahn, Studer, 1986; Robleto *et al.*, 1998; Sessitsch *et al.*, 1998; Shamseldin, 2007). Du fait de la disponibilité de marqueurs génétiques spécifiques à chaque souche bactérienne issue du typage génétique réalisé dans la première étape, nous avons choisi d'utiliser ces informations alléliques pour discriminer les souches lors des expériences de compétition réalisées.

Les résultats de ces deux analyses sont présentés dans l'article intitulé « Effects of *Medicago truncatula* Genetic Diversity, Rhizobial Competition, and Strain Effectiveness on the Diversity of a Natural *Sinorhizobium* Species Community », publié dans AEM.

En complément de ces résultats, plusieurs hypothèses concernant la prédominance d'une espèce bactérienne sur l'autre espèce dans ce sol, la sanction bactérienne par la plante et la relation entre l'efficacité de fixation et la compétition sont développées (en anglais) dans la partie « discussion complémentaire » (III, 3).

2- Manuscrit 1 (accepté)

3- Discussion complémentaire

The bacterial proportions observed in our study certainly reflect a major disequilibrium between the two bacterial species in the soil, with a much higher proportion of *S. medicae*. Historical effects, such as presence of plant species that would have favoured *S. medicae* in the soil, may explain its predominance. Several studies have shown that presence of a leguminous plant had a rapid and significant positive effect on its symbiotic rhizobia population size in soil, as demonstrated for cowpea on *Bradyrhizobium* (Thies *et al.*, 1995), for soybean on *B. japonicum* (Brockwell *et al.*, 1987), for pea on *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Hirsch, Spokes, 1994), for alfalfa on *S. meliloti* (Da, Deng, 2003), or for navy bean on *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Robert, Schmidt, 1983). Mechanisms underlying population size increase of symbiotic bacteria when their host plant is present remains scarce. Authors have suggested that bacteria could be released in the plant rhizosphere after senescence of the nodules. Viable bacteria could be contained either in persistent infection threads in senescing nodules (Paau *et al.*, 1980) or in the determined senescing nodule. However, this latter model suggests that released bacteroids still have the faculty to divide, which is not the case in the undetermined nodules (Mergaert *et al.*, 2006), like *M. truncatula* ones, thus preventing them to contribute directly to the next generation in soil. Several authors (Olivieri, Frank, 1994; Simms, Bever, 1998) also suggested that bacteria in nodule might favour their relatives in the rhizosphere via the exudation of specific compounds from roots and nodules, in a kin-selection process. Thus, specific plant species could have induced a predominance of *S. medicae* on *S. meliloti*. For instance, the common species *M. polymorpha*, known for its ability to form an efficient symbiosis only with *S. medicae*, may have colonized the field in previous years and induced *S. medicae* population increase compare to *S. meliloti*. Such difference would subsist even if the plant species is not present anymore. Unfortunately, no historical data on plant cover is available for the site, even if previous presence of *M. polymorpha* plants is highly plausible in this South of France area.

A better adaptation of *S. medicae* to this soil might also explain its higher frequency. Garau *et al.* (2005) hypothesized that *S. meliloti* would be present in more alkaline and arid soils while *S. medicae* would be mostly associated with moderately acidic soils which is not the case in our study where the soil was alkaline (pH=8.3). Furthermore, several studies highlighted the importance of edaphic constraints in the competition of nodulation (Dowling, Broughton, 1986), such soil pH (Denton *et al.*, 2007; Frey, Blum, 1994). In addition to strain adaptation to environmental conditions, *Sinorhizobium* spp. population structure might also have been shaped by various dynamic evolutionary histories, including demographical events, such as foundation or migration effects. Thus, purifying or

diversifying selection might have occurred differently depending on the geographical site and the history of the population leading to variable distribution patterns of the two species (Bailly *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2007; Zribi *et al.*, 2004).

Even when combining specificity, abiotic factors and competition, the question of maintenance of bacterial diversity at the two levels, i.e. between *S. meliloti* / *S. medicae* and within each species, remains unclear. On one hand, it is usually admitted that legumes cannot consistently recognize and exclude non-fixing rhizobia, especially those that are closely related to their usual symbiotic partners (Amarger, 1981; Hahn, Studer, 1986), which would maintain diversity among bacteria. On the other hand, among effective bacteria, models predict that mutualism can only be maintained if symbiosis partners are able to sanction less beneficial partners (West *et al.*, 2002b), which would narrow bacterial diversity. In nitrogen fixation symbiosis, plant can punish cheater bacteria by decreasing oxygen content inside the nodule to restrain bacterial metabolism and control the energy expenditure (Prell, Poole, 2006) or by providing fewer resources (i.e. carbohydrates) to root nodules containing exploiter bacteria (Kiers *et al.*, 2006; Simms *et al.*, 2006). Thus, possible sanction mechanisms by the plant host against the less efficient symbionts should lead, in a bacterial population, to a weaker polymorphism of nitrogen fixation effectiveness and nodulation ability. In this context, all symbiotic bacteria present in the plant nodules composing a population should display a similar efficiency to fix nitrogen. However, as showed in the manuscript, population strains of this study presented variation to fix nitrogen.

If plant sanctions always exist, the maintenance of a broad nodulation and fixation variation among strains observed in this study might be explained by the absence of the four *M. truncatula* lines we used in the original ecosystem of the sinorhizobial populations. Plant-host sanctions against less beneficial genotypes are probably more detectable after several plant generations and consequently in our plant trapping experiments, time was not sufficient to influence the diversity of the bacterial populations. In the case of sanctions occurring in response to the absolute level of N₂-fixation in a nodule, and not relatively to the N₂-fixation rate at other nodules (West *et al.*, 2002b), usefulness of sanctions is questionable, because plant sanctions incur a cost in producing nodules occupied by a weak cooperative strain whereas this less mutualist partner may still provide some benefits. Several authors (Lodwig *et al.*, 2003; Sprent, 2003) also suggested that bacteria can apply, in return, sanctions against plant to maintain the mutualism. This may also explain the maintenance of less beneficial bacteria in the population.

Kiers *et al.* (Kiers *et al.*, 2006; Kiers *et al.*, 2003) demonstrated that plant can distinguish fixation levels among its nodules (even intermediate level), recognize less effective genotypes, and allocate resources preferentially to nodules containing the best strain, leaving open the possibility to sanction one strain among others when plant is inoculated with a bacterial mix. This would explain why, in our experiments, bacterial mixes showed an overall nitrogen fixation as good as the most effective strain, i.e. deleterious effects of less effective strains are hidden (even independently of their proportions), favouring the plant fitness.

Following these assumptions of the plant sanction theory, we should observe in natural population a positive correlation between nitrogen fixation effectiveness and nodulation competitiveness, as bad fixing bacteria should be eliminated. At the contrary, if the best nitrogen fixing species is not the more competitive for nodulation, a trade-off between nitrogen-fixation effectiveness and competition for nodulation would indeed lead to the maintenance of the two bacterial species into the soil. In this last hypothesis, whereas the more competitive sinorhizobia would always be maintained in the symbiotic populations, the best nitrogen-fixing symbionts could also be advantage by the plant and be maintained at a high rate in the soil. This agrees with Kiers *et al.*(2006) who showed a significant correlation between level of bacterial nitrogen fixation and rhizobium survival in nodules. However, such scenario still supposes a kind of plant sanction against poor N₂-fixing rhizobia, otherwise mutualism would derive towards parasitism. In this study *S. medicae* seems to be a better N₂-fixing species, at least when considering the nodulating populations, and is highly predominant in the soil, whereas *S. meliloti* is more competitive for nodulation. This could reflect a negative correlation between nodulation ability and fixation efficiency between the two bacterial species, explaining the maintenance of the two bacterial species in interaction with *M. truncatula*.

4- Perspectives

Plusieurs suites pourraient être données à cette expérimentation, afin d'affiner nos résultats mais aussi d'ouvrir de nouvelles perspectives de recherche.

Pour l'expérience de compétition réalisée entre les deux espèces bactériennes, d'autres approches pourraient être testées. L'inoculation pourrait se faire non pas avec le génotype le plus compétitif pour la nodulation, mais avec le meilleur génotype en terme de fixation, de chaque espèce. Cette approche permettrait de comparer la fixation maximale des deux espèces, au niveau de ce sol, et de pouvoir conclure plus aisément sur le probable différentiel de fixation des deux espèces. Cependant, la

manipulation qui serait peut-être la plus intéressante serait d'inoculer toutes les souches des deux espèces en même temps. Cette approche fournirait des conclusions plus fortes que celles décrites par l'approche utilisée. En effet, les deux paramètres (nodulation et fixation) seraient inclus dans un tel modèle.

Du fait du faible échantillonnage de *S. meliloti* détecté (malgré un nombre global d'individus assez important dans chaque série de piégeage), les tests statistiques de différenciation des populations bactériennes en fonction de la lignée végétale n'ont pas pu être réalisés pour cette espèce bactérienne. Pour répondre de manière plus robuste à l'existence d'une réelle différence de composition des populations piégées par chaque lignée végétale, la même approche de piégeage avec ces lignées végétales pourrait être effectuée sur d'autres sols présentant une proportion de *S. meliloti* plus importante. Cela suppose cependant de reprendre l'expérimentation depuis le début et donc une masse de travail expérimental conséquente...

La même approche que celle présentée dans cet article, menée sur plusieurs sites, permettrait de généraliser et donc de confirmer l'hypothèse selon laquelle *S. medicae* serait un meilleur fixateur que *S. meliloti*. Cette notion d'un différentiel d'efficacité de fixation, mais aussi de compétitivité pour la nodulation, serait sans aucun doute à approfondir pour mieux comprendre les conditions du maintien de ces deux espèces symbiotiques des mêmes plantes hôtes.

Enfin, un des points soulevés dans la discussion est l'existence de polymorphisme des gènes *avhB11* et *virB11* entre les deux espèces et au sein de *S. meliloti*. Certaines souches ne possèdent qu'un seul des deux gènes (et donc sûrement un seul des deux systèmes), soit *avhB11* et *virB11*, alors que d'autres possèdent les deux. L'analyse fonctionnelle de ces gènes dans ces trois cas permettrait de préciser le rôle de chacun de ces gènes et de savoir, lorsque les deux homologues sont maintenus, si les deux gènes jouent réellement une fonction ou si l'un des deux est éteint. Il est en effet étonnant que des souches bactériennes si proches génétiquement (et apparemment fonctionnellement) issues de la même population, puissent posséder des systèmes fonctionnels différents. Pourquoi les deux systèmes sont parfois maintenus dans certaines souches ? Pourquoi un des deux systèmes n'a-t-il pas été purgé au profit de l'autre ? Afin de mieux comprendre le maintien de ces deux gènes, il serait aussi possible de comparer ces systèmes à des souches appartenant à d'autres espèces bactériennes possédant les deux copies telles que *R. etli*, *A. tumefaciens* ou *S. teranga*.

CHAPITRE III:

SANCTION DES BACTERIES TRICHEUSES PAR LA PLANTE-HOTE

III- Sanction des bactéries tricheuses par la plante-hôte

1- Introduction

L'étude décrite dans le manuscrit 1 a permis de mettre en évidence l'existence d'une souche bactérienne présentant un phénotype de fixation drastiquement différent en fonction de la lignée végétale utilisée (souche *ml7*, figure 2), alors que le phénotype de nodulation n'est pas réellement modifié. En effet, 3 lignées de plantes-hôtes inoculées avec cette souche présentent une biomasse aérienne supérieure à celle du témoin non inoculé, alors que pour une autre lignée végétale (F83-005), la combinaison ne semble pas efficiente (figure III.1.1), bien qu'à l'œil nu, les nodules semblent aussi bien développés (figure III.1.2).

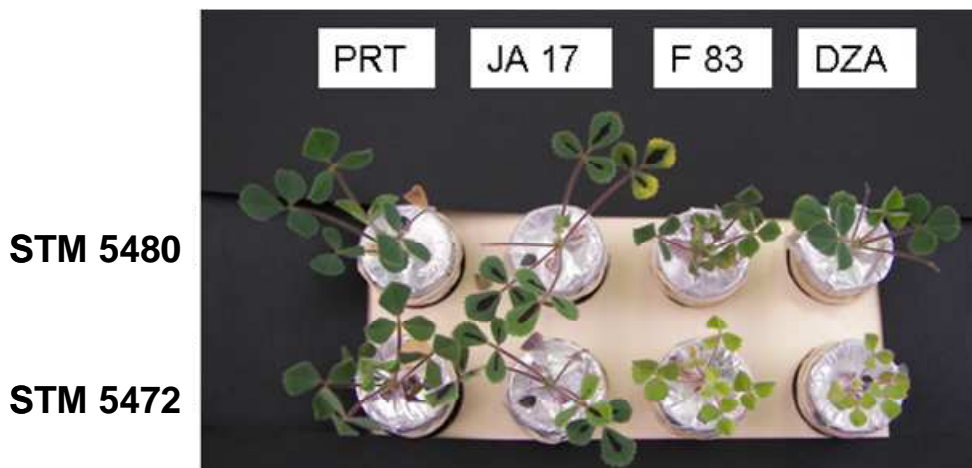


Figure III.1.1 : Photographie des biomasses aériennes des plantes inoculées avec la souche STM 5480 (témoin positif) et la souche STM 5472.

Plusieurs hypothèses permettraient d'expliquer ces différences : (i) cette souche pourrait être fixatrice d'azote en interaction avec F83-005, mais l'azote fixé ne serait pas transféré à la plante, (ii) cette souche pourrait ne pas fixer l'azote atmosphérique, tout en se développant grâce au carbone fourni par la plante ; enfin (iii) cette souche pourrait présenter un phénotype de fixation d'azote intermédiaire voire faible, ne transférant alors pas assez d'azote à la plante. Dans tous les cas, du fait du phénotype de nodulation apparemment non altéré, cette association plante-bactérie se rapprocherait plus du parasitisme que de la symbiose.

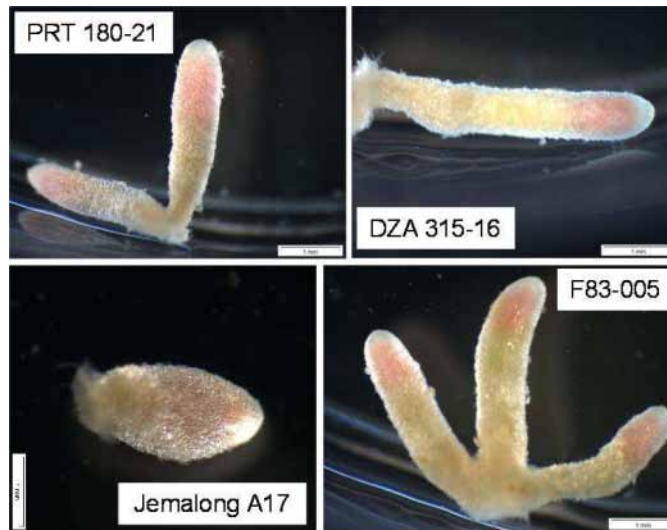


Figure III.1.2 : Photographie à la loupe binoculaire des nodosités observées dans les différentes interactions STM 5472 – *Medicago truncatula*.

Afin de tester ces différentes hypothèses, des coupes microscopiques ont été réalisées sur plusieurs nodosités issues de ces interactions, et comparées à celles réalisées sur une souche formant une symbiose efficace avec les 4 lignées (figure III.1.3).



Figure III.1.3 : Photographie d'une coupe microscopique de la partie apicale d'une nodosité issue de l'interaction DZA 315-16 avec STM 5472. Les autres combinaisons plantes-bactéries n'ont pas présenté de différences majeures (Yves Prin).

L'absence de différences contrastantes de bactéroïdes entre les coupes de nodosités issues d'une part de l'interaction de F83-005 avec l'une ou l'autre souche et d'autre part de l'interaction de STM 5472 entre les différentes lignées végétales a motivé le choix de réaliser une étude plus poussée. Cette partie est décrite dans le manuscrit suivant.

2- Manuscrit 2 (à resoumettre)

PLANT SANCTIONS AGAINST NON-FIXING SYMBIONTS: NOT UNIVERSAL?

ABSTRACT

In the nitrogen-fixing symbiosis, plant sanctions against ineffective bacteria have been demonstrated in previous studies performed on soybean and white lupin, both developing determinate nodules with *Bradyrhizobium* sp. strains. In this study, we focused on the widely studied symbiotic association *Medicago truncatula* - *Sinorhizobium meliloti*, which forms indeterminate nodules. Using two strains isolated from the same soil and displaying different nitrogen fixation phenotype on the same fixed plant line, we showed that the non-fixing strain was not counter-selected, in comparison to the N₂-fixing strain, by the plant- host. Even at the contrary, the non-fixing association resulted in a higher fitness of the bacteria and in higher resource allocation to these nodules. We confirmed this non-fixing advantage by comparing the same non-fixing strain either on a “fix-” compartment (with the previous plant line) or on a “fix+” compartment (with three others plant lines). This study indicated that, in a natural population, the less efficient strains can be favoured against effective symbionts and rise in frequency. Consequently, future studies should analyse the ubiquity of plant sanctions in various plant species but also in natural populations.

Keywords: sanction, symbiosis, nitrogen fixation, natural population, indeterminate nodule, *Sinorhizobium meliloti*, *Medicago truncatula*

INTRODUCTION

Legumes interact with nitrogen fixing bacteria (called rhizobia) by forming root nodules, inside which differentiated rhizobia (called bacteroids) have the ability to reduced atmospheric nitrogen into ammonium, making nitrogen available for the plant. In this mutual beneficial interest, i.e. mutualism, plant provides in return a protected environment and carbon photosynthates to the bacteria. Mutualisms, such as this symbiosis between leguminous plant and rhizobia, can be compared to a “biological market”, where the plant can exchange with several genetically different individuals (soil rhizobia population), thus initiating possible conflict. As rhizobia are not transmitted vertically between plant generations, mutualism persistence must partially be explained by the partner choice model (Bull, Rice, 1991; Simms, Taylor, 2002) , where at least one of the “trader” (the plant) evaluate and choose its partner based on its symbiotic efficiency .

The “tragedy of the commons” theory, which describes a conflict on commodities between individual and common interests, can be applied on the legume-rhizobia symbiosis. Indeed, rhizobia are under the dilemma between (1) taking the highest amount of resources from the plant without giving back nitrogen to the plant, increasing their own reproductive rate and reaching the highest fitness and competitiveness in the population and (2) giving more resources to the plant in order to increase plant fitness and increasing the probability that symbiosis will be maintained over next generation with the presence of the plant. Thus, a perennial symbiotic cooperation supposes the existence of rhizobia selection by the plant by either rewarding the more cooperative genotypes or by sanctioning the cheaters.

Whereas a theoretical model of legume sanctions was first proposed by Denison (2000), Kiers *et al.* (2003) provided the first experimental evidence of plant sanctions in the soybean - *Bradyrhizobium japonicum* interaction. By replacing air with a N₂-free atmosphere (Ar:O₂ mix), they showed that plant can not only penalize rhizobia that fail to fix N₂ inside their root nodules, but also evaluate the fixation level of rhizobia inside each nodule independently, and apply intermediate sanctions depending on their fixation level (Kiers *et al.*, 2006). This policing mechanism was measured by bacterial fitness, i.e. the number of rhizobia per plant or per nodule that could effectively be re-cultivated on plate. This measure gives a direct estimate of the number of individuals that would participate to the next bacterial generation. Moreover, a positive correlation between nodule size or nodule biomass, and rhizobial effectiveness was shown (Kiers *et al.*, 2006; Simms *et al.*, 2006), indicating that plant

sanction is also applied on the nodule development, certainly to minimize the useless energy expenditure.

At least one way for applying sanction on nodules containing poor N₂-fixing rhizobia would be by limiting their O₂ concentration and the nodule cell O₂ permeability to decrease the bacterial respiration and reproduction (Kiers *et al.*, 2003). Several other sanction mechanisms were hypothesised, such as the limitation of supplied photosynthates, the direct attack of non-fixing bacteroids or the abortion of roots supporting the ineffective nodules (Denison, 2000; Simms, Taylor, 2002).

Legume nodule types are usually classified in two groups: The determinate nodules inside which bacteroids keep the ability to reproduce, and the indeterminate nodules, where bacteroids may not divide anymore (see Denison (2000) for a review) and thus cannot contribute to the next rhizobial generation. Literature describes plant sanctions only on soybean determinate nodules or on “partially” determinate nodules of white lupin (Gonzalez-Sama *et al.*, 2004). However, Kiers *et al.* (2007) showed that, even within the same plant species, sanction ability varies depending on the plant genotype used, leading open the possibility that different plant species could show variations of sanctions on bacterial cheaters. Consequently, the question of the ubiquity of sanctions remains intact, particularly for plants forming indeterminate nodules. The goal of our study was to explore the reality of sanctions in the *Medicago truncatula* - *Sinorhizobium meliloti* association, considering several divergent fixed lines.

MATERIEL AND METHODS

. Inoculation and growth of plants.

We included in the study four *M. truncatula* fixed lines: DZA315-16, F83-005, PRT180-21, and JemalongA17. Each line was grown either with sterile water (negative controls), 5 mM nitrogen fertilizer (positive controls), strain STM 5472 or strain STM 5480, two *S. meliloti* strains isolated in a previous study from the same soil (Rangin *et al.*, 2008). Seeds were surface-sterilized and germinated in the dark during 48 h. The assays were performed twice with two different growing conditions: in the first assay, ten plant line replicates per combination were individually grown in tubes containing 20 ml of inclined sterile nutritive medium (15 g l⁻¹ agar) and 50 ml of liquid sterile nutritive solution diluted four times (Bertrand *et al.*, 2000). In the second assay, four plant line replicates per combination were grown on magenta pouches containing 1/3 perlite and 2/3 vermiculite watered initially with 70 ml sterile nutritive solution and weekly with 25 ml dH₂O. The two strains were grown in 20 ml yeast mannitol liquid medium during three days at 27°C under agitation (Vincent, 1970) and

washed twice with sterile water. In both assays, each seedling was inoculated with 1.5 ml inoculum (5×10^6 CFU ml⁻¹) and plants were grown during 7 and 8 weeks (respectively for the first and the second assay) with a 16 h photoperiod (alternating 24°C and 16°C).

In both assays, the total number of nodules produced on each plant was counted and plant shoot of each plant was collected, dried during 48 h at 72°C, and weighted. In the first assay, nodules were harvested and nodule surface per plant (defined as the projection surface of all scanned nodules) was calculated. Number of viable bacteria (reproductive offsprings) inside all the nodules per plant was also estimated by recording the number of colony-forming units produced from crushing, serially diluting and plating all subsamples of each plant (after sterilization of nodules). In the second assay, acetylene reduction assay were performed before harvesting shoot and fresh biomass of nodules per plant was measured.

. Acetylene reduction measurements.

Eight weeks after inoculation, nitrogenase activities were determined for four replicates from each plant line x bacterial genotype combination, by using an acetylene reduction method (Turner, Gibson, 1980). Briefly, 37 ml containers were sealed, and 10% of the headspace volume was replaced with atomic absorption-grade acetylene. Ethylene concentration was analysed 3 hours after adding acetylene, by using an Agilent 6850 Series GC System gas chromatograph. Peak areas were quantified by using Agilent G2630 software.

. Statistical tests.

Analyses of variances and LSD Fisher post-hoc tests were conducted either with the two strains (STM 5480 and STM 5472) inoculated on a single plant line (F83-005) or with one strain (STM 5472) inoculated on the four plant lines, using Statistica 6 software (www.statsoft.com). Statistics were performed on $N > 8$ plants for all the measurements, except for nitrogen fixation and nodule biomass ($N = 4$ plants). Only for the strain x four plant lines experiment, nitrogen fixation, nodule biomass, rhizobia per plant and nodule number were log-transformed to normalize residuals and respect homoscedasticity.

RESULTS AND DISCUSSION

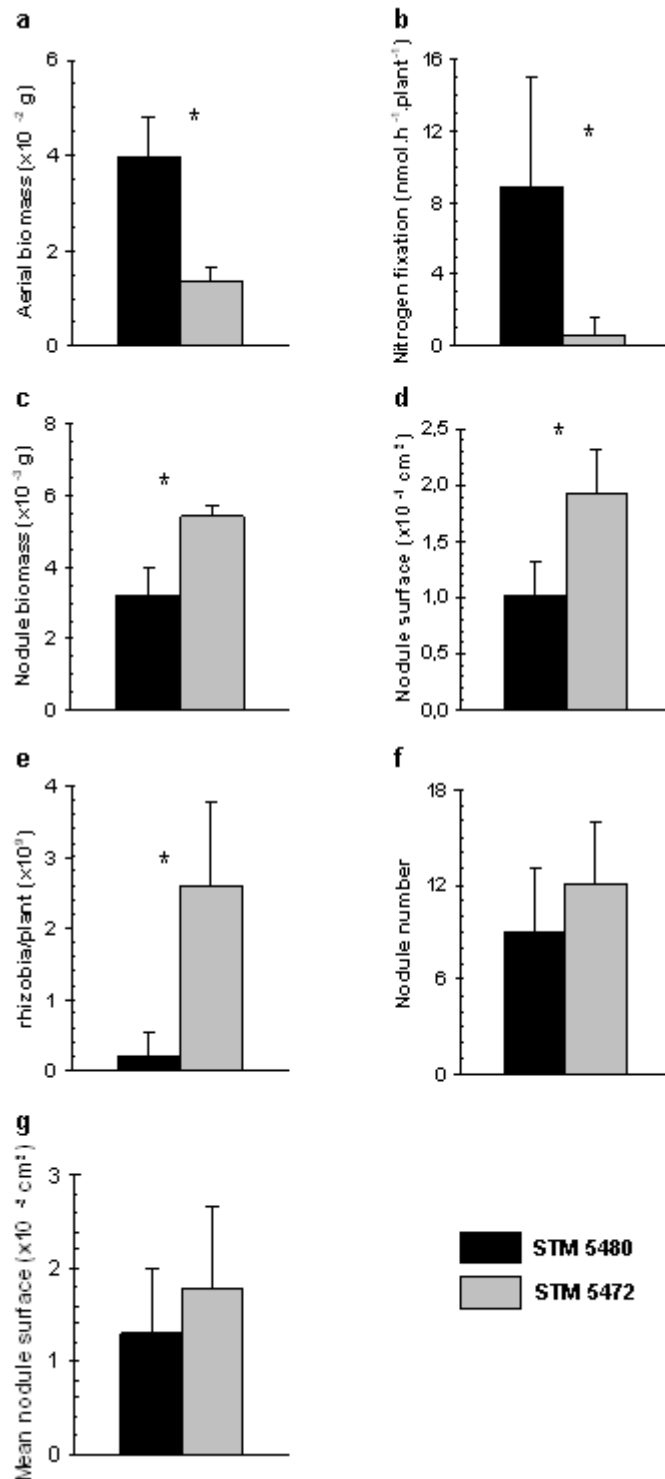


Figure 1: Measurements of aerial biomass (a), nitrogen fixation (b), nodule biomass/plant (c), nodule surface/plant (d), rhizobia/plant (e), nodule number (f) and mean nodule surface (g) on the plant line / strain combinations: F83-005 / STM 5480 and F83-005 / STM 5472. * Significant differences by paired t-test: a, $p < 0.001$; b, $p = 0.011$; c, $p = 0.007$; d, $p < 0.001$; e, $p < 0.001$; f, $p > 0.05$; g, $p > 0.05$.

Results obtained in the two assays are congruent (data not shown). The two strains used in this study display different fixation phenotype on the F83-005 plant line genotype. Indeed, as shown by aerial biomass (figure 1, a) and nitrogen fixation (figure 1, b), strain STM 5480 is efficient in term of nitrogen fixation (fix⁺) whereas strain STM 5472 is not (fix⁻). This fixation polymorphism of different *S. meliloti* strains when inoculated on the same *M. truncatula* genotype is not new, and Simsek *et al.* (2007) have suggested that succinoglycan oligosaccharide structure may be involved in the nitrogen fixation variation, at least partially. Much more surprisingly, differences in nodule biomass (figure 1, c), nodule surface (figure 1, d) and number of cultivable rhizobia (figure 1, e) per plant were found to be significantly higher in the non-fixing strain compared to the N₂-fixing strain. Nodule number (figure 1, f) as well as mean nodule size (figure 1, g) are not statistically different between the two strains.

The sanction theory suggests that plant would limit resources to non-fixing nodules, and conversely favour nodules where fixation occurred. In this context, our results are surprising, since bacterial fitness (estimated as the overall number of viable bacteria on root system), nodule biomass and nodule surface were lower for the efficient bacteria. Even if we can not exclude that the plant applied sanctions against the non-fixing STM 5472 strain, these sanctions were far from enough to result in a lower fitness in the non fixing bacteria compared to the fixing one. In term of viable bacteria that could be recovered from nodules, which represent a direct estimation of fitness for the bacteria, the mean ratio between the two strains was higher than 10. Considering each parameters measured, it seems clear that the plant finally give more resources to non-fixing nodules than to N₂-fixing nodules.

In order to go deeper in the understanding of this result, we performed the same experiment, keeping the same “non-fixing” strain and inoculating three other *M. truncatula* genotypes. The strain STM 5472 was efficient in fixing nitrogen in association with the three other genotypes tested (DZA315-16, PRT180-21, and JemalongA17), although showing polymorphism for aerial biomass (figure 2, a) and nitrogen fixation level (figure 2, b). This variation for nitrogen fixation among several plant lines with a single strain has previously been shown, and Tirichine *et al.* (2000) suggested that this polymorphism was, at least partially, under the control of the *Mtsym6* gene. When comparing the nodule biomass (figure 2, c), the nodule surface (figure 2, d) as well as the number of rhizobia (figure 2, e) per plant, values of the “fix-“ association (with F83-005 *M. truncatula* genotype) were not lower than the other N₂-fixing couples. Once again, the non-fixing combination does not result in a lower fitness of the bacteria or in a lower resource allocation to these nodules.

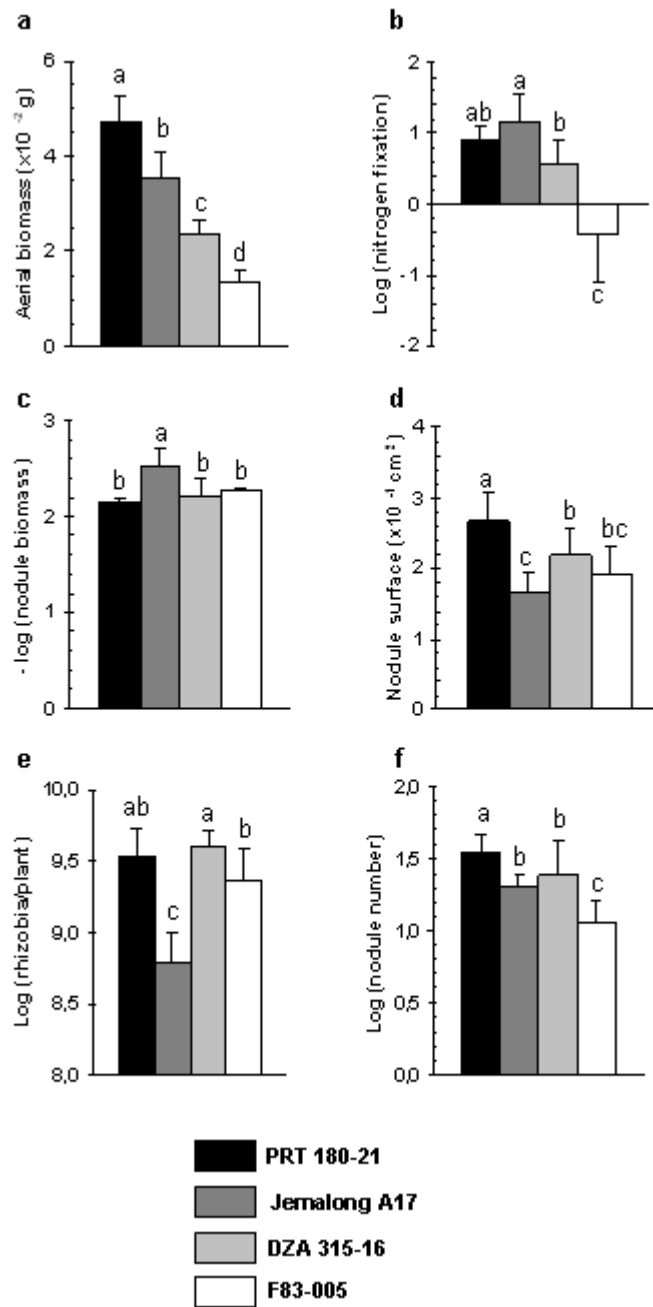


Figure 2: Measurements of aerial biomass (a), nitrogen fixation (b), nodule biomass (c), nodule surface (d), rhizobia/plant (e) and nodule number (f) on four cultivars / strain combinations: PRT 180-21 / STM 5472, JemalongA17 / STM 5472, DZA 315-16 / STM 5472 and F83-005 / STM 5472. Different letters above bars indicate significant mean differences (LSD Fisher post-hoc tests).

Taken together, these two experiments suggest that even if *M. truncatula* F83-005 line does apply sanctions against STM 5472 strain, these sanctions are not strong enough to result in a lower fitness of the bacteria compared either to other bacteria or to other plant lines associations. Nodule biomass, nodule surface and viable rhizobia per plant strongly suggest that *M. truncatula* does not apply any significant sanction against its ineffective symbiont.

Analyses of variances for the different measurements showed that nodulation ability (nodule number per plant), nodule development (nodule surface per plant) and bacterial fitness (number of rhizobia per plant) were dependent on the plant cultivar, on the strain genotype and on the interaction between plant and bacteria (table 1). This significant interaction means that the most beneficial strain is not an intrinsic status but rather depends on the host plant genotype. It seems thus that bacterial fitness and resources allocations to nodule are more dependent on the bacterial and plant genotypes, and their interaction, than the final output of the interaction, which is the level of nitrogen fixation. In our study, fitness of the non-fixing strain was better (or similar) than the N₂-fixing one, confirming this “independence” between fitness and nitrogen fixation level. This result should finally be viewed in a population dynamical context.

Table 1: ANOVAs for dry aerial biomass, nitrogen fixation, nodule surface, number of rhizobia/plant and nodule number of plants inoculated with the 2 bacterial genotypes independently on the four plant lines. (F-values shown *** $p \leq 0.001$).

effect	d.f.	aerial biomass	log (nitrogen fixation)	nodule surface	log (rhizobia/plant)	log (nodule number)
plant line	3	38,4 ***	10,7 ***	6,6 ***	14,2 ***	20,0 ***
bacterial genotype	1	81,5 ***	16,9 ***	123,4 ***	462,0 ***	25,3 ***
plant line x bacterial genotype	3	21,1 ***	5,6 ***	16,0 ***	29,2 ***	16,1 ***

Several studies have shown that the presence of a leguminous plant had a rapid and significant positive effect on its symbiotic rhizobial population size in soil, as for example demonstrated for alfalfa on *S. meliloti* (Da, Deng, 2003). In the case of indeterminate nodules, as for *M. truncatula*, Mergaert *et al.* (2006) showed that bacteroids were at an evolutionary dead-end form due to the endoreplication of their genome and the subsequent inability to divide. In this case, bacteroids are not involved in the next generation of the bacterial population. The viable rhizobia contained in persistent infection threads and possibly in the meristematic zone of the nodules keep however the ability to divide. They could be released in the plant rhizosphere after senescence of such indeterminate nodules (Paau *et al.*, 1980) and then have an impact on the evolution of the bacterial population. Our results, together with the fact that the two strains STM 5472 and STM 5480 display the same nodulation competitiveness on F83-005 lines (Rangin *et al.*, 2008), suggest that in a competition frame, the non-fixing strain STM 5472 frequency would increase in the population because of its highest fitness compared to the N₂-fixing bacteria STM 5480, leading to the maintenance of the “cheating” bacteria in the soil. However, such dual bacterial system would rapidly reach equilibrium, since the non-fixing bacteria will keep its advantage only if the plant can still reproduce, that is if a proportion of the nodules are colonized by the N₂-fixing bacteria. In a mixed plant system, with the two plant lines F83-

005 and JemalongA17 inoculated with strain STM 5472, F83-005 lacking an efficient symbiotic partner would rapidly disappear, even if the strain received a higher fitness from this genotype.

Natural ecosystems are obviously more complicated, containing different genotypes of both plants and bacteria, meaning that each plant usually interact with several bacterial genotypes. The situation where the plant does not reproduce due to nitrogen limitation should not exist (apart when the plant do not find any bacterial symbiont in a nitrogen deficient soil), meaning that cheating parasitic bacteria would increase in the population as their host plant can reproduce and maintain in the population. However, as the parasitic / mutualist status of a strain depends on the plant genotype, it seems extremely difficult to predict a ratio between parasitic and symbiotic strains in the field, all the more that recombination might occur among plant genotypes at every generation. Furthermore, theoretical models previously explained the coexistence of cheaters and mutualists (Ferriere *et al.*, 2002), and some focused on the stability for the legume-rhizobia mutualism (West *et al.*, 2002a).

Even if our results strongly suggest that plant sanctions must be extremely reduced in the *M. truncatula* - *S. meliloti* association, other experiments are needed to firmly conclude on their lack and generalize the result to other genotypes. The rhizobial fitness and the nodule development of N₂-fixing bacteria in presence of N₂: O₂ or with Ar: O₂ should be compared. This would test for the consequence of the lack of nitrogen fixation with for instance strain STM 5472 in association with different *M. truncatula* genotype. Fitness comparison of wild-type (“fix +” phenotype) versus mutant strain (mutated on a nitrogen fixation gene, leading to a “fix -” phenotype) on genetically divergent strain would give some insights on the reality and efficiency of plant sanction mechanism in indeterminate nodules. Furthermore, since this plant - bacteria couple has often been considered as a model couple (Cook, 1999), genetic and physiological works could be done in near future.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by program funded by INRA Santé des Plantes et Environnement (Rhizosphere Ecology of Annual Medics program). C. Rangin was supported by a Ph.D. fellowship from the French Ministry of Education and Research and by a teaching fellowship from the University Montpellier II.

We warmly thank Jean-Marie Prospéri and Magalie Delalande who provided the *Medicago truncatula* seeds. We are also very grateful to Jean-Claude Cleyet-Marel, Lucette Mauré and Karine Heulin, who provided technical help for nodule harvest and rhizobia counting.

Remarque: Les références bibliographiques citées dans le manuscrit sont incluses dans la bibliographie finale de la thèse.

3- Perspectives

a- Sanction « populationnelle »

Ce manuscrit a été soumis aux *Proceedings of Royal Society B : Biological Sciences*. Les reviewers ont émis un avis favorable sur l'intérêt de cette étude. Cependant, il leur est apparu nécessaire de confirmer notre hypothèse dans un système plus proche de la réalité biologique, c'est-à-dire lorsque la plante est en présence des deux types bactériens. Ils considèrent en effet que le terme sanction peut seulement être utilisé dans des conditions où le partenaire végétal a le choix entre plusieurs partenaires bactériens, permettant donc une éventuelle sanction de certains génotypes. Ils mentionnent malgré tout que West *et al.* (2002) suggère que la sanction peut être absolue, c'est-à-dire que la plante peut choisir de ne pas former de nodules avec une souche peu fixatrice, même en l'absence d'un choix alternatif de partenaires.

Afin de « réellement » tester l'hypothèse de sanction, suivant la définition des reviewers, nous avons choisi de mettre en place une manipulation de split-root. Cette expérience consiste à séparer équitablement le système racinaire de la plante-hôte en deux et d'appliquer un traitement différent pour chacun des deux sous-systèmes racinaires. Pour cette étude, nous allons comparer la fitness des souches STM 5472 / STM 5480 sur la lignée végétale F83.005. Deux contrôles seront nécessaires : l'inoculation d'une seule souche (STM 5472 ou STM 5480) de chaque côté du split-root. Les mêmes mesures que celle effectuées précédemment seront réalisées lors de la récolte. Cette expérimentation est en cours.

Une expérience en split-root avec la souche Sm1021 en présence de N₂ ou d'argon a indiqué que la souche fixatrice induisait d'avantage de nodules et une plus grande biomasse nodulaire totale du côté non limitant en fixation d'azote (Lepetit *et al.*, en préparation). Cette réponse compensatoire de la plante a été démontrée en temps long (14 jours) alors qu'elle n'a pas lieu en temps courts (Ruffel *et al.*, 2008). Par contre, l'inoculation de ces deux souches sur deux lots différents de plantes (donc sans système de split-root) a montré que le nombre de cellules viables est supérieure dans les nodules induit par la souche fixatrice (figure III.3.1) (Maren Friesen, unpublished data). Cependant, aucune précision n'est apportée au sujet du nombre de nodules dans les deux conditions.

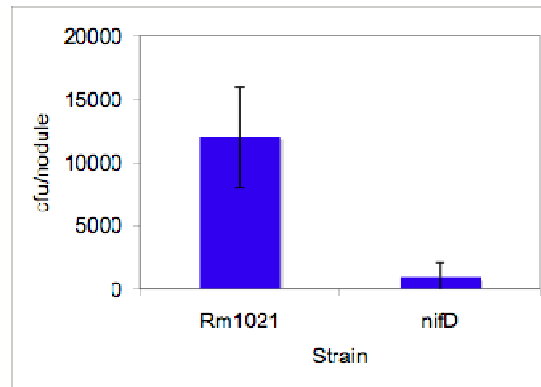


Figure III.3.1 : Nombre de bactéries viables par nodule. Les comptages bactériens ont été réalisés pour la souche Sm1021 sauvage et pour la souche mutée sur le gène de fixation *nifD*.

Ces résultats vont à l'encontre de notre hypothèse, selon laquelle la sanction pourrait ne pas exister dans le couple *Medicago truncatula* – *Sinorhizobium meliloti*. Ainsi, une expérience sur un plus grand nombre de souches de *S. meliloti* permettrait de vérifier ou d'infirmer l'hypothèse de sanction, et l'inclusion de souches de *S. medicae* permettrait d'élargir l'analyse aux deux symbiontes de *Medicago truncatula*. Dans une étape ultérieure, la comparaison de nodulation des deux espèces (par un système de split-root) permettrait éventuellement d'affiner les raisons du maintien des deux symbiontes sur la même plante-hôte.

b- Comparaison génomique et transcriptomique des souches

L'effet de la plante-hôte, de la souche bactérienne et de l'interaction plantes x souches a été démontré (manuscrit 1) et l'absence de réels mécanismes de sanctions a été suggéré (manuscrit 2). Grâce à ces études, des souches ayant un phénotype de fixation d'azote différent en fonction de la lignée végétale sont disponibles.

Dans le cadre d'une collaboration avec l'Université de Davis (Californie), le séquençage complet des souches STM 5472 et STM 5480 a été entrepris. Ces données vont nous permettre de comparer les diversités nucléotidiques sur les gènes précemment définis comme directement impliqués dans la spécificité d'hôte (Simsek *et al.*, 2007) et de visualiser des mutations potentielles non-synonymes pouvant affecter la symbiose. Par ailleurs, des approches de type transcriptomiques seront également possibles, en inoculant les deux lignées sur lesquelles la souche STM 5472 présente un polymorphisme de fixation avec les deux souches bactériennes.

CHAPITRE IV:

**ANALYSE PHYLOGEOGRAPHIQUE
SUR LE POURTOUR DU BASSIN
MEDITERRANEEN**

IV- Analyse phylogéographique sur le pourtour du bassin méditerranéen

1- Introduction

L'hypothèse initiale sous-jacente de ce projet était de mettre en évidence de la coévolution entre les deux partenaires symbiotiques, et plus précisément une corrélation entre la diversification d'espèces de *Medicago* à spectres de spécificité variables, et la présence concomitante de leurs souches symbiotiques. Afin de pouvoir tester en partie cette hypothèse, nous avons choisi d'analyser la différenciation bactérienne entre des populations piégées avec différentes espèces de *Medicago* présentant des spécificités symbiotiques différentes. Pour cela, le choix initial de ces espèces végétales s'est porté sur *M. truncatula*, *M. laciniata*, *M. carstiensis* et *M. rigiduloides*, qui présentent des aires de répartition géographique différentes sur le pourtour du bassin méditerranéen (voir figure IV.1.1) et qui sont connues pour appartenir à 4 classes de spécificité symbiotiques différentes. En étudiant des populations bactériennes sur différents sites situés sur le pourtour du bassin, nous supposons piéger des populations bactériennes reflétant la structuration géographique des espèces végétales. En effet, même si les bactéries fixatrices peuvent survivre à l'état libre dans le sol, la taille de ces populations devrait être fortement influencée (positivement) par la présence la plante-hôte, et par là même leur diversité.

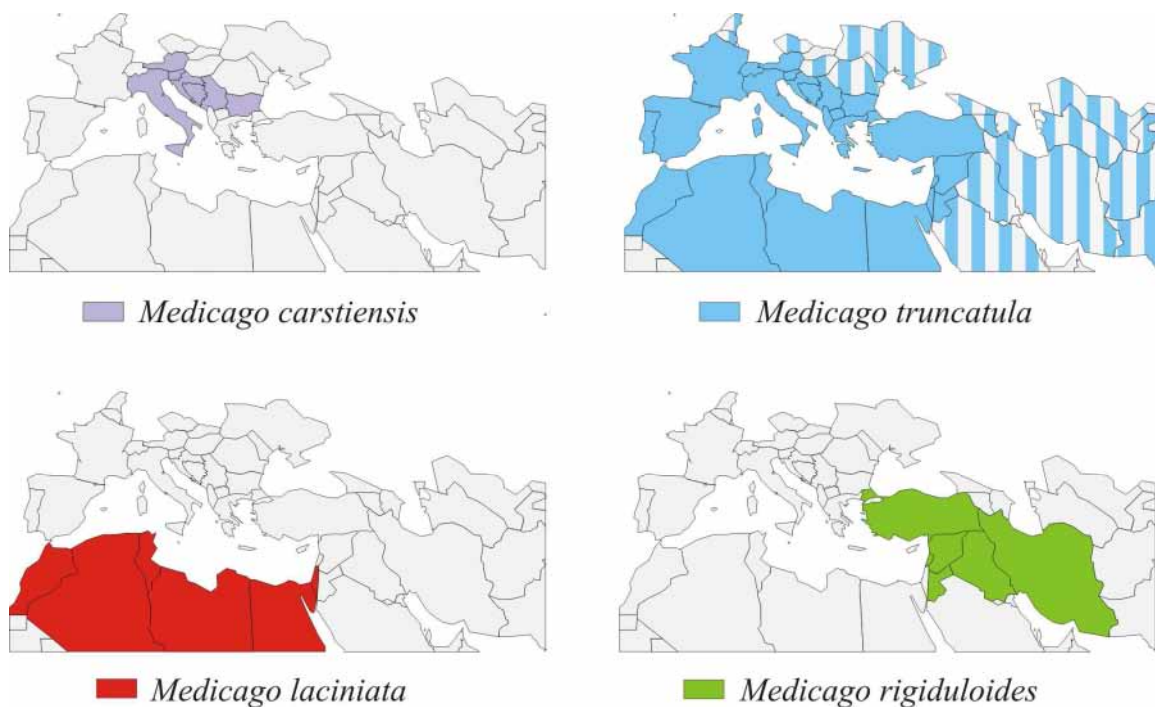


Figure IV.1.1 : Répartition des 4 espèces de *Medicago* utilisées sur le pourtour du bassin méditerranéen.

Alors que *M. laciniata* forme une symbiose avec le symbiote *S. meliloti* bv *medicaginis*, *M. truncatula* interagit efficacement avec *S. meliloti* bv *meliloti* et *S. medicae*. A ce jour, aucune souche symbiotique efficace n'a été décrite pour *M. carstiensis* et nous avons supposé qu'une analyse exhaustive de plusieurs sols de la zone de répartition de cette espèce végétale permettrait d'isoler ces symbiotes. De plus, les analyses génétiques précédentes de symbiotes efficaces de *M. rigiduloides* laissaient supposer l'existence d'un nouveau biovar de *S. meliloti* associé à cette espèce végétale.

Nous avons en parallèle effectué des analyses physico-chimiques des différents sols échantillonnés et utilisés pour le piégeage afin de déceler l'influence potentielle de ces paramètres sur la distribution génétique des communautés bactériennes. De plus, nous avons étudié l'impact de la distance géographique sur la différenciation génétique des populations bactériennes.

Les différentes questions de ce projet pourraient être résumées comme telles :

- Certains paramètres du sol influencent-ils la structuration de la diversité bactérienne ?
- La différenciation génétique entre les populations bactériennes est-elle corrélée à la distance géographique, reflétant un isolement par la distance ?
- La structure génétique des populations de *Sinorhizobium* associées aux *Medicago* est-elle corrélée à la distribution géographique des plantes-hôtes appartenant aux différents groupes de spécificité ?
- Les souches de *S. meliloti* associées à *M. rigiduloides* constituent-elles un nouveau biovar de *S. meliloti*?
- A quelle espèce ou biovar peut être rattaché le symbiote efficace de *M. carstiensis* ?

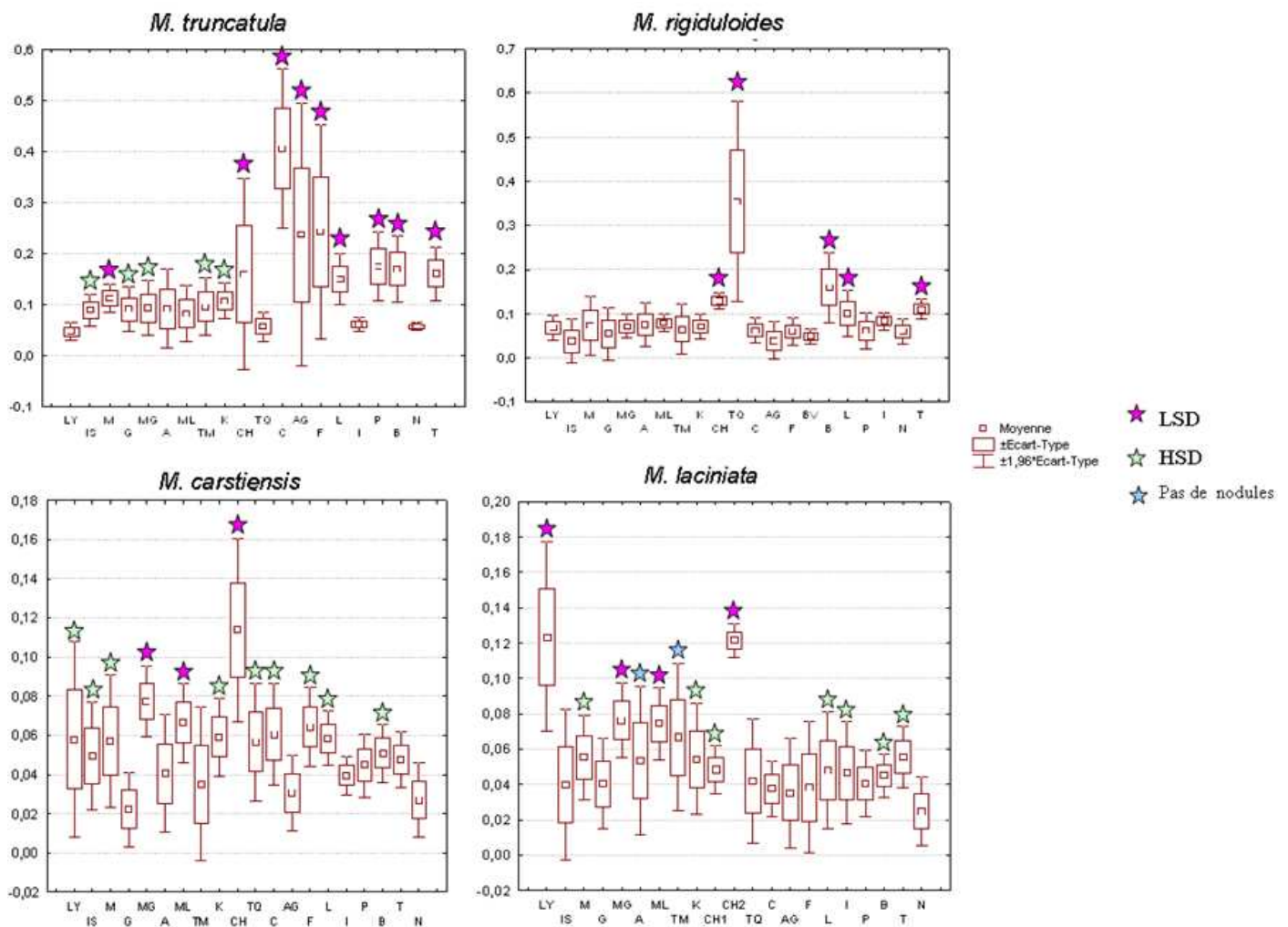
2- Expérimentations préliminaires

a- Différentiel de croissance des plantes issues du piégeage bactérien

Après piégeage avec les différents sols récoltés (voir matériel et méthodes IV.3), les poids secs des plantes ont été mesurés puis comparés aux poids secs des plantes non inoculées. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure IV.2.1. Les différences significatives de biomasses aériennes entre les lots inoculés et les lots témoins (ayant poussés sur un sol stérile) sont indiqués. Les tests statistiques ont été réalisés à l'aide de tests post-hoc LSD ou HSD. Le test LSD étant moins conservateur que le test HSD,

les différences significatives obtenues par test LSD incluent aussi les différences significatives obtenues par test HSD. Les plantes ne présentant pas de nodosités sont indiquées.

Figure IV.2.1 : Moyennes, écarts-types et intervalles de confiance des poids secs des parties aériennes (10^3 g) des plantes utilisées dans les piégeages bactériens sur les différents sols utilisés. Les codes utilisés pour l'origine des sols sont les suivants : LY, Lybie ; IS, Israël ; M, Maroc ; G, Grèce ; MG, Mongolie ; A, Albanie ; ML, Malte ; K, Kazakstan ; CH, Chypre ; TQ, Turquie ; C, Corse ; AG, Algérie ; F, France ; L, Liban ; I, Italie ; P, Portugal ; B, Bulgarie ; T, Tunisie ; N, témoin sans sol. Afin de respecter l'hypothèse d'homoscédasticité, deux lots de plantes ont été construits pour les plantes de *M. laciniata* poussant sur le sol issu de Chypre. Les étoiles indiquent les lots de plantes significativement différents du lot témoin non inoculé, différence significative obtenue par test LSD (rose) ou HSD (verte). Les étoiles bleues indiquent les lots de plantes où aucune nodosité n'a été observée.



Les différences significatives observées supposent un gain azoté des plantes, soit grâce à la présence dans le sol de bactéries efficaces soit par la présence de composés azotés organiques directement assimilables par la plante. Cependant, les quatre espèces végétales présentent toutes une biomasse aérienne significativement supérieure au témoin seulement sur trois sols, issus de Chypre, de Bulgarie ou du Liban. Les analyses de sols (tableau 1, manuscrit en préparation) indiquent une teneur en azote total relativement importante (par rapport aux autres sites) pour le sol libanais (3,3 g/kg).

Comparativement, la teneur en azote apparaît très importante sur le sol italien (7,8 g/kg), alors que la biomasse des plantes s'avère être supérieure au témoin négatif uniquement pour *M. laciniata*. Cette opposition de résultat suggère que l'apport azoté aux plantes, entraînant une meilleure croissance que le témoin, est probablement due à des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote efficaces dans l'association, et non pas par de l'azote du sol directement assimilable par la plante.

Pour *M. truncatula*, la majorité des lots de plantes présentent une différence significative par rapport au lot témoin, hormis les plantes ayant poussé sur les sols issus de Lybie, Albanie, Malte, Turquie et Italie.

Les plantes de l'espèce *M. rigiduloides* ayant poussé sur le sol de Turquie possèdent une biomasse aérienne largement supérieure aux autres lots. Puisque l'aire de répartition de *M. rigiduloides* est située sur l'Est du bassin méditerranéen, ce résultat laisse supposer la présence de symbiotes réellement efficaces sur ce sol. C'est cependant l'unique cas de différences très fortes. Les autres différences, bien que significatives, sont beaucoup plus faibles.

En ce qui concerne *M. carstiensis* et *M. laciniata*, seuls quelques sols induisent une biomasse des plantes plus importantes (suite à un test LSD) que le témoin.

b- Efficacité symbiotique

Pour *M. rigiduloides*, *M. carstiensis* et *M. laciniata*, une vingtaine de souches ont été isolées à partir des plantes ayant présentées des différences significatives par rapport au témoin. Ainsi, l'isolement de bactéries issues de *M. carstiensis* (sols de Mongolie, Malte et Chypre), de *M. laciniata* (sols de Lybie, Mongolie, Malte et Chypre) et de *M. rigiduloides* (Turquie, Chypre, Bulgarie, Liban, Tunisie) a été effectué. Plusieurs souches ont été testées sur l'espèce de plante-hôte utilisée pour leur piégeage.

Pour *M. laciniata*, toutes les souches testées sur l'espèce ont formé une symbiose efficace. Inversement, aucune des souches testées sur *M. carstiensis* n'a formé de symbiose efficace. Notre approche ne nous a donc pas permis d'obtenir une seule souche de *Sinorhizobium* efficace sur *M. carstiensis*. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat. La biologie de l'espèce pourrait jouer, puisque *M. carstiensis* est la seule du genre *Medicago* à posséder un rhizome en étant pérenne. Une autre hypothèse serait que pour ce couple, les souches bactériennes ne pourraient former une symbiose efficace qu'en présence d'une autre espèce bactérienne ou d'un champignon mycorhizien « helper ».

Pour les souches issues de *M. rigiduloides*, des résultats assez contrastés ont été observés. Certaines souches (isolées de nodosités) ne renodulent pas la plante-hôte d'origine, mais nodulent et fixent l'azote en association avec *M. truncatula*. Ce résultat suggère que ces souches appartiennent au biovar *S. meliloti* bv. *meliloti*. Une deuxième catégorie de souches, représentant une grande majorité des souches issues de Turquie (20 sur 24 testées) fixe l'azote en association avec *M. rigiduloides*.

Du fait de ces résultats préliminaires, nous avons décidé de restreindre notre analyse, et de nous intéresser à la phylogéographie des symbiotes bactériens seulement associés à *M. truncatula*. Ces résultats sont présentés dans le manuscrit 3 (en préparation). Du fait de la structuration géographique détectée chez ces symbiotes, l'expérience d'adaptation locale réalisée antérieurement (DEA) à cette analyse phylogéographique prend tout son intérêt. Ces travaux sont rapportés en chapitre V. Enfin, la description du biovar bactérien associé à *M. rigiduloides* est discutée dans les perspectives (chapitre IV.4.b).

3- Manuscrit 3 (en préparation)

**PHYLOGEOGRAPHY AND BACTERIAL SPECIATION OF
SINORHIZOBIUM MELILOTI AND *SINORHIZOBIUM MEDICAE*
IN THE MEDITERRANEAN BASIN**

ABSTRACT

Multilocus sequence typing was used to investigate the genetic structure of *S. meliloti* and *S. medicae* populations in the Mediterranean basin. These nitrogen-fixing bacteria interact with *Medicago* plants, which are widespread and common in this geographical region. We showed that both *Sinorhizobium* species are very diverse genetically and that recombination between isolates is frequent within each species. Diversity indexes, linkage disequilibrium analyses and migration rate estimations demonstrated that *S. medicae* and *S. meliloti* are structured in a panmictic and in an epidemic metapopulation respectively. This panmictic structuration could explain the phylogeographic pattern observed for *S. medicae*. This study suggests then that migration, gene flow and recombination are important events for the structuration of *Sinorhizobium* populations. Whereas spatial distance can not explain the differentiation between populations at the Mediterranean scale, several soils parameters (pH, phosphoric acid, magnesium oxide, calcium oxide and physical structure) and different demographic history of the two species can, at least partially, have influenced the structuration of each species, both at the interspecific and at the intraspecific level.

INTRODUCTION

Nitrogen-fixing bacteria form nodules on roots (or most rarely on stem) of leguminous plant. Exchanges of carbon and nitrogen molecules are at the basis of this symbiotic association. Most previously published studies analysed the molecular pathways regulating this interaction, but the ecological frame of this plant-bacteria symbiosis is also important to better understand the evolution and maintenance of such system.

Sinorhizobium sp. strains have been isolated from different continents and from several leguminous plant-hosts (Bailly *et al.*, 2007; Bailly *et al.*, 2006; Eardly *et al.*, 1990; Silva *et al.*, 2007). These bacteria survive as free-living bacteria in the soil and develop also inside nodules of plants they interact with. In this study, we were interested in the symbiotic bacteria, *S. meliloti* and *S. medicae*, which can be efficiently associated with the plant *Medicago truncatula*. Within *S. meliloti* species, three symbiotic ecotypes (biovarieties), based on their ability to interact with different plant species (due to the presence of alternative symbiotic plasmids encoding for different plant-host specificities), are actually described (Mnasri *et al.*, 2007; Villegas *et al.*, 2006). Only one of these bacterial ecotypes, *S. meliloti* biovar *meliloti* has the ability to form efficient nodules on several *Medicago* plants, like *M. truncatula*, *M. sativa* (alfalfa), *M. minima* or *M. constricta*. On the contrary, symbiotic specificity is more restricted within *S. medicae* species in the sense that none ecotype has been define nowadays. However, this bacterial species can be efficiently associated to several *Medicago* species, like *M. truncatula*, *M. ciliaris*, *M. arabica* or *M. polymorpha*.

Several factors have an influence on the geographical repartition of these bacterial species. Different soil compositions can explain bacterial diversity structure, as pH level, *S. medicae* being more acidic resistant than *S. meliloti* bv *meliloti* (del Papa *et al.*, 1999; Garau *et al.*, 2005). Furthermore, symbiont diversity trapped by the legume is, at least partially, under control of both the survival of the strains in the soil and the competition between strains for nodulation (Rangin *et al.*, 2008).

Although reports of the “same” *Sinorhizobium* strains isolated from very distant place of the world are widespread in the literature (Eardly *et al.*, 1990; Silva *et al.*, 2007; Van Berkum *et al.*, 2006), few studies have addressed the question of genetic differentiation among populations. Most studies did not detect significant differences among geographically separated populations between close populations

(Carelli *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2007). However, well separated populations presented significant differentiation (Pavoine, Bailly, 2007). This study leads to analyse genetic differentiation of these symbiont populations at a large scale in the natural repartition area of the plant-bacterial system. Centre of origin of *Medicago truncatula* plants was previously situated in the eastern part of Europe (Vavilov, 1926), and from here, species would have spread around the Mediterranean basin, with genetic differentiation (Lazrek *et al.*, 2008; Ronfort *et al.*, 2006). As plant dissemination is only efficient when nodulation occurs, *M. truncatula* symbionts should be widespread in this region, but little is known of their evolutionary history.

Genomic architecture of *Sinorhizobium* strains is variable, but is often composed of one chromosome (harbouring housekeeping genes) and several plasmids (harbouring auxiliary genes, among which symbiotic genes). Previous analyses showed a high level of genetic diversity among *S. meliloti* bv *meliloti* strains (Badri *et al.*, 2007; Biondi *et al.*, 2003b), with a hotspot of diversity on the megaplasmide pSymA (Bailly *et al.*, 2006; Giuntini *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2006). Main symbiotic genes, of which nodulation genes, are situated on this replication unit, but other genes also involved in symbiosis, such as exopolysaccharide genes are situated on the other megaplasmide pSymB. At present, less genetic diversity was observed within *S. medicae* strains (Van Berkum *et al.*, 2007; Zribi *et al.*, 2004), what may be due to its lowest frequency in all studies.(Bailly *et al.*, 2007; Roumiantseva *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2007)

In this study, we sampled soils from various sites around the Mediterranean Basin, and trapped symbiotic bacteria with the host-plant *Medicago truncatula* in the laboratory. Multilocus sequence typing (MLST) was performed to analyse the genetic diversity of the strains isolated. Such sampling and molecular method gave a highlight on the geographical distribution of the two symbiotic bacterial species. Furthermore, evolutionary hypotheses can be inferred from the phylogeographical patterns obtained for these two species. Phylogeography of bacterial species received much attention last decade (see Martiny *et al.* (2006) for review). The main goal of this study is to unravel the genetic structure of *S. meliloti* and *S. medicae* populations in the Mediterranean basin and try to understand the effects of soil parameters and geographical distance that might have an influence on the bacterial structuration in this spatial area.

MATERIAL AND METHODS

. **Soil samples and bacterial isolation.** In this study, 16 soil samples were collected randomly all around the Mediterranean basin and 3 others were collected more in the Eurasiatic area. Chemical and physical analyses were performed for 17 soils. For each of the 19 soils, seven plant species replicates of *Medicago truncatula* Jemalong A17 were used to trap nodulating bacteria. After 8 growth weeks, dry aerial plant biomass was measured and nodules were collected. Total genomic DNA was isolated (Chen, Kuo, 1993) for an average of 20 bacterial isolates per soil.

. **Marker's choice for genetic diversity analyses.** The genome of *S. meliloti* Sm1021 comprises one chromosome and two megaplasmids (pSymA and pSymB), whereas *S. medicae* strain WSM419 comprises in addition one small plasmid. Because previous studies have shown a significant linkage disequilibrium among markers within each replication unit in *S. meliloti* bv. *meliloti* (Bailly *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006), we amplified three genomic regions evenly distributed along the genome, and involved in different bacterial functions. Markers are located either within genes or adjacent to, within intergenic spacer (IGS). We used two markers involved in symbiosis: IGS_{nod} (on pSymA), framed by nodulation genes involved in symbiosis (*nodE* and *nodG*) and IGS_{exo} (on pSymB), situated in the exopolysaccharide cluster (between *exoP* and *thiD*) and one 'core' gene (chromosome), *edd*, coding for a phosphogluconate dehydratase. Primers and PCR conditions used for the amplification of loci chosen for MLST analysis were described previously by Rangin *et al.* (2008) for IGS_{nod}, Bailly *et al.* (2006) for IGS_{exo}, and van Berkum *et al.* (2006) for *edd*. Same primers were used for the sequencing reactions, done by the High Throughput Genomics Units Company, University of Washington.

. **Genetic diversity and bacterial growth rate analyses.** Significant departure from an equal proportion of each of the two species on overall populations was tested with a chi-squared test using Statistica 6 (StatSoft, France 2001). Differentiation between populations for bacterial species was tested with Genepop 3.4 (Raymond, Rousset, 1995).

For each species, genotypic diversity and nucleotidic diversity at each locus was computed using Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005a). To compare genotypic diversity of populations of unequal size, allelic richness was calculated after rarefaction to an equal sample size, by using Contrib (Petit *et al.*, 1998). Representation of allelic diversity for each marker was performed using phylogenies, calculated with Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005a) and drawn with Mega 4.1 (Tamura *et al.*, 2007). Bacterial growth rate was estimated at each locus using Lamarc 2.1.3, with 100 permutations (Kuhner, 2006).

Positive (or negative) value indicates an increase (or decrease) of the population size. Diversity indexes of bacterial communities (including both species) in each site sampled were calculated using EstimateS (Colwell, 2006). At least, genetic diversity of each species was performed either on global dataset or on each population including more than 9 individuals, using EstimateS (Colwell, 2006) and Contrib (Petit *et al.*, 1998). From indexes calculated on each population, student t-test from Statistica 6 (StatSoft, France 2001) was used to compare the mean diversity indexes between the two species.

Multiloci diversity defined several sequence types (ST). Based on this STs definition, rarefaction curves of the two bacterial species were drawn using EstimateS (Colwell, 2006) and the slopes of the two bacterial species were compared to evaluate the expected diversity of the two species. When slopes did converge to an asymptote, we can conclude that the observed diversity is well-estimated compared to the real diversity. Rarefaction curves were also computed on isolates based on their OTUs (Operational Taxonomic Unit) definition, corresponding to a sequence grouping at a 0.01 threshold using DOTUR version 1.3 (Schloss, Handelsman, 2005).

. **Linkage disequilibrium analyses.** For each species, we compared the degree of non random association between genotypes among replication units in each population. We calculated association measures that compare pairs of loci using Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005b) in order to distinguish levels of recombination between different replication units. We also used average association measure (I_a) over the whole genome using LIAN 3.5 (Haubold, Hudson, 2000), in the goal to compare recombination between the two bacterial species. At last we measure the I_a on all the isolates grouped within each species. The two methods used in this study to analyse the LD do not present the same null hypothesis, which are the linkage disequilibrium (presence of significant non random associations between loci) in Arlequin 3.1 and the linkage equilibrium (presence of significant random associations between loci) in LIAN 3.5.

. **Spatial genetic structure.** For each bacterial species, the genetic differentiation among bacterial populations isolated from each soil was tested by exact tests of global genotypic differentiation tests using SPAGeDi 1.2 (Hardy, Vekemans, 2002), calculated with Fst and Nst differentiation indexes, respectively based on the allelic and the nucleotidic diversities. Only populations having at least three individuals were taken into account and symbionts usually associated with *M. rigiduloides* are not included. To detect the existence of a phylogeographical structure, Fst and Nst were compared using SPAGeDi 1.2 (Hardy, Vekemans, 2002). When $Nst > Fst$, it means that similar alleles tend to be present in the same or in nearby populations, thus reflecting phylogeographical structure. To evaluate

gene flow for each species, matrix of absolute number of migrants (M) exchanged between two populations was calculated with Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005b), based on the differentiation between populations. To analyse isolation-by-distance patterns, mantel tests were performed with matrices of pairwise geographical distance and pairwise Fst/(1-Fst) coefficient between populations with SPAGeDi (Hardy, Vekemans, 2002) to detect some correlation between genetic and geographical distances.

. **Soil parameter influence.** To test the influence of soil parameters measured on the bacterial structuration, a canonical correspondence analyse was performed at the interspecific level using CANOCO 4.5 for windows (ter Braak, smilauer, 2002) to detect the more important factor(s). Variables to be included in the model were chosen by forward selection at a 0.05 baseline. Same analyse (CCA) was performed at the intraspecific level, by considering either the STs or the OTUs genotypes. Correlation between diversity indexes and soil parameters were calculated with linear regression analyses using Statistica 6 (StatSoft, France 2001).

. **Nucleotide sequence accession numbers.** All new sequences have been deposited in the GenBank database under the following accession numbers: IGS_{nod}, XX to XX; IGS_{exo}, XX to XX; *edd*, XX to XX.

RESULTS

. **Soil data.** Soil characteristics were found variable depending on the site, even if it could not be statistically tested (table 1).

Table 1: Soil chemical and physical characteristics for all samples but Turkmenistan and Kazakhstan.

	pH-H2O	Total limestone (g/kg)	CaO (g/kg)	CEC (CmolH/kg)	Organic matter (g/kg)	Total nitrogen (g/kg)	C/N	P2O5 (g/kg)	K2O (g/kg)	MgO (g/kg)	Clay (< 2 µm) (p.1000)	Fine silt (2 to 20 µm) (p.1000)	Unrefined silt (20 to 50 µm) (p.1000)	Fines sands (50 to 200 µm) (p.1000)	Unrefined sands (200 to 2000 µm) (p.1000)
Albania	7.94	28	7.75	13.8	10.3	0.97	6.2	0.125	0.147	0.621	273	208	190	228	90
Algeria	8.18	135	10.8	11.6	35.1	1.82	11	0.084	0.401	0.604	270	191	153	228	120
Bulgaria	8.24	393	12.2	15.9	32.7	1.88	10	0.088	0.345	0.213	243	193	117	107	306
Corsica	7.25	3	2.62	9	27.9	1.61	10	0.066	0.09	0.364	96	164	76	168	475
Cyprus	7.22	0	7.14	24.3	15.2	1.16	7.6	1.044	2.056	1.631	36	49	103	240	566
France	6.89	0	1.51	7.3	17.2	0.68	11	0.038	0.225	0.138	168	123	94	146	450
Greece	8.16	106	10.8	11	20.9	1.61	7.5	0.013	0.103	0.304	210	224	217	254	72
Israel	7.38	47	5.5	4.8	24	1.5	9.3	1.62	0.273	0.377	85	17	18	700	154
Italy	7.98	34	13.5	28.8	91.1	7.77	6.8	0.023	0.307	0.14	288	449	122	16	32
Lebanon	7.84	44	8.72	22.9	40.8	3.3	7.2	1.816	3.339	0.628	475	241	160	55	26
Libya	8.88	127	8.59	4.4	1.7	0.32	3	0.065	0.066	0.223	60	15	14	816	92
Malta	8.19	484	10.8	14.5	36.5	2.46	8.7	0.017	0.587	0.921	202	288	128	130	214
Morocco	9.03	66	8.67	5.6	19.9	1.18	9.8	0.094	0.086	0.181	157	136	134	388	164
Mongolia	7.83	0	4.66	15.3	37	1.92	11	0.158	0.165	0.51	154	201	195	380	32
Portugal	7.98	80	8.16	3.7	16.3	0.9	11	0.045	0.001	0.054	93	33	52	118	686
Tunisia	8.26	154	10.2	8	12.7	0.89	8.3	0.09	0.175	0.29	129	120	131	510	96
Turkey	7.36	0	2.17	11.9	14.4	0.92	9.2	0.03	0.169	0.258	123	89	103	216	454

.Genetic diversity results. *S. meliloti* was found predominantly around the Mediterranean basin ($\chi^2 = 58$; $dl = 1$; $p < 0.001$). Proportion of the two bacterial species is variable depending on the population (G-like test: p -value < 0.001) and *S. medicae* was not detected in every sites sampled (figure 1). Furthermore, diversity level of bacterial communities (both species included) was found variable depending on the sampling site (table S1).

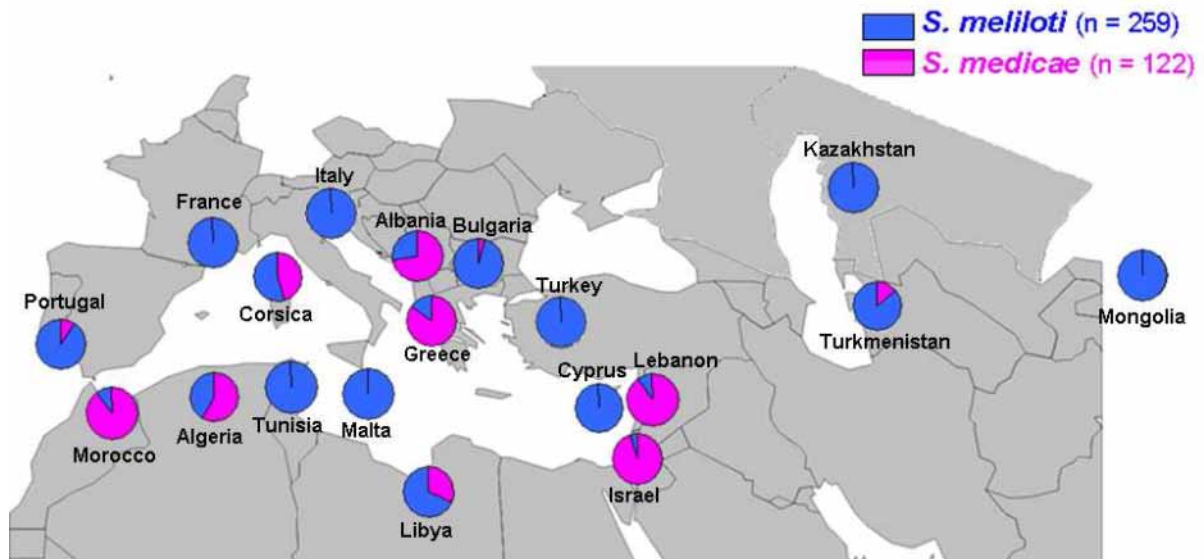


Figure 1: Repartition of the two bacterial species in the different sites sampled. (blue, *S. meliloti*; pink, *S. medicae*).Name of the sampling sites were given according to the country of origin.

Table S1: Diversity statistics for all sites sampled. Diversity indexes were computed using EstimateS (Colwell, 2006).

Site	n	R	1/D	ACE	n*	R*	1/D*	ACE*
Albania	18	17	53	77	15	14	105	53
Algeria	21	12	11.05	48	20	11	10	39
Bulgaria	20	10	4.13	24	20	10	4.13	24
Corsica	20	9	6.79	14	20	9	6.79	14
Cyprus	20	8	6.13	18	18	6	4.94	9
France	20	4	2.24	4	20	4	2.24	4
Greece	20	12	13.57	21.33	20	12	13.57	21.33
Israel	20	16	47.5	29.2	18	14	38.25	23
Italy	21 (16)	16 (12)	35 (24)	32.5 (24)	21 (16)	16 (12)	35 (24)	32.5 (24)
Kazakhstan	20	3	1.94	3	20	3	1.94	3
Lebanon	20	14	23.75	29	20	14	23.75	29
Libya	19	15	24.43	41.5	14	10	16.17	38
Malta	20	5	4.75	5	19	4	4.28	4
Morocco	19	15	34.2	37	19	15	34.2	37
Mongolia	20	15	31.67	28.75	13	11	39	23
Portugal	20	13	17.27	25	20	13	17.27	25
Tunisia	20	12	12.67	21.33	20	12	12.67	21.33
Turkey	23 (13)	16 (9)	28.11 (15.6)	29.75 (14)	21 (11)	15 (8)	26.25 (13.75)	33.33 (16.5)
Turkmenistan	20	5	1.79	6.5	19	4	1.61	4.5

n, number of isolates; R, number of STs; 1/D, Simpson's reciprocal diversity index; ACE, estimator of diversity. The suscript * indicates values calculated without any missing sequence. Values written in italics are those differing between two calculations. Values within brackets are obtained without the symbionts usually affiliated to *M. rigiduloides*.

The most polymorphic locus was IGS_{nod} for both species, both for allelic richness (comparison on the R[n] index) and nucleotidic diversity ($p < 0.001$) (table 2). Genotypic diversity is higher for *S. meliloti* than for *S. medicae*, at least for IGS_{nod} marker (table 2). Whereas majority of alleles detected on *edd* marker were shared between both species, obvious allelic distinction between both species was found for IGS_{exo} and IGS_{nod} (figure 2), at the exception for this latter marker of 6 *S. meliloti* isolates (verification done on 16S rRNA gene, data not shown) harbouring *S. medicae* IGS_{nod} alleles. Those isolates came from three different populations and their position on different clades of the phylogeny, shown on figure 2, suggest that several horizontal transfers between the two species could have occurred. Furthermore, 15 *S. meliloti* isolates harbouring IGS_{nod} alleles usually described in bacteria associated to *M. rigiduloides* were detected in two populations. Those symbionts are described as non-fixing strains on *M. truncatula* (Béna *et al.*, 2005) and important genetic divergence between those IGS_{nod} alleles (called RA to RF) and *S. meliloti* *bv meliloti* alleles was noted (figure 2), explaining why majority of diversity calculations were done without those data.

Table 2: Diversity indexes and growth rates per locus of *S. medicae* and *S. meliloti* species.

	Samples	Genotypic diversity		Nucleotidic diversity			Growth rate
	n	R	R [n]	S	L	π	G
<i>S. medicae</i>							
IGS _{nod}	116	10	10	521	15	0.0038	320
IGS _{exo}	111	9	9	221	7	0.0058	390
<i>edd</i>	116	7	7	500	41	0.0341	-75
<i>S. meliloti</i>							
IGS _{nod}	241	24	17.42	524	102	0.0145	-20
IGS _{exo}	253	18	12.57	424	35	0.0240	20
<i>edd</i>	260	7	6.44	500	37	0.0209	-90

n, numbers of isolates; R, allelic diversity; R[n], number of STs after rarefaction to a sample size of n (n chosen as the smallest number of isolates between the two species for locus considered), S, number of polymorphic sites; L, number of analysed sites; π , the estimator of nucleotidic diversity. Bacteria usually associated with *M. rigiduloides* are not included and the 6 isolates of *S. meliloti* harbouring *S. medicae* alleles on IGS_{nod} were not included in IGS_{nod} calculations. * $p \leq 0.10$; ** $p \leq 0.05$.

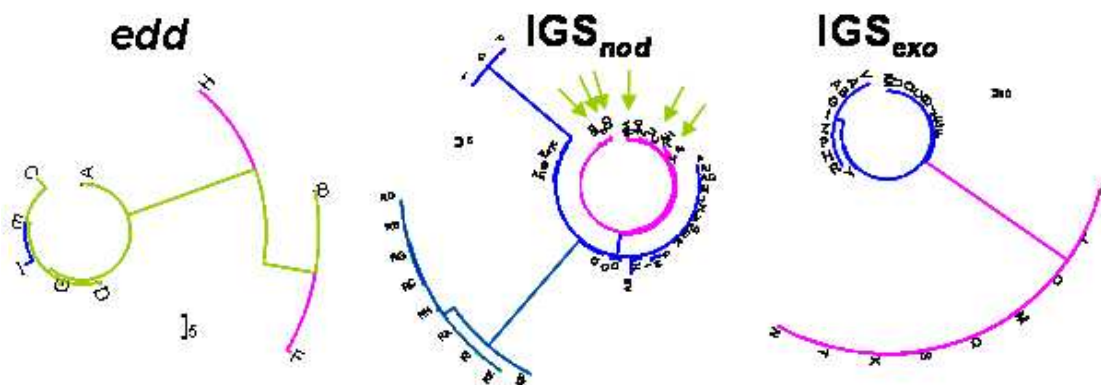


Figure 2: Phylogenies of the different alleles detected at each locus. Alleles detected exclusively in *S. meliloti* are in blue, those belonging only to *S. medicae* are in pink, whereas alleles shared by the two bacterial species are in green. Green arrows indicate *S. medicae* alleles amplified from *S. meliloti* isolates (see text).

A total number of 167 different multiloci haplotypes or sequences types (STs) were detected, with 106 for *S. meliloti* and 61 for *S. medicae*. By calculating mean diversity indexes for each species on the STs dataset (table 3), we found that *S. medicae* presented an higher expected allelic richness (R[9]) than *S. meliloti*, whereas the estimated levels of diversity (ACE and Simpson index) are not different between the two species. These tendencies were also observed on the global dataset (table 3), except for the ACE index uncorrected by the species sample size. Rarefaction curves (figure S1) on STs genotypes showed the same slope for the two species, and indicated that whole biodiversity expected is not observed in this sampling. However, rarefaction curves on OTUs genotypes showed that the total estimated diversity was nearly observed in this sampling.

Table 3: Levels of observed and estimated diversity for each species. Calculations were performed for each species either per population or globally (all the populations pooled). All calculations were performed by EstimateS (Colwell, 2006), except R[9] by Contrib (Petit *et al.*, 1998). For the mean per population class, calculations of R[9], Simpson and ACE indexes were performed in each geographical population (only populations presenting more than 9 isolates were included) and the means on all populations were calculated. Comparison of the index means were performed with a Student t-test using Statistica 6. Calculation of R[9] for global class was impossible due software limitation.

		n	R	R / n	R [9]	ACE	1 / D
Mean per population	<i>S. meliloti</i>	17.8	8.4	0.47 *	5.29 *	15.6	11.3
	<i>S. medicae</i>	15	10.6	0.70	7.11	21.9 ^{NS}	27.6 ^{NS}
Global	<i>S. meliloti</i>	265	106	0.40	-	307	41.06
	<i>S. medicae</i>	116	61	0.53	-	111	43.59

n, number of isolates ; R, number of STs ; R / n, standardized number of STs; R[9], number of STs after rarefaction to a sample size of 9; 1 / D, Simpson diversity index; ACE, diversity estimator . *, p<0.05; NS, non significant.

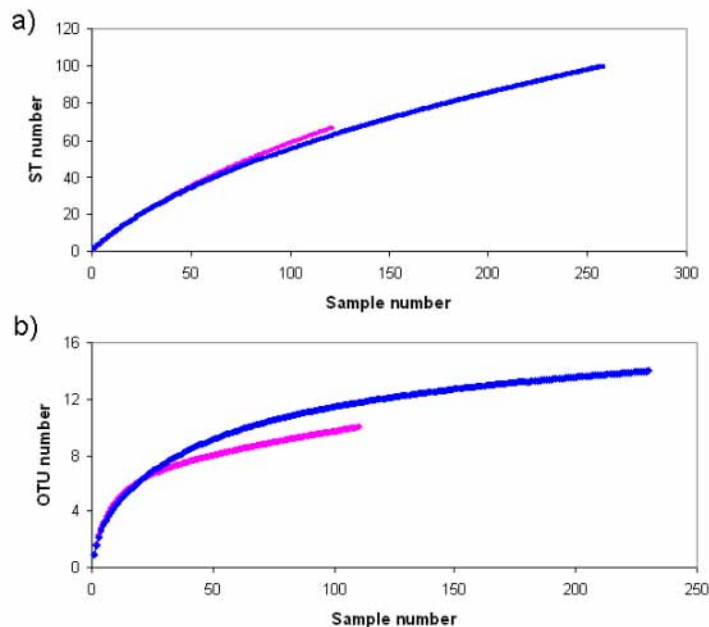


Figure S1: Rarefaction curves of STs (a) and OTU (b) for *S. meliloti* (blue) and *S. medicae* (pink) species. Rarefaction curves were performed with EstimateS (Colwell, 2006) using Coleman Rarefaction index. STs were defined with 100% sequence homology, and isolates with missing sequences were considered as a new ST. OTU were constructed using DOTUR (Schloss, Handelsman, 2005), and threshold of 0.01 was applied (99% sequence homology), isolates with missing sequence data were excluded of the analysis.

. **Bacterial growth rate analyses.** *S. medicae* presented a higher expansion rate on IGS_{nod} and IGS_{exo} markers than *S. meliloti* (table 2). Moreover, demographic contraction detected on the chromosomal marker for the two species might indicate that housekeeping genes are under purifying selective pressure, which tends to reduce the ancestral diversity on the chromosome (table 2).

. **Linkage disequilibrium measures.** For *S. medicae*, majority of pairwise tests between genetic markers revealed significant departure from the null hypothesis of linkage disequilibrium hypothesis, both between plasmidic units and between plasmidic and chromosomal unit (table 4). For *S. meliloti*, results appeared less clear, because pairwise tests were consistent with linkage disequilibrium in several populations (table 4). In those populations, this linkage disequilibrium might be due to the fitness advantage of several clones. For instance, one clone represented 70% of the isolates in Kazakhstan, represented by a low Simpson's reciprocal diversity index (table S1). Calculations of association index per population detected random association between markers over the whole genome for all *S. medicae* populations (table 4). This linkage equilibrium in *S. medicae* was confirmed by measure of association index on the whole data set, by considering either all isolates ($I_a = 0.72$, $P = 0.26$) or only one individual per genotype ($I_a = -0.02$, $P = 1$). For *S. meliloti*, linkage disequilibrium was demonstrated by measure of association index on the whole data set by considering all isolates ($I_a = 0.04$, $P < 0.01$), but not by considering only one isolate per genotype ($I_a = -0.02$, $P = 0.9$). However, as calculations of association index per population showed a weak linkage disequilibrium among *S. meliloti* isolates only in several populations (table 4), we can consider that linkage disequilibrium in *S. meliloti* is also due to genetic differentiation between populations.

Table 4: Linkage disequilibrium (DL) between genetic markers. The null hypothesis of random association between pairs of markers was tested using Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005b). Results indicated rejection of the null hypothesis (-, $p < 0.05$) or not (+, $p > 0.05$). The null hypothesis of random association between markers over the whole genome (I_a) was tested using LIAN 3.5 (Haubold, Hudson, 2000). The Monte Carlo P values of the association index are calculated with 100 resamplings. Number of isolates (n) is indicated.

	<i>S. meliloti</i>						<i>S. medicae</i>					
	n	odd / IGS _{nod}	odd / IGS _{exo}	IGS _{nod} / IGS _{exo}	I_a	P value (I_a)	n	odd / IGS _{nod}	odd / IGS _{exo}	IGS _{nod} / IGS _{exo}	I_a	P value (I_a)
Albania	5	-	-	-	0.01	1.00 ^{nr}	10	-	-	-	-0.05	0.63
Algeria	9	+	-	+	0.48	0.01	12	-	-	-	0.06	0.13
Bulgaria	19	-	-	-	0.11	0.07	1	nt	nt	nt	nt	nt
Corsica	11	nt	nt	nt	0.01	1.00 ^{nr}	9	nt	nt	-	0.08	0.16
Cyprus	20	+	+	+	0.31	0.01	0	nt	nt	nt	nt	nt
France	20	+	nt	nt	0.29	0.01	0	nt	nt	nt	nt	nt
Greece	3	nt	nt	-	nt	nt	17	-	-	+	-0.03	0.59
Israel	1	nt	nt	nt	nt	nt	19	-	-	-	0.01	0.41
Italy	21	-	-	-	0.05	0.06	0	nt	nt	nt	nt	nt
Kazakhstan	20	+	+	+	0.46	0.01	0	nt	nt	nt	nt	nt
Lebanon	2	nt	nt	nt	nt	nt	18	-	-	-	0.01	0.46
Libya	14	-	-	-	-0.32	0.06	5	-	-	-	-0.01	0.37
Malta	20	nt	nt	nt	0.06	0.04	0	nt	nt	nt	nt	nt
Morocco	2	nt	nt	nt	nt	nt	17	-	-	-	0.01	0.66
Mongolia	20	-	-	-	-0.34	0.09	0	nt	nt	nt	nt	nt
Portugal	18	-	-	+	0.09	0.01	2	nt	nt	nt	nt	nt
Tunisia	20	-	-	-	0.05	0.10	0	nt	nt	nt	nt	nt
Turkey	23	nt	nt	-	-0.33	0.09	0	nt	nt	nt	nt	nt
Turkmenistan	17	-	nt	nt	0.22	0.01	3	-	-	-	nt	nt

nt, nr, computations are respectively not tractable or not reliable due to a lack of polymorphism.

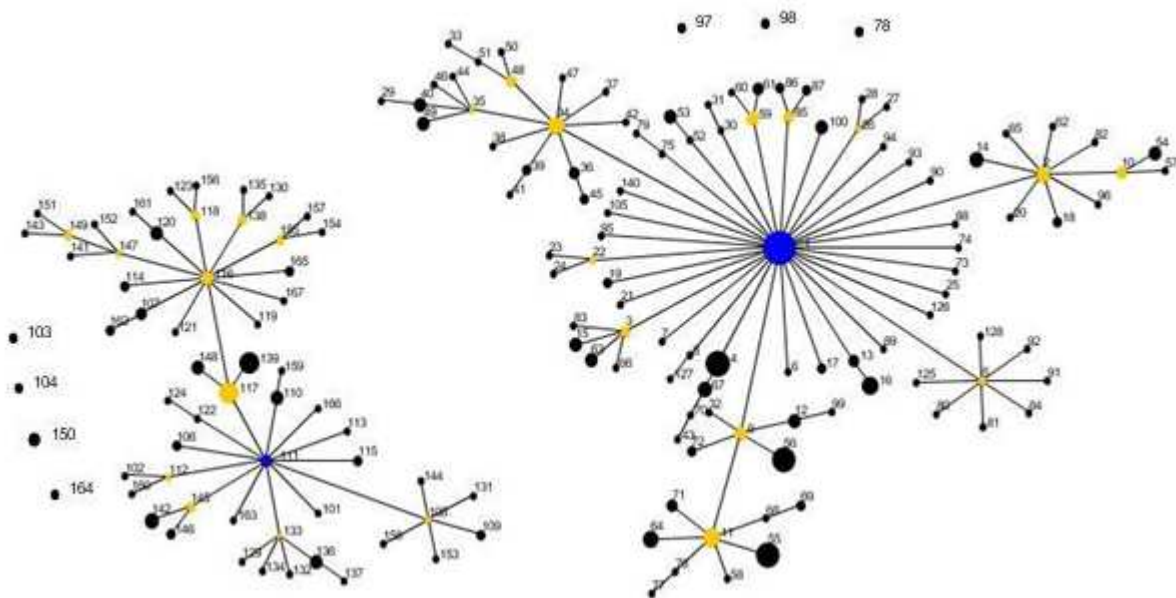
. Phylogeographical structure. Surely because 83% (139 of 167) of the haplotypes were detected only in one population, there was a clear overall genetic differentiation between the 19 populations, except on IGS_{exo} for *S. medicae* (table 5). However, 63% (105 of 167) of the haplotypes only had one representative. Furthermore, pairwise population comparisons (data not shown) do not indicate that populations situated in Eurasia (Turkmenistan and Kazakhstan) and even in Asia (Mongolia) are genetically differentiated of south-european and north-african populations. In addition, a phylogeographical pattern was only detected for nodulation loci (IGS_{nod}) of *S. medicae* species, meaning that alleles which are closed genetically tend to be present in the same or in nearby population.

Table 5: Phylogeographic structure of each bacterial species. Calculations and comparison of allelic (Gst) and nucleotidic (Nst) genetic differentiation among populations were performed using SPAGeDi (Hardy, Vekemans, 2002). Only populations having at least three individuals were taken into account. Symbionts usually associated with *M. rigiduloides* are not included (see text).

	<i>S. meliloti</i>		<i>S. medicae</i>	
	Nst	Gst	Nst	Gst
multiloci	0.386 *** =	0.378 ***	0.421 *** =	0.206 ***
IGS _{nod}	0.168 *** =	0.288 ***	0.479 *** >	0.229 ***
IGS _{exo}	0.460 *** =	0.405 ***	0.109 *	= 0.096
edd	0.466 *** =	0.448 ***	0.439 *** =	0.297 ***

The likely patterns of genetic evolutionary descent and the identities of the probable founding genotypes were inferred from an eBURST analysis (Feil *et al.*, 2004) of the MLST data. Only one group was found for each species (figure 3). Within *S. meliloti* group, the predicted founding type was ST-1 (bootstrap confidence of 100%) whereas ST-111 was the predicted founding type of *S. medicae* (91%). Nearly the same number of predicted co-founding types (around 12) was detected for both species. For *S. medicae*, ST-111 was found in Morocco site only, whereas the two more frequent co-founding types (ST-116 (94%) and ST-117 (60%)) were detected in several (3 and 4 sites respectively) sites of the sampling. All others co-founding types of *S. medicae* were detected either in two locations (ST-147 and ST-118), or only in a single geographical site. At the contrary of *S. medicae*, the founder genotype of *S. meliloti* (ST-1) was detected in 7 locations. Furthermore, majority of co-founder types were found in several locations. No correlation could be inferred from the genetic relation between STs and their geographical location. The STs types descending from co-founder STs were often not sampled in the same geographical site, suggesting an important migration process within *S. meliloti*.

Figure 3: ‘Population snapshot’ of 381 *Sinorhizobium* sp. strains derived from the allelic variation of 4 loci. This ‘population snapshot’ shows the clusters of *S. meliloti* and *S. medicae*. A matrix of the ST followed by the allele labels for each was used in eBURST to generate a diagram of the evolutionary patterns among the strains. The snapshot was produced by setting the group definition to 0/3 alleles. The size of the circles is related to the numbers of isolates within each ST. The founder and cofounder genotypes are colored blue and yellow, respectively. Distances between STs indicated by connecting lines are arbitrary.



. **Influence of geographic distance.** No correlation was found in Mantel tests of all pairwise comparisons of genetic and geographic distance between strains for the two species (data not shown), even when considering IGS_{nod} of *S. medicae*. This pattern is consistent with a model in which

geographic distance do not contribute to the differentiation among populations. Migration rates were calculated between each pair of populations (table S2).

. Influence of soil parameters. Linear correlation was found between ACE* estimator (table S1) and soil pH ($r = 0.58$, $p = 0.01$) or unrefined sands ($r = -0.49$, $p = 0.04$). At the interspecific level, phosphoric acid ($p = 0.046$) and unrefined silt ($p = 0.032$) were factors which had the greater influence on the genetic structure. At the intraspecific level, magnesium oxide ($p = 0.045$) and calcium oxide ($p = 0.018$) were the most important factors, when considering either all the STs genotypes, only the STs genotypes present in more than one population or all the OTUs genotypes.

Table S2: Matrix of absolute migrant number for *S. medicae* and *S. meliloti* populations.. Values above and below the diagonal are M values for *S. medicae* and *S. meliloti* respectively ($M=Nm$, with N, effective size of the population and m, migration rate). Number indicated on the second line and on the second colon correspond to the number of isolates for *S. medicae* and *S. meliloti* respectively. Calculations were performed with Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005b), by considering only populations having at least three individuals. (inf = infinity).

		Albania	Algeria	Bulgaria	Corsica	Cyprus	France	Greece	Israel	Italy	Kazakhstan	Lebanon	Libya	Malta	Morocco	Mongolia	Portugal	Tunisia	Turkey	Turkmenistan
	n	13	12	1	9	0	0	17	19	0	0	18	5	0	17	0	2	0	0	3
Albania	5		inf		2.21			0.41	inf			inf	3.53		inf				0.99	0.60
Algeria	9	0.53			inf			0.18	1.66			2.21	0.25		8.85				0.08	0.07
Bulgaria	19	7.19	inf																	
Corsica	11	0.00	0.12	0.33				0.12	0.65			0.78	0.21		1.37				0.08	0.10
Cyprus	20	inf	2.93	inf	0.44															
France	20	8.58	0.45	0.71	1.56	0.92														
Greece	3	0.44	0.38	0.80	0.07	inf	5.98		0.60			0.36	0.29		0.46				0.11	0.33
Israel	1											inf	inf		inf				1.11	1.17
Italy	21	0.23	75.12	inf	0.05	2.72	0.23	0.30												
Kazakhstan	20	0.14	0.84	0.59	0.08	0.57	0.41	0.16		0.50										
Lebanon	2												inf		37.19				1.55	0.69
Libya	14	0.04	0.54	0.84	0.02	0.89	0.19	0.09	1.41	0.46				inf					2.45	0.92
Malta	20	inf	1.26	inf	0.45	inf	inf	1.84	0.57	0.26			0.17							
Morocco	2																		1.66	5.51
Mongolia	20	0.87	1.18	0.98	0.39	inf	2.22	inf	1.72	3.70			1.53	0.57						
Portugal	18	0.77	0.86	0.87	0.52	1.95	inf	0.59	0.391	0.81			0.27	1.73		1.24				
Tunisia	20	inf	3.05	28.11	0.48	inf	0.97	1.99	12.48	0.46			0.77	inf		1.59	0.92			
Turkey	23	1.52	inf	inf	0.19	inf	0.55	inf	inf	8.80			318.57	2.69		6.56	1.41	inf		0.35
Turkmenistan	17	0.30	0.76	inf	0.02	0.54	0.12	0.16	0.88	0.13			0.11	inf		0.40	0.21	4.67	inf	

DISCUSSION

This study analysed the phylogeography of two coexisting symbiotic bacteria in their natural origin areas. As our interest focused on symbiotic bacteria, i.e. those able to initiate and colonize plant nodules, *Medicago truncatula* plants were used as “bacterial trap” to select only those symbionts among free living bacteria community in the soil. We consider that our sampling does reflect the symbiotic bacterial natural biodiversity (figure S1). In fact, comparison of the two groups of rarefaction curves indicated that our sampling included genotypes present in all the major distinct clades, and that only genotypes differing by slightly genetic differences were missed.

. Comparison of the spatial distribution of *S. meliloti* by *meliloti* and *S. medicae*.

The data obtained showed a high variation of ratios of the two bacterial species among geographical populations and *S. meliloti* species was detected predominantly compared to *S. medicae* around the Mediterranean Basin. We analysed different factors that might influence the structuration of these two species.

The relationship between the presence of legumes and the prevalence of their symbiotic rhizobia in soils is now well established (Brockwell, 2001). Thus, soil rhizobial density will be affected by the presence of its host legume. By comparing the geographical repartition of several legumes usually associated either with *S. meliloti* and *S. medicae* or only efficiently with *S. medicae* with ILDIS Legumes Database, majority of both groups of legumes are quite widespread around the Mediterranean and were listed in countries used in our study. Thus, different plant - host repartition can not really be inferred to explain the variation of ratios between the two bacterial species, even if no clear information on specific sampling sites used are available. A fine and local variation of natural plant covering, as described for *M. truncatula* repartition (Lazrek *et al.*, 2008; Ronfort *et al.*, 2006), might influence the bacterial populations, but we had no access to such data. Consequently, we analysed other factors which may be responsible of the repartition of the two bacterial species.

Bacterial trapping might explain the disequilibrium between the two bacterial proportions, as *S. meliloti* was suggested more competitive for nodulation than *S. medicae* on *M. truncatula* Jemalong A17 (Rangin *et al.*, 2008). However, this might not explain the extreme ratio disproportions observed. Rhizobia populations are also affected by edaphic and climatic factors, acting directly on the bacteria or through the plant. Arguably, the major edaphic factor is soil pH, particularly for medic rhizobia (Brockwell *et al.*, 1991). Garau *et al.* (2005) suggested that *S. medicae* species could be more acidic tolerant than *S. meliloti*. Our study could not confirm this assumption on the geographical scale used, because none of the soil was truly acidic. However, our study suggested that absorbed phosphoric acid might influence the repartition of the two bacterial species. Positive correlation between total rhizobial population and phosphorus retention was previously demonstrated (Woomer *et al.*, 1988). For *S. meliloti*, the more phosphate is available, the more the bacteria grow (Rinaudi *et al.*, 2006). Furthermore, depending on the phosphate concentration encountered in the environment, the strain *S. meliloti* 2011 synthesizes two different exopolysaccharides (EPS) (Bahlawane *et al.*, 2008). As EPS are implicated in initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti* (Cheng, Walker, 1998), we may suggest that different EPS lead to different

efficiency of nodule invasion. Then, the two bacterial species might present different growing levels and nodulation efficiencies under the same concentration of phosphoric acid, but these mechanisms might be variable depending on the phosphate concentration in the environment. Bacterial community structure was also at least partly dependent on soil physical structure.

Last, historical factor could explain the predominance of *S. meliloti* on *S. medicae*. It has been previously suggested that *medicae* could have emerged from one of the differentiated *S. meliloti* biovars (Bailly *et al.*, 2007; Biondi *et al.*, 2003b). Thus, this more recent origin of *S. medicae* suggests that this species might not have had time to spread widely, explaining why *S. medicae* is not present in all the populations sampled and why *S. meliloti* was found predominantly. However, this remains partly speculative.

. Bacterial diversity structuration.

To analyse the bacterial evolution of each species, diversity analyses were performed on three loci, IGS_{nod}, IGS_{exo} and *edd*. For IGS_{exo}, the two species do not share any alleles, confirming a specialization of this symbiotic gene. In contrast, the majority of alleles detected for *edd* are shared by the two bacterial species, as previously described on housekeeping genes *gnd* (Van Berkum *et al.*, 2006) et *nuoE2* (Guo *et al.*, 2007). In our knowledge, all other previous studies have always shown a complete sexual isolation for genes analysed. These shared alleles could be due to recurrent lateral transfer, but could also, and may be more probably, reflect an ancestral polymorphism since the two species share the same common ancestor (Bailly *et al.*, 2007; Biondi *et al.*, 2003b). Six *S. meliloti* isolates (distributed in 3 populations) also harboured *S. medicae* alleles for IGS_{nod} marker. It is the first time that such nodulation gene transfer is observed between the two species. Horizontal gene transfer may have occurred between the two species, but is not yet explained.

Literature often describes *S. meliloti* as a more diverse species than *S. medicae*, both at genotypic and nucleotidic levels (Badri *et al.*, 2007; Bailly *et al.*, 2006; Zribi *et al.*, 2004), and usually explained by the more recent speciation of *S. medicae* (Bailly *et al.*, 2007; Biondi *et al.*, 2003b). Congruently with literature, nucleotidic diversity and genotypic diversity corrected for an equal sample size were found higher in *S. meliloti* bv. *meliloti* than in *S. medicae*, at least for symbiotic intergenic loci (table 2). Demographic histories were found different for plasmidic unit of both species, suggesting that megaplasmids of *S. medicae* could be in higher expansion than those of *S. meliloti* (table 2). We can suppose that the megaplasmid demographic expansion observed in this species might homogenize the

nucleotidic and genotypic diversity levels between the two species in a more or less near future. At least, results of linkage disequilibrium analyses suggest that the different replication units (chromosome and megaplasmids) evolve independently from each other in both species (table 4), as previously demonstrated with confidence in *S. meliloti* (Bailly *et al.*, 2006). This linkage equilibrium between replication units allow some diversity establishment in these bacteria, which reproduce clonally.

Surprisingly, genotypic diversity indexes calculated on STs types showed for the first time that *S. medicae* species presents more expected multiloci allelic diversity than *S. meliloti* by *meliloti* (table 3). These contrasting results between monolocus and multilocus analyses suggest that recombination rate among replication units is more important in *S. medicae* than in *S. meliloti* by *meliloti*, as inferred from the linkage disequilibrium measures (table 4).

. Structuration of populations for each bacterial species.

Whereas previous studies suggested no intraspecific spatial structuration at a world scale (Silva *et al.*, 2007; Van Berkum *et al.*, 2006), our study demonstrated significant differentiation among populations for both species at the Mediterranean Basin scale (table 5). Furthermore, our study showed that genetic differentiation between populations also occurs at a small geographical scale in Europe, because populations issued from nearby locations are still genetically differentiated (pairwise differentiation tests not shown). Thus, structuration of *Sinorhizobium* populations seems different depending on the continent, as differentiation between populations was not previously observed at a small geographical scale in the South-American continent (Silva *et al.*, 2007).

Levels of intraspecific genetic diversity vary depending on the population for both species (data not shown). As an example for *S. medicae*, a high diversity was detected in Lebanon, contrasting with absent or extinct populations in Malta. Furthermore, populations are genetically differentiated and migration processes were detected among them (table S2). Such diversity variations among spatially fragmented *Sinorhizobium* populations related by migration process reflected a metapopulation system of *Sinorhizobium* sp. strains around the Mediterranean Basin.

Our linkage disequilibrium analysis on the three replication units support results obtained on the chromosome by Maynard-Smith *et al.* (1993). *S. medicae* appears to be structured as a panmictic metapopulation, where recombination between individuals is not restricted (table 4). At the contrary,

S. meliloti appears to be structured as an epidemic metapopulation, where overrepresentation of several genotypes is observed (table 3), mainly in several populations (table S1). However, recombination still occurs in this species (not like in a strictly clonal metapopulation).

Highest structuration between populations was detected for *S. meliloti* than for *S. medicae* (table 4), which is in accordance with their respective epidemic and panmictic metapopulation structures. The small diversity observed in several populations, as for *S. meliloti* populations in Turkmenistan or France, might result either from a recent foundation event, suggested by high migration rates among several populations, or from strong genetic drift, probable in harsh environmental conditions. Since different genotypes are overrepresented in different population, we can hypothesise that these genotypes are each better adapted to specific environmental conditions found in the site they were sampled from, suggesting local adaptation. Otherwise these genotypes could result from genetic drift, leading to their high frequency, independently of their adaptation capacity.

. Influence of historical factors and selective pressures on the metapopulation structures.

Within both species, some clones composed till 50% of the isolates in several populations, indicating that these genotypes might comport as epidemic clones (Maynard Smith *et al.*, 1993; McInnes *et al.*, 2004). In that case, probable good adaptation and high competitiveness of these clones could explain this epidemic pattern. Furthermore, snapshot populations (figure 3) indicated that the founder of *S. medicae* was only detected in one geographical site which is not the case for *S. meliloti* one. This difference of founder repartition between the two species can be explained by the more recent speciation of *S. medicae* (Bailly *et al.*, 2007; Biondi *et al.*, 2003b). However, widespread distribution of *S. meliloti* founder and co-founder STs as well as *S. medicae* cofounder STs suggest that strains migrate between populations, adapt to different environments by mutation and thus create new STs types. That dynamic spatial pattern could explain the high STs diversity detected. This study suggests then that migration, gene flow and recombination are important events for the structuration of *Sinorhizobium* populations, as previously reported in other rhizobia (Silva *et al.*, 2005; Vinuesa *et al.*, 2005).

Rhizobia dispersion might involve either human processes by inoculations of seeds or rhizobia transportation on introduced seeds (Perez-Ramirez *et al.*, 1998) or natural processes by wind or water (Kellogg, Griffin, 2006; Silva *et al.*, 2005; Vinuesa *et al.*, 2005; Wang, Chen, 2004). At a small geographical scale, biogeographic dispersion of bacteria is also facilitated by active mechanisms, such

as flagella presence, which was described in *S. meliloti* (Eggenhofer *et al.*, 2006) and detected in *S. medicae* genome. Ubiquitous passive movement, such as resistant endospore formation or formation of protective biofilms (Hall-Stoodley, Stoodley, 2005) might also favoured bacterial motility on a large geographical scale.

However, as 81% of the haplotypes were not detected in more than one population, the majority of haplotypes is confined to specific regions at this geographical scale. Those clones might have appeared recently, might present small rates of migration or might be weakly competitive against other clones. Recent apparition by recombination for instance might be suitable, as microbial species that recombine frequently have a greater rate of adaptation over clonal populations in a harsh environment where selection is strong (Goddard *et al.*, 2005). Another possible explanation is that regional differences reflect the biogeography of the bacteria, implying that there would be conjointly a certain historical contingency and particular environmental conditions impacting bacterial distribution patterns.

. Phylogeographical pattern.

The two bacterial species do not present the same geographical repartition model. In fact, we showed that the nodulation alleles (IGS_{nod}) of *S. medicae* are structured depending on a phylogeographical pattern but not those of *S. meliloti* (table 5). This phylogeographical pattern means that the symbiotic alleles which are close genetically tend to be present in the same or nearby population. This phylogeographical pattern was not observed for the two other markers, what is not contradicting with the linkage equilibrium observed between replication units. It is accepted that the selective pressure exerted on nodulation alleles is different than that exerted on other loci. But, even by considering this evidence, none hypothesis explains nowadays this difference between markers.

Another remaining question is why *S. medicae* do present a phylogeographical pattern (when analysing nodulation intergene), but not *S. meliloti*? On one hand, we demonstrated that *S. medicae* and *S. meliloti* are structured in a panmictic and epidemic metapopulation respectively. On the other hand, *S. medicae* is a more recent species than *S. meliloti* (Bailly *et al.*, 2007; Biondi *et al.*, 2003b), and a higher demographic expansion was found on IGS_{nod} for *S. medicae* than for *S. meliloti* (table 2). Taken together, those results suggest that structuration of *S. medicae* is currently taken place, whereas *S. meliloti* is yet structured. This hypothesis might, at least partially, explained differences of phylogeography observed between the two species.

. Influence of environment on the structuration among populations.

In the goal to explain the genetic differentiation between populations, we tested the influence of spatial distance between sites. No correlation between geographical and genetic distances was found within each bacterial species. Spatial distance does not explain bacterial repartition.

The phylogeographical pattern detected on IGS_{nod} of *S. medicae* species supports the hypothesis that *S. medicae* alleles, which are closed genetically, are often found in the same population. Furthermore, *S. medicae* is organized in a panmictic model, with relatively high migration rate between populations. However, because no geographical distance influence was detected, migration should not be favoured between closer populations, compared to well separate populations.

As the genetic differentiation between populations could not be explained by the geographical distance, we tested the impact of soil parameters. Magnesium oxide is the main chemical soil parameter influencing bacterial structuration at the intraspecific level. Amount of magnesium increased the bacterial growth and the biofilm formation of *S. meliloti* (Rinaudi *et al.*, 2006). Furthermore, the distribution of sulphate-reducing prokaryotes (SRP) in river floodplain has been found correlated to this factor (Miletto *et al.*, 2008), suggesting that particular SRPs presented a better growth in sites presenting specific concentrations.

Calcium oxide was also found to influence the bacterial structuration of the different STs types. *S. meliloti* bacterial growth decreases at extreme calcium concentrations (Rinaudi *et al.*, 2006). Calcium is implicated in diverse cellular processes and could also activate the bacteria for adhesion to facilitate the recognition of the plant-host (Caetano-Anolles *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 2007). Different levels of calcium concentration in the soil may activate different bacterial STs types, leading to different populations trapped by the plant-host.

Moreover, the expected level of diversity appeared to be higher in more basic soil, as previously demonstrated by Fierer and Jackson (2006) on soil bacterial communities. However, “extreme” pH (pH = 6 and pH = 8) negatively affect bacterial growth and biofilm formation in *S. meliloti* Sm1021 compared to a neutral condition (pH = 7) (Rinaudi *et al.*, 2006). As pH effects may differ from one bacterial species to another to establish a biofilm (Rinaudi *et al.*, 2006), it is possible that pH effects are different on *S. medicae*, at least in acid conditions where this species was indeed found well adapted (del Papa *et al.*, 1999). From these results, we can suppose that growth of different bacterial

haplotypes within the same species is also variable on different pH conditions, allowing the higher *Sinorhizobium* sp. diversity when pH increases.

At least, the less a soil contained unrefined sands, the higher is *Sinorhizobium* diversity in this soil. However, it is known that sand facilitate the adhesion of bacteria in the rhizosphere and that frequency of adhesion depends on the bacterial genotypes within *S. meliloti* species (Fujishige *et al.*, 2006).

Thus, bacterial diversity and bacterial population composition differed by ecosystem type, but more analyses should be performed on sites differentiated for specific chemical or physical parameters to assess clearly the role of each factor. Therefore, the patterns observed in our study may reflect regional differences in environmental conditions, either not measured in our study or confounded in plant-host presence differences. However, our results observed for the first time in *Sinorhizobium* sp. species are in agreement with previous studies on other non-symbiotic bacterial species, who found that the bacterial structuration was driven primarily by environmental heterogeneity, rather than by geographic distance itself (Fierer, Jackson, 2006; Fuhrman *et al.*, 2008; Herfort *et al.*, 2007; Horz *et al.*, 2004; Lozupone, Knight, 2007; Van der Gucht *et al.*, 2007; Yeager *et al.*, 2004; Yergeau, Kowalchuk, 2008).

4- Perspectives

a- Souches recombinantes atypiques

L'échantillonnage obtenu ici a mis en évidence l'existence de souches de *S. meliloti* bv. *meliloti* (vérifiées par l'analyse de leur ARNr 16S) présentant des allèles IGS_{nod} très proches (ou identiques) génétiquement de celles retrouvés chez *S. medicae*, alors que leurs allèles IGS_{exo} correspondent aux allèles classiquement retrouvés chez *S. meliloti* bv. *meliloti*. A notre connaissance, ces 6 souches sont les premières détectées présentant de tels profils de recombinaison inter-spécifique. D'autres analyses de la diversité allélique sur le mégaplasmide pSymA pourraient permettre de savoir quel fragment de ce plasmide (sûrement partiel) a été assimilé par la souche receveuse. On pourrait par exemple s'attendre à observer des séquences d'insertions sur les parties flanquantes du fragment inséré, puisque l'existence de recombinaison homologue avec le fragment correspondant de *S. meliloti* permettrait d'expliquer la non-amplication d'un fragment IGS_{nod} de *S. meliloti*. Aucune explication ne permet actuellement d'expliquer de telles recombinaisons. En effet, aucune recombinaison n'a été décrite entre *S. medicae* et *S. meliloti* bv *meliloti* ou bv *medicaginis*. L'existence de ces souches recombinantes *S. meliloti* bv. *meliloti* / *S. medicae* remet en cause l'isolement sexuel décrit jusqu'à maintenant entre les deux espèces.

Ces souches ont été obtenues à partir de plusieurs sites (Turquie, Libye et Italie). De manière surprenante, nous n'avons pas mis en évidence de souches de *S. medicae* sur deux de ces sites (Turquie et Italie). Soit cela est dû à un effet d'échantillonnage (20 nodosités typées), soit cette espèce bactérienne est désormais absente de ces sites, supposant une extinction populationnelle de *S. medicae*. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer une telle extinction, comme la moins bonne valeur sélective de cette espèce vis-à-vis de *S. meliloti* ou l'occurrence de changements environnementaux auxquelles cette espèce n'aurait pas pu s'adapter.

b- Description et répartition spatiale de *S. meliloti* bv *rigiduloides*

A ce jour, les souches s'associant efficacement avec *M. rigiduloides*, *M. noeana* et *M. radiata* n'ont pas été décrites. Dans un souci de clarté, nous appellerons ces souches *S. meliloti* bv. *rigiduloides*. Cependant, plusieurs travaux non publiés ont été réalisés. Par des hybridations ADN / ADN, Brunel *et al.* (communication personnelle) ont montré que ces souches appartiennent à l'espèce

S. meliloti et non à l'espèce *S. medicae*. L'analyse du gène codant pour le 16S rRNA a indiqué un seuil d'homologie inférieur à 97 % avec les deux écotypes bactériens s'associant au genre *Medicago*. *S. meliloti* bv. *rigiduloides* et *S. meliloti* bv. *meliloti* présentent aussi un partage allélique sur des intergènes tels que IGS_{rkp}, IGS_{gab} ou IGS_{exo}, qui n'est pas obtenu sur les gènes de nodulation, dont l'IGS_{nod} (Bailly *et al.*, 2007).

Chez les bactéries symbiotiques, le biovar est défini comme une division taxonomique infraspécifique présentant des propriétés symbiotiques distinctes des autres biovars de la même espèce. La spécificité d'hôte a été observée entre les écotypes *S. meliloti* bv. *meliloti* (Nod+, Fix+ sur *M. truncatula*) et *S. meliloti* bv. *rigiduloides* (Nod+, Fix+ sur *M. rigiduloides*). Par tests d'inoculations croisées, *S. meliloti* bv. *rigiduloides* forme des nodosités non fixatrices sur *M. truncatula* (Nod+, Fix-), alors que *S. meliloti* bv. *meliloti* ne forme pas de nodosités sur *M. rigiduloides* (Nod-, Fix-) (Béna *et al.*, 2005).

Plusieurs autres tests phénotypiques sont nécessaires pour décrire cet écotype bactérien associé à *M. rigiduloides*. Parmi ceux-ci, les tests de nodulation et de fixation devraient être complétés sur des espèces végétales, spécifiquement associées à *S. meliloti* bv. *medicaginis* (i.e. *M. laciniata*) ou associées à *S. meliloti* bv. *mediterraneum* (i.e. *Phaseolus vulgaris*). Il faudrait aussi évaluer les caractéristiques de croissance de ce biovar sur différents pH, températures ou concentrations en chlorure de sodium. Enfin, la sensibilité à différents antibiotiques, ainsi que des tests biochimiques (galerie API 50 CH) permettrait de définir sans ambiguïté *S. meliloti* bv. *rigiduloides*.

Le piégeage à l'aide de *M. rigiduloides* a permis d'isoler plusieurs souches appartenant potentiellement au biovar *rigiduloides*, en particulier au niveau des sols de Turquie, de Bulgarie et du Liban. De plus, le piégeage à l'aide de *M. truncatula* a permis d'isoler plusieurs souches présentant un profil allélique sur l'IGS_{nod} similaire aux souches appartenant au biovar *rigiduloides* et donc différent du biovar *meliloti*. Ces souches ont été piégées au niveau des sols de Turquie, d'Italie et de Lybie. Enfin, un travail antérieur réalisé par Jean-Claude Cleyet-Marel et Gustave Gintzburger leur a permis de détecter des souches efficaces sur *M. rigiduloides* suite à des expériences de sur-semis sur sol, situé à Saint-Bauzille de Putois, en France. Sur la base de ces données sur le pourtour du bassin méditerranéen, les souches *S. meliloti* bv. *rigiduloides* seraient donc au moins localisées en Turquie, au Liban, en Bulgarie, en Libye, en Italie et en France.

Du point de vue écologique, alors que les bactéries symbiotiques ont la capacité de se maintenir sous forme libre au niveau du sol, la présence des plantes-hôtes dans les zones géographiques où ce biovar a été détecté expliquerait bien la répartition de ces souches bactériennes. La présence de *M. rigiduloides*, de *M. noeana* et *M. radiata* dans la zone du croissant fertile, permet tout d'abord d'expliquer la détection des souches en Turquie. Selon la base de données ILDIS, l'espèce *M. radiata* a été recensée au Liban et a aussi été introduite en Italie et en France. Ainsi, la détection de souches efficaces associées à *M. rigiduloides* dans différents sites sur le pourtour du bassin méditerranéen laisse supposer que ce biovar de *S. meliloti* serait localisé spatialement dans l'aire de répartition de ses plantes-hôtes, ne remettant pas en cause l'hypothèse de coévolution entre les différentes espèces de *Medicago* et ses symbiotes associés.

c- Spécificité d'hôte particulière

Dans l'étude phylogéographique de *Sinorhizobium* sp. sur le pourtour du bassin méditerranéen, plusieurs isolats de *S. meliloti* piégés avec *M. truncatula* sur les sols de Turquie et d'Italie ont présentés une double séquence sur l'IGS_{nod}. Cet intergène est situé dans le cluster des gènes de nodulation qui codent pour la spécificité d'hôte (décoration du facteur Nod). Par contre, ces isolats de *S. meliloti* n'ont présenté aucune duplication ou anomalie de séquences sur les deux autres marqueurs génomiques étudiés. Au moyen de clonages et séquençages de l'IGS_{nod} de ces souches, il est apparu que ces souches possèdent les IGS_{nod} de *S. meliloti* bv. *meliloti* et de *S. meliloti* bv. *rigiduloides*. Nous avons vérifié que ces souches correspondent bien à un seul isolat par séquençage de l'IGS_{nod} de mutants spontanés (créés sur 30 à 100 µg/ml de rifampycine).

Ces observations permettent d'émettre l'hypothèse d'une double acquisition (partielle ou totale) du cluster des gènes de nodulation chez ces souches. Concernant le cluster de nodulation, seules les séquences des gènes *nodABC* (DQ406581) et de l'intergène *NodEG* (DQ406571) sont actuellement disponibles sur NCBI pour *S. meliloti* bv. *rigiduloides*. Le séquençage (et clonage éventuel) des souches sur les gènes communs de la nodulation (*nodA*, *nodB* et *nodC*) permettrait de mieux connaître la taille du fragment « dupliqué ». A terme, le séquençage complet du cluster de nodulation chez *S. meliloti* bv. *meliloti* et chez *S. meliloti* bv. *rigiduloides* serait nécessaire afin de savoir si ces souches possèdent l'ensemble des gènes de nodulation des deux clusters.

Deux hypothèses pourraient expliquer une telle architecture. Premièrement, le cluster de nodulation de *S. meliloti* bv. *rigiduloides* aurait été transféré à *S. meliloti* bv. *meliloti*. Deuxièmement,

il est possible que la souche ancestrale de *S. meliloti* bv. *meliloti* et *S. meliloti* bv. *rigiduloides* ait possédé plusieurs clusters de nodulation afin de réaliser une symbiose efficace avec les différentes espèces végétales, puis que les souches se soient ensuite spécialisées par perte de fragments symbiotiques. Ces souches particulières auraient pu ne pas perdre un des deux clusters de nodulation et conserver les deux clusters de gènes fonctionnels. Alors que la première hypothèse semble la plus probable (en tout cas la plus simple), la fonctionnalité des deux clusters de nodulation éventuels devrait être vérifiée dans tous les cas. Tout d'abord, l'analyse phénotypique de la nodulation et de la fixation des souches possédant l'éventuelle duplication sur les deux espèces végétales *M. truncatula* et *M. rigiduloides* sera entreprise. Si ces souches ont la capacité de former des nodosités fixant l'azote sur les deux plantes-hôtes (Nod+, Fix-), la création de simples mutants serait nécessaire pour démontrer la fonctionnalité des deux clusters de nodulation.

Finale­ment, si la fonctionnalité des deux clusters (potentiels) se vérifiait, la comparaison de la taille gé­nomique des souches associées à *M. truncatula* et à *M. rigiduloides* à celle des souches associées exclusi­vement à *M. truncatula* ou à *M. rigiduloides* permettrait de savoir si la diversification du nombre de plante-hôte entraîne l'expansion gé­nomique chez *S. meliloti*, comme précédemment observé chez *Frankia* (Normand *et al.*, 2007).

d- Analyse des paramètres environnementaux

Comme il a déjà été démontré dans d'autres études analysant la structuration de communautés bactériennes du sol, les paramètres physico-chimiques du sol ainsi que d'autres facteurs environnementaux (pluviométrie, altitude, latitude,...) pourraient s'avérer très importants. Dans notre étude, l'acide phosphorique semblerait être le facteur chimique expliquant le plus de variabilité entre les deux espèces bactériennes, suivi de près par le pH des sols. Par contre, au niveau intraspécifique, l'oxyde de magnésium, l'oxyde de calcium et la granulométrie des sols semblent expliquer la structuration de la diversité bactérienne. Pour approfondir ces analyses, il serait intéressant d'étudier la structuration des communautés de *Sinorhizobium* sur des sols présentant des gradients de teneurs pour ces différents facteurs.

Le but de cette étude était de détecter une éventuelle structuration bactérienne sur une échelle spatiale relativement large et de savoir, si structuration il y a, si la distance géographique était impliquée. Puisque l'influence de la distance géographique n'est pas probante dans cette étude, un

nouvel échantillonnage pourrait être réalisé à d'autres échelles spatiales, plus ou moins grandes, afin d'approfondir les différentes études qui ont déjà été effectuées.

De plus, l'analyse détaillée du couvert végétal sur les sites utilisés serait très utile pour déterminer l'influence respective des paramètres physico-chimiques et des espèces végétales présentes.

CHAPITRE V:

ADAPTATION LOCALE A L'ECHELLE DU SUD DE LA FRANCE ET DU BASSIN MEDITERRANEEN

V- Adaptation locale à l'échelle du Sud de la France et du bassin méditerranéen

1- Introduction

Au sein du terme coévolution peuvent être, entre autres, distinguées des notions de cospéciation (émergence concomitante de deux espèces), de cocladogénèse (divergence phylogénétique concomitante de deux groupes) ou de coadaptation locale (divergence concomitante des partenaires dans des conditions environnementales spécifiques). Dans l'interaction légumineuse - rhizobium, le processus de coévolution a été régulièrement suggéré (Aguilar *et al.*, 2004; Heath, Tiffin, 2007; Provorov, 1998), la cocladogénèse et l'adaptation locale étant les deux processus les plus souvent avancés.

Dans la symbiose fixatrice d'azote, l'analyse de cocladogénèse entre deux partenaires symbiotiques est visible à l'aide des gènes de nodulation bactériens, qui sont directement impliqués dans la symbiose (Wernegreen, Riley, 1999).

Sur le couple *Rhizobium etli*- *Phaseolus vulgaris*, Aguilar *et al.* (2004) ont montré, sur la base de la diversité du gène *nodC*, que la distribution de différentes lignées de bactéries symbiotiques *Rhizobium etli* suivait celle des centres de diversité et de domestication de la plante hôte, indiquant une structuration conjointe des espèces hôtes et des bactéries associées. De plus, ils ont démontré une meilleure efficacité symbiotique pour les couples sympatriques que pour les couples allopatriques, soit de l'adaptation locale. Pour un autre couple, *Amphicarpaea bracteata* - *Bradyrhizobium*, la fixation d'azote a tout d'abord été démontrée supérieure lorsque les partenaires sont naturellement sympatriques par rapport à la situation où les symbiotes sont d'origine allopatrique (Wilkinson *et al.*, 1996a). De plus, les couples formés de symbiotes plus spécifiques (en terme de spectre d'hôte) apparaissent plus efficaces pour la fixation d'azote que les généralistes (Wilkinson, Parker, 1996). Ainsi la spécificité génotypique des bactéries pour leur hôte est un facteur important dans l'efficacité symbiotique de l'interaction. Ces exemples de coadaptation restent cependant spécifiques à quelques couples symbiotiques. On peut se demander si l'ensemble des couples bactéries fixatrices d'azote - légumineuses possèdent le même profil de coévolution et de coadaptation.

Dans cette étude, nous avons voulu approfondir la notion de coévolution dans la symbiose *Medicago truncatula* - *Sinorhizobium* sp. Pour cela, une analyse de l'adaptation locale a été effectuée

entre les deux partenaires symbiotiques. Le phénomène d'adaptation locale peut être visualisé (ou non) à différentes échelles spatiales. Afin de maximiser la probabilité d'observer de l'adaptation locale, nous avons fait le choix de nous placer aux échelles où de la différenciation génétique a été décelée entre les populations, d'une part pour le partenaire végétal (Lazrek *et al.*, 2008; Ronfort *et al.*, 2006) mais aussi pour le partenaire bactérien (Pavoine, Bailly, 2007). L'échelle « régionale », avec un échantillonnage situé sur le Sud de la France, ainsi que l'échelle plus « globale », constituée de prélèvements sur le bassin méditerranéen ont donc été les deux échelles spatiales retenues.

Du point de vue chronologique, cette étude a été réalisée au cours de mon Master 2. La rédaction du manuscrit 4 est donc grandement inspirée de mon mémoire de Master.

2- Manuscrit 4 (en préparation)

ADAPTATION LOCALE CHEZ LE COUPLE

MEDICAGO TRUNCATULA – SINORHIZOBIUM SP.

INTRODUCTION

L'adaptation locale décrit l'association étroite qui existe lors de la comparaison de différentes unités géographiques dans un couple symbiotique ; on parle d'adaptation locale lorsque les symbiotes ont une meilleure valeur sélective s'ils sont associés à des partenaires locaux plutôt qu'à des populations de partenaires distants. L'existence d'une adaptation locale a souvent été évaluée en comparant les structures génétiques spatiales des deux partenaires, d'un point de vue de la diversité génétique ou du point de vue d'efficacités fonctionnelles (symbiotique ou pathogénique) différentes entre des couples naturels de populations sympatriques et des couples allopatriques expérimentaux.

Le terme partenaire comprend alors soit une entité biotique, comme par exemple dans le système hôte-parasite *Rissa tridactyla- Ixodes uriae* (McCoy *et al.*, 2002) ou encore une communauté édaphique dans son ensemble (Belotte *et al.*, 2003), soit un environnement abiotique comme le climat ou le type de sol comme par exemple la concentration d'un ion métallique lourd (Berglund *et al.*, 2004). D'autres recherches se sont intéressées à l'étude de la coévolution vis-à-vis d'un environnement considéré dans son ensemble comme par exemple l'analyse d'adaptation locale à l'échelle européenne de 3 espèces de plantes invasives, *Trifolium pratense* L., *Dactylis glomerata* L. et *Plantago lanceolata* L., réalisée à l'aide d'expériences de transplantations-replantations (Joshi *et al.*, 2001).

Cependant, ces études ont souvent pris une définition très restreinte de l'adaptation locale comme meilleure valeur sélective d'un individu dans son environnement par rapport à un environnement différent. Cette définition et mise en évidence d'adaptation locale apparaît effectivement restrictive. Kawecki et Ebert. (2004) soutiennent ainsi que le processus d'adaptation locale doit être mis en évidence et analysé selon deux critères : 'local' vs 'foreign' et 'home' vs 'away' comme représenté sur la figure V.2.1. Dans chaque habitat (représenté par exemple par chaque lot de symbiotes), la population locale d'hôtes doit montrer une efficacité symbiotique plus importante que les populations allopatriques ('local' vs 'foreign') et chaque population doit avoir une meilleure efficacité symbiotique dans son propre habitat ('at home') que dans d'autres habitats ('away'). Si ces deux conditions sont respectées, on peut alors parler d'adaptation locale. Par contre, un profil différent (comme celui où seulement une seule des conditions est respectée) peut indiquer l'existence d'un environnement plus propice aux développements des deux types d'organismes, ou une contre-sélection du génotype local.

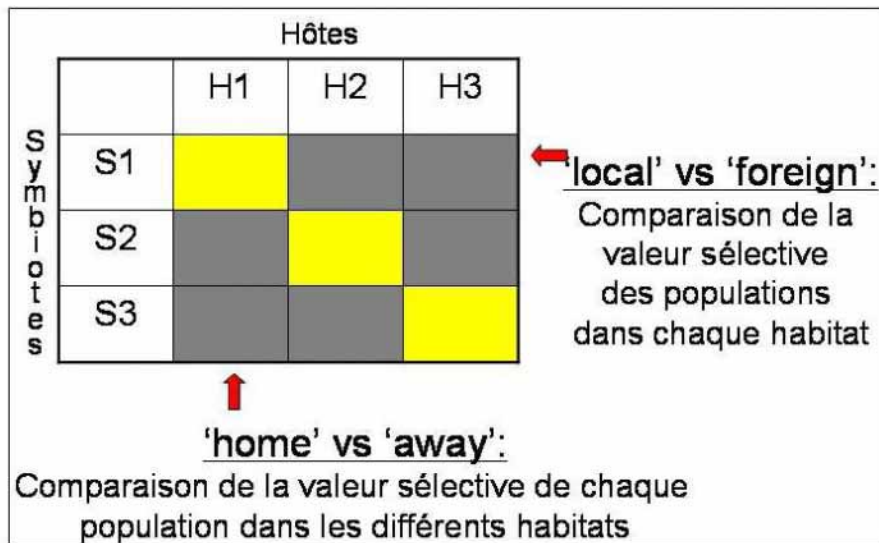


Figure V.2.1 : Présentation des hypothèses sous-jacentes au concept d'adaptation locale ('home' versus 'away' et 'local' versus 'foreign').

Adapté de Kawecki et al. (2004).

Il est évident que le processus de coévolution peut laisser les populations locales modérément maladaptées. La maladaptation est alors entendue dans le sens de l'existence de déviations par rapport aux pics adaptatifs locaux se déroulant dans les points chauds de coévolution (Crespi, 2000; Thompson *et al.*, 2002). Des études d'interactions symbiotiques ont parfois montré une maladaptation, par exemple par le biais d'une virulence parasitaire moindre chez des hôtes sympatriques que chez des hôtes allopatriques (Kaltz *et al.*, 1999).

L'association *M. truncatula* - *S. meliloti* a été à la base de nombreux travaux de génomique visant à élucider les mécanismes de régulation végétale et bactérienne de la symbiose fixatrice d'azote. En effet, *M. truncatula* représente actuellement une légumineuse modèle pour l'étude des bases génétiques des interactions plante-rhizobium et pour la génomique des légumineuses. Cependant, aucune étude écologique portant sur une éventuelle coévolution entre les deux partenaires n'a été réellement effectuée.

Les plantes à large répartition sont souvent caractérisées par une plasticité phénotypique importante ainsi que par une large variabilité génétique (Bradshaw, 1984). Comme attendu chez une espèce autogame, les populations de *M. truncatula* sont fortement différenciées parfois même à une petite échelle géographique (sous-population), comme l'a montré l'utilisation de marqueurs moléculaires (Lazrek *et al.*, 2008; Ronfort *et al.*, 2006; Siol *et al.*, 2008) ou l'étude de caractères phénotypiques (date de floraison, croissance,...(Bonnin *et al.*, 1996)). Les populations bactériennes de

S. meliloti et de *S. medicae* semblent aussi présenter des niveaux de diversité génétique relativement importants, et il a été montré une différenciation significative entre plusieurs populations naturelles à une petite échelle géographique (Pavoine, Bailly, 2007) ou sur le pourtour du bassin méditerranéen (travaux de phylogéographie, chapitre IV-3). Ces résultats laissent supposer qu'une costructuration spatiale et génétique entre ces deux organismes pourrait exister, ce qui laisserait ouverte la possibilité d'existence de phénomènes d'adaptation locale. Plusieurs études antérieures renforcent cette hypothèse par le fait qu'une différenciation génétique significative a été montrée entre plusieurs populations de *S. meliloti* et de *S. medicae* nodulant différentes variétés de *Medicago sativa* ou de *M. truncatula* (Paffetti *et al.*, 1996; Rangin *et al.*, 2008).

Nous avons donc voulu explorer les possibilités d'adaptations locales chez le couple *M. truncatula* - *Sinorhizobium* sp. à l'aide de deux approches.

Une première approche par inoculations croisées entre ces deux partenaires a été réalisée à une échelle régionale afin d'analyser les variations de spécificité et d'efficacité symbiotique hôte - rhizobium entre populations, et une seconde approche située à une échelle plus large a été basée sur la compétitivité entre souches pour étudier la spécificité de la nodulation. Ces deux expérimentations ont eu pour objectifs de répondre aux deux questions suivantes :

- D'une part, peut-on mettre en évidence une adaptation locale dans la symbiose *M. truncatula* - *S. meliloti* et *S. medicae*, non seulement à l'échelle régionale, mais aussi à l'échelle de l'aire de répartition méditerranéenne ?

- D'autre part, si adaptation locale il y a, se retrouve-t-elle au niveau de la compétitivité des souches au cours de la phase de nodulation et/ou lors de la fixation d'azote ?

MATERIEL ET METHODES

. **Collecte et sélection du matériel végétal et bactérien à l'échelle régionale.** Durant l'automne 2004, des gousses de *M. truncatula* ont été récoltées en bulk au sein de trois populations du Sud de la France (récoltées dans le Var, dans les Pyrénées-Orientales et dans l'Aude). Des prélèvements de sols effectués au niveau de ces mêmes parcelles ont servi à réaliser des piégeages bactériens (Bailly *et al.*, 2006). Par population, une vingtaine de nodosités ont été choisies aléatoirement parmi les plus grosses et les plus roses, et une bactérie a été isolée à partir de chaque nodosité. Les extractions d'ADN génomique bactérien ont été réalisées selon le même protocole que Chen et Kuo (1993) et des PCR spécifiques de *S. meliloti* et de *S. medicae* ciblant le locus *nod* (intergène de 580 pb entre *nodE* et

nodG) ainsi que le locus *exo* (intergène de 250 pb entre *exoP* et *thiD*) (Bailly *et al.*, 2006) ont permis de typer et de discriminer les souches.

Sur le site de Narbonne, seules des souches de *S. medicae* ont été mises en évidence, alors que les deux autres populations ont permis d'isoler des souches de *S. medicae* et de *S. meliloti*. Dans un souci de bonne représentation du cortège de l'espèce bactérienne de chaque population, un lot constitué de cinq souches de *S. medicae* choisies arbitrairement a été formé par sol, en mélangeant équitablement les cinq solutions bactériennes concentrées entre 1 et 5 10⁶ bactéries par ml.

. Collecte et sélection du matériel végétal et bactérien à l'échelle méditerranéenne. Afin d'étudier la compétitivité entre les souches de *S. meliloti* vis-à-vis de la capacité à noduler *M. truncatula*, nous nous sommes situés à l'échelle du bassin méditerranéen, en utilisant d'une part cinq lignées végétales (à raison de 5 réplicats par lignée) de France, de Tunisie et de Grèce et trois lignées de Turquie (8 réplicats par lignée). Les graines utilisées sont issues de la banque de graines de l'INRA de Mauguio (J.M. Proserpi). Les souches bactériennes d'origine française, tunisienne et turque proviennent de la collection du LSTM alors que celles de provenance grecque ont été obtenues à partir de piégeages bactériens réalisés sur du sol de ce pays. Des PCR spécifiques de *S. meliloti* ciblés sur les locus *gab* (intergène de 700 pb entre *gabD5* et *SMa1850*), *nod* (intergène de 580 pb entre *nodE* et *nodG*), *rkp* (intergène de 600 pb entre *rkpA* et *rkpU*) (Bailly *et al.*, 2006) ainsi que leur séquençage sur séquenceur MegaBACE (Amersham Biosciences) ont été réalisés. L'analyse du polymorphisme de ces séquences à l'aide des logiciels Genedoc (Nicholas *et al.*, 1997) et ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) a permis de sélectionner quatre souches nécessaires à cette étude, à raison d'une seule par pays; ces quatre *S. meliloti* ont été choisies de manière à posséder la plus grande diversité génétique possible entre elles (tableau V.2.1).

Tableau V.2.1: Polymorphisme de séquence des souches bactériennes d'origine turque, grecque, tunisienne et française pour les loci *gab*, *nod* et *rkp*.

Origine bactérienne	Locus							
	<i>gab</i>				<i>nod</i>		<i>rkp</i>	
Turquie	G	G	G	G	G	T	C	T
Grèce	G	A	G	G	G	T	A	C
Tunisie	A	A	A	G	G	C	A	C
France	A	A	A	A	A	T	C	T

. Conduite expérimentale d'inoculation, de croissance et de récolte de données. Dans les deux études, les germinations stérilisées ont été plantées dans des pots « magenta » de 0,5 l de volume contenant un mélange stérile de deux tiers de vermiculite et d'un tiers de perlite. Le même jour, 0,5 ml

d'inoculum bactérien correspondant à 10^6 bactéries a été apporté à la base de chaque plantule (Smith, Long, 1998; Vincent, 1970).

En ce qui concerne l'étude de spécificité, des inoculations croisées à l'aide des trois lots bactériens ont été réalisées. Chaque lot était composé de 5 souches isolées d'une des trois populations. Pour chaque population, 60 plantules (à raison de 3 plantules par pot) ont été inoculées par leur mélange sympatrique et des croisements allopatriques en même effectif ont aussi été effectués avec les deux autres lots bactériens (voir figure V.2.2). De plus, un pot par localité n'a été inoculé par aucun rhizobium. Les plantes ont été disposées de manière randomisée en chambre de culture et ont été arrosées avec du milieu Jensen (Vincent, 1970) pendant les trois premières semaines de leur croissance, puis avec de l'eau stérile. A 3 semaines de développement, une plantule de chaque pot a été supprimée et après 4 semaines de croissance, une autre plantule a été récoltée et sa partie aérienne a été séchée pendant 48 h à 60°C puis pesée.

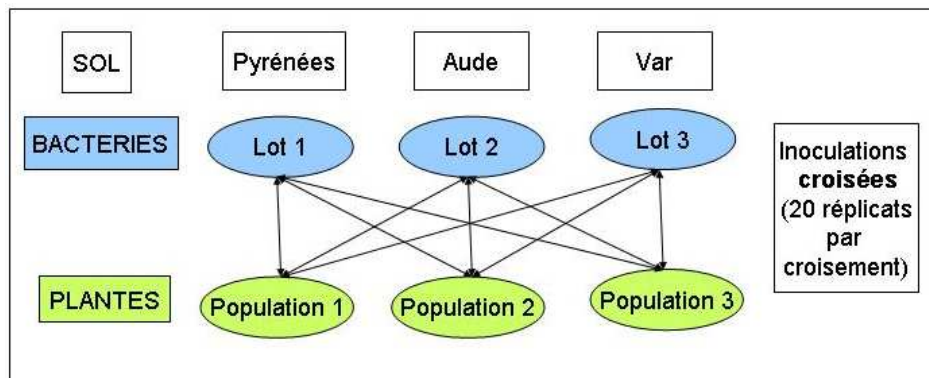


Figure V.2.2 : Plan des expériences d'inoculations croisées dans l'étude effectuée à l'échelle régionale (Sud de la France).

A la même date et pour chaque plante restante par pot, il a été mesuré le nombre de feuilles ainsi que la longueur et largeur de la foliole de la plus grande feuille. Ces mesures de croissance permettent l'estimation de la surface foliaire totale, grâce à la formule : « $3 * (\text{nombre de feuilles} * (3,14 * \text{longueur plus grande feuille} * \text{largeur plus grande feuille}) / 4) \) », créée pour une monofoliée, puis adaptée à une trifoliée (Hélène Frérot, communication personnelle). L'équation « $\text{biomasse végétative} = 0,018 * \text{surface foliaire totale} + 57$ » donne alors l'estimation de la biomasse végétative. Ces plantes ont ensuite été amenées à floraison puis fructification, et après récolte nous avons mesuré la masse de gousses produites par plante, le nombre de graines ainsi que la masse totale des graines par plante.$

Pour l'étude de compétitivité des rhizobia, un mélange équimolaire contenant les quatre souches bactériennes a été apporté à la base de chacune des trois plantules présentes par pot (figure V.2.3). Après 1 mois de croissance effectuée dans les mêmes conditions que dans l'étude décrite

précédemment, deux plantes par pot ont été supprimées et des mesures de croissance sur la troisième plante ont été effectuées. Puis, après 6 semaines, nous avons récolté les plantes, en prélevant d'une part les parties aériennes et racinaires et d'autre part une quinzaine de nodosités par plantes (les plus grosses et les plus roses si le nombre permettait de faire un choix). Ces nodosités ont été conservées dans du glycérol à 60 % à - 80°C avant d'être typées moléculairement.

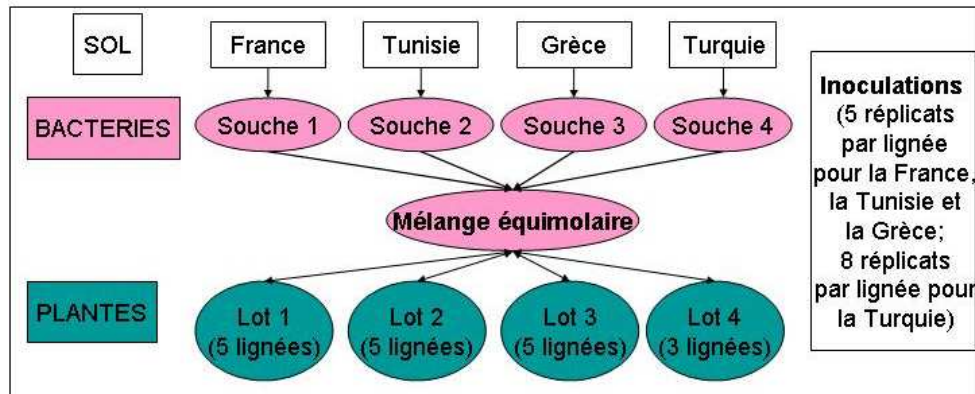


Figure V.2.3: Plan des expériences d'inoculations dans l'étude effectuée à l'échelle du bassin méditerranéen.

. **Typage bactérien des nodosités par CE-SSCP (capillary electrophoresis-single stranded conformation polymorphism).** La technique de polymorphisme de conformation d'ADN dénaturé (SSCP) a été utilisée pour distinguer les souches bactériennes dans l'étude de la compétitivité des souches. Des amorces nucléotidiques d'environ 20 pb (tableau V.2.2) ont été définies sur les trois loci à l'aide du logiciel Primer Premier 5.0 de manière à pouvoir amplifier des fragments d'environ 200 pb. Ces amorces ont été marquées en 5' avec les fluorochromes fam (locus *gab*), hex (locus *rkp*) (Eurogentec) et ned (locus *nod*) (Applied Biosystems) (Sunnucks *et al.*, 2000).

Tableau V.2.2 : Amorces nucléotidiques utilisées pour les différentes amplifications PCR (T_m indique la température de fusion).

Locus	Localisation	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce	Longueur du fragment (pb)	T _m
<i>nodE-nodG</i>	pSymA	nodF1-NED	5'NED- AAG TAA TGC TGG TTG TTC TTG C	209	56,5°C
		nodR1-NED	5'NED- TCT TCG TGT TCA TCG TGG C		56,7°C
<i>gabD5-SMa1850</i>	pSymA	gabF1-FAM	5'FAM- TGG TTT CTG CCG CTC GTG	158	58,2°C
		gabR2-FAM	5'FAM- GTC TCA GTT CCT TGT CCT TGC		60,5°C
<i>rkpA-rkpU</i>	chromosome	rkpF1-HEX	5'HEX- TGG TTT CTG CCG CTC GTG	188	56,0°C
		rkpR1-HEX	5'HEX- CGC AAG ACT GCT GCA CGC		60,5°C

Une PCR multiplexe avec ces trois couples d'amorces marquées (0,5 µl de chaque amorce à 20 pmol/µl) sur nodule stérilisé broyé dans 20 µl d'eau stérile (1 µl par réaction de 25 µl) a été mis au point selon le cycle d'amplification suivant : éclatement cellulaire (5 min à 98°C suivi de 7 cycles de 30 s à 98°C puis 10 s à 4°C) et PCR (5 min à 94°C, 38 cycles de dénaturation de 30 s à 94°C, renaturation pendant 30 s à 56°C puis élongation de 1 min à 72°C, se terminant par 7 min à 72°C). Ensuite, un volume de 6 µl de produits PCR précipité (selon le protocole du kit de séquençage DYEnamic ET Terminator Cycle, Amersham Biosciences) a été mélangé avec 10 µl de marqueur de taille dilué dans du Tris-HCl (marqueur MegaBACE ET400-R Size Standard, Amersham Biosciences). Ce mélange a ensuite été mis à migrer sur MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences) selon un protocole relativement similaire à celui décrit dans Bryja (2005) avec un ajustement des conditions: injection de 70s à 6V et migration de 70 min à 9 V. Ainsi un typage bactérien de six nodosités par plante a été réalisé sur les loci IGS_{nod} , IGS_{gab} et rkp , et la reproductibilité de la technique a été testée sur une quarantaine d'individus.

. **Analyse statistique de l'adaptation locale à l'échelle régionale.** Les effets plante, bactérie et interaction plante x bactérie ont été testés par analyse de variance quant à la différence des variables mesurées sur les plantes sous Statistica 6.0, en utilisant comme variables dépendantes alternativement la biomasse aérienne mesurée à 3 semaines de croissance, celle estimée à trois semaines, la masse des gousses en fin de cycle, le nombre de graines, la masse des graines et la masse moyenne de graines par plante. La variable nombre de graines a du être transformée logarithmiquement afin de respecter la normalité et l'homoscédasticité des variables.

. **Analyse statistique de l'adaptation locale à l'échelle du bassin méditerranéen.**

. Différentiation génotypique des populations.

La caractérisation bactérienne des nodosités a permis de déterminer la composition de colonisation de chaque type bactérien de chaque plante. Les nodosités caractérisées comme co-inoculation double ont été traités comme étant deux nodosités distinctes possédant chacune une seule bactérie (etc si co-inoculation triple...). Pour connaître la différenciation génotypique entre populations (soit tester si les compositions en bactéries des nodules varient pour chaque population), les génotypes multilocus ont servi à estimer le F_{ST} de Wright (Wright, Johnston, 1951) par l'estimateur θ de Weir et Cockerham (1984) sur l'ensemble des populations ou par paires de populations, ceci pour chaque locus séparément, ainsi que pour les deux loci simultanément. Afin de quantifier la significativité des valeurs obtenues, un test de différenciation a été réalisé grâce à un test exact de Fisher. Les p-values de

ces tests de différenciation génotypique ont été obtenues par la méthode de la chaîne de Markov (démémorisation de 10000, batches de 100 et 5000 itérations par batch) calculée à l'aide du logiciel Genepop, version 3.4 (Raymond, Rousset, 1995).

.Comparaison des compositions de colonisation entre combinaisons allopatriques et sympatriques.

. **Approche par régression logistique.** A partir des effectifs de colonisation des nodosités calculés et en éliminant les données manquantes, le pourcentage de colonisation de chaque type bactérien de chaque plante a été calculé pour chaque locus. Nous avons voulu connaître le (ou les) indicateur(s) qui permettent de prévoir la variation de proportion d'infection sympatrique/allopatrique, c'est-à-dire ceux présentant un effet significatif sur cette proportion. Ainsi, pour chaque locus séparément, une régression logistique a été effectuée sur l'ensemble des populations de plantes analysées (logiciel Statistica 6.0) en utilisant les entrées suivantes : l'origine de la plante ou l'origine de la bactérie ont été successivement considérées comme variable indépendante, la modalité binaire sympatrique/allopatrique ayant servi de variable dépendante et les proportions d'infection comme effectifs.

Nous avons ensuite cherché à analyser plus précisément les deux conditions d'analyse de l'adaptation locale ('home' vs 'away' et 'local' vs 'foreign'). Il a été testé d'une part pour chaque population de plantes si ce critère population permettait la prédiction des variations de proportions des types bactériens sympatriques versus allopatriques. Ceci a été estimé à l'aide d'une régression logistique ayant les mêmes entrées de variables dépendantes et d'effectifs que dans l'analyse globale (paragraphe précédent) mais avec un facteur binaire population étudiée versus populations allopatriques comme variable indépendante. La même approche a été réalisée pour chaque souche bactérienne.

. **Approche par tests de rang et tests t de comparaison.** Le rang pris par chaque type bactérien dans chaque plante a été déduit des proportions de colonisations. L'ordre des rangs a été défini tel que le rang le plus bas soit attribué à la proportion la plus élevée et une égalité de rang a été attribuée à des proportions égales. Afin de compléter l'analyse de différenciation génotypique, les rangs pris par chaque type bactérien dans une même population ont été comparés à l'aide d'une ANOVA de Kruskal-Wallis. Ici, les facteurs type bactérien et rang obtenu ont été respectivement considérés comme variable dépendante et indépendante. Si le test de rang non paramétrique a indiqué une

significativité du facteur dépendant, un test de comparaison post-hoc des rangs moyens (valeur R) de tous les couples de groupes a été effectué. Ce test permet de savoir si une population végétale possède significativement plus de souches sympatriques que chacune des souches allopatriques.

Dans l'idée de la double définition de l'adaptation locale, nous avons également testé si une souche préférerait coloniser sa population sympatrique par rapport à des populations allopatriques. Ensuite, des tests-t de comparaison pour échantillons indépendants ont été réalisés sur les fréquences de chaque type bactérien entre les différentes populations de plantes en groupant les populations en un ensemble sympatrique et un ensemble allopatrique.

. **Approche par ANOVA factorielle.** Enfin, une approche plus globale au niveau de la métapopulation a été effectuée en utilisant une analyse de type ANOVA factorielle logistique binomiale pour savoir si les facteurs population de plante, type bactérien et interaction plante*bactérie permettent d'expliquer une variation de proportions de combinaisons sympatrique/allopatrique au niveau global. Pour cela, nous avons considéré le facteur dichotomique sympatrique/allopatrique (réponse binomiale) comme variable dépendante, les facteurs type de population végétale et type bactérien comme prédicteurs catégoriels et le pourcentage d'infection (fonction logit) comme variable d'effectifs. Les tests de Shapiro-Wilk et de Levene ont permis de vérifier la normalité des résidus ainsi que l'homoscédasticité.

RESULTATS

. **Analyse de l'adaptation locale à l'échelle régionale.** Les analyses de variance ont été effectuées sur le poids secs des plantes à trois semaines et sur les différentes variables mesurées en fin de cycle (masse de gousses, masses des graines, poids des graines et poids moyens des graines) (voir figure V.2.4). Les ANOVA nous indiquent un effet population de plantes ($p < 0,05$) pour tous les paramètres testés sauf pour la variable nombre de graines. Par contre, ni l'effet type bactérien ni l'interaction plante*bactérie n'est significatif pour les variables de valeur sélective étudiées.

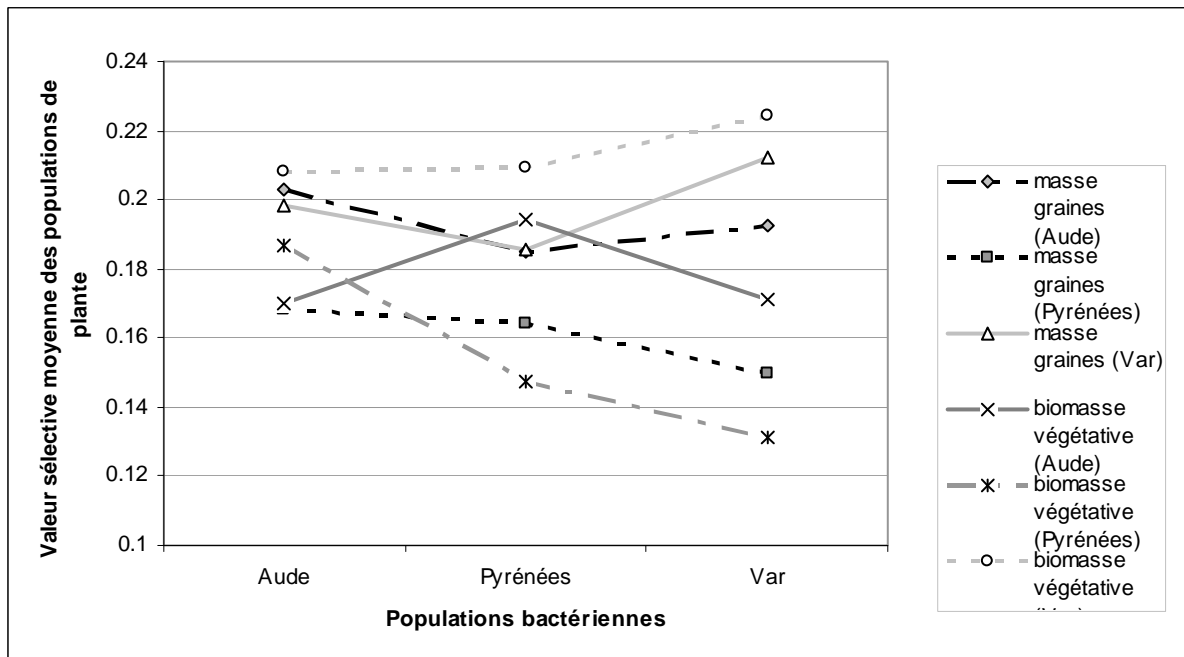


Figure V.2.4: Estimateurs de la valeur sélective moyenne des plantes issues des populations du Sud de la France après croissance en présence d'un inoculum bactérien sympatrique ou allopatrique. Les masses de graines (récoltées en fin de cycle végétal) sont en grammes et les biomasses végétales (mesurées à trois semaines de croissance) sont en décigrammes.

. **Analyse de l'adaptation locale à l'échelle du bassin méditerranéen.** Les tests de reproductibilité de la technique réalisés sur une quarantaine d'individus se sont révélés être peu pertinents pour le locus *rkp*, donc celui-ci n'a donc pas pu être utilisé pour cette étude. Seuls les deux loci *gab* et *nod* ont donc été analysés.

. Analyse de la différenciation génotypique des populations. En considérant l'ensemble des populations végétales, l'occurrence de la souche française en inoculation simple ou multiple (n=384 sur *nod* et 408 sur *gab*) est supérieure à celle des autres souches (86, 94 et 10 sur *nod* et 81, 99 et 5 sur *gab* pour les souches d'origine grecque, tunisienne et turque respectivement). Les pourcentages moyens de chaque type bactérien dans chacune des populations végétales pour les deux loci étudiés sont reportés dans le tableau V.2.3. La composition bactérienne moyenne des nodosités de plantes en fonction du génotype est représentée sur la figure V.2.5 (locus *nod* et locus *gab*). Dans les résultats suivants, seuls seront présentées les analyses faites sur le locus *nod*, puisque les résultats obtenus sur le locus *gab* sont très similaires.

Tableau V.2.3 : Pourcentage moyen de chaque type bactérien dans chacune des populations végétales pour les deux loci étudiés (F= France ; G= Grèce ; TN= Tunisie ; TQ=Turquie).

locus	population plante	souche F	souche G	souche TN	souche TQ
NOD	pop F	73,54	12,07	13,28	1,11
	pop G	78,00	11,00	10,44	0,67
	pop TN	59,00	19,00	20,00	2,13
	pop TQ	58,38	18,31	20,28	3,03
GAB	pop F	76,10	9,71	13,62	0,57
	pop G	75,98	9,90	13,54	0,57
	pop TN	61,43	17,97	19,37	1,24
	pop TQ	53,33	15,54	18,46	0,67

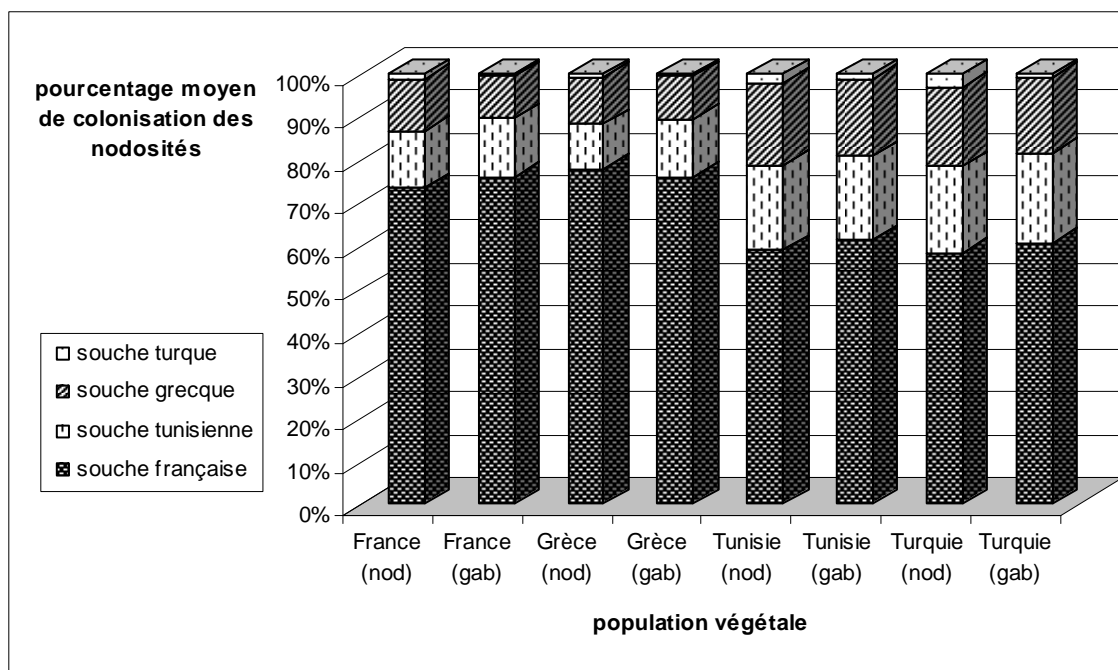


Figure V.2.5 : Représentation des fréquences moyennes de colonisation des nodosités de chaque type de population végétale par les différents types bactériens.

Les valeurs de F_{st} obtenues ($F_{st}=0,0224$ pour *nod* et $F_{st}=0,0157$ pour *gab*) supposent que les quatre populations utilisées sont très peu différenciées sur ces deux loci. Le test exact de Fisher global suggère cependant que les populations sont globalement différenciées à un seuil significatif ($p=0,0068$). Suite aux tests exacts par paires de populations (tableau V.2.4), les valeurs de p obtenues suggèrent que les populations de Grèce et de France d'une part ($p=0,4947$) et les populations de Turquie et de Tunisie d'autre part ($p=0,7837$) ne sont pas du tout différenciées. La population de Grèce apparaît significativement différente de celles de Tunisie ($p= 0,0015$) et de Turquie ($p=0,0029$) bien qu'une correction du seuil α de 5 % par Bonferroni donnerait un résultat à la limite de

significativité. La population de France peut être inversement considérée comme peu différenciée (seuil significatif marginal) des populations de Tunisie ($p=0,1190$) et de Turquie ($p=0,1282$).

Tableau V.2.4 : Différenciation génotypique des populations bactériennes associées aux différentes populations de plantes au niveau du locus *nod* et aux deux loci, évaluée d'une part par le F_{ST} de Weir et Cockerham (écrit en gras, au-dessus de la diagonale). D'autre part, les p-values des tests exacts de Fischer associés sont présentées en italique, en dessous de la diagonale.

pop (<i>nod</i>)	France	Tunisie	Grèce	Turquie
France		0,0192	0,0038	0,0136
Tunisie	<i>0,119</i>		0,0568	-0,006
Grèce	<i>0,4947</i>	<i>0,0015</i>		0,0497
Turquie	<i>0,1282</i>	<i>0,7837</i>	<i>0,0029</i>	

pop (2 loci)	France	Tunisie	Grèce	Turquie
France		0,0231	-0,0012	0,0183
Tunisie	<i>0,0257</i>		0,0429	-0,0062
Grèce	<i>0,836</i>	<i>0,0006</i>		0,0376
Turquie	<i>0,0544</i>	<i>0,9713</i>	<i>0,002</i>	

Le test de rang de Kruskal-Wallis sur toutes les populations regroupées (tableau V.2.5) nous permet de conclure que la souche française est significativement la souche la plus fréquente dans toutes les populations et qu'au contraire la souche turque est la souche la moins colonisatrice.

Tableau V.2.5 : Comparaison des fréquences des génotypes bactériens, caractérisées au niveau du locus *nod*, au sein de l'ensemble des plantes-hôtes par le biais de tests de rang. Les p-value des tests sont indiquées au dessus de la diagonale, les niveaux de significativité en dessous (NS : $p > 0.05$; *** : $p < 0.001$). (F=France, G= Grèce, TN= Tunisie et TQ= Turquie).

		Type bactérien (Valeur moyenne de rang, R)			
		F (R :77,79)	G (R :215,7)	TN (R :205,4)	TQ (R :279,0)
Type bactérien	F		<i>0,000000</i>	<i>0,000000</i>	<i>0,000000</i>
	G	<i>***</i>		<i>1,000000</i>	<i>0,000512</i>
	TN	<i>***</i>	<i>NS</i>		<i>0,000029</i>
	TQ	<i>***</i>	<i>***</i>	<i>***</i>	

Le test exact de Fisher global sur *nod* ($p=0,0068$) nous indique que la distribution de nos effectifs ne suit pas une distribution aléatoire entre les différentes combinaisons plante*bactérie. Cela implique que le facteur plante et/ou le facteur bactérie a une influence sur la colonisation bactérienne des nodosités.

Les résultats de la régression logistique sur *nod* nous indiquent que les paramètres de régression sont statistiquement significatifs. Ainsi, nous avons trouvé que le facteur type de population de plantes est un bon prédicteur de la proportion de combinaisons sympatriques et allopatriques ($\text{Chi}^2= 202,44$;

dl=1 et p=0,000). Par contre, le facteur type bactérien n'est pas significatif ($\text{Chi}^2= 0,17$; dl=1 et p=0,67).

. Avantage de colonisation des souches sympatriques ou allopatriques selon la population végétale.

Les régressions logistiques par population de plante sont toutes significatives (tableau V.2.6) sauf celle de la Tunisie (p=0,12) et les rangs pris par les différents types bactériens au sein de chaque population sont significativement différents (p=0). Les tests post-hoc indiquent que la souche française est celle qui infecte le plus de nodosités quelle que soit la population de plante-hôte (rang moyen significativement le plus faible par comparaison par paire). Les souches de Grèce et de Tunisie occupent significativement le même rang dans les quatre populations (p=1) et la souche de Turquie est la moins représentée en moyenne dans chacune des populations, avec un classement significativement différent de celui des souches grecque et tunisienne seulement dans sa propre population sympatrique turque.

Tableau V.2.6 : Comparaison des proportions des différents types bactériens au sein de chaque population de plantes hôtes (A) et comparaison des fréquences de chaque type bactérien au sein des différentes populations de plantes-hôtes (B). Dans chaque cas, les p-values des différentes régressions logistiques et des tests de rang non paramétriques de Kruskal-Wallis sont présentés. Pour le tableau A, les valeurs moyennes des rangs pris par chaque type bactérien sont indiquées et des rangs non significativement différents (tests post-hoc de comparaison de rang) possèdent le même niveau de gris. Au sein du tableau B, les résultats des tests t de comparaison de moyenne (allopatrique versus sympatrique) pour chaque souche sont également exposés. La significativité au seuil de 5 % est indiquée par une étoile.

A	Régression logistique			Kruskal-Wallis		Post-hoc de comparaison				
	population	Chi ²	dl	p	H (3, N=100)	p	Rang 1	Rang 2	Rang 3	Rang 4
France	193	1	0*	55,3992	0*	F (R :17,42)	G (R :59,50)	TN (R :53,42)	TQ (R :71,66)	
Tunisie	6,2	1	0,12	39,6056	0*	F (R :24,52)	G (R :52,10)	TN (R :52,38)	TQ (R :73,00)	
Grèce	29,3	1	0*	59,4729	0*	F (R :15,34)	TN (R :57,68)	G (R :57,78)	TQ (R :71,20)	
Turquie	67,92	1	0*	35,2136	0*	F (R :21,77)	TN (R :43,81)	G (R :47,84)	TQ (R :64,56)	

B	Régression logistique			Kruskal-Wallis		Test t de comparaison				
	souche	Chi ²	dl	p	H (2, N=97)	p	μ sympa	μ allop	t	dl
France	0,27	1	0,60	4,3561	0,11	73,54	65,46	1,30	95	0,20
Tunisie	0,89	1	0,34	2,6101	0,46	19,81	14,43	-1,16	95	0,25
Grèce	4,25	1	0,04*	2,679	0,26	11,20	16,24	1,14	95	0,26
Turquie	0,74	1	0,39	0,9637	0,81	3,03	1,30	-1,27	95	0,21

Les nodosités des plantes françaises ont donc davantage tendance à être colonisées par des souches sympatriques, à la différence des nodosités des plantes grecques et turques qui sont colonisées majoritairement par des souches allopatriques (de France). Par contre, aucune prédiction ne peut être avancée en ce qui concerne la colonisation au sein des plantes tunisiennes, même si le nombre de

nodosités infectées par la souche française dans notre échantillon (n=145 nodosités réparties sur 25 plantes) est supérieur aux nombres de nodosités colonisées par les trois autres types de souche.

. Colonisation non préférentielle des populations végétales sympatriques ou allopatriques selon le type bactérien. Les régressions logistiques effectuées sur chaque type bactérien en fonction de la variable dichotomique sympatrique/allopatrique ne donne aucun résultat significatif, sauf pour la Grèce (p=0,04). De plus, pour chaque bactérie, les rangs obtenus par la souche ne sont significativement pas différents entre populations (p=0,11; p=0,46; p=0,26 et p=0,81) et les pourcentages de colonisation de plantes sympatriques ou allopatriques ne peuvent pas être considérés comme différents, même pour la France, indiquant que les bactéries ne préfèrent pas coloniser leur population d'origine.

. Comparaison au niveau global des compositions de colonisation entre combinaisons allopatriques et sympatriques. L'effet d'interaction plante*bactérie testé par l'ANOVA factorielle n'est pas significatif, au niveau global (ensemble des populations végétales et ensemble de bactéries testés).

. Colonisation bactérienne 'simple' ou 'multiple'. Sur la caractérisation génotypique de 580 nodosités, quatre typages ont révélé des génotypes multiples identiques aux deux locus ; il s'agit alors de nodosités infectées par deux bactéries. Ce faible pourcentage (0,69 %) de colonisation bactérienne multiple peut cependant être augmenté par l'existence de plusieurs nodosités génotypées comme 'multiple' à un locus mais 'simple' sur l'autre (21 cas soit 3.62 %) ou encore par des nodosités caractérisées 'multiple' sur un locus mais non déterminées sur l'autre (3 cas soit 0,52 %). Enfin, il existe deux cas de caractérisation triple sur un locus (0,35 %).

. Analyse de la recombinaison. Un intérêt particulier a été porté aux individus discordants génotypiquement entre les deux loci afin d'étudier l'existence d'une éventuelle recombinaison. Quatre nodosités (0,70 %) ont été typées comme ayant un génotype différent aux deux loci, c'est-à-dire présentant sur chaque loci un profil ayant une origine différente. On a trouvé les deux possibilités de recombinaison suivantes : souche turque/souche grecque (2 cas) et souche tunisienne/souche française (2 cas).

DISCUSSION

. **Analyse de l'adaptation locale.** L'hypothèse de base de cette étude était l'existence d'une interaction génotype-environnement pour la valeur sélective chez le couple symbiotique *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium* sp.; cette interaction est en effet une condition prérequis évidente pour l'existence d'adaptation locale (Kawecki, Ebert, 2004). Parmi les différentes formes possibles d'interaction, la pléiotropie antagoniste est la plus importante, cela est le cas lorsque les allèles impliqués ont des effets opposés sur la valeur sélective dans les différents habitats. Un tel phénomène implique donc qu'aucun génotype ne doit être supérieur dans tous les habitats. D'après nos résultats, nous avons observé une absence d'interaction plante x bactérie à l'échelle régionale et une dominance génotypique de la souche française à l'échelle méditerranéenne. Ainsi, les analyses coévolutives mises en place n'ont pas permis de mettre en évidence une adaptation locale ni à l'échelle 'étroite' (Sud de la France), ni à l'échelle plus 'large' (bassin méditerranéen) de la métapopulation. Les questions suivantes se posent alors : Quelles peuvent être les causes de cette absence de détection d'adaptation locale et/ou pourquoi aurions nous pu attendre un résultat coévolutif du type 'maladaptation' ? Comment cette étude pourrait-elle être améliorée et complétée ? Lorsque le phénomène de coévolution ne peut être démontré, de nombreuses raisons peuvent être avancées, comme des raisons évolutives, des biais expérimentaux voire une réalité coévolutive décevante.

.Raisons évolutives.

. **Trop de flux de gènes.** Puisqu'une différenciation génétique entre populations utilisées pour une étude de coévolution est nécessaire pour qu'un phénomène d'adaptation locale puisse se mettre en place, le flux de gènes inter-populations doit donc être limité. Cela est le cas soit parce que le flux n'existe effectivement pas, soit parce que les migrants sont contre sélectionnés dans leur nouvel environnement avant que des phases d'hybridation n'aient pu se réaliser. Des travaux ont montré l'existence d'une structuration génétique élevée des populations végétales de *M. truncatula* (Bonnin *et al.*, 1996; Lazrek *et al.*, 2008; Ronfort *et al.*, 2006), au moins sur des marqueurs neutres. Donc a priori, ce ne sont pas les flux de gènes qui ont empêché la mise en place d'un phénomène d'adaptation locale pour les plantes. Une étude faite sur *S. meliloti* et *S. medicae* a montré une différenciation génotypique entre les populations de France et Tunisie (Pavoine, Bailly, 2007). On peut donc supposer qu'il en existe aussi entre populations plus éloignées géographiquement (Grèce et Turquie). Par contre, aucune analyse de la structuration n'a été effectuée sur les populations bactériennes du Sud de la France. Ainsi, il est possible que des phénomènes de migration bactérienne et de succès des migrants dans leur

nouvel habitat aient pu empêcher la différenciation entre populations bactériennes à cette échelle et donc que ces flux de gènes trop importants empêchent la mise en place d'adaptation locale. Au niveau du bassin méditerranéen, cette hypothèse de flux de gènes importants entre populations est moins claire. Ainsi, nous pourrions quantifier ce phénomène d'immigration pour les deux échelles utilisées et aussi étudier les introgressions géniques consécutives au sein du génome des populations locales (Mopper *et al.*, 2000), afin de savoir si le faible flux de gènes dû à une faible dispersion et à une forte 'fidélité d'habitat' existe dans ce système symbiotique.

. **Populations trop récentes.** La coévolution est un processus assez long par lequel des changements évolutifs réciproques se mettent en place sous l'influence de la sélection naturelle (Ehrlich, Raven, 1964). Ce phénomène d'adaptation locale ne peut donc être décelé que dans des populations suffisamment âgées pour avoir laissé le temps à ces échanges de se faire. *M. truncatula* est une espèce pionnière, colonisant des milieux ouverts soit dégradés (où les autres espèces ne peuvent s'implanter) soit artificiellement maintenus ouverts (pâture, oliveraie...). En compétition avec d'autres espèces, comme lorsqu'un milieu se referme, l'espèce a du mal à se maintenir. On s'attend donc a priori, même si cela n'a pas formellement été quantifié, à ce que les populations naturelles ne puissent pas se maintenir sur de très longues périodes (plusieurs décennies). Une faible espérance de vie pourrait donc fortement limiter la mise en place d'adaptation locale dans ce système symbiotique. Il conviendrait de vérifier si le modèle *Amphicarpaea. Bracteata*, utilisé par Wilkinson et Parker (1996) pour son approche coévolutive avec *Bradyrhizobium* sp. est différent sur ce point, avec des cycles de vie où des conditions permettent le maintien de populations sur de plus grandes périodes. Une approche de type coalescence pourrait apporter des éléments clefs sur les événements importants qu'ont subi les populations végétales de notre étude et cela pourrait permettre d'estimer si elles ont subi récemment des événements démographiques majeurs (effets de fondations par exemple), comme les récents événements de migration observés dans la population de Salses (Pyrénées-Orientales, France) (Siol *et al.*, 2008).

. **Sélection divergente inadéquate.** La sélection divergente est la force adaptative maîtresse de l'adaptation locale. Chez *M. truncatula*, le caractère relié à la symbiose, et donc dans notre cas à l'adaptation avec les bactéries, est polygénique, avec des gènes liés à la colonisation racinaire, à la nodulation et à la fixation d'azote notamment. Dans le cas d'un déterminisme polygénique, des études théoriques ont montré que le phénomène d'adaptation locale est favorisé lorsque la sélection exercée sur les plantes dans un environnement allopatrique est forte, mais que la sélection contre des génotypes intermédiaires (recombinants) est modérée. En effet, si les populations étudiées subissent

une sélection très forte en conditions allopatriques, une population initialement adaptée à un habitat aura des difficultés à coloniser d'autres habitats et à évoluer en groupes de populations adaptées (Day, 2000). Cependant, pour que le phénomène d'évolution de l'adaptation puisse avoir lieu, une sélection modérée doit être exercée sur les génotypes intermédiaires, mais celle-ci ne doit pas être trop faible afin que le maintien de génotype généraliste intermédiaire ne mène pas à une perte de différenciation génétique (Spichtig, Kawecki, 2004). Dans notre cas, nous ne possédons pas pour l'instant les éléments permettant de définir les niveaux de sélection des génotypes intermédiaires. Cependant, l'absence de contre sélection forte des plantes en condition allopatrique pourrait expliquer une absence de patron d'adaptation locale. Il convient cependant de noter que l'argumentation est cyclique, l'absence d'adaptation locale s'exprimant aussi par l'absence de contre sélection des individus!

. **Trop de variation temporelle dans la sélection.** S'il existe des variations temporelles dans les populations, notamment si les populations bactériennes fluctuent beaucoup, alors les plantes qui s'associent avec toutes les souches, donc des plantes à spectre d'hôte large (généralistes) ont un génotype favorisé par rapport à des plantes plus spécialistes. Si des plantes généralistes sont utilisées dans notre étude, alors l'adaptation locale ne peut pas être mise en place. Nous ne pouvons exclure cette hypothèse, bien que non testée pour l'instant.

. **Coûts de la plasticité adaptative bactérienne et compétition bactérienne.** Le coût bactérien pour l'adaptation peut expliquer le profil de maladaptation observé. Si l'on estime que certaines bactéries, telles que la souche turque par exemple, ont un coût élevé d'adaptation aux conditions expérimentales (adaptation au type de sol, aux températures, à l'humidité...), elles peuvent alors montrer un taux de survie moindre par rapport à la souche française (Kassen, 2002). Dans le cadre de notre étude inter-pays, nous sommes dans un cas où une souche apparaît extrêmement compétitive par rapport aux autres. Mais on ne sait pas si cette souche est très compétitive effectivement sur la nodulation, ou bien si le milieu de culture (vermiculite/perlite) lui a été très favorable sélectivement par rapport aux autres souches. On peut en effet supposer que l'utilisation d'une seule souche par pays biaise notre échantillonnage (sélection au hasard d'une souche française ayant une très grande valeur sélective dans nos conditions vis-à-vis des autres souches). Des études complémentaires de compétition bactérienne entre ces quatre souches, par exemple sur sol stérile ou en milieu liquide, pourraient alors permettre de savoir dans quelle mesure il existe une différence de compétitivité (vitesse de croissance par exemple) entre les souches, ou si les différences observées sont le résultat d'une sélection du milieu expérimental.

. Contraintes et biais expérimentaux.

. **L'échelle d'étude.** L'échelle d'étude utilisée dans les deux approches peut être une barrière à la démonstration du processus de coévolution. Le choix d'analyser la coévolution à une échelle métapopulation 'large' (bassin méditerranéen) et à une échelle métapopulation plus 'restreinte' (Sud de la France) a été basé sur les concepts de différenciation génotypique et de flux de gènes respectivement proportionnel et inversement proportionnel à la distance entre les populations. Peut-être que l'échelle d'étude utilisée pour visualiser de l'adaptation locale en terme de valeur sélective est trop fine entre nos populations du Sud de la France, et devrait être réalisée à une échelle plus large. L'absence de résultats sur l'expérience de compétitivité aurait alors pour origine d'autres éléments, que cela soit un effet échantillonnage ou un effet lignées de plantes. On peut se demander si l'exploitation des données sur les lignées végétales aurait pu être approfondie comme l'ont été les niveaux d'analyse hiérarchisés 'groupe de plantes dans population', 'plantes individuelles dans groupe' et 'grain dans plante' dans l'analyse d'adaptation locale entre *Colletotrichum lindemuthianum* et *Phaseolus vulgaris* (Capelle, Neema, 2005). Cependant, puisque aucun phénomène d'adaptation locale n'a été ressorti à l'échelle des groupes de populations par pays, la recherche d'effets entre lignées, voire entre plantes nous a semblé être peu pertinent.

. **Sélection évolutive de *S. medicae* vis-à-vis de *S. meliloti* sur le site de Narbonne.** Contrairement à l'idée de départ, qui était de travailler avec l'espèce *S. meliloti*, l'espèce bactérienne *S. medicae* a été utilisée pour les inoculations croisées à l'échelle française, puisqu'en effet, le piégeage bactérien réalisé sur le site de Narbonne n'a pas permis la détection de souches de *S. meliloti* alors que les deux types bactériens ont été révélés sur les deux autres sites de piégeage. Si l'on suppose que les génotypes symbiotiques des plantes puissent être soit spécialiste pour l'un des deux genres bactériens soit généraliste, on peut alors considérer que cette structuration génotypique quasiment (ou totalement) restreinte à *S. medicae* donne un avantage aux génotypes végétaux généralistes en ce site géographique. Cette idée allant à l'encontre du concept d'adaptation locale, cela pourrait expliquer l'absence de détection de ce processus à cette échelle géographique. Cette hypothèse est renforcée par les résultats issus de plusieurs études de polymorphisme de séquence, qui a montré que certains gènes chromosomiques possèdent une diversité génétique moindre chez *S. medicae* par rapport à celle existant chez *S. meliloti* (Bailly *et al.*, 2007; Rangin *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'extinction génotypique de *S. meliloti* sur un des trois sites échantillonnés laisse penser que ce phénomène d'extinction-colonisation au sein de cette espèce n'est pas un processus rare. Or une telle dynamique efface les avantages géniques adaptatifs et est donc non favorable à l'adaptation locale. Il conviendrait peut-être

de réaliser la même expérience avec une espèce ne réalisant sa symbiose qu'avec *S. medicae*, telle que *Medicago polymorpha*, puisque a priori l'espèce végétale ne serait alors pas sensible à ces effets d'extinction-colonisation d'une espèce bactérienne sur les deux généralement sympatriques. L'utilisation de modélisation mathématique pourrait être appropriée pour tester l'hypothèse de fréquence non négligeable du phénomène d'extinction-colonisation au sein de cette espèce.

. **Biais dans les mesures de valeur sélective à l'échelle régionale.** Selon Howe (2005), la meilleure mesure pour juger de l'importance relative d'un trait adaptatif est son effet sur la valeur sélective elle-même. Donc a priori, les mesures de poids et de nombre de graines sont directement reliées à cette adaptation. Ainsi le choix d'utiliser d'une part la biomasse végétative à trois semaines de croissance et d'autre part la production de graines (en terme de nombre de graines ou de biomasse totale) en fin de cycle végétal semble pertinent puisque la vigueur des plantes peut être estimée par des mesures quantitatives de poids secs aériens, si l'on suppose que la vigueur de la plante est directement corrélée à sa valeur sélective (production de descendants). Cependant, un éventuel biais expérimental peut être considéré à ces deux niveaux : la première mesure de poids sec aérien des plantes à 4 semaines pourrait avoir devancé l'apparition d'un phénomène sélectif sur la nodulation. D'après des observations en chambre de culture sur le même milieu de croissance, les nodules apparaissent quinze jours après l'inoculation et deviennent fixateurs une à deux semaines plus tard. Ainsi, on peut alors penser que les différences de valeur sélective soient majoritairement dues au génotype végétal intrinsèque de la plante, comme la taille initiale des graines. De plus, une certaine limitation du point de vue de la taille des pots de croissance en fin de cycle pourrait avoir induit un stress lié au développement racinaire confiné, conduisant à un effacement des différences d'adaptation par un épuisement des plantes. Pour une expérience ultérieure, la mesure de la biomasse végétative à floraison (pouvant être considérée comme l'éclosion de la première fleur) pourrait être un reflet adéquat de la valeur sélective des plantes, ou la fructification pourrait être menée à terme, mais alors en pots de plus grand volume. Par ailleurs, nous ne pouvons exclure des effets de contamination entre les pots puisque nous n'avons pas réalisé le typage des souches issues de chaque pot à la fin de l'expérience. Cependant, l'apport initial en inoculum étant largement dominant, on doit pouvoir considérer que les contaminations sont négligeables.

. **Précision de concordance d'origine des souches et des graines à l'échelle méditerranéenne.** En ce qui concerne l'analyse de la compétitivité des souches, la biodisponibilité expérimentale nous a imposé l'utilisation de souches bactériennes française, turque et tunisienne originaires de la même région globale (par pays) que les graines mais qui ne sont pas issues des mêmes populations d'où sont

originaires les lignées de plante. De plus, en ce qui concerne les sols de Turquie et Grèce, les souches ont été isolées à partir de sols contenant des légumineuses, mais sans une sûreté de présence de *M. truncatula*. On ne peut donc exclure que ces souches, qui appartiennent à *S. meliloti*, aient partiellement divergé pour une spécialisation vers d'autres espèces de *Medicago*, ce qui traduirait, notamment en ce qui concerne la souche de Turquie, une mauvaise adaptation à *M. truncatula*. Cette explication ne tient cependant pas pour la souche de Tunisie, lorsque l'on compare ses fréquences de nodulation avec celles de la souche de France. Ainsi, un isolement *in situ*, ou du moins un piégeage avec un sol prélevé sous un couvert de *M. truncatula*, serait préférable et un travail avec des populations de *M. truncatula* prélevées au même endroit permettrait d'affiner cette approche.

. **Biais dans le typage des nodosités.** Le typage d'un nombre restreint de nodosités a été réalisé, le choix ayant été porté parmi les nodosités les plus roses et les plus grosses, puisque supposées avoir un rôle prépondérant dans l'apport azoté de la plante. On observe que la souche française se retrouve en pourcentage majoritaire dans cette catégorie de nodosités, mais il est possible que cela ne soit pas le cas pour les autres catégories de nodosités de la plante. Il serait possible de vérifier cette hypothèse en poursuivant le typage de toutes les nodosités, qui ont été récoltées et conservées.

. **Analyse sur site.** Certains auteurs considèrent que l'adaptation locale est un phénomène qui peut être mieux observé *in situ* (Joshi *et al.*, 2001). Ainsi des expériences de transplantation-replantation sur sites semblent très adaptées, puisque l'ensemble des conditions biotiques, édaphiques et climatiques est alors pris en compte. Mais une étude globale d'adaptation locale de ce genre ne permettrait alors pas de discriminer les effets bactériens des autres effets environnementaux.

. Dure réalité et perspectives.

. **Absence réelle d'adaptation locale.** En plus de ces hypothèses pouvant expliquer l'absence de détection d'adaptation locale pour la plante, il ne faut évidemment pas négliger celle de l'absence réelle d'existence de ce processus évolutif. Cette hypothèse ne peut en effet pas être écartée avant d'avoir testé la coévolution à toutes les échelles d'étude possibles.

. **Analyse du point de vue bactérien.** Cependant, au lieu d'étudier l'adaptation de la plante, un intérêt particulier peut aussi être apporté à l'analyse de l'adaptation locale du point de vue bactérien. L'adaptation locale bactérienne dépend notamment des arrivées de nouvelles variations génétiques, via des facteurs non indépendants tels que la mutation, la migration et la recombinaison, et leur relation à

la taille de la population (Gandon, Michalakis, 2002). Dans le système *M. truncatula-Sinorhizobium* sp., l'espèce végétale se reproduit sexuellement avec de la recombinaison génétique alors que la bactérie tend à atteindre une taille de population importante en un temps de génération court (estimé entre 4 et 5 h en culture in vitro). Ces arguments peuvent laisser supposer que la bactérie est l'organisme du système qui possède un plus haut potentiel d'évolution du point de vue temporel, et donc que le symbiote devrait s'adapter localement plus fréquemment que son hôte (Hamilton *et al.*, 1990). Cette approche d'adaptation bactérienne pourrait être étudiée à l'aide d'expériences d'inoculations croisées ou de compétitivité similaires à celles réalisées dans notre étude. A partir des sols de culture, l'extraction des bactéries pourrait servir à réaliser des PCR quantitatives spécifiques ou à effectuer des mesures directes de valeur sélective des bactéries, en estimant la taille des populations bactériennes présentes dans les pots (Elena, Lenski, 2003). L'étude d'adaptation locale du point de vue bactérien semble justifiée puisque le fait que l'hôte ou que le symbiote soit adapté localement dépend principalement du système biologique considéré (Kaltz, Shykoff, 1998).

. Résultats parallèles à l'adaptation locale.

. Co-inoculation de nodosités. Par ailleurs, un autre résultat intéressant ressortant de cette étude est le typage de bactéries multiples au sein d'une nodosité. Le mécanisme de coinfection a été décrit par Gage (2004). En effet, l'absence de mise en culture des bactéries lors de ce typage a permis d'observer une co-infection bactérienne pour environ 1% des nodosités analysées. Ce pourcentage pourrait atteindre environ 5 % si l'on considère les nodosités génotypées comme 'multiple' à un locus mais 'simple' sur l'autre (3,62 %) ou encore les nodosités caractérisées 'multiple' sur un locus mais non déterminées sur l'autre (0,52 %). Expérimentalement, ces deux dernières catégories peuvent être expliquées par une mauvaise amplification génique PCR soit d'un des génotypes au niveau du locus 'simple' ou alors de tous les génotypes au niveau du locus non déterminé. En plus d'être une technique rapide et peu chère, la technique moléculaire CE-SSCP possède l'avantage de permettre la conservation des broyats bactériens. Ainsi, les nodosités considérées comme co-inoculées pourraient être mises en culture et le séquençage de ces souches permettrait de confirmer l'existence de ce phénomène de co-inoculation double ou triple au sein d'une même nodosité. Du point de vue évolutif, s'il y a de la co-inoculation, on peut considérer que certaines souches se comportent comme des parasites, a priori en profitant du cordon d'infection d'une souche pour entrer en même temps dans la nodosité et s'y multiplier. Cela se traduit par des souches qui ne sont pas bonnes d'un point de vue symbiotique mais qui vont quand même utiliser la plante pour augmenter leur valeur sélective, ce sont donc des bactéries tricheuses. Il faut noter que le taux de co-inoculation est finalement élevé au regard

de la proportion très forte de souche française dans les nodosités ; la forte compétitivité de la souche française peut en effet supposer être à l'origine d'une sous-estimation de ce taux. Il serait donc intéressant de mesurer le taux de co-inoculation dans une approche expérimentale ne mettant en jeu que les souches grecque et tunisienne qui possèdent un niveau de compétitivité identique. De plus, une approche par modélisation mathématique permettrait de savoir si l'existence de tricheurs peut avoir un effet sur l'évolution des populations bactériennes.

. Recombinaison supposée importante. L'analyse effectuée sur deux loci plasmidiques (pSymA), supposés être en fort déséquilibre de liaison chez un haploïde nous indique un taux de recombinaison minimal de 0,7 %. Cette fréquence mesurée sur une centaine de plantes en croissance pendant quatre semaines suppose donc que le phénomène de recombinaison intra-plasmidique pourrait être important en populations naturelles. Le mégaplasmide symbiotique pSymA est en effet considéré comme le « point chaud » majeur pour la différenciation intra-spécifique de *S. meliloti* (Bailly, 2006; Giuntini *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006). Les possibilités de recombinaison observées dans cette étude (souche turque/souche grecque et souche tunisienne/souche française) peut suggérer une différenciation génétique faible entre la Turquie et la Grèce d'une part et entre la France et la Tunisie d'autre part. Dans cette idée, la structuration bactérienne pourrait être en forte corrélation avec la structuration végétale, supposant alors de la co-structuration hôte-*Rhizobium*. Le rôle joué par la plante dans le niveau de recombinaison bactérienne est certainement non négligeable, puisque les légumineuses créent un confinement bactérien d'une part pour les bactéries rhizosphériques pour lesquelles a lieu une stimulation de division par rapport à des bactéries libres du sol, et d'autre part pour deux bactéries se développant au sein d'une même nodosité. Comme la recombinaison bactérienne peut donc être supposée favorisée chez des bactéries en symbiose vis-à-vis de bactéries libres du sol, un milieu dépourvu de plantes permettrait d'augmenter le comportement généraliste des bactéries. L'utilisation prévue du locus *rkp* situé sur le chromosome aurait été utile pour enrichir cette notion de recombinaison génétique, puisqu'en effet nous aurions attendu un taux de recombinaison plus fort entre un locus plasmidique et un locus chromosomique. Ainsi, la raison de cette variation 'effet dose' de migration des fragments *rkp* sur CE-SSCP devrait être éclaircie lors de l'amélioration de la technique, afin de pouvoir discriminer les souches sans ambiguïté sur ce locus et pouvoir alors mesurer le taux global de recombinaison.

CONCLUSION

Cette étude chez le couple symbiotique *Medicago truncatula* – *Sinorhizobium* sp. ne nous a donc pas permis de démontrer de l'adaptation locale à l'échelle de la métapopulation. De nombreuses raisons évolutives peuvent être avancées, comme par exemple un flux de gènes trop important ou des effets de fondation récents des populations, pour tenter d'expliquer ce profil inattendu. Cependant, des biais expérimentaux peuvent aussi supposer être à l'origine d'une absence de détection de ce phénomène adaptatif et la possibilité d'une réelle absence d'existence d'adaptation locale ne doit pas être écartée. Ainsi, en plus des améliorations techniques qui peuvent être apportées à l'étude de la coévolution analysée du point de vue légumineuse, une approche de l'adaptation locale du point de vue *Rhizobium* semble être pertinente à réaliser.

3- Perspectives

Afin de pouvoir détecter de l'adaptation locale, la même expérience pourrait être réalisée, avec quelques variantes notoires : utilisation de souches bactériennes et de graines végétales issues du même site y compris à l'échelle du bassin méditerranéen, mesure de la fitness des rhizobia, mesure de la fitness de la plante grâce à la biomasse aérienne sèche à 7 semaines de croissance ou grâce au nombre et poids des graines (pots de culture de taille importante). Les résultats de génotypage des souches obtenus dans la manipulation « phylogéographie » pourraient être utilisés pour le choix des populations. De plus, les sols et les graines de *M. truncatula* ont été récoltés en même temps pour les sites de Turquie, de France et de Corse, et les lignées végétales ont été reproduites ; il serait alors possible d'utiliser des souches bactériennes et des plantes issues des mêmes localités géographiques. Par ailleurs, des expériences préalables de compétition bactérienne pour la nodulation au sein de chaque site seraient nécessaires afin de connaître la compétitivité des souches en intra population. Dans un deuxième temps, la sélection de souches présentant une compétitivité équivalente entre les sites pourrait être effectuée puis testée par des expériences de compétition inter-populations. Les analyses d'adaptation locale pourraient alors être réalisées *de novo*.

CHAPITRE VI:

COMPARAISON DES POPULATIONS BACTERIENNES ISSUES DES NODOSITES ET DE LA RHIZOSPHERE

VI- Comparaison des populations bactériennes issues des nodosités et de la rhizosphère

1- Introduction

Le projet « Microger » a pour objectif d'étudier l'effet des pratiques de gestion et des modes d'aménagement agricoles et sylvicoles sur la communauté microbienne qui intervient dans la fertilité et la qualité des sols. Ce projet se subdivise en deux sous-projets, Microfor (étude des relations entre biodiversité et fonctionnement géochimique dans les plantations forestières) et Micagro (effet des pratiques agricoles sur la qualité des sols et l'environnement). Le travail présenté ici est une composante du sous-projet Micagro, et étudie la diversité des souches de *Sinorhizobium spp.* associées à *Medicago sativa*, en fonction des précédents culturaux. Cette étude est possible grâce à l'Unité Expérimentale d'Epoisses (INRA, département de la Côte d'Or) qui a mis en place et gère des cultures de luzerne sur différentes parcelles dans des conditions de monoculture et de culture en rotation avec blé et colza sur trois ans.

Plusieurs objectifs ont été définis sur ce projet :

- la comparaison des populations de *Sinorhizobium spp.* présentes dans les nodosités et dans le compartiment rhizosphérique
- la comparaison des populations de *Sinorhizobium spp.* sous des conditions de monoculture de luzerne et de culture de blé, colza et luzerne en rotation. Ce deuxième objectif est développé dans les perspectives (chapitre VIII)

2- Manuscrit 5 (en préparation)

COMPARAISON DES POPULATIONS BACTERIENNES SYMBIOTIQUES PRESENTES DANS LES NODOSITES ET DANS LA RHIZOSPHERE

INTRODUCTION

L'objectif de cette étude était de comparer la population de *Sinorhizobium meliloti* présente au sein des nodosités, avec celle observée au niveau de la rhizosphère de *Medicago sativa*. En effet, il a été montré que les bactéries colonisant les nodosités de *M. sativa* sont qualitativement différentes de celles présentes au niveau du sol (Hartmann *et al.*, 1998). Comme il peut exister une différence de diversité entre les nodosités et le sol, il faut admettre que la plante joue à un moment donné le rôle de filtre sélectif. Il existe 3 compartiments au niveau du complexe plante-sol : le sol nu, le sol rhizosphérique (sous influence directe des racines de la plante) et les nodosités des plantes. La diversité des microsymbiotes à l'intérieur des nodosités peut se distinguer de celle de l'extérieur des nodosités; le filtre sélectif pourrait donc s'exercer entre le sol nu et le sol rhizosphérique, ou entre la rhizosphère et les nodosités. Comme il est très difficile d'avoir accès aux rhizobia du sol sans passer par le piégeage par la plante, étant donné leur faible nombre dans ce compartiment et l'absence d'un milieu d'isolement sélectif, nous avons décidé de considérer seulement le sol rhizosphérique et non pas le sol nu. En effet, dans le sol rhizosphérique, le nombre de bactéries est multiplié par 5 à 10 (Gobat *et al.*, 1998) par rapport au sol nu, ce qui constitue une condition plus favorable pour accéder aux rhizobia localisés hors des nodosités sans l'utilisation de plante-hôte. Afin de mettre en évidence une sélection bactérienne entre le sol rhizosphérique et les nodosités, nous avons comparé la population de *Sinorhizobium* sp. présente dans les nodosités de *Medicago sativa*, avec celle présente au niveau du sol rhizosphérique. L'approche de séquençage massif d'ADN extrait du sol, ou métagénome, serait a priori la seule évitant ces biais et permettant l'obtention d'une image réelle de la diversité bactérienne présente dans un sol. Ces approches de métagénomique se développent de plus en plus, en concordance avec la démocratisation du séquençage massif.

Tous les biologistes analysant les communautés bactériennes naturelles se posent la question : mon échantillonnage reflète-il la diversité réelle de la communauté ? Les progrès de la génétique moléculaire ont permis l'analyse détaillée de la diversité et de la richesse des espèces bactériennes. Plusieurs méthodes se distinguent en fonction du but de l'étude. Un grand nombre d'études sont basées sur la technique de clonage-séquençage, considérée actuellement comme la méthode d'analyse la plus précise, mais aussi une des plus coûteuse en temps et en argent. De ce fait, l'analyse des

communautés bactériennes a souvent été réalisée grâce à des approches fournissant des empreintes moléculaires. Parmi d'autres, l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE), le polymorphisme de conformation simple brin (SSCP), le polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP) ou l'analyse automatique de l'espaceur intergénique rRNA (ARISA) sont fréquemment utilisées. Toutes ces méthodes moléculaires, y compris les banques de clones, sont critiquées pour l'introduction d'un biais lors de l'amplification de l'ADN par PCR. Evidemment, ces techniques ne sont pas parfaites et certains individus des communautés ne sont pas détectés alors que d'autres sont surestimés, résultant en un inventaire exhaustif de la diversité bactérienne impossible à ce jour.

Dans cette étude, la discrimination de variations de séquences a été analysée à l'aide de séquençages et de la technique SSCP qui permet de discriminer des polymorphismes de séquences sur gel d'acrylamide. Cette technique est adaptée à une taille des fragments d'intérêt inférieure à 500 bp (King *et al.*, 2005). Elle est efficace pour discriminer des séquences qui diffèrent par une seule paire de bases ou plus (Sunnucks *et al.*, 2000). Ainsi, la mise au point de cette technique dans ce cadre d'étude devrait nous permettre de comparer la population de *Sinorhizobium spp.* issue de nodosités de luzerne avec celle issue de la rhizosphère. L'aboutissement de cette comparaison permettra d'atteindre l'objectif fixé qui est de vérifier l'hypothèse émise : existe-t-il un filtre sélectif sur les souches de *Sinorhizobium meliloti* lors de la colonisation des nodosités de *Medicago sativa* par *Sinorhizobium meliloti* ?

MATERIEL ET METHODES

. **Création des bases de données de diversité.** L'essai dans lequel s'insère ce travail a été mis en place sur le site de l'Unité Expérimentale d'Epoisses et le dispositif général est présenté dans la figure VI.2.1. Les plants de luzerne ont été prélevés dans huit parcelles : quatre parcelles de luzerne en rotation avec le colza et le blé (parcelles n° 4, 7, 10 et 13), et quatre autres parcelles en monoculture (parcelles n° 19, 22, 25 et 32) sur trois ans. Les prélèvements (de nodules et de sol rhizosphérique) ont été effectués sur trois points selon une diagonale au sein de chaque parcelle. Au final une vingtaine de nodosités ainsi qu'un échantillon de sol rhizosphérique (regroupement des trois prélèvements) ont été prélevés par parcelle.

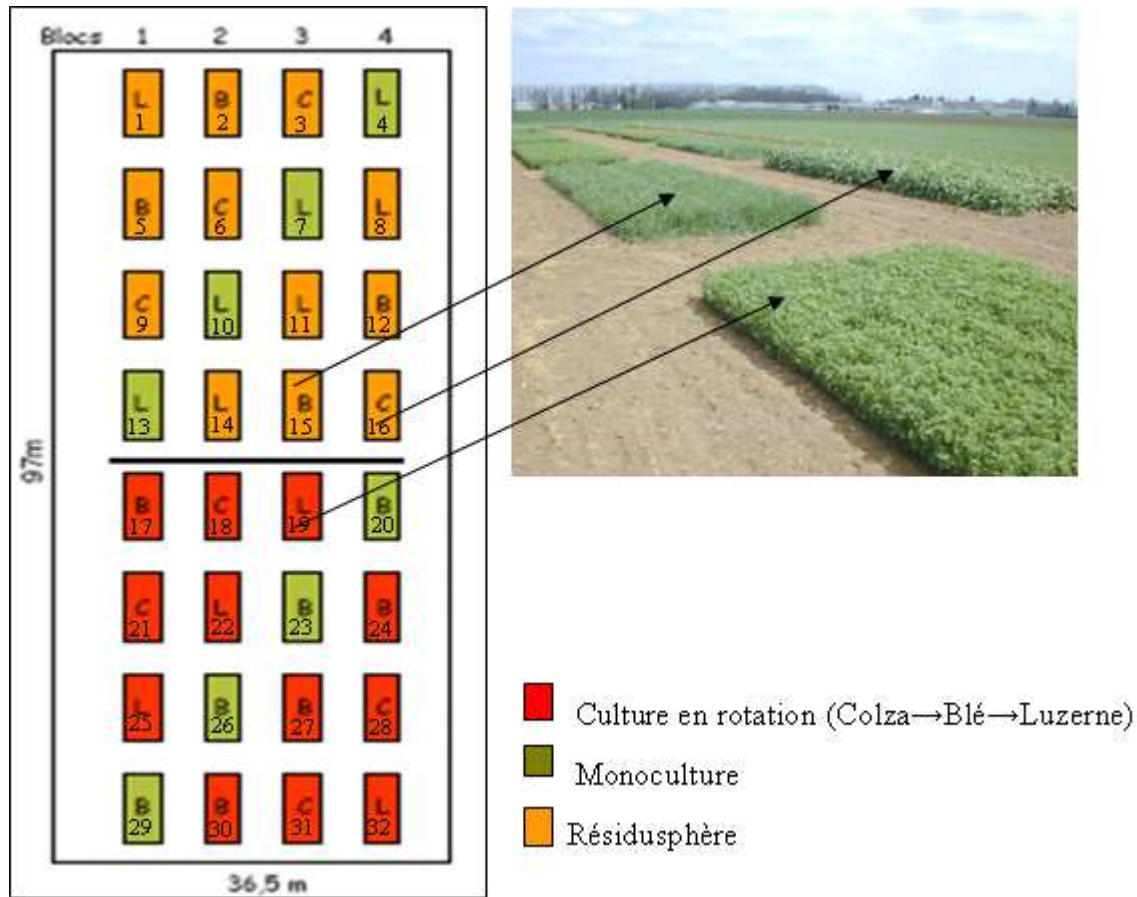


Figure VI.2.1 : Schéma représentant la disposition des parcelles de monoculture et de culture en rotation de luzerne sur l'unité expérimentale d'Epoisses.

Les parties racinaires adjacentes aux nodosités ont été sectionnées puis les nodosités ont été stérilisées superficiellement (hypochlorite de calcium à 3 % suivi de plusieurs rinçages), afin d'éliminer les bactéries rhizosphériques et n'obtenir que celles qui sont présentes à l'intérieur des nodosités. Les nodosités ont ensuite été broyées et étalées sur boîte de pétri YM-agar (Dalton, 1980). Ces boîtes ont été placées en chambre de culture à 28 °C pendant 48 heures. Une colonie par boîte d'isolement a été sélectionnée et repiquée en milieu solide YM-agar dans le but de purifier chaque souche. Les boîtes ont été mises en chambre de culture dans les mêmes conditions que précédemment. Les colonies obtenues ont ensuite été mises en culture liquide YM sous agitation à 28 °C pendant 48 heures. Chaque souche a été conservée dans la collection du laboratoire à -80 °C dans du glycérol à 60 % (50 % de culture liquide et 50 % de glycérol à 60 %).

. Extraction d'ADN des souches de *Sinorhizobium meliloti* purifiées. Chaque culture liquide a été lavée deux fois puis centrifugée (4000 rpm pendant 15 min à 20 °C). Une solution de tampon de lyse (Tris-Acétate 40 mM à pH 8, EDTA 1 mM, acétate de sodium 20 mM et SDS 10 %) a permis de lyser les membranes bactériennes pour libérer le contenu cellulaire (ajout de 400 µl de solution). Les

protéines ont été précipitées (par ajout de 133 µl de chlorure de sodium 5 M). Les échantillons ont été centrifugés (10 minutes à 10 000 rpm à 4 °C) pour récupérer la phase supérieure contenant l'ADN. L'ajout d'un volume de 300 µl de Sevag (chloroforme-alcool isoamylique 24 :1 vol/vol) a dénaturé les protéines éventuellement restantes. Les résidus protéiques ont été culotés (centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 minutes) et éliminés. L'ADN a ensuite été précipité par ajout de 250 µl d'isopropanol, lavé à l'éthanol et séché au Speedvac 5 minutes pour éliminer l'éthanol. Ces ADN ont été repris dans du TE-RNase (chauffés à 50 °C pendant 10 minutes) pour hydrolyser l'ARN. Les solutions d'ADN obtenues ont enfin été dosées au spectrophotomètre Nanodrop. Des dilutions ont été effectuées afin d'obtenir une concentration de 50 ng.µl⁻¹, concentration optimale pour le bon fonctionnement des PCR qui vont suivre.

L'ADN rhizosphérique extrait à partir des huit parcelles (Mougel *et al.*, 2006), nous a été fourni par C. Mougel (Microbiologie et Géochimie des Sols : UMR INRA / Université de Bourgogne).

. Sélection et amplification de fragments d'ADN d'intérêt. L'intergène *exoP-thiD* (494 bp) et l'intergène *nodE-nodG* (209 bp), situés à proximité de gènes sous pression de sélection (respectivement des gènes codant pour des exopolysaccharides de surface et des gènes de nodulation) ont été choisis pour leur polymorphisme de séquence démontré dans des études préalables (Bailly *et al.*, 2007; Bailly *et al.*, 2006). Les amorces utilisées sont données dans le tableau VI.2.1. La spécificité de ces amorces pour *Sinorhizobium meliloti* et *S. medicae* a été vérifiée par un BLAST sur NCBI. De plus, les bactéries proches phylogénétiquement de *S. meliloti* (autres espèces de *Sinorhizobium*) présentent le gène *exoP* et le gène *thiD* physiquement éloignés sur leur génome, excluant donc a priori leur amplification.

Tableau VI.2.1 : Détail des amorces nucléotidiques employées pour les amplifications par PCR.

Locus	Localisation	amorces	Séquence de l'amorce
exoP-thiD	psymB	exomltf1	5'-CAA CAA GAC GGA TAT GAA CGA A
		exomltr1	5'-GTG GTG GAA GGA TTG ACT GC
nodE-nodG	psymA	nodE_f	5'-CAG TTC TGG CAT TCA AGC
		nodG_r	5'-CCC CTC CTA TGG CTC CTG AT

Les PCRs utilisées utilisent les programmes d'amplification décrits ci-après. Pour l'intergène *exoP-thiD*: 4 minutes à 96 °C, puis 35 cycles avec dénaturation pendant 30 secondes à 96 °C,

renaturation de 60 °C à 50 °C en touchdown, puis élongation d'une minute à 72 °C. Ceci suivi de 20 cycles identiques au cycle précédent, mais le touchdown a été remplacé par une renaturation pendant 30 secondes à 50 °C suivi d'une élongation de 7 minutes à 72 °C. Pour l'intergène *nodE-nodG* : dénaturation à 94 °C pendant 5 minutes, puis 35 cycles comportant une dénaturation de 30 secondes à 94 °C, une renaturation de 30 secondes à 58 °C, puis une élongation d'une minute à 72 °C. Cette PCR se termine par une élongation finale de 7 minutes à 72 °C. Le mélange des réactifs de PCR (dans un volume total de 25 µl) contient 14,875 µl d'eau stérile; 5 µl de tampon PCR 5X; 2 µl de dNTP 10 mM; 1 µl de chaque amorce à 20 pmol.µl⁻¹; 0,125 µl de Taq-polymérase (2,5 U par réaction); et 1 µl d'ADN concentré à 50 ng.µl⁻¹. Les 25 µl de produits obtenus ont été déposés en totalité sur un gel d'agarose à 1 % (dans du TAE 1X). Ce gel contient du bromure d'éthidium (BET) à 0,6 mg.ml⁻¹. Après vérification de la longueur des fragments d'ADN et de l'intensité de leur signal, les bandes ont été découpées puis l'ADN a été purifié grâce au kit Qiaquick gel extraction (Quiagen) selon les recommandations du fabricant en éluant les échantillons dans un volume d'éluant de 30 µl. Les solutions contenant les fragments d'intérêt ainsi obtenus ont alors été dosées au spectrophotomètre Nanodrop.

. **Typage génétique des souches isolées à partir de nodosités.** Les solutions d'ADN ont été diluées afin que leur concentration finale soit comprise entre 15 et 50 ng.µl⁻¹, gamme de concentrations optimales pour leur séquençage, réalisé par la société MacroGen. Les séquences ont été corrigées grâce au logiciel Chromas pro version 1.33 (www.technelysium.com.au/ChromasPro.html), alignées grâce au logiciel ClustalX version 1.83 (Thompson *et al.*, 1997) puis comparées sous le logiciel Genedoc version 2.6 (Nicholas *et al.*, 1997). Les séquences obtenues ont été classées par haplotype (combinaison donnée de nucléotides polymorphes le long d'une séquence) afin d'obtenir des bases de données de diversité sur les deux loci *nod* et *exo*.

. **Analyse statistique.** L'analyse de la différenciation des 8 populations (8 parcelles) de *Sinorhizobium spp.* issues des nodosités a été réalisée grâce au logiciel Genepop version 3.4 (Raymond et Rousset, 1995). Des tests de différenciation (globale et par paires) de populations sur les données concernant les deux loci *exo* et *nod* ont ainsi été effectués (Demémorisation 10000, batches 10000 et 10000 itérations par batch).

. **Analyse de la population rhizosphérique sur gel SSCP.** La technique SSCP (détaillée en figure VI.2.2) permet de visualiser et de discriminer, sur un seul gel d'acrylamide, les différents haplotypes (au niveau d'un locus) des souches détectées au sein d'une population. Suite à la dénaturation des fragments d'ADN d'intérêt, chaque simple brin ainsi obtenu prend une conformation bidimensionnelle caractéristique de sa séquence. Sur gel d'acrylamide, les brins migrent donc à différentes vitesses au travers du maillage du gel, compte tenu de leurs conformations spatiales différentes. Les différentes étapes de la mise au point de la technique sont résumées dans le tableau VI.2.2.

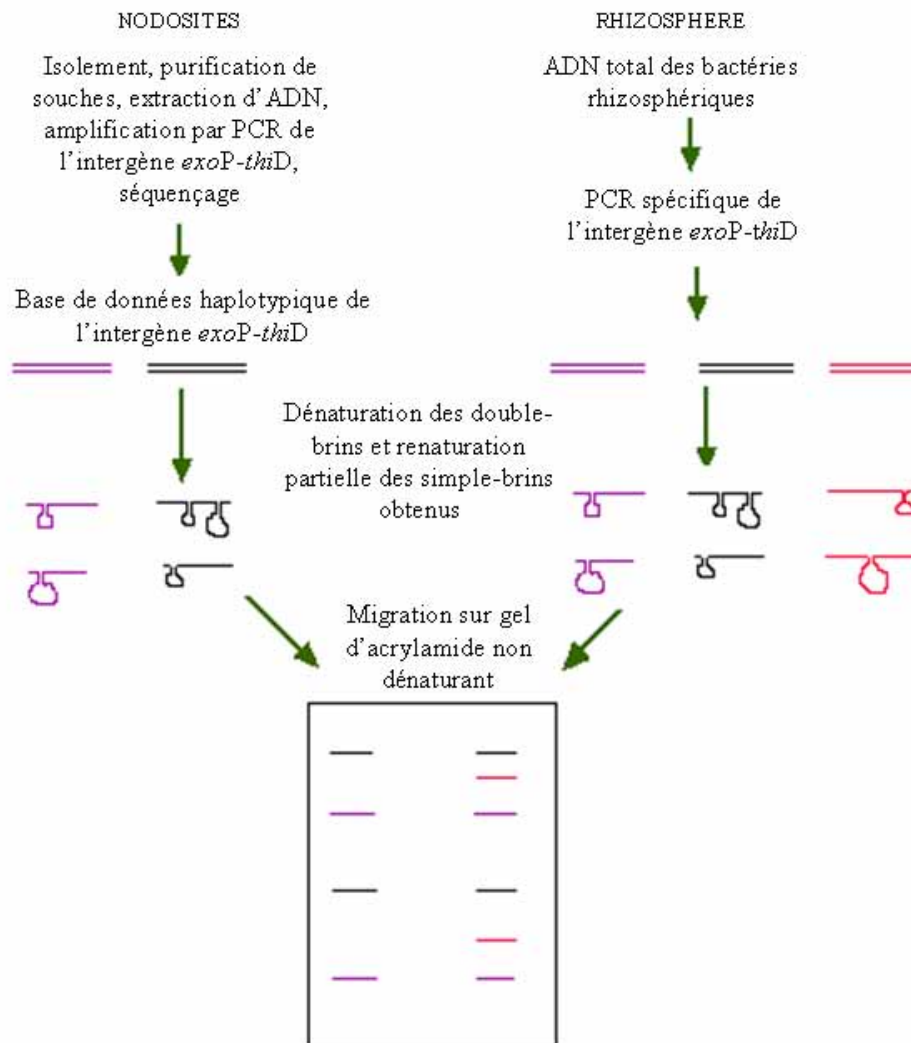


Figure VI.2.2 : Schéma représentant le principe de la SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism) adaptée à l'étude.

Tableau VI.2.2 : Récapitulatif des étapes de mise en point de la technique SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism). Les tests effectués qui ont été validés sont ceux soulignés.

Catégories de mises au point	Tests effectués	Réponse observée
Étanchéité du dispositif (plaques de verre) lors de la polymérisation du gel	-Dépôt de graisse marine le long des espaceurs -Installation de rubans adhésifs le long des espaceurs et au bas des plaques de verre -Dépôt de gel d'agarose à 5% au bas des plaques de verre -Inclinaison des plaques de verre à l'horizontal pour la polymérisation - <u>Dépôt de gel d'agarose à 10% en bas des plaques de verre</u>	} } → Fuite du gel } → Fuite du gel } → Fuite du gel } → Limite les forces exercées par la pression verticale du gel } → Mesure qui étanchéfie le système
Concentration en gel MDE	-0,6X et 0,7X : Maillage du gel large -0,775X et 0,8X : Maillage très fi - <u>0,75X : Maillage fin</u>	} → Haplotypes peu discriminés } → Le gel a présenté une dessiccation } → Bon compromis entre finesse du maillage du gel et résistance de celui-ci a des migrations sur des temps longs
Temps et puissance de migration	-4h : 600V, 90mA (0,7X en MDE): 216W -6h : 600V, 175mA (0,7X en MDE): 630W -14h : 600V et 90mA: 756W ; 600V et 175mA: 1470W (0,7X en MDE) -14h30 : 120V et 18mA: 31.32W ; 220V et 36mA: 114W (testés sur 0,7X et 0,6X en MDE) -15h : 255V et 34mA: 130W; 210V et 33mA (0,6X): 210W ; 60Vet 8mA (0,7X): 7.2W; 500V et 100mA: 870W (0,8X) -15h30 : 250V, 32mA: 124W (0,7X) -16h :184V, 32mA: 94W (0,7X) -20h : 300V et 100mA: 600W (0,7X) ; 350V et 50mA: 350W (0,75X), <u>450V et 125mA: 1125W (0,775X et 0,7X)</u> -23h : 350V, 50mA: 402W (0,75X)	Mauvaise résolution du profil Migration faible, temps trop court Migration insuffisante, temps trop court Migration correcte, temps adapté Diffusion des bandes, temps trop long
Température	-Migrations à température ambiante, le dispositif ne permettant pas de réguler la température - <u>Migrations en chambre froide</u>	→ Fortes variations de température dans la cuve, de 23°C à 55°C pour de fortes puissances de migration → Température stabilisée à 25°C
Contraste du gel	- <u>Élimination de certains tampons du protocole de purification des produits PCR</u>	-Élimination des « smears » présents sur le gel

* Préparation d'ADN simple brin. L'integène *exoP-thiD* a été amplifié selon le même programme d'amplification que celui décrit précédemment, dans un volume de 50µl, à l'aide des amorces *exomltf1/exomltr1-5P*. La pureté de l'amplification et l'estimation de la concentration en ADN ont été effectuées par dépôt de 5 µl de chaque échantillon sur un gel d'agarose (1 %). Les 45 µl de produits PCR restants ont alors été purifiés grâce au kit Qiagen PCR purification, les échantillons étant élués dans 30 µl de tampon d'éluion.

* Préparation du dispositif SSCP. Les deux plaques de verre (22 cm sur 20 cm), les espaceurs (épaisseur finale de 0,75 mm), les peignes et les clamps ont été nettoyés au détergent, rincés à l'eau distillée et à l'alcool à 96 % puis séchés au papier Kimwipes (Travis and Glenn, 1991). Le dispositif a été placé à l'horizontale, les plaques de verre et les espaceurs étant parfaitement alignés. Le dépôt au bas des plaques d'une bande de gel d'agarose à 10 % a permis d'étanchéifier le système.

* Préparation du gel d'acrylamide. Un gel d'acrylamide de 27 ml a été préparé avec une concentration finale en MDE à 0,775X et en TBE à 1X (8,16 ml d'eau stérile, 10,46 ml de gel MDE à 2X et 5,4 ml de TBE 5X). La solution a été filtrée sur un filtre Nalgène cellulose acétate (0,45 µm de diamètre). Du persulfate d'ammonium à 10 % a été ajouté sous hotte aspirante (123 µl) ce qui a permis la polymérisation du gel ; l'ajout de 12,3 µl de TEMED a permis d'accélérer cette polymérisation. La solution a alors été coulée entre les plaques de verre grâce à une seringue de 50 ml et à une aiguille de 1,2 mm de diamètre. Après introduction du peigne dans le gel, nous avons laissé le gel polymériser pendant une heure au minimum.

* Préparation des échantillons. Les fragments d'ADN ont été dénaturés par incubation de 2 mn à 95 °C suivi de 5 mn sur glace. Sept microlitres d'ADN ont été mélangés à 2,5 µl de solution stop (95 % de formamide, 10 mM NaOH, 0,25 % de Bleu de Bromophénol, 0,25 % de Xylène Cyanol), qui permet la visualisation du chargement des puits.

* Conditions de migration. Le gel polymérisé a été installé dans une cuve placée en chambre froide (5 °C) contenant du tampon d'électrophorèse TBE 1X, le peigne a été retiré et les puits ont été rincés avec du tampon de migration à l'aide d'une seringue. Une migration à vide de 30 minutes a été réalisée pour équilibrer la température et le tampon au sein du gel tout en éliminant les impuretés ioniques (Lugovstev *et al.*, 2004). Les échantillons, ainsi qu'un marqueur de taille comme échelle de référence, ont été déposés dans les puits, en prenant soin de laisser un puit vide à chaque extrémité du

gel. La migration s'est effectuée sur 20 h à 400 V et 180 mA, soit 1 440 W de puissance, la température de la cuve (non réfrigérante) atteignant alors les 25°C.

* Révélation du gel. Le gel a été plongé dans un bain de BET (1 g.l⁻¹) pendant 20 minutes, puis rincé pendant 10 minutes à l'eau distillée. Le gel a été examiné sous UV puis photographié grâce au logiciel Perfect-Image version 5.3.

RESULTATS

. **Analyse de diversité des souches isolées des nodosités.** Sur 158 isolats issus des nodosités et analysés, respectivement huit et treize haplotypes ont été détectés pour les loci *nod* et *exo*. La totalité de ces isolats appartiennent à l'espèce *S. meliloti*. Pour le locus *nod* (tableau VI.2.3), l'haplotype α est majoritaire car présent dans 146 isolats. Les haplotypes β et ϕ ont été détectés chez 6 et 2 isolats respectivement. Les haplotypes χ , δ , ε , γ et η n'ont été trouvés que dans un seul isolat et leur séquence ne diffère des autres haplotypes que par un seul nucléotide de différence.

Tableau VI.2.3 : Récapitulation des sites nucléotidiques variables pour les différents haplotypes considérés pour l'intergène *nodE-nodG*, et du nombre d'individus détectés par haplotype.

Groupes haplotypiques	Nombre d'individus	Nucléotides variables sur la séquence de l'intergène <i>nodE-nodG</i> .					
		C	T	C	T	G	C
α	146	C	T	C	T	G	C
β	6	C	T	C	C	G	C
γ	1	C	A	C	C	G	C
δ	1	C	T	G	T	G	C
ε	1	C	T	C	T	C	C
θ	2	C	T	C	C	G	G
η	1	C	A	C	T	G	C
χ	1	T	T	C	C	G	C
Position sur la séquence (bp)		40	145	171	341	416	494

Au niveau du locus *exo* (tableau VI.2.4), 95 % de l'ensemble des isolats sont répartis dans 6 haplotypes, A, B, G, H, I, J, K avec respectivement 72, 9, 5, 8, 45 et 11 isolats. Cinq groupes haplotypiques (C, D, E, F, L et M) ne sont représentés que par un seul isolat et diffèrent des séquences majoritaires par des insertion-délétion et des substitutions. La séquence de chaque haplotype n'étant représentée que par un seul isolat a été vérifiée par re-séquençage pour les deux loci.

Tableau VI.2.4 : Récapitulation du polymorphisme de séquences et des positions des sites variables considérées pour l'intergène *exoP-thiD*, comprenant les nombres d'individus détectés par groupe haplotypique.

Groupes haplotypiques	Nombre d'individus	Polymorphisme de séquences sur l'intergène <i>exoP-thiD</i>																
		-	-	C	C	GCCTTTTTC	C	AG	T	G	A	T	G	G	A	A	G	T
A	72	-	-	C	C	GCCTTTTTC	C	AG	T	G	A	T	G	G	A	A	G	T
B	9	A	-	C	C	GCCTTTTTC	C	AG	T	G	A	T	G	G	A	A	G	T
C	1	-	A	C	C	GCCTTTTTC	C	AG	T	G	A	T	G	G	A	A	G	T
D	1	-	-	C	C	GCCTTTTTC	C	AG	T	G	A	T	C	G	A	A	G	T
E	1	-	-	C	C	GCCTTTTTC	C	AG	T	G	A	T	G	G	A	A	T	T
F	1	A	-	C	C	GCCTTTTTC	C	AG	T	G	A	T	G	G	A	A	T	T
G	5	A	-	C	T	-----GC	T	GA	C	G	A	T	G	G	A	A	G	T
H	2	A	-	C	T	-----GC	T	GA	C	G	A	G	G	G	A	A	G	C
I	8	-	-	C	T	-----GC	T	GA	C	G	A	G	G	G	A	A	G	C
J	45	-	-	C	T	-----GC	T	GA	C	G	A	T	G	G	A	A	G	T
K	11	-	-	T	T	-----GC	T	GA	C	A	A	G	G	G	A	G	G	C
L	1	-	-	C	C	GCCTTTTTC	C	AG	T	G	A	T	G	G	G	A	G	T
M	1	-	-	T	T	-----GC	T	GA	C	G	C	G	G	C	A	A	G	T
Position sur la séquence (bp)		42	61	86	92	97 à 103	107	118-119	122	138	172	208	209	286	303	333	351	409

. **Analyse statistique des populations bactériennes issues des nodosités.** Le résultat du test global de différenciation des populations sur les données de diversité du locus *nod* donne une valeur de probabilité de 0,51, ce qui nous permet d'accepter l'hypothèse nulle au risque α de 5 % et ainsi d'affirmer qu'il n'y a pas de différenciation significative des populations pour ce locus.

En revanche, la valeur de probabilité du test global obtenue pour les données du locus *exo* (p-value de 0,035) est en dessous du seuil statistique de 5 %. Nous avons donc décidé d'effectuer un test de différenciation par paires pour voir si la population d'une des parcelles a une influence forte sur cette valeur. Les résultats de ces 28 tests par paires (tableau VI.2.5) donnent les valeurs de probabilité correspondant aux différentes comparaisons.

Tableau VI.2.5 : Valeurs de probabilité des tests de différenciation génotypique par paires des populations bactériennes de *S.meliloti* au niveau du locus *exo*, associées aux différentes parcelles de l'Unité Expérimentale d'Époisses.

Locus <i>exo</i>	Parcelle4	Parcelle7	Parcelle10	Parcelle13	Parcelle19	Parcelle22	Parcelle25	Parcelle32
Parcelle4		0,27	0,33	0,46	0,77	0,53	0,81	0,91
Parcelle7			0,8	0,01	0,02	0,03	0,006	0,09
Parcelle10				0,05	0,14	0,16	0,02	0,08
Parcelle13					1	0,48	0,85	0,16
Parcelle19						1	1	0,51
Parcelle22							0,22	0,14
Parcelle25								0,44
Parcelle32								

Nous observons que seules cinq valeurs de probabilité ne permettent pas d'accepter l'hypothèse nulle, et parmi elles, quatre correspondent à la comparaison de populations avec celle de la parcelle n°7. Le nombre de comparaisons par paires étant de 28, la correction de Bonferroni est donc utilisable et permet de calculer un risque α' égal à α/n , d'où $\alpha'=0,0018$. Ceci permet alors d'accepter l'hypothèse nulle pour ce locus pour toutes les combinaisons au risque de 5 % : la répartition de la population de *S. meliloti* sur les parcelles d'après les données du locus *exo* ne semble donc pas significativement différente et que même s'il y a une différenciation, celle-ci reste faible.

. Comparaison des populations issues des nodosités et de la rhizosphère.

* Profils haplotypiques des bactéries issues des nodosités. Du fait du faible taux de polymorphisme obtenu sur le locus *nod*, la comparaison des populations rhizosphériques et des nodules a uniquement porté sur le locus *exo*. La migration des 13 différents fragments haplotypiques obtenue à partir du séquençage des nodules a permis de discriminer six profils de migration, et donc de distinguer six groupes (figure VI.2.3), puisque certains haplotypes migrent à un niveau similaire sur le gel.

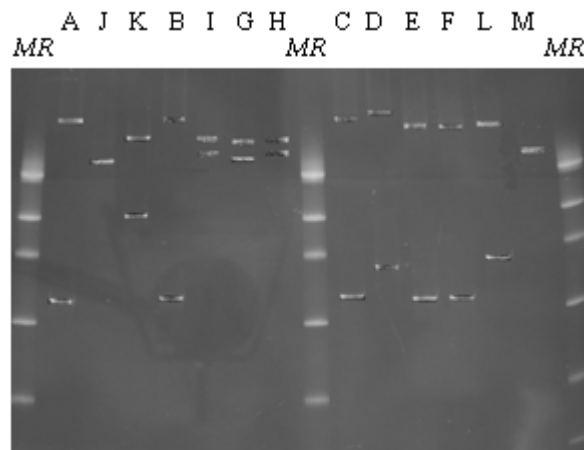


Figure VI.2.3 : Photographie d'un gel d'acrylamide à 0.775X en MDE2X, sur lequel ont migré les fragments simple-brins des haplotypes détectés sur l'intergène *exoP_thiD* (haplotypes A, J, K, B, I, G, H, C, D, E, F, L, M). *MR* représente les emplacements du marqueur de référence.

Le groupe 1 contient les haplotypes A, B, C, E, F; le groupe 2 est constitué des haplotypes J et G, le groupe 3 comporte les haplotypes I, H, M. Les haplotypes D, L, et K sont les seuls représentants de leur groupe et constituent respectivement les groupes 4, 5 et 6. Les différences de séquence entre les haplotypes sont schématisées dans le tableau VI.2.4.

Profil haplotypique de l'ADN rhizosphérique. L'amplification de l'intergène *exoP-thiD* de *S. meliloti* présent dans la rhizosphère a donné un résultat positif pour six échantillons. L'ADN de *S. meliloti* se trouvant dilué au sein de l'ADN rhizosphérique, les échantillons d'ADN de deux parcelles (n°1 et 7) n'ont pas pu être amplifiés. La migration des produits PCR issus de l'amplification de l'ADN rhizosphérique (parcelles n°2, 3, 4, 5, 6, 8 et 9) et de celle de 10 haplotypes issus des nodosités (A, J, K, B, I, G, H, C, L et M) sont représentées sur la figure VI.2.4. Sur la figure VI.2.4.a, pour l'ADN rhizosphérique, 4 bandes par échantillon peuvent être distinguées dans la partie haute du gel et chacune semble correspondre à un haplotype issu des bactéries des nodosités. La migration présentée sur la figure VI.2.4.b montre deux à trois bandes supplémentaires ayant un profil de migration tout à fait différent des haplotypes présents dans les nodosités.

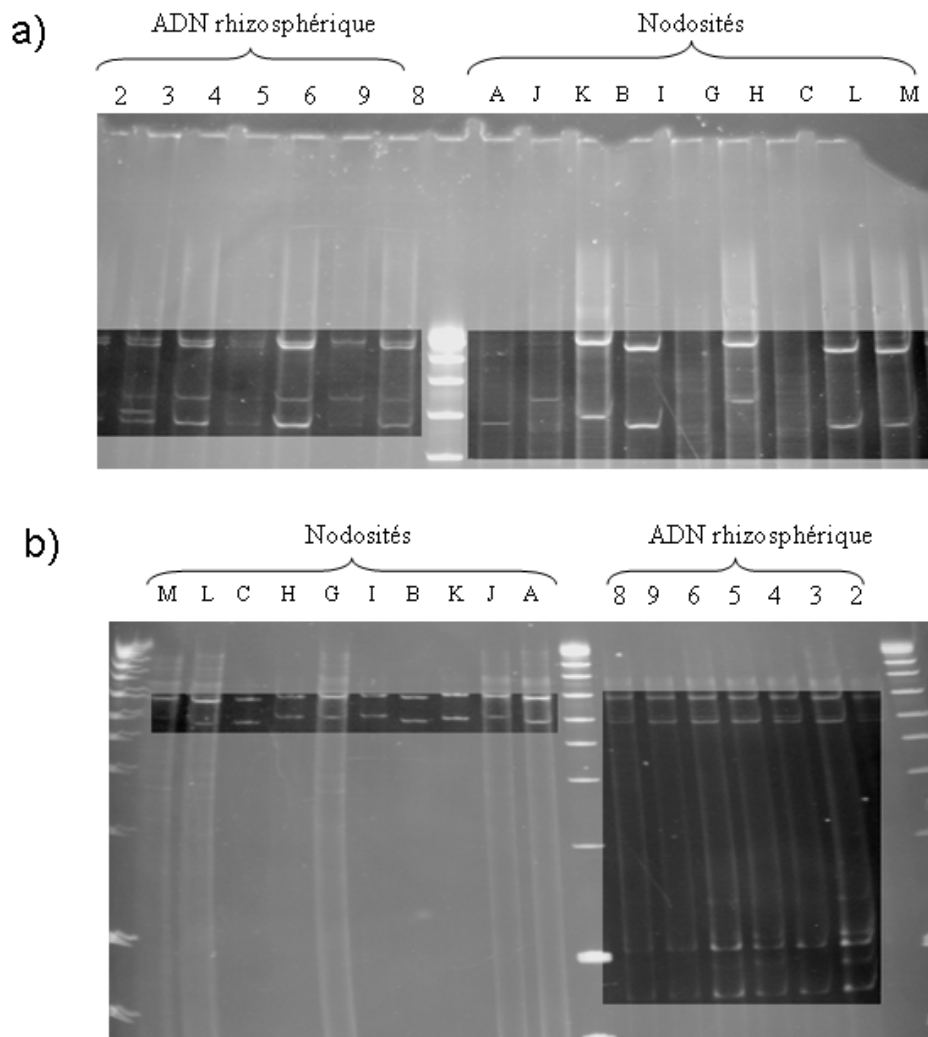


Figure VI.2.4: Comparaison des profils de migration des fragments intergéniques *exoP-thiD* pour les haplotypes issus des nodosités (M, L, C, H, G, I, B, K et A) avec les fragments issus de l'amplification de l'ADN rhizosphériques (parcelles 8, 9, 6, 5, 4, 3 et 2) de l'Unité Expérimentale d'Epoisses. a) zoom sur la partie haute du gel; b) sans zoom.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

. Analyse de diversité.

L'intergène *exoP-thiD* (494 bp) et l'intergène *nodE-nodG* (209 bp) sont respectivement à proximité de gènes codant pour des exopolysaccharides de surface et des gènes de nodulation. Les intergènes situés à proximité de gènes sous pression de sélection subirait aussi cette pression, par phénomène d'autostop génétique. Ainsi, les mutations engendrées, même ponctuelles, peuvent présenter une diversité suffisante pour la comparaison des haplotypes au sein des souches. Une étude précédente réalisée sur 7 intergènes de *S. meliloti* a révélé la diversité la plus élevée sur ces deux zones (Bailly *et al.*, 2006). C'est pourquoi nous avons choisi de travailler sur ces deux intergènes dans cette analyse. Le faible polymorphisme nucléotidique observé dans cette étude peut être expliqué par l'homogénéisation préalable du terrain grâce à une culture de maïs. En effet, celle-ci pourrait avoir induit une diminution de la diversité des *S. meliloti* du sol, comme cela a été démontré pour la population bactérienne *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* sous une monoculture de maïs (Depret *et al.*, 2004). Cependant, la diversité observée sur le locus *exo* s'est avérée plus importante que celle sur le locus *nod*, imposant le choix de ce locus pour la comparaison des populations de *S. meliloti* présentes dans les nodosités à celle présente dans la rhizosphère de la plante.

Du fait des résultats statistiques obtenus (après application de la correction mathématique), nous pouvons considérer que les populations de *S. meliloti* issues des nodosités ne sont pas significativement différentes entre les parcelles étudiées pour les loci *exo* et *nod*. Cependant, il est apparu qu'une des parcelles présente une diversité particulière au niveau du locus *exo*, par la présence importante d'un haplotype bactérien particulier. On pourrait donc supposer qu'au sein de cette parcelle, il y ait eu un apport de terre extérieure, dans lequel aurait pu se trouver un haplotype de *S. meliloti* différent de ceux présents sur le terrain. Cet haplotype importé se serait bien adapté et aurait été compétitif par rapport aux autres. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de comparer la diversité génétique de ces isolats particuliers à celle des autres isolats, sur un autre locus d'intérêt polymorphe.

. SSCP : limites de la technique.

La totalité des haplotypes *exo* détectés par séquençage ne sont pas discriminables sur gel d'acrylamide. Particulièrement, les mutations ponctuelles situées à proximité des extrémités du fragment génique ne permettent pas aux fragments d'être discriminés les uns par rapport aux autres, alors que les substitutions ou insertion-délétion situées à un niveau plus central de la séquence

permettent la discrimination des séquences entre elles. Du fait de la non-discrimination de l'ensemble des haplotypes par cette technique, celle-ci ne nous apparaît donc pas « idéale » pour cette étude, puisque un niveau fin de diversité est primordial.

Il est possible de procéder à la digestion enzymatique d'un des deux brins d'ADN avant migration (Schwieger, Tebbe, 1998; Schwieger, Tebbe, 2000), mais, dans cette étude, les deux brins sont parfois nécessaires à la discrimination de profils.

. Premiers résultats : possibilité d'haplotypes absents des nodosités et présents dans le compartiment rhizosphérique.

La comparaison des deux populations est à ce stade encore incomplète, mais une première interprétation est possible. La majorité des haplotypes issus de la rhizosphère présenterait un profil de migration identique aux haplotypes issus des nodosités. Cependant certains fragments ayant une migration tout à fait différente de celles des haplotypes issus des nodosités ont été détectés dans la population rhizosphérique. Ces fragments pourraient être des séquences d'ADN *exoP-thiD* de *S. meliloti* dont la séquence présenterait des mutations très différentes de celles trouvées au sein des nodosités. Dans ce cas, il est possible qu'il s'agisse d'haplotypes de *S. meliloti* qui ne colonisent pas les nodosités. Néanmoins, ces fragments pourraient aussi représenter des fragments d'ADN renaturés. L'hypothèse d'une amplification de l'intergène *exoP-thiD* chez une autre espèce bactérienne semble peu probable, puisque la spécificité des amorces a été étudiée en comparaison avec la majorité des espèces proches phylogénétiquement de *S. meliloti*. Afin de vérifier ces différentes hypothèses, chaque bande présente dans les profils rhizosphériques devrait être découpée, purifiée, clonée puis séquencée.

3- Perspectives

a- Nouvelle approche expérimentale

L'impossibilité de réobtenir un profil de migration après maints essais et contrôles nous a conduit à choisir une autre approche pour finaliser cette étude. Notre choix s'est porté sur le clonage-séquençage. Nous avons choisi de séquencer 20 clones par population rhizosphérique (par parcelle). Ce travail est prévu pour Novembre 2008. Trois hypothèses peuvent être émises concernant la comparaison de la population de *S. meliloti* présente au niveau des nodosités et de celle présente au niveau du sol rhizosphérique : soit les populations sont qualitativement et quantitativement identiques, soit les populations bactériennes sont identiques qualitativement mais différentes quantitativement, soit les populations sont différentes qualitativement.

b- Influence des rotations de culture sur la diversité des bactéries symbiotiques

Le projet Micagro a pour objectif la comparaison des populations de *Sinorhizobium spp.* sous des conditions de monoculture de luzerne et de culture de blé, colza et luzerne en rotation. Ces cultures sont étudiées sur trois ans. Le typage bactérien des *S. meliloti* présents dans les parcelles de luzerne en première étude a été présenté dans le chapitre VI. Afin de comparer l'impact de la monoculture et de la culture en rotation de luzerne sur la population bactérienne colonisant les nodosités de luzerne et de voir l'évolution de ces populations bactériennes, le typage bactérien en années 2 et 3 reste à être effectué.

Cependant, les nodosités des plants de monoculture de luzerne n'ont pu être récoltées en deuxième année alors que les plantes possédaient une bonne valeur sélective. On suppose que les nodosités étaient situées trop en profondeur lors de la deuxième année de culture, puisqu'il s'agit d'une plante pérenne. Afin de pouvoir tout de même analyser la diversité bactérienne au sein des nodosités, il pourrait être possible de réaliser des piégeages bactériens, dont le principe est de mettre en culture *in vitro* des plants de luzerne en présence d'échantillons de sols. Puisque Silva *et al.* (Silva *et al.*, 2007) ont montré que les populations de *S. meliloti* issues des nodosités sont identiques entre l'isolement direct après culture des plantes en champ ou après piégeage bactérien à partir du même sol. Ainsi, le piégeage bactérien pourrait être réalisé dans chaque parcelle et pour chaque année et les comparaisons des populations en fonction des différents traitements cultureux pourraient alors être possibles.

CHAPITRE VII:

**EVOLUTION EXPERIMENTALE DE
*SINORHIZOBIUM MEDICAE***

VII- Evolution expérimentale de *Sinorhizobium medicae*

1- Introduction

Plusieurs études d'évolution expérimentale de bactéries ont été réalisées afin de comprendre les fréquences, mécanismes et impacts des mutations sur les génomes bactériens et sur leur valeur sélective. En effet, les microorganismes (bactéries, virus) sont des modèles de choix pour réaliser des études d'évolution expérimentales, puisqu'ils se reproduisent rapidement (permettant un grand nombre de générations), ils se comptent facilement, ils atteignent des tailles de population importantes dans peu d'espace, ils peuvent être stockés dans un état donné puis réanimés plus tard (permettant la comparaison du type ancestral aux types évolués), ils se reproduisent souvent de façon asexuée résultant dans la clonalité (permettant la précision de la réplication expérimentale), leur environnement (comme leurs ressources de croissance) est facilement modifiable, leur caractérisation génétique est relativement aisée et de plus en plus de données moléculaires et génétiques sont disponibles pour de nombreux microorganismes.

La meilleure mesure pour juger de l'importance relative d'une mutation ou d'un fragment génique acquis par transfert horizontal est son effet sur la valeur sélective elle-même (capacité à produire des descendants viables) ou sur des composants reliés à la valeur sélective. Chez une plante, la production de graines, la germination, la survie ou la biomasse aérienne sont des mesures souvent adaptées (Howe, Brunner, 2005). Chez une bactérie, l'impact d'une mutation ou d'évènements de recombinaison peut être évalué en comparant sa capacité de croissance et/ou sa vitesse de croissance (sur différentes sources) par rapport à la souche non mutée (Cooper *et al.*, 2001; Trivisano, 1997; Trivisano, Lenski, 1996).

Cette méthode de comparaison de souches ayant acquis ou non une/des mutation(s) est schématisée dans la figure VII.1.1 (Elena, Lenski, 2003), dans le cas de la comparaison d'une souche ancestrale et d'une souche évoluée.

Du point de vue de la dynamique de l'adaptation, les bactéries devraient avoir le temps de s'adapter entre chaque nouvelle mutation, puisque les mutations sont rares. Or, il a été montré que les gains de valeur sélective sont rapides initialement mais tendent à être moins fréquents au cours du temps (figure VII.1.2).

The fitness of an evolved type is generally expressed relative to its ancestor. Relative fitness is measured by allowing the ancestral and evolved types to compete with one another. Unless otherwise specified, the competition environment is the same as that used for the experimental evolution. The following description presents the protocol used in the long-term serial-transfer experiment with *Escherichia coli*^{12,25,26}, but similar procedures are used in experiments with many microorganisms.

The two competitors are grown separately in the competition environment to ensure that they are comparably acclimated to the test conditions. They are then mixed (usually at a 1:1 ratio) and diluted (100-fold in this case) in the competition environment. Initial densities at timepoint $t = 0$ are estimated by diluting and spreading the cells on an indicator agar that distinguishes the evolved and ancestral types by colony colour, which differs owing to an engineered marker that is selectively neutral. In this case, red and white colonies correspond to Ara^- and Ara^+ phenotypes, respectively. After one day ($t = 1$) (corresponding to the serial-transfer cycle in the evolution experiment), final densities are estimated by plating cells, as before, on the indicator agar. The growth rate of each competitor is calculated as the natural logarithm of the ratio of its final density to its initial density (adjusted for dilution during plating). Relative fitness is then defined simply as the ratio of the realized growth rates of the evolved and ancestral types.

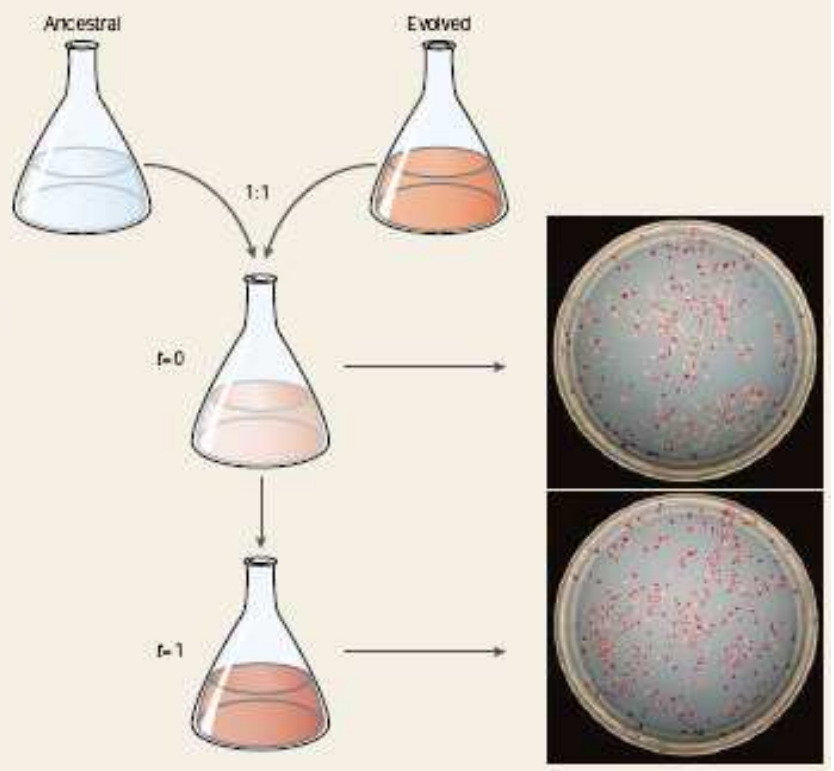


Figure VII.1.1 : La mesure de la fitness bactérienne.

Issu de Elena et Lenski (2003).

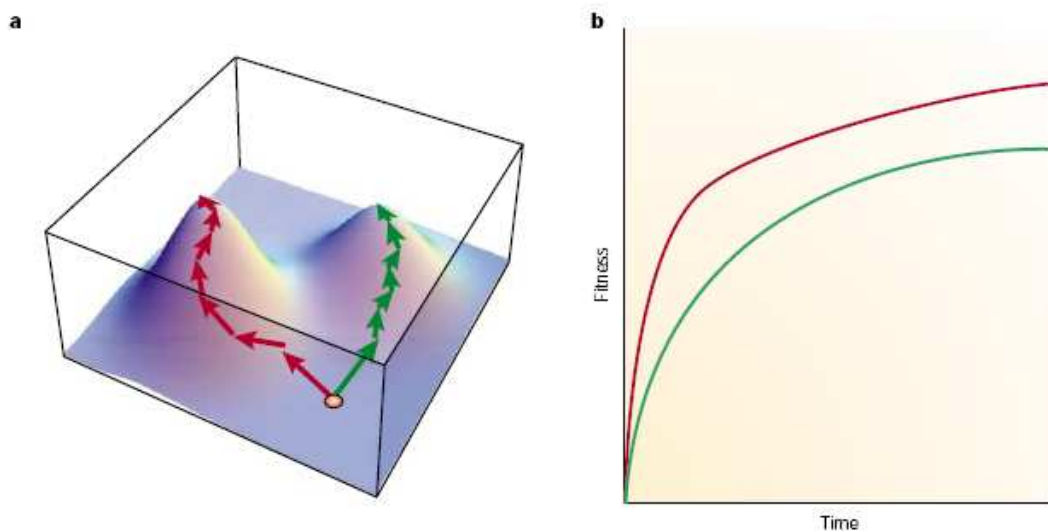


Figure VII.1.2 : Le paysage adaptatif et ses dynamiques évolutives. a/ Un paysage adaptatif hypothétique avec deux pics adaptatifs (hautes valeurs sélectives). Les flèches vertes et rouges montrent deux trajectoires possibles pour des populations issues du même génotype ancestral et qui ont évolué indépendamment dans l'environnement. b/ Les mutations bénéfiques tendent à avoir des effets plus importants au début de l'expérience, quand une population est loin de son pic adaptatif, plutôt que plus tard lorsqu'elle se rapproche de son pic adaptatif. Deux populations peuvent atteindre différents niveaux de valeur sélective, si elles évoluent dans des pics d'adaptation de hauteur inégale.

Issu de Elena et Lenski (2003).

2- Manuscrit 6 (en préparation)

EVOLUTION EXPERIMENTALE D'UNE SOUCHE SYMBIOTIQUE SOUS PRESSION DE SÉLECTION DE LA PLANTE-HÔTE

INTRODUCTION

Le génotype végétal d'une légumineuse influence la diversité génétique de sa population bactérienne symbiotique associée, à la fois au niveau de l'espèce végétale (Jebara *et al.*, 2001; Thurman, Bromfield, 1988) ou même au niveau de la lignée végétale (Rangin *et al.*, 2008; Thurman, Bromfield, 1988). L'existence d'une sélection des souches présentes dans les nodosités à partir de la communauté bactérienne rhizosphérique a été largement vérifiée par la description de mécanismes moléculaires de spécificité, composés de la reconnaissance des flavonoïdes de la plante par la bactérie, de la reconnaissance des facteurs Nod de la bactérie par la plante ou encore des polysaccharides de surface (EPS, KPS et LPS) et des systèmes de sécrétion bactériens. Cependant, l'hypothèse d'une évolution des bactéries, au sein même de la niche écologique « nodosité », sous l'influence de pressions de sélection exercée par la plante ne semble pas aberrante. En effet, dans un système symbiotique, il est probable que le mutualisme entre les deux partenaires mène à un phénomène de coévolution, qui correspond à des changements évolutifs réciproques, sous l'influence de l'autre partenaire. Ainsi, la spécialisation actuelle des rhizobia pour certaines espèces de légumineuses résulte sans doute d'une telle coévolution entre les deux organismes.

Dans la symbiose *Medicago sp.* – *Sinorhizobium sp.*, l'espèce *S. medicae* a la capacité de former des nodules fixateurs notamment sur les deux espèces *M. truncatula* et *M. polymorpha*. Ces deux espèces diffèrent cependant sur leur spectre symbiotique : *M. truncatula* peut s'associer efficacement avec une autre espèce bactérienne, *S. meliloti* alors que *M. polymorpha* possède exclusivement *S. medicae* comme symbiote efficient. De ce fait, *M. polymorpha* et *M. truncatula* peuvent être considérées respectivement plantes-hôtes spécialiste et généraliste. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'influence du comportement spécialiste ou généraliste de la plante-hôte sur l'évolution du symbiote bactérien associé.

Dans ce but, une expérience d'évolution expérimentale bactérienne a été réalisée, en utilisant la nature du couvert végétal comme pression de sélection. Les deux conditions de couvert végétal choisies ont été d'une part une plante spécialiste et d'autre part un mélange de plante spécialiste et généraliste pour la souche bactérienne considérée, afin de permettre à la souche bactérienne d'évoluer sous les deux conditions. Du fait de la rapidité d'adaptation présumée (Elena, Lenski, 2003), nous avons choisi

de mener cette expérience d'évolution expérimentale sur un faible nombre de génération. Les deux objectifs de cette étude étaient i) de tester l'effet de la présence d'une plante sur l'évolution de sa bactérie associée, ii) d'évaluer si une bactérie symbiotique évolue plus rapidement lorsqu'elle est en contact avec une plante spécialiste qu'avec un mélange de plantes spécialiste et généraliste. L'hypothèse sous-jacente de ce dernier point était qu'en présence d'une combinaison de deux plantes hôtes, donc en ayant un choix, la pression de sélection appliquée sur la bactérie sera moindre qu'en présence d'une seule plante-hôte.

MATERIEL ET METHODES

Souche bactérienne. La souche bactérienne *S. medicae* WSM 419 (isolée de *Medicago murex* et originaire de Sardaigne) a été utilisée comme inoculum initial, appelée donc « souche ancestrale ». Cette souche a été choisie parce qu'elle a été séquencée, permettant alors l'accès complet à son information génétique (Reeve *et al.*, en préparation). Cette souche est composée d'un chromosome (3,78 Mb) et de 3 mégaplasmides de tailles respectives 1,57, 1,24 et 0,22 Mb. Le temps de générations de *S. medicae* est entre 3 et 5 h en culture *in vitro* (Rome *et al.*, 1996).

Cycles d'inoculation. La souche ancestrale a été inoculée d'une part à plusieurs lots de plantes *M. polymorpha* et d'autre part à plusieurs lots de plantes en mélange, composé de *M. polymorpha* et *M. truncatula* Jemalong A17. Six cycles d'inoculation ont été réalisés. Ces cycles sont composés de trois phases successives : croissance des plantes; collecte, stérilisation et broyage du système racinaire incluant les nodosités puis inoculation du broyat à de nouvelles germinations végétales. Cinq lots de plantes ont été utilisés pour chacune des 2 conditions, chaque lot étant composé de deux plants de *M. polymorpha* ou de deux plants de *M. polymorpha* et de deux plants de *M. truncatula*. Après stérilisation des graines, la croissance de chaque lot de plante a eu lieu en pot magenta individuel (de 0,5l de volume), en milieu perlite-vermiculite et 50 ml d'eau stérile furent ajoutés hebdomadairement à chaque pot. Après 50 jours de croissance, le broyat issu de chaque lot de plantes a été inoculé sur un seul nouveau lot de plantes. Après les cinq cycles d'inoculations, le broyat issu de chaque lot de plantes a été inoculé sur cinq germinations de *M. polymorpha*. Pour ce 7^e cycle de croissance, chaque plante a été disposée en tube individuel contenant un mélange de gélose nutritive inclinée et de la solution liquide nutritive (Rangin *et al.*, 2008). Parallèlement, cinq plantes ont été inoculées avec la souche ancestrale avec 1,5 ml d'inoculum (ajusté à $5 \cdot 10^6$ cellules.ml⁻¹) dans les mêmes conditions expérimentales. La méthodologie appliquée est schématisée en figure VII.2.1.

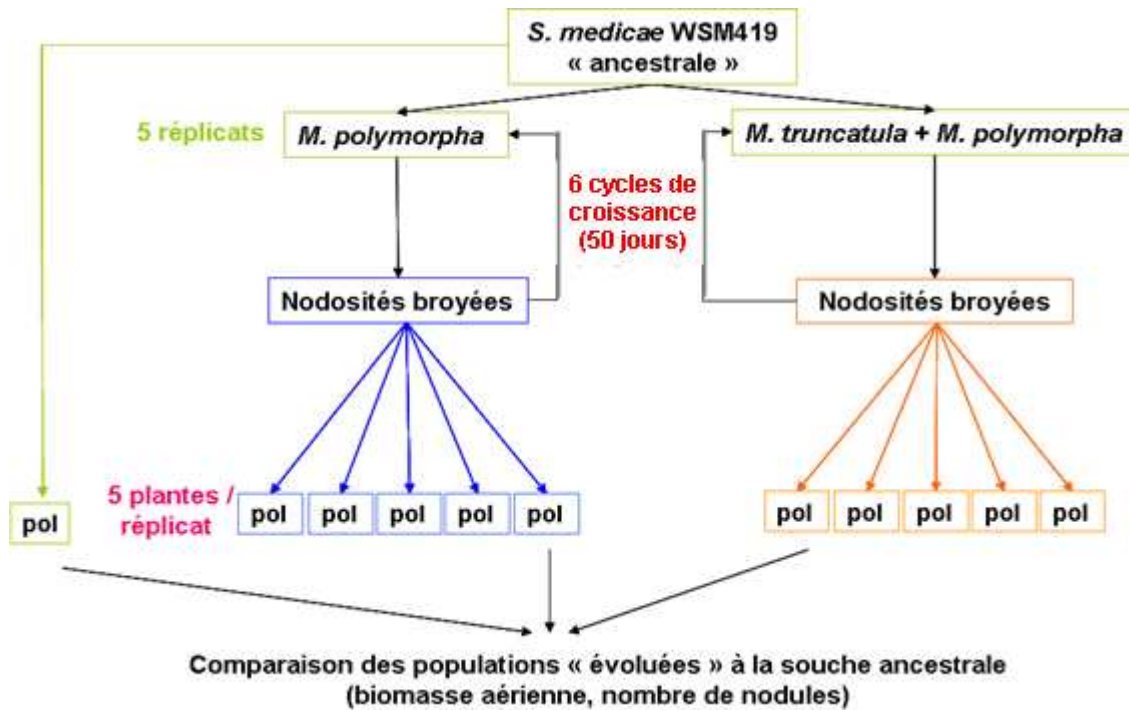


Figure VII.2.1 : Présentation du schéma expérimental. (pol= *M. polymorpha*)

Sélection de souches potentiellement évoluées. La biomasse aérienne sèche et le nombre de nodosités de chacune des 5 plantes composant les 10 lots de plantes au cours de l'étape finale ont été mesurés. Ces deux mesures représentent respectivement l'efficacité de fixation et la capacité de nodulation des différents lots de souches bactériennes potentiellement évoluées et de la souche ancestrale non évoluée. Les valeurs obtenues ont été comparées par tests-t de Student (seuil de α de 5 %) au lot de plantes inoculé avec la souche dite ancestrale à l'aide du logiciel Statistica 6. Pour les lots de plantes présentant une biomasse aérienne significativement différente du lot inoculé avec la souche ancestrale, les nodosités ont été stérilisées et une bactérie a été isolée à partir de chaque nodosité.

Détection de l'évolution symbiotique des souches bactériennes. Chacune des 71 souches ainsi obtenues a été inoculée sur 14 plantes de *M. polymorpha* en tube individuel, comme décrit précédemment. L'inoculation des souches a cependant été réalisée à l'aide d'un inoculum contenant plus de 10^8 bactéries. Après 7 semaines de croissance, les biomasses aériennes sèches et le nombre de nodosités ont été mesurés et comparés aux valeurs obtenues avec la souche ancestrale. Les souches ayant induit un taux de fixation d'azote par plante significativement différent de celui atteint avec la souche ancestrale ont été considérées comme « bactéries évoluées ». Une seule souche a été choisie par lot de plante et par catégorie de phénotype (inférieure, égale ou supérieure à biomasse induite par la souche ancestrale), en choisissant la souche présentant la valeur la plus extrême par rapport à

l'ancestrale pour les catégories inférieures ou supérieures à l'ancestrale et la souche présentant la valeur la plus proche de l'ancestrale pour les catégories égales à l'ancestrale. Le phénotype de fixation d'azote par plante fut également remesuré pour vérification sur 10 plantes, en inoculant $7,5 \cdot 10^6$ bactéries par plante.

Mesure de l'évolution génétique des bactéries. Après analyse in silico (<http://insilico.ehu.es>) (Bikandi *et al.*, 2004), des analyses AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ont été réalisées selon le protocole de Mueller *et al.* (1996) avec modifications (Miché *et al.*, en préparation). L'enzyme *PstI* et les adaptateurs contenant des extensions –AC à l'extrémité 3' ont été utilisés. Le séquençage des fragments intergéniques *nodE-nodG* et *exoP-thiD* (Rangin *et al.*, 2008) ont aussi été réalisées afin de vérifier la proximité génétique des souches évoluées à la souche ancestrale, reflet d'une absence de contamination lors des étapes précédentes. Deux souches de *S. medicae* extérieures à l'étude (STM 3237 et STM 3124) ont été ajoutées comme points de comparaison.

Tests physiologiques. L'utilisation de différentes sources de carbone et d'énergie des souches de *S. medicae* a été testée sur GN2 Microplate™ (Gram Negative Identification Test Panel) (Biolog, Hayward, California, USA) contenant 95 sources de carbone dont des sucres, des acides aminés et des acides organiques. Les cellules bactériennes ont poussé une nuit à 28°C sur milieu YM, et lavées deux fois dans de l'eau stérile. Le culot a été dilué dans de l'eau stérile à une DO_{600} de 0,1 (approximativement 10^8 cellules.ml⁻¹), et 150 µl de la suspension ont été ajoutés à chaque puit de la microplaque Biolog. Les cellules ont été incubées à 27°C pendant 48 h et les résultats ont été obtenus par lecture de la densité optique avec le lecteur de microplaque Magellan Infinite M200 (Tecan, France). Ce test est fréquemment utilisé pour comparer la physiologie de souches ancestrales et évoluées (Venail *et al.*, 2008).

RESULTATS

Cycles d'inoculation. Après six cycles d'inoculation, trois lots de plantes ont présentés une valeur de biomasse aérienne sèche différente du lot inoculé avec la souche ancestrale (figure VII.2.2). Ces trois lots comptabilisaient au total 71 nodosités. Sur les plantes de plusieurs lots, aucun nodule formé n'a pu être observé lors du 6^e cycle d'inoculation-récolte-réinoculation.

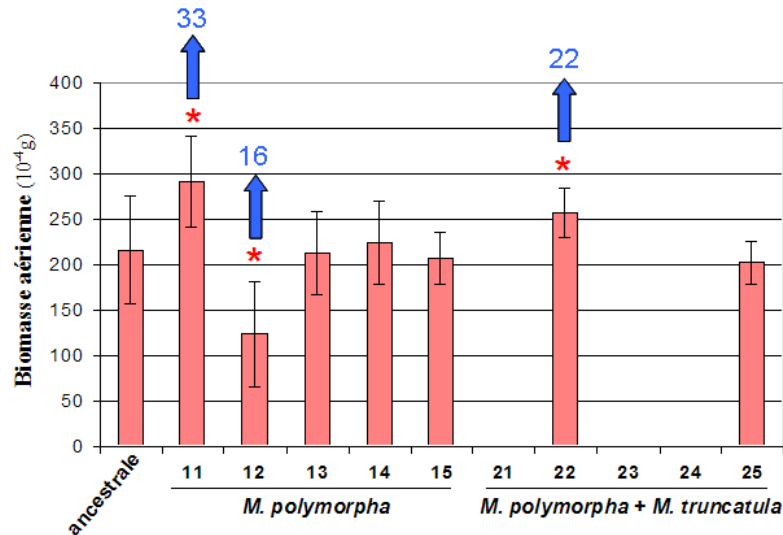


Figure VII.2.2 : Biomasse aérienne des différents lots de plantes de *M. polymorpha* issus des six cycles d'inoculation. Les trois conditions expérimentales sont indiquées sur l'axe des abscisses, avec l'inoculation de la souche ancestrale, les cinq lots de plantes de *M. polymorpha* et du mélange *M. polymorpha* et *M. truncatula* issus des cycles d'inoculation-récolte-réinoculation. L'absence d'histogrammes pour les lots 21, 23 et 24 est due à l'abortion précoce de la nodulation lors du 6^e cycle de réinoculation. Les étoiles indiquent les lots de plantes présentant une biomasse aérienne significativement différentes du lot inoculé avec la souche ancestrale. Les nombres 33, 16 et 22 représentés au-dessus des histogrammes représentent le nombre de nodosités présentes et récoltées sur *M. polymorpha* lors du dernier cycle de réinoculation.

Sélection de souches potentiellement évoluées. Les analyses de biomasse aérienne ont permis de mettre en évidence plusieurs catégories de souches (inférieure, égale ou supérieure à la souche ancestrale) pour chaque lot (figure VII.2.3). Au total, 32 souches et 1 souche ont respectivement induit une diminution et une augmentation de biomasse aérienne des plantes par rapport à la souche ancestrale, les 38 autres souches n'induisant pas de différences. Les données obtenues pour le nombre de nodosités ne sont pas présentées. Aucune corrélation n'a été observée entre la biomasse aérienne et le nombre de nodosités.

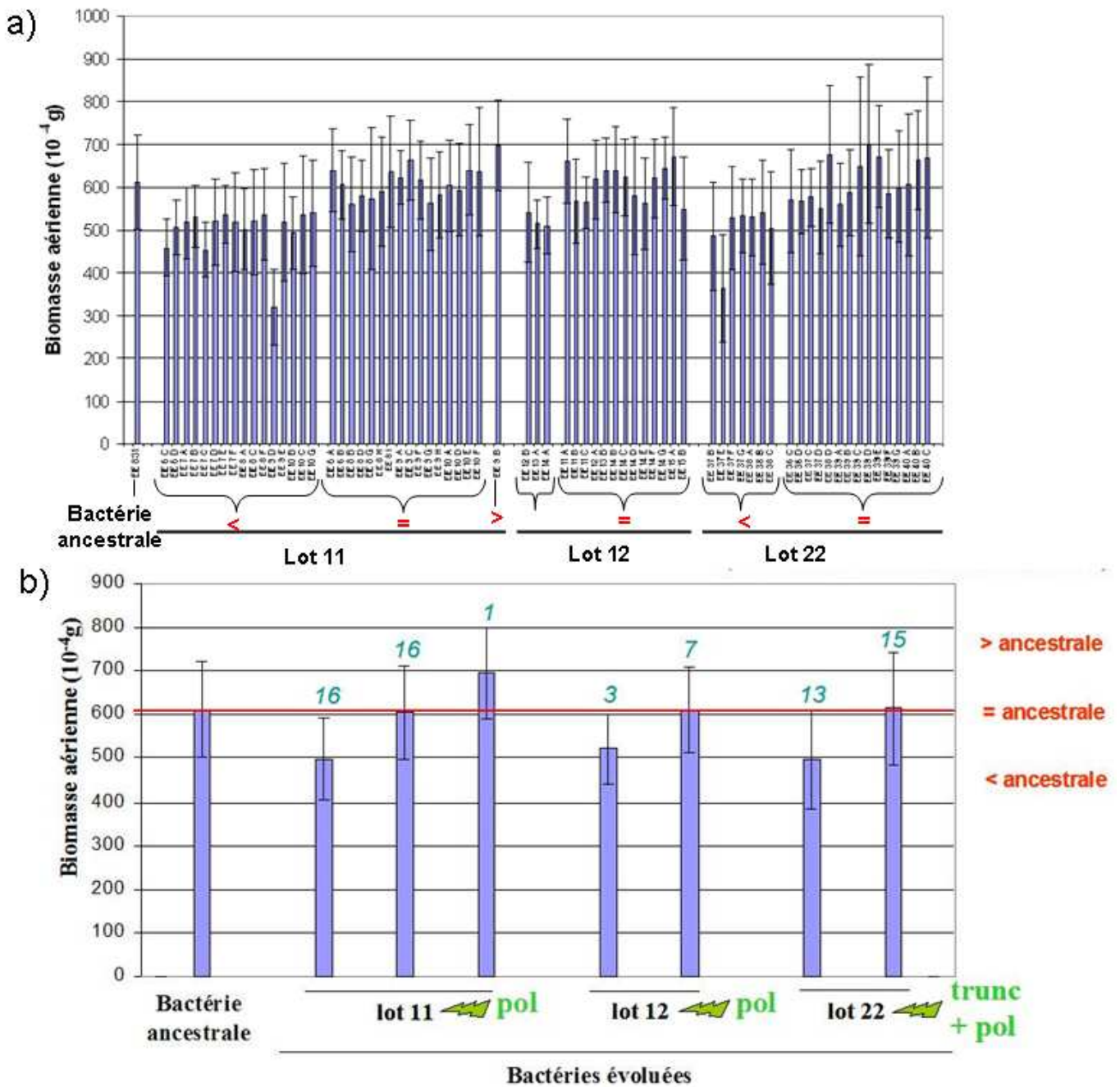


Figure VII.2.3 : Biomasse aérienne des différents lots de plantes de *M. polymorpha* inoculés avec la souche ancestrale ou avec chacune des bactéries potentiellement évoluées. a) Représentation pour chacune des 72 souches. b) Valeurs moyennes obtenues pour chaque catégorie (inférieure, égale ou supérieure à la souche ancestrale) au sein de chaque lot. Les nombres indiqués en bleu indiquent le nombre de bactéries évoluées pour chaque histogramme. Les flèches vertes indiquent le couvert végétal utilisé pendant les cycles d'inoculation (pol= *M. polymorpha* ; trunc + pol = *M. tuncatula* + *M. polymorpha*).

Vérification du phénotype d'efficacité symbiotique des souches sélectionnées. Pour chaque catégorie de chaque lot, la souche la plus extrême a été choisie pour les expérimentations suivantes. La comparaison des résultats des deux séries de tests d'inoculation est présentée en figure VII.2.4.

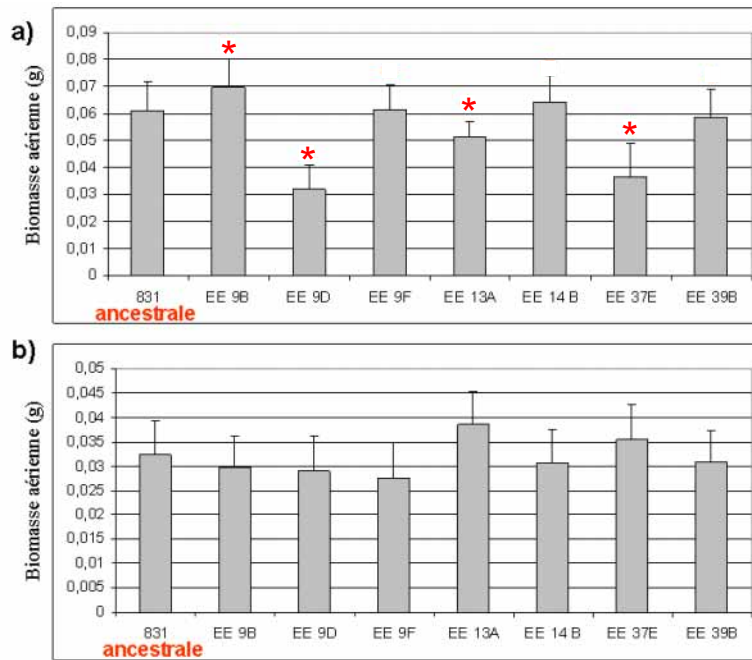


Figure VII.2.4 : Biomasse aérienne des plantes de *M. polymorpha* inoculées avec la souche ancestrale ou avec plusieurs bactéries potentiellement évoluées. Pour la nomenclature utilisée, EE correspond à la manipulation ‘Evolution Expérimentale’, les chiffres correspondent à la plante dont sont issues les souches et les lettres A à F correspondent au nodule isolé. De plus, EE 9 (B, D et F) sont les représentants des trois catégories du lot de plantes n° 11, EE 13A et EE 14B ceux des deux catégories du lot 12, et EE 37E et EE 39B ceux des deux catégories du lot 22. Les biomasses aériennes ont été obtenues en inoculant chaque plantule avec a) plus de 10^8 bactéries par plante ou b) $7,5 \cdot 10^6$ bactéries par plante. Les différences significatives de biomasse entre les plantes inoculées avec les bactéries potentiellement évoluées et celles inoculées avec la souche ancestrale sont indiquées par une étoile ($p < 0,05$).

Evaluation de l’évolution génétique des souches potentiellement évoluées. Aucune différence nucléotidique sur les deux intergènes testés ou une différence d’empreinte moléculaire sur génome total (AFLP) (figure VII.2.5) entre la souche ancestrale et les souches potentiellement évoluées n’ont été détectées.

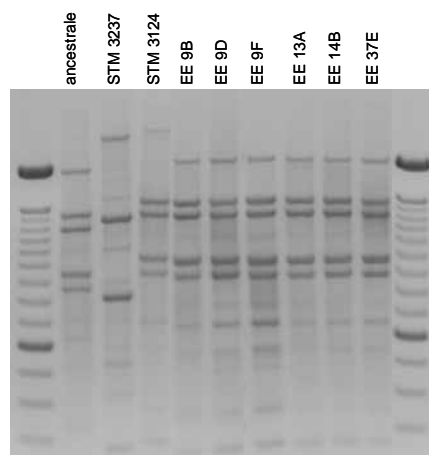


Figure VII.2.5 : Comparaison du profil AFLP des différentes souches « évoluées » de l’étude à la souche ancestrale et à deux autres souches de *S. medicae*. Le marqueur de taille *Invitrogen* 100 bp a été utilisé.

Tests physiologiques. Les mesures de croissance en plaque Biolog GN2 (figure VII.2.6) n'ont pas révélé de différences majeures entre la souche ancestrale et les souches potentiellement évoluées. Seule la croissance des différentes souches sur 2,3-butanédiol diffère, bien que cela nécessite d'être confirmé.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
F	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
G	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
H	+	-	-	-	-	-	-	v	+	-	-	-

Figure VII.2.6 : Schématisation de la croissance de la souche ancestrale en plaque Biolog GN2. (+ : croissance ; - : absence de croissance ; v : variable selon les souches).

DISCUSSION

Cette étude d'évolution expérimentale de souches symbiotiques sous influence de la plante-hôte a été effectuée à l'aide de 6 cycles d'inoculation-récolte-réinoculation. La caractérisation de plusieurs souches obtenues en fin de manipulation par AFLP et séquençage de deux intergènes, méthode ayant par ailleurs montré de la variabilité génétique en population naturelle (Bailly *et al.*, 2006), démontre ici l'absence de contamination au cours de cette expérience. Les résultats que nous obtenons sont ambigus, avec notamment une première série de tests suggérant des différences significatives entre les bactéries ayant subi le processus expérimental, alors qu'une seconde série de tests ne permet pas de réobtenir ces résultats.

. Concentrations d'inoculum.

Les travaux antérieurs de Revellin *et al.* (2000) obtenus sur le couple soja-*Bradyrhizobium* avaient montré qu'au-dessus de $5,5 \cdot 10^3$ bactéries ml^{-1} d'inoculum, la biomasse aérienne des plantes restait constante au stade remplissage des graines, même si une diminution (mais non significative) de celle-ci apparaissait à partir de $5,5 \cdot 10^7$ bactéries. ml^{-1} . Ces résultats suggèrent l'hypothèse qu'une concentration importante de bactéries pourrait engendrer une augmentation de la rhizodéposition par la plante, ce qui l'affaiblirait par rapport à une plante poussant en présence d'un inoculum bactérien moins concentré.

D'une façon assez surprenante, il semble que chez le couple *Medicago polymorpha* – *Sinorhizobium medicae*, des variations dans la concentration de l'inoculum puisse révéler des différences entre les différentes souches ayant évolué au contact des plantes. En effet, il semble que les bactéries ayant subi une phase d'évolution dans notre système expérimental ne répondent pas de la même façon lorsqu'elles sont inoculées à différentes concentrations avec *M. polymorpha*. Nous observons un effet souche à 10^8 bactéries par inoculum alors que cet effet ne se retrouve pas à $7,5 \cdot 10^6$ bactéries. Il apparaît donc que la concentration bactérienne de l'inoculum influencerait la nodulation (données non montrées) et la fixation d'azote (figure VII.2.4) dans le couple *M. polymorpha* - *S. medicae*.

Si l'hypothèse d'une augmentation de rhizodéposition en présence d'une forte concentration bactérienne est correcte, nous pouvons supposer que l'évolution des bactéries au contact des plantes s'est traduite par une modification de la perception de ces bactéries par ces mêmes plantes. L'évolution bactérienne n'aurait donc pas eu d'effet sur la nodulation et la fixation d'azote proprement dite, mais sur des relations de perceptions entre les deux partenaires. Ce résultat d'une réponse à forte concentration est alors relativement surprenant dans la mesure où les cycles de réinoculations successifs s'effectuant à partir de broyats de système racinaire, les concentrations de ces inocula ne devaient pas être excessivement élevés.

Une analyse plus approfondie de l'effet de la concentration de l'inoculum de *S. medicae* sur l'efficacité de nodulation et de fixation sur *M. polymorpha* serait cependant nécessaire pour le confirmer. Sur la base d'une telle hypothèse, il est possible que l'effet observé en condition d'inoculum concentré ne soit plus visible ou détectable par nos approches en conditions d'inoculum moins concentré. D'autres mesures seraient éventuellement mieux adaptées pour détecter de fines variations, comme le dosage de la teneur d'azote dans les parties aériennes, la mesure de fixation d'azote des souches par la technique d'azote ^{15}N ou le dénombrement de descendants végétaux (nombre de graines germant).

. Evolution potentielle de la souche ancestrale.

Plusieurs études ont démontré l'existence d'un polymorphisme de fixation chez les souches de *S. medicae*, que cela soit en interaction avec *M. truncatula* (Garau *et al.*, 2005; Heath, Tiffin, 2007; Rangin *et al.*, 2008; Rome *et al.*, 1996) ou avec *M. polymorpha* (Garau *et al.*, 2005; Rome *et al.*, 1996; Van Berkum *et al.*, 2006). D'après Garau *et al.* (2005), WSM419 induirait une biomasse aérienne intermédiaire et peu de nodules en interaction avec *M. polymorpha* par rapport aux 14 autres souches

de *S. medicae* testées. Par contre, elle semblerait être une souche très efficace sur *M. truncatula* (Terpolilli *et al.*, 2008). Ces différents résultats supposeraient donc que la souche ancestrale WSM419 soit bien adaptée à *M. truncatula* et qu'elle possède, en association avec *M. polymorpha*, un potentiel adaptatif d'évolution vers une meilleure association symbiotique. L'absence de modification des niveaux de fixation, en concentration basse, suggère qu'une amélioration de l'association passe par des modifications complexes n'étant pas intervenues dans cette expérience. Nous ne pouvons que révéler des mutations ayant entraîné une décroissance de l'efficacité de l'association. Ici, 45% des souches testées ont présenté ce phénotype, au moins pour un certain niveau d'inoculum bactérien.

Par ailleurs, la symbiose entre les deux partenaires n'étant pas obligatoire, les souches bactériennes ont pu évoluer de manière autonome (« égoïste ») en améliorant leur propre valeur sélective sans modifier leur capacité symbiotique (de nodulation ou de fixation), notamment en modifiant leur capacité de survie dans la rhizosphère des plantes-hôtes. La mesure même de la valeur sélective des bactéries serait alors la plus appropriée. Une estimation du nombre de bactéries viables survivant dans le sol après un cycle de culture serait informative sur ce point.

. Sélection expérimentale et sanction.

La sanction par la plante-hôte des génotypes bactériens les moins fixateurs a été décrite chez d'autres couples symbiotiques (Denison, 2000; Kiers *et al.*, 2003). Si une telle sanction existe effectivement dans la symbiose entre *S. medicae* et *M. truncatula* ou *M. polymorpha*, les génotypes bactériens potentiellement évolués « négativement » (induisant une diminution de la biomasse aérienne des plantes) dans cette étude, pourraient avoir été contre-sélectionnés par les plantes-hôtes, ne permettant donc pas leur détection dans les nodosités. De plus, la majorité des mutations génétiques étant neutres ou délétères (Imhof, Schlotterer, 2001), les souches bactériennes potentiellement évoluées « négativement » devraient être plus fréquentes que celles potentiellement évoluées « positivement ». La combinaison de ces deux facteurs permettrait d'expliquer l'absence de détection de souches bactériennes mutées sur leur niveau de fixation, comme observé sur les 7 souches testées en condition d'inoculum bactérien peu concentré.

. Evolution différentielle sous deux couverts végétaux différents.

A notre connaissance, aucune étude n'a comparé la diversité des bactéries *S. medicae* piégées avec *M. truncatula* et *M. polymorpha*. En effet, Biondi *et al.* (2003b) ont utilisé ces deux espèces végétales pour piéger les bactéries symbiotiques à partir du même sol, mais seules des souches de *S. meliloti* ont été détectées sur *M. truncatula*. Puisque *M. truncatula* est une plante à spectre d'hôte généraliste, alors que *M. polymorpha* possède un spectre d'hôte spécialiste, nous pouvons émettre l'hypothèse que la

diversité des bactéries au sein de l'espèce *S. medicae* serait plus importante chez la plante spécialiste, car celle-ci ne possède pas la capacité de s'associer efficacement avec les souches de l'autre espèce bactérienne. *M. polymorpha* pourrait alors posséder un spectre d'hôte plus important au sein de la même espèce bactérienne, afin de détecter le « meilleur » symbiote. Cette hypothèse suggérerait que la diversité bactérienne (engendrée par des mutations non neutres) devrait être plus importante sous traitement *M. polymorpha* seul que sous traitement *M. polymorpha* et *M. truncatula* en mélange. Ainsi, il aurait dû être possible de détecter plus de bactéries évoluées génétiquement sous ce premier traitement. Le nombre de lots bactérien potentiellement évolué a été trouvé plus important dans cette condition (figure VII.2.3), mais l'analyse génétique des souches issues des deux traitements serait nécessaire pour tester cette hypothèse. Les tests AFLP et de croissance en plaque Biolog n'ont pas été effectués sur suffisamment de souches pour y répondre.

Par ailleurs, l'abortion de la nodulation a été observée pour trois lots de plantes (sur 5) sous traitement *M. polymorpha* et *M. truncatula* en mélange, alors que cela n'a jamais été observé sous traitement *M. polymorpha* (figure X). Terpolilli *et al.* (2008) ont mesuré la biomasse aérienne de *M. polymorpha* cv. Santiago et celle de *M. truncatula* Jemalong A17 après inoculation avec WSM419. Ces résultats ne permettent pas de rejeter l'hypothèse que l'effet espèce de plante soit à la base de la différence entre les deux conditions, puisque cette différence n'a pas été testée statistiquement. Ces résultats semblent aussi suggérer une meilleure adaptation (et efficacité symbiotique) entre cette souche bactérienne de *S. medicae* et *M. polymorpha* qu'avec *M. truncatula*. Dans ce cadre, nos résultats suggéreraient une diminution de la fixation d'azote des souches en présence de *M. truncatula*, en comparaison de *M. polymorpha*. Cependant, l'interaction *M. truncatula* – WSM419 étant efficace, l'abortion des nodosités observée pour 3 lots de plantes est difficile à expliquer. L'accumulation progressive de mutations délétères ne peut être rejetée, même si aucune différence interprétable de nodulation ou de fixation n'a été détectée au cours de l'expérience (mesures à chaque fin de cycle, données non montrées).

. Nombre de générations.

La comparaison de notre étude d'évolution expérimentale à celle de Lenski et collaborateurs est différente sans commune mesure. Leurs travaux ont en effet été effectués sur 20 000 générations bactériennes d'*E. Coli* sur milieu minimum en glucose et sont un bel exemple d'évolution expérimentale de bactéries (Cooper *et al.*, 2003; Crozat *et al.*, 2005; Lenski, Travisano, 1994; Papadopoulos *et al.*, 1999; Pelosi *et al.*, 2006; Travisano, 1997; Travisano, Lenski, 1996). Le temps de génération de *S. medicae* étant estimé entre 3 et 5 h sur milieu YM (Rome *et al.*, 1996), nous pouvons

supposer que notre étude d'évolution expérimentale a été effectuée sur 1440 à 2400 générations, si l'on considère que le temps de génération est identique en milieu de culture et dans les nodosités. Cependant, 2000 générations pourraient représenter un pas de temps trop court pour que les bactéries puissent évoluer sous pression de sélection de la plante-hôte.

. Conclusion.

A ce stade de l'étude, aucune conclusion ne peut être affirmée sans prudence. En effet, plusieurs hypothèses devraient être vérifiées concernant l'influence de la concentration d'inoculum, l'efficacité de la souche ancestrale avec les deux plantes-hôte, l'existence de sanctions dans les deux couples symbiotiques ou la diversité intraspécifique des souches associées aux plantes-hôtes spécialiste et généraliste utilisées.

3- Perspectives

En perspective, la caractérisation de la diversité génétique des 72 souches est prévue. En effet, la visualisation de changements génétiques devrait être plus facile que la mesure de différence d'efficacité de fixation d'azote par mesure de la biomasse aérienne ou que la détection de changements de croissance sur des substrats carbonés (plaque biolog). Parmi plusieurs techniques expérimentales possibles, cette caractérisation sera réalisée par Rep-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic PCR Genomic Fingerprinting) afin d'obtenir un profil génomique des différentes souches.

Il a été montré que, du fait de la plasticité génomique des bactéries, les rhizobia possédant un faible spectre d'hôte ont présenté une contraction du génome bactérien par rapport aux bactéries possédant un large spectre d'hôte (Normand *et al.*, 2007). Cette étude a été réalisée sur trois souches actinorhiziennes du genre *Frankia* formant une symbiose fixatrice d'azote avec plusieurs espèces de plantes de la famille des angiospermes. Dans l'hypothèse où le temps d'évolution appliqué dans cette étude était suffisant pour entraîner des changements génétiques, il est raisonnable de supposer que les souches ayant évolué sous un spectre d'hôte plus restreint ont diminué la taille de leur génome par rapport aux souches ayant évolué sous un spectre d'hôte plus large. Par contre, il est difficile de prédire la différence de taille entre la souche ancestrale *S. medicae* WSM419 et les souches évoluées.

Après sélection des souches génétiquement différentes de la souche ancestrale, leur profil plasmidique pourrait par exemple être analysé par gel eckardt, comme adapté de Silva *et al.* (2007), ou

par PFGE si les différences de taille des plasmides sont réellement importantes. Dans ce cas, le séquençage total de certaines souches (ou du moins de certaines unités de réplication) apporterait des informations sur le contenu génique modifié.

Enfin, l'inoculation de *M. polymorpha* avec ces souches génétiquement évoluées et la mesure du niveau de fixation d'azote pourraient être réalisées par une technique de mesure fine, comme par marquage avec de l'azote ^{15}N . Il serait aussi intéressant de tester l'efficacité symbiotique de ces interactions à différentes concentrations d'inoculum.

CHAPITRE VIII:
CONCLUSION GENERALE

VIII- Conclusion générale

1- Modèle d'étude

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés au modèle *Medicago* sp. – *Sinorhizobium* sp., qui est considéré comme l'un des couples modèles de la symbiose fixatrice d'azote (Cook, 1999). Dans cette interaction plante – bactérie, plusieurs compartiments physiques contenant le partenaire bactérien peuvent être considérés : les nodosités, la zone rhizosphérique et le sol. Alors que la communauté bactérienne de *Sinorhizobium* sp. du sol est différente de celle présente dans les nodosités des plantes-hôtes (Hartmann *et al.*, 1998), il semblerait que cette différence de communauté se mette en place au niveau de la rhizosphère. En effet, des haplotypes supplémentaires semblent être détectés dans la rhizosphère, par rapport à la population de *S. meliloti* décrite dans les nodosités (manuscrit 5), même si ce résultat nécessite d'être complété. Dans cette thèse, nous avons limité notre étude à l'analyse des bactéries *Sinorhizobium* sp. nodulantes, c'est-à-dire aux populations bactériennes présentes dans les nodosités.

2- Structuration spatiale des deux espèces bactériennes

Les différentes études réalisées au cours de cette thèse permettent d'améliorer les connaissances concernant la répartition spatiale des espèces *S. meliloti* bv. *meliloti* et *S. medicae* et de leurs diversités respectives sur l'aire géographique du bassin méditerranéen, et des facteurs qui y contribuent.

En ce qui concerne la fréquence des deux espèces au sein des nodosités de *M. truncatula*, l'espèce *S. meliloti* a été observée plus fréquemment que *S. medicae* sur le pourtour du bassin méditerranéen (manuscrit 3). Cependant, même si l'espèce *S. meliloti* a été piégée plus fréquemment que *S. medicae*, il ressort aussi que la proportion des deux espèces bactériennes symbiotiques est très variable en fonction du site géographique échantillonné. *S. meliloti* a en effet été isolée à partir de tous les sites utilisés pour l'analyse phylogéographique à l'échelle du bassin méditerranéen (manuscrit 3) ainsi que sur les sites utilisés pour l'étude d'adaptation locale à grande échelle spatiale (manuscrit 4) et a été la seule espèce détectée sur le sol de Dijon (France) (manuscrit 5). Plusieurs sites d'échantillonnage ont cependant révélé une prédominance de *S. medicae*, comme sur le site de Narbonne (France) qui a été utilisé pour l'analyse d'adaptation locale à l'échelle restreinte (manuscrit 4), sur le site de Saint Bazille de la Sylve (France) (manuscrit 1), ou sur les sites échantillonnés au Maroc, en Grèce, en

Israël ou au Liban dans l'analyse phylogéographique (manuscrit 3). Cependant, l'analyse exclusive des bactéries nodulantes ne permet pas de savoir si les deux espèces bactériennes sont présentes au niveau de tous les sols étudiés. Dans la littérature, il est décrit qu'une nodulation efficace des plantes (et donc un bon rendement cultural) n'est possible qu'à partir d'un certain seuil qui varie selon les espèces (Herridge, 2007). Ainsi, si les rhizobia sont très faiblement présents au niveau du sol, il n'est statistiquement pas possible de les isoler par piégeage bactérien, d'autant plus que seuls 20 isolats ont été obtenus par site. On peut se poser la question si ces rhizobia ont été présents en forte proportion sur ces mêmes sites. En effet, aucune expérience ne décrit actuellement la dynamique d'extinction-migration-colonisation sur des populations de rhizobia. A ce stade de connaissances, la citation connue « Everything is everywhere, [...] » (Baas Becking, 1934) ne peut actuellement être infirmée pour chacune des deux espèces de *Sinorhizobium*. Ainsi, les nouveaux outils moléculaires, telle la métagénomique, permettront sans doute d'analyser la diversité bactérienne au niveau des sols de manière plus exhaustive, ce qui permettra d'affiner nos connaissances sur la structuration de ces bactéries au niveau du sol.

Afin de mieux comprendre cette variation de fréquence des deux espèces en fonction du site géographique utilisé, nous avons analysé certains facteurs qui pourraient avoir une influence sur le différentiel de nodulation des plantes-hôtes par ces deux espèces de bactéries. Tout d'abord, nous ne pouvons pas supposer que *S. meliloti* ait été trouvé plus fréquente que *S. medicae* du fait de la plante-hôte utilisée pour le piégeage, puisque la même lignée végétale (*Medicago truncatula* Jemalong A17) a été utilisée pour la plupart des études. Par ailleurs, la différence de compétitivité pour la nodulation entre les deux espèces pourrait être suggérée puisque nous avons montré, sur un des sites géographiques utilisés (Saint Bazille de la Sylve, France), que les souches de l'espèce *S. meliloti* sont plus compétitives pour la nodulation de *M. truncatula* que les souches de *S. medicae* (manuscrit 1). Cependant, cette expérience a été effectuée en chambre de culture (sur milieu de laboratoire) et non en milieu naturel, et les différences obtenues, bien que significatives, ne sont pas très importantes. De plus, nous ne savons pas aujourd'hui si *S. meliloti* est toujours l'espèce la plus compétitive pour la nodulation, ou s'il s'agit d'un effet propre à cette population ; il faudrait donc analyser la compétition des deux espèces dans d'autres sites géographiques, avant de généraliser cette idée. Ainsi, ce facteur de compétitivité relative pourrait éventuellement contribuer au différentiel des deux espèces observé au niveau des nodosités, mais il ne serait pas le facteur prédominant. A mon avis, le facteur expliquant le mieux la disproportion des deux espèces au niveau des nodosités en fonction du site géographique est la différence de taille des populations des deux espèces bactériennes au niveau du sol, puisque sur le même site (Saint Bazille de la Sylve, France) (manuscrit 1), l'espèce *S. medicae* a été l'espèce

bactérienne isolée le plus fréquemment (et très largement). En effet, la taille de la population bactérienne a été décrite comme un facteur important de la colonisation de la plante-hôte dans la symbiose entre *M. truncatula* – *Sinorhizobium* sp. (Denton *et al.*, 2007). Pour le vérifier, des mesures de taille de population pour chacune des deux espèces dans plusieurs sites présentant des proportions contrastées permettraient de vérifier cette hypothèse. La taille des populations bactériennes dans le sol serait fonction de leur survie au niveau du sol, qui dépend d'une part de leur niveau de compétitivité vis-à-vis d'autres organismes (bactéries appartenant à d'autres genres, champignons ectomycorhiziens,...) ou encore de leur adaptation aux conditions édaphiques du sol considéré. Par exemple, certains paramètres physico-chimiques du sol, dont principalement le pH (Garau *et al.*, 2005), l'acide phosphorique (manuscrit 3), ou encore la structure physique du sol (manuscrit 3) semblent influencer le ratio des deux espèces au niveau des nodosités, *S. medicae* étant une espèce plus tolérante aux pH acides, alors qu'une concentration basse en acide phosphorique favoriserait *S. meliloti*. Cependant, il n'est pas connu si ces paramètres chimiques influencent seulement l'adaptation différentielle des deux espèces au niveau du sol, ou s'ils influencent aussi le niveau de compétitivité des deux espèces. Une autre hypothèse pouvant expliquer le différentiel de proportions des deux espèces de *Sinorhizobium* serait que différentes dynamiques évolutives (comme des effets de migration ou de fondation variables entre les espèces) aient structuré les populations en fonction du site géographique. Enfin, il est bien démontré dans la littérature que le couvert végétal, en particulier la luzerne, influence la survie et la persistance de ses symbiotes au niveau du sol (Da, Deng, 2003). Puisqu'il existe une grande spécificité entre les plantes *Medicago* et ses symbiotes (certaines espèces végétales ne pouvant s'associer qu'à certaines espèces de *Sinorhizobium* sp., alors que d'autres présentent un spectre d'hôte plus généraliste), la répartition spatiale des espèces végétales a certainement une influence sur la répartition de ses symbiotes associés. Dans les différentes études réalisées au cours de cette thèse, il n'a pas été possible de recenser la diversité végétale présente sur tous les sites échantillonnés. Nous avons donc utilisé la base de données de répartition spatiale des légumineuses (ILDIS) pour notre raisonnement, même si les informations fournies sont peu précises (information sur le pays et non sur la région précisément). Il est apparu que la présence des deux espèces bactériennes est parfaitement corrélée à la présence théorique des légumineuses associées.

3- Maintien des deux espèces bactériennes en interaction avec la même plante-hôte

La spécificité d'hôte dans le système *Medicago* sp – *Sinorhizobium* sp., bien décrite dans la littérature, met en évidence l'existence de plantes-hôtes, comme *M. truncatula*, possédant plusieurs partenaires symbiotiques efficaces. Cependant, peu d'hypothèses permettent d'expliquer ce maintien

de polymorphisme génétique. En effet, pourquoi aucune spécialisation bactérienne stricte n'apparaît-elle ? Pourquoi une des deux espèces ne serait-elle pas favorisée dans la symbiose et pourquoi l'autre espèce ne tendrait-elle pas à être éliminée de l'interaction ?

Evidemment, il est possible que les processus évolutifs en place contribuent à une telle sélection bactérienne et que cette spécialisation stricte soit en cours... Si tel est le cas, plusieurs observations suggèrent que *S. medicae* pourrait devenir le symbiote exclusif. Tout d'abord, *S. medicae* pourrait devenir l'espèce prédominante car elle présente une plus forte expansion démographique comparativement à *S. meliloti* (manuscrit 1, manuscrit 3). De plus, *S. medicae* présente plus de recombinaison intraspécifique que *S. meliloti* (manuscrit 3), ce qui lui permettrait théoriquement de mieux s'adapter à de nouvelles conditions environnementales (Goddard *et al.*, 2005).

Cependant, il est aussi possible que cette symbiose multipartenaire se maintienne du fait d'un équilibre. Une hypothèse serait que l'espèce *S. meliloti* aurait un avantage à noduler alors que *S. medicae* pourrait mieux fixer l'azote atmosphérique (manuscrit 1). Cette hypothèse reste cependant à confirmer sur un échantillonnage plus étoffé, et les travaux de mesure de sanction relative, proposés en perspectives de le manuscrit 2 y contribueront peut-être.

4- Comparaison de la diversité entre les deux espèces bactériennes

Au cours de cette thèse, la diversité génétique existant au sein de chaque espèce a été étudiée et les niveaux de diversité intraspécifique ont ainsi pu être comparés entre les deux espèces. Nous avons démontré qu'au niveau de chaque locus, l'espèce *S. meliloti* est une espèce plus diversifiée (en termes de richesse allélique et de diversité nucléotique pour les loci symbiotiques) que *S. medicae* à l'échelle du bassin méditerranéen (manuscrit 3), et cela a aussi été vérifié au sein d'un site géographique où *S. meliloti* a été faiblement échantillonné comparativement à *S. medicae* (manuscrit 1). Une hypothèse serait que la sélection purificatrice serait plus importante chez *S. medicae* que chez *S. meliloti*. Cette différence de diversité pourrait aussi être expliquée par le fait que *S. medicae* serait une espèce plus récente que *S. meliloti* (Bailly *et al.*, 2006; Biondi *et al.*, 2003b).

Cependant, la diversité haplotypique (en multiloci) a été observée plus importante chez *S. medicae* que chez *S. meliloti* (manuscrit 3). En effet, la recombinaison entre souches est plus forte chez *S. medicae*, comme suggéré par les mesures de déséquilibre de liaison (multilocus ou par paires de marqueurs) (manuscrit 3). Par ailleurs, nous avons montré que la compétition entre souches

génétiqnement différentes est plus importante au sein de *S. medicae* qu'au sein de *S. meliloti* (manuscrit 1), ce qui est en contradiction avec cette différence de diversité entre les deux espèces. Mais ces résultats de différence de compétitivité nécessitent d'être généralisés à d'autres sites.

5- Structuration spatiale de la diversité intraspécifique

A partir des analyses de diversité infraspécifiques réalisées, nous avons pu compléter différentes études antérieures analysant la structuration de la diversité au sein de chaque espèce.

A ce jour, aucune analyse des populations de *Sinorhizobium* n'a encore été réalisée à l'échelle mondiale, ni au niveau interspécifique, ni au niveau intraspécifique. Cependant l'analyse de la diversité génétique de souches issues de différents continents a été réalisée et a montrée l'existence d'une variabilité génétique intraspécifique, qui ne semble pas corrélée à la localisation géographique des souches (Silva *et al.*, 2007). Ces auteurs suggèrent que la migration chez *S. meliloti* et *S. medicae* pourrait agir à très longue distance spatiale, comme cela a déjà été démontré chez d'autres rhizobia (Silva *et al.*, 2005; Vinuesa *et al.*, 2005).

Nous avons démontré que la métapopulation de *S. medicae* est organisée selon une structure panmictique sur le bassin méditerranéen (manuscrit 3). La différenciation entre populations observée chez cette espèce (F_{st} global $< 0,3$) (manuscrit 3) semble indiquer un taux de migration relativement important chez *S. medicae*. De plus, la détection d'un patron phylogéographique chez *S. medicae* suppose que la migration ne se ferait pas à longue distance (manuscrit 3).

A l'échelle du bassin méditerranéen, l'étude de Bailly *et al.* (2007) complétée par l'analyse de Pavoine et Bailly (2007) avait montré que la structure des populations de *S. meliloti* était sensible à l'effet d'isolement par la distance. Nous avons montré une différenciation relativement forte ($0,3 < F_{st} < 0,5$) entre les populations bactériennes de *S. meliloti* bv. *meliloti* au niveau du pourtour du bassin méditerranéen (manuscrit 3). Ainsi, chez *S. meliloti*, la migration pourrait être moins forte que chez *S. medicae*, mais à plus longue distance (pas de profil phylogéographique) (manuscrit 3). Une telle dynamique pourrait induire une absence d'adaptation locale à l'échelle du bassin méditerranéen chez *S. meliloti*, comme cela a été détecté dans notre étude (manuscrit 4). Cependant, la structure épidémique de la métapopulation de *S. meliloti* (détectée par mesures de déséquilibre de liaison, manuscrit 3) est due à la présence de certains clones en fort pourcentage au sein de chaque population géotypée. La prédominance d'un clone au niveau de différentes populations échantillonnées au

Mexique avait aussi été observée (Silva *et al.*, 2007), confortant notre observation réalisée sur le pourtour du bassin méditerranéen. Un tel profil pourrait suggérer une bonne adaptation de ces clones en fonction de l'environnement, supposant que de l'adaptation locale puisse avoir lieu, au moins à l'échelle du bassin méditerranéen. Ainsi, l'analyse de l'adaptation locale devrait être effectuée *de novo* et de manière plus propice à la recherche de tels phénomène (voir discussion et perspectives du manuscrit 4), afin de clarifier ces contradictions. Cependant, la présence de ces clones en fort pourcentage pourrait aussi résulter de dérive génétique.

A une échelle spatiale plus restreinte, Silva *et al* (2007) n'avaient pas montré de différenciation génétique entre plusieurs populations échantillonnées au sein du même pays (le Mexique). L'existence du même clone en forte proportion sur ces différentes populations mexicaines suggère plus une structure clonale qu'une structure épidémique des populations de *S. meliloti* sur ce continent. A la même échelle spatiale mais sur une autre région géographique (régions Nord ou Sud du bassin méditerranéen), les populations ont été trouvées structurées à cette échelle (manuscrit 3). A une échelle encore plus restreinte, l'analyse de la diversité génétique des populations issues de plusieurs parcelles expérimentales (Dijon, France) situées à quelques mètres de distance (manuscrit 5) a permis de montrer que *Sinorhizobium* ne semblait pas présenter de micro-structuration à cette échelle. Cependant, cette dernière étude n'a pas montré un taux élevé de diversité au sein des nodosités, ce qui pourrait être à la base de cette absence de détection de structuration. Ainsi, la même analyse devrait être répétée sur d'autres sites expérimentaux, présentant plus de diversité totale pour vraiment appréhender à quelle distance les populations de *S. meliloti* présentent une différenciation significative.

Cette thèse a permis d'analyser l'influence de plusieurs facteurs sur la diversité génétique intraspécifique des bactéries *Sinorhizobium* sp.. Pour chaque espèce bactérienne, aucune corrélation n'a pu être observée entre la composition génétique des populations bactériennes et la distance géographique entre ces populations (pas d'isolement par la distance).

D'autres facteurs, principalement des facteurs physico-chimiques du sol, semblent être impliqués. Nous avons montré que la diversité des souches bactériennes nodulantes est positivement corrélée au pH du sol dans une gamme de pH compris entre 6 et 9 (manuscrit 3), comme cela a été montré dans des communautés bactériennes du sol (Fierer, Jackson, 2006). Puisque la plupart des microorganismes ont un pH intracellulaire compris entre 6 et 8 (Madigan *et al.*, 1997), toute déviation significative du pH environnemental de la neutralité doit imposer un stress sur les organismes. Ce stress a une influence sur la diversité globale des communautés microbiennes dans les environnements acides autant

dans des environnements terrestres qu'aquatiques (Bååth, Anderson, 2003; Hornstrom, 2002; Schnittler, Stephenson, 2000). Pour les bactéries symbiotiques *S. meliloti* et *S. medicae*, cette corrélation pH / diversité reste plus difficile à comprendre. Une augmentation de pH améliore la croissance de *S. meliloti* Sm1021 (Rinaudi *et al.*, 2006), mais puisque cet effet diffère d'une espèce bactérienne à une autre (Rinaudi *et al.*, 2006), il pourrait être possible qu'une augmentation de pH diminue la croissance de *S. medicae*, puisque cette espèce est bien adaptée aux conditions acides (del Papa *et al.*, 1999). Ainsi, la seule hypothèse expliquant la corrélation entre le pH et la diversité des souches *Sinorhizobium* sp. serait que la croissance et la survie des différents génotypes de *S. meliloti* serait variable en fonction du pH du sol et / ou de la rhizosphère. Cette hypothèse est confortée par le fait que la quantité de rhizobia au niveau des sols est positivement corrélée au pH du sol (Ballard *et al.*, 2003).

Par ailleurs, l'oxyde de magnésium et l'oxyde de calcium seraient aussi des facteurs influençant la composition génétique intraspécifique des bactéries *Sinorhizobium* sp. (manuscrit 3), en agissant aussi sur la croissance de *S. meliloti* (Rinaudi *et al.*, 2006). Il est donc possible que différents génotypes de *Sinorhizobium* sp. réagissent à différents seuils de concentration, ce qui entraînerait une composition bactérienne différente en fonction de la concentration de ces deux éléments. L'influence du magnésium sur la structuration des populations bactériennes a d'ailleurs déjà été montrée pour les communautés de procaryotes sulfato-réducteurs (Miletto *et al.*, 2008).

Le dernier facteur, décelé dans le manuscrit 3, influençant la diversité des populations de *Sinorhizobium* est la teneur en sable au niveau du sol. En effet, les sols contenant le moins de sable sont ceux qui présentent le plus de diversité. Cela est difficile à expliquer car le sable facilite l'adhésion des bactéries *S. meliloti* dans la rhizosphère (Fujishige *et al.*, 2006).

Alors qu'aucun résultat obtenu au cours de cette thèse ne permet de l'affirmer, le couvert végétal pourrait aussi avoir une influence sur la diversité bactérienne au sein de la même espèce (au moins chez *S. meliloti*). En effet, la spécificité d'hôte bien décrite dans la littérature (Béna *et al.*, 2005; Villegas *et al.*, 2006) suggère que la répartition des bactéries symbiotiques de l'espèce *S. meliloti* dépend de celle des plantes-hôtes associées (Bailly *et al.*, 2007; Van Berkum *et al.*, 2007). Nos résultats (bien que très préliminaires) semblent supposer que la répartition des bactéries *S. meliloti* associées à *M. rigiduloides*, à *M. noeana* et à *M. radiata* (*S. meliloti* bv. *rigiduloides*) semble aussi correspondre à la distribution des plantes-hôtes (perspectives manuscrit 3). Les analyses

complémentaires sur l'expérience d'évolution expérimentale (manuscrit 6) permettront aussi d'évaluer l'impact de deux types de couvert végétal sur l'évolution des bactéries symbiotiques, ici *S. medicae*.

Afin d'affiner les connaissances sur l'impact des différents paramètres physico-chimiques du sol et du couvert végétal sur la composition des communautés bactériennes de *Sinorhizobium* sp., une nouvelle analyse s'avèrerait donc nécessaire. L'échantillonnage devrait être réalisé selon une méthode différente de celle réalisée dans cette thèse. Dans un premier temps, l'analyse exhaustive de nombreux sols (pour les paramètres du sol ou le couvert végétal) devrait être réalisée. En fonction du paramètre étudié, certains sols (qui diffèrent « seulement » sur le paramètre étudié) pourraient être sélectionnés et la composition bactérienne pourrait alors être étudiée. De plus, d'autres paramètres pourraient être étudiés tels que la latitude, la température ou encore la saison sur la répartition des espèces de *S. meliloti* et *S. medicae*, paramètres qui ont été rapportés comme facteurs importants pour la structure des communautés bactériennes totales du sol.

6- Polymorphisme symbiotique

Au cours de cette thèse, nous avons confirmé l'existence d'une interaction plante x bactéries pour la nodulation et pour la fixation d'azote chez les deux espèces bactériennes. De plus, nous avons démontré l'existence d'un polymorphisme de fixation d'azote (que nous appelons polymorphisme symbiotique) entre plusieurs souches présentant une faible divergence génétique, que cela soit chez *S. meliloti* ou chez *S. medicae* (manuscrit 1). Cependant, aucune corrélation n'est aujourd'hui possible entre diversité du fond génétique et polymorphisme symbiotique. L'échantillonnage réalisé dans l'analyse phylogéographique sur le pourtour du bassin méditerranéen (manuscrit 3) pourrait permettre d'élargir ces connaissances, du fait de la plus importante divergence génétique détectée entre les souches.

La détection d'haplotypes bactériens partagés dans plusieurs populations étudiées (manuscrit 3) soulève l'hypothèse que ces haplotypes soient favorisés par une facilité de migration et dispersion, par l'environnement abiotique, ou par la plante-hôte elle-même. Dans ce dernier cas, il est possible que ces souches soient des symbiotes efficaces, et qu'ils soient donc favorisés par la plante. L'étude du niveau de fixation des souches serait donc pertinente. Cependant, cette hypothèse va à l'encontre des résultats obtenus dans le manuscrit 2. En effet, il semblerait que la plante-hôte favorise d'avantage un symbiote non-fixateur qu'un symbiote fixateur, même si à l'heure actuelle aucune conclusion ne peut être affirmée en ce qui concerne l'existence ou non de sanctions en système populationnel chez

Medicago truncatula – *S. meliloti* (manuscrit 2). Malgré tout, la présence de génotypes partagés par plusieurs populations pourrait être un reflet purement démographique, avec des souches ayant envahi ces différents sites, par une expansion démographique plus ou moins ancienne. Une approche de type coalescent permettrait peut-être de trancher entre un scénario de type sélection et un scénario de type démographique.

7- Coévolution chez le couple *Medicago* sp – *Sinorhizobium* sp.

L'existence de sanctions dans un couple symbiotique suppose que chaque partenaire a évolué, au moins partiellement, sous l'influence réciproque de l'autre partenaire. Nous n'avons cependant pas pu démontrer l'existence d'un tel phénomène évolutif par le système d'évolution expérimentale mis en place au cours de cette thèse (manuscrit 6). Alors que de la coévolution a en effet été observée dans de nombreux systèmes pathogènes ou symbiotiques, comme chez certains systèmes légumineuses – rhizobia (Aguilar *et al.*, 2004), aucune cocladogénèse stricte n'a été observée entre les deux partenaires symbiotiques chez *Medicago* sp. – *Sinorhizobium* sp (Béna *et al.*, 2005) et l'existence d'adaptation locale à plusieurs échelles spatiales chez *Medicago truncatula* - *Sinorhizobium* sp reste incertaine (manuscrit 4). Ainsi, de nouvelles analyses (d'adaptation locale, de cocladogénèse,...) seraient donc nécessaires pour savoir s'il existe ou non de la coévolution dans la symbiose *Medicago* sp. – *Sinorhizobium* sp..

8- Futur du modèle

De nombreuses questions sur la génétique des populations de ce modèle *Medicago truncatula* – *Sinorhizobium* sp. restent actuellement en suspens (voir entre autres les nombreuses perspectives de ce manuscrit). De plus, du fait des continuelles avancées technologiques, l'analyse des populations se veut de plus en plus rapide. Je ne peux donc que souhaiter à ce modèle de ne pas finir oublié dans les archives bibliographiques, de continuer à vivre sur les paillasses de laboratoire et qu'ainsi de jeunes chercheurs (ou chercheurs confirmés) puissent apprendre (ou continuer) ce travail passionnant de recherche.

CHAPITRE IX:
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

IX-Références bibliographiques

- Aguilar, O. M., Riva, O., Peltzer, E.** (2004) Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 13548-13553.
- Amarger, N.** (1981) Competition for nodule formation between effective and ineffective strains of *Rhizobium meliloti*. *Soil Biology and Biochemistry* **13**, 475-480.
- Ames-Gottfred, N. P., Christie, B. R.** (1989) Competition among strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* and use of a diallel analysis in assessing competition. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 1599-1604.
- Ané, J. M., Zhu, H., Frugoli, J.** (2008) Recent Advances in *Medicago truncatula* Genomics. *International Journal of Plant Genomics* **2008**, 256597.
- Aneja, P., Zachertowska, A., Charles, T. C.** (2005) Comparison of the symbiotic and competition phenotypes of *Sinorhizobium meliloti* PHB synthesis and degradation pathway mutants. *Canadian Journal of Microbiology* **51**, 599-604.
- Aoki, T., Akashi, T., Ayabe, S.** (2000) Flavonoids of leguminous plants: Structure, biological activity, and biosynthesis. *Journal of Plant Research* **113**, 475-488.
- Athar, M., Johnson, D.** (1996) Influence of drought on competition between selected *Rhizobium meliloti* strains and naturalized soil rhizobia in alfalfa. *Plant and Soil* **184**, 231-241.
- Baas Becking, L. G. M.** (1934) *Geobiologie of Inleiding tot de Milieukunde*, The Hague.
- Bååth, E., Anderson, T. H.** (2003) Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biology and Biochemistry* **35**, 955-963.
- Badri, Y., Zribi, K., Badri, M., et al.** (2007) Comparison of rhizobia that nodulate *Medicago laciniata* and *Medicago truncatula* present in a single Tunisian arid soil. *Canadian Journal of Microbiology* **53**, 277-283.
- Bahlawane, C., Baumgarth, B., Serrania, J., Ruberg, S., Becker, A.** (2008) Fine-tuning of galactoglucan biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti* by differential *WggR (ExpG)*-, *PhoB*-, and *MucR*-Dependent Regulation of Two Promoters. *Journal of Bacteriology* **190**, 3456-3466.
- Bailly, X.** (2006) *Recombinaison, spécialisation et spéciation chez les symbiotes du genre Sinorhizobium associés aux plantes du genre Medicago: des patrons de diversité aux hypothèses évolutives*, Université de Montpellier 2.
- Bailly, X., Olivieri, I., Brunel, B., Cleyet-Marel, J.-C., Bena, G.** (2007) Horizontal gene transfer and homologous recombination drive the evolution of the nitrogen-fixing symbionts of *Medicago* species. *Journal of Bacteriology* **189**, 5223-5236.

- Bailly, X., Olivieri, I., De Mita, S., Cleyet-Marel, J.-C., Bena, G. (2006) Recombination and selection shape the molecular diversity pattern of nitrogen-fixing *Sinorhizobium* sp. associated to *Medicago*. *Molecular Ecology* **15**, 2719-2734.
- Ballard, R. A., Shepherd, B. R., Charman, N. (2003) Nodulation and growth of pasture legumes with naturalised soil rhizobia. 3. Lucerne (*Medicago sativa* L.). *Australian Journal of Experimental Agriculture* **43**, 135-140.
- Belotte, D., Curien, J. B., Maclean, R. C., Bell, G. (2003) An experimental test of local adaptation in soil bacteria. *Evolution* **57**, 27-36.
- Ben Romdhane, S., Tajini, F., Trabelsi, M., Aouani, M., Mhamdi, R. (2007) Competition for nodule formation between introduced strains of *Mesorhizobium ciceri* and the native populations of rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum*) in Tunisia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**, 1195-1201.
- Béna, G., Lejeune, B., Prosperi, J.-M., Olivieri, I. (1998a) Molecular phylogenetic approach for studying life-history evolution: the ambiguous example of the genus *Medicago* L. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **265**, 1141-1151.
- Béna, G., Lyet, A., Huguet, T., Olivieri, I. (2005) *Medicago-Sinorhizobium* symbiotic specificity evolution and the geographic expansion of *Medicago*. *Journal of Evolutionary Biology* **18**, 1547-1558.
- Berglund, A.-B. N., Dahlgren, S., Westerbergh, A. (2004) Evidence for parallel evolution and site-specific selection of serpentine tolerance in *Cerastium alpinum* during the colonization of Scandinavia. *New Phytologist* **161**, 199-209.
- Bertrand, H., Plassard, C., Pinochet, X., *et al.* (2000) Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Canadian Journal of Microbiology* **46**, 229-236.
- Bever, J. D. (1999) Dynamics within mutualism and the maintenance of diversity: inference from a model of interguild frequency dependence. *Ecology Letters* **2**, 52-61.
- Bikandi, J., San Millan, R., Rementeria, A., Garaizar, J. (2004) In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. *Bioinformatics* **20**, 798-799.
- Biondi, E. G., Fancelli, S., Bazzicalupo, M. (1999) IS Rm10: a new insertion sequence of *Sinorhizobium meliloti*: nucleotide sequence and geographic distribution. *FEMS Microbiology Letters* **181**, 171-176.
- Biondi, E. G., Femia, A. P., Favilli, F., Bazzicalupo, M. (2003a) IS Rm31, a new insertion sequence of the IS 66 family in *Sinorhizobium meliloti*. *Archives of Microbiology* **180**, 118-126.
- Biondi, E. G., Pilli, E., Giuntini, E., *et al.* (2003b) Genetic relationship of *Sinorhizobium meliloti* and *Sinorhizobium medicae* strains isolated from Caucasian region. *FEMS Microbiology Letters* **220**, 207-213.
- Bittinger, M. A., Milner, J. L., Saville, B. J., Handelsman, J. (1997) *rosR*, a determinant of nodulation competitiveness in *Rhizobium etli*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**, 180-186.

- Bonnin, I., Prosperi, J. M., Olivieri, I.** (1996) Genetic markers and quantitative genetic variation in *Medicago truncatula* (Leguminosae): a comparative analysis of population structure. *Genetics* **143**, 1795-1805.
- Bonnin, I., Ronfort, J., Wozniak, F., Olivieri, I.** (2001) Spatial effects and rare outcrossing events in *Medicago truncatula* (Fabaceae). *Molecular Ecology* **10**, 1371-1383.
- Bradshaw, A. D.** (1984) Ecological significance of genetic variation between populations. In: *Perspectives on Plant Population Ecology* (eds. Dirzo RS, Sunderland J), pp. 213-228. Sinauer Associates Inc.
- Brenner, D. J.** (1981) Introduction to the family Enterobacteriaceae. In: *The Prokaryotes* (eds. Starr MP, Stolp H, Truper HG, Alows A, Schlegel HG), pp. 1105-1127. Springer-Verlag, K. G., Berlin.
- Brockwell, J.** (2001) *Sinorhizobium meliloti* in Australian soil: population studies of the root-nodule bacteria for species of *Medicago* in soils of the Eyre Peninsula, South Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **41**, 753-762.
- Brockwell, J., Pilka, A., Holliday, R.** (1991) Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils in central New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **31**, 211-219.
- Brockwell, J., Roughley, R. J., Herridge, D. F.** (1987) Population dynamics of *Rhizobium japonicum* strains used to inoculate three successive crops of soybean. *Australian Journal of Agricultural Research* **38**, 61-74.
- Bromfield, E. S. P.** (1984) Variation in preference for *Rhizobium meliloti* within and between *Medicago sativa* cultivars grown in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **48**, 1231-1236.
- Bromfield, E. S. P., Thurman, N. P., Whitwill, S. T., Barran, L. R.** (1987) Plasmids and symbiotic effectiveness of representative phage types from two indigenous populations of *Rhizobium meliloti*. *Journal of General Microbiology* **133**, 3457-3466.
- Broughton, W. J., Heycke, N., Priefer, U., Schneider, G.-M., Stanley, J.** (1987) Ecological genetics of *Rhizobium meliloti* : diversity and competitive dominance. *FEMS Microbiology Letters* **40**, 245-249.
- Broughton, W. J., Perret, X.** (1999) Genealogy of legume-Rhizobium symbioses. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 305-311.
- Bryja, J., Galan, M., Charbonnel, N., Cosson, J.-F.** (2005) Analysis of major histocompatibility complex class II gene in water voles using capillary electrophoresis-single stranded conformation polymorphism. *Molecular Ecology Notes* **5**, 173-176.
- Buckling, A., Rainey, P. B.** (2002) The role of parasites in sympatric and allopatric host diversification. *Nature* **420**, 496-499.
- Buckling, A., Wills, M. A., Colegrave, N.** (2003) Adaptation limits diversification of experimental bacterial populations. *Science* **302**, 2107-2109.

- Bull, J. J., Rice, W. R.** (1991) Distinguishing mechanisms for the evolution of cooperation. *Journal of Theoretical Biology* **149**, 63-74.
- Burdon, J. J., Gibson, A. H., Searle, S. D., Woods, M. J., Brockwell, J.** (1999) Variation in the effectiveness of symbiotic associations between native rhizobia and temperate Australian Acacia: within-species interactions. *Journal of Applied Ecology* **36**, 398-408.
- Caetano-Anolles, G., Lagares, A., Favelukes, A. G.** (1989) Adsorption of *Rhizobium meliloti* to alfalfa roots: Dependence on divalent cations and pH. *Plant and Soil* **117**.
- Capelle, J., Neema, C.** (2005) Local adaptation and population structure at a micro-geographical scale of a fungal parasite on its host plant. *Journal of Evolutionary Biology* **18**, 1445-1454.
- Carelli, M., Gnocchi, S., Fancelli, S., et al.** (2000) Genetic diversity and dynamics of *Sinorhizobium meliloti* populations nodulating different alfalfa cultivars in Italian soils. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 4785-4789.
- Castro, S., Carrera, I., Martinez-Drets, G.** (2000) Methods to evaluate nodulation competitiveness between *Sinorhizobium meliloti* strains using melanin production as a marker. *Journal of Microbiological Methods* **41**, 173-177.
- Cebula, T. A., Le Clerc, J. E.** (1997) Hypermutability and homeologous recombination: Ingredients for rapid evolution. *Bulletin de l'Institut Pasteur* **95**, 97-106.
- Charles, T. C., Finan, T. M.** (1991) Analysis of a 1600-kilobase *Rhizobium meliloti* megaplasmid using defined deletions generated in vivo. *Genetics* **127**, 5-20.
- Chen, W. P., Kuo, T. T.** (1993) A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research* **21**, 2260.
- Cheng, H. P., Walker, G. C.** (1998) Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* **180**, 5183-5191.
- Cohan, F. M.** (2001) Bacterial species and speciation. *Systematic Biology* **50**, 513-524.
- Cohan, F. M., Perry, E. B.** (2007) A systematics for discovering the fundamental units of bacterial diversity. *Current Biology* **17**, R373-386.
- Colwell, R. K.** (2006) EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 8.
- Cook, D. R.** (1999) *Medicago truncatula*- a model in the making. *Current opinion in plant biology* **2**, 301-304.
- Cooper, T. F., Rozen, D. E., Lenski, R. E.** (2003) Parallel changes in gene expression after 20,000 generations of evolution in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 1072-1077.

- Cooper, V. S., Bennett, A. F., Lenski, R. E.** (2001) Evolution of thermal dependence of growth rate of *Escherichia coli* populations during 20,000 generations in a constant environment. *Evolution* **55**, 889-896.
- Cooper, V. S., Lenski, R. E.** (2000) The population genetics of ecological specialization in evolving *Escherichia coli* populations. *Nature* **407**, 736-739.
- Crespi, B. J.** (2000) The evolution of maladaptation. *Heredity* **84**, 623-629.
- Crozat, E., Philippe, N., Lenski, R. E., Geiselmann, J., Schneider, D.** (2005) Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. XII. DNA topology as a key target of selection. *Genetics* **169**, 523-532.
- Da, H. N., Deng, S. P.** (2003) Survival and persistence of genetically modified *Sinorhizobium meliloti* in soil. *Applied Soil Ecology* **22**, 1-14.
- Dalton, H.** (1980) The cultivation of diazotrophic microorganisms. In: *Methods for evaluating biological nitrogen fixation* (ed. Bergensen FJ), pp. 13-64. John Wiley and Sons, New York.
- Day, T.** (2000) Competition and the effect of spatial resource heterogeneity on evolutionary diversification. *American Naturalist* **155**, 790-803.
- De Lajudie, P., Willems, A., Pot, B., et al.** (1994) Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**, 715-733.
- De Meaux, J., Cattan-Toupance, I., Lavigne, C., Langin, T., Neema, C.** (2003) Polymorphism of a complex resistance gene candidate family in wild populations of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Argentina: comparison with phenotypic resistance polymorphism. *Molecular Ecology* **12**, 263-273.
- Decaestecker, E., Gaba, S., Raeymaekers, J. A., et al.** (2007) Host-parasite 'Red Queen' dynamics archived in pond sediment. *Nature* **450**, 870-873.
- del Papa, M. F., Balague, L. J., Sowinski, S. C., et al.** (1999) Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia present in acidic soils of central Argentina and Uruguay. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 1420-1427.
- Denison, R. F.** (2000) Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia. *American Naturalist* **156**, 567-576.
- Denton, M. D., Coventry, D. R., Murphy, P. J., Howieson, J. G., Bellotti, W. D.** (2002) Competition between inoculant and naturalised *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii for nodulation of annual clovers in alkaline soils. *Australian Journal of Agricultural Research* **53**, 1019-1026.
- Denton, M. D., Hill, C. R., Bellotti, W. D., Coventry, D. R.** (2007) Nodulation of *Medicago truncatula* and *Medicago polymorpha* in two pastures of contrasting soil pH and rhizobial populations. *Applied Soil Ecology* **35**, 441-448.

- Depret, G., Houot, S., Allard, M. R., et al.** (2004) Long-term effects of crop management on *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae populations. *FEMS Microbiology Ecology* **51**, 87-97.
- Depret, G., Laguerre, G.** (2008) Plant phenology and genetic variability in root and nodule development strongly influence genetic structuring of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae populations nodulating pea. *New Phytologist* **179**, 224-235.
- Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., et al.** (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defense, a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* **3**, 371-390.
- Dowling, D. N., Broughton, W. J.** (1986) Competition for nodulation of legumes. *Annual Review of Microbiology* **40**, 131-157.
- Downie, J. A.** (1998) Functions of rhizobial nodulation genes. In: *The Rhizobiaceae* (eds. Spink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ), pp. 387-402. Kluwer academic publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Drake, J.** (1991) A Constant Rate of Spontaneous Mutation in DNA-Based Microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 7160-7164.
- Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., Crow, J. F.** (1998) Rates of Spontaneous Mutation. *Genetics* **148**, 1667-1686.
- Dreyfus, B., Garcia, J. L., Gillis, M.** (1988) Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen.nov., sp.nov., a stem nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**, 89-98.
- Eaglesham, A. R. J., Ahmad, M. H., Hassouna, S., Goldman, B. J.** (1982) Cowpea rhizobia producing dark nodules: use in competition studies. *Applied and Environmental Microbiology* **44**, 611-618.
- Eardly, B. D., Materon, L. A., Smith, N. H., et al.** (1990) Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 187-194.
- Eggenhofer, E., Rachel, R., Haslbeck, M., Scharf, B.** (2006) *MotD* of *Sinorhizobium meliloti* and related alpha-proteobacteria is the flagellar-hook-length regulator and therefore reassigned as *FliK*. *Journal of Bacteriology* **188**, 2144-2153.
- Ehrlich, P. R., Raven, P. H.** (1964) Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* **18**, 586-608.
- Elena, S. F., Lenski, R. E.** (2003) Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nature Reviews Genetics* **4**, 457-469.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S.** (2005a) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* **1**, 47-50.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S.** (2005b) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**, 47-50.
- Faria, S. M., Lewis, G. P., Sprent, J., Sutherland, J. M.** (1989) Occurrence of nodulation in the *Leguminosae*. *New Phytologist* **111**, 607-619.

- Fauvart, M., Michiels Jan** (2008) Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium-legume symbiosis. *FEMS Microbiology Letters* **285**, 1-9.
- Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P., Spratt, B. G.** (2004) eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology* **186**, 1518-1530.
- Ferriere, R., Bronstein, J. L., Rinaldi, S., Law, R., Gauduchon, M.** (2002) Cheating and the evolutionary stability of mutualisms. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **269**, 773-780.
- Fierer, N., Jackson, R. B.** (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 626-631.
- Fierer, N., Morse, J. L., Berthrong, S. T., Bernhardt, E. S., Jackson, R. B.** (2007) Environmental controls on the landscape-scale biogeography of stream bacterial communities. *Ecology* **88**, 2162-2173.
- Fischer, H. M.** (1994) Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **58**, 352-386.
- Frey, S., Blum, L.** (1994) Effect of pH on competition for nodule occupancy by type I and type II strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. *Plant Soil* **163**, 157-164.
- Frugoli, J., Harris, J.** (2001) *Medicago truncatula* on the move! *Plant Cell* **13**, 458-463.
- Fuhrman, J. A., Hewson, I., Schwalbach, M. S., et al.** (2006) Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 13104-13109.
- Fuhrman, J. A., Steele, J. A., Hewson, I., et al.** (2008) A latitudinal diversity gradient in planktonic marine bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 7774-7778.
- Fujishige, N. A., Kapadia, N. N., De Hoff, P. L., Hirsch, A. M.** (2006) Investigations of rhizobium biofilm formation. *FEMS Microbiology Ecology* **56**, 195-206.
- Gage, D. J.** (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**, 280-300.
- Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., et al.** (2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**, 668-672.
- Gandon, S., Buckling, A., Decaestecker, E., Day, T.** (2008) Host - parasite coevolution and patterns of adaptation across time and space. *Journal of Evolutionary Biology* **21**, 1861-1866.
- Gandon, S., Michalakis, Y.** (2002) Local adaptation, evolutionary potential and host-parasite coevolution: interactions between migration, mutation, population size and generation time. *Journal of Evolutionary Biology* **15**, 451-462.

- Garau, G., Reeve, W. G., Brau, L., 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 Soil* **276**, 263-277.
- Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., et al.** (2007) Legumes symbioses: absence of nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science* **316**, 1307-1312.
- Giuntini, E., Mengoni, A., De Filippo, C., et al.** (2005) Large-scale genetic variation of the symbiosis-required megaplasmid pSymA revealed by comparative genomic analysis of *Sinorhizobium meliloti* natural strains. *BMC Genomics* **6**, 158.
- Gobat, J. M., Aragno, M., Willey, M.** (1998) *Le sol vivant*, Lausanne.
- Goddard, M. R., Godfray, H. C., Burt, A.** (2005) Sex increases the efficacy of natural selection in experimental yeast populations. *Nature* **434**, 636-640.
- Gonzalez-Sama, A., Lucas, M. M., de Felipe, M. R., Pueyo, J. J.** (2004) An unusual infection mechanism and nodule morphogenesis in white lupin (*Lupinus albus*). *New Phytologist* **163**, 371-380.
- Gotelli, N. J., Colwell, R. K.** (2001) Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* **4**, 379-391.
- Graham, P. H., Vance, C. P.** (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology* **131**, 872-877.
- Greenwood, R. M.** (1964) Populations of rhizobia in New Zealand soils. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association 26th Annual conference*, 95-101.
- Guo, H., Sun, S., Finan, T. M., Xu, J.** (2005) Novel DNA sequences from natural strains of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 7130-7138.
- Guo, X., Flores, M., Mavingui, P., et al.** (2003) Natural genomic design in *Sinorhizobium meliloti*: novel genomic architectures. *Genome Research* **13**, 1810-1817.
- Guo, X., Flores, M., Morales, L., et al.** (2007) DNA diversification in two *Sinorhizobium* species. *Journal of Bacteriology* **189**, 6474-6476.
- Hafner, M. S., Nadler, S. A.** (1988) Phylogenetic trees support the coevolution of parasites and their hosts. *Nature* **332**, 258-259.
- Hahn, M., Studer, D.** (1986) Competitiveness of a *nif* *Bradyrhizobium japonicum* mutant against the wild-type strain. *FEMS Microbiology Letters* **33**, 143-148.
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P.** (2005) Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiology* **13**, 7-10.
- Hamilton, W. D., Axelrod, R., Tanese, R.** (1990) Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 3566-3573.

- Hardy, O. J., Vekemans, X.** (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* **2**, 618-620.
- Harrisson, S. P., Young, J. P., Jones, D. G.** (1989) *Rhizobium* population genetics: Host preference and strain competition effects on the range of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii genotypes isolated from natural populations. *Soil Biology and Biochemistry* **21**, 981-986.
- Hartmann, A., Giraud, J. J., Catroux, G.** (1998) Genotypic diversity of *Sinorhizobium* (formerly *Rhizobium*) *meliloti* strains isolated directly from a soil and from nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) grown in the same soil. *FEMS Microbiology Ecology* **25**, 107-116.
- Haubold, B., Hudson, R. R.** (2000) LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Bioinformatics* **16**, 847-849.
- Heath, K. D., Tiffin, P.** (2007) Context dependence in the coevolution of plant and rhizobial mutualists. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **274**, 1905-1912.
- Herfort, L., Schouten, S., Abbas, B., et al.** (2007) Variations in spatial and temporal distribution of Archaea in the North Sea in relation to environmental variables. *FEMS Microbiology Ecology* **62**, 242-257.
- Herridge, D. F.** (2007) Inoculation technology for legumes. In: *Nitrogen-fixing leguminous symbioses* (ed. Netherlands S), pp. 77-115.
- Hill, T. C. J., Walsh, K. A., Harris, J. A., Moffett, B. F.** (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology* **43**, 1-11.
- Hirsch, P. R., Spokes, J. D.** (1994) Survival and dispersion of genetically modified rhizobia in the field and genetic interactions with native strains. *FEMS Microbiology Ecology* **15**, 147-160.
- Hoffmeister, M., Martin, W.** (2003) Interspecific evolution: microbial symbiosis, endosymbiosis and gene transfer. *Environmental Microbiology* **5**, 641-649.
- Hong, H., Pruden, A., Reardon, K. F.** (2007) Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. *Journal of Microbiological Methods* **69**, 52-64.
- Hornstrom, E.** (2002) Phytoplankton in 63 limed lakes in comparison with the distribution in 500 untreated lakes with varying pH. *Hydrobiologia* **470**, 115-126.
- Horz, H.-P., Barbrook, A., Field, C. B., Bohannan, B. J. M.** (2004) Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 15136-15141.
- Howe, G. T., Brunner, A. M.** (2005) An evolving approach to understand plant adaptation. *New Phytologist* **167**, 1-5.
- Howieson, J. G.** (1999) The host-rhizobia relationship. In: *Genetic Resources of Mediterranean Pasture and Forage Legume* (eds. Bennett AF, Cocks PS), pp. 96-106. Kluwer academic publishers, Netherlands.

- Hughes, J. B., Hellmann, J. J., Ricketts, T. H., Bohannon, B. J. M.** (2001) Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 4399-4406.
- Hunt, D. E., David, L. A., Gevers, D., et al.** (2008) Resource partitioning and sympatric differentiation among closely related bacterioplankton. *Science* **320**, 1081-1085.
- Imhof, M., Schlotterer, C.** (2001) Fitness effects of advantageous mutations in evolving *Escherichia coli* populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 1113-1117.
- Jebara, M., Mhamdi, R., Aouani, M. E., Ghrir, R., Mars, M.** (2001) Genetic diversity of *Sinorhizobium* populations recovered from different *Medicago* varieties cultivated in Tunisian soils. *Canadian Journal of Microbiology* **47**, 139-147.
- Johannsen, W.** (1903) Professor Johannsen's experiments in heredity. *New Phytologist* **2**, 235-242.
- Jones, K. M., Lloret, J., Daniele, J. R., Walker, G. C.** (2007) The type IV secretion system of *Sinorhizobium meliloti* strain 1021 is required for conjugation but not for intracellular symbiosis. *Journal of Bacteriology* **189**, 2133-2138.
- Jordan, D.** (1981) Reduction of the nodulation barrier in *Medicago laciniata* by alteration of the root temperature. *Plant and Soil* **61**, 93-111.
- Joshi, J., Schmid, B., Caldeira, M. C., et al.** (2001) Local adaptation enhances performance of common plant species. *Ecology Letters* **4**, 536-544.
- Jousselin, E., Rasplus, J. Y., Kjellberg, F.** (2003) Convergence and coevolution in a mutualism: evidence from a molecular phylogeny of *Ficus*. *Evolution* **57**, 1255-1269.
- Kaltz, O., Gandon, S., Michalakis, Y., Shykoff, J. A.** (1999) Local maladaptation in the anther-smut fungus *Microbotryum violaceum* to its host plant *Silene latifolia*: Evidence from a cross-inoculation experiment. *Evolution* **53**, 395-407.
- Kaltz, O., Shykoff, J. A.** (1998) Local-adaptation in host-parasite system. *Heredity* **81**, 361-370.
- Kassen, R.** (2002) The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity. *Journal of Evolutionary Biology* **15**, 173-190.
- Kawecki, T. J., Ebert, D.** (2004) Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* **7**, 1225-1241.
- Kellogg, C. A., Griffin, D. W.** (2006) Aerobiology and the global transport of desert dust. *Trends in Ecology and Evolution* **21**, 638-644.
- Keyser, H. H., Cregan, P. B.** (1987) Nodulation and competition for nodulation of selected soybean genotypes among *Bradyrhizobium japonicum* serogroup 123 isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 2631-2635.
- Kibota, T. T., Lynch, M.** (1996) Estimate of the genomic mutation rate deleterious to overall fitness in *E. coli*. *Nature* **381**, 694-696.

- Kielak, A., Pijl, A. S., van Veen, J. A., Kowalchuk, G. A. (2008) Differences in vegetation composition and plant species identity lead to only minor changes in soil-borne microbial communities in a former arable field. *FEMS Microbiology Ecology* **63**, 372-382.
- Kiers, E. T., Hutton, M. G., Denison, R. F. (2007) Human selection and the relaxation of legume defences against ineffective rhizobia. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*.
- Kiers, E. T., Rousseau, R. A., Denison, R. F. (2006) Measured sanctions: legume hosts detect quantitative variation in rhizobium cooperation and punish accordingly. *Evolutionary Ecology Research* **8**, 1077-1086.
- Kiers, E. T., Rousseau, R. A., West, S. A., Denison, R. F. (2003) Host sanctions and the legume-rhizobium mutualism. *Nature* **425**, 78-81.
- King, S., McCord, B. R., Riefler, R. G. (2005) Capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism analysis for monitoring soil bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **60**, 83-92.
- Koepfel, A., Perry, E. B., Sikorski, J., *et al.* (2008) Identifying the fundamental units of bacterial diversity: a paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 2504-2509.
- Krishnan, H. B., Pueppke, S. G. (1991) Sequence and analysis of the *nodABC* region of *Rhizobium fredii* USDA257, a nitrogen-fixing symbiont of soybean and other legumes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **4**, 512-520.
- Kroes, I., Lepp, P. W., Relman, D. A. (1999) Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 14547-14552.
- Kuhner, M. K. (2006) LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics* **22**, 768-770.
- Lavin, M., Herendeen, P. S., Wojciechowski, M. F. (2005) Evolutionary rates analysis of *Leguminosae* implicates a rapid diversification of lineages during the tertiary. *Systematic Biology* **54**, 575-594.
- Lawrence, J. G., Ochman, H. (1998) Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 9413-9417.
- Lazrek, F., Roussel, V., Ronfort, J., *et al.* (2008) The use of neutral and non-neutral SSRs to analyse the genetic structure of a Tunisian collection of *Medicago truncatula* lines and to reveal associations with eco-environmental variables. *Genetica (in press)*.
- Lechene, C. P., Luyten, Y., McMahon, G., Distel, D. L. (2007) Quantitative imaging of nitrogen fixation by individual bacteria within animal cells. *Science* **317**, 1563-1566.
- Leebens-Mack, J., Pellmyr, O. (2004) Patterns of genetic structure among populations of an oligophagous pollinating yucca moth (*Tegeticula yuccasella*). *The journal of Heredity* **95**, 127-135.

- Lenski, R., Travisano, M.** (1994) Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000 generation experiment with bacterial populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 6808-6814.
- Lesins, K. A., Lesins, I.** (1979) *Genus Medicago (Leguminosae), a taxonomic study*, The Hague.
- Lodwig, E. M., Hosie, A. H. F., Bourdès, A., et al.** (2003) Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume -*Rhizobium* symbiosis. *Nature* **422**, 722-726.
- Lozupone, C. A., Knight, R.** (2007) Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 11436-11440.
- Lugovstev, V. Y., Vodeko, G., Strupczewski, C. M., Levandowski, D. A.** (2004) Simple and rapide strategy for genetic characterization of influenza B virus reassortants. *Journal of Virological Methods* **124**, 203-210.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J.** (1997) *Brock Biology of Microorganisms* Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Marie, C., Deakin, W. J., Viprey, V., et al.** (2003) Characterization of *Nops*, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 743-751.
- Martiny, J. B. H., Bohannan, B. J. M., Brown, J. H., et al.** (2006) Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology* **4**, 102-112.
- Mavingui, P., Flores, M., Guo, X., et al.** (2002) Dynamics of genome architecture in *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Journal of Bacteriology* **184**, 171-176.
- Maynard Smith, J., Smith, N. H., O'Rourke, M., Spratt, B. G.** (1993) How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 4384-4388.
- Mazodier, P., Davies, J.** (1991) Gene transfer between distantly related bacteria. *Annual Review of Genetics* **25**, 147-171.
- McCoy, K., Bouludier, T., Schorring, S., Michalakis, Y.** (2002) Local adaptation of the ectoparasite *Ixodes uriae* to its seabird host. *Evolutionary Ecology Research* **4**, 441-456.
- McInnes, A., Thies, J. E., Abbott, L. K., Howieson, J. G.** (2004) Structure and diversity among rhizobial strains, populations and communities-a review. *Soil Biology and Biochemistry* **36**, 1295-1308.
- Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., et al.** (2006) Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 5230-5235.
- Michaud, R., Lehman, W., Rumbaugh, M. D.** (1988) World distribution and historical development. In: *Alfalfa and alfalfa improvement* (eds. Hanson AA, Barnes DK, Hill RR), pp. 25-91. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI.

- Miletto, M., Loy, A., Antheunisse, A. M., *et al.* (2008) Biogeography of sulfate-reducing prokaryotes in river floodplains. *FEMS Microbiology Ecology* **64**, 395-406.
- Miller, L. D., Yost, C. K., Hynes, M. F., Alexandre, G. (2007a) The major chemotaxis gene cluster of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is essential for competitive nodulation. *Molecular Microbiology* **63**, 348-362.
- Miller, S. H., Elliot, R. M., Sullivan, J. T., Ronson, C. W. (2007b) Host-specific regulation of symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Microbiology* **153**, 3184-3195.
- Mnasri, B., Mrabet, M., Laguerre, G., Aouani, M. E., Mhamdi, R. (2007) Salt-tolerant rhizobia isolated from a Tunisian oasis that are highly effective for symbiotic N(2)-fixation with *Phaseolus vulgaris* constitute a novel biovar (bv. *mediterranense*) of *Sinorhizobium meliloti*. *Archives of Microbiology* **187**, 79-85.
- Moawad, H. A., Ellis, W. R., Schmidt, E. L. (1984) Rhizosphere response as a factor in competition among three serogroups of indigenous *Rhizobium japonicum* for nodulation of field-grown soybeans. *Applied and Environmental Microbiology* **47**, 607-612.
- Mopper, S., Stiling, P., Landau, K., Simberloff, D., Van Zandt, p. (2000) Spatiotemporal variation in leafminer population structure and adaptation to individual oak trees. *Ecology* **81**, 1577-1587.
- Moran, N. A., Wernegreen, J. J. (2000) Lifestyle evolution in symbiotic bacteria: insights from genomics. *Trends in Ecology and Evolution* **15**, 321-326.
- Mougel, C., Offre, P., Ranjard, L., *et al.* (2006) Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5. *New Phytologist* **170**, 165-175.
- Mueller, U. G., Lipari, S. E., Milgroom, M. G. (1996) Amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting of symbiotic fungi cultured by the fungus-growing ant *Cyphomyrmex minutus*. *Molecular Ecology* **5**, 119-122.
- Nicholas, K. B., Nicholas, H. J., Deerfield, D. W. I. (1997) Genedoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMB news* **4**.
- Normand, P., Lapierre, P., Tisa, L. S., *et al.* (2007) Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography. *Genome Research* **17**, 7-15.
- Olivieri, I., Frank, S. A. (1994) The evolution of nodulation in *Rhizobium*: altruism in the rhizosphere. *Journal of Heredity* **85**, 46-47.
- Oresnik, I. J., Liu, S.-L., Yost, C. K., Hynes, M. F. (2000) Megaplasmid pRme2011a of *Sinorhizobium meliloti* is not required for viability. *Journal of Bacteriology* **182**, 3582-3586.
- Orr, H. A. (1998) The population genetics of adaptation: the distribution of factors fixed during adaptive evolution. *Evolution* **52**, 935-949.
- Osei Yaw Ampomah, J. B. J., T. V. Bhuvaneshwari, (2008) Lack of trehalose catabolism in *Sinorhizobium* species increases their nodulation competitiveness on certain host genotypes. *New Phytologist* **179**, 495-504.

- Paau, A. S., Bloch, C. B., Brill, W. J.** (1980) Developmental fate of *Rhizobium meliloti* bacteroids in alfalfa nodules. *Journal of Bacteriology* **143**, 1480-1490.
- Paffetti, D., Daguin, F., Fancelli, S., et al.** (1998) Influence of plant genotype on the selection of nodulating *Sinorhizobium meliloti* strains by *Medicago sativa*. *Antonie van Leeuwenhoek* **V73**, 3-8.
- Paffetti, D., Scotti, C., Gnocchi, S., Fancelli, S., Bazzicalupo, M.** (1996) Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2279-2285.
- Papadopoulos, D., Schneider, D., Meier-Eiss, J., et al.** (1999) Genomic evolution during a 10,000-generation experiment with bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 3807-3812.
- Pavoine, S., Bailly, X.** (2007) New analysis for consistency among markers in the study of genetic diversity: development and application to the description of bacterial diversity. *BMC Evolutionary Biology*.
- Pawlowski, K., Bisseling, T.** (1996) Rhizobial and actinorhizal symbioses: What are the shared features? *Plant Cell* **8**, 1899-1913.
- Pellock, B. J., Cheng, H.-P., Walker, G. C.** (2000) Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *Journal of Bacteriology* **182**, 4310-4318.
- Pelosi, L., Kuhn, L., Guetta, D., et al.** (2006) Parallel changes in global protein profiles during long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. *Genetics* **173**, 1851-1869.
- Perez-Ramirez, N. O., Rogel, A., M., et al.** (1998) Seeds of *Phaseolus vulgaris* carry *Rhizobium etli*. *FEMS Microbiology Ecology* **26**, 289-296.
- Petit, R., El Mousadik, A., Pons, O.** (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* **12**, 844-855.
- Pielou, E. C.** (1975) *Ecological diversity* Wiley, New York, N.Y.
- Pistorio, M., Giusti, M. A., Del Papa, M. F., et al.** (2008) Conjugal properties of the *Sinorhizobium meliloti* plasmid mobilome. *FEMS Microbiology Ecology* **65**, 372-382.
- Poole, P., Allaway, D.** (2000) Carbon and nitrogen metabolism in *Rhizobium*. *Advances in Microbial Physiology* **43**, 117-163.
- Prell, J., Poole, P.** (2006) Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiology* **14**, 161-168.
- Provorov, N. A.** (1998) Coevolution of rhizobia with legumes : Facts and hypotheses. *Symbiosis* **24**, 336-367.
- Pueppke, S. G., Broughton, W. J.** (1999) *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**, 293-318.

- Quiros, C. F., Bauchan, G. R.** (1988) The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex. In: *Alfalfa and alfalfa improvement* (eds. Hanson AA, Barnes DK, Hill RR), pp. 93-124. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI.
- Rangin, C., Brunel, B., Cleyet-Marel, J.-C., Perrineau, M.-M., Bena, G.** (2008) Effects of *Medicago truncatula* genetic diversity, rhizobial competition and strain effectiveness on the diversity of a natural *Sinorhizobium* spp. community. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM.01107-01108.
- Raymond, M., Rousset, F.** (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Ren, J.** (2000) High-throughput single-strand conformation polymorphism analysis by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **741**, 115-128.
- Revellin, C., Meunier, G., Giraud, J. J., et al.** (2000) Changes in the physiological and agricultural characteristics of peat-based *Bradyrhizobium japonicum* inoculants after long-term storage. *Applied Microbiology and Biotechnology* **54**, 206-211.
- Rinaudi, L., Fujishige, N. A., Hirsch, A. M., et al.** (2006) Effects of nutritional and environmental conditions on *Sinorhizobium meliloti* biofilm formation. *Research in Microbiology* **157**, 867-875.
- Robert, F. M., Schmidt, E. L.** (1983) Population changes and persistence of *Rhizobium phaseoli* in soil and rhizospheres. *Applied and Environmental Microbiology* **45**, 550-556.
- Robleto, E. A., Kmiecik, K., Oplinger, E. S., Nienhuis, J., Triplett, E. W.** (1998) Trifolitoxin production increases nodulation competitiveness of *Rhizobium etli* CE3 under agricultural conditions. *Applied of Environmental Microbiology* **64**, 2630-2633.
- Robleto, E. A., Scupham, A. J., Triplett, E. W.** (1997) Trifolitoxin production in *Rhizobium etli* strain CE3 increases competitiveness for rhizosphere colonization and root nodulation of *Phaseolus vulgaris* in soil. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**, 228-233.
- Roesch, L. F., Fulthorpe, R. R., Riva, A., et al.** (2007) Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *Isme Journal* **1**, 283-290.
- Rome, S., Fernandez, M. P., Brunel, B., Normand, P., Cleyet-Marel, J. C.** (1996) *Sinorhizobium medicae* sp nov, isolated from annual *Medicago* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 972-980.
- Romero, D., Palacios, R.** (1997) Gene amplification and genomic plasticity in prokaryotes. *Annual Review of Genetics* **31**, 91-111.
- Ronfort, J., Bataillon, T., Santoni, S., et al.** (2006) Microsatellite diversity and broad scale geographic structure in a model legume: building a set of nested core collection for studying naturally occurring variation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology* **6**, 28.
- Roumiantseva, M. L., Andronov, E. E., Sharypova, L. A., et al.** (2002) Diversity of *Sinorhizobium meliloti* from the central asian alfalfa gene center. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 4694-4697.

- Ruffel, S., Freixes, S., Balzergue, S., et al.** (2008) Systemic signaling of the plant nitrogen status triggers specific transcriptome responses depending on the nitrogen source in *Medicago truncatula*. *Plant physiology* **146**, 2020-2035.
- Schloss, P. D., Handelsman, J.** (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 1501-1506.
- Schnittler, M., Stephenson, S. L.** (2000) Myxomycete biodiversity in four different forest types in Costa Rica. *Mycologia* **92**, 626–637.
- Schwieger, F., Tebbe, C. C.** (1998) A new approach to utilize PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 4870-4876.
- Schwieger, F., Tebbe, C. C.** (2000) Effect of Field Inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the composition of bacterial communities in rhizospheres of a target plant (*Medicago sativa*) and a non-target plant (*Chenopodium album*). *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 3556-3565.
- Selbitschka, W., Arnold, W., Jording, D., et al.** (1995) The insertion sequence element ISRm2011-2 belongs to the IS630-Tc1 family of transposable elements and is abundant in *Rhizobium meliloti*. *Gene* **163**, 59-64.
- Selbitschka, W., Zekri, S., Schroder, G., Puhler, A., Toro, N.** (1999) The *Sinorhizobium meliloti* insertion sequence (IS) elements ISRm102F34-1/ISRm7 and ISRm220-13-5 belong to a new family of insertion sequence elements. *FEMS Microbiology Letters* **172**, 1-7.
- Sessitsch, A., Hardarson, G., de Vos, W. M., Wilson, K. J.** (1998) Use of marker genes in competition studies of *Rhizobium*. *Plant and Soil* **204**, 35-45.
- Shamseldin, A.** (2007) Use of DNA marker to select well-adapted *Phaseolus*-symbionts strains under acid conditions and high temperature. *Biotechnology Letters* **29**, 37-44.
- Silva, C., Kan, F. L., Martínez-Romero, E.** (2007) Population genetic structure of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* isolated from nodules of *Medicago spp.* in Mexico. *FEMS Microbiology Ecology* **60**, 477-489.
- Silva, C., Vinuesa, P., Ehuiarte, L. E., Souza, V., Martínez-Romero, E.** (2005) Evolutionary genetics and biogeographic structure of *Rhizobium gallicum sensu lato*, a widely distributed bacterial symbiont of diverse legumes. *Molecular Ecology* **14**, 4033-4050.
- Simms, E. L., Bever, J. D.** (1998) Evolutionary dynamics of rhizopine within spatially structured rhizobium populations. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **265**, 1713-1719.
- Simms, E. L., Taylor, D. L.** (2002) Partner choice in nitrogen-fixation mutualisms of legumes and rhizobia. *Integrative and Comparative Biology* **42**, 369-380.
- Simms, E. L., Taylor, D. L., Povich, J., et al.** (2006) An empirical test of partner choice mechanisms in a wild legume-rhizobium interaction. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **273**, 77-81.

- Simsek, S., Ojanen-Reuhs, T., Stephens, S. B., Reuhs, B. L.** (2007) Strain-ecotype specificity in *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago truncatula* symbiosis is correlated to succinoglycan oligosaccharide structure. *Journal of Bacteriology* **189**, 7733-7740.
- Siol, M., Prosperi, J. M., Bonnin, I., Ronfort, J.** (2008) How multilocus genotypic pattern helps to understand the history of selfing populations: a case study in *Medicago truncatula*. *Heredity* **100**, 517-525.
- Small, E., Jomphe, M.** (1988) A synopsis of the genus *Medicago* (*Leguminosae*). *Canadian Journal of Botany* **67**, 3260-3294.
- Smith, L. S., Long, S. R.** (1998) Requirements for *syrM* and *nodD* genes in the nodulation of *Medicago truncatula* by *Rhizobium meliloti*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 937-940.
- Somasegaran, P., Bohlool, B. B.** (1990) Single-strain versus multistrain inoculation: effect of soil mineral N availability on rhizobial strain effectiveness and competition for nodulation on chick-pea, soybean, and dry bean. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 3298-3303.
- Spaink, H. P.** (2000) Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Review of Microbiology* **54**, 257-288.
- Spichtig, M., Kawecki, T. J.** (2004) The maintenance (or not) of polygenic variation by soft selection in heterogeneous environments. *American Naturalist* **164**, 70-84.
- Sprent, J.** (2003) Plant biology: Mutual sanctions. *Nature* **422**, 672-674.
- StatSoft** (France 2001) STATISTICA (logiciel d'analyse de données), version 6. www.statsoft.com.
- Stepkowski, T., Legocki, A. B.** (2001) Reduction of bacterial genome size and expansion resulting from obligate intracellular lifestyle and adaptation to soil habitat. *Acta Biochimica Polonica* **48**, 367-381.
- Stougaard, J.** (2000) Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant physiology* **124**, 531-540.
- Sun, S., Guo, H., Xu, J.** (2006) Multiple gene genealogical analyses reveal both common and distinct population genetic patterns among replicons in the nitrogen-fixing bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology* **152**, 3245-3259.
- Sunnucks, P., Wilson, A. C., Beheregaray, L. B., et al.** (2000) SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology* **9**, 1699-1710.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S.** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1596-1599.
- Tarlera, S., Jangid, K., Ivester, A. H., Whitman, W. B., Williams, M. A.** (2008) Microbial community succession and bacterial diversity in soils during 77,000 years of ecosystem development. *FEMS Microbiology Ecology* **64**, 129-140.

- Tas, E., Leinonen, P., Saano, A., et al.** (1996) Assessment of competitiveness of rhizobia infecting *Galega orientalis* on the basis of plant yield, nodulation, and strain identification by antibiotic resistance and PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 529-535.
- Tellstrom, V., Usadel, B., Thimm, O., et al.** (2007) The lipopolysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* suppresses defense-associated gene expression in cell cultures of the host plant *Medicago truncatula*. *Plant physiology* **143**, 825-837.
- ter Braak, C. J. F., smilauer, P.** (2002) CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). *Microcomputer Power, Ithaca, NY*.
- Terpolilli, J. J., O'Hara, G. W., Tiwari, R. P., Dilworth, M. J., Howieson, J. G.** (2008) The model legume *Medicago truncatula* A17 is poorly matched for N₂ fixation with the sequenced microsymbiont *Sinorhizobium meliloti* 1021. *New Phytologist* **179**, 62-66.
- Thies, J. E., Woomer, P. L., Singleton, P. W.** (1995) Enrichment of *Bradyrhizobium* spp. populations in soil due to cropping of the homologous host legume. *Soil Biology and Biochemistry* **27**, 633-636.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G.** (1997) The clustal_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**, 4876-4882.
- Thompson, J. N.** (1999) The evolution of species interactions. *Science* **284**, 2116-2118.
- Thompson, J. N., Nuismer, S. L., Gomulkiewicz, R.** (2002) Coevolution and maladaptation. *Integrative and Comparative Biology* **42**, 381-387.
- Thurman, N. P., Bromfield, E. S. P.** (1988) Effect of variation within and between *Medicago* and *Melilotus* species on the composition and dynamics of indigenous populations of *Rhizobium meliloti*. *Soil Biology and Biochemistry* **20**, 31-38.
- Tian, C., Wang, E., Han, T., Sui, X., Chen, W.** (2007) Genetic diversity of rhizobia associated with *Vicia faba* in three ecological regions of China. *Archives of Microbiology* **188**, 273-282.
- Tindall, B. J.** (2008) The genus name *Sinorhizobium* (Chen et al. 1988) is a later synonym of *Ensifer Casida* 1982 and is not conserved over the latter genus name, and the species name '*Sinorhizobium adhaerens*' is not validly published. Opinion 84. *International Journal of Systematic Bacteriology* **58**, 1973.
- Tirichine, L., de Billy, F., Huguet, T.** (2000) *Mtsym6*, a gene conditioning *Sinorhizobium* strain-specific nitrogen fixation in *Medicago truncatula*. *Plant physiology* **123**, 845-851.
- Toro, A.** (1996) Nodulation competitiveness in the Rhizobium-legume symbiosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **12**, 157-162.
- Torsvik, V., Ovreas, L., Thingstad, T. F.** (2002) Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* **296**, 1064-1066.
- Travisano, M.** (1997) Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. VI. Environmental constraints on adaptation and divergence. *Genetics* **146**, 471-479.

- Travisano, M., Lenski, R. E.** (1996) Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. IV. Targets of selection and the specificity of adaptation. *Genetics* **143**, 15-26.
- Turner, G. L., Gibson, A. H.** (1980) Measurement of nitrogen fixation by indirect means. In: *Methods of evaluating biological nitrogen fixation* (ed. Bergersen FJ), pp. 111-138, Wiley, Chichester.
- Turner, S. L., Young, J. P.** (2000) The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Molecular Biology and Evolution* **17**, 309-319.
- Van Berkum, P., Badri, Y., Elia, P., Aouani, M. E., Eardly, B. D.** (2007) Chromosomal and symbiotic relationships of Rhizobia nodulating *Medicago truncatula* and *M. laciniata*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 7597-7604.
- Van Berkum, P., Elia, P., Eardly, B. D.** (2006) Multilocus sequence typing as an approach for population analysis of *Medicago*-nodulating rhizobia. *Journal of Bacteriology* **188**, 5570-5577.
- Van der Gucht, K., Cottenie, K., Muylaert, K., et al.** (2007) The power of species sorting: local factors drive bacterial community composition over a wide range of spatial scales. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 20404-20409.
- van Dillewijn, P., Soto, M. J., Villadas, P. J., Toro, N.** (2001) Construction and environmental release of a *Sinorhizobium meliloti* strain genetically modified to be more competitive for alfalfa nodulation. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 3860-3865.
- Van Valen, L.** (1973) A new evolutionary law. *Evolutionary Theory* **1**, 1-30.
- Vasse, J., de Billy, F., Camut, S., Truchet, G.** (1990) Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *Journal of Bacteriology* **172**, 4295-4306.
- Vavilov, N. I.** (1926) Centers of origin of cultivated plants. *Trends Pract. Bot. Genet. Sel.* **16**, 3-248.
- Venail, P. A., MacLean, R. C., Bouvier, T., et al.** (2008) Diversity and productivity peak at intermediate dispersal rate in evolving metacommunities. *Nature* **452**, 210-214.
- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., et al.** (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**, 66-74.
- Vial, L., Lavire, C., Mavingui, P., et al.** (2006) Phase variation and genomic architecture changes in *Azospirillum*. *Journal of Bacteriology* **188**, 5364-5373.
- Villegas, M. D. C., Rome, S., Maure, L., et al.** (2006) Nitrogen-fixing sinorhizobia with *Medicago laciniata* constitute a novel biovar (bv. medicaginis) of *S. meliloti*. *Systematic and Applied Microbiology* **29**, 526-538.
- Vincent, J. M.** (1970) *A manual for the practical study of root-nodule bacteria* Blackwell Scientific Publications Ltd, Oxford.
- Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D., Martinez-Romero, E.** (2005) Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in

- Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **34**, 29-54.
- Vulic, M., Dionisio, F., Taddei, F., Radman, M.** (1997) Molecular keys to speciation: DNA polymorphism and the control of genetic exchange in enterobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 9763-9767.
- Wang, E., Chen, W. X.** (2004) Estimation of biotic and abiotic factors that affect migration of rhizobia. In: *Biological Resources and Migration* (ed. Werner D), pp. 167-171. Springer Verlag, Berlin.
- Weir, B. S., Cockerham, C. C.** (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- Wernegreen, J., Riley, M.** (1999) Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages. *Molecular Biology and Evolution* **16**, 98-113.
- West, S. A., Kiers, E. T., Pen, I., Denison, R. F.** (2002a) Sanctions and mutualism stability: when should less beneficial mutualists be tolerated? *Journal of Evolutionary Biology* **15**, 830-837.
- West, S. A., Kiers, E. T., Simms, E. L., Denison, R. F.** (2002b) Sanctions and mutualism stability: why do rhizobia fix nitrogen? *Proc. R. Soc. B.* **269**, 685-694.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., Wiebe, W. J.** (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 6578-6583.
- Wielbo, J., Marek-Kozaczuk, M., Kubik-Komar, A., Skorupska, A.** (2007) Increased metabolic potential of *Rhizobium* spp. is associated with bacterial competitiveness. *Canadian Journal of Microbiology* **53**, 957-967.
- Wilkinson, H. H., Parker, M. A.** (1996) Symbiotic specialization and the potential for genotypic coexistence in a plant-bacterial mutualism. *Oecologia* **108**, 361-367.
- Wilkinson, H. H., Spoerke, J. M., Parker, M. A.** (1996a) Divergence in symbiotic compatibility in a legume- bradyrhizobium mutualism. *Evolution* **50**, 1470-1477.
- Williams, A., Wilkinson, A., Krehenbrink, M., et al.** (2008) Glucomannan-mediated attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hairs is required for competitive nodule infection. *Journal of Bacteriology* **190**, 4706-4715.
- Wong, K., Golding, G. B.** (2003) A phylogenetic analysis of the pSymB replicon from the *Sinorhizobium meliloti* genome reveals a complex evolutionary history. *Canadian Journal of Microbiology* **49**, 269-280.
- Woomer, P., Singleton, P. W., Bohlool, B. B.** (1988) Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 1112-1116.
- Wright, J. P. W., Johnston, A. W. B.** (1951) The genetical structure of populations. *Annual Eugenics* **15**, 323-354.

- Yannarell, A. C., Triplett, E. W.** (2005) Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 227-239.
- Yeager, C. M., Kornosky, J. L., Housman, D. C., et al.** (2004) Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 973-983.
- Yergeau, E., Bokhorst, S., Huiskes, A. H., et al.** (2007a) Size and structure of bacterial, fungal and nematode communities along an Antarctic environmental gradient. *FEMS Microbiology Ecology* **59**, 436-451.
- Yergeau, E., Kowalchuk, G. A.** (2008) Responses of Antarctic soil microbial communities and associated functions to temperature and freeze-thaw cycle frequency. *Environmental Microbiology*.
- Yergeau, E., Newsham, K. K., Pearce, D. A., Kowalchuk, G. A.** (2007b) Patterns of bacterial diversity across a range of Antarctic terrestrial habitats. *Environmental Microbiology* **9**, 2670-2682.
- Young, J. P., Mutch, L. A., Ashford, D. A., Zézé, A., Mutch, K. E.** (2003) The molecular evolution of host specificity in the rhizobium-legume symbiosis. In: *Genes in the Environment* (eds. Hails R, Godfray HJC, Beringer JE), pp. 245-257. Blackwell Science, Oxford.
- Young, J. P. W.** (1992) Phylogenetic classification of nitrogen fixing-organisms. In: *Biological nitrogen fixation* (eds. Stacey G, Burris RH, Evans HJ), pp. 43-86. Chapman & Hall, New York.
- Young, N. D., Cannon, S. B., Sato, S., et al.** (2005) Sequencing the genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant physiology* **137**, 1174-1181.
- Zhang, Q., Zhang, L., Wei, S. Q., Li, Y. B., Zhang, C.** (2007) Effects of Ca²⁺ on acid tolerance of *Medicago sativa* and *Rhizobium meliloti*. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* **18**, 1231-1236.
- Zribi, K., Mhamdi, R., Huguet, T., Aouani, M. E.** (2004) Distribution and genetic diversity of rhizobia nodulating natural populations of *Medicago truncatula* in tunisian soils. *Soil Biology and Biochemistry* **36**, 903-908.
- Zul, D., Denzel, S., Kotz, A., Overmann, J.** (2007) Effects of plant biomass, plant diversity, and water content on bacterial communities in soil lysimeters: implications for the determinants of bacterial diversity. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 6916-6929.
- Zwirgmaier, K., Jardillier, L., Ostrowski, M., et al.** (2008) Global phylogeography of marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* reveals a distinct partitioning of lineages among oceanic biomes. *Environmental Microbiology* **10**, 147-161.

TITRE : Phylogéographie, compétition et sélection chez les bactéries symbiotiques *Sinorhizobium meliloti* et *Sinorhizobium medicae*.

RESUME

Les deux espèces bactériennes, *Sinorhizobium meliloti* et *S. medicae* forment une symbiose efficace avec *Medicago truncatula*, tout en présentant un polymorphisme de fixation d'azote. Nous n'avons pas pu confirmer dans ce modèle l'existence de mécanismes de sanction des symbiotes non-fixateurs décrits théoriquement et expérimentalement chez d'autres couples symbiotiques. Les deux espèces bactériennes pourraient alors être maintenues en sympatrie avec la même plante-hôte du fait d'avantages sélectifs différents : *S. meliloti* serait plus compétitrice pour la nodulation de la plante, alors que *S. medicae* présenterait un plus fort potentiel de fixation. Essentiellement du fait de son fort taux de recombinaison, *S. medicae* est l'espèce présentant le plus de diversité génotypique. A l'échelle du bassin méditerranéen *S. medicae* a une structure panmictique se rapprochant d'une métapopulation, expliquant le profil phylogéographique décelé sur cette espèce. Sa forte expansion démographique pourrait également suggérer une spécialisation symbiotique en cours. *S. meliloti* a une structure génétique épidémique, avec de probables adaptations locales, mais qui n'ont pas pu être décelées. Aucun isolement par la distance ne permet d'expliquer la répartition spatiale de la diversité bactérienne, tant intra- que interspécifique. Cependant, certains paramètres physico-chimiques du sol, ainsi que le couvert végétal, même à l'échelle de la lignée, ont une influence sur la structuration de la diversité bactérienne. Des manipulations d'évolution expérimentale ont été entreprises pour évaluer l'impact de la plante-hôte sur la capacité mutationnelle de ces bactéries symbiotiques associées.

Mots-clefs : rhizobia, coévolution, distribution spatiale, sanction, diversité, métapopulation.

TITLE : Phylogeography, competition and selection in the symbiotic bacteria *Sinorhizobium meliloti* and *Sinorhizobium medicae*.

ABSTRACT:

The two bacterial species, *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* form an efficient symbiosis with *Medicago truncatula*, while presenting a polymorphism for nitrogen fixation. We could not confirm in this biological model the existence of mechanisms of sanctions against non-fixing symbionts, theoretically and experimentally described for other symbiotic couples. Both bacterial species might then be maintained in sympatry with the same plant-host because of different selective advantages: *S. meliloti* would be more competitive for plant nodulation, while *S. medicae* would present a better potential of fixation. Mostly because of its strong rate of recombination, *S. medicae* is the species presenting the more genotypic diversity. At the scale of the Mediterranean basin, *S. medicae* show a panmictic structure converging towards a metapopulation structuration, explaining the phylogeographic pattern revealed on this species. Its strong demographic expansion could also suggest an ongoing symbiotic specialization. *S. meliloti* displays an epidemic genetic structure, with possible local adaptations that however could not be proven. Lack of isolation by distance could not help in explaining the spatial distribution of the bacterial diversity, both at an intra- and interspecific scale. However, several physical and chemical soil parameters, as well as the plant cover, even on the scale of the fixed line, have an influence on the structuration of the bacterial diversity. Bacterial artificial evolution experiments were initiated to estimate the impact of the plant-host on the mutational process of these associated symbiotic bacteria.

Keywords : rhizobia, coevolution, spatial repartition, sanction, diversity, metapopulation.

LABORATOIRE DE RATTACHEMENT

Institut de Recherche pour le Développement, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM), UMR 113, Campus International de Baillarguet, TA-A82/J, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

TITRE : Phylogéographie, compétition et sélection chez les bactéries symbiotiques *Sinorhizobium meliloti* et *Sinorhizobium medicae*.

RESUME

Les deux espèces bactériennes, *Sinorhizobium meliloti* et *S. medicae* forment une symbiose efficace avec *Medicago truncatula*, tout en présentant un polymorphisme de fixation d'azote. Nous n'avons pas pu confirmer dans ce modèle l'existence de mécanismes de sanction des symbiotes non-fixateurs décrits théoriquement et expérimentalement chez d'autres couples symbiotiques. Les deux espèces bactériennes pourraient alors être maintenues en sympatrie avec la même plante-hôte du fait d'avantages sélectifs différents : *S. meliloti* serait plus compétitrice pour la nodulation de la plante, alors que *S. medicae* présenterait un plus fort potentiel de fixation. Essentiellement du fait de son fort taux de recombinaison, *S. medicae* est l'espèce présentant le plus de diversité génotypique. A l'échelle du bassin méditerranéen *S. medicae* a une structure panmictique se rapprochant d'une métapopulation, expliquant le profil phylogéographique décelé sur cette espèce. Sa forte expansion démographique pourrait également suggérer une spécialisation symbiotique en cours. *S. meliloti* a une structure génétique épidémique, avec de probables adaptations locales, mais qui n'ont pas pu être décelées. Aucun isolement par la distance ne permet d'expliquer la répartition spatiale de la diversité bactérienne, tant intra- que interspécifique. Cependant, certains paramètres physico-chimiques du sol, ainsi que le couvert végétal, même à l'échelle de la lignée, ont une influence sur la structuration de la diversité bactérienne. Des manipulations d'évolution expérimentale ont été entreprises pour évaluer l'impact de la plante-hôte sur la capacité mutationnelle de ces bactéries symbiotiques associées.

Mots-clefs : rhizobia, coévolution, distribution spatiale, sanction, diversité, métapopulation.

TITLE : Phylogeography, competition and selection in the symbiotic bacteria *Sinorhizobium meliloti* and *Sinorhizobium medicae*.

ABSTRACT:

The two bacterial species, *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* form an efficient symbiosis with *Medicago truncatula*, while presenting a polymorphism for nitrogen fixation. We could not confirm in this biological model the existence of mechanisms of sanctions against non-fixing symbionts, theoretically and experimentally described for other symbiotic couples. Both bacterial species might then be maintained in sympatry with the same plant-host because of different selective advantages: *S. meliloti* would be more competitive for plant nodulation, while *S. medicae* would present a better potential of fixation. Mostly because of its strong rate of recombination, *S. medicae* is the species presenting the more genotypic diversity. At the scale of the Mediterranean basin, *S. medicae* show a panmictic structure converging towards a metapopulation structuration, explaining the phylogeographic pattern revealed on this species. Its strong demographic expansion could also suggest an ongoing symbiotic specialization. *S. meliloti* displays an epidemic genetic structure, with possible local adaptations that however could not be proven. Lack of isolation by distance could not help in explaining the spatial distribution of the bacterial diversity, both at an intra- and interspecific scale. However, several physical and chemical soil parameters, as well as the plant cover, even on the scale of the fixed line, have an influence on the structuration of the bacterial diversity. Bacterial artificial evolution experiments were initiated to estimate the impact of the plant-host on the mutational process of these associated symbiotic bacteria.

Keywords : rhizobia, coevolution, spatial repartition, sanction, diversity, metapopulation.

LABORATOIRE DE RATTACHEMENT

Institut de Recherche pour le Développement, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM), UMR 113, Campus International de Baillarguet, TA-A82/J, 34398 Montpellier Cedex 5, France.
