

MINISTERE DE L'AGRICULTURE
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER

THESE

Présentée à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier

Pour obtenir le **DIPLOME DE DOCTORAT**

SPECIALITE : Physiologie, Biologie des Organismes et des Populations
Formation doctorale : Développement et adaptation des plantes
Ecole doctorale : Biologie intégrative

**CARACTERISATION DES *BRADYRHIZOBIUM* PHOTOSYNTHETIQUES
ENDOPHYTES DU RIZ SAUVAGE *ORYZA BREVILIGULATA*.**

Par

Clémence DONGMO-CHARENTREUIL

Soutenue le 8 Décembre 2000

devant le jury composé de :

Claude GRIGNON, Professeur, ENSA, Montpellier
Moniek GILLIS, Professeur, Université de Gand, Belgique
Philippe NORMAND, Directeur de Recherches, CNRS, Lyon
Michel LEBRUN, Professeur, Université de Montpellier II
Eric GIRAUD, Ingénieur de Recherches, IRD, Montpellier
Bernard DREYFUS, Directeur de Recherches, IRD, Montpellier

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

A mes chers enfants Alexandre et Audrey Bibiane

A mon mari Gérard CHAINTREUIL

A mes parents André et Bibiane DONGMO

A ma soeur jumelle Lucie Prudence WAHL

A mes frères et soeurs

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Symbioses Tropicales et Méditerranéennes de Montpellier (LSTM) qui est une unité mixte de recherche (UMR 113) Agro-M/INRA/CIRAD/IRD.

Je remercie Monsieur Bernard Dreyfus, Directeur de Recherche et Directeur du laboratoire, qui m'a accueillie dans son unité. Ses grandes compétences, son soutien moral, son profond humanisme et sa simplicité m'ont été très bénéfiques.

Je remercie beaucoup Eric Giraud qui a accepté de suivre et diriger ce travail. Sa disponibilité, son souci du travail bien fait, sa rigueur scientifique, ses suggestions et remarques m'ont été d'un grand apport pour la réalisation de ce travail. Qu'il trouve ici le témoignage de ma très haute considération.

Je tiens à remercier Monsieur Claude Grignon, qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Je suis aussi sensible à l'honneur que me font Mme Monique Gillis et MM Michel Lebrun, Philippe Normand, de faire partie de ce jury de thèse.

Je remercie vivement Yves Prin pour ses conseils pratiques et ses compétences qui m'ont et ont été indispensables lors de la réalisation des travaux de microscopie. Ses astuces et son humour m'ont permis d'apprécier ces techniques.

Je remercie également Jean Lorquin pour l'appui qu'il m'a toujours assuré et pour sa confiance depuis le DEA jusqu'aux derniers moments de cette thèse.

Toute ma sympathie à Philippe de Lajudie qui a aussi contribué à la réalisation de ce travail. Ses conseils scientifiques et surtout sa gentillesse m'ont été d'un grand soutien.

J'exprime toute ma reconnaissance à Laure Hannibal, pour l'efficacité de ses conseils et de son encadrement technique.

Je remercie chaleureusement Ibrahima N'doye et Amadou Ba qui m'ont soutenue durant ces années.

Je remercie également Jean-Claude Cleyet-Marel, Marc Ducouso, Antoine Galliana, Pierre Beunard, Brigitte Brunel, Cathérine Boivin, pour leurs conseils pratiques.

Sincères remerciements à Nathalie Pujet pour sa bonne humeur et sa grande disponibilité.

Je n'oublierai pas tous les encouragements et le soutien amical de Nicolas, Etiké, flore et Mathieu. Qu'ils trouvent ici mon affection sincère.

Que tous les autres stagiaires et personnels du laboratoire: Joël, Daniel, Marièle, Abdoulaye, Salif, Carmen, Antonio, Florence, Lionel, Frédéric, Christine, Odile, Philippe, Henri, Xavier, Sébastien, Sophie, Lucette, Lulu, Sylvie et Alain, trouvent ici l'expression de ma sympathie. Je n'oublie pas le personnel du laboratoire de l'IRD de Dakar, qu'ils reçoivent ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Ce travail a pu être réalisé grâce au soutien de l'IRD qui m'a octroyé une allocation de thèse de 3 ans. Merci à tout le personnel.

Que tous ceux, qui m'ont apporté leur soutien, sous une forme ou sous une autre, trouvent ici mes chaleureux remerciements.

RESUME

Nous avons montré pour la première fois que des rhizobiums, bactéries qui forment habituellement des nodules fixateurs d'azote sur les racines des plantes de la famille des légumineuses étaient également des bactéries endophytes associées aux racines du riz sauvage *Oryza breviligulata*. Cette espèce pousse dans les mares temporaires d'Afrique de l'Ouest du Sénégal à la Guinée et est considérée comme l'ancêtre du riz africain cultivé *O. glaberrima*.

En utilisant des méthodes de caractérisation moléculaire, ces rhizobiums endophytes du riz ont été identifiés comme des *Bradyrhizobia* photosynthétiques, des souches qui étaient jusqu'à présent connue pour former des nodules de tiges sur deux espèces de légumineuses aquatiques, *Aeschynomene indica* et *A. sensitiva* qui poussent dans les mêmes biotopes qu'*O. breviligulata*. Ces *Bradyrhizobia* photosynthétiques sont capables d'utiliser la lumière comme source d'énergie, et nous avons caractérisé et séquencé leurs gènes de fixation de l'azote (gènes *nif*).

Nous avons également évalué la capacité de colonisation *in vitro* des racines du riz par les *Bradyrhizobium* en utilisant une souche *lacZ* marquée de la souche type ORS278. Les résultats de cette étude cytologique montrent un attachement spécifique précoce du *Bradyrhizobium* aux cellules de la coiffe suivie d'une colonisation intense de la surface et des espaces intercellulaires. Le cytoplasme de quelques cellules du cortex de la racine est envahi par les bactéries mais, ces cellules ne se multiplient pas.

Les *Bradyrhizobium* photosynthétiques ont été inoculés à plusieurs espèces de riz cultivés (*O. sativa*, *O. glaberrima*) en serre et au champ afin de mesurer l'effet de l'inoculation sur le riz. Dans des rizières de Guinée, on observe un effet positif très important de l'inoculation sur la croissance du riz en pépinière, en particulier sur système racinaire qui gagne 55% en longueur et la base de la tige 25% en largeur. L'augmentation de la croissance du riz semble être le résultat d'une production de phytohormones par le *Bradyrhizobium* photosynthétique, et non d'un apport d'azote par la fixation biologique de l'azote.

MOTS-CLES : *Oryza breviligulata*, *Bradyrhizobium* photosynthétiques, Endophytes du riz, bactéries PGPR, inoculation du riz.

ABSTRACT

We have shown for the first time that rhizobia, bacteria which usually form nitrogen-fixing nodules on roots of leguminous plants, are also endophytic bacteria of the wild rice *Oryza breviligulata*. This rice species is growing in temporary ponds of West Africa and is considered to be the ancestor plant of *O. glaberrima*, the african cultivated rice species.

Using molecular characterization methods, we identified these endophytic rhizobia as photosynthetic *Bradyrhizobium*, a species up to now known to form stem nodules on two species of aquatic legumes, *Aeschynomene indica* et *A. sensitiva* which growth in the same waterlogged soils as *O. breviligulata*. We have characterized and sequenced the nitrogen fixation genes (*nif* genes) of these photosynthetic *Bradyrhizobium*, which are able to use light as energy.

We also evaluated the ability of the photosynthetic *Bradyrhizobium* to colonize the roots of *O. breviligulata* by using a *LacZ* ORS278 tagged strain. Results showed a specific attachment of the strain to the cells of the root cap, followed by an intense colonization of the root surface and a deep intercellular penetration.

Photosynthetic *Bradyrhizobium* strains were inoculated to several cultivated rice species (*O. sativa*, *O. glaberrima*) both in glasshouse and in the field. In Guinea (West Africa) paddy fields, we observed an important positive effect of inoculation by strain ORS278 of the rice growth in nurseries. The length of roots was increased by 55%, and both the stem height and the width of the stem base by 25%. The increase of the rice growth appears to result from the production of phyto-hormones by the photosynthetic *Bradyrhizobium*, and not from nitrogen supply to rice through nitrogen fixation.

Keywords : *Oryza breviligulata*, photosynthetic *Bradyrhizobium*, rice bacterial endophytes, PGPR bacteria, rice inoculation.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

I. La fixation d'azote : Généralités	1
II. Présentation du sujet de Thèse	4
II.1. Contexte de l'étude	4
II.2. Objectifs	5

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les bactéries fixatrices d'azote	8
II. Symbioses fixatrices d'azote et évolution des végétaux	11
III. La symbiose <i>Rhizobium</i>-Légumineuses	12
IV. Les partenaires de la symbiose <i>Rhizobium</i>-Légumineuses	13
IV.1. Les rhizobia, partenaires bactériens	13
IV.1.1. La taxonomie des rhizobia	13
IV.1.2. Les techniques de classification des rhizobia	14
IV.1.3. Les différents genres et espèces	15
IV.1.3.1. Le genre <i>Rhizobium</i>	15
IV.1.3.2. Le genre <i>Bradyrhizobium</i>	16
IV.1.3.3. Le genre <i>Sinorhizobium</i>	17
IV.1.3.4. Le genre <i>Mesorhizobium</i>	17
IV.1.3.5. Le genre <i>Azorhizobium</i>	18
IV.1.3.6. Le genre <i>Allorhizobium</i>	19
IV.1.4. Les liens phylogénétiques entre les genres	19

IV.2. Les Légumineuses, partenaires végétaux	20
IV.3. Classification des légumineuses à nodules de tiges	21
IV.4. Classification des rhizobia isolés des nodules racinaires et caulinares des <i>Aeschynomene</i>	23
V. Propriétés originales des rhizobia associés aux Légumineuses	24
à nodulation caulinares	
V.1. Les <i>Bradyrhizobium</i> photosynthétiques	25
V.2. Ecologie épiphytique des rhizobia induisant des nodules caulinares	26
VI. Génétique de la fixation de l'azote et de la symbiose	27
VI.1. Les gènes <i>nif</i>	27
VI.2. Régulation de l'expression des gènes <i>nif</i> chez <i>Klebsiella pneumonia</i>	28
VII. L'établissement de la symbiose <i>Rhizobium</i>-Légumineuse	30
VII.1. Diversité des modes d'infection et développement des nodules	30
VII.1.1. Infection par les poils absorbants	31
VII.1.2. Infection intercellulaire	32
VII.1.3. Infection intercellulaire (par les cordons d'infection)	32
VII.2. Les processus d'infection conduisant aux nodules caulinares	33
VIII. Déterminants bactériens de l'infection, la spécificité et la nodulation	33
VIII.1. Gènes <i>nod</i> et facteurs Nod	33
VIII.2. Les gènes <i>nod</i> et leur régulation	34
VIII.3. Les gènes <i>nod</i> et la structure des facteurs Nod	36
VIII.4. Rôle des gènes <i>nod</i> dans la synthèse des facteurs Nod et dans la détermination du spectre d'hôte	37
VIII.4.1. Les gènes de nodulation	38
VIII.4.1.1. Les gènes <i>nod</i> communs	39
VIII.4.1. 2. Les gènes <i>nod</i> spécifiques	40
VIII.5. Autres déterminants bactériens	40

VIII.6. Les facteurs Nod et réponses des légumineuses	41
VIII.7. Effets des facteurs Nod sur les non-Légumineuses	43
IX. La photosynthèse bactérienne	44
IX.1. Organisation moléculaire de l'appareil photosynthétique des bactéries pourpres non sulfato-réductrices	45
IX.1.1. Organisation des gènes spécifiant les sous-unités du centre et des antennes	45
IX.1.2. Organisation des gènes de photosynthèse en super opéron	46
X. Le riz et ses micro-organismes associés	48
X.1. Caractérisation botanique	48
X.1.1. Le genre <i>Oryza</i> et son origine	48
X.1.2. La biologie de la plante	49
X.2. L'importance du riz dans le monde	50
X.3. Les microorganismes associés au riz	52
X.4. Effets des microorganismes sur la croissance des céréales	54

<u>MATERIEL ET METHODES</u>

I. Souches Bactériennes	58
II. Milieux de culture	58
II.1. Milieu YM	58
II.2. Milieu Jensen	59
II.3. Milieu LB	59
II.4. Milieu Cambel	60
II.5. Milieu TY	60
II.6. Milieu TYGPN	60

III. Désinfection des racines et tiges d'<i>Oryza breviligulata</i> et méthodes de piègeage des souches de rhizobiums	61
IV. Dénombrement des bradyrhizobia	61
V. Stérilisation et germination des graines	62
V.1. Stérilisation et germination des graines	62
V.2. Stérilisation et germination des graines de riz sauvage	62
VI. Technique d'inoculation	63
VI.1. Inoculation des racines et des tiges	63
VI.2. Inoculation des jeunes plants de riz en serre	63
VI.2.1. Substrat de culture et inoculation	63
VI.2.2. Paramètres évalués	64
VI.3. Inoculation des jeunes plants de riz en « <i>culture in vitro</i> »	64
VII. Isolement et culture des souches bactériennes	65
VII.1. Isolement et purification des souches de rhizobiums à partir des nodules	65
VII. 2. Isolement des souches de rhizobiums à partir de l'eau de mare	65
VII.3. Culture des <i>Bradyrhizobium</i> photosynthétiques	65
VIII. Techniques de microscopie	66
VIII.1. Microscopie photonique	66
VIII.1.1. Fixation des échantillons de racines de riz sauvage	66
VIII.1.2. Coupe au vibratome	66
VIII.2. Microscopie électronique à balayage	67
IX. Estimation du potentiel fixateur d'azote	67
IX.1. Observation du phénotype des plants inoculés	67
IX.2. Mesure de l'activité réductrice d'acétylène	68
IX.3. Mode de calcul de la quantité d'éthylène	69
X. Caractérisation et quantification des pigments bactériens	70

X.1. Extraction des caroténoïdes	70
X. 2. Détermination structurale des caroténoïdes	70
X.2.1. Chromatographie sur couche mince	71
X.2.2. Spectrophotométrie UV/VIS	71
X.2.3. Méthodes chimiques	72
X.3. Quantification des pigments bactériens	73
X.3.1. Bactériorchlorophylle	73
X.3.2. Caroténoïdes	73
X.3.3. Canthaxanthine	74
X.3.4. Matière sèche bactérienne	75
XI. Analyse des protéines cellulaires totales par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS	74
XI.1. Principe	74
XI.2. Protocole	75
XI.2.1. Culture des bactéries	75
XI.2.2. Production de la biomasse bactérienne	75
XI.2.3. Récolte des bactéries	75
XI.2.4. Extraction des protéines bactériennes	76
XI.2.5. Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide	76
XI.2.6. Analyse des profils protéiques	76
XII. Analyse comparative des profils de restriction de l'ADNr 16S	77
XIII. Extraction d'ADN	78
XIII.1. Extraction d'ADN génomique total	78
XIII.1.1. Lyse des cellules bactériennes	78
XIII.1.2. Déprotéinisation	78
XIII.1.3. Précipitation	79
XIII.1.4. Traitement à la ribonucléase	79

XIII.1. 5. Contrôle de la pureté de l'ADN	79
XIII.2. Extraction d'ADN plasmidique	80
XIV. Amplification par PCR de l'ADN	81
XIV.1. Préparation du mélange d'amplification	81
XIV.2. Analyse par électrophorèse de la réaction des produits de PCR	81
XV. Construction d'une banque d'ADN génomique totale	82
XV.1. Les plasmides	82
XV.2. Méthode de clonage	83
XV.2.1. Digestion partielle de l'ADN génomique	83
XV.2.2. Préparation du vecteur de clonage	83
XV.2.3. Ligation et encapsidation	83
XV.2.4. Transformation et sélection des clones	84
XV.2.5. Criblage de la banque	84
XVI. Technique d'hybridation sonde froide	85
XVI.1. Transfert des fragments d'ADN sur membrane de Nylon	85
XVI.2. Purification et marquage de la sonde	86
XVI.3. Hybridation à l'aide d'une sonde froide	87
XVI.4. Les lavages de la sonde	87
XVI.5. Procédure de détection	88
XVII. Méthode de sous clonage des fragments d'ADN	88
XVII.1. La ligation	89
XVII.2. Transformation par électroporation	89
XVII.2.1. Préparation des cellules électrocompétentes	89
XVII.2.2. Electroporation	90

XVII.3. Sélection et analyse des clones recombinants	91
XVIII. Séquençage	91
XVIII.1. Principe de la réaction de séquence	91
XVIII.2. Préparation du mélange de la réaction de séquence	92
XVIII.3. Purification de la réaction de séquence	93
XVIII.4. Lecture des séquences : détection	93
XVIII.5. Analyse et alignement des séquences	94
XIX. Construction d'un mutant <i>nif</i>⁻	94

CHAPITRE I

Caractérisation des *Bradyrhizobium* photosynthétiques associé au riz sauvage *Oryza breviligulata*

A. Introduction	96
B. Résultats	98
1. Isolement des rhizobiums	98
1.1. Isolement par piégeage des rhizobiums présents dans les racines du riz sauvage <i>Oryza breviligulata</i>	98
1.2. Isolement des rhizobiums de l'eau de mare	99
2. Numération des bactéries endophytes du riz sauvage et des bactéries présentes dans l'eau de mare.	99
3. Caractérisation symbiotique	100
4. Caractérisation photosynthétique	101
4.1. Aspect phénotypique	101
4.1.1. Pigmentation et production de bactériochlorophylle <i>a</i>	101
4.1.2. Identification des caroténoïdes	102
4.1.2.1. Souches oranges	102

4.1.2.2. Souches roses	103
4.1.3. Quantification des pigments	104
4.2. Aspect génotypique	105
4.2.1. Mise en évidence des gènes photosynthétiques par hybridation	105
4.2.2. Isolement et séquençage des gènes <i>puf</i>	106
5. Caractérisation taxonomique	107
5.1. Analyse des protéines cellulaires totales par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS	107
5.2. Analyse ARDRA	108
5.3. Séquençage du gène codant pour l'ADNr 16S	109
C. Discussion et Conclusion	111

CHAPITRE II

Effet des *Bradyrhizobium* photosynthétiques sur la croissance du riz sauvage *Oryza breviligulata*

A. Introduction	117
B. Résultats	119
1. Colonisation des racines de riz en culture <i>in vitro</i>	119
2. Comparaison de l'inoculation <i>in vitro</i> entre riz sauvage et riz cultivé	121
3. Effet de l'inoculation sur la croissance du riz en serre	121
3.1. Effet comparatif de l'inoculation des <i>Bradyrhizobium</i> sur le riz	122
3.2. Effet de l'inoculation sur la biomasse racinaire du riz	122
3.3. Mesure de la fixation biologique de N ₂ au niveau des racines du riz inoculé	123
4. Inoculation au champ : une stimulation importante de la croissance du riz en pépinière	124

CHAPITRE III**Recherche des mécanismes intervenant dans l'association *Bradyrhizobium* photosynthétique-riz sauvage *Oryza breviligulata***

A. Introduction	131
B. Résultats	133
1. Essai d'isolement des gènes de nodulation chez ORS278	133
1.1. Isolement par PCR	133
1.2. Isolement par complémentation	134
1.3. Isolement par hybridation	135
2. Diversité des gènes <i>nod</i> chez les <i>Bradyrhizobium</i> photosynthétiques et non photosynthétiques d' <i>Aeschynomene</i> des groupes I et II	136
2.1. Chez les souches non photosynthétiques des groupes I et II	136
2.2. Chez les souches photosynthétiques du groupe II	137
3. Séquençage de différents gènes <i>nodA</i>	137
4. Caractérisation de l'opéron <i>nodABC</i> chez la souche ORS285	139
5. Isolement et Caractérisation des gènes de la fixation de l'azote (gènes <i>nifHDK</i>) chez la souche ORS278	142
5.1. Construction d'un mutant <i>nif⁻</i> de la souche ORS278	143
5.2. Etude de l'expression des gènes <i>nif⁻</i>	144
6. Mesure de l'activité réductrice de l'acétylène	145
C. Discussion et conclusion	146

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

1. Les rhizobiums, bactéries symbiontes des légumineuses, sont également	150
--	-----

des bactéries endophytes du riz

2. La photosynthèse, un caractère important pour la survie des bactéries associées au riz ?	151
3. Spécificité de nodulation et d'association avec le riz	153
4. L'infection chez les <i>Aeschynomene</i> et le riz : deux processus primitifs proches ?	154
5. L'association riz / <i>Bradyrhizobium</i> : un effet PGPR, une fixation d'azote très faible	155
6. Vers l'inoculation des rizières	157

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

160

ANNEXES

A. Liste des souches utilisées dans ce travail	192
Souches et plasmides utilisés pour la complémentation et les clonages	195
B. Article N°1 : Photosynthetic Bradyrhizobia are Natural Endophytes of the African Wild Rice <i>Oryza breviligulata</i> . (Applied Environmental Microbiology. December 2000, volume 66, issue 12).	
C. Article N°2 : Characterization of the common nodulation genes of the Photosynthetic <i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS285 reveals the presence of a new Insertion Sequence upstream of <i>nodA</i> . Sous presse dans FEMS.	
D. Article N°3 : Isolation and characterization of canthaxanthin biosynthesis genes from the photosynthetic bacterium <i>Bradyrhizobium</i> sp. strain ORS278. J. Bacteriol. 182 :3850-3853.	

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Introduction

Figure 1. Riz sauvage (*Oryza breviligulata*) en fleur dans les mares temporaires des environs de Joal, en cohabitation avec des Légumineuses aquatiques comme les *Aeschynomene* 5

Revue Bibliographique

- Figure 1.** Phylogénie des plantes ayant la capacité de noduler 11
- Figure 2.** Pouvoirs discriminatifs des différentes techniques de taxonomie 14
- Figure 3.** Arbre phylogénétique des rhizobia basé sur la comparaison des séquences d'ARNr 16S obtenu par la méthode de neighbor-joining 19
- Figure 4.** Morphologie du nodule caulinaire d'*Aeschynomene sensitiva* 33
- Figure 5.** Dialogue moléculaire entre deux partenaires compatibles dans la symbiose *Rhizobium*-Légumineuses 34
- Figure 6.** Carte des gènes de nodulation de quelques rhizobia et leur rôle dans la synthèse des facteurs Nod 39
- Figure 7.** Représentation schématique de l'appareil photosynthétique des bactéries pourpres 45
- Figure 8.** Relations phylogénétiques des deux espèces de riz cultivé 49
- Tableau 1.** Phylogénie des principaux microorganismes fixateurs d'azote et leurs principales caractéristiques. 9
- Tableau 2.** Classification des rhizobia 15
- Tableau 3.** Distribution géographique et classement des légumineuses 21

à nodules de tige

Tableau 4. Classification des <i>Aeschynomene</i>	23
Tableau 5. Fonction des gènes <i>nif</i> de <i>K. pneumoniae</i>	28
Tableau 6. La structure des facteurs Nod de différents rhizobia	36
Tableau 7. La fonction des gènes <i>nod</i> , <i>nol</i> et <i>noe</i> dans la production des facteurs Nod	38
Tableau 8. Bactéries fixatrices libres de la rhizosphère du riz	53
Tableau 9. Sites de colonisation des endophytes diazotrophes	55

Matériel et méthodes

Figure 1. Programme PCR classique	81
Figure 2. Programme PCR « Touch down »	81
Figure 3. Construction d'une banque d'ADN génomique d'ORS285	82
Figure 4. Criblage de la banque ORS285 par PCR	85
Figure 5. Position des amorces internes du gène ADNr 16S	91
Figure 6. Programme PCR utilisé pour effectuer les réactions de séquences	92
Tableau 1. Amorces utilisées pour les réactions de séquence de l'ADNr 16S	91

Chapitre I

Figure 1. Isolement des bactéries endophytes et de ceux présents dans l'eau de mare	98
Figure 2. (A) Spectre d'un extrait correspondant à une souche orange ORS2011 (B) Structure de la cathaxanthine, caroténoïde majeur synthétisé par les souches oranges	103
Figure 3. (A) Spectre d'un extrait correspondant à une souche rose ORS408	103

(B) Structure de la cathaxanthine, caroténoïde majeur synthétisé par les souches roses	
Figure 4. Mise en évidence par hybridation des gènes <i>puf</i> chez les souches de riz	106
Figure 5. Electrophorèse des produits d'amplification obtenue par utilisation des amorces <i>pufL278f/pufM278r</i> qui s'hybrident au niveau du gène <i>puf</i> de l'ADN des souches endophytes du riz sauvage et des souches aquatiques	107
Figure 6. Dendrogramme montrant les relations entre les profils électrophorétiques de protéines des isolats endophytes du riz sauvage	108
Figure 7. Dendrogramme montrant les relations entre les profils électrophorétiques des isolats endophytes du riz sauvage	109
Figure 8. Dendrogramme basé sur la comparaison des séquences du gène codant pour l'ADNr 16S	110
Tableau 1. Origine et spécificité de nodulation	100
Tableau 2. Nature et concentration des principaux pigments synthétisés	102
Tableau 3. Données spectroscopiques des caroténoïdes identifiés chez ORS2011	103

Chapitre II

Figure 1. Analyse au microscope photonique de la colonisation des racines de riz sauvage <i>Oryza breviligulata</i> inoculées par la souche M10 (278 <i>LacZ</i>)	119
Figure 2. Racines de riz inoculées avec la souche de <i>Bradyrhizobium</i> ORS278, observées en microscopie à balayage	120
Figure 3. Inoculation du riz africain avec la souche de <i>Bradyrhizobium</i> ORS278 en Guinée, en présence ou non d'engrais NPK, 22 jours après inoculation.	125
Figure 4. Inoculation du riz africain avec la souche de <i>Bradyrhizobium</i> ORS278	125

en Guinée, en présence ou non d'engrais NPK, 40 jours après inoculation.

Tableau 1. Effet de l'inoculation par les <i>Bradyrhizobium</i> photosynthétiques endophytes et non endophytes sur la croissance des tiges, feuilles, et sur le rendement en graines du riz sauvage <i>Oryza breviligulata</i>	122
Tableau 2. Effet de l'inoculation de quelques souches de <i>Bradyrhizobium</i> sur la croissance des racines, tiges, feuilles et sur le rendement en graines du riz sauvage <i>Oryza breviligulata</i>	123
Tableau 3. Analyse statistiques (Super Anova) des résultats obtenus lors de l'inoculation en pépinière du riz <i>Oryza sativa</i> , variété « Tamba yégeti ».	125
Tableau 4. Pourcentages obtenus 40 jours après inoculation du riz africain « Tamba Yeguetei » en pépinière	126

Chapitre III

Figure 1. Analyse des profils de restriction du gène <i>nodA</i> isolé des <i>Bradyrhizobium</i> du groupe I et du groupe II	136
Figure 2. Comparaison des séquences <i>nodA</i> chez les souches du groupe I et II	137
Figure 3. Dendrogramme basé sur la comparaison des séquences de gène <i>nodA</i> obtenu par la méthode du neighbour-joining et montrant la position phylogénétique des <i>Bradyrhizobium</i> appartenant aux groupes I et II	138
Figure 4. Analyse par hybridation des profils de restriction du clone STM75	139
Figure 5. Organisation des gènes de nodulation (<i>nodABC</i>) chez la souche ORS285 et localisation des différents fragments sous clonés pour le séquençage	140
Figure 6. Analyse par hybridation des profils de restriction des clones STM122	142

et STM123	142
Figure 7. Organisation des gènes de nitrogénase (<i>nifHDK</i>) chez la souche ORS278 et localisation des différents fragments sous clonés pour le séquençage	142
Figure 8. Structure génétique de la mutation <i>nif</i>	143
Figure 9. Mise en évidence du phénotype Fix - de la souche mutante M4 sur les plants d' <i>Aeschynomene sensitiva</i> cultivés en tube Gibson	144
Figure 10. Observation en microscopie photonique de l'activité β -galactosidase du mutant <i>nif</i> ⁻ (M4).	144
Tableau 1. Couples d'amorces utilisés pour l'isolement des gènes <i>nod</i> chez la souche ORS278 et chez d'autres souches du groupe III	133
Tableau 2. Amplification de la région <i>IS</i> chez différentes souches de <i>Bradyrhizobium</i> d' <i>Aeschynomene</i> et du riz sauvage (avec le couple d'amorces <i>ISf</i> / <i>ISr</i>)	141
Tableau 3. Pourcentage d'identité obtenu sur 4 gènes (<i>nifH</i> , <i>nifD</i> , <i>nifK</i> , et <i>MucR</i>) d'ORS278	143
Tableau 4. Caractéristiques structurales et fonctionnelles des gènes <i>nifH</i> , <i>nifD</i> , <i>nifK</i> , et <i>MucR</i> de la souche ORS278	143

LISTE DES ABREVIATIONS

AcOEt	acétate d'éthyle
ADN et ADNr	acide désoxyribonucléique et ADN ribosomique
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
ARN	acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
Bchl <i>a</i>	Bactéριοchlorophylle <i>a</i>
bv.	Biovar
CCM	chromatographie sur couche mince
CH ₂ Cl ₂	dichlorométhane (ou chlorure de méthylène)
CSPD	disodium 3-(4-méthoxyspiro{1,2-dioxétane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)
DIG-AP	digoxigénine liée à une phosphatase alcaline
DIG-dUTP	digoxigénine liée au désoxyuridine triphosphate
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
DO	densité optique ou absorbance
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique
EtOH	éthanol
Facteur Nod	facteur de nodulation
kb	Kilobase
LH	Complexe photosynthétique capteur de lumière
LH-I et LH-II	Antenne collectrice centrale et Antenne collectrice périphérique
MeOH	méthanol
MPN	Most Probable Number
NBT	nitro bleu de tétrazolium
nm	nanomètre
ORF	Phase de lecture ouverte
PCR	Polymérase Chain Reaction
RC	Complexe centre réactionnel photosynthétique
Rf	indice de migration en chromatographie sur couche mince
RFLP	Restriction Fragment Length polymorphism

SDS	sodium dodecylsulfate
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate-polyacrylamid gel electrophoresis
SSC	sodium chlorure-sodium citrate
T_m	Température de 1/2 dénaturation de l'ADN
UV/VIS	ultra-violet/visible
v/v	volume/volume
YMA	yeast mannitol agar
λ_{max}	longueur d'onde à absorbance maximale

INTRODUCTION GENERALE

I. La fixation d'azote : généralités

L'azote moléculaire (N_2) qui constitue le composé majoritaire de notre atmosphère n'est assimilable que par un petit nombre de microorganismes procaryotes grâce à un processus appelé fixation biologique de l'azote qui consiste en la réduction enzymatique du N_2 en ammonium NH_4^+ . Parmi les microorganismes fixateurs d'azote, les bactéries du sol appelées communément rhizobia sont capables de former sur les racines, ou parfois les tiges, de nombreuses plantes appartenant à la famille des légumineuses, des organes particuliers, les nodules, dans lesquels elles transforment l'azote de l'air en ammonium assimilable par la plante. Cette importante fixation symbiotique représente environ 80% de la fixation biologique totale de l'azote sur terre, et permet à de nombreuses légumineuses de pousser dans des sols pauvres très dégradés et parallèlement de contribuer à l'enrichissement de ces sols en azote. On estime que la quantité d'azote fixé par les rhizobiums dans les légumineuses représente l'équivalent de l'azote fixé réduit par l'ensemble des industries de production d'engrais chimiques dans le monde.

De nombreuses espèces de rhizobia ont été caractérisés à ce jour appartenant aux genres *Rhizobium* sensu stricto, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, ainsi que très récemment *Methylobacterium* avec une nouvelle espèce, *Methylobacterium nodans*. Tous ces rhizobia peuvent vivre en dehors de la plante hôte, et la symbiose n'est pas obligatoire.

Une des caractéristiques principales de ces bactéries symbiotiques est leur spécificité. En effet, un rhizobium donné n'infecte en général qu'un nombre limité d'espèces végétales, appelé spectre d'hôte de la bactérie. Les mécanismes qui contrôlent l'infection et la formation d'un nodule ont montré qu'un dialogue moléculaire était à l'origine de la reconnaissance entre la bactérie et sa plante-hôte.

Les gènes bactériens dits de nodulation (gènes *nod*, *nol*, *noe*), qui comprennent les gènes de structure et les gènes régulateurs, jouent un rôle central dans cette interaction. En présence d'inducteurs végétaux (flavonoïdes, bêtaïnes), les protéines régulatrices NodD sont activées et induisent l'expression des gènes de structure. L'expression de ces gènes structuraux communs à l'ensemble des *Rhizobium* conduit à la production de signaux bactériens extracellulaires spécifiques ou facteurs Nod qui jouent un rôle essentiel dans le processus d'infection et l'organogenèse des nodules.

En général, on considère que les symbioses les moins spécifiques sont les plus primitives. Ainsi, les *Bradyrhizobium* apparaissent peu spécifiques car ils nodulent la plupart des légumineuses tropicales, ainsi que la seule non-légumineuse connue appartenant au genre *Parasponia*. Les premiers stades de l'infection de ces symbioses "primitives", sont caractérisés par la pénétration directe des bactéries dans la racine au niveau des espaces intercellulaires créés par l'émergence de racines secondaires, contrairement aux processus d'infection plus "évolués" qui passent par la formation de cordons d'infection initiés dans les poils absorbants. L'un des types d'infection le plus primitif est illustré par les légumineuses tropicales aquatiques du genre *Aeschynomene* qui ont la capacité de former des nodules fixateurs d'azote à la fois sur leurs tiges et leurs racines. Dans cette symbiose très particulière, les *Bradyrhizobium* qui présentent la particularité unique parmi les rhizobia d'être photosynthétiques, pénètrent directement dans les cellules de la plante hôte sans former de cordons d'infection.

La capacité de former des nodules fixateurs d'azote est limitée aux légumineuses et à *Parasponia* nodulés par les rhizobia, à plusieurs genres et espèces de plantes à actinorhizes nodulées par la bactérie actinomycète *Frankia*, et aux plantes du genre *Gunnera* capables de former une symbiose intracellulaire avec des cyanobactéries du genre *Nostoc*. Par contre, dans la nature il existe de nombreuses

associations entre les bactéries fixatrices d'azote et les plantes, particulièrement les graminées, qui n'aboutissent pas à la formation d'organes spécialisés comme les nodules. Ces associations présentent des situations intermédiaires entre la symbiose véritable où il existe un bénéfice mutuel démontré pour les deux partenaires, et des associations facultatives ou fortuites entre plantes et organismes diazotrophes. Chez les graminées, certaines bactéries colonisent simplement la surface de la racine, d'autres sont de véritables endophytes qui pénètrent profondément dans les espaces intercellulaires de la racine ou même qui forment de véritables symbioses intracellulaires. Ainsi, la rhizosphère des graminées abrite d'importantes populations de bactéries fixatrices d'azote atmosphérique et/ou productrices d'hormones de croissance végétales (auxines, cytokinines) (Reinhold-Hurek et Hurek, 1998). Ce sont des bactéries à effet PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) telles que *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani *et al.*, 1986 ; Boddey *et al.*, 1995 ; James *et al.*, 1998) et *Acetobacter diazotrophicus* (Cavalcante et Dobereiner, 1988 ; Rolfe *et al.*, 1997) retrouvées dans les racines de la canne à sucre, *Azoarcus* spp. (Reinhold-Hurek et Hurek, 1998 ; Rolfe *et al.*, 1997) isolé des racines de *Leptochloa fusca* (Kallar Grass) et *Azospirillum* spp. isolé des racines du maïs (Bashan, 1999). D'autres associations sont moins étroites mais bénéfiques, c'est par exemple le cas d'*Azotobacter paspali* associé à l'herbe tropicale *Paspalum notatum* (Boddey *et al.*, 1983) et de *Beijerinckia* sp. (Baldani *et al.*, 1997) qui colonisent la rhizosphère de la canne à sucre ou du riz. Les associations avec cette dernière céréale sont particulièrement étudiées car le riz constitue l'aliment de base de plus de la moitié de la population mondiale.

L'azote est en effet l'un des principaux facteurs limitant de la production rizicole et les variétés à haut rendement actuellement cultivées demandent de telles quantités d'engrais chimiques azotés (jusqu'à 300 kg/ha) que les exigences de rendement entraînent, soit un surcoût insupportable pour les paysans les plus pauvres, soit une importante pollution en nitrates des rizières et des nappes qui est

dangereuse pour la santé humaine. Après avoir tenté de transférer directement au riz la capacité de fixer l'azote, les recherches, plus réalistes dans l'immédiat, s'orientent vers une augmentation de la capacité du riz à s'associer efficacement à des microorganismes rhizosphériques et endophytes fixateurs d'azote. Ceci permettrait de réduire la quantité d'engrais azoté à utiliser dans les rizières. Pour arriver à cet objectif, il est tout d'abord nécessaire de mieux connaître les microorganismes fixateurs d'azote qui sont des endophytes naturels du riz. C'est ainsi que récemment, une équipe Américano-Egyptienne a montré qu'en Egypte, *Rhizobium leguminosarium* bv. *trifolii* était naturellement présent dans les racines de riz cultivé en rotation avec le trèfle d'Alexandrie (*Trifolium alexandrinum*)(Yanni *et al.*, 1997). Ce travail était le premier à montrer que les rhizobiums pouvaient s'associer à une graminée. Auparavant, des travaux (Cocking *et al.*, 1992, 1995 ; Döbereiner *et al.*, 1995 ; Gough *et al.*, 1996) avaient montré qu'*Azorhizobium caulinodans*, symbionte de *Sesbania rostrata*, inoculé au riz cultivé, était capable de coloniser les racines de riz et de pénétrer dans les espaces intercellulaires.

II. Présentation du sujet de Thèse

II.1. Contexte de l'étude

En faisant l'hypothèse que les riz sauvages, non soumis à une sélection par l'homme, pourraient avoir conservé les associations les plus efficaces avec les microorganismes fixateurs d'azote, en particulier les rhizobiums, nous avons donc recherché une espèce de riz primitive, naturellement associée à des légumineuses et, contrairement aux espèces cultivées, peu exigeante en azote. En Afrique de l'Ouest, l'espèce annuelle de riz sauvage *Oryza breviligulata*, ancêtre du riz cultivé africain *Oryza glabberima*, pousse naturellement dans les mares temporaires et les deltas des



Figure 1 : Riz sauvage (*Oryza breviligulata*) en fleur dans les mares temporaires des environs de Joal, en cohabitation avec des légumineuses aquatiques comme les *Aeschynomene*. la flèche indique un plant d'*Aeschynomene indica*.

fleuves où il forme des peuplements importants. Ses grains rouges semblent avoir été récoltés et consommés par certaines populations africaines depuis des millénaires. Cette espèce primitive de riz pousse toujours dans les mêmes zones inondées que des légumineuses aquatiques à nodules de tige, telles que *Sesbania rostrata* et deux espèces d'*Aeschynomene*, *A. sensitiva* et *A. indica* (figure 1) qui sont particulièrement fréquentes parmi les plants de riz. Ces deux espèces sont exclusivement nodulées par des *Bradyrhizobium* photosynthétiques que le laboratoire étudie depuis plusieurs années. Cette niche écologique regroupant riz et légumineuses aquatiques constituait donc un excellent modèle d'étude, et c'est ainsi que nous avons découvert pour la première fois que les rhizobiums, symbiontes des *Aeschynomene* étaient aussi retrouvés naturellement associés au riz sauvage.

II.2. Objectifs

L'objectif de cette thèse était donc double : 1) caractériser les *Bradyrhizobium* photosynthétiques endophytes et leur association avec le riz sauvage *Oryza breviligulata*, 2) exploiter le potentiel de cette association originale en vue d'augmenter la production des riz cultivés (*O. sativa*, *O. glaberrima*).

Les résultats obtenus dans le cadre de ma thèse, qui font l'objet de deux publications comme premier auteur dans des revues internationales, sont présentés en trois chapitres précédés d'une partie bibliographique.

- Le premier chapitre porte sur la caractérisation des *Bradyrhizobium* photosynthétiques endophytes du riz sauvage *Oryza breviligulata*. Nous avons isolé une collection de rhizobia à partir des racines du riz sauvage prélevées au Sénégal et en Guinée, et également à partir de l'eau de mare baignant le riz. Ces souches ont fait à la fois l'objet d'une caractérisation symbiotique par l'étude de leur spectre d'hôte, d'une caractérisation biochimique de leurs pigments photosynthétiques, et d'une

caractérisation moléculaire de certains gènes impliqués dans la photosynthèse (gènes *puf*). De plus, une étude taxonomique de ces souches a été faite à partir de l'analyse des profils de protéines totales par SDS-PAGE et, le séquençage de l'ADNr 16S a permis de construire un arbre phylogénétique des *Bradyrhizobium* du riz et de les comparer aux *Bradyrhizobium* isolés des nodules de tige des *Aeschynomene*.

- Le deuxième chapitre porte sur l'effet de l'inoculation des *Bradyrhizobium* photosynthétiques sur la croissance du riz sauvage et du riz cultivé. Une étude détaillée de la colonisation et de l'infection racinaire a tout d'abord permis de confirmer que les *Bradyrhizobium* photosynthétiques étaient bien des bactéries endophytes du riz. Par des mesures de l'activité réductrice d'acétylène *in vitro*, nous avons en outre montré que ces *Bradyrhizobium* présentaient une activité fixatrice d'azote lorsqu'ils étaient associés au riz, mais que celle-ci était trop faible pour assurer un gain de croissance pour le riz. Après avoir inoculé avec différentes souches de *Bradyrhizobium* de jeunes plants de riz sauvage cultivés dans des pots en serre, nous avons obtenu avec 2 souches une augmentation significative de la croissance du riz et du rendement en grains. Ceci nous a conduit à mener une expérience d'inoculation d'une variété de riz cultivé dans une rizière de Guinée.

- Le troisième chapitre porte sur l'étude des gènes de nodulation (gènes *nod*) et de fixation d'azote (gènes *nif*) des *Bradyrhizobium* photosynthétiques. Nous avons tout d'abord caractérisé les gènes *nod* de certaines souches de *Bradyrhizobium* photosynthétiques et avons ainsi montré la présence originale d'une séquence d'insertion en amont du gène *nodA*. De plus, le gène *nodA* de ces bactéries apparaît phylogénétiquement éloigné des autres gènes *nodA* connus chez les rhizobiums. Nous avons également étudié et caractérisé les gènes *nif*, de ces *Bradyrhizobium* photosynthétiques afin de savoir s'ils s'exprimaient au cours de l'infection du riz.

En conclusion, nous insisterons particulièrement sur les perspectives appliquées et fondamentales offertes par cette nouvelle association originale entre

des rhizobiums et une céréale, et dont pourraient à l'avenir bénéficier les paysans des pays du Sud.

L'analyse bibliographique présentée ci-après nous a permis de faire le point des connaissances actuelles sur les microorganismes fixateurs d'azote et sur les microorganismes associés aux graminées.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les bactéries fixatrices d'azote

Bien que l'atmosphère constitue une réserve inépuisable d'azote, cet élément est paradoxalement un des principaux facteurs limitant de la croissance des plantes. En effet, comme tous les organismes eucaryotes, les végétaux sont incapables d'utiliser directement l'azote moléculaire N_2 de l'air et doivent donc disposer de formes d'azote combiné pour leur croissance. Dans le règne vivant, seuls certains procaryotes appelés fixateurs d'azote ou diazotrophes, possèdent la propriété de réduire l'azote N_2 en ammoniacque assimilable par les plantes grâce à un complexe enzymatique appelé nitrogénase. Cette fixation biologique de l'azote représente 65% de la fixation annuelle d'azote au niveau de la planète, 25% étant produit par la production industrielle d'ammoniacque, et 10% lors des orages et des éruptions volcaniques (Newton, 1998).

La capacité de fixer l'azote est largement répandue dans les deux grands domaines bactériens, c'est à dire à la fois chez les Archaea et les Bactéria, suggérant ainsi une origine très ancienne de la fixation de l'azote atmosphérique. Chez les eubactéries, cette propriété a été mise en évidence chez des microorganismes à métabolisme très différents comme les bactéries aérobies, les bactéries anaérobies, les cyanobactéries, les bactéries photosynthétiques et les actinomycètes dont les principaux groupes fixateurs d'azote sont représentés dans le tableau 1. Plus récemment, le séquençage de l'ARN 16S a permis de déterminer les relations phylogénétiques entre ces microorganismes fixateurs d'azote (Young, 1992). Parmi ceux-ci, de nombreuses espèces fixent l'azote à l'état libre, d'autres sont associées à certains organismes eucaryotes, principalement les plantes.

Tableau 1 : Phylogénie des principaux microorganismes fixateurs d'azote et leurs principales caractéristiques (D'après Young, 1992 ; Hill, 1992 ; Elmerich *et al.*, 1992).

Groupes	Genres	Caractéristiques
BACTERIA		
Bactéries vertes sulfureuses		Anaérobies obligatoires, utilisent le sulfate, sol.
Firmibactéries	<i>Bacillus</i> <i>Clostridium</i>	Microaérobies, Rhizosphère, Anaérobies obligatoires, sol.
Thallobactéries	<i>Frankia</i>	Aérobies, symbioses plantes actinorhiziennes.
Héliobactéries	<i>Heliospirillum</i>	
Cyanobactéries	<i>Synechococcus</i> <i>Anabaena</i> <i>Nostoc</i> <i>Calothrix</i>	Photosynthétiques, Aérobies (PA) (PA), symbiose avec <i>Azolla</i> (PA), symbiose avec lichens (PA), symbiose avec lichens
Campylobactéries	<i>Campylobacter</i>	Rhizosphère, endophytes
Protéobactéries		
Sous-division α	<i>Acétobacter</i> <i>Azorhizobium</i> <i>Azospirillum</i> <i>Bradyrhizobium</i> <i>Rhizobium</i> <i>Rhodobacter</i>	Chimioorganotrophes, microaérobies (CM), symbiotiques (CM), associatives (CM), Symbiotiques (CM), Symbiotiques Anaérobies, Aquatiques, Phototrophes
	<i>Rhodopseudomonas</i>	Anaérobies, Aquatiques, Phototrophes
	<i>Xanthobacter</i>	Microaérobies
Sous division β	<i>Alcaligenes</i>	Endophytes, microaérobies
Sous division δ	<i>Azotobacter</i> <i>Klebsiella</i> <i>Pseudomonas</i>	Chimioorganotrophes, Aérobies Anaérobies, Associatives Microaérobies, parfois associatives
Sous division γ	<i>Desulfovibrio</i>	Anaérobies obligatoires, réducteurs des sulfates
ARCHAEA	<i>Halobacterium</i>	

En fonction de leur relation avec les plantes et surtout de leur capacité à induire des organes particuliers chez les végétaux, les bactéries fixatrices d'azote sont classiquement réparties en deux groupes : les fixateurs libres et les fixateurs symbiotiques.

Les fixateurs libres sont associés aux racines ou aux feuilles de nombreuses plantes. Ce sont pour la plupart des bactéries hétérotrophes (*Azospirillum* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* spp.), qui fixent l'azote à l'état libre dans la rhizosphère ou la phyllosphère. Ainsi, les fixateurs libres tels que *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus* sp. et certaines espèces de *Pseudomonas* ont été isolés de la rhizosphère des graminées sauvages ou cultivées. Ces associations peuvent être plus étroites, variant de la simple multiplication bactérienne à la surface de la racine, à la colonisation des espaces intercellulaires, ou même à des invasions inter-cellulaires et intra-cellulaires qui sont caractéristiques des bactéries endophytes des plantes. Ainsi, la colonisation d'*Azospirillum* dans les espaces intercellulaires de l'épiderme et du cortex racinaire a été montrée dans les racines de maïs et de sorgho (Döbereiner *et al.*, 1995 ; Kennedy *et al.*, 1997). D'autres associations avec des fixateurs libres ont évolué en de véritables symbioses sans qu'aucun organe spécialisé de la plante ne soit formé, c'est le cas de la bactérie endophyte *Azoarcus* qui peut pénétrer à l'intérieur des cellules de la graminée fourragère tropicale *Leptochloa fusca* (Reinhold-Hurek et Hurek, 1997). De même, les bactéries photosynthétiques autotrophes comme les cyanobactéries (*Anabaena*, *Nostoc*, *Synechococcus*...), sont associées à des fougères comme les *Azolla*, ou les *Cycas*, avec lesquelles elles forment de véritables symbioses obligatoires dans lesquelles la plante bénéficie de la fixation d'azote de la bactérie, celle-ci demeurant cependant toujours à l'extérieur des cellules de la plante-hôte.

En dehors de ces symbioses particulières, le rôle des fixateurs libres dans la croissance des plantes a longtemps été un sujet de controverses. Sen (1929) fut le

premier à suggérer que les bactéries hétérotrophes associées au système racinaire du riz, pouvaient contribuer efficacement à la fixation d'azote. On sait aujourd'hui que, grâce à l'utilisation de mutants non fixateurs d'azote, les échanges entre la bactérie et la plante sont plus complexes et font beaucoup plus intervenir la production d'hormones végétales par la bactérie que l'activité fixatrice d'azote. C'est l'effet PGPR ou Plant Growth Promoting Bacteria dû essentiellement à la production d'Acide Indol-Acétique (AIA) et d'Acide Gibérellique (AG) qui agissent sur la croissance racinaire de la plante.

Les fixateurs symbiotiques sont les bactéries capables d'induire la formation de structures particulières différenciées sur leur plante-hôte dans lesquelles elles fixent l'azote. Dans ces symbioses il y a couplage efficace entre la photosynthèse de la plante et la fixation biologique de la bactérie, cette dernière fournissant l'azote nécessaire à la croissance de la plante et recevant en retour des sucres synthétisés par la photosynthèse de la plante hôte. Il existe deux grands groupes de bactéries symbiotiques, les bactéries unicellulaires communément appelées *Rhizobium* (bactéries Gram-), qui forment des nodules de racines ou parfois de tiges chez la plupart des légumineuses, et les bactéries filamenteuses du genre *Frankia* (bactéries Gram+) qui forment des nodules avec les plantes actinorhiziennes appartenant à différentes familles botaniques. Un troisième groupe beaucoup plus restreint de bactéries symbiotiques est représenté par quelques cyanobactéries du genre *Nostoc* qui forment des symbioses intracellulaires avec les plantes du genre *Gunnera* en colonisant des glandes préexistantes présentes sur la tige, et non pas en induisant un organe néo-formé comme chez les *Rhizobium* et les *Frankia* (Meeks, 1998).

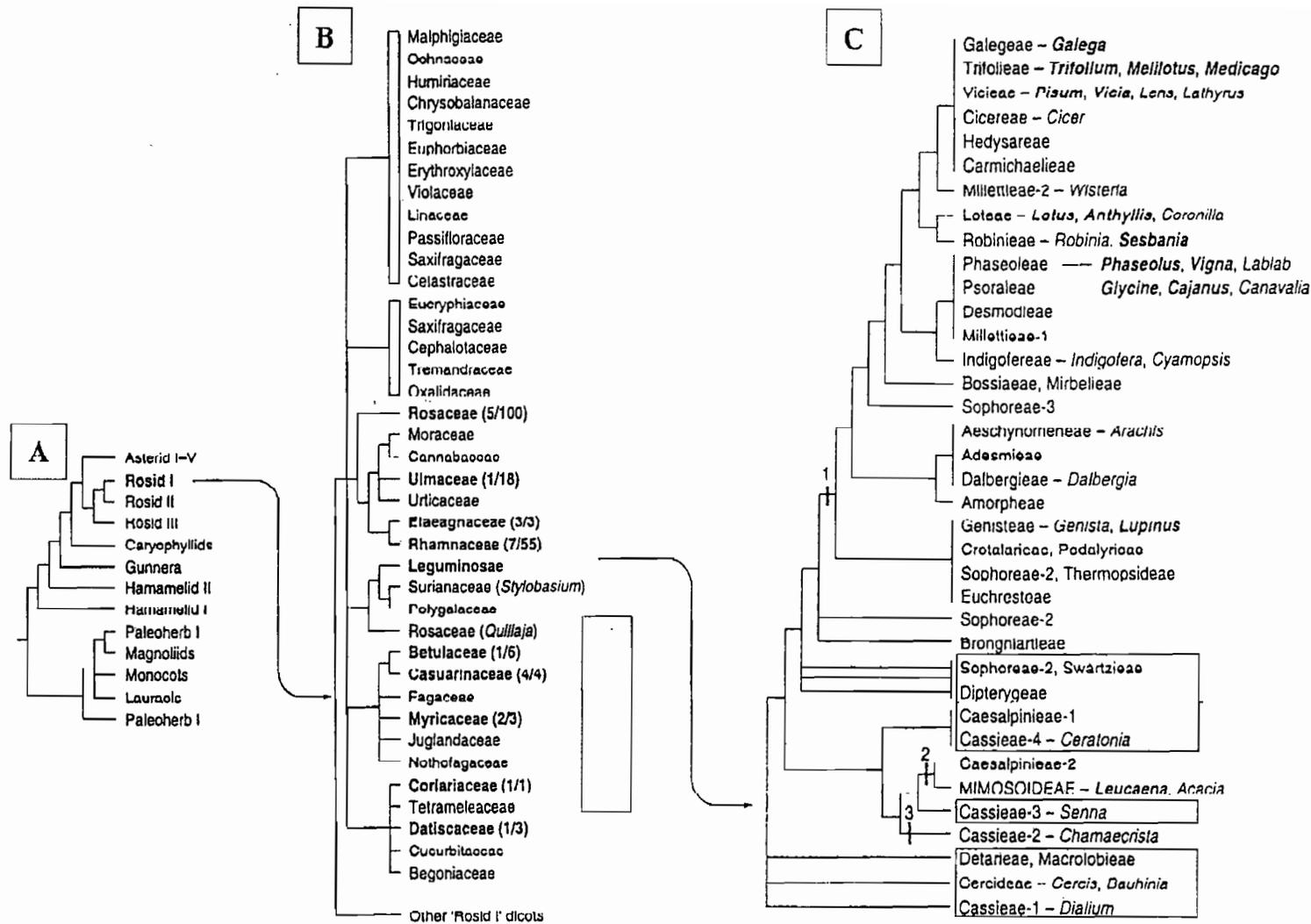


Figure 1. Phylogénie des plantes ayant la capacité de noduler.

A. Position du clade des Rosid I parmi les angiospermes. Noter la position du clade Gunnera, le seul angiosperme établissant une endosymbiose avec des cyanobactéries.

B. Clade des Rosid I. Les familles comportant des membres capables de noduler sont indiquées en gras. Entre parenthèses, le nombre de genres qui nodules par rapport au nombre total de genres de la famille.

C. Famille des Légumineuses. les familles encadrées ne comportent pas de membres connus établissant des symbioses fixatrices d'azote.

1,2,3: Possibles origines indépendantes pour la nodulation.

D'après Doyle, 1998.

II. Symbioses fixatrices d'azote et évolution des végétaux

Chez les plantes, des analyses phylogénétiques indiquent que toutes les espèces capables de former des nodules fixateurs d'azote en symbiose avec des bactéries appartiennent à un même clade (Rosidées I), ce qui suggère que cette propriété serait apparue chez un ancêtre direct de toutes ces espèces végétales (Soltis *et al.*, 1999). A l'intérieur de ce clade, seule une minorité de genres peut noduler, et chaque sous-clade compte des membres non symbiotiques (Figure 1). La capacité à noduler aurait évolué plusieurs fois à l'intérieur de chaque sous-clade, en entraînant la perte de cette propriété chez les ancêtres de certains de leurs membres (Soltis *et al.*, 1995, Gualtieri et Bisseling, 2000).

Il existe deux grands groupes de plantes nodulantes : les plantes le plus souvent ligneuses, qui interagissent avec les *Frankia* et que l'on appelle plantes à actinorhizes, et les légumineuses, dont la plupart vivent en symbiose avec les *Rhizobium*. Notons que le genre *Parasponia* constitue l'unique exception d'une non-légumineuse nodulée par les rhizobia. Quatre des six sous-clades des Rosidées I (Figure 1) comptent donc des membres capables de former des nodosités fixatrices d'azote, dont trois comprennent les plantes à actinorhizes et les Ulmacées, genre auquel appartient *Parasponia*, et le quatrième comprend la famille des légumineuses (Soltis *et al.*, 1995, Soltis *et al.*, 1999).

Parmi les angiospermes, on retrouve le cas particulier du genre *Gunnera*, qui n'appartient pas au clade des Rosidées I (Figure 1) mais qui forme des symbioses intracellulaires avec des cyanobactéries. Comme il ne s'agit pas dans ce cas de l'induction d'un organe néo-formé, la position des *Gunnera* en dehors des Rosidées I n'est pas incompatible avec l'hypothèse que la capacité à former des nodules racinaires ou caulinaires, n'est apparue qu'une seule fois au cours de l'évolution chez

un ancêtre des Rosidées (Soltis *et al.*, 1999). Cette hypothèse conforte le fait que l'on n'ait jamais trouvé chez les plantes appartenant aux monocotylédones, dont fait partie le riz sauvage étudié dans cette thèse, d'organes symbiotiques particuliers hébergeant des bactéries fixatrices d'azote intracellulaires.

III. La symbiose *Rhizobium*-Légumineuses

L'association *Rhizobium*/légumineuses est sans doute la symbiose fixatrice d'azote la plus efficace. On estime qu'elle fixe chaque année autant d'azote que l'ensemble des industries d'engrais chimiques de la planète. Cette symbiose revêt donc un intérêt économique et écologique considérable car les légumineuses, grâce à la fixation de l'azote, peuvent pousser dans des sols très pauvres et contribuent ainsi activement à enrichir le sol en azote combiné assimilable par toutes les autres plantes.

C'est essentiellement à l'intérieur des cellules de la plante-hôte que les rhizobia, dont les cellules intracellulaires se présentent le plus souvent sous forme de volumineux bactéroïdes (Verma, 1992), transforment l'azote de l'air en ammonium. La plante fournit en retour à la bactérie une niche écologique dans laquelle les bactéroïdes reçoivent les substrats carbonés dont ils ont besoin pour leur métabolisme. Les rhizobiums peuvent ainsi se multiplier en très grand nombre, (on estime leur nombre à 10^9 bactéries par nodule), et sont protégés des autres microorganismes avec lesquels ils sont habituellement en compétition lorsqu'ils sont dans les sols. Les populations de rhizobiums relâchés dans les sols au moment de la sénescence des nodules sont généralement importantes (Brewin, 1991). Chez les légumineuses tropicales qui représentent les symbioses les plus primitives, chaque bactéroïde est capable de se reproduire. Par contre, chez les symbioses les plus

évoluées comme chez les principales légumineuses tempérées, de nombreux bactéroïdes perdent la capacité de se reproduire comme si la symbiose aboutissait à un suicide pour la bactérie. Dans ce cas, la plante aurait "détourné à son unique profit" la symbiose. Inversement, certains rhizobiums non fixateurs d'azote deviennent de véritables bactéries parasites ; ils consomment les sucres de la plante sans lui apporter d'azote. Ce type de relations parasitaires est relativement fréquent dans la nature, mais il semble que la plante réussisse généralement *in fine* à sélectionner, parmi tous les rhizobiums présents dans les sols, les bactéries fixatrices d'azote les plus efficaces.

IV. Les partenaires de la symbiose *Rhizobium*-Légumineuses

IV.1. Les rhizobia, partenaires bactériens

Les rhizobia sont des bactéries Gram-, en bâtonnets, strictement aérobies et non sporulées (Jordan, 1984) qui peuvent infecter les racines et, parfois les tiges des plantes appartenant à la famille des Légumineuses pour y former des nodules. Phylogénétiquement, les rhizobia font partie de la sous-classe alpha des Protéobactéries (Stackebrandt *et al.*, 1988).

IV.1.1. La taxonomie des rhizobia

La taxonomie a pour objet d'étudier et de décrire aussi complètement que possible les relations qui existent entre différents groupes de micro-organismes. La taxonomie bactérienne actuelle a une approche polyphasique, fondée sur le regroupement d'un maximum de données obtenues à partir de diverses techniques de différents niveaux d'expression basées sur des critères de discrimination

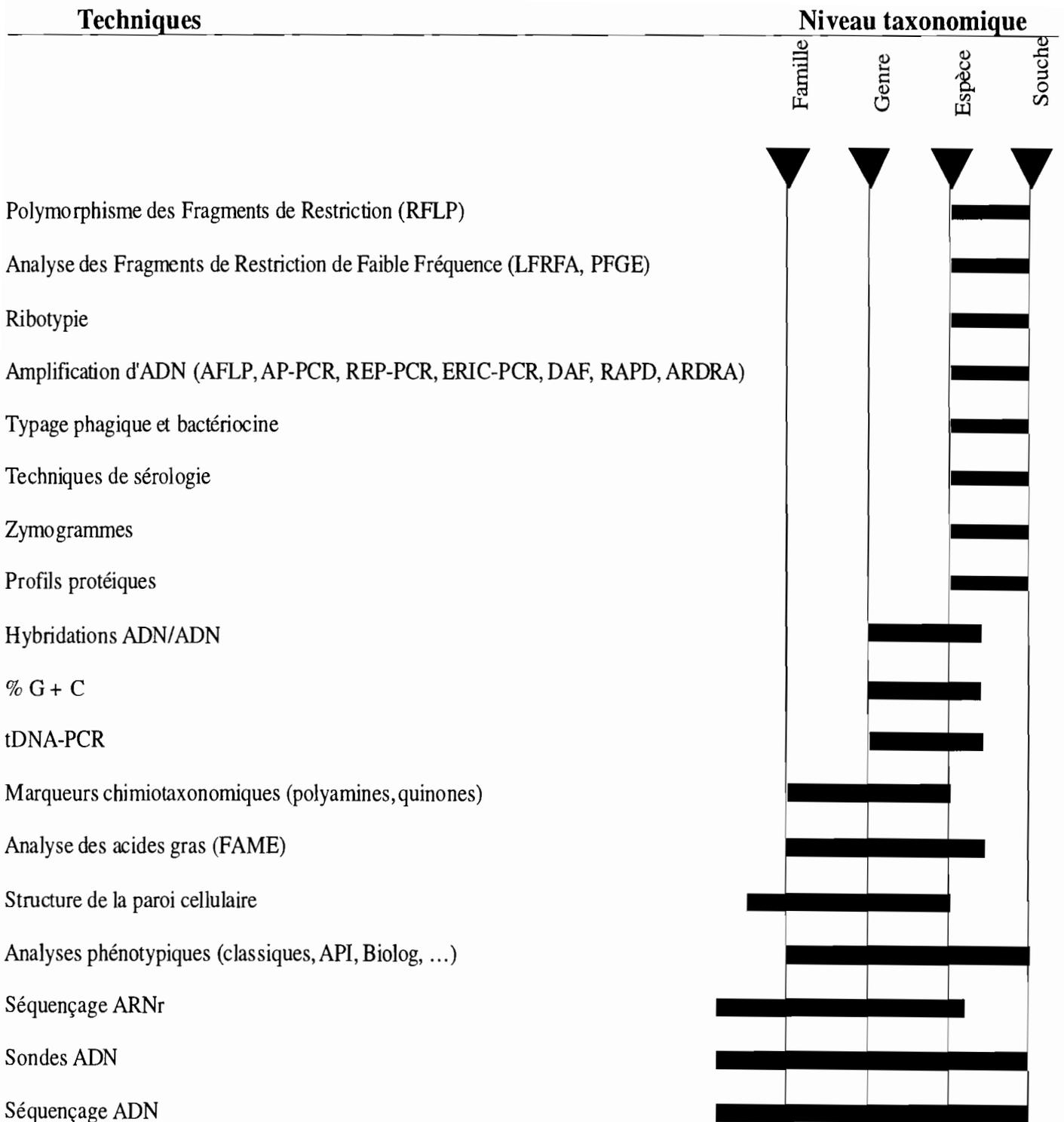


Figure 2. Pouvoirs discriminatifs des différentes techniques de taxonomie (d'après Vandamme *et al.*, 1996).

Abréviations : RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism ; LFRFA, Low Frequency Restriction Fragment Analysis ; PFGE, Pulsed-Field Gel Electrophoresis ; AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism ; AP-PCR, Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction (PCR) ; REP-PCR, Repetitive Extragenomic Palindromic-PCR ; ERIC-PCR, Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR ; DAF, DNA Amplification Fingerprinting ; RAPD, Randomly Amplified Polymorphic DNA ; ARDRA, Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis ; FAME, Fatty Acid Methyl Ester.

différents (Vandamme *et al.*, 1996). Le premier niveau d'expression correspond au génome. L'information d'un génome bactérien s'exprime d'abord au niveau de la structure chimique des protéines. La nature chimique des composants cellulaires (sucres substitués, paroi cellulaire, lipides...) représente le deuxième niveau, tandis que les propriétés métaboliques correspondent au troisième niveau d'expression (Graham *et al.*, 1991).

IV.1.2. Les techniques de classification des rhizobia

Parmi les techniques utilisées pour la classification taxonomique, certaines sont considérées comme indispensables (figure 2). Le séquençage des molécules d'ARNr 16S est particulièrement utilisé. Les gènes ribosomiaux ont l'avantage de contenir à la fois des séquences très conservées et des séquences hypervariables. Leur pouvoir discriminatif très étendu, permet ainsi de séparer des genres, des familles, des classes et des sous-classes (Woese, 1987 ; de Ley, 1991). Actuellement sur la base du concept polyphasique, l'espèce est définie comme étant un ensemble de souches présentant entre elles un pourcentage d'homologie d'hybridation ADN/ADN d'au moins 70% avec une valeur de ΔT_m inférieure ou égale à 5°C (Wayne *et al.*, 1987). Vandamme *et al.*, (1996) ont définie l'espèce comme étant l'association d'isolats descendant d'un ancêtre commun chez lesquels des évènements génétiques ont aboutis à des clones présentant différents degrés de recombinaison et caractérisés par : un certain niveau de cohérence phénotypique entre eux, un degré significatif d'homologie ADN/ADN, plus de 97% d'homologie de séquence au niveau de l'ADNr 16S. On désigne une souche type de l'espèce qui sert de référence.

Depuis quelques années, de nouvelles observations et récoltes de nodules ont été effectuées sur de nombreuses espèces annuelles ou pérennes, en particulier dans

Tableau 2. Classification des rhizobia.

Genres	Espèces	Plantes hôtes	Références			
Rhizobium (croissance rapide)	<i>R. leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i>	<i>Pisum sativum</i> , <i>Vicia</i> , <i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i>	Jordan, 1984 Jordan, 1984			
	biovar <i>trifolii</i> biovar <i>phaseoli</i>	<i>Trifolium pratense</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Jordan, 1984 Jordan, 1984			
	<i>R. tropici</i> Type II A Type II B	<i>P. vulgaris</i> L., <i>Leucaena</i> <i>P. vulgaris</i> L., <i>Leucaena</i>	Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991 Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991			
	<i>R. elti</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena</i>	Segovia <i>et al.</i> , 1993 ; Hernandez-Lucas <i>et al.</i> , 1995			
	<i>R. hainanense</i>	<i>Desmodium sinuatum</i> & autres plantes de régions arides	Chen <i>et al.</i> , 1997			
	<i>R. gallicum</i> biovar <i>gallicum</i> biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Amarger <i>et al.</i> , 1997 Amarger <i>et al.</i> , 1997 Amarger <i>et al.</i> , 1997			
	<i>R. mongolense</i> <i>R. galegae</i> biovar <i>orientalis</i> biovar <i>officinalis</i>	<i>Medicago ruthenica</i> <i>Galega orientalis</i> <i>Galega officinalis</i>	Van Berkum <i>et al.</i> , 1998 Lindström, 1989 Lindström, 1998 Lindström, 1998			
	<i>R. giardinii</i> biovar <i>giardinii</i> biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Amarger <i>et al.</i> , 1997 Amarger <i>et al.</i> , 1997 Amarger <i>et al.</i> , 1997			
	<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	Wang <i>et al.</i> , 1998			
	Mesorhizobium (croissance intermédiaire)	<i>M. loti</i> <i>M. huakuii</i> <i>M. ciceri</i> <i>M. tianshanense</i>	<i>Lotus corniculatus</i> <i>Astragalus sinicus</i> , <i>Acacia</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Glycyrrhiza pallidiflora</i> & autres plantes tropicales	Jarvis <i>et al.</i> , 1982 Chen <i>et al.</i> , 1991 Nour <i>et al.</i> , 1994 Chen <i>et al.</i> , 1995		
		<i>M. mediterraneum</i> <i>M. plurifarum</i> <i>M. amorphae</i>	<i>Cicer arietinum</i> <i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Chamaecrista</i> <i>Amorpha fruticosa</i>	Nour <i>et al.</i> , 1995 de Lajudie <i>et al.</i> , 1998a Wang <i>et al.</i> , 1999		
		Sinorhizobium (croissance rapide)	<i>S. meliloti</i> <i>S. fredii</i> chemovar <i>fredii</i> chemovar <i>siensis</i> <i>S. saheli</i> biovar <i>acaciae</i> biovar <i>sesbaniae</i> <i>S. teranga</i> biovar <i>acaciae</i> biovar <i>sesbaniae</i> <i>S. medicae</i> <i>S. kostiense</i> <i>S. arboris</i>	<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> , <i>Trigonella</i> <i>Glycine max</i> <i>Glycine max</i> <i>Sesbania</i> spp. <i>Acacia</i> spp. <i>Sesbania</i> spp. <i>Acacia</i> spp. <i>Sesbania</i> spp. <i>Medicago</i> <i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i> <i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i>	Dangeard, 1926 ; Jordan, 1984 ; de Lajudie <i>et al.</i> , 1994 Chen <i>et al.</i> , 1988 ; de Lajudie <i>et al.</i> , 1994 Scholla et Elkan, 1984 Scholla et Elkan, 1984 de Lajudie <i>et al.</i> , 1994 Boivin et Giraud, 1999 Boivin et Giraud, 1999 de Lajudie <i>et al.</i> , 1994 ; Trüper et de Clari, 1997 Lortet <i>et al.</i> , 1996 Lortet <i>et al.</i> , 1996 Rome <i>et al.</i> , 1996 Nick <i>et al.</i> , 1999 Nick <i>et al.</i> , 1999	
			Azorhizobium (croissance rapide)	<i>A. caulinodans</i> <i>Azorhizobium</i> sp.	<i>Sesbania rostrata</i> <i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus <i>et al.</i> , 1988 Rinaudo <i>et al.</i> , 1991
				Bradyrhizobium (croissance lente)	<i>B. japonicum</i> <i>B. elkanii</i> <i>B. liaoningense</i> <i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Glycine max</i> , <i>Glycine soja</i> <i>Glycine max</i> <i>Glycine max</i> , <i>Glycine soja</i> <i>Vigna</i> , <i>Lupinus</i> , <i>Mimosa</i> <i>Acacia</i> <i>Aeschynomene</i>
			Allorhizobium (croissance rapide)		<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i> de Lajudie <i>et al.</i> , 1998b

les régions tropicales. Parallèlement, l'isolement de nombreux rhizobiums de ces espèces a récemment permis à plusieurs laboratoires dans le monde de développer des recherches sur l'étude de la diversité des rhizobiums et de les caractériser. Ainsi, la classification des rhizobia est en pleine évolution.

IV.1.3. Les différents genres et espèces

Sur la base d'études systématiques fondées sur la taxonomie numérique (t'Mannetje, 1967), les hybridations ADN/ADN et ADN/ARNr (Gibbons et Gregory, 1972) ainsi que d'autres critères incluant aussi bien le temps de génération sur mannitol-extrait de levure (Jordan, 1982; Jarvis *et al.*, 1992), que le séquençage du 16 S (Young, 1999), les rhizobiums capables d'induire des nodules fixateurs d'azote chez les Légumineuses sont actuellement subdivisés en six genres (*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Allorhizobium* et *Sinorhizobium*) et une vingtaine d'espèces appartenant à trois branches phylogénétiquement distinctes (Young et Haukka, 1996) (tableau 2).

IV.1.3.1. Le genre *Rhizobium*

Le genre *Rhizobium* regroupe des bactéries dites « à croissance rapide » (temps de génération inférieur à 6 heures) et comporte 4 espèces définies : *Rhizobium leguminosarum* avec les trois biovars *trifolii*, *phaseoli* et *viciae*, *Rhizobium galegae* isolé de *Galegae officinalis* et *Galegae orientalis* (Lindström, 1989), *Rhizobium tropici* qui nodule aussi *Leucaena leucocephala* (Martinez-Romero *et al.*, 1991), *Rhizobium etli* qui a initialement été décrit comme ne nodulant que le haricot (Segovia *et al.*, 1993). Ce genre infecte principalement les légumineuses des régions tempérées.

Récemment, d'autres nouvelles espèces de *Rhizobium* ont été décrites. L'espèce *Rhizobium huakuii* renferme des souches très spécifiques isolées de *Astragalus sinicus* (Chen *et al.*, 1991). *R. ciceri* (Nour *et al.*, 1994a) phylogénétiquement proche de *R. loti* et de *R. huakuii*; *R. mediterraneum* (Nour *et al.*, 1995) comprend les souches nodulant le pois chiche ; *R. tianshanense* (Chen *et al.*, 1995), cette espèce renferme diverse souches isolées de légumineuses des sols arides et salés de chine. Le temps de génération de ces souches est compris entre 5 et 15 heures et l'analyse du séquençage partiel de l'ARNr 16S apparente les souches de *Rhizobium tianshanense* à l'espèce *R. huakuii*. Les rhizobia isolés des cultivars européens de *Phaseolus vulgaris* sont rattachés à l'espèce *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* ainsi qu'à deux espèces génomiques, représentées par les souches R602 et H152 (Laguerre *et al.*, 1993b) et désignées récemment comme *Rhizobium gallicum* et *R. giardinii* respectivement (Amarger *et al.*, 1997).

IV.1.3.2. Le genre *Bradyrhizobium*

Le genre *Bradyrhizobium* comprend les bactéries dites « à croissance lente » (temps de génération supérieur à 6 heures). Depuis sa caractérisation par Jordan (1982 et 1984), ce genre ne comprenait qu'une seule espèce définie : *Bradyrhizobium japonicum* nodulant le soja (*Glycine max*), et le siratro (*Macroptilium atropurpureum*). Récemment sur la base d'hybridation ADN/ADN, deux nouvelles espèces, *Bradyrhizobium elkanii* (Kuykendal *et al.*, 1992), et *B. liaoningensis* (Xu *et al.*, 1995) ont été définies. Cette dernière espèce regroupe les souches à croissance très lente isolées des nodules de *Glycine max* et de *Glycine soja*. Les bactéries appartenant au genre *Bradyrhizobium* infectent de nombreuses légumineuses tropicales. De nombreuses souches de *Bradyrhizobium* ont été isolées de différentes légumineuses, mais la

distinction en espèces n'a pas toujours été définie. Elles sont regroupées sous le terme *Bradyrhizobium* sp. suivi du nom de leur plante d'isolement (Dupuy *et al.*, 1994).

IV.1.3.3. Le genre *Sinorhizobium*

Le genre *Sinorhizobium* a été initialement créé en 1888 pour regrouper les *Rhizobium* à croissance rapide nodulant le soja ; il contenait alors la nouvelle espèce *Sinorhizobium xinjiangense* isolée de nodules de soja en chine (d'où le nom du genre), et *Sinorhizobium fredii*, anciennement *Rhizobium fredii* (Chen *et al.*, 1988). Ce genre a été redéfini par de Lajudie *et al.*, (1994). Il est actuellement constitué de quatre espèces. Deux espèces, *Sinorhizobium meliloti* (Jordan, 1984; Eardly *et al.*, 1990) et *S. fredii* (Scholla et Elkan, 1984), qui appartenaient auparavant au genre *Rhizobium* sont incluses dans ce nouveau genre. Deux nouvelles espèces, *S. saheli* et *S. terangae* ont été décrites (de Lajudie *et al.*, 1994). *S. saheli* ne comprend que des souches nodulant les différentes espèces de *Sesbania*, alors que *S. teranga* comprend à la fois des souches de *Sesbania* et des souches d'*Acacia*.

Rome *et al.*, (1996b) ont proposé la création d'une nouvelle espèce, *Sinorhizobium medicae*, associée au genre *Medicago* qui est également nodulé par *Sinorhizobium meliloti*. Récemment, Nick *et al.*, (1999) ont décrit deux nouvelles espèces *Sinorhizobium arboris* et *S. kostiense* (tableau 2). Ces espèces comprennent des souches dont la plupart sont isolées au Soudan.

IV.1.3.4. Le genre *Mesorhizobium*

Le genre *Rhizobium* étant très hétérogène; plusieurs branches divergentes ont été taxonomiquement identifiées. Celle de *R. loti* est très éloignée des autres branches

(Jarvis *et al.*, 1986) et justifie donc la description d'un cinquième genre qui a été appelé *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997) et où sont regroupées cinq espèces, *Mesorhizobium loti*, *M. huakuii*, *M. ciceri*, *M. tianshanense*, *M. mediterraneum*. (Lindström *et al.*, 1995 ; Jarvis *et al.*, 1997) et *M. amorphae* isolé de la légumineuse *Amorpha fruticosa* (Wang *et al.*, 1999) (Tableau 2).

IV.1.3.5. Le genre *Azorhizobium*

Taxonomiquement très éloigné des trois autres, ce genre comprend une seule espèce définie, *Azorhizobium caulinodans* dont la souche type est la souche ORS571 (Dreyfus *et al.*, 1988) qui nodule les tiges et les racines de *Sesbania rostrata* (Dreyfus *et al.*, 1988). Ces *Rhizobium* ont la capacité exceptionnelle par rapport aux autres rhizobia de fixer l'azote en culture pure et d'utiliser l'azote fixé comme seule source d'azote pour leur croissance (Dreyfus *et al.*, 1983 ; Gebhardt *et al.*, 1984). Des études d'hybridation ADN-ADN réalisées sur 191 souches isolées de tiges et de racines de *Sesbania rostrata* ont révélé l'existence d'une seconde espèce génomique contenant 9 souches. Cette espèce n'a pas été nommée à ce jour (Rinaudo *et al.*, 1991). Le genre *Azorhizobium* est taxonomiquement éloigné des genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Sinorhizobium*, mais extrêmement proche des bactéries aquatiques appartenant aux genres *Xanthobacter* et *Aquabacter*. Ainsi, les *Azorhizobium* seraient des bactéries aquatiques ayant reçu par conjugaison avec des rhizobiums du sol (peut être des *Sinorhizobium*) des gènes de nodulation, et qui seraient devenus spécifiques de la nodulation de tige de la légumineuse aquatique *Sesbania rostrata*. Contrairement aux bactéries du genre *Sinorhizobium* qui forment des nodules effectifs sur les racines de nombreuses espèces de *Sesbania*, les azorhizobia ne fixent l'azote qu'avec *Sesbania rostrata* (Boivin *et al.*, 1997a).

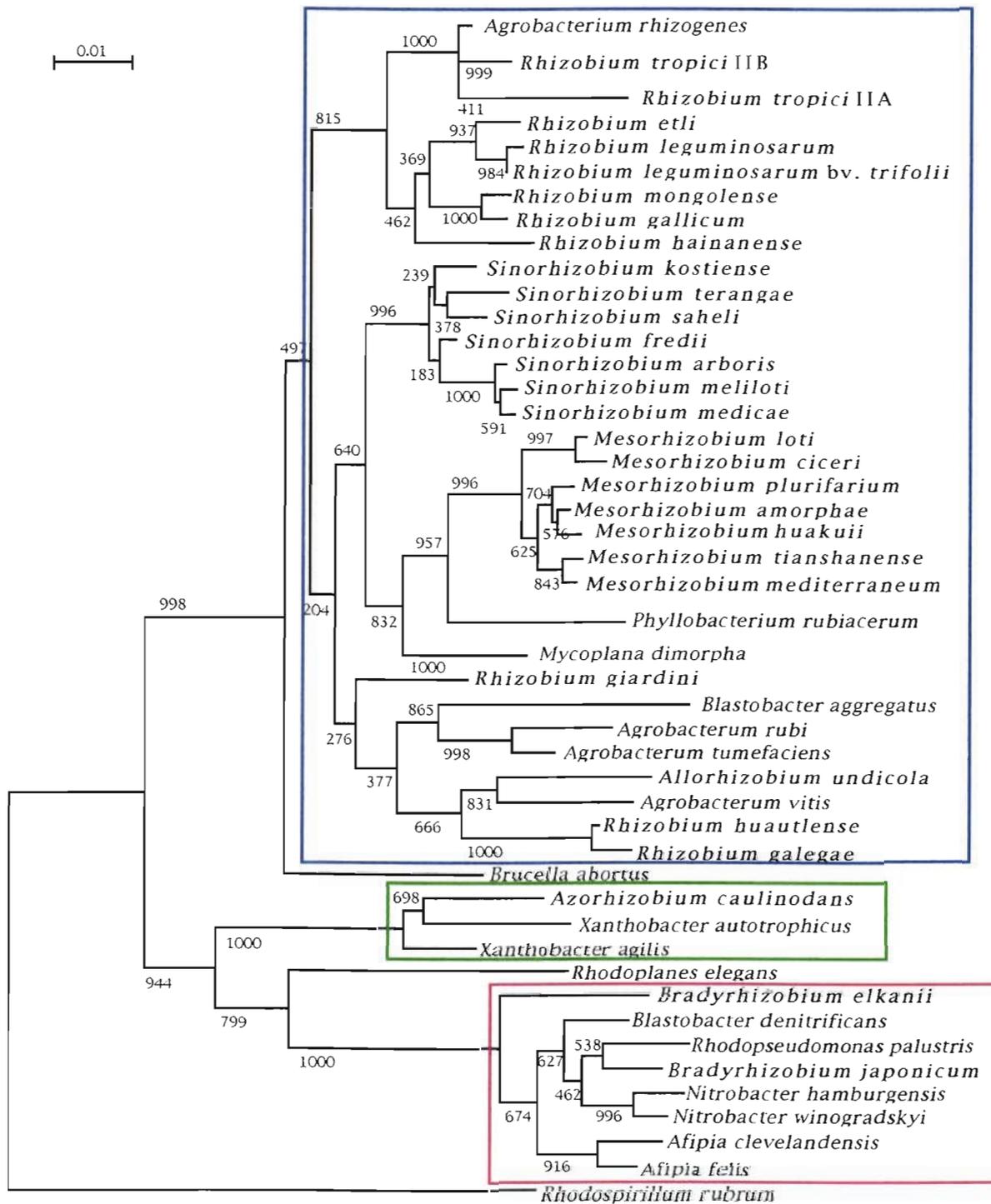


Figure 3. Arbre phylogénétique des rhizobia basé sur la comparaison des séquences d'ADNr 16S, obtenu par la méthode du neighbor-joining.

Les valeurs bootstrap sont indiquées aux points d'embranchement. L'échelle représente le pourcentage de substitutions.

IV.1.3.6. Le genre *Allorhizobium*

Les résultats de l'étude polyphasique réalisée par de Lajudie *et al.*, (1998b) ont amené à définir un nouveau genre et donc une nouvelle espèce *Allorhizobium undicola* isolée de la légumineuse aquatique *Neptunia natans*.

IV.1.4. Les liens phylogénétiques entre les genres

Les bactéries associées aux Légumineuses constituent la famille des Rhizobiaceae. Cette famille comprend entre autres les genres *Agrobacterium* et *Phyllobacterium*, bactéries également impliquées dans des interactions spécifiques avec des plantes. La comparaison des séquences d'ARN 16S révèle une hétérogénéité phylogénétique au sein des rhizobia (figure 3). Phylogénétiquement, le genre *Bradyrhizobium* est plus proche des bactéries non symbiotiques comme *Rhodopseudomonas palustris*, *Nitrobacter*, *Afipia*, et *Blastobacter denitrificans*, que des genres *Rhizobium* et *Agrobacterium* (Willems et Collins, 1992, 1993 ; Molouba *et al.*, 1999). La souche type de *Bradyrhizobium japonicum* est phylogénétiquement plus proche de *Afipia*, *R. palustris* et *Nitrobacter* que de *B. elkanii* et de certains *Bradyrhizobium* sp. Les genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium* sont apparentés aux genres *Agraobacterium*, *Brucella*, *Bartonella*, *Phyllobacterium* et *Blastobacter* (Young et Haukka, 1996 ; de Lajudie *et al.*, 1994). L'espèce *Azorhizobium caulinodans* est phylogénétiquement proche des genres *Xanthobacter* et *Aquabacter* (Dreyfus *et al.*, 1988 ; Rainey et Wiegel, 1996).

De nombreuses études en cours sur les microsymbiotes des Légumineuses pourraient modifier la taxonomie des rhizobia présentée dans le tableau 2. En effet,

seulement près de 20% des Légumineuses (soit 3400 espèces) ont été testées pour évaluer leur aptitude à noduler.

IV.2. Les Légumineuses, partenaires végétaux

Les légumineuses appartiennent à la famille des *Leguminosae* qui se subdivise en trois sous-familles, les *Papilinoideae*, les *Mimosoideae*, et les *Caesalpinioideae*.

La famille des *Leguminosae* est la troisième plus grande famille de plantes à fleurs après les *Orchidaceae* et les *Compositae*. Elle comporte approximativement 750 genres et environ 19000 espèces. On considère que la majorité des légumineuses (80%) sont capables de noduler lorsqu'elles sont en présence de rhizobiums. En réalité, ces données sont des extrapolations car, seul un nombre restreint d'espèces de légumineuses a jusqu'à présent été réellement examiné pour leur capacité à noduler (Allen et Allen, 1981). On notera que la nodulation par les rhizobia est plus fréquente dans les deux sous-familles des *Mimosoideae* et des *Papilionoideae* que chez les *Caesalpinioideae* (Polhill et Raven, 1981).

Chez la grande majorité des légumineuses, les nodules fixateurs d'azote sont localisés sur le système racinaire (*Phaseolus vulgaris*, *Arachis hypogaea*, *Glycine max* etc..). Cependant, quelques rares espèces appartenant aux genres *Aeschynomene* (Alazard, 1985 ; Becker *et al.*, 1988), *Sesbania* (Dreyfus et Dommergues, 1981a), *Discolobium* (Loureiro *et al.*, 1994) et *Neptunia* (Schaede, 1940) présentent une particularité remarquable qui les distingue des autres légumineuses ; elles possèdent des nodules fixateurs d'azote non seulement sur leurs racines, mais aussi sur leurs tiges.

Tableau 3. Distribution géographique et classement des légumineuses à nodules de tige.

Légumineuses	Origine géographique	Type de nodulation	Références
<i>Aeschynomene</i>			
<i>afraspera</i>	Afrique	I	Alazard, 1985
<i>nilotica</i>	Afrique	I	Alazard, 1985
<i>aspera</i>	Afrique, Sud Est Asiatique	II	Hagerup, 1928
<i>ciliata</i>	Afrique, Amérique de Sud	II	Alazard, 1985
<i>cristata</i>	Afrique, Madagascar	II	Ladha <i>et al.</i> , 1992
<i>denticulata</i>	Amérique de Sud	II	Eaglesham et Slazay, 1983
<i>evenia</i>	Amérique de Sud	II	Barrios et Gonzales, 1971
<i>indica</i>	Pantropical	II	Arora, 1954; Yatazawa et Yoshida, 1979
<i>paniculata</i>	Amérique de Sud	II	Suessenguth von et Beyerle, 1936
<i>pratensis</i>	Amérique de Sud	II	Eaglesham et Slazay, 1983
<i>rudis</i>	Amérique de Sud	II	Eaglesham et Slazay, 1983
<i>scabra</i>	Amérique de Sud	II	Eaglesham et Slazay, 1983
<i>schimperi</i>	Afrique	II	Alazard, 1985
<i>sensitiva</i>	Pantropical	II	Eaglesham et Slazay, 1983; Alazard, 1985
<i>tambacoundensis</i>	Afrique	II	Alazard, 1985
<i>uniflora</i>	Afrique	II	Ladha <i>et al.</i> , 1992
<i>villosa</i>	Amérique de Sud	II	Barrios et Gonzales, 1971
<i>fluminensis</i>	Amérique de Sud	II	Loureiro <i>et al.</i> , 1995
<i>virginica</i>	Amérique de Nord	II	Eaglesham <i>et al.</i> , 1990
<i>crassicaulis</i>	Afrique	III	Alazard, 1985
<i>elaphroxylon</i>	Afrique	III	Jenik et Kubikova, 1969
<i>pfundii</i>	Afrique	III	Alazard, 1985
<i>Sesbania</i>			
<i>rostrata</i>	Afrique	I	Dreyfus <i>et al.</i> , 1988
<i>punctata</i>	Madagascar	I	Dreyfus, résultats non publiés
<i>speciosa</i>	Asie, Afrique	II	Ladha <i>et al.</i> , 1992
<i>pubescens</i>	Afrique	II	Dreyfus, résultats non publiés
<i>javanica</i>	Sud Est Asiatique	III	Ladha <i>et al.</i> , 1992
<i>Neptunia</i>			
<i>oleacera</i>	Pantropicale	III	Schaede, 1940
<i>Discolobium</i>			
<i>pulchellum</i>	Amérique de Sud	III	Loureiro <i>et al.</i> , 1994

Les espèces sont groupées en fonction de leur capacité de nodulation sur la tige: I, nodulation aérienne possible sur toute la tige; II, nodulation aérienne limitée à la base de la tige; III, nodulation exclusivement sur la partie immergée de la tige.

IV.3. Classification des Légumineuses à nodules de tiges

La nodulation de tige a été rapportée pour la première fois chez *Aeschynomene aspera* L. (Hagerup, 1928). Elle était considérée comme une curiosité naturelle jusqu'à ce que l'étude menée chez *Sesbania rostrata*, une légumineuse tropicale, révèle les propriétés exceptionnelles de ce système fixateur d'azote (Dreyfus et Dommergues, 1981). Les légumineuses à nodules de tige appartiennent à quatre genres différents, *Sesbania* (5 espèces), *Aeschynomene* (22 espèces), *Discolobium* (1 espèce) appartenant à la sous-famille des Papilionacées, et le genre *Neptunia* (1 espèce) de la sous-famille des mimosacées (tableau 3). Toutes ces plantes sont des herbacées annuelles ou pérennes, des arbustes ou des petits arbres qui poussent en saison des pluies, dans les sols temporairement inondés, dans les mares et marécages, aux bords des rivières, lacs et cours d'eau des régions tropicales (Boivin *et al.*, 1997b). Ces légumineuses qui se rencontrent essentiellement dans les écosystèmes aquatiques sont considérées comme des légumineuses aquatiques. Les légumineuses à nodules de tiges sont caractérisées par la présence sur leurs tiges, des sites prédéterminés de nodulation (Dreyfus *et al.*, 1984). Ces sites de nodulation caulinaires se développent indépendamment de toute infection bactérienne et correspondent à des primordia racinaires en état de dormance, présents sur toute la longueur de la tige, capables de se différencier en racines latérales en cas d'immersion des tiges (Duhoux et Dreyfus, 1982 ; Alazard et Duhoux, 1990). Ces primordia peuvent rester cachés sous le cortex de la tige, formant ainsi un dôme épidermique ; ou alors ils percent légèrement cette structure, montrant une protubérance d'un apex en phase de dormance qui forme une cavité circulaire dans l'épiderme de la tige. Lorsqu'ils sont mis en contact avec les rhizobiums spécifiques, ces sites donnent naissance à des nodules fixateurs d'azote. Comme les rhizobia pénètrent les primordia racinaires par invasion intercellulaire, seuls les primordia émergeant de l'apex des tiges sont accessibles à

l'infection rhizobiale. Ainsi, la nature et la localisation des sites de nodulation restent des facteurs importants pour cette infection. Ils sont utilisés pour classer les légumineuses à nodules de tiges (tableau 3).

On peut distinguer trois groupes de plantes parmi les Légumineuses à nodules caulinaires :

- Les légumineuses du groupe I présentent des primordia racinaires qui ont nettement percé l'épiderme de la tige. Après simple contact avec les rhizobiums, les nodosités apparaissent sur toute la longueur de la tige. Ces nodules peuvent soit recouvrir toute la tige comme chez *Aeschynomene afraspera* et *A. nilotica*, soit être disposés en trois ou quatre rangées verticales sur la tige comme chez *Sesbania rostrata* et *S. punctata*.
- Le groupe II comprend des plantes avec des primordia racinaires moins développés que ceux du groupe I, seuls les primordia les plus bas percent l'épiderme de tige. Dans ce cas, la nodulation est généralement limitée à la partie submergée des tiges comme chez certaines espèces d'*Aeschynomene* (*A. indica*, *A. sensitiva*) et de *Sesbania* (*Sesbania pubescens*).
- Chez les Légumineuses du groupe III comme chez *Neptunia oleracea*, *Aeschynomene pfundii*, *A. elaphroxylon*, les primordia racinaires se développent exclusivement à la base de la tige, uniquement lorsque celle-ci est périodiquement soumise à l'immersion. On ne trouve jamais les nodosités sur les tiges aériennes.

Tableau 4. Classification des *Aeschynomene* (d'après Alazard et Duhoux, 1988).

Groupe I	Groupe II	Groupe III
<i>A. americana</i>	<i>A. afraspera</i>	<i>A. ciliata</i>
<i>A. crassicaulis</i>	<i>A. nilotica</i>	<i>A. denticulata</i>
<i>A. elaphroxylon</i>		<i>A. evenia</i>
<i>A. falcata</i>		<i>A. indica</i>
<i>A. fluminensis</i>		<i>A. pratensis</i>
<i>A. histrix</i>		<i>A. rudis</i>
<i>A. pfundii</i>		<i>A. scabra</i>
<i>A. schimperi</i>		<i>A. sensitiva</i>
<i>A. villosa</i>		<i>A. tambacoudensis</i>

IV.4. Classification des rhizobia isolés des nodules racinaires et caulinaires des *Aeschynomene*

Une étude des propriétés phénotypiques et génomiques des rhizobia d'*Aeschynomene* a permis d'apparenter sans équivoque ces rhizobia au genre *Bradyrhizobium* (Alazard, 1991 ; Young *et al.*, 1991).

Dans le genre *Aeschynomene* qui comprend environ 250 espèces tropicales, dont la moitié sont des espèces aquatiques (Kretschmer et Bullock, 1979), trois groupes (tableau 4) de *Bradyrhizobium* de spécificité différente caractérisent la nodulation (Alazard et Duhoux, 1988) :

- Le groupe I correspond à des souches de *Bradyrhizobium* typiques, non spécifiques et non photosynthétiques, qui nodulent les espèces à nodules exclusivement racinaires ou dont les primordia racinaires restent inclus dans les tissus corticaux de la tige (*A. uniflora*, *A. pfundii*, *A. schimperi*, *A. Elaphroxylon* etc...).

- Le groupe II intermédiaire comprend à la fois des souches non photosynthétiques et photosynthétiques qui nodulent deux espèces très voisines, *A. afraspera* et *A. nilotica*, caractérisées par une nodulation caulinaire importante, l'apex du primordium étant recouvert par une seule couche de cellules épidermiques aplaties.

- Le groupe III, qui comprend exclusivement des bactéries photosynthétiques, est très spécifique et ne nodule que les espèces à nodules de tige comme *A. indica* ou *A. sensitiva* dont les primordia racinaires présents sur la tige affleurent sous une couche de cellules épidermiques intactes.

V. Propriétés originales des rhizobia associés aux Légumineuses à nodulation caulinaires

Grâce à la double nodulation caulinaire et racinaire certaines espèces comme *Sesbania rostrata* et *Aeschynomene afraspera* peuvent porter 5 fois plus de nodules que les autres légumineuses et présentent une croissance extrêmement rapide, jusqu'à 10 cm par jour pour *Sesbania rostrata* en milieu inondé et dans les conditions optimales (Dreyfus *et al.*, 1984). Ces deux espèces possèdent ainsi un fort potentiel de fixation d'azote. La découverte de ces différentes propriétés a été le point de départ de l'utilisation des légumineuses aquatiques comme engrais vert dans les rizières tropicales, leur capacité de fixation d'azote étant supérieure à celle des légumineuses à nodules racinaires ou de la fougère *Azolla* utilisée traditionnellement dans les rizières asiatiques (Ladha *et al.*, 1989b ; Boivin *et al.*, 1997a).

L'originalité des légumineuses aquatiques se retrouve aussi dans les propriétés particulières de leurs bactéries symbiotiques. Ainsi, les bactéries du genre *Azorhizobium* nodulant les racines et les tiges de *Sesbania rostrata* sont capables de fixer l'azote atmosphérique en culture pure lorsque la concentration d'oxygène dans l'air est de 3% (Elmerich *et al.*, 1992 ; Dreyfus *et al.*, 1983). Certaines souches bactériennes isolées de nodules de tige d'*Aeschynomene* sont aussi capables de fixer l'azote en culture pure, mais à des concentrations en O₂ plus faibles, de l'ordre de 0,5% (Alazard, 1990).

L'aptitude à fixer l'azote en culture pure semble donc être un caractère commun aux bactéries du genre *Azorhizobium* et *Bradyrhizobium* isolées des nodules de tige. Elle leur permet ainsi de se maintenir à la surface des tiges et des feuilles où l'azote combiné est rare (Boivin *et al.*, 1997b). Par contre la nodulation caulinaire impose au symbiote une adaptation à la vie épiphytique. Ainsi, Le fait qu'aucun

représentant du genre *Sinorhizobium* ne présente l'aptitude à utiliser l'azote atmosphérique *ex planta* pourrait s'expliquer par une mauvaise adaptation des espèces bactériennes à la nodulation caulinaire de *Sesbania rostrata* (Boivin *et al.*, 1997b).

V.1. Les *Bradyrhizobium* photosynthétiques

Dans le genre *Aeschynomene*, caractérisé par un grand nombre d'espèces à nodules de tige (Tableau 3), la plupart des rhizobiums isolés de nodules de tige se distinguent des *Azorhizobium* par leur propriété, unique parmi tous les rhizobiums connus, de synthétiser de la bactériochlorophylle *a* (Bchl *a*) et des caroténoïdes sous l'effet de la lumière (Eaglesham *et al.*, 1990; Lorquin *et al.*, 1993 et 1997b). De ce fait, ces rhizobiums sont considérés comme des bactéries photosynthétiques, bien qu'appartenant au genre *Bradyrhizobium* (Lorquin *et al.*, 1993).

Le premier *Bradyrhizobium* photosynthétique isolé de nodules de tige d'*Aeschynomene indica* a été la souche BTAi1 (Eaglesham *et al.*, 1990) pour laquelle la lumière induit une augmentation de l'absorption du CO₂ (Hungria *et al.*, 1993). Depuis cette découverte, de nombreuses souches photosynthétiques ont été isolées à partir des nodules de tige de plusieurs espèces d'*Aeschynomene* (Ladha et So, 1994; So *et al.*, 1994). Les *Bradyrhizobium* photosynthétiques d'*Aeschynomene* appartenant aux groupes II et III, ainsi que la souche BTAi1, sont phylogénétiquement proches de *Rhodopseudomonas palustris* (Young *et al.*, 1991), une bactérie photosynthétique pourpre non sulfato-réductrice appartenant à la famille des *Rhodospirillaceae* (Pfennig, 1978) et capable d'utiliser en anaérobiose le CO₂ comme source de carbone grâce à la photosynthèse. De plus, les *Bradyrhizobium* photosynthétiques sont capables de synthétiser des centres réactionnels photosynthétiques dont les bandes d'absorption

dans le visible sont assimilables à celles des centres réactionnels des *Rhodospirillaceae* (Evans *et al.*, 1990). Cependant, les *Bradyrhizobium* photosynthétiques d'*Aeschynomene* se distinguent physiologiquement des *Rhodospirillaceae* par le fait qu'ils sont aérobies stricts comme tous les rhizobiums, et qu'ils ne peuvent pousser en l'absence d'un substrat carboné, même en présence de lumière. Les *Bradyrhizobium* photosynthétiques d'*Aeschynomene* sont donc hétérotrophes vis à vis du carbone, alors que beaucoup de bactéries photosynthétiques pourpres sont photoautotrophes en anaérobiose, c'est à dire qu'elles peuvent pousser avec le CO₂ comme seule source de carbone. Une telle hétérotrophie pour le carbone se rencontre également chez d'autres bactéries photosynthétiques aérobies strictes, les bactéries marines *Erythrobacter longus* Och101 (Harashima *et al.*, 1978 et 1980), *E. sibericus* (Yurkov et Gorlenko, 1990), *Roseobacter litoralis* et *R. denitrificans* (Shiba, 1991), mais également chez des bactéries méthylotrophes (Sato, 1978; Miyata *et al.*, 1983; Urakami et Komagata, 1984; Green *et al.*, 1988) ainsi que chez *Porphyrobacter neustonensis* (Fuerst *et al.*, 1993).

V.2. Ecologie épiphytique des rhizobia induisant des nodules caulinaires

L'habitat épiphytique constitue pour les bactéries symbiotiques, qui forment des nodules sur les tiges des légumineuses tropicales, une niche écologique « atypique » pour les rhizobia (Boivin *et al.*, 1997b). Ces rhizobia sont le plus souvent localisés au niveau de la phyllosphère, des fleurs et des tiges (Robertson *et al.*, 1995 ; Alazard, communication personnelle) et sont ainsi exposés à des conditions environnementales différentes de celles rencontrées dans la rhizosphère ou à l'intérieur des nodules racinaires, à savoir, l'exposition des nodules caulinaires à de fortes intensités lumineuses, la cohabitation avec la photosynthèse de la plante hôte

au niveau du cortex nodulaire, une forte tension en oxygène, et l'absence d'azote combiné au niveau de la tige et dans la phyllosphère.

VI. Génétique de la fixation de l'azote et de la symbiose

Les bactéries fixatrices d'azote sont capables d'assimiler directement l'azote moléculaire N_2 . Ce processus, appelé "fixation biologique de l'azote", consiste en la réduction enzymatique de l'azote moléculaire N_2 en ammoniac NH_3 grâce à une enzyme, la nitrogénase. Cette enzyme est très conservée tant au niveau biochimique que génétique. Elle a été purifiée à partir de fixateurs libres comme *Azotobacter vinelandii*, *Clostridium pasteurianum* et *Klebsiella pneumoniae* (Eady, 1986).

VI.1. Les gènes *nif*

Tous les organismes fixateurs d'azote étudiés actuellement possèdent les gènes *nifHDK* qui codent pour les différentes sous-unités de la nitrogénase. Le gène *nif* est caractéristique des organismes fixateurs d'azote et son évolution est liée à celle de la bactérie qui le possède. Chez *Azorhizobium caulinodans*, c'est le même ensemble de gènes qui participe à la fixation de l'azote en symbiose et dans les conditions non symbiotiques ; la régulation des gènes *nif* s'effectue par voies apparentées à celles de *K. pneumoniae* et de *R. meliloti*. Plus récemment la nitrogénase d'*Azorhizobium caulinodans* a été purifiée à partir de bactéries cultivées à l'état libre, et ses propriétés biochimiques sont très semblables à celles de l'enzyme de *Klebsiella pneumoniae*

Tableau 5. Fonction des gènes *nif* de *K. pneumoniae* (D'après Dean et Jacobson, 1992)

Gènes	Fonctions établies
<i>nifJ</i>	Pyruvate-flavodoxine-oxydoréductase. Contient probablement 4 centres 4Fe-4S.
<i>nifH</i>	Sous-unité de la protéine II. Requis pour la biosynthèse du cofacteur à molybdène.
<i>nifD</i>	Sous unité α de la protéine I.
<i>nifK</i>	Sous unité β de la protéine I.
<i>nifT</i>	Fonction inconnue. Pas nécessaire à la fixation de l'azote.
<i>nifY</i>	Pas nécessaire à la fixation de l'azote. S'associe à l'apoprotéine I (Homer <i>et al.</i> , 1993)
<i>nifE</i>	Requis pour la biosynthèse du cofacteur à molybdène. Forme avec le polypeptide codé par <i>nifN</i> un tétramère $\alpha_2\beta_2$. Partage un certain degré de similitude avec <i>nifD</i> .
<i>nifN</i>	Requis pour la biosynthèse du cofacteur à molybdène. Partage un certain degré de similitude avec <i>nifK</i> .
<i>nifX</i>	Semble être impliqué dans la régulation négative des gènes <i>nif</i> . Pas nécessaire à la fixation de l'azote.
<i>nifU</i>	Fonction inconnue. Semble être impliqué dans la stabilisation de la protéine II.
<i>nifS</i>	Cystéine désulfurase. Donneur de soufre pour les groupements prosthétiques (Zheng <i>et al.</i> , 1993).
<i>nifV</i>	Nécessaire à la biosynthèse du cofacteur à molybdène.
<i>nifW</i>	Impliqué dans la maturation de la protéine I de manière inconnue.
<i>nifZ</i>	Impliqué dans la maturation de la protéine I de manière inconnue.
<i>nifF</i>	Flavodoxine, donneur physiologique d'électrons à la protéine II.
<i>nifL</i>	Modulateur de l'activité de <i>nifA</i> .
<i>nifA</i>	Régulateur transcriptionnel positif.
<i>nifQ</i>	Requis pour une étape précoce de la biosynthèse du cofacteur à molybdène.

VI.2. Régulation de l'expression des gènes *nif* chez *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae est une bactérie anaérobie facultative qui croît aux dépens de l'azote atmosphérique en conditions anaérobies.

Tous les gènes requis pour la fixation de l'azote sont groupés sur le chromosome près de l'opéron histidine. Les études de génétique classique et l'établissement de la séquence nucléotidique de la région *nif* ont permis l'identification de 20 gènes groupés en 7 ou 8 unités de transcription (Arnold *et al.*, 1988). Leur localisation dans une région de 24 kb du génome de *K. pneumoniae* a été définie et caractérisée. Ce sont : *nifJ*, *nifHDKTY*, *nifENX*, *nifUSVWZ*, *nifF*, *nifLA*, *nifQ*. Ces gènes codent pour les polypeptides de structure de la nitrogénase, le complexe enzymatique responsable de la fixation de l'azote, et pour les protéines nécessaires à la synthèse et à la mise en place des groupements prosthétiques associés à la nitrogénase, comme le cofacteur à fer et à molybdène (FeMo-co). Les gènes *nifKD* et *H* sont respectivement les gènes de structure des protéines I et II du complexe nitrogénase. Les produits des gènes *nifWZ* et *nifUSM* interviennent respectivement dans la maturation des protéines I et II. Les gènes *nifQBVNE* interviennent dans la biosynthèse du cofacteur FeMo-co (Dean *et al.*, 1993). Les produits des *nifFJ* interviennent dans le transport des électrons à la protéine II. Les gènes *nifLA* sont des gènes de régulation (Elmerich, 1991 ; Dean et Jacobson 1992 ; Merrick 1993), leur produit contrôle les opérons des autres gènes *nif* : le produit du gène *nifA* est un activateur positif de la transcription des opérons *nif*. Le produit du gène *nifL* intervient dans le contrôle négatif (tableau 5) Le rôle des autres gènes n'est pas connu, aussi certains gènes *nif* peuvent être dupliqués. Quand un rhizobium renferme des copies multiples du gène *nifA*, il pourrait en résulter une fixation d'azote accrue (d'où une augmentation de la production végétale) et aussi une amélioration de la compétitivité. Chez *Azorhizobium caulinodans*, il existe deux

copies de *nifH* (Denèfle *et al.*, 1987 ; Norel et Elmerich, 1987) et *Rhizobium phaseoli* deux opérons *nifHDK* et une troisième copie de *nifH* (Quinto *et al.*, 1982).

Les techniques d'hybridation d'ADN, en utilisant comme sonde les gènes *nif* de *K. pneumoniae* a permis de localiser les gènes *nif* dans le génome des différentes souches bactériennes. Chez la plupart des espèces de *Rhizobium* la majorité des gènes impliqués dans la nodulation et la fixation de l'azote sont localisés sur des plasmides de poids moléculaire élevé appelés mégaplasmides, plasmides symbiotiques ou bien encore *pSym*. La taille des *pSym* varie de quelques centaines de kb à plus d'une mégabase. Chez *R. meliloti* par exemple, les gènes *nif* sont regroupés sur le mégaplasmide *pSym*. En revanche, l'information génétique pour la symbiose et la fixation de l'azote est présente sur le chromosome dans le cas de *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* et *Mesorhizobium*, qui sont tous dépourvus de plasmides symbiotiques (Fischer, 1994).

Plusieurs gènes essentiels pour la fixation de l'azote pendant la symbiose ont été identifiés chez *R. meliloti* à proximité des gènes de structure de la nitrogénase. Ces nouveaux gènes qui n'ont pas de correspondants chez *K. pneumoniae* ont été appelés gènes *fix*. Chez *Azorhizobium caulinodans*, une mutation dans le gène *nif* conduit à un phénotype non fixateur d'azote en culture pure (*nif*⁻) et en symbiose. Il en est de même pour le gène *fix* en symbiose (mutant *fix*).

L'étude génétique de la fixation de l'azote est rendue difficile chez les fixateurs symbiotiques comme les rhizobia dans la mesure où il n'est pas possible de cultiver les bactéries en culture pure aux dépens de l'azote moléculaire comme seule source d'azote ; exception faite d'*Azorhizobium caulinodans* (Dreyfus *et al.*, 1983) et de certains *Bradyrhizobium* sp. isolés des nodules de tiges de différentes espèces d'*Aeschynomene*. Ces bactéries sont en effet capables de croître en culture pure aux dépens de l'azote moléculaire (Dreyfus *et al.*, 1988). Les rhizobia en symbiose ont des capacités de

fixation d'azote parmi les plus élevées du monde biologique. Chez *Rhizobium*, les gènes contrôlant la fixation de l'azote ont été classés en deux catégories : les gènes *nif*, qui présentent une homologie fonctionnelle ou structurale avec les gènes *nif* de *Klebsiella pneumoniae*, et les gènes *fix*, qui n'ont pas d'équivalent chez *K. pneumoniae*.

Les gènes de la fixation de l'azote (*nif* et *fix*) sont regroupés dans une même région comprenant 43 gènes. Ce groupe comprend deux copies identiques de *nifHDK*, le gène de régulation *nifA*, et les gènes impliqués dans la maturation de la nitrogénase et dans la synthèse de ses groupements prosthétiques.

VII. L'établissement de la symbiose *Rhizobium*-Légumineuse

VII.1. Diversité des modes d'infection et développement des nodules

La pénétration des rhizobia dans les cellules racinaires ou caulinaires des Légumineuses correspond à une infection des tissus végétaux de la plante-hôte. Les composés présents dans les exsudats, notamment des acides aminés, sucres, des acides carboxyliques, des flavonoïdes jouent un rôle de chimio-attractants (Caetano-Anollés *et al.*, 1988). Les rhizobiums, bactéries flagellées, mobiles, sont attirés vers les racines des Légumineuses par un chimiotactisme positif (Gaworzewska et Carlile, 1982 ; Barbour *et al.*, 1991). Le chimiotactisme et la mobilité semblent être impliqués dans la compétitivité entre souches dans la rhizosphère, mais ne sont pas indispensables aux processus d'infection et de nodulation (Caetano-Anollés *et al.*, 1988). Les bactéries symbiotiques peuvent pénétrer dans la plante-hôte par trois voies distinctes.

VII.1.1. Infection par les poils absorbants

Le mode d'infection par les poils absorbants est le plus répandu. Il est observé chez la grande majorité des Légumineuses tempérées (Verma et Long, 1983 ; Bauer, 1981), et aussi chez certaines Légumineuses tropicales comme *Glycine max* (Turgeon et Bauer, 1982 ; Pueppke, 1983), *Vigna unguiculata* (Pueppke, 1983) ou *Acacia albida* (Dupuy, 1993). Sous l'effet des substances émises par les rhizobiums (facteurs Nod), on observe une déformation très variable des poils absorbants (spirale, tire-bouchon, ramification) (Sprent, 1995), certains d'entre eux prennent la forme d'une crosse enserrant les rhizobiums ; on parle de courbure en « crosse berger » (Dazzo *et al.*, 1976). La pénétration des bactéries dans le poil absorbant entraîne la formation d'un cordon d'infection, structure tubulaire contenant les bactéries disposées en file (Truchet *et al.*, 1985, Trugeon et Bauer, 1985). La paroi du cordon est d'origine végétale (Trugeon et Bauer, 1985). Les cordons d'infection envahissent les primordia nodulaires, se ramifient. L'invasion des cellules végétales par les bactéries s'effectue par une sorte d'endocytose (Newcomb, 1981 ; Sprent, 1995). Elle s'accompagne d'une cascade de transformations mutuelles. Les bactéries subissent des transformations morphologiques, elles s'agrandissent, prennent des formes irrégulières, en X, en Y ou en T. Cette transformation en bactéroïdes s'accompagne d'un bouleversement métabolique avec l'apparition de la nitrogénase et la mise en route d'une assimilation de l'azote.

VII.1.2. Infection intercellulaire

L'infection bactérienne peut se faire directement par pénétration intercellulaire au niveau de l'assise de cellules épidermiques racinaires ou

caulinaires de la plante-hôte. Ce mode d'infection caractérisé par l'absence de cordons infectieux est observé chez un grand nombre de Légumineuses tropicales et subtropicales (Chandler, 1978 ; Alazard et Duhoux, 1990 ; James *et al.*, 1992). La pénétration facilitée des bactéries entre les cellules du rhizoderme est appelée « crack entry ». Ce processus d'infection a été décrit chez *Arachis hypogea*, *Stylosanthes* spp., *Sesbania rostrata*, *Neptunia plena*, *Aeschynomene* spp. (Alazard, 1990 ; James *et al.*, 1992 ; Ndoye *et al.*, 1994 ; Reddy *et al.*, 1997). L'infection intercellulaire a également été observée chez la non-Légumineuse *Parasponia rigida*. (Lancelle et Torrey, 1984). La propagation de l'infection intercellulaire dans le cortex jusqu'à la zone méristématique induite à distance fait suite à des événements qui peuvent être différents suivant les hôtes considérés.

VII.1.3. Infection intercellulaire (par les cordons d'infection)

Chez *Mimosa scabrella*, on observe un troisième mode d'infection (Sprent et de Faria, 1988). Les bactéries traversent la couche mucilagineuse, puis pénètrent dans la paroi cellulaire primaire des cellules épidermiques de la surface des racines. Des structures semblables à des cordons d'infections, émises à partir des sacs d'origine pariétale traversent la paroi cellulaire et infectent les cellules voisines. Cette invasion entraîne la dégénérescence des cellules de l'hôte. Ce phénomène est aussi observé chez *Stylosanthes* et *Aeschynomene afraspera* (Chandler *et al.*, 1982 ; Alazard et Duhoux, 1990). L'infection se propage alors comme décrit chez les Légumineuses tempérées, et aboutit à la formation de nodules indéterminés (Newcomb, 1981).



Figure 4. Morphologie du nodule caulinaire d'*Aeschynomene sensitiva*.

VII.2. Les processus d'infection conduisant aux nodules caulinaires

Chez les Légumineuses à nodules de tiges, les nodules caulinaires apparaissent toujours au niveau des sites de nodulation prédéterminés, développés sur les tiges indépendamment de toute infection bactérienne (Arora, 1954 ; Dreyfus *et al.*, 1984). L'infection conduisant à la formation de nodules caulinaires est bien connue chez *Sesbania rostrata* (Tsien *et al.*, 1983 ; Duhoux, 1984) et quelques espèces du genre *Aeschynomene* (Alazard et Duhoux, 1990 ; Loureiro, 1995) (figure 4).

VIII. Déterminants bactériens de l'infection, la spécificité et la nodulation

VIII.1. Gènes *nod* et facteurs Nod

La formation des nodules est l'aboutissement d'un dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie : les racines de la légumineuse produisent des flavonoïdes et des bêtaïnes (figure 5) qui activent les gènes de structure de la nodulation (gènes *nod*, *noe* et *nol*) des rhizobiums qui émettent alors en retour des signaux spécifiques ou facteurs Nod permettant la reconnaissance de la plante hôte, l'induction des méristèmes nodulaires et la formation des nodules (Dénarié *et al.*, 1996). Des composés présents dans les exsudats racinaires, essentiellement des flavonoïdes, peuvent activer chez la bactérie la protéine régulatrice NodD, qui à son tour induit l'expression des gènes bactériens de nodulation, les gènes *nod*, *nol* et *noe*. Ce sont des gènes symbiotiques qui sont directement responsables de la reconnaissance spécifique, du processus d'infection, de la nodulation de la plante hôte, de la

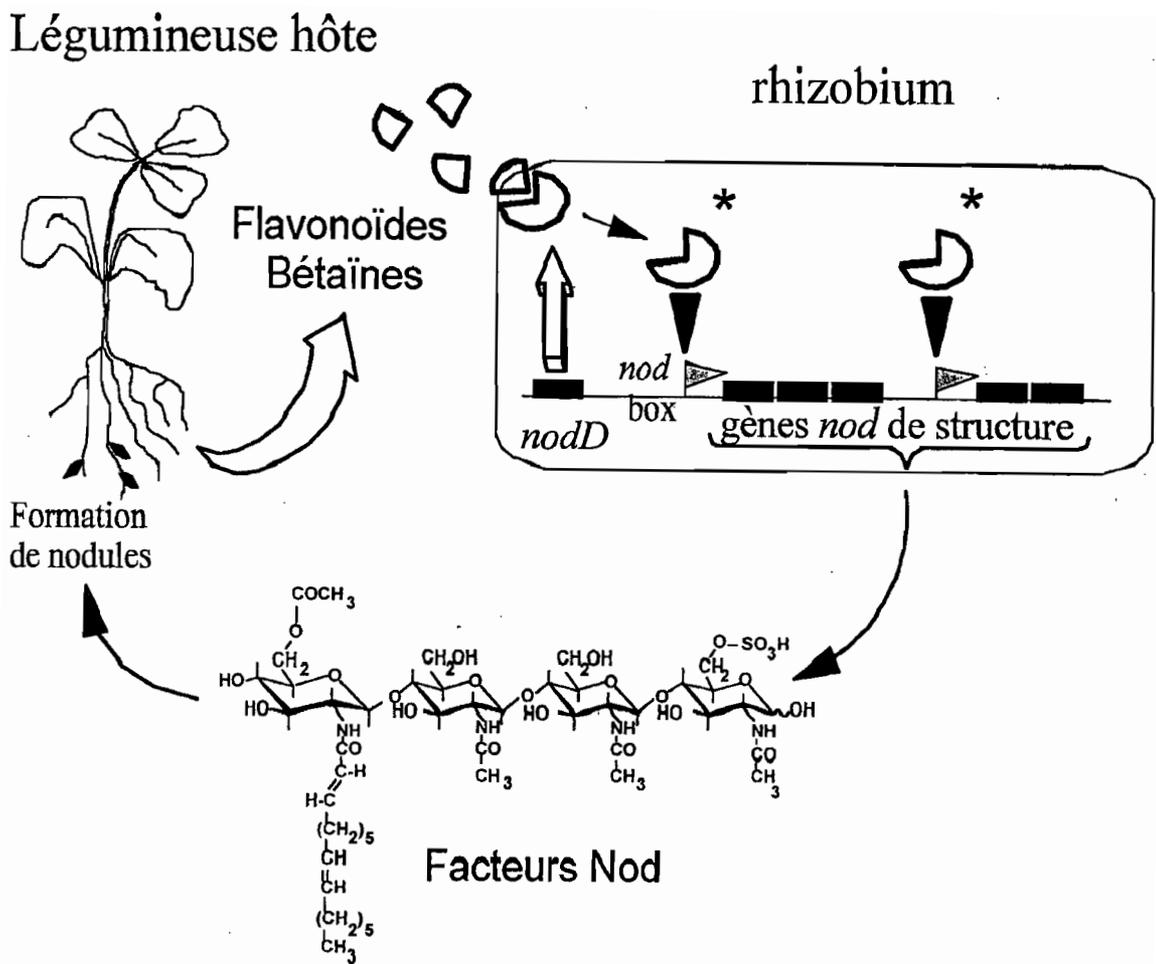


Figure 5. Dialogue moléculaire entre deux partenaires compatibles dans la symbiose *Rhizobium*-Légumineuses. Rosenberg, (1997).

synthèse et de la sécrétion des facteurs Nod. Plusieurs étapes de la nodulation présentent des barrières de spécificité plus ou moins strictes, et c'est finalement la somme de ces barrières qui détermine l'étendue du spectre d'hôte (Fellay *et al.*, 1995). Chaque espèce de *Rhizobium* produit un ensemble de facteurs Nod de structures caractéristiques. Ce profil semble refléter une adaptation à la plante hôte.

VIII.2. Les gènes *nod* et leur régulation

L'activité de ces gènes *nodD* produit des protéines régulatrices de la famille LysR, qui se fixent sur une séquence d'ADN conservée appelée « *nod box* », présente en amont des différents promoteurs des opérons *nod* et *nol* (à l'exception des gènes *nolA*, *nolC* et *nolVW*) impliqués dans le processus de la nodulation (Schultze *et al.*, 1994). Ceci explique que NodD contribue à la spécificité d'association avec l'hôte. Les protéines régulatrices NodD activent la transcription des différents opérons *nod* en présence de certains composés de plantes présents dans les exsudats racinaires. (Fisher et Long, 1992 ; Kondorosi, 1992). Ces signaux de plantes sont généralement des flavonoïdes produits au cours des réactions de défense en réponse à une agression par des agents pathogènes. Les protéines NodD de différentes espèces de *Rhizobium* sont capables de reconnaître des flavonoïdes différents et, une espèce donnée de légumineuse produit toujours plusieurs flavonoïdes différents (Schultze *et al.*, 1994). Ces flavonoïdes peuvent avoir des rôles complémentaires (synergiques) ou antagonistes (anti-inducteurs). La reconnaissance d'une protéine régulatrice NodD donnée par un spectre particulier d'inducteurs racinaires, détermine un premier niveau de spécificité dans l'interaction symbiotique.

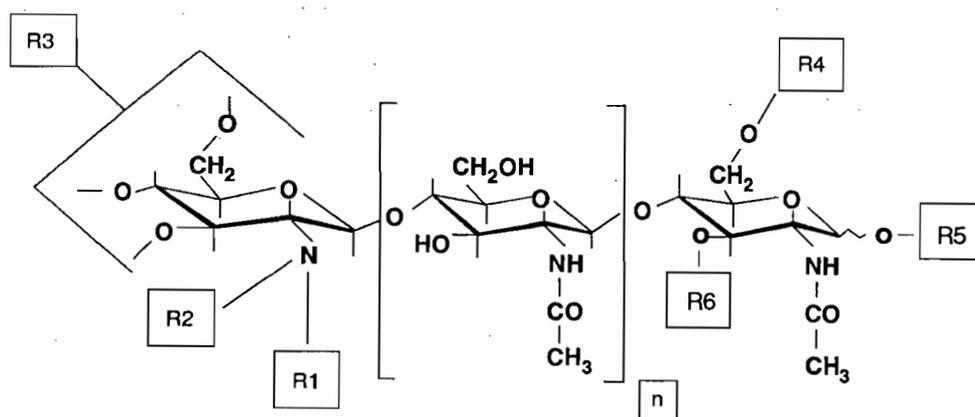
Le système de régulation *nodD* que l'on retrouve chez tous les rhizobiums, existe en copies variables d'une espèce à une autre, et une même souche de

rhizobium peut posséder plusieurs copies du gène *nodD*, présentant des spécificités différentes (Fisher et Long, 1992 ; Kondorosi, 1992 ; Schultze *et al.*, 1994). Chez *Sinorhizobium meliloti* par exemple, il existe trois copies du gène *nodD* : *nodD1*, *nodD2*, *nodD3*. Ces gènes sont presque identiques, mais ont tout de même de petites différences et ne sont pas installés dans les parties de l'ADN. C'est certainement un moyen d'optimiser la reconnaissance de l'hôte, donc de faciliter la colonisation de plusieurs variétés végétales (Honma *et al.*, 1990 ; Schlaman *et al.*, 1998). Une mutation dans l'une ou l'autre des copies entraîne une diminution de l'efficacité de la nodulation sur l'une ou l'autre des six hôtes principaux (Györgypal *et al.*, 1988). Par contre, si aucune copie de *nodD* n'est fonctionnelle, on observe une perte totale de l'aptitude à noduler. Chez certaines souches de *R. tropici*, il en existe jusqu'à cinq copies de gène *nodD* (Van Rhijn *et al.*, 1993). La régulation des gènes *nodD* varie d'une espèce à l'autre. Chez *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarium* bv. *phaseoli* et *Sinorhizobium fredii* il existe plusieurs copies du gène *nodD* ; le gène *nodD1* est précédé d'une « *nod box* » et sa transcription est activée par des flavonoïdes (Applebaum *et al.*, 1988 ; Davis et Johnston, 1990 ; Wang et Stacey, 1991). Lorsque *nodD* est en une seule copie, il réprime souvent sa propre transcription, comme chez *Rhizobium leguminosarium* bv. *viciae* ou *trifolii* (Rossen *et al.*, 1985 ; Spaink *et al.*, 1987a). Par contre chez *Azorhizobium caulinodans* il existe une seule copie du gène *nodD* (Goethals *et al.*, 1990) qui s'exprime de façon constitutive (Geelen *et al.*, 1995b).

VIII.3. Les gènes *nod* et la structure des facteurs Nod

L'existence d'un facteur Nod a été montrée la première fois chez *Sinorhizobium meliloti* (Lerouge *et al.*, 1990 ; Dénarié et Roche, 1992). Tous les facteurs Nod identifiés jusqu'à présent sont des oligomères de N-acétylglucosamine liés en β -1,4. Ils sont

Tableau 6 : La structure des facteurs Nod de différents rhizobia.



Origine	Espèce ^a	Substitutions ^{b,c}					n ^d	Références
		R1	R2	R3	R4	R6		
Medicago	<i>S. meliloti</i>	H	C16:2, C16:3 C18-C26(w-1)OH	Ac(O-6), H	S	H	1,2,3	Schultze <i>et al.</i> , 1992
Vicia	<i>R. l. bv viciae</i>	H	C18:1, C18:4	Ac(O-6), H	H	H	2,3	Spaink <i>et al.</i> , 1991
Pisum cv. Afghanistan	<i>R. l. bv viciae</i> TOM	H	C18:1, C18:4	Ac(O-6)	Ac	H	2,3	Firmin <i>et al.</i> , 1993
Trifolium	<i>R.l. bv trifolii</i>	H	C18:1, C18:3 C20:3, C20:4	Ac(O-6)	H	H	1,2,3	Spaink <i>et al.</i> , 1995
Lotus	<i>R. loti</i>	Me	C18:1	Cb(O-4)	AcFuc	H	3	Lopez-lara <i>et al.</i> , 1995b
Phaseolus	<i>R. elti</i>	Me	C18:1	Cb(O-4), H	AcFuc	H	3	Poupot <i>et al.</i> , 1995
	<i>R. tropici</i>	Me	C18:1	H	S, H	H	3	Poupot <i>et al.</i> , 1993
Acacia	<i>R. sp. GRH2</i>	Me, H	C18:1	H	S, H	H	2,3,4	Lopez-lara <i>et al.</i> , 1995b
	<i>S. teranga</i>	Me	C16:0, C18:1	Cb(O-4)ou Cb(O-6)	S, H	H	3	Lorquin <i>et al.</i> , 1997a
	<i>M.plurifarium</i> ORS1001	Me	C18:0, C18:1	Cb(O-4)ou Cb(O-6)	S, H	H	3	Lorquin <i>et al.</i> , 1997a
Lablab	<i>R. sp. NGR234</i>	Me	C18:1	Cb(O-6 et O3,O4)	MeFucAcMe Fuc, MeSFuc	H	3	Price <i>et al.</i> , 1992
Glycine	<i>S. fredii</i>	H	C18:1	H	MeFucFuc	H	1,2,3	Bec-Ferté <i>et al.</i> , 1994
	<i>B. japonicum</i>	H	C18:1	H	MeFuc	H	3	Sanjuan <i>et al.</i> , 1992
	<i>B. elkanii</i>	Me, H	C18:1	Ac(O6),H, Cb	MeFucFuc	H	2,3	Carlson <i>et al.</i> , 1993
Sesbania	<i>A. caulinodans</i>	Me	C18:1	Cb(O-6)	Fuc, H	D-Ara,H	2,3	Mergaert <i>et al.</i> , 1993
	<i>S. saheli</i>	Me	C18:1, C18:0	Cb	Fuc, H	D-Ara,H	2,3	Lorquin <i>et al.</i> , 1997a
	<i>S. teranga</i>		C16:1			D-Ara- Fuc		Mergaert <i>et al.</i> , 1997a

^a: *S.*, *Sinorhizobium*; *R.*, *Rhizobium*; *R. l.*, *Rhizobium leguminosarum*; *M.*, *Mesorhizobium*; *B.*, *Bradyrhizobium*; *A.*, *Azorhizobium*.

^b: R5=H pour toutes les espèces, sauf pour *Bradyrhizobium elkanii* où R5=H, glycérol

^c: Me, Métyl; AC, Acétyl; Cb, carbamoyl; S, sulfate; Fuc, fucosyl; AcFuc, acétylfucosyl; MeFuc, méthylfucosyl; AcMeFuc, acéthylméthylfucosyl; MeSFuc, méthylsulfatefucosyl; D-Ara, D-arabinose.

^d: Les chiffres en caractère gras correspondent aux molécules majoritaires.

généralement pentamériques, mono-N-acylés sur la partie non réductrice, et substitués sur les deux glucosamines terminales (Dénarié *et al.*, 1996 ; Mergaert *et al.*, 1997b). Les substitutions fréquemment rencontrées sur la glucosamine non réductrice sont des N-méthyls, des acétyls, des carbamates, et de l'acide vaccénique (tableau 6). Sur la partie réductrice, on trouve des groupements sulfate, ou un sucre comme le fucose ou le 2-O-méthylfucose, ou encore du 2-O-méthylfucose sulfaté comme chez *Sinorhizobium* sp. NGR234, ou encore aussi deux sucres simultanément, le fucose et l'arabinose, comme chez *Azorhizobium caulinaudans* et les *Sinorhizobium* nodulant les *Sesbania*. La nature de l'acide gras et des autres ornements varie avec la souche de rhizobium considérée. Les facteurs Nod peuvent être schématiquement classés en quatre familles structurales en fonction de la nature de l'acide gras et des substitutions présentes sur la glucosamine réductrice : le type 1, le plus simple, qui est N-acylé par un acide gras commun et n'est pas glycosylé, c'est le type *R. tropici* ; le type 2, *Bradyrhizobium* qui est N-acylé par un acide gras commun et est fucosilé à l'extrémité réductrice ; le type 3, dont *Azorhizobium* qui est N-acylé par un acide gras commun présente deux substitutions de type sucre, fucose et arabinose et le type 4, dont *Sinorhizobium meliloti* qui possède un acide gras polyinsaturé et qui n'est pas fucosylé.

Une espèce donnée produit une famille de composés plus ou moins proches, et dont le nombre peut aller jusqu'à une vingtaine chez *Sinorhizobium* sp. NGR234 (Price *et al.*, 1992). Ce sont ces différentes substitutions qui confèrent aux facteurs Nod leur spécificité et qui expliquent qu'une espèce de rhizobium donné ne soit capable de noduler qu'un nombre limité de Légumineuses (Roche *et al.*, 1991b ; Spaink *et al.*, 1991). La structure des facteurs Nod qui est contrôlée par un ensemble de gènes *nod* dits spécifiques, détermine le second niveau de la détermination du spectre d'hôte.

VIII.4. Rôle des gènes *nod* dans la synthèse des facteurs Nod et dans la détermination du spectre d'hôte

Il existe une corrélation totale entre la structure des facteurs Nod et le spectre d'hôte des souches dont ils proviennent (Lortet *et al.*, 1996). Cette relation a été établie par des études génétiques et biochimiques. Chez *Bradyrhizobium japonicum* et *Sinorhizobium fredii*, tous deux symbiotes du soja, la convergence de spectre d'hôte a pu être mise en relation avec la similitude de structure des facteurs Nod produits (Sanjuan *et al.*, 1992 ; Bec-Ferté *et al.*, 1994). Cette convergence à la fois du spectre d'hôte d'une bactérie et de la structure des facteurs Nod produits n'est pas stricte. Par exemple, *Rhizobium elti* et *Rhizobium loti* produisent des facteurs Nod identiques, mais ont un spectre d'hôte différent (*Phaseolus* spp. et *Lotus* spp respectivement) (Cardenas *et al.*, 1995). Aussi, la majorité de facteurs Nod produit par *R. leguminosarum* bv. *trifolii* sont identiques à ceux produits par *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Spaink *et al.*, 1995 ; Orgambide *et al.*, 1995) pourtant, ces deux biovars nodulent des plantes distinctes. Des rhizobiums appartenant à des groupes taxonomiques différents mais isolés de la même plante hôte peuvent produire des facteurs Nod de structure similaire (Lorquin *et al.*, 1997a ; Doyle, 1998). Deux souches de *Rhizobium* nodulant la même plante peuvent produire des facteurs Nod différents. C'est le cas de *Rhizobium tropici* et *R. elti* qui nodulent tous deux le haricot (*Phaseolus vulgaris*) mais produisent respectivement des facteurs Nod sulfatés et des facteurs Nod acétylfucosylés (Poupot *et al.*, 1993 ; Poupot *et al.*, 1995a). Aussi *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium japonicum*, la souche NGR234 (*Rhizobium* sp.) et la souche USDA257 (*Rhizobium fredii*) ont un spectre d'hôte identique (Pueppke et Broughton, 1999) mais leurs facteurs Nod varient considérablement.

Tableau 7. La fonction des gènes *nod*, *nol* et *noe* dans la production des facteurs Nod (d'après Dénarié *et al.*, 1992 ; Fellay *et al.*, 1995 ; Dénarié *et al.*, 1996).

Gènes	Espèces	Localisation	Fonctions ou homologies
<i>nodA</i>	communs	cytoplasme	N-acétyl transférase
<i>nodB</i>	communs	cytoplasme	déacétylase
<i>nodC</i>	communs	mb externe	N-acétyl-glucosamyl transférase
<i>nodD</i>	communs		Activateur transcriptionnel
<i>nodE</i>	Rl, Rt, Rp, Sm, NGR*	mb cytoplasmique	b-kétoacyl transférase
<i>nodF</i>	Rl, Rt, Sm	cytoplasme	Protéine « acyl carrier »
<i>nodG</i>	Sm, NGR*		Alcool désydrogénase-3-oxoacyl-(protéine « acyl carrier ») réductase
<i>nodH</i>	Sm, Rtr		Sulfotransférase
<i>nodI</i>	Bj, Rl, Rt, Rp, Rlo, Sm, Rlo	mb cytoplasmique	Transport membranaire et sécrétion des facteurs Nod
<i>nodK</i>	Bsp	mb cytoplasmique	
<i>nodL</i>	Rl, Rt, Sm	mb cytoplasmique	acétyl transférase
<i>nodM</i>	Rl, Rt, Sm		D-glucosamine synthase
<i>nodN</i>	Rl, Rt, Sm		
<i>nodO</i>	Rl	sécrété	Famille de l'hémolysine, protéine fixatrice de Ca ₂ ⁺
<i>nodPQ</i>	Sm, NGR*, Rtr		ATP-sulfurylase et APS kinase
<i>nodR</i>	Rt		
<i>nodS</i>	Ac, Bj, NGR, Sf		méthyltransférase
<i>nodT</i>	Rl, Rt	mb externe	Protéine membranaire ?
<i>nodU</i>	Ac, Bj, NGR, Sf		Activité carbamoyl transférase ?
<i>nodVW</i>	Bj	cytoplasme	Récepteur d'un régulateur à deux composants
<i>nodX</i>	Rt	cytoplasme	Acétyl transférase
<i>nodY</i>	Bj		
<i>nodZ</i>	Bj, NGR*		Fucosyl transférase
<i>nolA</i>	Bj		Site de fixation d'ADN
<i>nolBTVWX</i>	Rf		
<i>nolC</i>	Rf		« Heat shock » protéine
<i>nolE</i>	Rp		
<i>nolFGHI</i>	Sm		mécanisme d'exportation
<i>nolK</i>	Ac		Transfert de groupement arabinosyl ?
<i>NolMN</i>	Bj		
<i>NolO</i>	BJ		
<i>NolP</i>	Rp		
<i>NolQ1Q2S</i>	Sm		
<i>NolR</i>	Sm		Site de fixation d'ADN : répresseur des gènes nod
<i>NolY,Z</i>	Bj		
<i>noeA</i>	SM		
<i>noeB</i>	Sm		

Abréviations : Ac : *Azorhizobium caulinaudans* ; Bj : *Bradyrhizobium japonicum* ; Bsp : *Bradyrhizobium* sp. *Parasponia* ; NGR : *Sinorhizobium* sp. NGR234 ; Rlo : *Rhizobium loti* ; Rl : *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* ; Rt : *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ; Rp : *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* ; Rtr : *Rhizobium tropici* ; Sf : *Sinorhizobium fredii* ; Sm : *Sinorhizobium meliloti*.

* : homologie détectée par hybridation.

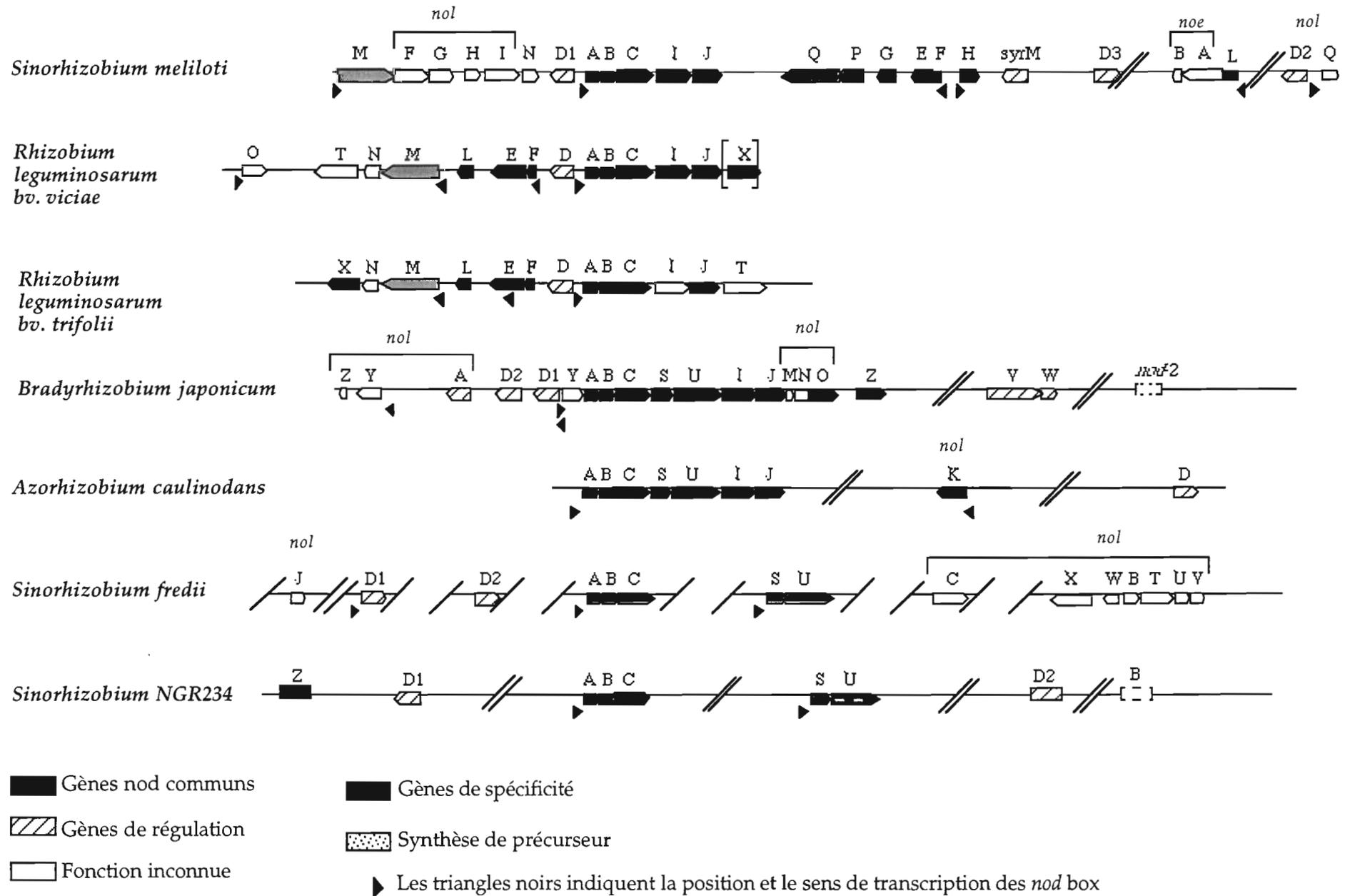
A partir de l'analyse des mutants, de l'étude d'activité enzymatique *in vitro* et d'expression chez *Escherichia coli* et des comparaisons de séquences avec des protéines connues, une fonction biologique a pu être attribuée aux produits de certains gènes de nodulation (tableau 7).

VIII.4.1. Les gènes de nodulation

Communément appelés gènes *nod*, ce sont des séquences d'ADN bactérien nécessaires à la formation des nodules fixateurs d'azote sur les racines ou les tiges des légumineuses. Chez les *Bradyrhizobium*, les gènes *nod* sont portés sur le chromosome tandis que la plupart des rhizobiums à croissance rapide, portent les gènes *nod* sur de gros plasmides symbiotiques (pSym) souvent organisés en clusters près des gènes *nif* (Martinez-Romero, et Caballero-Mellado, 1996). Les gènes *nod* codant pour les enzymes responsables de la synthèse des facteurs Nod sont classiquement divisés en deux grands groupes : les gènes *nod* communs, les gènes *nod* de spécificité pour la nodulation de l'hôte. Ces gènes sont essentiels dès les premiers stades de l'infection et de la formation de nodule dans les symbioses *Rhizobium*-Légumineuses ; ils contrôlent l'infection, la nodulation et la spécificité de l'hôte.

Les gènes *nod* communs codent pour des enzymes qui interviennent dans la biosynthèse de la structure de base des facteurs Nod et par conséquent participent au contrôle de la spécificité d'hôte tandis que les gènes *nod* spécifiques contrôlent la nature et la position des substituants fixés sur la structure de base.

Figure 6. Carte des gènes de nodulation de quelques rhizobia et leur rôle dans la synthèse des facteurs Nod (d'après Van Rhijn et Vanderleyden, 1995)



VIII.4.1.1. Les gènes *nod* communs

Il s'agit des gènes *nodABC*. Ce sont les premiers gènes de nodulation identifiés. Ces gènes sont présents chez toutes les espèces de *Rhizobium*, *Azorhizobium* et de *Bradyrhizobium* et y assurent des fonctions similaires. Ils sont en général groupés en un seul opéron (Van Rhijn et Vanderleyden, 1995) chez toutes les espèces de *Rhizobium* (figure 6). Les produits des gènes *nodABC* interviennent dans la synthèse du squelette lipo-chitooligosaccharidique. Une mutation dans l'un de ces gènes, qui se traduit par la perte de toutes les propriétés symbiotiques de la souche sur la plante hôte, et ce quelque soit l'hôte, le mode d'infection, le type de développement nodulaire ou la localisation des nodules (Kondorosi *et al.*, 1984 ; Rossen *et al.*, 1984 ; Djordjevic *et al.*, 1985a ; Horvath *et al.*, 1986) peut généralement être complétée par le gène homologue d'une autre espèce (Dénarié *et al.*, 1992 ; Fischer et long, 1992 ; Schultze *et al.*, 1994). Ces gènes sont donc interchangeableables d'une espèce de *Rhizobium* à une autre sans altération du spectre d'hôte.

Le gène *nodD* est associé étroitement aux gènes communs : ses produits interagissent avec les molécules-signaux de la plante (flavonoïdes et isoflavonoïdes), activent la transcription des autres gènes *nod* inductibles et pourraient, en outre, jouer un rôle dans la spécificité (McCardell *et al.*, 1992).

Les gènes *nodIJ* sont considérés comme des gènes *nod* communs. Ils ont été identifiés chez de nombreux rhizobia (Van Rhijn et Vanderleyden 1995 pour revue) et sont situés en aval des gènes *nodABC* (Schultze *et al.*, 1994). Une mutation dans l'un de ces gènes provoque un délai de nodulation plus ou moins prononcé chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* et *trifolii* et chez *Azorhizobium caulinodans* (Spaink *et al.*, 1995b ; Geelen *et al.*, 1993).

VIII.4.1.2. Les gènes *nod* spécifiques

Ce sont ces gènes qui déterminent le spectre d'hôte d'une souche. Ils sont caractéristiques de chaque espèce. Des mutations dans un de ces gènes de spécificité entraînent généralement des altérations du spectre d'hôte. De même l'introduction d'un de ces gènes dans une espèce étrangère modifie son spectre d'hôte. (Dénarié *et al.*, 1992 ; Fischer et Long, 1992 ; Schultze *et al.*, 1994). Par exemple, le transfert de l'ensemble des gènes de spécificité d'hôte de *Sinorhizobium meliloti* à une autre espèce, comme *R. leguminosarum* bv. *viciae*, rend cette dernière capable d'infecter et de noduler la luzerne, plante-hôte de *S. meliloti*. L'activation de ces gènes conduit à la production des facteurs Nod. En effet, c'est par la sulfatation de l'extrémité réductrice des facteurs Nod que les gènes *nodH* et *nodPQ* déterminent la spécificité d'hôte de *Sinorhizobium meliloti* (Lerouge *et al.*, 1990 ; Roche *et al.*, 1991b).

Certains gènes de spécificité d'hôte sont présents chez plusieurs Rhizobiaceae mais, leur produit de traduction présenterait une spécificité de substrat légèrement différente en fonction de l'espèce dont il est issu. D'autres gènes ne sont présents que dans une espèce ou un biovar donné.

VIII.5. Autres déterminants bactériens

Chez certains *Rhizobium*, d'autres gènes interviennent dans le processus d'infection, de nodulation et de fixation d'azote. Ce sont les gènes impliqués dans la synthèse, l'assemblage ou le transport des composés bactériens de surface tels que les exopolysaccharides capsulaires (gènes *exo*), les β -1,2 glucanes cycliques (gènes *ndv*), et les lipopolysaccharides (gènes *lps*). Des mutations dans ces gènes peuvent conduire à la formation de nodosités vides de bactéries (Breedveld et Miller, 1994),

ce qui montre que ces composants de surface sont impliqués dans le processus d'infection.

VIII.6. Les facteurs Nod et réponses des légumineuses

La plante détecte ou non les produits émis par les bactéries. Les facteurs Nod purifiés provoquent, spécifiquement sur les plantes hôtes, et à de très faibles concentrations (jusqu'à 10^{-12} M), des réactions voisines de celles induites par les rhizobiums vivants: déformations de poils absorbants (phénotype Had ou « Hair deformation ») (Price *et al.*, 1992 ; Heidstra *et al.*, 1994) , division de cellules corticales racinaires et, dans certains cas, formation de nodosités vides de bactéries ne fixant pas l'azote atmosphérique (Dénarié *et al.*, 1996). La période de contact entre le facteur Nod et le poil absorbant n'a pas besoin de dépasser 5 à 10 minutes pour que ces réactions apparaissent (Heidstra *et al.*, 1994). Lerouge *et al.*, (1990) ont montré que la présence physique des bactéries n'est pas indispensable au recourbement des poils racinaires, étape initiale de l'infection. La fonction essentielle revient à un facteur diffusible commandé par *nod*, isolé pour la première fois de *R. meliloti* sur la luzerne. Ce facteur est désigné par NodRm-1 pour *R. meliloti*, NodRlv pour *R. leguminosarum* bv. *viciae* et NodBj pour *Bradyrhizobium japonicum*. C'est un oligosaccharide constitué d'un acide gras insaturé en C16 et d'un groupe sulfate. Sa synthèse est commandée par l'opéron *nodEFG*. NodRm-1 est excrété par *R. meliloti* sous l'influence d'un flavonoïde, la lutéoline, à condition que les gènes *nod* communs et un gène de spécificité d'hôte (*nodH*) soient fonctionnels. NodRm-1 est actif sur la luzerne à très faible dose comprise entre 10^{-8} et 10^{-11} . Les NodRm agissent donc comme de véritables hormones reconnues par des récepteurs spéciaux produits par la plante.

Des composés similaires notés par le préfixe NodR1 ont été étudiés chez *Rhizobium leguminosarum* (Spaink *et al.*, 1991).

Parallèlement à ces différentes phases du développement nodulaire, la cellule végétale fabrique en retour diverses protéines spécifiques des nodules appelées nodulines. Un certain nombre de gènes végétaux codant pour ces nodulines, sont induits de façon spécifique au cours de l'interaction symbiotique (Nap et Bisseling, 1990). Les nodulines dites précoces (*ENOD*) sont induites pendant les premières étapes de la formation des nodosités et de l'infection bactérienne (Mylona *et al.*, 1995). C'est le cas de nodulines précoces *ENOD12* et *ENOD5* qui ont été isolés initialement à partir d'une banque d'ADNc chez le pois, et qui codent pour des protéines riches en prolines (Horvath *et al.*, 1993). Ces protéines pourraient appartenir à une classe particulière de protéines végétales riches en hydroxyproline spécialement abondantes dans les parois végétales. Un contact physique direct entre le facteur Nod et la cellule épidermique semble nécessaire à l'induction du gène *ENOD12* (Journet *et al.*, 1994). Mais, il a été montré que *ENOD12* n'est pas nécessaire pour l'établissement d'une symbiose efficace (Csanadi *et al.*, 1994). Néanmoins, le fait que ces nodulines précoces s'expriment suivant un profil spatio-temporel connu, les transforment en de bons marqueurs moléculaires de l'activation de l'épiderme en réponse aux facteurs Nod.

Les facteurs Nod sont également capables d'induire l'expression d'un autre gène de noduline précoce *ENOD40* (Vijn *et al.*, 1995a). Des divisions des cellules du péricycle sont induites par les facteurs Nod de façon préalable à l'activation du cortex (Timmers *et al.*, 1999). L'induction de l'expression de *ENOD40* dans le péricycle avant la début de divisions corticales a été la première indication que ce tissu est activé par les facteurs Nod. Des plantes transgéniques surproduisant *ENOD40* montrent un nombre élevé de foyers de divisions dans le cortex en réponse

aux facteurs Nod, ce qui suggère que *ENOD40* pourrait être impliqué dans l'induction des divisions corticales (Charon *et al.*, 1999). Le gène de noduline *ENOD40* est un marqueur de la formation du primordium nodulaire (Yang *et al.*, 1993). *ENOD40* a été isolé dans différentes légumineuses (Yang *et al.*, 1993 ; Asad *et al.*, 1994 ; Papadopoulou *et al.*, 1996) ainsi que chez certaines non-légumineuses telles que le riz (Kouchi *et al.*, 1999) ou le tabac (van de Sande *et al.*, 1996).

Toute modification de structure des facteurs Nod, qu'il s'agisse d'un changement dans la longueur de la chaîne d'oligochitine ou d'une altération des substituants de l'une ou l'autre extrémité de la molécule entraîne une diminution de l'aptitude à induire ces nodosités. C'est la possibilité de synthétiser un très grand nombre de facteurs Nod (plus de 18) qui explique que la souche de *Rhizobium* NGR234 ait un spectre d'hôte très étendu lui permettant de noduler 110 genres de Légumineuses ainsi que *parasponia* une non-Légumineuse (Pueppke et Broughton, 1999). On admet actuellement que la plante répondrait aux signaux bactériens par l'intermédiaire de récepteurs des facteurs Nod spécifiques. Il y aurait alors là un troisième niveau de spécificité qui implique très précisément la plante. La spécificité de la symbiose serait donc contrôlée par la plante et donc par sa position taxonomique. Le rôle de la bactérie serait d'activer le programme génétique de la plante par la voie des signaux émis.

VIII.7. Effets des facteurs Nod sur les non-Légumineuses

Un certain nombre d'informations indiquent que les plantes non-Légumineuse semblent pouvoir réagir aux facteurs Nod. C'est le cas de *Parasponia andersonii* (famille des Ulmaceae), la plante non-Légumineuse nodulée par *Rhizobium*, mais également de lignées cellulaires de carotte ayant perdu l'aptitude à former des

embryons somatiques, chez lesquelles l'addition de facteurs Nod restaure une embryogenèse normale (de Jong *et al.*, 1993). Sur des cultures cellulaires de tomate, l'addition de facteurs Nod se traduit par une rapide alcalinisation du milieu de culture (Staelin *et al.*, 1994b). Röhrig *et al.*, (1995), ont montré que des concentrations très faibles (jusqu'à 10^{-15} M) de facteurs Nod permettent à des protoplastes de tabac de se diviser en absence d'auxine et de cytokinine. Ces facteurs Nod induisent en outre l'expression de gènes de tabac normalement induits par l'auxine. A l'échelle de la plante, la présence des gènes *nodAB* perturbe le développement des plants de tabac transgéniques (Schmidt *et al.*, 1993) ; ce qui indique d'une part que la plante produit de façon endogène des substrats potentiels des enzymes NodA et NodB, et d'autre part que le produit de cette réaction est reconnu par certains des mécanismes du développement de la plante. Très récemment il a été montré que chez plusieurs plantes dont le maïs, la betterave, le soja, le haricot, le melon, la laitue et la tomate, les NodBj appliqués directement sur la graine, augmentaient considérablement la germination en provoquant un allongement important de la radicule (Prithiviraj *et al.*, 2000). Ces résultats montrent qu'à l'avenir il sera sans doute possible d'utiliser les facteurs Nod pour augmenter la production végétale.

IX. La photosynthèse bactérienne

La photosynthèse est le mécanisme par lequel les plantes supérieures, les algues et les bactéries photosynthétiques convertissent l'énergie lumineuse en énergie chimique.

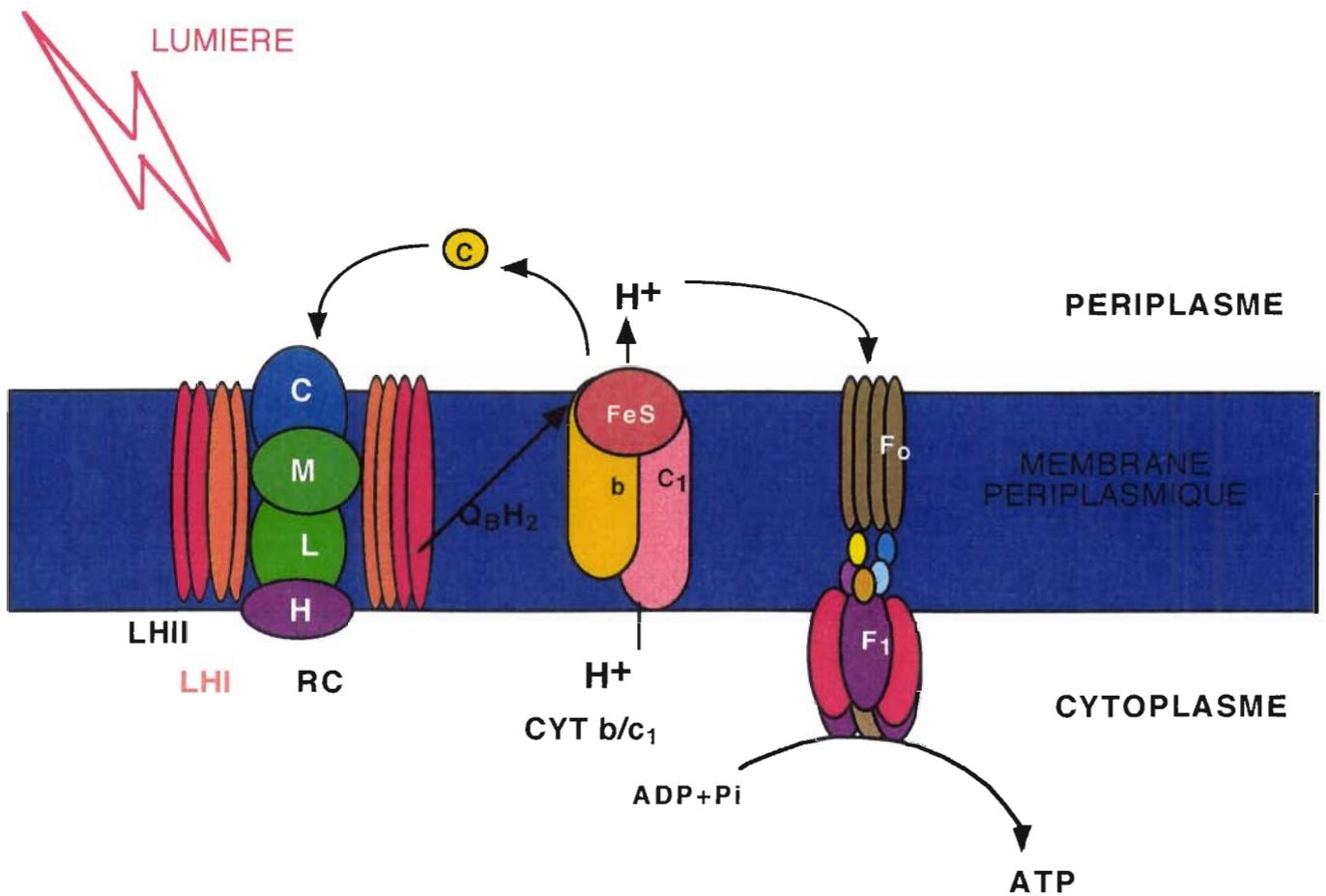


Figure 7. Représentation schématique de l'appareil photosynthétique des bactéries pourpres. D'après Ouchane, 1997.

IX.1. Organisation moléculaire de l'appareil photosynthétique des bactéries pourpres non sulfato-réductrices

Les bactéries pourpres sont les organismes les plus étudiés depuis plusieurs années. L'espèce la plus étudiée génétiquement et dont on dispose d'une meilleure connaissance des séquences génomiques est *Rhodobacter (Rb) capsulatus*. C'est un micro-organisme très versatile dans son mode de croissance. Il peut se développer comme un phototrophe ou un hétérotrophe en utilisant l'azote combiné ou l'azote atmosphérique. Son génome est relativement petit, représentant les 3/4 de la taille de celui d'*E. coli*.

IX.1.1. Organisation des gènes spécifiant les sous-unités du centre et des antennes

L'appareil photosynthétique des bactéries pourpres anaérobies telles que *Rb capsulatus* et *Rb. sphaeroides* est constitué de 3 principaux complexes pigments-protéines (Cogdell *et al.*, 1996). Le complexe capteur de lumière ou antenne collectrice LH-II (light harvesting II ou B800-850) est située à la périphérie de l'ensemble LH-I (B875)/Centres Réactionnels (RC). Les complexes LH fonctionnent comme des "antennes" qui canalisent les photons vers les centres réactionnels (RC) Bchl-protéines dans lesquels l'énergie lumineuse est convertie en énergie chimique par des réactions redox induites par la lumière. Les complexes LH-I et LH-II sont constitués de deux sous-unités α et β auxquelles sont associés les pigments bactériochlorophylles et caroténoïdes qui ont un rôle dans la stabilité des complexes et dans la capture et le transfert de l'énergie lumineuse (figure 7). Les caroténoïdes, en absorbant certaines longueurs d'onde qui interviennent dans la photo-oxydation de la bactériochlorophylle agirait comme des écrans protecteurs à l'égard de cette

photo-oxydation (rôle de photoprotection). Les caroténoïdes jouent aussi le rôle de pigments accessoires : ils absorbent la lumière entre 450-470 nm et transfèrent l'énergie aux pigments actifs que sont les molécules de bactériochlorophylle (Codgell et Franck, 1987).

IX.1.2. Organisation des gènes de photosynthèse en super opéron

L'essentiel des gènes impliqués dans la synthèse du photosystème de *Rhodobacter capsulatus* sont groupés en un fragment de 46 kb du chromosome (Yen et Marrs, 1976; Marrs, 1981; Taylor *et al.*, 1983; Zsebo et Hearst, 1984; Alberti *et al.*, 1994). Ce fragment a été complètement séquencé chez *R. capsulatus* (Burke *et al.*, 1991). Il comprend plusieurs opérons qui codent pour des enzymes impliquées dans la synthèse de la bactériochlorophylle (*bch*) et des caroténoïdes (*crt*). Les gènes de biosynthèse *bch* et *crt* sont associés aux opérons *puf* et *puf*, qui contiennent les gènes des centres réactionnels (*pufA*, *pufL* et *pufM*), les gènes de structure des complexes capteurs de lumière "Light-Harvesting" LH-I (*pufB* et *pufA*), et le gène *pufX* codant pour une protéine associée au complexe RC-LH-I (Youvan *et al.*, 1984, Belasco *et al.*, 1985, Bauer *et al.*, 1988). Cette protéine interviendrait dans l'interaction entre ces complexes pigment-protéines et les autres composés impliqués dans le transfert photosynthétique des électrons (Farchaus *et al.*, 1992). Chez certaines espèces, d'autres gènes supplémentaires font partie de l'opéron ; c'est le cas du gène *pufQ*. Cette protéine régulatrice de la synthèse de la *Bchl a*, est un transporteur probable des intermédiaires de biosynthèse de *bchl a* (Bauer et marrs, 1988). L'organisation polycistronique de l'opéron *puf* a été déterminée pour cinq espèces de la sous-classe alpha des bactéries pourpres. Il s'agit de *Rb capsulatus* (Belasco *et al.*, 1985), *Rb sphaeroides* (Coomber *et al.*, 1990), *Rhodospirillum (Rs.) rubrum* (Bélangier et Gingras,

1988), *Rhodopseudomonas (Rps.) viridis* (wiessner et al., 1990), *Rhodocista centenaria* (Yildiz et al., 1992). Chez ces espèces, l'ordre des gènes dans l'opéron *puf* est conservé (Nagashima et al., 1994). L'opéron *puf* de *Rps. viridis*, qui synthétise de la *Bchl b*, ne renferme pas les gènes *pufQ* et *pufX*. Deux ORFs font partie de l'opéron *puf* de *R. gelatinosus* (Nagashima et al. 1994), leur fonction reste encore inconnue. Chez *Rps. viridis*, le cadre de lecture ORFR, localisé en amont de l'opéron *puf*, présente de fortes homologues avec les gènes de *Bchl a* de *Rb. capsulatus* ; ORFR serait donc l'homologue du gène *pufQ* des autres bactéries pourpres non sulfato-réductrices (Young et al., 1989). L'opéron *bchCXYZ* se trouve en amont de l'opéron *puf* chez *Rb. capsulatus*, *Rb. spaeroides*, *Rs. rubrum* et *Rhodocista centenaria* (Beatty, 1995). L'arrangement des autres gènes des photopigments (*bch*) varie selon l'espèce bactérienne. L'organisation des gènes localisés en aval de l'opéron *puf* n'a pas été décrite. Chez *Rb. capsulatus* et certaines autres espèces, il a été suggéré que les opérons *bch* et *puf* peuvent être cotranscrits (Wellington et Beatty 1991b ; Wellington et al., 1992 ; Beatty 1995). L'opéron polycistronique *puc*, notamment formé des gènes de structure de l'antenne LH-II (gènes *pucB* ou *pucA*), est situé sur un autre segment du chromosome (Youvan et Ismail, 1985; Kiley et Kaplan, 1987; Fonstein et Haselkorn, 1993), à 18 kb de l'opéron *puh*. Les gènes *pucA* et *pucB* codent respectivement pour les sous-unités α et β du complexe LH-II. En plus de ces deux gènes, l'opéron *puc* présente trois gènes supplémentaires *pucCDE*. Le gène *pucC* a un rôle régulateur ; il active la transcription de l'opéron *puc* et régule l'expression du complexe LH-II (Tichy et al., 1991), le gène *pucD* code pour la sous unité γ de l'antenne LH-II et le gène *pucE* est impliqué dans la stabilité et la mise en place de l'antenne LH-II (Lee et al., 1989 ; Tichy et al., 1991). L'opéron *puh*, localisé à environ 39 kb de l'opéron *puf* contient le gène *puhA* qui code pour le polypeptide H, sous unité protéique du complexe RC qui ne se lie pas à des pigments (Taylor et al., 1983).

D'autres gènes impliqués dans la synthèse de la bactériochlorophylle tel que *hemA*, ne font pas partie du cluster de 46 kb. En effet, un autre cluster de gènes a été identifié chez *R. capsulatus* et il comprend des gènes de régulation essentiels pour la formation de l'appareil photosynthétique (Sganga et Bauer, 1992).

Chez les *Bradyrhizobium* photosynthétiques d'*Aeschynomene*, la caractérisation et l'organisation des gènes impliqués dans la photosynthèse ainsi que leur rôle dans la symbiose ont été très récemment caractérisés par Giraud *et al.*, (2000).

X. Le riz et ses micro-organismes associés

X.1. Caractérisation botanique

X.1.1. Le genre *Oryza* et son origine

Le genre *Oryza* renferme environ 25 espèces dont deux seulement sont cultivées (Second, 1985, pour revue). Parmi ces deux espèces cultivées, la principale est *Oryza sativa* L., originaire d'Asie et qui a aujourd'hui une aire de répartition mondiale. La deuxième espèce est *Oryza glaberrima* Steud originaire d'Afrique occidentale et dont la culture est demeurée restreinte à cette région. En Afrique, on trouve deux espèces de riz sauvages. L'une *Oryza breviligulata* (A. CHEV & Roehr.) est l'ancêtre du riz cultivé *Oryza glaberrima*, elle est annuelle et autogame. Elle produit de gros grains rouges qui sont encore récoltés par certaines populations africaines qui pratiquent une sorte de cueillette par battage des tiges couchées dans une pirogue. L'autre espèce sauvage est *Oryza longistaminata* qui est pérenne et allogame et se multiplie essentiellement par voie végétative par ses rhizomes dont il est difficile de se débarrasser.

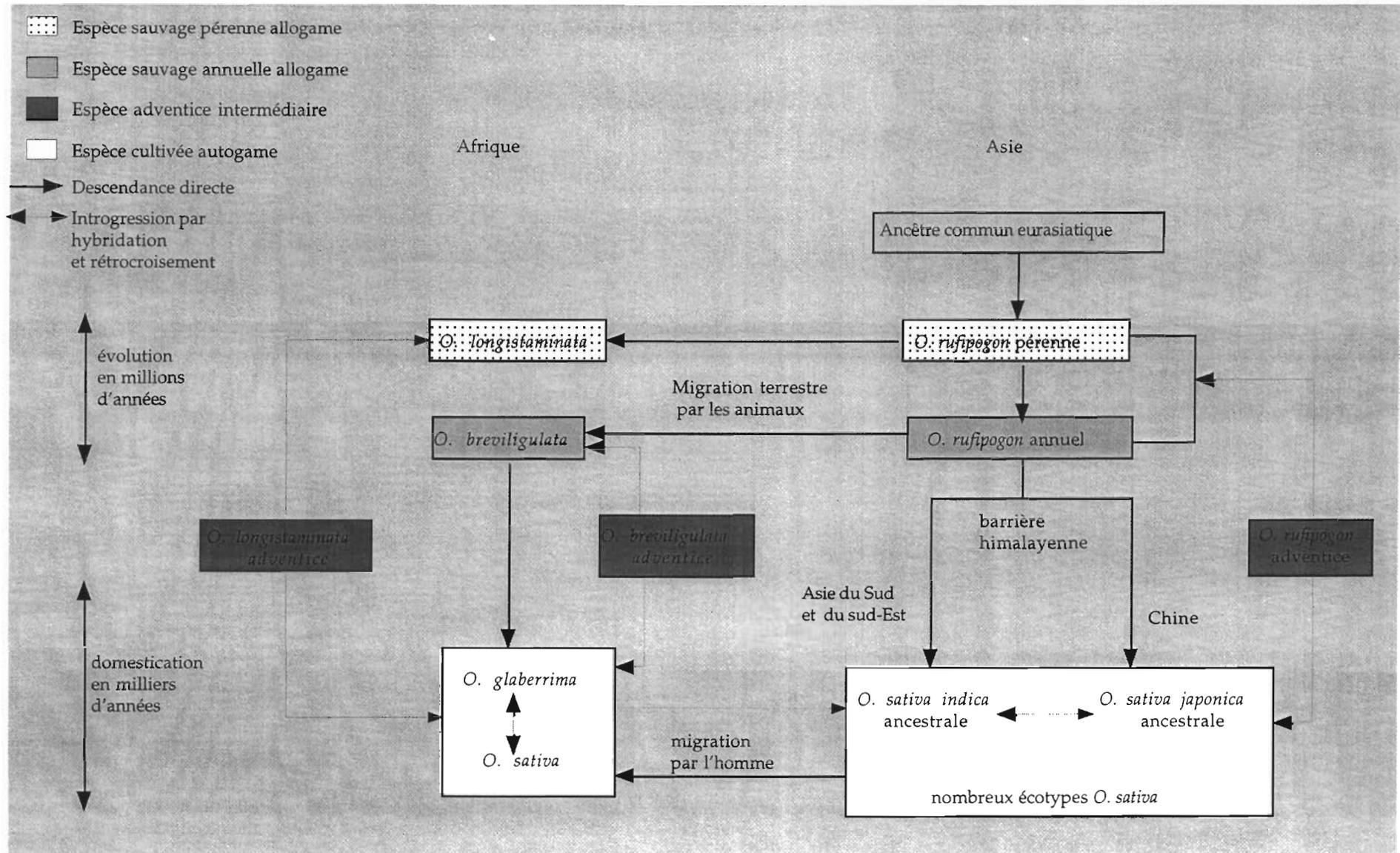


Figure 8. Relations phylogénétiques des deux espèces de riz cultivé, d'après Second, (1986).

Toutes les espèces de riz auraient une origine asiatique y compris les riz africains (figure 8). Ainsi les formes annuelles (*Oryza breviligulata*) africaines n'auraient pas évolué à partir des formes pérennes africaines (*Oryza longistaminata*) mais trouveraient leur origine dans de nouvelles introductions en provenance d'Asie. La présence du riz sauvage en Amérique tropicale serait récente à l'échelle de l'évolution.

La culture du riz *O. glaberrima* s'est traditionnellement développée depuis 2000 ans en Afrique subsaharienne (Porteres, 1950), et a sans doute succédé au système de cueillette d'*Oryza glaberrima* qui subsiste encore aujourd'hui dans de rares régions comme la cuvette du lac Tchad, le delta intérieur du Niger, ou la région côtière de Guinée. A partir du XVI^{ème} siècle, des riz de l'espèce *O. sativa* ont été introduits le long des côtes de l'Afrique de l'Est et de l'Afrique de l'ouest par les Portugais. Ces riz asiatiques se sont ensuite propagés à toute l'Afrique tropicale. Aujourd'hui, l'espèce africaine, encore cultivée dans des systèmes de production traditionnels, est de plus en plus supplantée par l'espèce asiatique, mais c'est tout un patrimoine génétique qui est en train de disparaître.

X.1.2. La biologie de la plante

Le riz est une graminée d'origine tropicale. C'est une monocotylédone annuelle, herbacée et poussant normalement dans l'eau. Elle est autogame, diploïde ($2n=24$) et les étapes de son développement sont similaires à celles de toutes les céréales à paille : levée, tallage, montaison, épiaison, floraison, remplissage du grain. L'inflorescence du riz est une panicule dont les ramifications, les pédicelles, portent des épillets. Les origines du riz comme plante cultivée sont anciennes. Le riz a des besoins en températures élevés. C'est une plante de climats chauds et adaptée à la

culture aquatique. L'espèce africaine *Oryza glaberrima* est adaptée à la riziculture inondée ou pluviale. Certaines de ses variétés sont capables de pousser complètement exondées (riz de montagne), d'autres sont des riz flottants qui poussent dans plus de trois mètres d'eau et sont capables, par leur croissance extrêmement rapide de suivre la montée brutale des eaux lors des crues. La variété sauvage *Oryza breviligulata* peut également pousser en eau profonde (jusqu'à deux mètres d'eau).

Les types *indica* ont leur optimum de photosynthèse entre 25 et 35°C, les types *japonica* entre 18 et 25°C. la croissance des *indica* serait limitée au-dessous de 20°C ; celles des *japonica* au-dessous de 10°C.

En Europe, la culture du riz n'est donc possible que dans les pays du sud (Italie, Espagne, France méditerranéenne). En France, *Oryza sativa* est cultivé essentiellement en Camargue, et aussi sur de petites surfaces dans les départements de l'Aude et de l'Hérault.

X.2. L'importance du riz dans le monde

Parmi toutes les céréales cultivées, le riz est la seule qui soit presque exclusivement réservée à l'alimentation humaine. Il constitue la base de l'alimentation de près de la moitié de la population mondiale, surtout dans les pays du Sud où le déficit alimentaire est très élevé. Les cultures de riz couvrent environ 150 millions d'hectares. Près de 90% de ces surfaces se retrouvent en Asie ; les 10% restant se répartissent sur tous les autres continents. La consommation annuelle de riz par habitant varie selon les régions, chaque région ayant ses préférences de qualité en termes de forme, de comportement à la cuisson et de parfum du grain, ainsi que ses méthodes de préparation culinaire. Par exemple la consommation de riz

est de 100 kg par habitant en Chine, 50 kg par habitant au Brésil et 5 kg par habitant en France (Jacquot *et al.*, 1997 pour revue). Une partie des grains récoltés est transformée en pâtes, gâteaux et autres produits ou utilisée pour la production de boissons alcoolisées. Les sous-produits du blanchiment (le son et les germes) sont utilisés comme nourriture pour le bétail ou pour l'extraction de vitamines à usage pharmaceutique. Les sous-produits du décorticage (les balles) sont employés pour la fabrication de matériaux de construction, en tant que combustible ou encore comme source de silice à des fins industrielles. Les pailles de riz, lorsqu'elles ne sont pas enfouies, servent de complément fourrager et de litière pour le bétail ou de substrat pour la production de champignons comestibles.

L'azote est le principal facteur limitant de la productivité des rizières. De plus, après la révolution verte des années 60/70, les variétés de riz à haut rendement qui sont actuellement recommandées aux agriculteurs des pays du Sud, sont extrêmement exigeantes en engrais azotés. Les conséquences de l'utilisation de ces nouvelles variétés sont différentes suivant les continents :

- En Asie, les agriculteurs disposent en général de moyens suffisants pour utiliser des engrais chimiques qui ont longtemps été subventionnés, et on assiste actuellement à une sur-utilisation des engrais azotés dont l'application dépasse souvent les 300 kg à l'hectare. Une des conséquences est la pollution importante par les nitrates des nappes d'eau et des rizières, pollution qui représente actuellement un véritable danger pour la santé des populations. De plus, les sols de rizière sont progressivement appauvris en éléments nutritifs autres que l'azote et donc les rendements globaux diminuent de façon dramatique.

- En Afrique, les agriculteurs n'ont le plus souvent pas les moyens d'acheter des engrais, ce qui entraîne souvent des rendements très faibles pour les variétés dites à haut rendement. Les agriculteurs cultivent donc encore les variétés

traditionnelles à faibles rendements mais mieux adaptées aux sols de rizière pauvres, et en général, les rendements en riz dépendent de la fertilité naturelle des sols.

Il était donc très important dans ce travail d'identifier des systèmes naturels de riz n'ayant pas connus d'intrants chimiques depuis des centaines d'années, voir 2000 à 3000 ans. Le riz sauvage *Oryza breviligulata*, récolté et consommé par certaines populations africaines depuis des millénaires, nous est donc apparu comme le système idéal pour explorer des possibilités naturelles de fixation de l'azote bénéficiant au rendement du riz et qui soit une alternative à l'utilisation massive d'engrais azotés chimiques coûteux et polluants. C'est ainsi que nous avons découvert une association jusqu'alors insoupçonnée entre des *Bradyrhizobium* photosynthétiques et une espèce de riz sauvage ancêtre du riz cultivé Africain.

X.3. Les microorganismes associés au riz

Etant donnée l'importance du riz dans l'alimentation humaine, et ses besoins importants en azote, les microorganismes fixateurs d'azote associés à cette céréale sont l'objet de nombreuses études avec comme objectif principal d'améliorer les rendements en grains du riz en limitant les apports d'engrais chimiques. Dans les rizières, il existe en effet une microflore fixatrice d'azote importante adaptée au milieu aquatique et plus ou moins directement associée au riz.

Cette microflore peut être entièrement libre, c'est-à-dire présente dans l'eau de la rizière et à l'interface sol-eau. Dans ce cas, il s'agit en général de microorganismes photosynthétiques, (Cyanobactéries ou bactéries photosynthétiques anaérobies) qui tirent de la lumière l'énergie nécessaire à leur développement, ou de bactéries anaérobies strictes qui décomposent les résidus végétaux présents à la surface du sol inondé.

Tableau 8. Bactéries fixatrices libres de la rhizosphère du riz (d'après Heulin et Berge, 1992).

Espèces	Groupe phylogénétique (Woese, 1987)	Références
Protéobactéries		
Subdivision		
<i>Azospirillum brasilense</i>	α	Tarrand <i>et al.</i> , 1978,
<i>Azospirillum irakense</i>	α	Khammas <i>et al.</i> , 1989
<i>Azospirillum lipoferum</i>	α	Bally <i>et al.</i> , 1983 ; Ladha <i>et al.</i> , 1987
<i>Azospirillum</i> sp.	α	Watanabe <i>et al.</i> , 1979
<i>Pseudomonas diazotrophicus</i>	α	Watanabe <i>et al.</i> , 1987b
<i>Spingomonas paucimobilis</i>	α	Bally <i>et al.</i> , 1983
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	β	Gillis <i>et al.</i> , 1995
<i>Citrobacter freundii</i>	γ	Omar <i>et al.</i> , 1989b
<i>Enterobacter cloacae</i>	γ	Bally <i>et al.</i> , 1983
<i>Klebsiella oxytoca</i>	γ	Bally <i>et al.</i> , 1983
<i>Klebsiella planticola</i>	γ	Omar <i>et al.</i> , 1989b
<i>Agrobacterium</i> sp.		Reddy <i>et al.</i> , 1997
<i>Azorhizobium</i> sp.		Reddy <i>et al.</i> , 1997
<i>Rhizobium</i> sp.		Yanni <i>et al.</i> , 1997
Firmibactéries		
<i>Paenibacillus polymyxa</i>		Nakamura, 1984
<i>Bacillus</i> sp.		Stoltzfus <i>et al.</i> , 1997

La microflore fixatrice d'azote peut également être rhizosphérique (tableau 8), c'est-à-dire qu'elle se développe autour ou à la surface du système racinaire du riz qui lui fournit, grâce aux exsudats racinaires, les substrats énergétiques nécessaires. C'est le cas de *Bacillus* sp., et de *Agrobacterium* sp., (Stoltzfus *et al.*, 1997 ; Reddy *et al.*, 1997) qui colonisent uniquement la surface des racines, et entrent alors en compétition avec tous les autres microorganismes présents dans la rhizosphère.

Enfin, un troisième type d'association microbienne fixatrice d'azote, la plus étroite, est représentée par les microorganismes endophytes.

Rappelons que, le terme endophyte était utilisé pour désigner les bactéries et les champignons dont la colonisation interne des racines est bénéfique à l'hôte (Kloepper et Beauchamp, 1992). Plus tard ce terme s'est étendu aux microorganismes capables de coloniser sans symptômes pathogéniques l'intérieur des racines et les tissus internes des plantes-hôtes (Pereira, 1995, Wilson, 1995). Dans l'association endophytique, la bactérie fixatrice d'azote se protège des autres microorganismes présents dans la rhizosphère et susceptibles de rentrer en compétition avec elle. Elle bénéficie de plus des métabolites directement fournis par la plante hôte.

Les microorganismes endophytes du riz sont donc ceux que l'on trouve à l'intérieur des racines soit dans les espaces intercellulaires soit à l'intérieur même des cellules du riz. On distingue les bactéries endophytes facultatives, localisées à la fois à l'intérieur et à l'extérieur des racines (Döbereiner et Baldani, 1982) comme les quatre espèces d'*Azospirillum* (*A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, et *A. irakense*), *Azorhizobium caulinodans* (Ndoye *et al.*, 1996 ; Van Nieuwenhove *et al.*, 2000) (tableau 8), et les endophytes obligatoires (Döbereiner 1992a), tels que *Acetobacter diazotrophicus* (Cavalcante et Döbereiner, 1988), *Azoarcus* sp (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993 ; Hurek *et al.*, 1994b ; Plessl *et al.*, 2000) et *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani *et al.*, 1986a) qui colonisent l'intérieur des tissus

racinaires mais sont incapables de survivre dans le sol sans la présence de la plante hôte.

Dans les champs où le trèfle (*Trifolium alexandrinum*) pousse en rotation avec le riz (*Oryza sativa*), Yanni *et al.*, (1997) ont montré que *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii symbiote du trèfle, se retrouvait aussi à l'intérieur des racines de riz. Cette association naturelle entre les racines de riz et *R. leguminosarum* bv. trifolii semble bénéfique pour la plante puisqu'une augmentation de la croissance du riz et de la production en grains a été obtenue après inoculation.

La plupart des bactéries, endophytes ou non, qui vivent à l'extérieur et à l'intérieur des racines de riz, sont des diazotrophes ; ils peuvent représenter jusqu'à 80% de la microflore totale (Barraquio et Watanabe, 1981). Ces microorganismes sont capables de fixer l'azote en symbiose avec l'hôte (Döbereiner, 1992a, 1992b), mais, dans la plupart des cas, ces bactéries utilisent les produits de la fixation d'azote pour leur propre croissance, et ne libèrent qu'une petite quantité de l'azote fixé pour la plante hôte (Van Berkum et Bohlool, 1980 ; Yanni *et al.*, 2000). Ainsi, les mesures de fixation d'azote par ^{15}N effectuées sur le riz inoculé avec les *Azospirillum*, ont montré que la majeure partie de l'azote fixé se retrouvait au niveau de la bactérie à l'intérieur des racines (Okon, 1985). De même, Yanni *et al.*, (2000), par des mesures de delta ^{15}N effectuées *in vitro* sur du riz inoculé par *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii démontrent que la fixation biologique de l'azote n'intervient pas dans la croissance du riz.

X.4. Effets des microorganismes sur la croissance des graminées

Les racines des graminées représentent un habitat très favorable au développement des bactéries micro-aérobies fixatrices d'azote (Ladha *et al.*, 1997)

Tableau 9. Sites de colonisation des endophytes diazotrophes. (D'après Döbereiner *et al.*, 1994 ; Ndoye *et al.*, 1996 ; Hallmann *et al.*, 1997 ; Chanway, 1998).

Microorganisme	Plante	Localisation
	Obligatoires	
<i>Azoarcus</i> sp.	Riz, kallar grass	Racines : intracellulaire, dans l'épiderme, exoderme, coiffe racinaire, cortex, parenchyme du xylème ; Parties basales des tiges
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	Canne à sucre,	Racines, tiges, feuilles
	Pennisetum	Racines, tiges
	Patate douce	Racines tiges et tubercules
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Canne à sucre	Racines tiges,
	Céréales	Racines, tiges, feuilles, graines
	Palmier à huile	Racines tiges,
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	Forage grasses	Racines, tiges, feuilles
	Canne à sucre	Racines, tiges, feuilles
	Riz	
	Facultatifs	
<i>Azospirillum brasilense</i>	Céréales	Racines, tiges, graines
	Forage grasses	Racines, tiges
	Canne à sucre	Racines, tiges, feuilles
	Palmier à huile	Racines, tiges, fruits
<i>Azospirillum lipoferum</i>	Céréales	Racines, tiges, graines, xylème
	Forage grasses	Racines, feuilles
	Canne à sucre	Racines, tiges, feuilles
	Plantes à tubercules	Tubercules, racines
	Palmier à huile	Racines, tiges, fruits
<i>Azospirillum amazonense</i>	Céréales	Racines, tiges, graines
	Canne à sucre	Racines, tiges
	Palmier à huile	Racines, tiges, fruits
<i>Azospirillum irakense</i>	Riz	Racines
<i>Azospirillum caulinodans</i>	Riz	Racines
<i>Agrobacterium</i>	Riz	Racine, tiges
<i>Bacillus</i>	Riz	Racines, tiges
<i>Rhizobium</i>	Riz	Racines, tiges
<i>Pseudomonas</i>	Riz	Racines, tiges

(tableau 9). Ce sont des bactéries à effet PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) telles que *Acetobacter diazotrophicus* (Cavalcante et Döbereiner, 1988 ; Rolfe *et al.*, 1997) et *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani *et al.*, 1986 ; Boddey *et al.*, 1995 ; James et Olivares, 1998) qui colonisent la canne à sucre, *Azoarcus* spp (Reinhold *et al.*, 1993 ; Reinhold et Hurek, 1998) endophyte de *Leptochloa fusca* (Kallar grass) et *Azospirillum* spp. (Bashan, 1999) *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (Yanni *et al.*, 2000 ; Hilali *et al.*, 2000) endophytes du riz et du maïs. Ces PGPR stimulent la croissance de leurs plantes-hôtes, qui se traduit par une augmentation très significative du poids sec des plantes, du rendement en grains, et par une augmentation de la fixation symbiotique d'azote (Yanni *et al.*, 1997). Chez les graminées, l'inoculation des racines avec les PGPR induit aussi une augmentation du volume du système racinaire due à une augmentation du nombre et de la longueur des racines latérales (Kalpulnik *et al.*, 1985b ; Barbieri *et al.*, 1986 ; Levanony et Bashan, 1989). Ainsi, l'inoculation des plants de maïs par *Azospirillum brasilense* se traduit par une augmentation significative du rendement du poids de la matière sèche des parties aériennes (Levanony *et al.*, 1990 ; O'Hara *et al.*, 1981).

Les effets positifs des diazotrophes tels que *Azospirillum* spp. sur le rendement de certaines graminées dont le riz ont donc été attribués aux taux de phytohormones produit par la bactérie (Okon et Labandera-Gonzalez, 1994). Par exemple, l'effet bénéfique d'*Azospirillum* sur la croissance du riz paraît être lié plus précisément à leur aptitude à produire de l'Acide Indole Acétique (AIA). En effet, l'AIA est une des auxines les mieux caractérisées. Elle est connue pour stimuler à la fois l'élongation, la division et la différenciation des cellules de la plante (Cleland, 1990 ; Hagen, 1990). Plusieurs voies de biosynthèse existent pour cette phytohormone, nécessitant ou non la présence de L-tryptophane dont la principale source dans la rhizosphère vient des exsudats produits par les racines des végétaux (Patten et Glick, 1996). Rinaudo

(1982), a observé avec quatre souches d'*Azospirillum* une corrélation positive entre leur production d'AIA *in vitro* et les poids secs correspondants des plants de riz inoculés par ces souches. Aussi, une inoculation par *Azospirillum* produit le même effet sur le blé qu'un apport exogène d'auxines (Kolb et Martin, 1985). L'inoculation sur le blé de mutant d'*Azospirillum brasilense* non producteur ou faible producteur d'auxine (AIA) ne provoque aucun effet sur la croissance de la plante à la différence de la souche sauvage (Babieri *et al.*, 1986 ; Barbieri et Galli, 1993). Bertrand, (1997) a également montré que, l'effet de l'AIA (apportée à la concentration de 10^{-6} M) sur la morphologie du système racinaire de plantules de sorgho est le même que celui obtenu après inoculation avec *Azospirillum brasilense*. Il se produit dans les deux cas une augmentation du diamètre et du nombre de racines, de la longueur et du nombre de poils absorbants.

Des quantités significatives de gibbérellines et de cytokinines, autres substances de croissance végétales, ont également été détectées dans le milieu de culture d'*Azospirillum brasilense*. Les substances de croissance produites par les bactéries favoriseraient le développement des plantes par un effet direct sur leur métabolisme comme cela pourrait être le cas avec l'AIA. Ces phytohormones induisent une prolifération des racines latérales et des poils absorbants, conduisant à un accroissement de la surface d'échange entre la plante et le sol, pouvant entraîner une augmentation de l'absorption minérale et une stimulation de la croissance de la plante (Tien *et al.*, 1979).

Un autre mode d'action possible a été proposé pour expliquer le phénomène de stimulation de la croissance des racines par les PGPR. Il s'agit de la capacité de ces bactéries à diminuer la production d'une autre hormone végétale, l'éthylène, connue pour inhiber l'élongation racinaire. Ces bactéries possèdent l'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) déaminase qui hydrolyse l'ACC,

précurseur de l'éthylène dans la plante (Glick, 1995). Ainsi, l'inoculation de dicotylédones telles que le colza, la laitue et la tomate avec *Pseudomonas putida* GR12-2 abouti à une stimulation de l'élongation racinaire. La bactérie mutante, n'ayant pas d'activité ACC déaminase, n'a pas d'effet, ce qui démontre l'implication de cette enzyme dans le mécanisme bactérien utilisé pour favoriser le développement des racines (Bertrand, 1997).

L'augmentation de la nutrition hydrique et minérale est un effet produit par l'inoculation et pourrait ainsi expliquer l'amélioration de la croissance de la plante entière (Okon, 1985, Bertrand *et al.*, 2000). Ainsi un accroissement du prélèvement de NO_3^- , K^+ , et PO_4^- a été observé chez le maïs inoculé par *A. brasilense* (Lin *et al.*, 1983) et de NH_4^+ et PO_4^- chez le riz inoculé par *A. lipoferum* (Murty et Ladha, 1988). En plus des modifications des paramètres concernant la racine, l'inoculation des céréales avec *Azospirillum* affecte également les paramètres foliaires. L'augmentation du poids de matière sèche des feuilles est directement corrélée à une amélioration de la nutrition minérale par la plante, particulièrement en nitrates et ammonium. Ce phénomène pourrait expliquer l'accumulation de composés azotés dans la plante sans fixation d'azote apparente. La plante peut prélever plus efficacement de l'azote (NO_3^- et NH_4^+) dans le sol et requiert alors une moindre fertilisation azotée pour atteindre une meilleure productivité (Bashan et Levanony, 1990).

Les bactéries PGPR utilisent donc probablement plusieurs mécanismes et non un seul particulier pour favoriser la croissance des plantes. Bashan et Levanony, 1990 suggèrent que ces bactéries agissent selon de multiples mécanismes, chacun de faible importance évalué séparément. Ainsi, la contribution de la fixation d'azote moléculaire n'est que de 5% dans l'effet observé sur les plantes mais selon ces mêmes auteurs, lorsqu'elle est combinée avec d'autres facteurs, cette faible contribution pourrait devenir significative.

MATERIEL ET METHODES

I. Souches bactériennes

Toutes les souches de *Bradyrhizobium* isolées de différentes espèces d'*Aeschynomene* sont repiquées sur milieu YM (Vincent 1970). Ces souches sont disponibles dans le soucier du LSTM. Elles appartiennent aux groupes I, II ou III d'inoculation croisée définis par Alazard (1991). Nous avons inclus dans ce travail des souches représentant les différents genres et espèces connus chez les rhizobia à ce jour.

Les souches d'*Escherichia coli* sont repiquées sur milieu TYGPN ou sur milieu LB supplémenté de l'antibiotique approprié.

Toutes les bactéries sont conservées à -80°C dans du glycérol 50%.

Toutes les souches utilisées dans notre travail sont répertoriées en annexe A dans le tableau 1.

II. Milieux de culture

Différents milieux de culture ont été utilisés en fonction des buts recherchés. Tous les milieux de culture ont été stérilisés à 120°C pendant 20 minutes.

II.1. Milieu YM (Vincent, 1970)

Ce milieu a été utilisé pour la croissance et la bonne conservation des souches de bradyrhizobia.

Par litre : Mannitol : 10 g ; Glutamate de sodium : 0,5 g ; K_2HPO_4 : 0,5 g ; Solution T ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 g/l) : 10 ml ; NaCl (50 g/L) : 1 ml ; Solution U ($CaCl_2$, 40 g/l) : 1 ml ; Solution V ($FeCl_3$, 4 g/l) : 1 ml ; Extrait de levure : 1 g.

Le pH est ajusté à 6,8 avec HCl 0,1 N. Le milieu gélosé (YMA) correspondant est obtenu après addition de 20 g/l d'agar.

II.2. Milieu Jensen (Vincent, 1970)

Ce milieu a été utilisé pour les cultures de plantes en tube Gibson lors de l'étude du spectre d'hôte de nos différents isolats et pour l'inoculation *in vitro* des jeunes plants de riz sauvage.

Pour 1 litre de milieu : K_2HPO_4 (20 g/l) + $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (20 g/l) : 10 ml ; NaCl (20 g/l) : 10 ml ; $CaHPO_4$ (50 g/l) : 20 ml ; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (4 g/l) : 10 ml ; Oligo-éléments de Jensen* : 1 ml ; agar : 20 g. Le pH est ajusté à 6,7.

*1 litre de solution d'oligo-éléments de Jensen contient : H_3BO_3 : 2,86 g ; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$: 2,03 g ; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,22 g ; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 0,08 g ; $NaMoO_4 \cdot H_2O$: 0,09 g.

II.3. Milieu LB (Luria Bertani)

Le milieu LB (Sambrook *et al.*, 1989) a été utilisé pour les cultures de souches d'*Escherichia coli*.

Pour 1 litre : Extrait de levure : 5 g ; tryptone : 10 g ; NaCl : 10 g.

Le pH est ajusté à 7 avec NaOH 1 N. Le milieu gélosé correspondant est obtenu après addition de 20 g/l d'agar.

II.4. Milieu Cambel (milieu C)

Ce milieu a été utilisé pour la germination des graines sur boîte de Petri.

Pour 1 litre : K_2HPO_4 : 0,5 g ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,2 g ; NaCl : 0,1 g ; Mannitol : 10 g ; Casamino acids : 0,5 g ; Extrait de levure : 2,5 g ; Gelose bacto agar : 8 g. Le pH du milieu est ajusté à 7.

II.5. Milieu TY (Beringer, 1974)

Ce milieu a notamment été employé lors de l'extraction des protéines totales pour l'analyse SDS-PAGE des nouveaux isolats.

Pour 1 litre : Tryptone (Oxoid) : 5 g ; extrait de levure (Oxoid) : 0,75 g ; KH_2PO_4 : 0,454 g ; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$: 2,388 g ; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (13,4 g / 100 ml) : 5 ml ; agar : 20 g. Le pH est ajusté à 6,8-7,0.

II.6. Milieu TYGPN

Ce milieu a été utilisé pour la construction de la banque d'ADN génomique.

Pour 1 litre, le milieu est composé de : Tryptone 20 g ; Extrait de levure : 10 g ; glycérol 80% : 10 ml ; $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$: 6,3 g ; KNO_3 : 10 g. Le pH est ajusté à 7.

III. Désinfection des racines et tiges d'*Oryza breviligulata* et méthodes de « piègeage » des souches de rhizobiums

Les plants de riz sauvage *Oryza breviligulata* ont été collectés dans les mares temporaires des environs de Joal (Sénégal) et de Kapachez (Guinée). Certains plants proviennent aussi de Guinée. Au laboratoire, les racines sont sectionnées à l'aide d'un scalpel en segments d'environ 2 cm. Les racines sont désinfectées par immersion dans l'éthanol à 96%, pendant 1 min, puis elles sont trempées dans une solution de HgCl₂ 0,1% pendant 5 min. Les fragments de racines sont abondamment rincés (6 fois) à l'eau distillée stérile avant d'être broyés dans un mortier contenant 1 ml d'eau distillée stérile. Le broyat obtenu est ensuite inoculé aseptiquement dans des tubes Gibson contenant des jeunes plants d'*Aeschynomene sensitiva*, de *Sesbania rostrata* et de *Faidherbia albida* poussant sur milieu Jensen sans azote.

Afin de vérifier s'il n'y a pas de bactéries contaminantes, nous avons étalé sur boîte de Petri (milieu YMA) 0,1 ml de la dernière eau de rinçage.

IV. Dénombrement des bradyrhizobia

La densité des populations bactériennes endophytes du riz sauvage et présentes dans l'eau de mare a été estimée par la technique du nombre le plus probable ou technique MPN (Brockwell, 1980).

La concentration des bactéries est déterminée en gramme pour les racines et en millilitre pour les rhizobiums présents dans l'eau de mare.

V. Stérilisation et germination des graines

V.1. Stérilisation et germination des graines

Les graines d'*Aeschynomene sensitiva*, de *Sesbania rostrata* et de *Faidherbia albida* sont stérilisées par immersion dans l'acide sulfurique concentré (96%) pendant 45 min. Après plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile, les graines sont laissées 6 h dans l'eau. Cette étape favorise le gonflement des graines qui sont ensuite déposées stérilement dans des boîtes de Petri contenant de l'eau gélosée à 0,8% d'agar, à raison de 20 graines par boîte. La germination s'effectue ensuite en atmosphère humide, à 30°C. et à l'obscurité, pendant 24 h.

Lorsque les racines des jeunes plantes ont atteint environ 1 à 2 cm de long, elles sont transférées dans des tubes Gibson contenant du milieu Jensen.

Pour éviter le dessèchement de l'enveloppe cotylédonaire des graines et pour leur permettre de se libérer spontanément de l'enveloppe de la graine, il est nécessaire de laisser les tubes en atmosphère humide pendant 24 h sous éclairage continu.

V.2. Stérilisation et germination des graines de riz sauvage

Les graines de riz sauvage *Oryza breviligulata* ont été récoltées dans les mares temporaires de la région de Joal au Sénégal. Au laboratoire, elles sont désinfectées 15 min dans l'alcool puis trempées pendant 25 min dans l' HgCl_2 à 0,1%. Après plusieurs rinçages avec de l'eau stérile, les graines sont laissées environ 6 h dans de l'eau. Cette étape favorise le gonflement des graines qui sont ensuite déposées stérilement dans les boîtes de Petri contenant du milieu Cambel à raison de

20 graines par boîte. La germination des graines s'effectue en atmosphère humide dans une étuve à 30°C et à l'obscurité pendant 48 h.

VI. Technique d'inoculation

VI.1. Inoculation des racines et des tiges

Les plantes en culture hydroponique sont inoculées 3 jours après le repiquage des jeunes plants dans le tube Gibson. L'inoculation sur les racines se fait avec environ 1 ml de culture bactérienne pure en phase exponentielle de croissance (milieu YM). L'inoculation des tiges est réalisée en badigeonnant les sites de nodulation avec un pinceau fin stérilisé, trempé au préalable dans la culture bactérienne pure.

VI.2. Inoculation des jeunes plants de riz en serre

VI.2.1. Substrat de culture et inoculation

Le sol utilisé a été prélevé à Dakar. Son nom vernaculaire est " Dior ". C'est un sol sablonneux, contenant 93 % de sable. Le sol a été tamisé et autoclavé.

Lorsque la racine atteint 1 à 2 cm de long, les graines prégermées sont repiquées dans des pépinières préalablement submergées par un centimètre d'eau environ. Les pépinières sont ensuite placées dans une chambre de culture à 37°C. Après 3 à 4 jours de croissance, les plantules sont repiquées dans des pots contenant 5 kg de sol stérile. Le sol est ensuite inoculé avec 10 ml de culture bactérienne en phase exponentielle. Les pots sont alors placés en serre. Pour cette espèce de riz sauvage, il est nécessaire que le sol reste inondé d'eau pendant toute la croissance.

Chaque traitement est répété 6 fois. Pour les témoins, nous avons procédé comme suit :

- 6 plants témoins inoculés avec du milieu de croissance des bactéries (milieu YM).
- 6 plants supplémentés avec de l'azote KNO_3 , 5 mM 15 jours après le repiquage des plants dans les pots

Les traitements sont disposés au hasard sur une tablette métallique dans une serre. L'arrosage est effectué tous les deux jours avec de l'eau et toutes les 2 semaines avec du milieu Jensen additionné d'azote.

VI.2.2. Paramètres évalués

L'expérience a duré 5 mois, de Juin à Octobre, dans une serre où la température varie de 27°C à 34°C, avec une photopériode de 12 h.

Le poids sec des graines, la matière sèche des feuilles et des tiges ont été mesurés après séchage dans une étuve à 80°C pendant 72 h.

Les données sont soumises à une analyse de variance et les moyennes sont comparées avec le test de Fischer (Snedecor et Cochran, 1989).

VI.3. Inoculation des jeunes plants de riz en " *culture in vitro* "

Lorsque les racines des jeunes plants ont atteint environ 1 à 2 cm de longueur, elles sont trempées pendant 1 min dans une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance (milieu YM) ; ensuite elles sont placées entre deux feuilles de papier filtre dans une boîte de Petri contenant du milieu Jensen. Les boîtes sont placées dans une chambre de culture à 30°C pendant environ 2 à 4 semaines.

VII. Isolement et culture des souches bactériennes

VII.1. Isolement et purification des souches de rhizobiums à partir des nodules

Les nodules racinaires des jeunes plants inoculés d'*Aeschynomene sensitiva* sont récoltés 3 semaines après inoculation et désinfectés superficiellement par immersion dans l'éthanol à 96% pendant 5 min, puis dans une solution de HgCl₂ à 0,1% pendant 5 min avant d'être rincés abondamment à l'eau distillée stérile puis écrasés dans une goutte d'eau stérile. Le broyat est ensuite étalé sur boîte de Petri contenant le milieu de croissance YMA (Vincent, 1970). L'incubation s'effectue à 30°C. Les souches sont purifiées par repiquages successifs sur le même milieu. Elles sont ensuite testées pour leur aptitude à former des nodules sur la plante hôte et conservées à 4°C sur gélose inclinée en tube à vis ou sur boîte de Petri (milieu YMA).

VII.2. Isolement des souches de rhizobiums à partir de l'eau de mare

Les jeunes plants d'*Aeschynomene sensitiva* poussant en tube Gibson ont été directement inoculés avec 1 ml d'eau de mare où pousse le riz sauvage.

VII.3. Culture des *Bradyrhizobium* photosynthétiques

Les souches de *Bradyrhizobium* photosynthétiques sont cultivées dans des erlenmeyers contenant 50 ml de milieu liquide YM (Vincent, 1970), à une agitation d'environ 170 rpm (agitateur 'Orbit shaker', Bioblock), sous un éclairage intermittent

de 15 h / 9 h (lumière/obscurité) en utilisant des lampes incandescentes de 60 watts (type Mazda). Le flux lumineux mesuré au niveau des erlenmeyers est de 4500 lux, la température de 30°C. En phase stationnaire (5 à 6 jours), les milieux contenant les bactéries sont mis à centrifuger (10.000 g, 10 min) dans une centrifugeuse SORVALL RC-5C équipée d'un rotor SS34. Le surnageant est éliminé et les culots bactériens sont mis à congeler à -20°C. La pureté des souches est vérifiée par observation sur boîte des colonies et observation des cellules vivantes au microscope.

VIII. Technique de microscopie

VIII.1. Microscopie photonique

VIII.1.1. Fixation des échantillons de racines de riz sauvage

Les échantillons de racines sont fixés 15 minutes sous vide à température ambiante dans une solution de glutaraldéhyde 2,5% dans un tampon cacodylate de sodium 0,2 M (pH 7,2). Le mélange fixateur est renouvelé et placé à température ambiante pendant 1 heure et 45 minutes. Le matériel est ensuite rincé trois fois (30 minutes pour chaque rinçage) dans du tampon cacodylate 0,1 M, puis post-fixé pendant 2 heures dans la solution de coloration (tampon cacodylate 0,2 M; K_3FeCN_6 ; K_4FeCN_6 ; Xgal 2%). Après fixation, les échantillons de racines sont rincés trois fois (10 minutes pour chaque rinçage) dans du tampon cacodylate 0,1 M.

VIII.1.2. Coupe au vibratome

Les échantillons de racines sont ensuite immobilisés dans un gel d'agarose 3% en position verticale pour les coupes transversales, et en position horizontale pour les

coupes longitudinales. Cet enrobage confère une rigidité nécessaire à l'étape de microtomie. Des coupes ultra fines de 40 µm de fragments de racines préalablement fixés sont réalisées à l'aide d'un vibratome (Leica VT1000S). Après montage entre lame et lamelle dans de l'eau distillée, les coupes sont observées au microscope photonique (Olympus Provis microscope).

VIII.2. Microscopie électronique à balayage

Pour la microscopie à balayage, les échantillons sont fixés classiquement au glutaraldéhyde (3% dans du tampon cacodylate de sodium 0,1 M) pendant 2 h, rincés et déshydratés à l'éthanol absolu. Après contournement du point critique (substitution acétone absolu/CO₂ sur appareil BAL-TEC/CPD030 critical point Dryer), les échantillons sont métallisés (appareil BAL-TEC SCD 050) puis observés à l'aide d'un microscope Jeol Japan electronic and Optic lens, réf. 6300F.

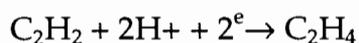
IX. Estimation du potentiel fixateur d'azote

IX.1. Observation du phénotype des plants inoculés

L'observation de la couleur verte des plantes inoculées et de leur croissance (racines et parties aériennes) en comparaison à des plantes non inoculées et placées dans les mêmes conditions de culture (avec des feuilles généralement jaunâtres et limitées dans leur croissance) est une première indication de l'activité fixatrice d'azote des isolats testés.

IX.2. Mesure de l'activité réductrice d'acétylène

L'activité réductrice de l'acétylène a été mesurée suivant la méthode de Hardy *et al.*, (1973). La réduction de l'acétylène (C₂H₂) en éthylène (C₂H₄) se fait suivant la réaction :



Le principe du calcul de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) est basé sur le rapport (dit facteur de conversion) C₂H₄/N₂ fixé. Il est généralement admis que ce rapport est de 3/1 bien qu'il soit très variable, car, la réduction de l'azote est couplée d'une production d'H₂, utilisant une partie de l'énergie destinée à la fixation d'azote. Ce rapport varie également suivant les conditions d'incubation et, l'expérience montre qu'il peut être compris entre 0,6 et 6,2 sans qu'on puisse l'expliquer (Minchin *et al.*, 1983). Pour limiter l'incertitude et obtenir des résultats comparables, toutes les mesures d'ARA sont effectuées dans des conditions standardisées et aux mêmes heures de la journée.

Les racines de riz sont coupées et introduites dans un flacon fermé de façon étanche. L'acétylène est injecté à la concentration finale de 10% dans ce flacon. Des échantillons gazeux de 0,5 ml sont prélevés après 30 minutes et 60 minutes, et la quantité d'éthylène présent dans l'échantillon est mesurée par chromatographie en phase gazeuse en utilisant un chromatographe de type Varian Aerograph série 1400, équipé d'une colonne de type sphérosil XOB hydrogène 075 en acier inoxydable 120 cm x 0,02 cm.

Les gaz apparaissent au niveau du détecteur dans l'ordre méthane, éthylène, propane et acétylène. Les débits (azote : 40 ml/min ; hydrogène : 30 ml/min et air : 360 ml/min) et températures (injecteur : 60°C, four colonne : 75°C et détecteur :

120°C) sont ajustés de manière à obtenir une séparation correcte des constituants du mélange gazeux injecté, avec un temps de rétention minimal.

IX.3. Mode de calcul de la quantité d'éthylène

La conversion des hauteurs de pics en nmoles de C₂H₄ se fait par référence à un étalon standard. Une dilution étalon d'éthylène est préparée par l'introduction de 0,57 ml d'éthylène dans un flacon hermétique de 570 ml (dilution 1/1000). La concentration de cette dilution étalon est de 10⁶/22400 nmoles de C₂H₄/ml.

$$\frac{10^6 \times 0,5}{22400} \times \frac{1}{h \times A} \text{ nmoles de C}_2\text{H}_4 / \text{cm de pic}$$

L'injection au chromatographe de 0,5 ml de cette dilution donne un pic de hauteur : h x A. (h = pic de mesure en cm ; A = facteur d'atténuation). Les hauteurs des pics sont proportionnelles aux quantités injectées et un pic de 1 cm correspond à :

Pour un échantillon de volume V (ml) dont on a injecté un volume v (ml) au chromatographe et qui donne un pic de X = h_i x A_i, la quantité d'éthylène totale est donc :

$$\frac{10^6 \times 0,5}{22400} \times \frac{1}{h \times A} \times h_i \times A_i \times \frac{V}{v} \text{ nmoles de C}_2\text{H}_4$$

H = hauteur du pic standard en cm ; h_i = hauteur du pic C₂H₄ en cm ; A = atténuation due au témoin standard ; A_i = atténuation due à l'échantillon ; V =

volume du flacon d'incubation en ml; v = volume injecté dans le chromatographe (0,5 ml).

X. Caractérisation et quantification des pigments bactériens

X.1. Extraction des caroténoïdes

Un mélange acétone-MeOH (7:2, v/v) est ajouté aux culots bactériens (environ 3 volumes de solution pour 1 volume de culot) et laissé à 4°C et à l'abri de la lumière pendant 30 à 60 min. L'extrait est alors centrifugé (8000 g, 10 min) et le surnageant, qui contient les pigments, est récupéré. L'extraction est répétée plusieurs fois jusqu'à décoloration complète du culot. Lorsque l'extraction est difficile par le mélange acétone-MeOH, ce qui est le cas pour les souches ORS408, ORS2006 et ORS2013, le solvant utilisé est alors un mélange chloroforme-MeOH (1:2, v/v). Une solution concentrée de NaCl est ajoutée (5% en final) au surnageant. Les caroténoïdes sont ensuite extraits une fois par l'hexane dans une ampoule à décanter. La phase hexane est récupérée.

Les traces d'eau qui peuvent être présentes sont éliminées par l'addition de Na_2SO_4 . Après filtration sur papier, la solution d'hexane est concentrée (rotavapor BUCHI) jusqu'à un très petit volume. L'extrait est conservé ainsi à 4°C, à l'abri de la lumière.

X.2. Détermination structurale des caroténoïdes

La structure des caroténoïdes a été déterminée par plusieurs méthodes complémentaires entre elles.

X.2.1. Chromatographie sur couche mince

L'extrait obtenu précédemment est déposé sur une plaque de CCM (plaque d'aluminium, silice Si60, MERCK N°5553, sans indicateur fluorescent). Les caroténoïdes sont visualisés après élution de la plaque par un solvant CH₂Cl₂/AcOEt (95:5, v/v). Les divers caroténoïdes se séparent pour former des bandes visibles de couleur variable. Par comparaison des R_f et par co-élution avec des témoins du commerce, les caroténoïdes peuvent ainsi être identifiés. La canthaxanthine, le β-carotène, le β-apo-8' caroténal, le lycopène, l'asthaxanthine, et la zéaxanthine, ont été fournis par la société Hoffman-Laroche (Bâle, Suisse). Le témoin isozéaxanthine est synthétisé par réduction de la canthaxanthine par le borohydrure de sodium (cf. Méthodes chimiques, "réduction")

X.2.2. Spectrophotométrie UV/VIS

Après grattage de la silice dans la zone correspondant aux différentes bandes obtenues en CCM, les caroténoïdes sont extraits par du méthanol et la silice est éliminée par centrifugation. Le spectre d'absorption de ces molécules est ensuite enregistré à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS Beckman DU40. Les longueurs d'onde à absorbance maximale (λ_{\max}) correspondants sont alors comparés à ceux de la littérature (Foppen, 1971), afin de proposer une structure éventuelle.

X.2.3. Méthodes chimiques

- Réduction : L'addition de quelques cristaux de NaBH_4 en présence de méthanol (Krinisky et Goldsmith, 1960), sur le caroténoïde purifié permet de vérifier si la molécule contient des groupes cétoniques.

- Acétylation : Les groupements hydroxyles secondaires sont mis en évidence par réaction d'acétylation (Ungers et Cooney, 1968). Après évaporation à sec du méthanol (voir spectrophotométrie UV/VIS), le caroténoïde est repris par 500 μl d'un mélange pyridine/anhydride acétique (50:50, v/v). Après incubation pendant 8 h à 25°C et à l'abri de la lumière, le mélange réactionnel est évaporé à sec et repris par de l'hexane. Un aliquot du produit obtenu et du produit de départ sont ensuite déposés sur une plaque CCM de Si60 éluée ensuite par $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (95:5, v/v). Le R_f obtenu est comparé à celui du produit non acétylé.

- Méthylation : Les groupements hydroxyles peuvent également être méthylés. Le caroténoïde sec est dissout dans 500 μl de MeOH et 8 μl de HCl 12 N (concentration finale 0,2 N). Après 10 min, le spectre visible de la solution est enregistré de 400 à 600 nm.

- Calcul du coefficient de partage : La présence ou non de certains groupements fonctionnels dans la structure d'un caroténoïde peut être confirmée par la détermination du coefficient de partage de la molécule entre deux solvants non miscibles tels que l'hexane et le méthanol à 95% (Petracek et Zechmeister, 1956). Le caroténoïde purifié par CCM et en solution dans le méthanol (cf. Spectrométrie UV/VIS) est évaporé à sec, puis repris par 1 ml de MeOH 95%. La densité optique A_1 est alors mesurée au λ_{max} du caroténoïde. 1 ml d'hexane est ajouté à la solution précédente et le mélange est agité vigoureusement et laissé au repos 2 min. La phase méthanolique est récupérée et l'absorbance (A_2) mesurée à nouveau. Le coefficient

de partage du caroténoïde est déterminé par le rapport A_1/A_2 . La valeur trouvée est alors comparée à celles répertoriées dans les tables de Foppen (1971).

X.3. Quantification des pigments bactériens

Le dosage des pigments s'effectue directement à partir de l'extrait obtenu dans le mélange acétone/méthanol. Le spectre d'absorption de l'extrait est enregistré à l'aide du spectrophotomètre BECKMAN DU40 de 300-350 à 900 nm.

X.3.1. Bactériorhodospirine

La concentration en bactériorhodospirine *a* (Bchl *a*), visualisée principalement à 770 nm (Eimhjellen *et al.*, 1963), est calculée par la loi de Beer-Lambert. Le coefficient d'extinction molaire est de $76 \text{ mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Clayton, 1966). La teneur en Bchl *a* est exprimée en nmoles/mg de matière sèche.

X.3.2. Caroténoïdes

La teneur en caroténoïdes totaux est déterminée par la formule suivante (Liaaen-Jensen et Jensen, 1971): $Q \text{ (mg)} = DO \times V \times 10/2500$ où DO = densité optique mesurée au λ_{max} , V = volume de l'extrait total en ml, 2500 = e moyen des caroténoïdes, Q (mg) étant exprimée en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche.

X.3.3. Canthaxanthine

La canthaxanthine (Rf 0,48) est purifiée par chromatographie sur couche mince. Les isomères de la canthaxanthine (Rf 0,37 et 0,26) sont également pris en compte pour la détermination de la canthaxanthine totale. Le spectre d'absorption est enregistré dans le méthanol. Le calcul de la concentration s'effectue par la loi de Beer-Lambert en prenant une valeur de 2200 cm^{-1} pour le coefficient d'absorption (Liaaen-Jensen et Jensen, 1971).

X.3.4. Matière sèche bactérienne

Quarante ml de culture bactérienne sont centrifugés (10.000 g, 15 minutes) dans 2 tubes Corex préalablement pesés. Le surnageant est alors éliminé et les tubes contenant le culot bactérien sont placés dans une étuve à 100°C pendant 6 heures. Les tubes sont pesés et la quantité de matière sèche, exprimée en mg/ml de culture, est déterminée en faisant une moyenne sur deux cultures différentes.

XI. Analyse des protéines cellulaires totales par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS

XI.1. Principe

Il est basé sur la séparation des protéines totales d'une souche par électrophorèse en présence d'un composé dénaturant chimique, le Sodium Dodécyl Sulfate. Il est nécessaire de disposer d'au moins 80 mg de biomasse bactérienne de chaque souche pour réaliser l'électrophorèse d'extraits protéiques bactériens.

XI.2. Protocole

XI.2.1. Culture des bactéries

Pour une bonne reproductibilité du système permettant l'étude comparative des souches bactériennes, le milieu de culture doit être riche et tamponné, afin d'optimiser la croissance bactérienne dans des conditions de pH constant pendant la durée de la culture. Les cultures bactériennes ont été faites sur milieu TY tamponné. Sur ce milieu, les bactéries produisent peu de polysaccharides gênant pour l'extraction des protéines. Une quantité de bactéries correspondant à une öese de platine est inoculée sur milieu TY tamponné gélosé incliné en tubes de verre. Ce procédé est répété à chaque fois que la culture stock sur TY est âgée de plus d'une semaine.

XI.2.2. Production de biomasse bactérienne

Au bout de 72 heures, la culture bactérienne sur TY incliné (5 ml de gélose/tube) est homogénéisée dans 3 ml de solution de tampon phosphate stérile 0,01 M, pH 7. Cette suspension est employée pour inoculer des milieux TY tamponnés gélosés stériles en boîtes de Petri. L'inoculum est uniformément réparti à la surface de l'agar, puis les boîtes sont incubées pendant 48 à 72 heures à 28°C.

XI.2.3. Récolte des bactéries

Les bactéries sont récoltées en fin de phase exponentielle de croissance dans une suspension de tampon phosphate de sodium 0,01 M, pH 7,3 (tampon NaPBS), et centrifugées pendant 10 min à 10.000 rpm (Sorvall RC2B, rotor type SS34) après

avoir été filtrées sur une gaze de coton. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois dans le même tampon ; remise en suspension, elles sont récoltées par centrifugation à 15.000 rpm, 2 fois successivement.

XI.2.4. Extraction des protéines bactériennes

Au moins 80 mg de la biomasse bactérienne de chaque souche est mise en suspension (dans des tubes Eppendorf) dans un volume de 0,9 ml de tampon STB (0,062 M Tris HCl, pH 6,8 contenant 5% (v/v) de mercaptoéthanol et 5% (p/v) de sucrose).

La lyse des cellules se fait par addition de 0,1 ml de SDS 20% et chauffage des échantillons à 95°C pendant 10 min. Les extraits protéiques sont alors refroidis dans la glace et centrifugés pendant 10 min à température ambiante. Le surnageant est partagé en deux parties. La partie majeure est conservée à -80°C, et la partie mineure pour l'usage courant est placée à -20°C.

XI.2.5. Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide

Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE), en présence de SDS selon le protocole de Laemmli (1970), légèrement modifié (Kiredjian *et al.*, 1986), sur des appareils de type Hoefer SE ou LKB 2001 (gels verticaux).

XI.2.6. Analyse des profils protéiques

Les profils électrophorétiques sont comparés aux profils de souches de référence à l'aide du logiciel GelCompar 4.2 qui permet la saisie, la standardisation, la

normalisation et le stockage des données (Kerstens, 1985 ; Vauterin et Vauterin, 1992). Un densitomètre (type Ultrascan Laser LKB 2202, programme Gel-Scan) connecté à un ordinateur PC compatible permet la mémorisation des bandes de protéines suivie de leur digitalisation et de leur stockage (Programme GelCompar, Vauterin et Vauterin, 1992). La normalisation des profils est faite par rapport à celui de la souche de *Psychrobacter immobilis* LMG1125, standard choisi pour son profil protéique constitué de bandes nettement séparées et réparties sur toute la longueur du gel. Cette étape de normalisation permet de corriger d'éventuelles différences de conditions de migration résultant des aléas expérimentaux. La similarité entre les profils des différentes souches bactériennes comparées deux à deux est ensuite calculée et exprimée en pourcentage par conversion du coefficient de corrélation de Pearson (r) qui tient compte de la densité optique des profils d'ADN (Häne *et al.*, 1993). Les résultats obtenus sont ensuite intégrés et présentés sous forme de dendrogramme UPGMA (Unweighted Pair Group Method Average). Dans ce type de dendrogramme, la distance entre deux groupes est définie comme étant la moyenne des distances calculées entre chaque paire d'individus appartenant aux deux groupes (Everitt, 1993).

XII. Analyse comparative des profils de restriction de l'ADNr 16S

Les images des gels scanés sont ensuite digitalisés sous format TIFF et conservés sous support informatique grâce à la carte IRIS Video Digitizer et le logiciel Colovivion (Inside Technology, Amersfoot, Hollande). Ces images sont analysées par le logiciel Gel Compar version 4.2 (Vauterin et Vauterin, 1992) en utilisant le coefficient de similarité de Dice. L'indice de Dice corrélant les profils électrophorétiques deux à deux tient compte de la présence ou de l'absence des

fragments. Les résultats sont présentés sous forme de dendrogramme UPGMA (Unweighted Pair group Method Average).

XIII. Extraction d'ADN

XIII.1. Extraction d'ADN génomique total (Sambrook *et al.*, 1989)

XIII.1.1. Lyse des cellules bactériennes

Après centrifugation de 5 ml de culture bactérienne en phase stationnaire, le culot est lavé une fois (10 minutes à 14000 rpm) avec 5 ml de TE (tampon Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) avant d'être repris par 500 µl de TE contenant du lysosyme à 1 mg/ml, ce qui détruit la paroi bactérienne. Le mélange est incubé à 37°C pendant 30 minutes. Le volume de TE additionné de lysosyme peut varier en fonction de la concentration de la suspension bactérienne, celle-ci devant rester fluide.

Pour dénaturer les protéines bactériennes, on ajoute au mélange 30 µl de SDS 10% et 10 µl de protéinase K à 20 mg/ml. Après une nuit d'incubation à 37°C, on améliore la lyse par 20 µl de SDS 10% suivi d'inversions lentes, puis 130 µl de NaCl 5 M, suivi d'une forte agitation. L'addition d'une solution de NaCl permet de dissocier les protéines des acides nucléiques (du fait de la forte concentration en sel).

XIII.1.2. Déprotéinisation

Le lysat est ensuite extrait deux fois par 700 µl de phénol-chlorophorme-alcool isoamylique (25 :24 :1) puis, deux fois au chlorophorme-alcool isoamylique

(24 :1 v/v). Entre chaque extraction, une centrifugation (5000 g, 10 minutes) est effectuée.

Le chloroforme dénature les protéines et l'alcool isoamylique diminue la formation de mousse durant l'agitation, aide à la séparation de l'ADN des protéines et maintient la stabilité de l'interphase protéique.

XIII.1.3. Précipitation

L'ADN est ensuite précipité par l'addition de 70 μ l d'acétate de sodium 3 M à pH 5,2 et 1 ml d'isopropanol. Après centrifugation (5000 g, 10 minutes), le liquide est écarté délicatement et l'ADN est lavé à l'éthanol 70%. L'éthanol est retiré et l'ADN séché à l'air libre, à température ambiante. Il est finalement repris dans 50 μ l à 100 μ l (selon la quantité d'ADN obtenu) de Tris 10 mM.

XIII.1.4. Traitement à la ribonucléase

L'ADN est ensuite traité à la RNase (10 μ l de RNase à 0,4 mg/ml pour 150 μ l de solution d'ADN génomique). Après l'incubation du mélange à 37°C pendant 2 heures, l'ADN est précipité avec 10 μ l d'acétate de sodium 3 M à pH 5,2 et 200 μ l/ml d'éthanol absolu. Le culot est lavé à l'éthanol 70% puis repris dans du Tris 10 mM et conservé dans des microtubes à +4°C jusqu'à dissolution complète, ensuite à -20°C avant d'être utilisé

XIII.1.5. Contrôle de la pureté de l'ADN

Le spectre d'absorption des solutions d'ADN est enregistré à l'aide du spectrophotomètre UV/VIS BECKMAN DU40 dans des cuves en quartz de 1 cm de

trajet optique. Les valeurs d'absorbance à 230, 260, 280 et 320 nm sont relevées. Pour contrôler la pureté de l'ADN en suspension, il faut vérifier que :

$$\alpha = \frac{DO_{260} - DO_{320}}{DO_{280} - DO_{320}} \quad \text{est compris entre 1,8 et 2.}$$

Une valeur inférieure indique une contamination par des protéines.

Le rapport

$$\beta = \frac{DO_{260} - DO_{320}}{DO_{230} - DO_{320}} \quad \text{doit être compris entre 2 et 2,3.}$$

Une valeur supérieure traduit la présence d'ARN et/ou de nucléotides libres.

La densité optique à 260 nm est corrélée à la concentration en ADN de la solution; il est généralement admis qu'une solution d'ADN de concentration égale à 50 µg/ml a une densité optique de 1. La quantité d'ADN est donc déterminée de la manière suivante : $Q_{ADN} (\mu\text{g/ml}) = 50 \times (DO_{260} - DO_{320}) \times 1/\text{dilution}$.

XIII.2. Extraction d'ADN plasmidique

Les souches d'*Escherichia coli* sont cultivées pendant 12 heures à 37°C sur milieu LB liquide additionné de l'antibiotique nécessaire. Les plasmides sont extraits à partir de 10 ml de culture avec le kit d'extraction PROMEGA Wizard *plus* SV Minipreps utilisant un principe de purification sur microcolonnes.

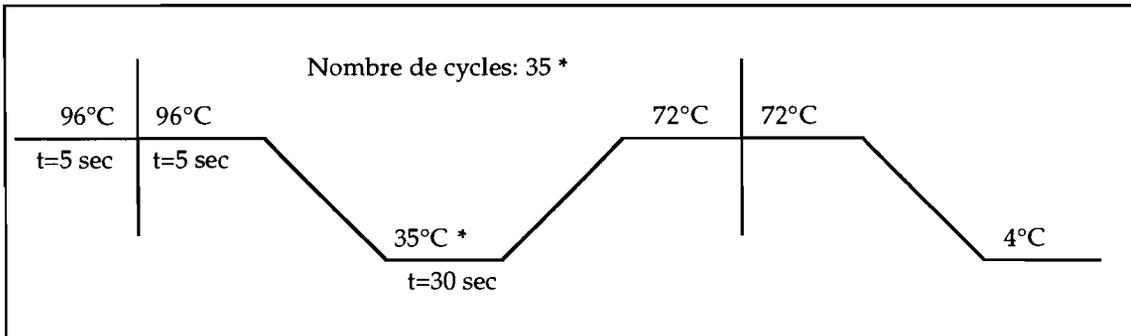


Figure 1: Programme PCR classique.

Le cycle passant de 96°C (dénaturation ADN-amplifié) à 35°C (hybridation amorce) puis 72°C (élongation de l'amorce) est répété 35 fois.

* La température d'hybridation des amorces et le nombre de cycles dépend de la T_m des amorces.

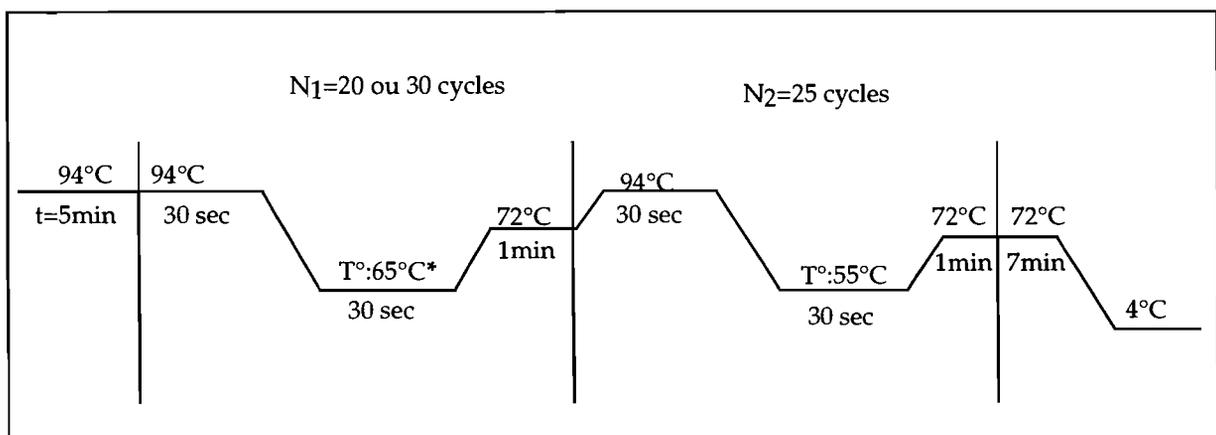


Figure 2: Programme PCR "Touch down".

* indique une baisse de 0,5°C à chaque cycle et durant les 20 ou 30 cycles, permettant ainsi de tester toute une gamme de température pour l'hybridation des amorces. Les températures d'hybridation dépendent du T_m des amorces.

Abréviations: N: nombre de cycles; t: temps, T°:température; sec: secondes; min: minutes.

XIV. Amplification par PCR de l'ADN

La technique de PCR nécessite la connaissance d'une partie de la séquence des régions qui délimitent le segment de DNA à amplifier.

Les PCR ont été réalisées avec un thermocycleur Perkin Elmer Applied Biosystems: Gene Amp PCR system 2400.

Nous avons utilisé selon les cas différents programmes de PCR (Figure 1 et 2). Le programme " Touch down " est souvent nécessaire lorsque les couples d'amorces utilisés sont dégénérés. La " Touch down " regroupe deux séries de cycles, ce qui permet de tester toute une gamme de températures pour l'hybridation des amorces lors d'une première série de cycles, puis une seconde série permet d'amplifier les fragments d'ADN obtenus lors de la première série.

XIV.1. Préparation du mélange d'amplification

L'enzyme utilisée est la Taq polymérase.

L'amplification est réalisée dans un volume réactionnel de 25 µl contenant : 2 µl d'ADN matrice (50 ng), 2,5 µl de Tampon 10x concentré (Eurogentec), 1,5 µl de MgCl₂ (25 mM), 2 µl des dNTPS (2,5 mM), 1 µl de chacune des amorces (20 pmol/µl), 0,125 µl de Taq polymérase,(Gibco-BRL) et de l'H₂O pour compléter le volume à 25 µl.

XIV.2. Analyse par électrophorèse de la réaction des produits de PCR

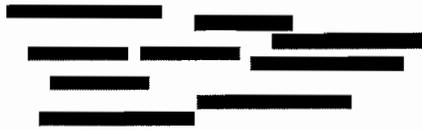
Après chaque PCR, 4 µl du produit amplifié sont prélevés et additionnés à 2 µl de bleu de charge (bleu de bromophénol 0,25%, glycérol 30%, EDTA 10 mM, à

Figure 3. Construction d'une banque d'ADN génomique d'ORS285

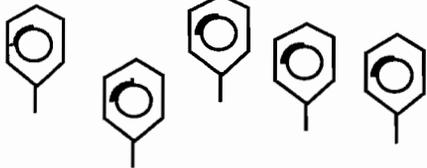
ADN génomique ORS285



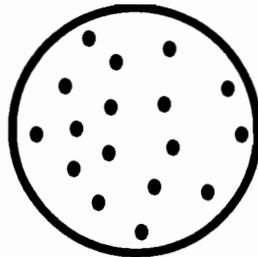
Digestion partielle *Sau3A*
Sélection de fragments de 35-45 kb



Ligation avec le vecteur pCPP47i et
Packaging *in vitro*



Infection dans *E. coli*



Sélection des clones transformants
(sur LB+tétracycline)



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												

Repiquage individuel de
2000 clones en 21
microplaques de 96 puits

pH 8,0). Le mélange est déposé dans des puits de gel horizontal d'agarose (Sigma, type II) à 1% contenant du bromure d'éthidium à 0,5 µg/ml. La migration du gel se fait dans une cuve d'électrophorèse (Easy Cast model B₂) contenant du tampon TAE (tris-acetate 40 mM, Na₂-EDTA 1 mM, pH 8,5), sous une tension de 100 volts et une intensité de 35 mA, pendant 2 heures. Le marqueur de taille moléculaire utilisé est le Smart Ladder (Eurogentec). Il permet à la fois de vérifier la taille du fragment amplifié et aussi sa concentration.

XV. Construction d'une banque d'ADN génomique total

La figure 3 résume la technique de construction de la banque d'ADN génomique.

XV.1. Les plasmides

Les plasmides utilisés pour le clonage, les sous-clonages et le séquençage sont : le vecteur SuperCos 1 (Stratagene), Le vecteur pCPP47i (Bauer et Colmell 1997) et le vecteur pUC18 (Eurogentec) (Yanisch-Perron *et al.*, 1985).

Le SuperCos 1 est un vecteur de 7,6 kb, il porte un gène de résistance à la kanamycine (50 µg/ml).

Le pCPP47i est un vecteur conjugatif de 12,3 kb, il porte un gène de résistance à la tétracycline (50 µg/ml). Ce vecteur a l'avantage d'avoir un spectre d'hôte assez large, permettant ainsi l'étude de l'expression des gènes dans les souches bactériennes de *E. coli* et de *Bradyrhizobium*.

Le pUC18 est un plasmide de 2,69 kb qui porte un fragment d'opéron *lacZ* de la b-galactosidase, une courte séquence de clonage multiple ou "polylinker" avec 13 sites de restriction permettant l'insertion de fragments d'ADN et un gène de résistance à l'ampicilline.

XV.2. Méthode de clonage

XV.2.1. Digestion partielle de l'ADN génomique

L'ADN génomique total de la souche ORS285 est partiellement digéré par l'enzyme *Sau3A* (Eurogentec). Cette enzyme de restriction permet une hydrolyse partielle qui coupe l'ADN génomique en fragments se chevauchant, d'environ 35 à 45 kb. Les fragments d'ADN digérés sont séparés sur gel d'électrophorèse et les bandes correspondantes sont découpées à l'aide d'une lame de scapel, puis purifiées selon le protocole Quiagen.

XV.2.2. Préparation du vecteur de clonage

Le vecteur pCPP47i (Bauer et Colmell, 1997) est au préalable linéarisé par l'enzyme de restriction *Sca I* puis, traité à la CIP (Calf Intestinal Phosphatase, d'origine bovine) pour déphosphorylation.

XV.2.3. Ligation et encapsidation

Les fragments sont insérés dans le vecteur pCPP47i par ligation à l'aide de la T4 DNA ligase (Eurogentec, réf. ME-0045-10). Le mélange réactionnel a été incubé

pendant 16 heures à 4°C. Après ligation, les fragments d'ADN sont encapsidés à l'aide du kit Gigapack III Gold (Stratagene) packaging selon les recommandations du fournisseur.

XV.2.4. Transformation et sélection des clones

Les cellules d'*Escherichia coli* XL1-MR sont ensuite infectées par les particules de phage précédemment encapsidés selon le protocole de Stratagene. Les bactéries transformées sont sélectionnées sur milieu gélosé LB supplémenté de tétracycline (10 µg/ml), résistance portée par le vecteur pCPP47i.

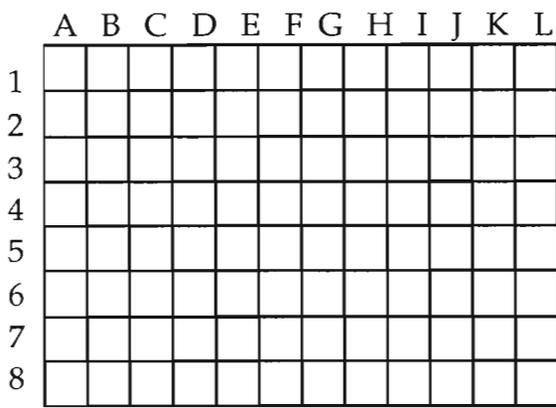
Après une nuit d'incubation à 37°C, les clones résistants à la tétracycline sont retenus. Chaque clone est repiqué dans un puit unique d'une microplaque de Nunc contenant du milieu TYGPN additionné de tétracycline. Nous avons utilisé au total 20 microplaques de Nunc pour 1920 clones. Après une croissance de 16 heures à 37°C sous faible agitation, 150 µl de glycérol 50% sont rajoutés dans chacun des puits. L'ensemble des clones obtenus constitue la banque d'ADN génomique de la souche ORS285 et représente le génome de cette souche. Chaque clone est repéré par le numéro de la microplaque et ses coordonnées. La banque est conservée à - 80°C.

XV.2.5. Criblage de la banque

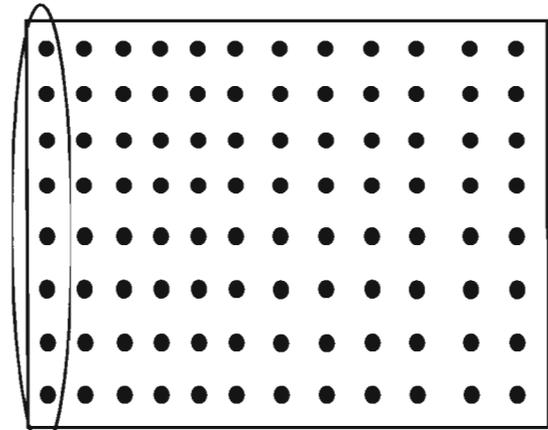
Il s'agit ici de rechercher parmi les 1920 clones, ceux qui possèdent l'ensemble des gènes qui nous intéressent.

Nous avons choisi la méthode de PCR (Polymérase Chain Reaction) pour sélectionner parmi les clones obtenus ceux qui contiennent une partie des gènes impliqués dans la nodulation chez la souche ORS285. Pour cribler la banque, nous avons utilisé le couple d'amorces suivant

Figure 4. Criblage de la banque ORS285 par PCR

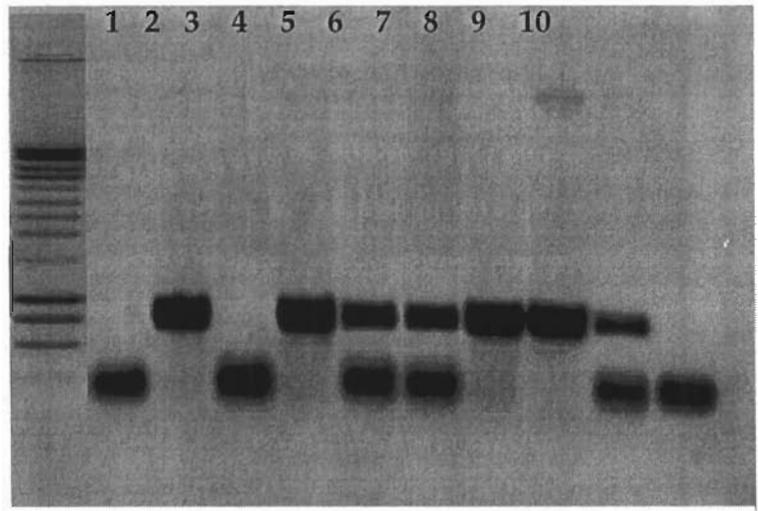


Duplication sur LB agar + kn



1ère étape : Pool des colonies présentes sur microplaque et extraction plasmidique sur 10 microplaques

Recherche par PCR des microplaques donnant produit d'amplification



2ème étape, sur microplaque positive: Pool des colonies présents sur une colonne et recherche par PCR des colonnes donnant un produit d'amplification

3ème étape : Recherche individuel sur colonne positive des clones donnant une amplification par PCR

Conservation des clones et analyse des profils de restriction par hybridation avec sonde homologue

nodAsp285f: 5'-ACGCGCTCCCGTTCATGTCG-3'

nodAsp285r: 5' -GAAATACAAGCACCAACGGC-3'

Ce couple d'amorces a été défini à partir d'alignements multiples de séquences du gène *nod* de la souche ORS285.

On a réalisé pour chaque microplaque une empreinte sur milieu LB gélosé supplémenté de tétracycline. Après une croissance de 16 heures à 37°C, les 96 clones de chaque microplaque sont rassemblés par grattage à l'aide d'un rateau, puis repris par 10 ml d'eau stérile (figure 4). Une extraction d'ADN plasmidique de ces différents pools est ensuite réalisée (selon le protocole du Kit Wizard Plus), suivie d'une amplification par PCR avec le couple d'amorces ci-dessus.

Pour les microplaques contenant le produit d'amplification attendu, chaque colonne est criblée par PCR, puis les colonnes " positives " sont criblées puits par puits. A la fin du criblage on obtient le ou les clones contenant l'insert sur lequel se trouve une partie du gène recherché. Après vérification par PCR de la présence de ce gène, les clones sont conservés dans du glycérol à -80°C.

XVI. Technique d'hybridation sonde froide

L'ADN des fragments à hybrider est digéré par plusieurs enzymes en fonction des sites de restriction qui nous intéressent.

XVI.1. Transfert des fragments d'ADN sur membrane de Nylon

Après avoir fait migrer les fragments d'ADN sur gel d'agarose et visualisé le gel aux UV, le transfert se fait ensuite sur membrane de nylon (Nytran 13N, Schleicher et Schuell, Allemagne).

Le transfert est réalisé sous vide selon le protocole Hybaid. Pendant le transfert, l'échantillon est extrait du gel en plaçant celui-ci en contact avec du papier Whatman. La membrane de nylon intercalée entre le gel et le papier Whatman fixe les brins d'ADN sortant du gel.

Après le transfert sur membrane de nylon, celle-ci est récupérée en enlevant le papier absorbant et le papier Whatman. L'ADN est alors fixé sur la membrane par irradiation aux UV (312 nm) avec un transilluminateur suivie d'un rinçage pendant 1 min dans du 2 x SSC. La membrane peut être stockée à 4°C pour l'hybridation ultérieure.

XVI.2. Purification et marquage de la sonde

Le produit d'amplification utilisé pour la sonde est purifié selon le protocole (Quiagen). Le marquage de la sonde est réalisé selon le protocole de Boehringer fourni avec le kit DIG high prime DNA labeling and detection stater kit de Boehringer Mannheim (ref. 1585614).

Le principe du marquage de la sonde est l'incorporation d'un déoxyribonucléotide modifié (dig-dUTP) dans l'ADN sonde. Le radical dig (digoxigénine) est un stéroïde qui joue le rôle d'haptène. L'ADN marqué est détecté après hybridation par un anticorps polyclonal anti-DIG-AP qui est lui-même couplé à une enzyme (phosphatase alcaline).

La sonde purifiée sous forme de double brin doit être dénaturée, c'est-à-dire présentée en simple brin pour l'hybridation. L'ouverture du double brin peut s'obtenir par choc thermique, ionique ou chimique. Ici nous avons dénaturé la sonde en la chauffant à 100°C pendant 10 minutes, suivi d'un refroidissement immédiat dans la glace.

XVI.3. Hybridation à l'aide d'une sonde froide

La membrane de nylon est incubée à 68°C pendant 3 heures dans la solution de préhybridation (SSC x 5 ; N Laurylsarkosyl 0,1% ; SDS 0,02% ; agent bloquant 1%), puis celle-ci est renouvelée et la sonde froide dénaturée y est introduite (1 à 5 µl de DIG-High Prime pour 15 ml de solution de préhybridation). La fixation de la sonde, sur l'ADN à reconnaître, s'effectue au cours d'une réaction d'hybridation moléculaire. L'hybridation ici se fait à forte stringence (à 68°C) pendant une nuit, la sonde étant homologue.

Les conditions dans lesquelles se dérouleront la réaction et les lavages, essentiellement la température et la force ionique (concentration en sels) sont particulièrement importantes parce qu'elles déterminent la stringence de l'hybridation. On définit la stringence de la réaction comme étant la rigueur des conditions opératoires utilisées qui vont tendre à éliminer le plus possible des hybridations non spécifiques et atténuer ainsi le bruit de fond. Ainsi on dit que la stringence est élevée lorsqu'on opère à température élevée et à faible force ionique ce qui déstabilise les doubles chaînes. L'hybridation entre un ADN et la sonde utilisée est donc d'autant plus spécifique que l'incubation, et surtout les lavages suivants ont été effectués à forte stringence.

XVI.4. Les lavages de la membrane

Après l'incubation, la membrane est lavée à température ambiante deux fois avec la solution I de lavage (SSC x 2 ; SDS 0,1%) puis deux fois pendant 15 minutes à 65 °C avec la solution II de lavage (SSC x 0,1 ; SDS 0,1%).

XVI.5. Procédure de détection

Après un rinçage rapide deux fois pendant trois minutes dans la solution de " Washing Buffer " (acide maléique 0,1 M ; NaCl 0,15 M ; pH 7,5 ; 3 g de Tween 20), la membrane est incubée pendant 30 minutes à 25°C dans le tampon 2 de détection (acide maléique 0,1 M ; NaCl 0,15 M ; pH 7,5 ; agent bloquant 1%) puis encore 30 minutes à 25°C dans le tampon de détection auquel on a rajouté 1/10000 d'anticorps Anti-DIG-AP conjugate (Boehringer Mannheim). Un rinçage de deux fois 15 minutes dans la solution de " Washing Buffer " est effectué, suivi de 5 minutes d'un prémouillage de la membrane dans le tampon 3 (Tris HCl 0,1 M ; NaCl 0,1 M ; pH 9,5), cette étape favorise l'activation de la phosphatase alcaline AP conjuguée à l'anticorps. La membrane est ensuite égouttée puis, placée dans une pochette en plastique dans laquelle sont déposés 1 ml de CSPD (Boehringer Mannheim). Après 5 minutes, l'excès de CSPD est retiré et la membrane est enveloppée avec du " Saran Wrap ". L'incubation est effectuée pendant 10 à 15 minutes à 37°C dans une cassette photographique. La membrane est enfin exposée avec un film (Kodak) dans la cassette photographique. Le film autoradiographique est développé par le révélateur XL24 (Kodak), puis fixé par la solution AL4 (Kodak).

XVII. Méthode de sous clonage des fragments d'ADN

Les fragments d'ADN issus des différentes digestions sont séparés sur gel d'électrophorèse. Les bandes à sous cloner sont récupérées sous UV (312 nm) en coupant le gel à l'aide d'une lame de scapel. L'ADN est extrait du gel avec le kit " QIAquick Gel extraction " de QIAGEN.

XVII.1. La ligation

La ligation des fragments récupérés du gel se fait dans le vecteur approprié, à l'aide de la T4 DNA ligase (Eurogentec, réf. ME-0045-10) à 4°C pendant toute une nuit selon les recommandations du fournisseur. La ligase virale T4 DNA est extraite de bactéries infectées par le virus T4. Nous avons utilisé le vecteur pUC18 qui a été linéarisé et déphosphorylé.

Le produit de ligation est précipité à l'éthanol absolu (50 µl) en présence de l'acétate de sodium (2 µl d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2). Après une centrifugation de 10 minutes à vitesse maximale, le culot est lavé à l'éthanol 70% puis séché à l'air libre avant d'être repris dans 5 µl d'eau distillée stérile.

XVII.2. Transformation par électroporation

XVII.2.1. Préparation des cellules électrocompétentes

500 ml de culture bactérienne de la souche d'*E. coli* XL1 d'une absorbance comprise entre 0,5 et 0,6 à une DO de 600 nm sont transvasés dans des tubes (Falcon) de 50 ml, puis centrifugés à 4°C pendant 15 minutes à une vitesse de 5000 tours /minutes. Les culots sont remis en suspension dans de l'eau à 4°C, puis centrifugés dans les mêmes conditions. Deux lavages sont nécessaires pour éliminer tous résidus provenant du milieu de culture, en particulier les sels responsables de l'apparition d'arcs électriques lors de l'électroporation proprement dite. Les culots réunis dans 2 tubes (Falcon) de 50 ml, sont repris dans 10 ml de glycérol à 10% et centrifugés dans les conditions ci-dessus. Ils sont de nouveau remis en suspension

dans 0,4 ml glycérol à 10% puis répartis dans des tubes Eppendorf à raison de 85 μ l par tube. Les cellules électrocompétentes sont conservées à -80°C .

XVII.2.2. Electroporation

La transformation directe ou par électroporation exploite les propriétés physiques des membranes cellulaires permettant ainsi d'insérer simplement et rapidement de l'ADN exogène dans de nombreux organismes et variétés de lignées cellulaires. Elle consiste en l'exposition d'un mélange (ADN-cellules) à un champ électrique pendant un bref laps de temps, afin de perméabiliser les membranes cellulaires.

5 μ l de produit de ligation sont électroporés dans 40 μ l de cellules électrocompétentes.

L'appareil utilisé est BIO-RAD Gene Pulser. Les conditions utilisées pour l'électroporation sont les suivantes :

Résistance, 200 ohms ; Capacitance, 25 μ F ; Voltage, 1,25 kV ; espacement entre plaques conductrices, 1 mm.

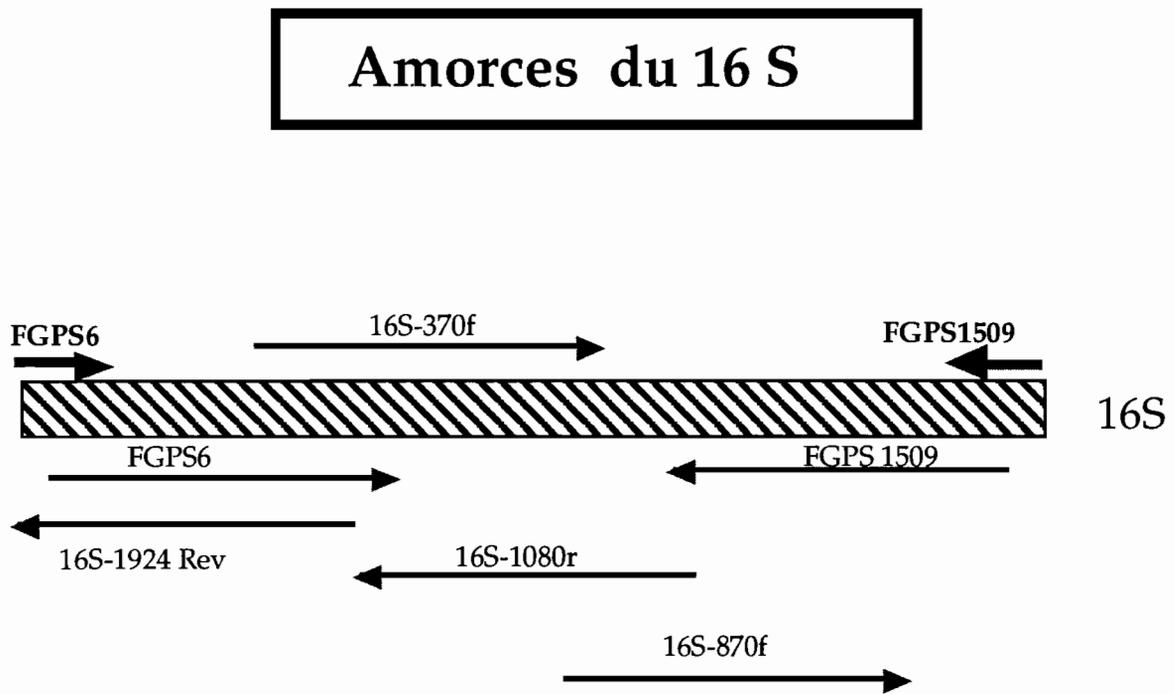
Après l'électroporation, le mélange est récupéré dans 500 ml de milieu LB liquide sans antibiotique et placé sous agitation pendant une heure à 37°C . Les cellules transformées sont étalées (100 μ l) sur un milieu sélectif dans des boîtes de Petri contenant du milieu LB gélosé, de l'ampicilline à 50 mg/ml, (résistance portée par le pUC18), de l'IPTG à 40 μ l/ml (IsoPropylThio-b-D-Galactoside) inducteur de la β galactosidase et de l'X-Gal à 40 μ g/ml (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-Galactoside). Le réactif X-Gal peut être hydrolysé par l'enzyme et libérer en plus du galactose, une substance " X " (5-bromo-4-chloro-3-hydroxy-indole) colorée en bleu. Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C .

Tableau 1. Amorces utilisées pour les réactions de séquençage de l'ADNr 16S.

Amorces	Séquences (5'-3')	Taille (bases)	Références
FGPS6	GGA-GAG-TTA-GAT-CTT-GGC-TCA-G	22	Giraud*
FGPS1509	AAG-GAG-GGG-ATC-CAG-CCG-CA	20	Normand, 1995
16S-370 f	GGC-AGC-AGT-GGG-GAA-TAT-TG	20	Giraud*
16S-870 f	CCT-GGG-GAG-TAC-GGT-CGC-AAG	21	Giraud*
16S-1080 r	GGG-ACT-TAA-CCC-AAC-ATC-T	19	Giraud*
16S-1924 rev	GGC-ACG-AAG-TTA-GCC-GGG-GC	20	Giraud*

* Amorces définies par Eric Giraud, communication personnelle.

Figure 5. Position des amorces internes du gène ADNr 16S.



XVII.3. Sélection des clones recombinants

Après cette incubation, on note l'apparition des colonies bleues et blanches. Les colonies blanches, témoins de la présence de recombinants, seront précieusement recueillies.

Trois à six colonies blanches recombinantes sont sélectionnées et mises en culture individuellement dans 15 ml de milieu LB supplémenté d'ampicilline (100 µg/ml) à 37°C sous agitation durant 12 heures.

A partir d'une culture en phase exponentielle de croissance, les clones bactériens sont congelés à - 80°C après addition de glycérol 50%.

XVIII. Séquençage

Les amorces utilisées pour la réaction de séquences de l'ADNr 16S et leurs positions sont répertoriées dans le tableau 1 et figure 5.

XVIII.1. Principe de la réaction de séquence

Le séquençage des fragments d'ADN produits par PCR est réalisé à l'aide du Sequencing kit, Big Dye terminator Sequencing, Ready Reaction de ABI PRISM (réf : P/N 402078). Le séquençage ici se fait par une méthode automatique d'analyse de la séquence de l'ADN n'impliquant pas de radioisotopes mais une détection par fluorescence. La réaction de séquence consiste à synthétiser une molécule d'ADN complémentaire d'une matrice d'ADN simple brin. Elle se fait par la méthode enzymatique et utilise donc les didéoxynucléotides (ddT, ddA, ddC, ddG) pour bloquer l'activité d'une enzyme thermostable (AmpliTaq DNA Polymérase) sur la

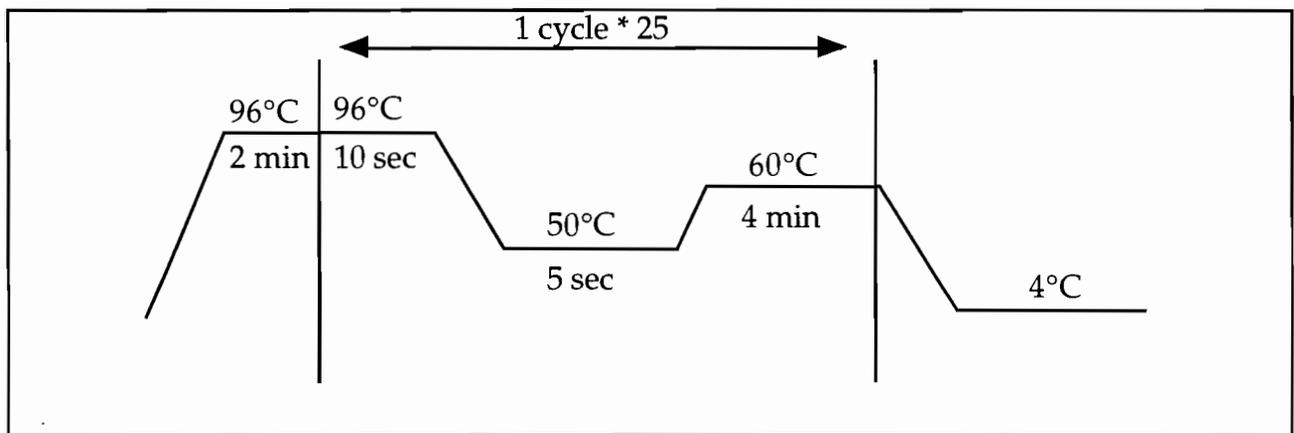


Figure 6: Programme PCR utilisé pour effectuer les réactions de séquences. Le cycle passant de 96°C (dénaturation ADN-amplifié) à 50°C (hybridation des amorces) puis 60°C (élongation de l'amorce) est répété 25 fois.

chaîne en cours d'élongation. La méthode dépend également de la présence de didéoxyribonucléotides triphosphates (ddNTP) qui sont incorporés durant la réaction d'élongation à la place des déoxyribonucléotides (dNTP) conventionnels. Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence du groupe 3'-OH nécessaire à la continuité de l'élongation. Quand le ddNTP est incorporé à la nouvelle molécule d'ADN simple brin, l'absence de groupe hydroxyle empêche la formation de liaison phosphodiester avec le nucléotide suivant : la réaction d'élongation est alors stoppée. L'incorporation du ddNTP étant effectuée au hasard, on génère ainsi toute une série de fragments de différentes longueurs. Les quatre ddNTP sont marqués par des fluorophores différents. Le ddATP est marqué par une fluorescence verte, le ddCTP a une fluorescence bleue, le ddGTP une fluorescence noire et le ddTTP est marqué par une fluorescence rouge.

XVIII.2. Préparation du mélange de la réaction de séquence

Le mélange de la réaction de séquence comprend : 1 µl d'amorce à 3,2 pmoles ; 4 µl de solution de réaction (ddNTP, AmpliTaq DNA Polymerase, FS, rTth pyrophosphatase, MgCl₂, tampon) et 2 µl de tampon 5X (Tris base 400 mM ; MgCl₂·6H₂O, 10 mM ; pH 9). Pour chaque réaction de séquence, on utilise une quantité approximative de 50 ng de produit de PCR. Le volume total de la réaction est ajusté à 20 µl avec de l'eau stérile.

Pour permettre le séquençage de l'ADN dans les deux sens et aussi une répétition de résultats parfois utile, il est nécessaire d'effectuer la réaction avec les deux sens de l'amorce (front et reverse).

Le programme d'amplification de la réaction de séquence est donné dans la figure 6.

XVIII.3. Purification de la réaction de séquence

Les produits issus de la réaction de séquence sont précipités à l'éthanol (50 μ l d'éthanol 95%) en présence de l'acétate de sodium (2 μ l d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2). Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, le mélange est centrifugé pendant 30 minutes à 1400 rpm. Le culot est ensuite lavé avec 250 μ l d'éthanol 70% pendant 30 minutes, puis séché à l'air libre avant d'être repris dans 25 μ l de tampon TSR (Template Suppression Reagent, réf 9812014). Avant de passer l'échantillon dans le séquenceur, il est nécessaire de dénaturer l'ADN pendant 4 minutes à 100°C suivi d'un refroidissement rapide dans la glace.

XVIII.4. Lecture des séquences : détection

Les brins d'ADN sont séparés en fonction de leur taille dans le capillaire par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide haute résolution. Le voltage appliqué dans chaque tube de réaction est de 2,5 kV. Les brins les plus petits sont les premiers à migrer. Les bandes sont repérées lors de leur passage au niveau du système de détection après excitation par un faisceau laser, et un jeu de filtres est alors utilisé pour les différencier d'après leur spectre d'émission. Les fragments d'ADN qui se terminent par A sont porteurs d'un fluorophore vert, ceux par C d'un bleu, ceux par G d'un noir et ceux qui se terminent par T d'un fluorophore rouge.

XVIII.5. Analyse et alignement des séquences

Les séquences obtenues sont corrigées par le logiciel "Sequence Navigator" et comparées selon le logiciel BLAST (Altschul *et al.*, 1997) à la banque de données GenBank par l'intermédiaire du serveur d'Infobiogen.

XIX. Construction d'un mutant *nif*⁻

Pour la construction du mutant *nif*⁻ d'ORS278, un fragment *Bgl* II de 3,6 kb du clone STM232, contenant les gènes *nif* de la souche ORS278 est cloné au niveau du site *Bam*H I du vecteur PJQ200mp18. La cassette PKOK5, contenant le gène rapporteur *LacZ* et le gène de résistance à la kanamycine (50 mg/ml) libérée par digestion avec l'enzyme *Sal* I est alors introduite au niveau du site *Xho* I du plasmide précédemment construit. Le plasmide résultant, qui contient le gène suicide *Sac* B est transféré après conjugaison (voir ci-dessus) dans la souche d'*Escherichia coli* S17 1 pour la mobilisation dans la souche ORS278. Après conjugaison, les colonies poussant sur milieu YMA contenant la Kanamycine (50 mg/ml), l'acide nalidixique (10 mg/ml dans du NaOH 0,05 N) et de l'*X*-Gal (40 µg/ml), sont repiquées sur un milieu YMA supplémenté de 5% de sucrose et de kanamycine (50 mg/ml) Les colonies résistantes au sucrose sont alors "screenées" par PCR pour vérifier que l'événement du double crossing-over a bien eu lieu.

La structure génomique du mutant a été par ailleurs vérifiée par hybridation de l'ADN chromosomique avec des sondes appropriées.

NB : Les conjugaisons sont réalisées en faisant un mélange de 10 ml d'une culture de 3 jours d'ORS278 et 2,5 ml d'une culture " Over Night " de la souche d'*E. coli* S17 1 contenant le plasmide à transférer. Le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à vitesse maximale et le culot est remis en suspension dans environ 600 µl de milieu YM. Sur des boîtes de Petri contenant du YMA on dépose environ 200 µl de suspension bactérienne. Les boîtes sont placées à l'étuve à 37°C pendant 2 ou 3 jours. Les gouttes sont ensuite récupérées avec une öese de platine puis, remises en suspension dans 1 ml d'eau stérile. Les différentes dilutions sont étalées sur milieu YMA supplémenté de kanamycine (50 mg/ml), l'acide nalidixique (10 mg/ml dans du NaOH 0,05 N)et de l'X-Gal.

CHAPITRE I:

**Caractérisation des *Bradyrhizobium* Photosynthétiques
associés au riz sauvage *Oryza breviligulata***

A. INTRODUCTION

La zone sahélienne est sûrement l'une des seules régions au monde où il est possible de trouver dans les mares temporaires deux espèces de riz sauvage *Oryza breviligulata*, espèce annuelle et *Oryza longistaminata* ainsi que plusieurs variétés de riz cultivé comme *Oryza glaberima* et *Oryza sativa* cohabitant avec des légumineuses aquatiques telles que *Aeschynomene sensitiva*, *A. indica*, *Sesbania rostrata*. La cohabitation du riz avec ces légumineuses aquatiques dans les régions du Sahel, représente donc des conditions très favorables à l'infection naturelle du riz par les rhizobiums symbiotes de ces légumineuses. C'est sur la base de cette observation que nous avons été amenés à rechercher la présence de rhizobiums à l'intérieur des racines de riz sauvage *Oryza breviligulata*.

Pour cela, des plants de riz sauvage ont été collectés dans les mares temporaires des régions du Sénégal et de Guinée. Nous avons essayé d'isoler des souches bactériennes à partir des racines désinfectées du riz, en utilisant comme « plantes piège » *Aeschynomene indica*, *A. sensitiva*, *A. afraspera*, *Sesbania rostrata* et *Faidherbia albida*. Ce « piégage » nous a permis de constituer une collection de 13 souches bactériennes isolées des racines de riz. Par ailleurs, 7 souches ont été isolées directement à partir de l'eau de mare où pousse ce riz sauvage. Les populations naturelles de souches bactériennes ont été évaluées par la méthode du nombre le plus probable (MNP).

L'étude des propriétés symbiotiques, du caractère photosynthétique ainsi que l'étude taxonomique basée sur l'analyse des profils protéiques en SDS-PAGE, et sur

l'analyse ARDRA de l'ADNr 16S ont été entreprises sur l'ensemble des nouveaux isolats. L'étude taxonomique a été réalisée en étroite collaboration avec l'équipe de M. Gillis au Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Gand (Belgique).

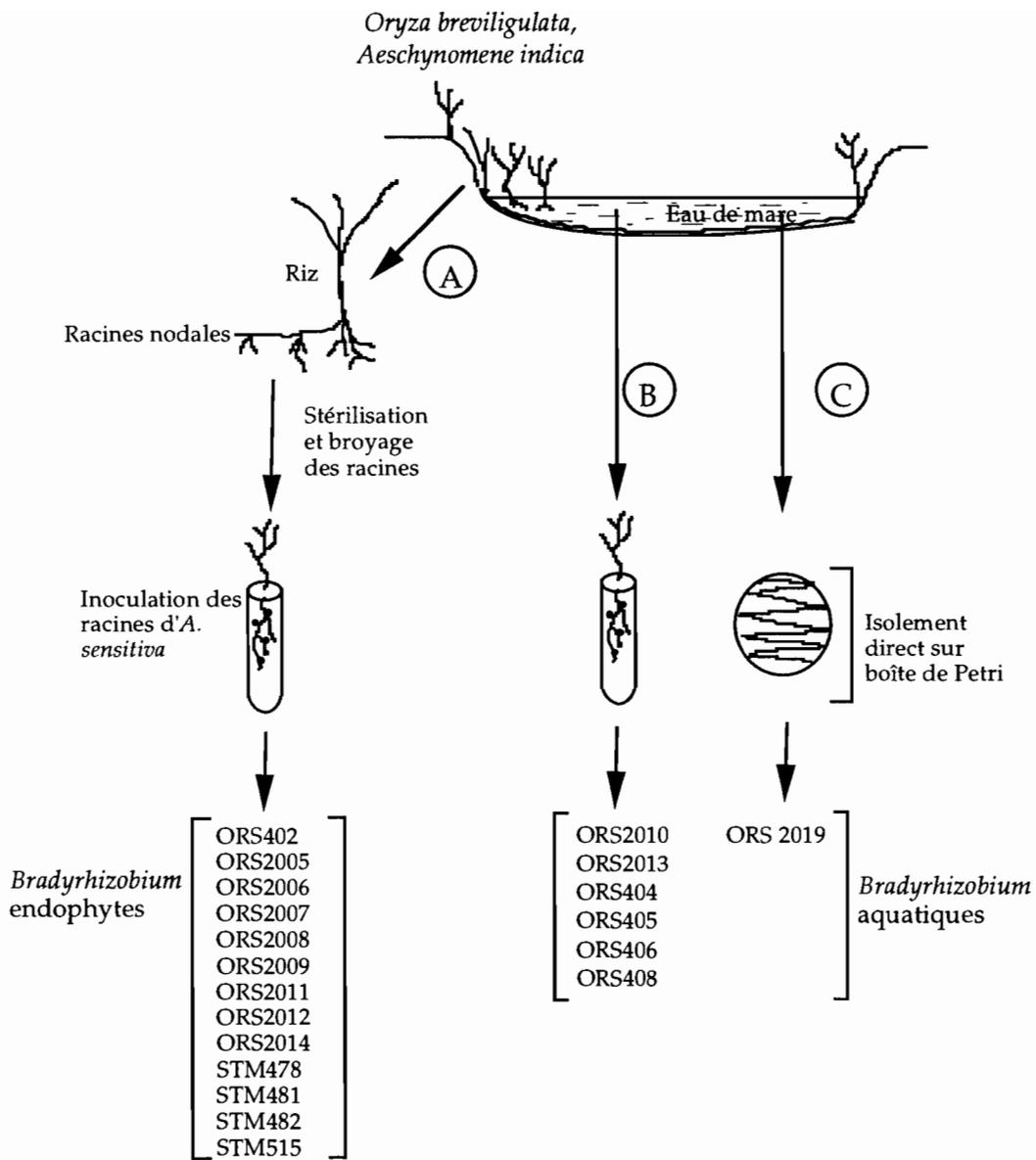


Figure 1. Isolement des bactéries endophytes du riz et de ceux présents dans l'eau de mer

B. RESULTATS

1. Isolement des rhizobiums

1.1. Isolement par piégeage des rhizobia présents dans les racines du riz sauvage *Oryza breviligulata*

La recherche de rhizobiums endophytes du riz sauvage *Oryza breviligulata* a été faite en utilisant un « piégeage » (voir matériel et méthodes) qui est une technique de base utilisée en rhizobiologie. 3 plantes ont été testées :

- *Aeschynomene sensitiva* et *Sesbania rostrata* qui sont retrouvées à proximité immédiate du riz sauvage et qui sont connues pour être spécifiquement nodulées par des *Bradyrhizobium* photosynthétiques pour les *Aeschynomene*, par *Azorhizobium caulonodans* ou *Sinorhizobium saheli* et *S. teranga* pour *Sesbania rostrata*.

- *Faidherbia albida* ou *Acacia albida*, arbre sahélien qui pousse également à proximité des rizières au Sénégal. Cet arbre connu pour avoir un large spectre d'hôte et être ainsi nodulé indifféremment par différentes espèces de *Bradyrhizobium*.

Seule l'inoculation des racines et des tiges d'*A. sensitiva* avec un broyat de racines de riz a permis d'obtenir des nodules. 13 rhizobia endophytes (ORS402, ORS2005, ORS2006, ORS2007, ORS2008, ORS2009, ORS2011, ORS2012, ORS2014, STM478, STM481, STM482, STM515) ont pu être ainsi isolées de ces nodules (figure 1, voie A).

Nous n'avons obtenu aucun nodule sur les racines de *S. rostrata* et de *F. albida*.

1.2. Isolement des rhizobia de l'eau de mare

Six rhizobia aquatiques (ORS404, ORS405, ORS406, ORS408, ORS2010 et ORS2013) ont été isolées des nodules d'*Aeschynomene sensitiva* préalablement inoculées par de l'eau de mare où sont retrouvés le riz sauvage et différentes légumineuses. (Figure 1, voie B). Par ailleurs, une souche ORS2019 a été isolée en étalant directement de l'eau de mare sur boîte de Pétri (figure 1, voie C). Cette souche a été sélectionnée par sa capacité à former des colonies jaune-orange et à noduler les racines d'*A. sensitiva*.

Ces souches présentent une croissance lente sur milieu YMA (apparition des colonies pigmentées après 3 à 4 jours de culture sur boîte de Pétri) suggérant ainsi qu'il s'agit de *Bradyrhizobium*.

2. Numération des bactéries endophytes du riz sauvage et des bactéries présentes dans l'eau de mare.

Afin de déterminer la distribution des populations de *Bradyrhizobium* se développant dans les racines de riz sauvage et dans l'eau de mare nous avons calculé la densité de population bactérienne par la méthode MPN (Brockwell, 1980).

Cette étude a porté sur un lot de plantes d'*A. sensitiva* inoculées par un broyat de racines désinfectées de riz sauvage, sur un lot de plantes inoculées par un broyat de racines non désinfectées de riz sauvage et sur un lot de plantes d'*A. sensitiva* inoculées par de l'eau de mare où pousse naturellement le riz. Les résultats montrent que, lorsque les racines sont stérilisées la densité de population bactérienne est d'environ 5×10^6 rhizobiums endophytes par gramme de racines ; cette densité augmente jusqu'à $2,5 \times 10^7$ rhizobiums par gramme de racines non désinfectées. Les

Tableau 1. Origine et spécificité de nodulation.

Souches ^a	Origine	Spécificité de nodulation ^b			
		<i>A. elaphroxylon</i> Groupe I	<i>A. afraspera</i> Groupe II	<i>A. sensitiva</i> - <i>A. indica</i> Groupe III	<i>Faidherbia albida</i>
Nouveaux isolats					
ORS 402	Racines	0	0	E	0
ORS 404	Eau	0	0	E	0
ORS 405	Eau	0	0	i	0
ORS 406	Eau	0	0	i	0
ORS 408	Eau	0	0	e	0
ORS 2005	Racines	0	0	E	0
ORS 2006	Racines	0	0	E	0
ORS 2007	Racines	0	0	E	0
ORS 2008	Racines	0	0	E	0
ORS 2009	Racines	0	0	E	0
ORS 2010	Eau	0	0	E	0
ORS 2011	Racines	0	0	E	0
ORS 2012	Racines	0	0	E	0
ORS 2013	Eau	0	0	E	0
ORS 2014	Racines	0	0	E	0
ORS 2019	Eau	0	0	E	0
STM 478	Racines	0	0	E	0
STM 481	Racines	0	0	E	0
STM 482	Racines	0	0	E	0
STM 515	Racines	0	0	E	0

^a Abréviations et désignations: ORS, IRD. Collection de souches de l'Institut de recherche pour le Développement, Montpellier, France; STM. Collection de souche du Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, Montpellier, France.

^b 0, pas de nodulation; e, nodulation racinaire peu effective; i, nodulation racinaire ineffective; E, nodulation racinaire effective.

populations bactériennes présentes dans l'eau de mare ont été estimées à $1,1 \times 10^2$ rhizobiums par ml d'eau. Ces résultats suggèrent que la densité de population bactérienne endophyte du riz sauvage est élevée et que, les bactéries nodulant *Aeschynomene* sont également capables de survivre dans l'eau.

3. Caractérisation symbiotique

Les souches isolées des racines d'*Oryza breviligulata* et de l'eau de mare ont été testées pour leur capacité à noduler les différents groupes d'*Aeschynomene*. Elles ont été inoculées sur trois espèces d'*Aeschynomene* représentatives des groupes d'inoculation croisée définie par Alazard (1991) : *Aeschynomene elaphroxylon* (représentante du groupe I), *A. afraspera* (représentante du groupe II), et *A. sensitiva* et *A. indica* (représentante du groupe III) ; ces souches ont aussi été inoculées à *Faidherbia albida*. Nous avons utilisé cette dernière plante pour sa capacité à être nodulée par différentes espèces de *Bradyrhizobium*.

Les résultats des tests de nodulation sont présentés dans le tableau 1. Toutes les souches étudiées montrent une très grande spécificité de nodulation. Aucune d'entre elles ne nodule des plantes à large spectre d'hôte typique des *Bradyrhizobium* classiques comme *Faidherbia albida*, ni les *Aeschynomene* du groupe I et II comme *A. elaphroxylon* et *A. afraspera*. Toutes les souches isolées nodulent uniquement *A. indica* et *A. sensitiva* appartenant au groupe III de spécificité défini par Alazard (1991).

Nous avons par ailleurs vérifié la capacité des souches à former des nodules de tiges sur *A. sensitiva* et *A. indica*. Les résultats ont montré que la majorité des souches isolées produisent des nodules de tige sur ces deux plantes. Par contre les souches ORS405 et ORS406 qui sont de couleur blanche ne produisent aucun nodule de tige sur *A. sensitiva* et sur *A. indica*.

Nous avons également étudié l'aptitude des nouveaux isolats à fixer l'azote en symbiose c'est-à-dire leur effectivité. Les analyses (tableau 1) ont été faites de façon visuelle après inoculation des racines et de tiges de trois espèces d'*Aeschynomene* (*A. elaphroxylon*, *A. afraspera*, et *A. sensitiva*), par comparaison aux plantes non inoculées. 1 mois après l'inoculation, l'observation de la couleur verte des parties aériennes des plantes inoculées et de leur croissance importante, comparativement aux plantes témoins non inoculés de couleur jaunâtre, a été un paramètre indiquant le caractère fixateur des isolats. Toutes les bactéries endophytes du riz sauvage (13 souches), qu'elles soient originaires de Guinée ou du Sénégal, sont effectives uniquement sur *A. sensitiva*, plante associée au groupe III. Parmi les souches isolées à partir de l'eau de mare, donc aquatiques, 4 souches (ORS404, ORS2010, ORS2013 et ORS2019) sont effectives sur *A. sensitiva* et une souche, ORS408 est peu effective. Seules deux souches de couleur blanche (ORS405 et ORS406) isolées à partir de l'eau de mare ne fixent pas l'azote ; elles sont non effectives.

Nos résultats confirment que les souches piégées sur *A. sensitiva* sont très spécifiques et fixent l'azote exclusivement sur les *Aeschynomene* du groupe III.

4. Caractérisation photosynthétique

4.1. Aspect phénotypique

4.1.1. Pigmentation et production de bactériochlorophylle *a*

Nous avons tout d'abord observé la pigmentation des colonies bactériennes après exposition des boîtes de Pétri (milieu YMA) à la lumière intermittente. Ainsi, nous avons noté que 8 souches (ORS404, ORS408, ORS2006, ORS2008, ORS2009, ORS2010, ORS2012 et ORS2013) synthétisent des pigments qui confèrent aux

Tableau 2. Nature et concentration des principaux pigments synthétisés par chaque souche.

Souches	Couleur des colonies	Bchl <i>a</i>	Nombre de caroténoïdes	Caroténoïdes Principaux	Bchl <i>a</i> (nmoles/mg MS)	Caroténoïdes (ng/mg MS)
BTAi1 ^a	R	+	1	Spirilloxanthine	0.67 *	280 *
ORS278 ^a	O	+	7	Canthaxanthine, Spirilloxanthine	0.13 *	1594 *
ORS402	B	-	0	-	-	-
ORS404	R	+	1	Spirilloxanthine	0.067	34.4
ORS405	B	-	0	-	-	-
ORS406	B	-	0	-	-	-
ORS408	R	+	1	Spirilloxanthine	0.061	18.57
ORS2005	O	+	7	Canthaxanthine, Spirilloxanthine	0.034	109.5
ORS2006	R	+	1	Spirilloxanthine	0.017	8.2
ORS2007	O	+	7	Canthaxanthine, Spirilloxanthine	0.065	93.3
ORS2008	R	+	1	Spirilloxanthine	0.036	15.78
ORS2009	R	+	1	Spirilloxanthine	0.055	30.2
ORS2010	R	+	1	Spirilloxanthine	0.018	10.31
ORS2011	O	+	7	Canthaxanthine, Spirilloxanthine	0.066	188.2
ORS2012	R	+	1	Spirilloxanthine	0.0538	24.1
ORS2013	R	+	1	Spirilloxanthine	0.020	11.33
ORS2014	O	+	7	Canthaxanthine, Spirilloxanthine	0.071	86.42
ORS2019	O	+	7	Canthaxanthine, Spirilloxanthine	0.050	151.4

Bchl, Bactériochlorophylle; B, Blanche; R, Rose; O, Orange. ^a, Souches utilisées comme témoin
^{*}, D'après Lorquin *et al.* (1996).

colonies une couleur rose, et 5 souches (ORS2005, ORS2007, ORS2011, ORS2014 et ORS2019) présentent une pigmentation orange (Tableau 2).

Les colonies des souches ORS402, ORS405 et ORS406 restent de couleur blanche quelque soit le temps d'exposition à la lumière. Les mêmes colorations sont obtenues en milieu YM liquide.

Nous avons tout d'abord vérifié que ces souches pigmentées étaient bien des *Bradyrhizobium* photosynthétiques capables de synthétiser de la bactériochlorophylle *a* (Bchl *a*). Pour cela, nous avons analysé les spectres d'absorption d'une souche représentant chaque type de couleur (rose, orange et blanche) dans un mélange acétone-méthanol (7 : 2, v/v).

Les résultats donnés aux Figures 2A et 3A montrent que la Bchl *a* (λ_{\max} 770 nm) est bien présente dans toutes les souches colorées et que ces souches peuvent donc être considérées comme photosynthétiques. Par contre, les souches blanches ORS402, ORS405 et ORS406 ne produisent ni bactériochlorophylle, ni caroténoïdes, le spectre d'absorption après extraction acétone/méthanol ne mettant en évidence aucun pic (résultat non illustré).

4.1.2. Identification des caroténoïdes

4.1.2.1. Souches oranges

Par chromatographie sur couche mince de silice, nous avons montré que les souches oranges synthétisent 7 caroténoïdes différents (Tableau 2). Parmi ceux-ci, le principal composé est la canthaxanthine, ou 4,4'-dikéto- β -carotène, dont la structure est donnée à la Figure 2B. Les données spectrales et physico-chimiques de ce caroténoïde confirment sa structure. Son λ_{\max} (476 nm dans le méthanol) et son Rf

Tableau 3. Données spectroscopiques des caroténoïdes identifiés chez ORS2011 (souche orange).

Composé ^a	Groupe(s) Fonctionnel(s)	Absorbance (lMax (nm) dans MeOH) ^b	Rf ^c	Coefficient de partage ^d
Composé 1	1 C=O	358, 384,(445), 473, (504)	0.65	85 : 15
Composé 1 (réduit)	1 OH	369, 444, 468, 494	-	-
<i>trans</i> -Canthaxanthine	2 C=O	476	0.48	50 : 50
<i>trans</i> -Canthaxanthine (du commerce)	2 C=O	476	0.48	48 : 52
<i>trans</i> -Canthaxanthine (réduite)	2 OH	(428), 452 478	-	22 : 78
9- <i>cis</i> -Canthaxanthine	2 C=O	365 ff 465	0.37	44 : 56
13- <i>cis</i> -Canthaxanthine	2 C=O	365, 463	0.26	43 : 56
Spirilloxanthine	2 OCH ₃	364 384 461, 488 521	0.85	90 : 10
Spirilloxanthine (de <i>Rh. rubrum</i>)	2 OCH ₃	364 384 462, 488 521	0.85	90 : 10
Echinénone	1 C=O	463	0.90	100 : 0
Echinénone (du commerce)	1 C=O	463	0.90	100 : 0
Echinénone (réduite)	1 OH	(425), 452 476	-	85 : 15
Non identifié	-	-	0.93	-

^a Composé 1, non identifié, Canthaxanthine (4,4'-dikéto-β-carotène), Canthaxanthine réduite (ou Isozéaxanthine, 4,4'-dihydroxy-β-carotène), Spirilloxanthine (1,1'-diméthoxy-3,4,3',4'-tétradéhydro-1,2,1',2'-téhydro Y,Y, carotène), Echinénone (4-kéto-β-carotène), Echinénone réduite (ou Isocryptoxanthine, 4-hydroxy-β-carotène).

^b Les longueurs d'onde entre parenthèses indiquent un épaulement plutôt qu'un pic d'absorption. ff, absorbance très faible.

^c TLC: solvant, 5% acétate d'éthyle-95% dichlorométhane, plaques HPTLC silica gel (0,2 mm d'épaisseur).

^d Déterminés dans un système hexane-méthanol (95%) selon Petracek et Zeichmeister (1956). Les valeurs obtenues sont très proches des tables de Foppen (1971).

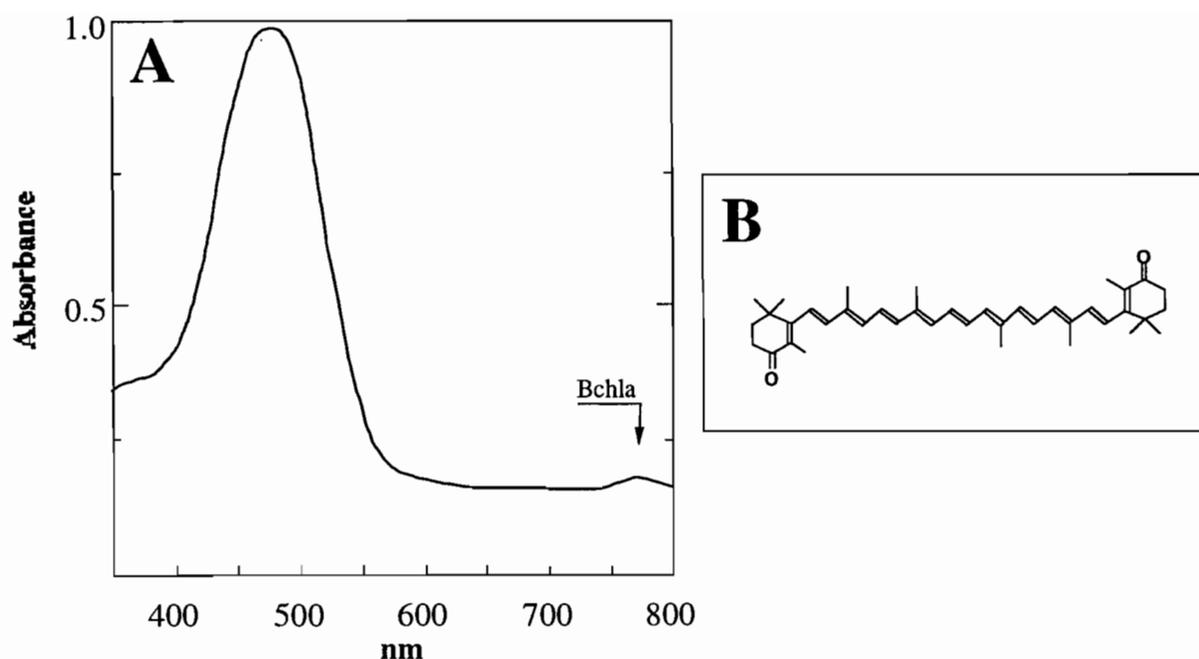


Figure 2. (A) Spectre d'un extrait correspondant à une souche orange, ORS2011. (B) Structure de la canthaxanthine, caroténoïde majeur synthétisé par les souches oranges.

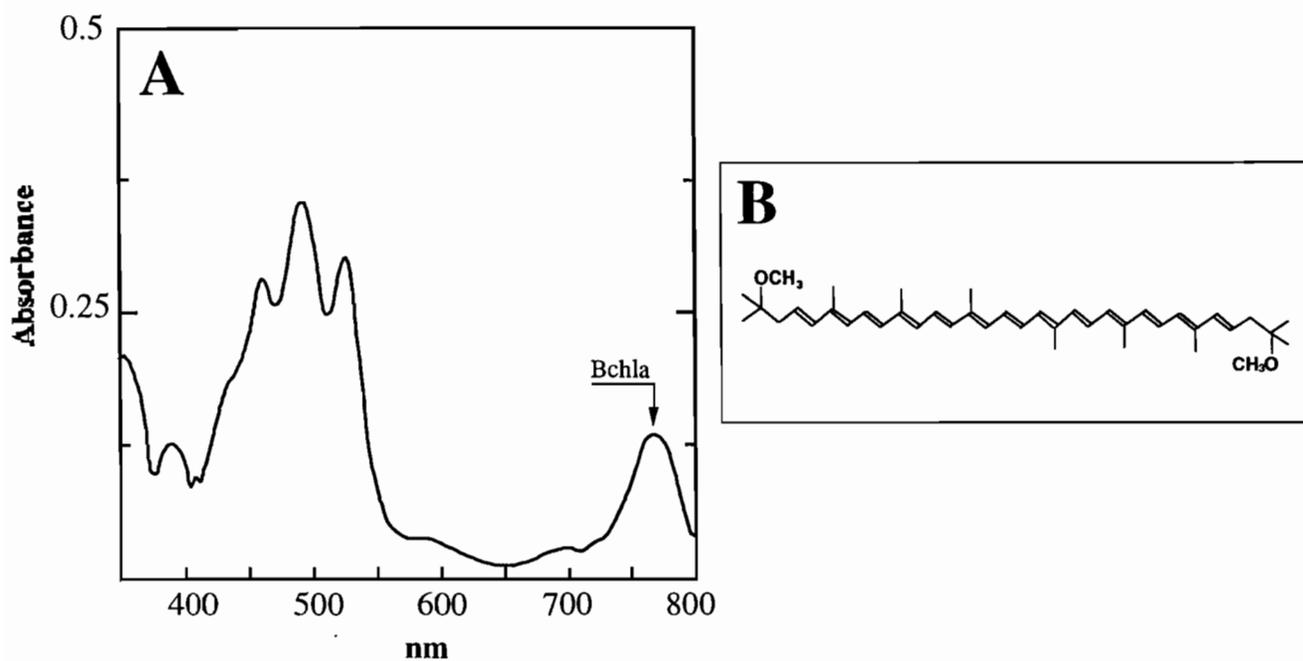


Figure 3. (A) Spectre d'un extrait correspondant à une souche rose, ORS408. (B) Structure de la spirilloxanthine, unique caroténoïde synthétisé par les souches roses.

de 0,48 (Tableau 3) sont identiques à ceux de la canthaxanthine du commerce. Le spectre en cloche (Figure 2A) est typique des caroténoïdes possédant des fonctions cétoniques, aldéhydiques ou encore carboxyliques. La réduction de la canthaxanthine par le borohydrure de sodium donne en effet un composé jaune dont le spectre visible correspond à celui de l'isozéaxanthine (λ_{\max} 428, 452, 478 nm, Tableau 3) (Cooney *et al.*, 1966). Ce dernier présente un λ_{\max} inférieur de 24 nm par rapport à celui de la canthaxanthine, confirmant ainsi que 2 fonctions cétoniques sont bien présentes sur le composé non réduit. Le coefficient de partage de la canthaxanthine purifiée a également été déterminé. Il est de 50 : 50 et est identique à celui donné par la littérature (Foppen, 1971).

Le deuxième composé important synthétisé par les souches de couleur orange est la spirilloxanthine, 1,1'-diméthoxy-3,4,3',4'-tétrahydro-1,2,1',2'-tétrahydro- Ψ,Ψ -carotène, dont la structure est représentée à la Figure 3B. Son R_f est de 0,85 et son spectre d'absorption est représenté par un tri-épaulement avec des λ_{\max} de 461, 488 et 521 nm dans le méthanol (Tableau 3). Le coefficient de partage de la spirilloxanthine est de 90 : 10, et est identique à celui de la littérature (Foppen, 1971).

D'autres pigments, autres que la canthaxanthine et la spirilloxanthine ont également été caractérisés dans les souches oranges et le Tableau 3 présente les caractéristiques de ces pigments ainsi que leurs noms, ils correspondent à des intermédiaires de la voie de biosynthèse de la canthaxanthine..

4.1.2.2. Souches roses

Les études effectuées par CCM montrent clairement que les souches de couleur rose ne synthétisent qu'un seul caroténoïde, une seule bande étant visible. Ce caroténoïde unique a été identifié de la même manière que dans le cas des

souches oranges. Il s'agit de la spirilloxanthine.

4.1.3. Quantification des pigments

Le Tableau 2 rend compte des quantités de Bchl *a* et de caroténoïdes synthétisés par les différentes souches, dans nos conditions de culture.

Par comparaison avec les souches ORS278 et BTAi1, deux souches modèles du laboratoire (Lorquin *et al.*, 1996), la quantité de Bchl *a* est plus faible chez les souches étudiées. Celles-ci varient de 0.01 à 0.07 nmoles/mg de matière sèche.

Quoiqu'il en soit et d'une façon générale, la teneur en Bchl *a* des souches photosynthétiques nodulant les *Aeschynomene* reste faible. Ces teneurs sont cependant du même ordre de grandeur que celles trouvées chez d'autres bactéries photosynthétiques aérobies, *Methylobacterium radiotolerans* et *Protaminobacter ruber*, mais sont éloignées de celles déterminées chez des bactéries marines également aérobies, *Erythrobacter longus*, *Roseobacter denitrificans* et *Roseobacter litoralis* (Shiba, 1989 et 1991).

La quantité de caroténoïdes des souches isolées du riz est très faible par rapport à celle de la souche ORS278. Si l'on compare les souches synthétisant la spirilloxanthine uniquement (souches roses), les concentrations de caroténoïdes sont faibles devant celle de la BTAi1. D'autre part, la quantité de caroténoïdes est plus élevée chez les souches oranges que chez les souches roses. Cette constatation vient du fait que les souches oranges synthétisent la canthaxanthine qui est largement majoritaire. En effet, après purification par chromatographie sur couche mince et dosage de la canthaxanthine dans ces souches, nous avons montré que la canthaxanthine représente 80% de la quantité totale des caroténoïdes produits par les souches oranges.

4.2. Aspect génotypique

Les gènes nécessaires pour la formation du complexe photosynthétique pigment-protéique ont été caractérisés chez plusieurs micro-organismes (*Rhodobacter capsulatus*, *R. sphaeroïdes*, *Rhodospirillum centenum*). Ils sont dans tous les cas retrouvés dans une région de l'ordre de 45 kb regroupant les gènes *bchl* codant pour les enzymes de biosynthèse de la bactériochlorophylle, les gènes *crt* codant pour les enzymes de biosynthèse des caroténoïdes et les gènes *puf* codant pour les protéines majeures des antennes collectrices (*pufA* et *pufB*) (Alberti, 1995) et les protéines du centre réactionnel (*pufL* et *pufM*).

Les gènes correspondant à l'opéron *puf* ont été récemment isolés et séquencés au laboratoire chez un *Bradyrhizobium* photosynthétique isolé d'un nodule de tige d'*A. sensitiva* : la souche ORS278, souche modèle du laboratoire (Giraud *et al.*, 2000).

La mise en évidence de gènes photosynthétiques chez nos isolats a été réalisée dans une première étape par hybridation en utilisant les gènes *puf* d'ORS278 comme sonde. Une région de ces gènes a été isolée par PCR sur certains de nos isolats, puis séquencée pour comparaison avec la séquence d'ORS278.

4.2.1. Mise en évidence des gènes photosynthétiques par hybridation

L'ADN des souches étudiées a été extrait suivant la méthode de Sambrook *et al.*, (1989). Les souches BTAi1 (Eaglesham *et al.*, 1990) et ORS278 (Lorquin *et al.*, 1993) isolées respectivement d'*Aeschynomene indica* et d'*A. sensitiva* ont été utilisées comme témoins. Les fragments d'ADN des souches étudiées sont digérés par l'enzyme *EcoRI* puis séparés sur gel d'électrophorèse. Après transfert de ces fragments sur

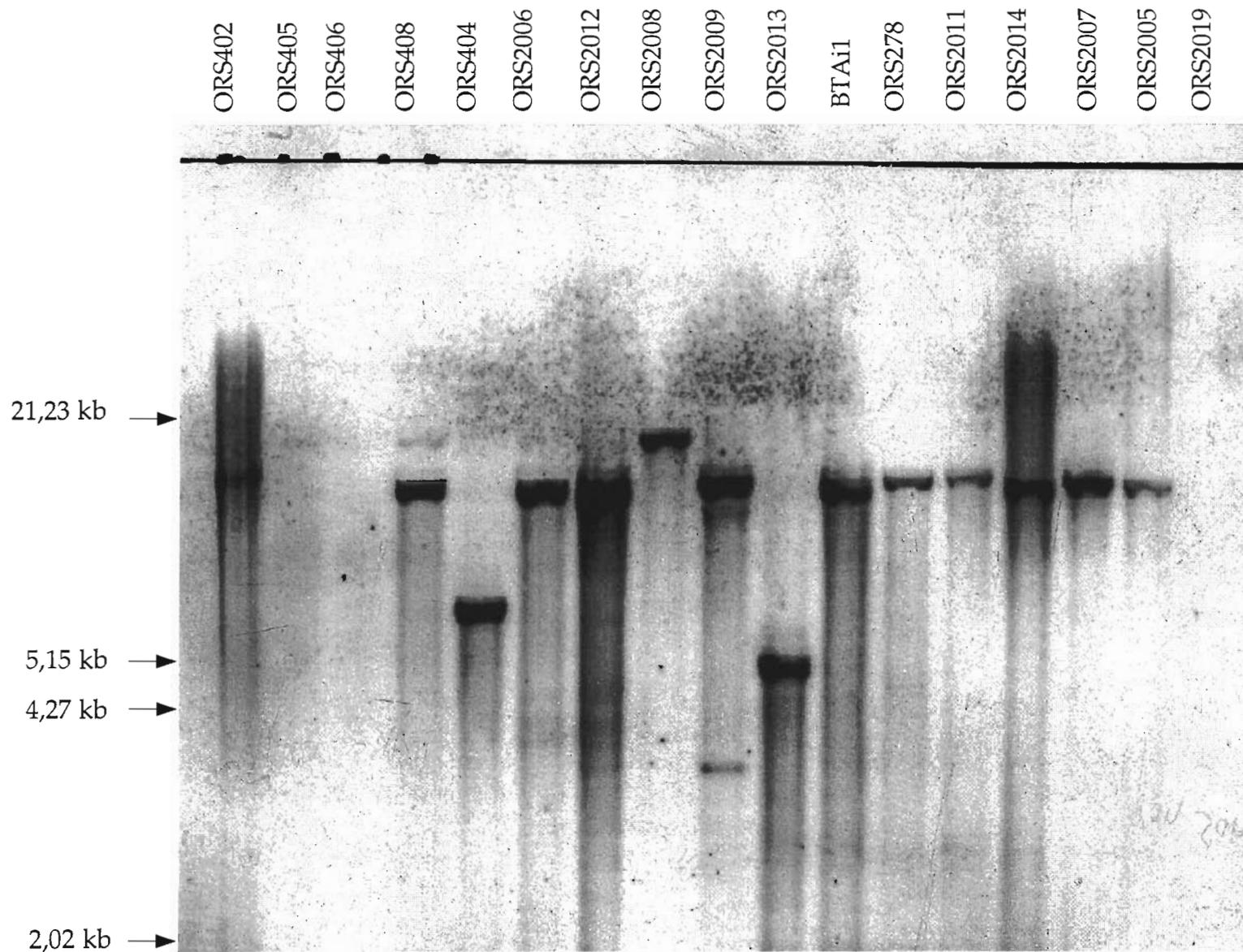


Figure 4. Mise en évidence par hybridation des gènes *puf* chez les souches de riz. Les souches ORS278 et BTAi 1 sont utilisées comme témoins.

membrane de nylon, l'hybridation est réalisée avec une sonde de 926 pb obtenue à partir du produit d'amplification de la souche ORS278 avec le couple d'amorces *PufL278f* (5'-CACCCATCTCGATTGGGTGTCTG-3') et *PufM278r* (5'-CTCCAGCTGCCCCATGAAGATCG-3'). Ce couple d'amorces spécifiques correspond à l'extrémité 3' du gène *pufL* et l'extrémité 5' du gène *pufM* chez ORS278 (Giraud, communication personnelle).

Les profils d'hybridation obtenus (Figure 4) montrent que l'ADN extrait de l'ensemble des souches pigmentées isolées s'hybride avec la sonde *puf* d'ORS278. Il est intéressant de noter que la souche ORS402 qui ne synthétise pas de pigments dans nos conditions de culture (cf. Tableau 2) présente aussi un fragment qui hybride avec la sonde. Un gène analogue au gène photosynthétique de la souche ORS278 semble donc présent chez ORS402, mais il ne s'exprime pas. Il peut correspondre à un gène vestige que cette bactérie aurait conservé au cours de son évolution et de son adaptation. Notons qu'un tel résultat avait déjà été observé par van Berkum *et al.*, (1995) sur des isolats de sols nodulant des espèces d'*Aeschynomene*. Par contre, aucune hybridation n'est observée avec les souches présentant une pigmentation blanche ORS405 et ORS406. Ces souches ne synthétisent pas de Bchl *a*, ni de caroténoïdes, ce qui confirme qu'elles ne sont pas photosynthétiques.

4.2.2. Isolement et séquençage des gènes *puf*

Le couple d'amorces spécifiques *pufL.278.f/pufM.278.r* à été utilisé pour isoler une région des gènes *puf* chez les souches endophytes du riz sauvage *Oryza breviligulata* et aquatiques.

Toutes les bactéries qui synthétisent des pigments dans nos conditions de culture ont donné un produit d'amplification de la taille attendue (926 pb). Par

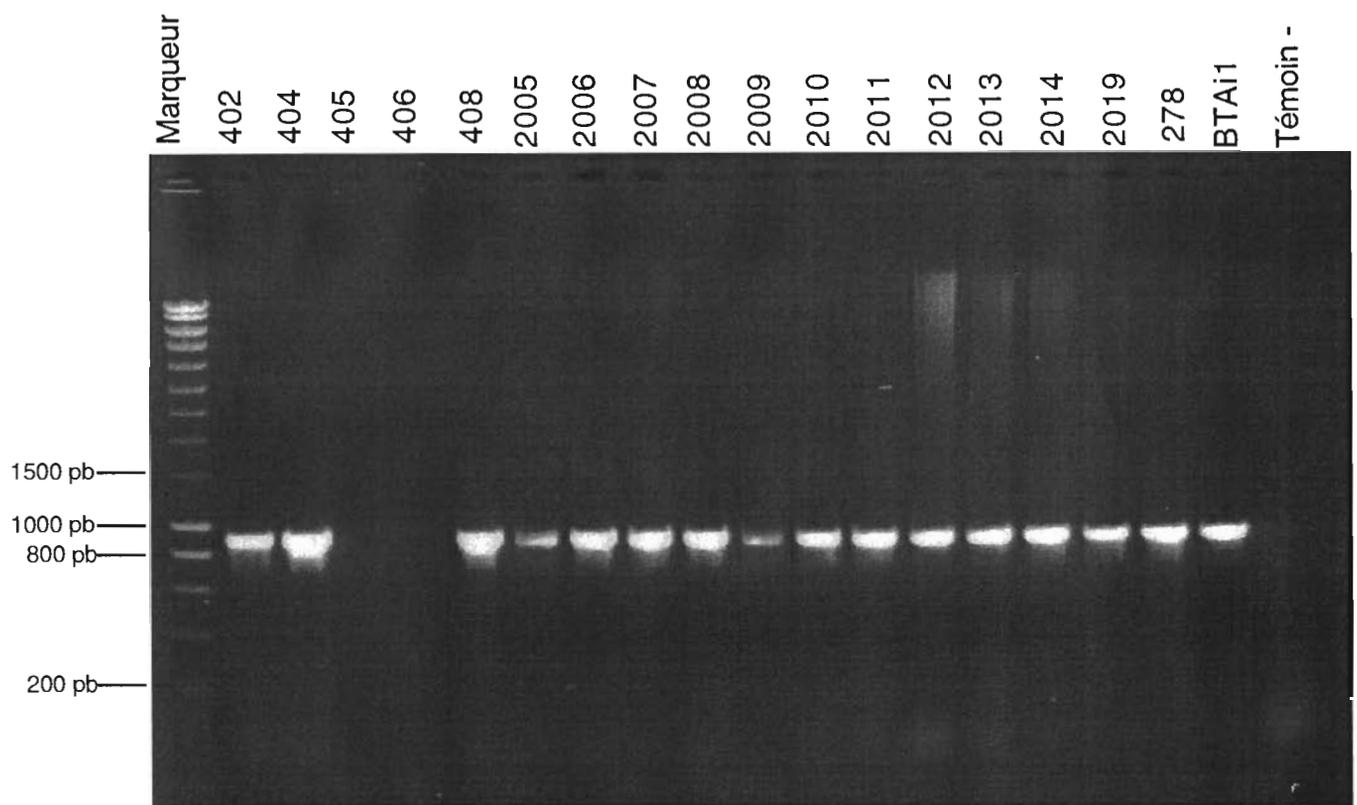


Figure 5. Electrophorèse des produits d'amplification obtenus par utilisation des amorces *pufL278f/pufM278r* qui s'hybrident au niveau du gène *puf* de l'ADN des souches endophytes du riz sauvage et des souches aquatiques.

Le marqueur de poids moléculaire est le Smart Ladder.

Le témoin - n'a pas d'ADN

contre, aucune amplification n'a été obtenue avec ces amorces chez les souches ORS405 et ORS406 (figure 5). Ces résultats confirment que ceux précédemment obtenus.

Afin de compléter cette étude de gènes *puf*, le produit d'amplification de 4 souches (ORS2011, ORS2006, ORS2008, et ORS2019) a été séquencé. Les séquences obtenues dans les 4 cas, indiquent bien qu'il s'agit d'une région correspondante au gène *puf*, et l'analyse comparative des séquences montre un pourcentage de similarité variant de 94 à 99,8 % avec la région *puf* correspondante chez ORS278.

Ces résultats montrent que ces gènes photosynthétiques sont bien conservés parmi ces différentes souches et sont très proches de ceux caractérisés chez ORS278.

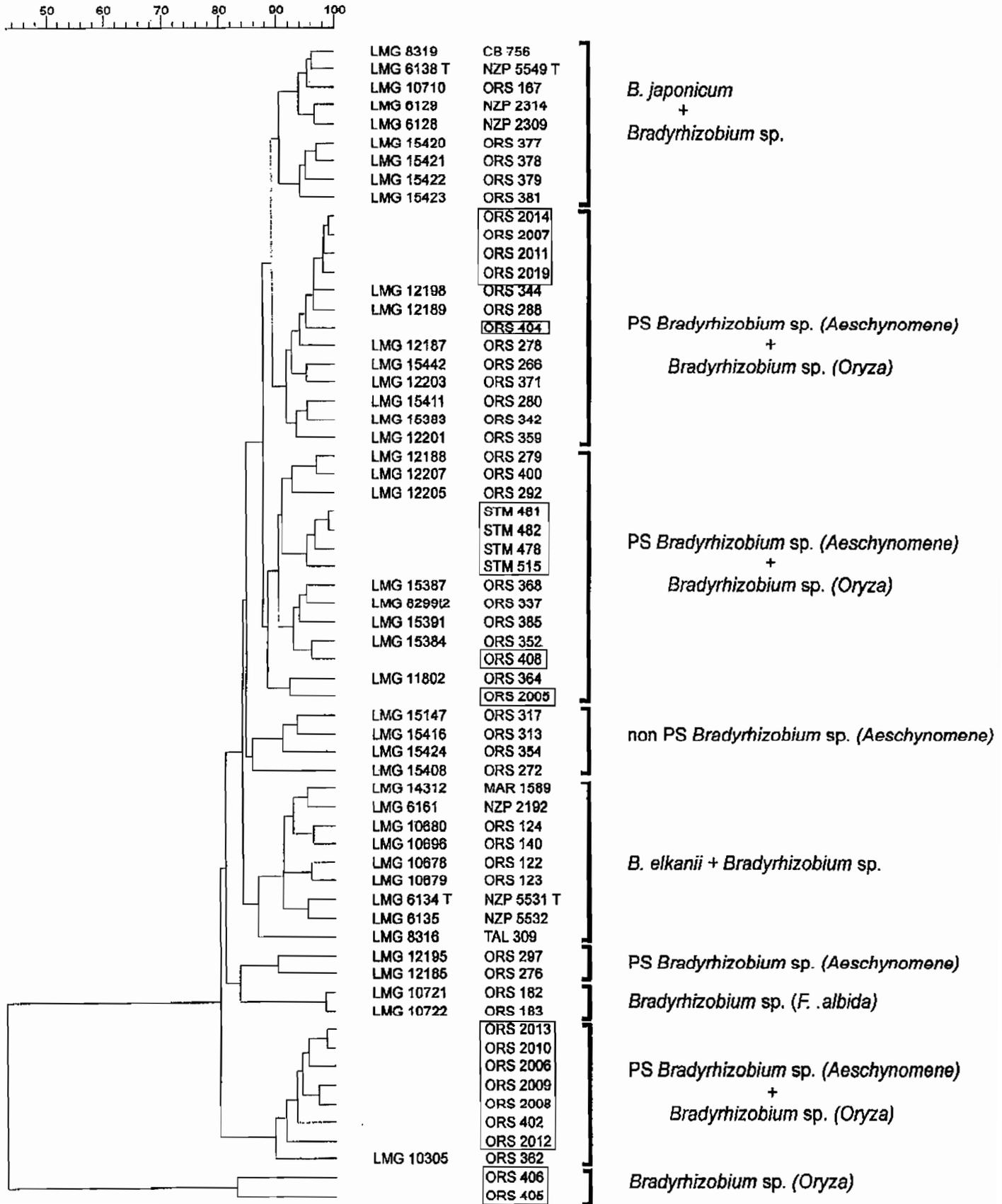
5. Caractérisation taxonomique

Cette étude est basée sur une approche polyphasique, faisant appel à différentes techniques de taxonomie bactérienne; la technique SDS-PAGE, l'analyse ARDRA et le séquençage de L'ADNr 16S.

5.1. Analyse des protéines cellulaires totales par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS

La technique SDS-PAGE est décrite comme une méthode fiable pour le groupement d'un grand nombre de souches. C'est une méthode très sensible qui fournit en effet un certain nombre d'informations sur la similarité des souches à l'intérieur d'une espèce ou d'une sous-espèce. Dans la taxonomie des rhizobia, la méthode SDS-PAGE est souvent utilisée comme première technique de criblage pour le groupement de nouveaux isolats (Dreyfus *et al.*, 1988 ; Chen *et al.*, 1991 ; Dupuy *et*

Figure 6. Dendrogramme montrant les relations entre les profils électrophorétiques des protéines des isolats endophytes du riz sauvage (en encadré).



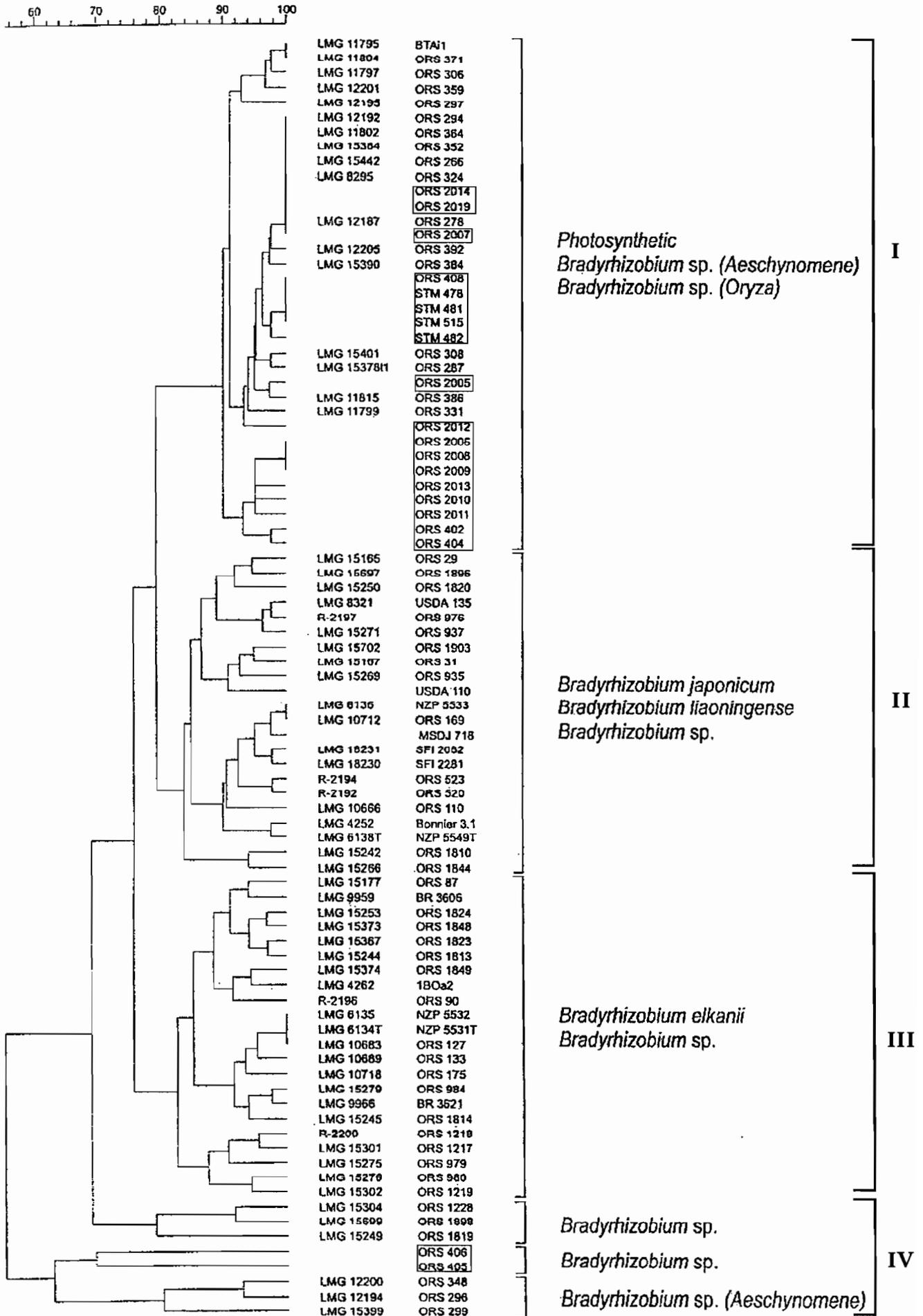
al., 1994 ; de Lajudie *et al.*, 1994, 1998a, b).

Les protéines ont été purifiées et séparées par SDS-PAGE en conditions standardisées. Les profils électrophorétiques obtenus ont été comparés à ceux de souches de référence appartenant aux différentes espèces de *Bradyrhizobium* isolées d'*Aeschynomene* et de *Bradyrhizobium* (*B. japonicum*, *B. elkanii*), ainsi que des représentants de groupes de rhizobia à croissance lente identifiés, mais non nommés de la littérature (Moreira *et al.*, 1993 et 1998; Dupuy *et al.*, 1994; Molouba *et al.*, 1999) ont été également inclus dans l'analyse (voir annexe tableau 1). Cette analyse est présentée sur la figure 6 sous forme de dendrogramme réduit incluant les nouveaux isolats et les souches de références trouvées les plus proches. 8 principaux groupes électrophorétiques ont été individualisés en utilisant le coefficient de similarité $r = 0,8$. La grande majorité des souches endophytes et aquatiques du riz sauvage appartient au groupe des *Bradyrhizobium* photosynthétiques d'*Aeschynomene*. Les souches ORS405 et ORS406 forment quant à elles un groupe complètement éloigné de toutes les souches de *Rhizobium* utilisées comme référence.

5.2. Analyse ARDRA

Afin de compléter les données de groupement obtenues par la méthode génotypique précédente (SDS-PAGE), nous avons utilisé la technique ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) basée sur l'analyse PCR-RFLP de la région 16S de tous les nouveaux isolats. Pour chaque souche analysée, le produit d'amplification a été une bande unique de 1500 pb. Chaque amplifiat a été hydrolysé séparément par cinq endonucléases tétramériques et les fragments résultants ont été séparés par électrophorèse. La longueur du produit d'amplification, estimée par la somme des tailles des fragments de restriction a été inférieure ou proche de

Figure 7. Dendrogramme montrant les relations entre les profils électrophorétiques des nouveaux isolats endophytes du riz sauvage (en encadré). Le dendrogramme est basé sur les valeurs du coefficient de corrélation de Pearson (r) qui ont été groupées par la méthode UPGMA (unweighted pair group method using average linkage). L'échelle indique les valeurs de r converties en pourcentage.



1500 pb. Avec chacune des cinq enzymes nous avons obtenu un (*Mwo* I), deux (*Alu* I, *Dde* I, *Hha* I), ou trois profils (*Hinf* I) différents. Nous avons comparé les nouveaux profils (en utilisant le logiciel Gel Compar, version 4.2) à ceux des souches représentatives des espèces de *Bradyrhizobium* sp, *B. japonicum*, *B. elkanii* et *B. liaoningense* (Molouba *et al.*, 1999 ; Doignon-Bourcier *et al.*, 1999) (voir annexe, tableau 1). Les résultats sont présentés sous forme de dendrogramme UPGMA (figure 7). Nous observons que, à l'exception des isolats ORS405 et ORS406, l'ensemble des souches se retrouvent dans le groupe des *Bradyrhizobium* photosynthétiques d'*Aeschynomene*, ce qui confirme les résultats obtenus en analyse SDS-PAGE.

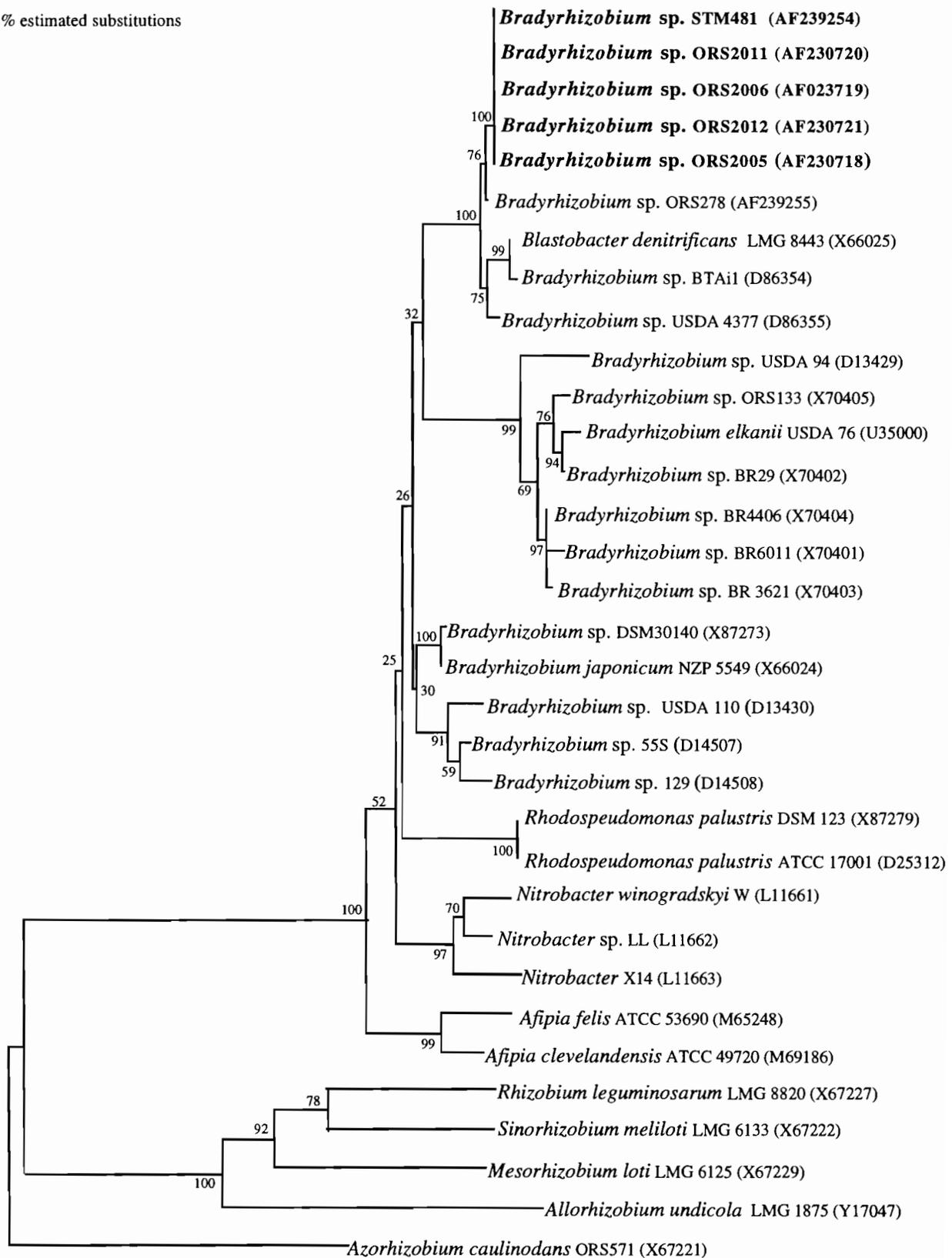
5.3. Séquençage du gène codant pour l'ADNr 16S

Le séquençage de l'ADNr 16S de plusieurs souches endophytes du riz sauvage (ORS2005, ORS2006, ORS2011, ORS2012 et STM481) originaires du Sénégal et de Guinée, montre que le gène codant pour l'ADNr 16S est parfaitement conservé (100% de similarité) chez tous ces isolats. Par comparaison de séquences, on obtient 2 bases de différences avec la souche ORS278, 4 bases de différences avec la souche USDA4377 (4 différences), 9 bases de différences avec la souche et 10 bases de différences avec la souche LMG8443 de *Blastobacter denitrificans* (figure 8).

Un arbre phylogénétique a été construit pour déterminer la position de ces isolats avec les autres souches de *Bradyrhizobium*. Toutes les souches endophytes du riz forment une branche séparée regroupant aussi les *Bradyrhizobium* photosynthétiques ORS278, BTAi1, USDA4377 et la souche aquatique *Blastobacter denitrificans*. Ce regroupement est confirmé par une valeur de bootstrap de 100% et

Figure 8. Dendrogramme basé sur la comparaison des séquences du gène codant pour l'ADNr 16S, obtenu par la méthode du neighbour-joining et montrant la position phylogénétique des souches endophytes du riz sauvage (en caractères gras) dans la sous-classe des α protéobactéries.

1 % estimated substitutions



Les numéros entre parenthèses correspondent aux numéros d'accèsion des séquences dans la banque de données EMBL. Les valeurs bootstrap significatives sont indiquées aux points d'embranchement. L'échelle représente le pourcentage de substitutions.

est distinct des autres 5 groupes représentés par *B. elkanii*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Nitrobacter winogradskyi* et *Afipia felis*.

Nous avons également séquencé la région codant pour l'ADNr 16S des souches ORS405 et ORS406, isolées de l'eau de mare où pousse le riz sauvage *Oryza breviligulata*. L'analyse des séquences montre 100% de similarité entre ces deux souches. La comparaison de séquences avec le logiciel BLASTN (Altschul *et al.*, 1997), montre que ces souches sont phylogénétiquement proches des *Ochrobactrum* sp., avec 94% de similarité. Les *Ochrobactrum* sp. sont des bactéries Gram- appartenant à la subdivision α des Protéobactéria comme les rhizobia (Yanagi et Yamasato, 1993). Ce sont des bactéries symbiotes des nématodes (Aguillera *et al.*, 1993 ; Bonifassi *et al.*, 1999). Elles sont retrouvées dans l'intestin des termites où elles jouent un rôle dans la dégradation de l'hémicellulose (Schafer *et al.*, 1996). Les *Ochrobactrum* sp. sont des bactéries opportunistes pathogènes de l'homme (Alnor *et al.*, 1994 ; Christenson *et al.*, 1997 ; Moller *et al.*, 1999), mais non pathogènes chez les insectes (Babic *et al.*, 2000).

C. DISCUSSION ET CONCLUSION

Ce travail nous a permis de mettre en évidence pour la première fois l'existence d'associations naturelles entre une espèce annuelle de riz sauvage *Oryza breviligulata* (A. Chev. & Roehr) et des rhizobiums. A partir des racines superficiellement désinfectées de cette espèce annuelle de riz sauvage poussant spontanément dans les mares temporaires du Sénégal, nous avons en effet isolé plusieurs souches de rhizobiums capables de former des nodules fixateurs d'azote sur les racines et les tiges de la légumineuse aquatique *A. sensitiva*. Ces même *Bradyrhizobium* d'*Aeschynomene* sont également présents à l'état libre dans l'eau des mares où poussent le riz sauvage et les légumineuses aquatiques. Les *Bradyrhizobium* photosynthétiques, isolés à partir des racines et tiges de riz sauvage sont caractérisés par une grande spécificité puisqu'ils nodulent exclusivement les espèces d'*Aeschynomene* à nodules de tige appartenant au groupe III (Alazard et Duhoux, 1988). Ces *Bradyrhizobium* ne forment pas de nodules sur les autres légumineuses telles que *Sesbania rostrata* et *Faidherbia albida*.

Les souches de *Bradyrhizobium* isolées à partir des racines du riz peuvent être considérées comme de véritables bactéries endophytes car le traitement que nous avons utilisé pour désinfecter les racines d'*Oryza breviligulata* ne permet pas à des bactéries de survivre à la surface de ces racines, aucune contamination bactérienne n'ayant été observée dans l'eau de rinçage. Les résultats obtenus dans ce travail et ceux décrits par Barraquio *et al.*, (1997), Stolfus *et al.*, (1997), montrent que les racines de riz abritent de nombreuses populations de bactéries diazotrophiques et

non diazotrophiques. Parmi celles-ci, on peut citer, *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* endophyte du riz cultivé en Egypte (Yanni *et al.*, 1997). Certaines de ces bactéries sont capables de recoloniser leurs plantes hôtes en conditions de culture stérile.

La caractérisation biochimique des caroténoïdes nous a permis de distinguer parmi les souches photosynthétiques endophytes du riz sauvage deux groupes de pigmentation :

- Le premier groupe est constitué par des souches de couleur rose qui ne produisent, comme la souche type BTAi1, qu'un seul caroténoïde, la spirilloxanthine. Ce caroténoïde acyclique généralement produit en anaérobiose chez les *Rhodospirillaceae* et les *Chromatiaceae* (Goodwin et Osman, 1954; Goodwin, 1956 et 1980), est un pigment majeur lié aux complexes protéiques de la photosynthèse. Récemment, la spirilloxanthine a également été mise en évidence dans une bactérie photosynthétique marine aérobie, *Erythrobacter longus* (Takaichi *et al.*, 1990).

- Le deuxième groupe est constitué par des souches de couleur orange. Elles produisent 7 caroténoïdes dont les principaux sont la canthaxanthine qui représente environ 80% des caroténoïdes totaux, et la spirilloxanthine. Ces bactéries produisent des caroténoïdes identiques à ceux précédemment identifiés chez la souche ORS278 (Lorquin *et al.*, 1993, 1997b). Chez d'autres organismes photosynthétiques, la canthaxanthine a été mise en évidence chez les cyanobactéries (Goodwin, 1980) ainsi que chez les micro-algues (Czygan, 1968; Dentice di Accadia *et al.*, 1966 et 1968), mais comme un pigment mineur. Ce caroténoïde n'est probablement pas associé aux complexes protéiques de la photosynthèse. En effet, chez *Methylobacterium radiotolerans*, les caroténoïdes acides, très majoritaires dans cet organisme, ne sont pas liés au complexe Bchl-protéines (Saitoh *et al.*, 1995). De même, chez *Erythrobacter longus*, *Erythromicrobium ramosum* E5 et *Roseococcus thiosulfatophilus* RB3, les

caroténoïdes polaires ne sont pas associés au complexe (Shimada *et al.*, 1985; Yurkov *et al.*, 1993). La canthaxanthine est un β -carotène ayant un fort pouvoir antioxydant pouvant protéger l'organisme contre les dommages photo-oxydatif. Cette molécule, produite par synthèse chimique actuellement, présente une forte valeur ajoutée. En effet, elle est utilisée pour ses propriétés colorantes dans l'industrie Agro-alimentaire et pour ses propriétés photo-protectrices dans l'industrie cosmétique et pharmaceutique. Les quantités de canthaxanthine détectées chez les souches endophytes et aquatiques du riz sauvage restent inférieures à celles de la souche ORS278. Cette souche a été initialement sélectionnée à Dakar pour sa capacité à produire en plus des pigments photosynthétiques, ce pigment supplémentaire la canthaxanthine qui représente plus de 85% des caroténoïdes totaux produits par la souche (Lorquin *et al.*, 1997b) mais, cette quantité reste trop faible (1,46 mg/g de matières sèches) pour envisager d'utiliser cette souche comme producteur de canthaxanthine ayant le label « naturel ». Cependant Il peut être possible d'augmenter la production de canthaxanthine en clonant les gènes de la voie de biosynthèse de ce caroténoïde. Aussi, durant mon travail de thèse, j'ai contribué à l'identification et la caractérisation du cluster de gènes intervenant dans la biosynthèse de la canthaxanthine chez la souche photosynthétique ORS278. Ce cluster a pu être complètement séquencé. Il contient cinq gènes notés *crtE*, *crtY*, *crtI*, *crtB* et *crtW* répartis en deux opérons distincts. L'ensemble de ces gènes permet la synthèse de la canthaxanthine à partir de Farnesyl pyrophosphate. Le cluster de gène *crt* de la canthaxanthine étant isolé, nous envisageons à présent de les cloner sous un promoteur fort dans un plasmide à large spectre d'hôte et à grand nombre de copies. Nous espérons ainsi que la transformation d'ORS278 par ce plasmide permettra d'obtenir une souche surexprimant ces gènes et surproduisant ainsi la

canthaxanthine. L'ensemble des résultats ont donné lieu à une publication donc je suis coauteur (voir article 2 en annexe).

A partir des profils d'hybridation obtenus avec une sonde contenant les gènes photosynthétiques, gène *puf* de la souche ORS278, nous avons confirmé que la majorité des souches associées au riz sauvage possédaient des gènes photosynthétiques homologues à ceux de la souche ORS278, et étaient donc bien photosynthétiques. Le caractère photosynthétique est développé uniquement par les symbiotes de tiges des *Aeschynomene*. Il se pourrait que ce caractère se soit développé suite à une pression de sélection dans un habitat soumis à de fortes intensités lumineuses. La présence dans les nodules caulinaires des *Aeschynomene*, des bactéroïdes qui prolifèrent dans une zone soumise à de fortes intensités lumineuses (délimitée par quelques assises cellulaires ou simplement sous l'épiderme caulinaire comme chez *A. sensitiva*) permettant ainsi l'expression de l'activité photosynthétique des symbiotes bactériens permet de conforter cette idée.

L'étude phylogénétique réalisée sur les gènes *puf*, et le séquençage de ces gènes a permis de montrer que les *Bradyrhizobium* photosynthétiques endophytes et aquatiques du riz sauvage sont phylogénétiquement proches des bactéries photosynthétiques de type ORS278.

Les diverses souches isolées à partir des racines et tiges de riz sauvage ont été étudiées par l'analyse des protéines totales SDS-PAGE et aussi par PCR-RFLP de l'ARNr 16S. La région codant pour l'ADNr 16S des représentants de chaque groupe a été séquençée. L'analyse des séquences montre que toutes les autres souches endophytes du riz sauvage, originaires du Sénégal (hormis les souches ORS405 et ORS406) et de Guinée, forment un groupe monophylétique homogène et se retrouvent dans le groupe des *Bradyrhizobium* photosynthétiques isolés des nodules de tiges d'*Aeschynomene* (Molouba *et al.*, 1999). Par ailleurs, le séquençage du

16SrDNA montre que ces isolats endophytes du riz sauvage, quelque soit leur origine géographique, ont des séquences 16S parfaitement identiques. Les souches ORS2005, ORS2006, ORS2011, ORS2012, et STM481 se retrouvent dans le groupe phylogénétique des souches ORS278, BTAi1, USDA 4377, isolées d'*Aeschynomene* et de la souche LMG8443 de *Blastobacter denitrificans* un organisme non pigmenté, retrouvé dans l'eau. Ce premier groupe est distinct des cinq autres groupes dont les représentants sont respectivement *Bradyrhizobium elkanii* USDA76, *Bradyrhizobium japonicum* NZP5549, *Rhodopseudomonas palustris* ATCC17001, *Nitrobacter winogradskyi* W, and *Afipia felis* ATCC53690. Le groupe *Bradyrhizobium* photosynthétiques-*Blastobacter denitrificans* pourrait former un nouveau genre avec plusieurs espèces. Il est intéressant de noter que la découverte d'un système photosynthétique chez la souche BTAi1 avait conduit à proposer un nouveau genre pour ce rhizobium, le genre « *Photorhizobium* » et l'espèce « *P. thompsonianum* » (Evans *et al.*, 1990 ; Eaglesham *et al.*, 1990). Les séquences de l'ADNr 16S des souches ORS405 et ORS406 sont phylogénétiquement proches des séquences de l'ADNr 16S des *Ochrobactrum* sp, bactéries opportunistes pathogènes chez l'homme. Nous avons montré que les souches ORS405 et ORS406 forment des nodules non effectifs, donc non fixateurs d'azote sur *Aeschynomene sentiva* et *A. indica*. Cependant, durant nos expériences, cette capacité nodulante n'a souvent pas été vérifiée. Le caractère symbiotique des souches ORS405 et ORS406 avec les racines des légumineuses reste donc assez ambigu. Nous envisageons d'autres études pour avoir une idée plus précise sur le spectre d'hôte de ces deux isolats. En outre, si nous réussissons à confirmer ces résultats, les *Ochrobactrum* constitueraient ainsi une nouvelle branche de bactéries nodulant les légumineuses.

CHAPITRE II:

**Inoculation du riz par les *Bradyrhizobium*
photosynthétiques :
Un important potentiel pour le développement**

A. INTRODUCTION

Augmenter ou maintenir la production du riz, première céréale mondiale, sans recourir à des quantités supplémentaires d'engrais polluants et coûteux représente certainement un des prochains défis du XXI^{ème} siècle. Parmi les solutions envisagées, l'inoculation par des bactéries rhizosphériques diazotrophes est une voie étudiée depuis de nombreuses années, mais qui n'a pour l'instant pu déboucher sur des augmentations de rendements importants. Jusqu'à présent, à l'exception des essais réalisés en Egypte par Yanni *et al.*, (1997), aucune expérience d'inoculation en rizières n'avait utilisé les rhizobiums. Un des objectifs principaux que nous nous sommes fixés a donc été de ré-inoculer les racines du riz sauvage et de deux variétés de riz cultivé par les *Bradyrhizobium* photosynthétiques endophytes afin de mesurer les effets de cette inoculation sur la croissance du riz.

Pour atteindre cet objectif, nous avons procédé en plusieurs étapes qui font l'objet de ce deuxième chapitre de thèse :

a/ Nous avons tout d'abord étudié la colonisation *in vitro* des racines du riz par une souche de *Bradyrhizobium* photosynthétique. Ce travail fait l'objet d'une publication (Chaintreuil *et al.*, AEM 2000).

b/ Nous avons ensuite conduit plusieurs expériences d'inoculation du riz en serres pour, d'une part mesurer l'effet des *Bradyrhizobium* sur la croissance et le rendement du riz, et d'autre part, sélectionner les souches les plus performantes.

c/ Nous avons enfin testé directement au champ la souche ORS278 sur une pépinière de riz en Guinée Conakry, et montrons tout le potentiel de cette technique.

B. RESULTATS

1. Colonisation des racines de riz en culture *in vitro*

Ce paragraphe a fait l'objet d'une description détaillée dans la publication Chaintreuil *et al.* (AEM 2000), voir annexe.

Afin de mieux suivre la colonisation des racines du riz sauvage et du riz cultivé, l'étude cytologique a été réalisée après inoculation *in vitro* d'une souche recombinante de *Bradyrhizobium* ORS278 marquée par le gène rapporteur *lacZ*. La souche de *Bradyrhizobium* non photosynthétique Aust13c isolée d'*Acacia mangium* (Galiana *et al.*, 1990) a été utilisée comme souche témoin. Les observations ont été faites d'une part, au microscope photonique 15 jours et 1 mois après inoculation, sur racines entières ou après coupe au Vibratome (40 μm), et d'autre part, au microscope à balayage après fixation au glutaraldéhyde et contournement du point critique.

Quinze jours après inoculation, on observe en microscopie photonique, grâce à l'activité β -galactosidase de la souche marquée ORS278 *lacZ* qui colore les bactéries en bleu, une colonisation bactérienne intense des apex racinaires (figure 1A) particulièrement au niveau de la coiffe et du mucilage qui l'entoure (Figure 1B). Il est intéressant de noter un attachement polaire spécifique de la souche marquée ORS278 *lacZ* sur les cellules végétales de la coiffe, alors que ce phénomène n'est pas observé avec la souche témoin Aust13c (Figure 1C). Tout au long de la croissance racinaire, des amas de cellules de la coiffe colonisées par les rhizobiums se détachent par

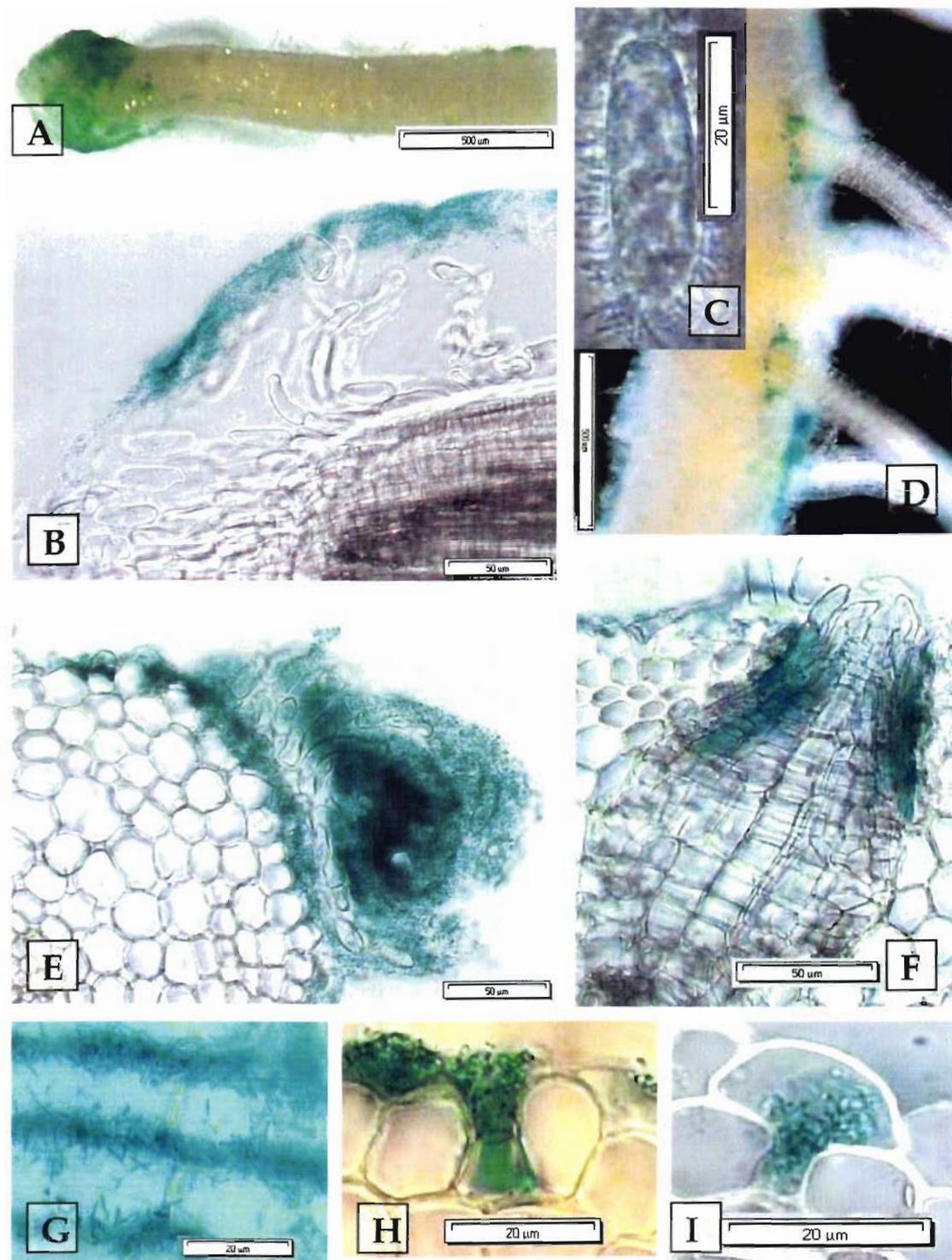


Figure 1 : Racines de riz inoculées avec la souche de *Bradyrhizobium* ORS278 *lacZ*, observées en microscopie photonique. **A** : colonisation bactérienne de la coiffe. **B** : Coupe longitudinale de la coiffe avec colonisation de la surface du mucilage. **C** : Attachement polaire des bactéries à une cellule desquamée de la coiffe. **D** : Colonisation bactérienne des fissures d'émergence des racines secondaires. **E** : Colonisation bactérienne de la surface racinaire à partir d'amas de cellules desquamées de la coiffe, coupe transversale. **F** : Pénétration bactérienne au niveau des fissures provoquées par l'émergence des racines secondaires, coupe transversale. **G** : Prolifération à la surface racinaire, particulièrement au niveau des espaces intercellulaires. **H** : Envahissement d'un espace intercellulaire, coupe transversale. **I** : Prolifération à l'intérieur d'une cellule du rhizoderme, coupe transversale.

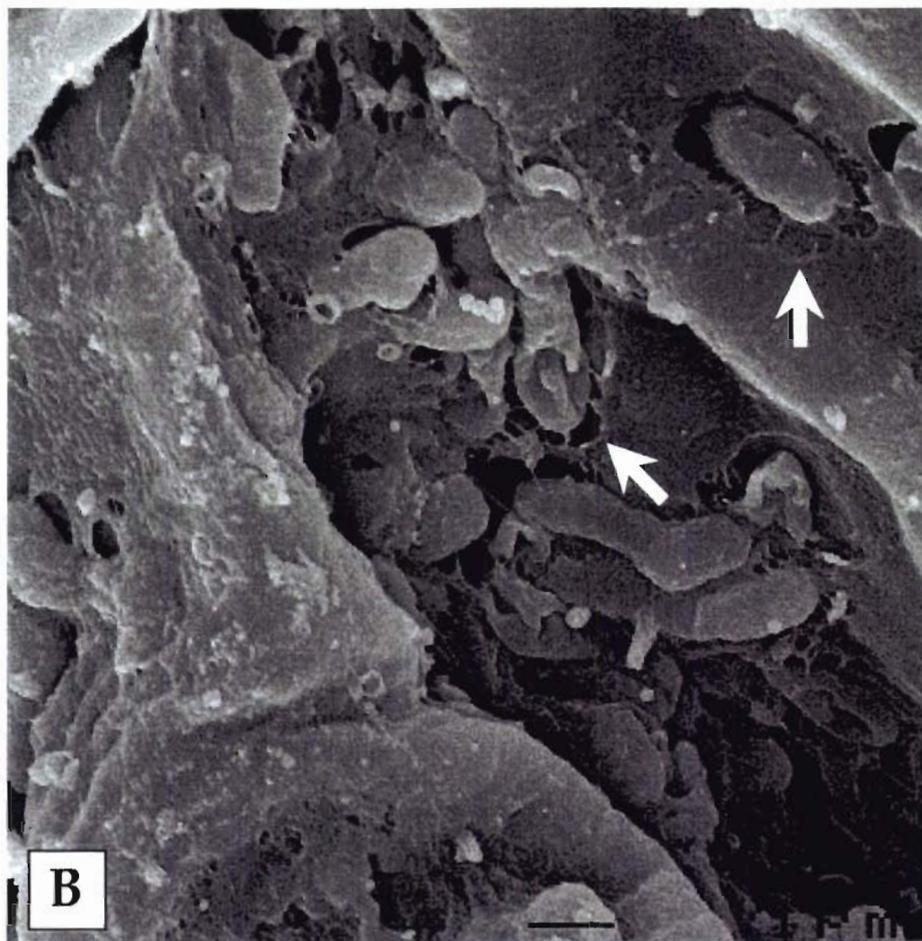


Figure 2. Racines de riz inoculées avec la souche de *Bradyrhizobium* ORS278, observées en microscopie électronique à balayage. **A** : Prolifération à la surface racinaire, dans la couche de mucilage. **B** : Cellules bactériennes colonisant le mucilage et présentant des zones de lyse du mucilage à leur périphérie (flèches).

desquamation et se déposent à la surface de la jeune racine en constituant des îlots de prolifération bactérienne (Figure 1E). Quelques millimètres en arrière de la coiffe, la colonisation bactérienne s'étend à une grande partie du rhizoplan ; elle est particulièrement active au niveau des espaces intercellulaires du rhizoderme, et aux points d'émergence des racines secondaires (Figure 1D).

L'observation en microscopie à balayage nous a permis de confirmer les résultats observés en microscopie photonique. En effet, 15 jours après inoculation des racines de riz par la souche sauvage ORS278, on observe bien une prolifération dense des bactéries à la surface des racines (figure 2A). Des plages de lyses sont observées autour des cellules bactériennes (figure 2B), correspondant probablement à l'utilisation par les bactéries du mucilage racinaire comme substrat carboné (Prin et Rougier, 1986).

Un mois après inoculation, la colonisation des *Bradyrhizobium* photosynthétiques a envahi la quasi totalité du système racinaire. Les bactéries se sont multipliées en grand nombre à la surface du rhizoplan et dans tous les espaces intercellulaires du rhizoderme (Figure 1G). Des pénétrations intercellulaires de bactéries sont observées dans les deux premières couches cellulaires et plus profondément (jusqu'à la cinquième assise cellulaire) au niveau des déchirures occasionnées par l'émergence des racines latérales (Figure 1F). Quelques invasions intracellulaires sont également observées régulièrement sans qu'il soit possible de savoir si ces cellules végétales infectées sont vivantes ou sénescents (Figure 1H). Toutes ces observations confirment le caractère endophytique des *Bradyrhizobium* photosynthétiques.

2. Comparaison de l'inoculation *in vitro* entre riz sauvage et riz cultivé.

Afin de vérifier si les *Bradyrhizobium* photosynthétiques pouvaient également être des bactéries endophytes du riz cultivé, nous avons étudié la colonisation « *in vitro* » par la souche ORS278 *lacZ* des racines de deux espèces de riz cultivées, *Oryza sativa*, variété IR64 (IRRI, Philippines) et *Oryza glaberrima*, variété TOG 5681 (ADRAO).

L'analyse faite au microscope photonique 15 jours et 1 mois après l'inoculation, montre que la souche ORS278 *lacZ* est capable d'infecter les racines de riz cultivé suivant un processus strictement identique à celui de l'infection des racines du riz sauvage, démontrant ainsi la capacité colonisatrice de cette bactérie pour les trois différentes espèces de riz.

3. Effet de l'inoculation sur la croissance du riz en serre

Au cours des deux dernières années, nous avons mené en serre tropicale deux expériences d'inoculation du riz sauvage *Oryza breviligulata*, cultivé pendant 5 mois en pots contenant 5 kg de sol, c'est-à-dire jusqu'à la récolte des graines. Une première expérience, réalisée sur un sol argilo-sableux ayant une teneur moyenne en azote (0,3% de teneur en azote total), a consisté à tester l'ensemble des souches endophytes du riz et de les comparer à deux souches de référence isolées d'*Aeschynomene*. La deuxième expérience, qui a porté sur un nombre plus restreint de souches bactériennes, a été conduite sur un sol sableux très pauvre en azote (0,025% de teneur en azote total).

Tableau 1. Effet de l'inoculation par les *Bradyrhizobium* photosynthétiques endophytes et non endophytes sur la croissance des tiges, feuilles, et sur le rendement en graines du riz sauvage *Oryza breviligulata*.

Souches ^a	Rendement en tiges et feuilles	Rendement en grains
	Poids sec (g)	Poids sec (g)
ORS 405	19,7 ^{bc}	1,9 ^c
ORS 2019	16,7 ^c	3,5 ^c
ORS 404	20,7 ^{bc}	4,5 ^c
ORS 2012	21,4 ^{bc}	4,6 ^c
ORS 402	23,0 ^b	4,9 ^c
ORS 408	26,4 ^b	5,0 ^c
ORS 2014	24,3 ^b	6,1 ^c
ORS 2008	23,6 ^b	6,8 ^{bc}
ORS 2010	20,5 ^{bc}	7,4 ^b
ORS 406	22,4 ^b	7,5 ^b
ORS 2005	22,4 ^b	8,1 ^b
ORS 2009	23,2 ^b	8,6 ^b
ORS 2013	21,8 ^{bc}	8,7 ^b
ORS 2007	24,3 ^b	9,4 ^{ab}
ORS 2006	27,5 ^{ab}	9,6 ^{ab}
ORS 2011	29,7^a	10,3^a
ORS 278	30,1^a	12,0^a
BTAi 1	23,4 ^b	7,2 ^b
Témoin (non-inoculé)	16,7 ^c	5,0 ^c
Témoin (addition de KNO ₃)	23,0 ^b	8,5 ^b

^a Abréviations et désignations: ORS, I.R.D. Collection de souches de l'Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France.

Chaque valeur est la moyenne de 6 répétitions par traitement. Dans la même colonne, les valeurs suivies d'une même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 1%. (Test de Snedecor et Cochran, 1989).

3.1. Effet comparatif de l'inoculation des *Bradyrhizobium* sur le riz

Seize souches endophytes du riz ou isolées dans l'eau de rizière, ainsi que 2 souches de *Bradyrhizobium* photosynthétiques d'*Aeschynomene*, les souches ORS278 et BTAi1, ont été inoculées au riz (6 répétitions par traitement). Les deux traitements témoins (non inoculé et addition d'azote) ont respectivement reçu du milieu stérile de croissance de bactéries et de l'azote sous forme de KNO_3 (5 mM).

Les résultats obtenus 5 mois après l'inoculation sont présentés dans le tableau 1. On observe que la majorité des souches donnent un rendement de la partie aérienne et de grain supérieur au témoin non inoculé, mais tout à fait comparable au témoin ayant reçu de l'azote. Par contre, la souche endophyte ORS2011 et la souche d'*Aeschynomene* ORS278 induisent une augmentation significative de l'ordre de 20% du rendement de la biomasse végétale et des graines par rapport au témoin ayant reçu de l'azote. L'autre souche isolée d'*Aeschynomene*, la souche BTAi1 ne présente pas de différence significative avec le témoin azote. Notons aussi que les souches ORS405, ORS404, ORS402, ORS2012, ORS2019 ont des rendements en grains inférieurs à celui du témoin non inoculé, on pourrait comparer leur effet à un « effet parasite » de la production de riz. Il existe donc une grande variabilité entre les souches que nous avons testées, et cette première expérience nous a permis de sélectionner les deux meilleures souches pour l'inoculation du riz.

3.2. Effet de l'inoculation sur la biomasse racinaire du riz

Dans cette deuxième expérience en serre, nous avons mesuré l'effet de l'inoculation de 5 souches isolées du riz ou de l'eau, et des deux souches d'*Aeschynomene* ORS278 et BTAi1 sur la production de biomasse végétale, et

Tableau 2. Effet de l'inoculation de quelques souches de *Bradyrhizobium* sur la croissance des racines, tiges, feuilles et sur le rendement en graines du riz sauvage *Oryza breviligulata*.

Souches ^a	Rendement en racines	Rendement en tiges et feuilles	Rendement en grains
Traitement	Poids sec (g)	Poids sec (g)	Poids sec (g)
ORS 278	4,97 ^a	18,01 ^a	12,82 ^a
ORS 402	4,85 ^a	16,08 ^{abc}	12,38 ^a
ORS 405	4,25 ^a	17,23 ^{ab}	12,35 ^a
BTAi 1	4,47 ^a	17,16 ^{ab}	12,28 ^a
ORS 2010	4,84 ^a	16,56 ^{abc}	12,24 ^a
ORS 2014	3,26 ^b	14,49 ^{abc}	12,09 ^a
ORS 2019	2,78 ^b	14,74 ^{abc}	11,63 ^a
Témoin (addition de KNO ₃)	2,45 ^b	13,73 ^c	10,69 ^a
Témoin (non-inoculé)	2,04 ^b	13,28 ^c	10,04 ^a

^a Abréviations et désignations: ORS, I.R.D. Collection de souches de l'Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France. Chaque valeur est la moyenne de 12 répétitions par traitement. Dans la même colonne, les valeurs suivies d'une même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 1%. (Test de Snedecor et Cochran, 1989).

particulièrement sur la production racinaire. Les résultats de l'inoculation sont présentés dans le tableau 2.

Ils confirment que la souche ORS278 est la plus performante sur le riz pour tous les paramètres étudiés, mais le résultat le plus significatif porte sur l'augmentation très significative de la biomasse racinaire. L'inoculation par les souches ORS278, ORS402, ORS405, BTAi1 et ORS2010, induit en effet un doublement de la biomasse racinaire, alors qu'il n'y a peu ou pas d'augmentation de la biomasse aérienne, et aucune augmentation de rendement en grains, contrairement à l'expérience précédente réalisée avec un sol plus riche en azote. Ces résultats, obtenus dans un sol très pauvre en azote, indiquent donc que les *Bradyrhizobium* photosynthétiques agissent essentiellement en augmentant la croissance racinaire, donc le potentiel d'exploration du sol par les racines de la plante.

3.3. Mesure de la fixation biologique de N₂ au niveau des racines du riz inoculé

Afin de vérifier si les *Bradyrhizobium* photosynthétiques étaient capables de fixer l'azote atmosphérique dans les racines ou dans la rhizosphère du riz, nous avons mesuré l'activité réductrice d'acétylène (ARA) sur les racines de riz sauvage inoculé en serre par la souche ORS278. Le riz était cultivé dans les mêmes conditions que l'expérience précédente, c'est à dire sur un sol sableux très pauvre en azote. Les résultats obtenus montrent une activité réductrice d'acétylène par plante extrêmement faible (25 nmol/C₂H₄/h/plante), incapable d'assurer les besoins en azote de la plante.

4. Inoculation au champ : une stimulation importante de la croissance du riz en pépinière

Afin de vérifier au champ les effets positifs de l'inoculation observés en serre, nous avons procédé à une inoculation de la souche sauvage ORS278 en rizières de mangrove dans la région de Conakry (Guinée). Pour ces essais au champ, nous avons choisi la Guinée car on y trouve des *Aeschynomene sensitiva* nodulées par des *Bradyrhizobium* photosynthétiques appartenant au même groupe taxonomique que la souche ORS278. L'introduction d'une espèce bactérienne naturellement présente ne présentait donc pas de danger pour l'environnement. Nous avons bénéficié sur place de la grande expérience de M. Mamadou Sow, agronome spécialiste du riz à l'IRAG, qui développe une rizière expérimentale de mangrove en y adaptant les techniques de dessalement des sols utilisées traditionnellement par les populations Balantes de Guinée Bissau.

Les essais ont été réalisés pendant la saison de pluies 2000 en utilisant une variété locale d'*Oryza sativa* appelée « Tamba Yéguéti » et adaptée aux sols salés et acides des rizières de mangrove. Quatre traitements ont été utilisés en pépinière :

- Un traitement engrais NPK (17-17-17) utilisé traditionnellement en rizière
- Un traitement inoculum ORS278 uniquement
- Un traitement NPK + inoculum ORS278
- Un traitement témoin absolu sans aucun apport d'engrais, ni d'inoculum

Les graines ont été semées en pépinière le 8 Juillet 2000 sur billons (figure 3A) et l'inoculation a été réalisée une semaine plus tard (14 Juillet) par la souche ORS278 en arrosant les jeunes plantules avec un arrosoir de 10 l d'eau stérile additionnée de 50 ml d'inoculum liquide contenant 10^9 bactéries/ml. L'inoculum appliqué sur les plantules de riz contenait donc 5×10^6 bactéries/ml. L'application d'engrais NPK a été faite au moment de l'inoculation.

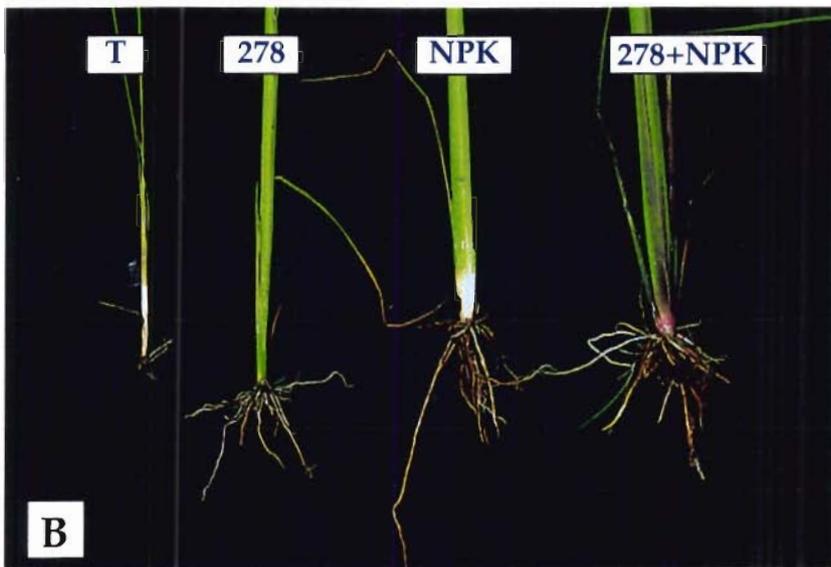


Figure 3 : Inoculation du riz africain avec la souche de *Bradyrhizobium* ORS278 en Guinée, en présence ou non d'engrais NPK, 22 jours après inoculation. **A** : vue générale de l'essai. **B** : Aspect des plants en fonction des différents traitements. **C** : Impact de l'inoculation en présence de NPK sur le système racinaire.

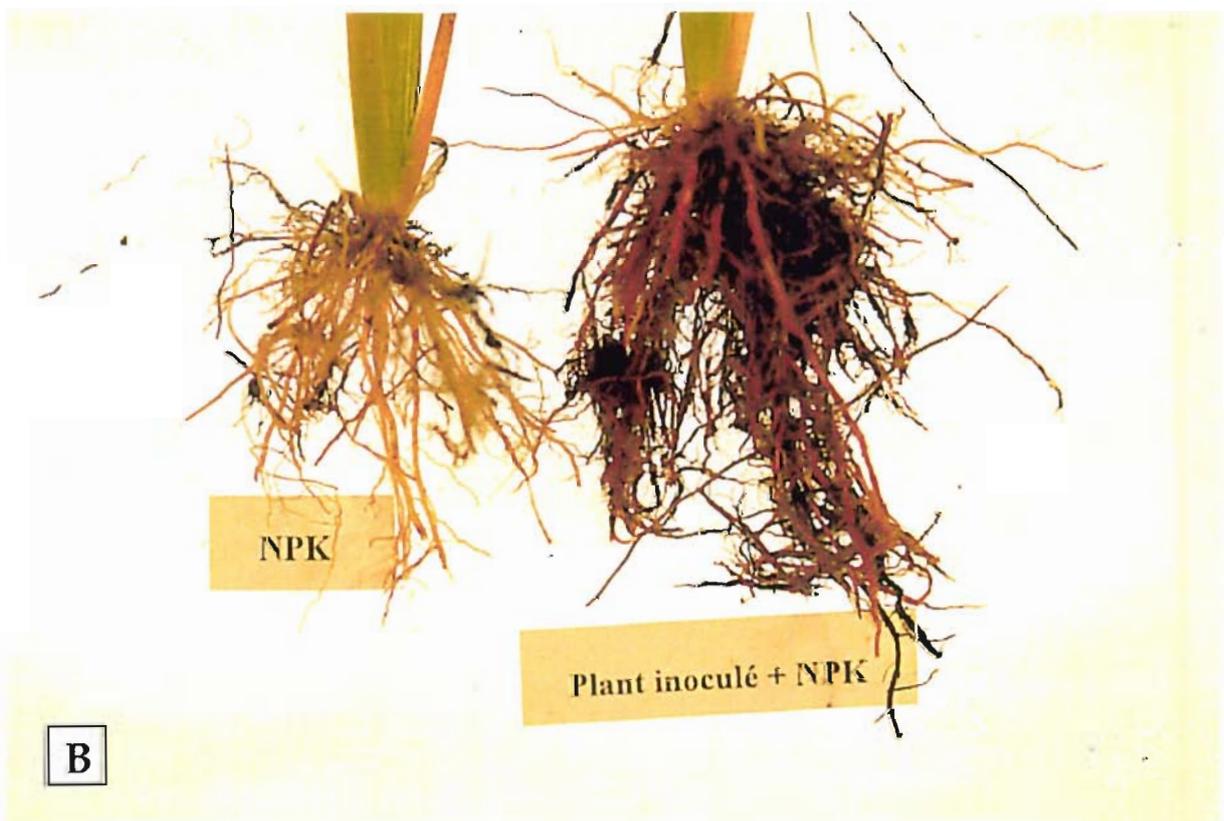


Figure 4 : Inoculation du riz africain avec la souche de *Bradyrhizobium* ORS278 en Guinée, en présence ou non d'engrais NPK, 40 jours après inoculation. **A** : Aspect des plants en fonction des différents traitements. **B** : Impact de l'inoculation en présence de NPK sur le système racinaire.

**Tableau 3. Analyse statistique (par Super Anova) des résultats obtenus lors de l'inoculation en pépinière du riz *Oryza sativa*, variété "Tamba végeti".
Oryza sativa, variété "Tamba végeti".**

Type III Sums of Squares

Source	df	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
traitement	3	29887,000	9962,333	356,961	,0001
Residual	196	5470,120	27,909		

Dependent: Longueur tige (cm)

Means Table

Effect: traitement

Dependent: Longueur tige (cm)

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Error
NPK	50	46,680	5,950	,841
R	50	33,280	4,010	,567
R+ NPK	50	61,180	4,610	,652
Témoin	50	30,380	6,236	,882

Student-Newman-Keuls

Effect: traitement

Dependent: Longueur tige (cm)

Significance level: ,01

	Count	Mean	
Témoin	50	30,380	a
R	50	33,280	b
NPK	50	46,680	c
R+ NPK	50	61,180	d

All were significantly different at this level.

Type III Sums of Squares

Source	df	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
traitement	3	2146,255	715,418	50,810	,0001
Residual	196	2759,740	14,080		

Dependent: Longueur racine(cm)

Means Table

Effect: traitement

Dependent: Longueur racine(cm)

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Error
NPK	50	10,860	3,057	,432
R	50	10,160	4,515	,638
R+ NPK	50	16,900	4,263	,603
Témoin	50	8,100	2,901	,410

Student-Newman-Keuls**Effect: traitement****Dependent: Longueur racine(cm)****Significance level: ,01**

	Count	Mean	
Témoin	50	8,100	a
R	50	10,160	b
NPK	50	10,860	c
R+ NPK	50	16,900	d

All were significantly different at this level.

Type III Sums of Squares

Source	df	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
traitement	3	369,545	123,182	56,160	,0001
Residual	196	429,910	2,193		

Dependent: Diamètre base de tige (mm)

Means Table**Effect: traitement****Dependent: Diamètre base de tige (mm)**

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Error
NPK	50	6,030	1,621	,229
R	50	4,020	,937	,132
R+ NPK	50	7,490	1,894	,268
Témoin	50	4,520	1,297	,183

Student-Newman-Keuls**Effect: traitement****Dependent: Diamètre base de tige (mm)****Significance level: ,01**

	Count	Mean	
R	50	4,020	a
Témoin	50	4,520	b
NPK	50	6,030	c
R+ NPK	50	7,490	d

All were significantly different at this level.

Une première observation des plants en pépinière a été réalisée 22 jours après le semis (figures 3A et 3B), soit 15 jours après l'inoculation. On observe une différence de croissance importante entre les différents traitements et, particulièrement, un effet positif très net de l'inoculation lorsque celle-ci est appliquée avec le traitement NPK. En effet, ce traitement NPK + inoculum présente la meilleure croissance en hauteur et les plants ont une coloration verte plus intense que les plants ayant reçu l'engrais NPK uniquement (figure 3A). De plus, le traitement NPK + ORS278 induit une largeur de la base de la tige beaucoup plus grande que dans tous les autres traitements (figure 3B). Ce critère est très important car il annonce en général un tallage du riz supérieur et donc une possible augmentation de rendement. Les plants inoculés avec la souche ORS278 sont de couleur jaunâtre, contrairement aux plants ayant reçu le traitement NPK. Cette couleur jaune est le signe d'une carence en azote et montre donc une absence de fixation d'azote par la souche ORS278 dans les racines du riz (figure 3B). Les plants de riz du témoin absolu n'ont presque pas poussé (figures 3A et 3B), ce qui confirme l'extrême pauvreté des sols. Nous avons également comparé les systèmes racinaires des différents traitements et avons remarqué que l'inoculation par la souche ORS278 + NPK induisait une importante croissance en longueur et en volume des racines du riz (figure 3C).

Ces premières observations à 22 jours ont été confirmées par des mesures (50 répétitions par traitements) effectuées 40 jours après les semis peu avant le repiquage du riz (45 jours) (figures 4A et 4B). Les résultats, portant sur la longueur de la partie aérienne, la largeur au collet, et la longueur des racines, sont donnés dans les tableaux 3 et 4. On remarque que tous les traitements sont significativement différents et que l'inoculation couplée à l'addition de NPK induit par rapport au traitement habituel de NPK seul, une augmentation très importante de 55% de la longueur de la racine, de 31% de la longueur de la tige et de 24% du diamètre au collet (tableau 4). Le traitement inoculation ORS278 seule diffère peu du témoin

Tableau 4. Pourcentages obtenus 40 jours après inoculation du riz africain « Tamba Yeguetei » en pépinière.

Paramètres	Longueur de tiges (%)	Longueur de racines (%)	Diamètre de la tige au collet (%)
<i>Rhizobium</i> + NPK / NPK	31	55	24
<i>Rhizobium</i> +NPK/ <i>Rhizobium</i>	83	66	86
<i>Rhizobium</i> + NPK / Témoin	101	108	65
<i>Rhizobium</i> / Témoin	9	25	- 11
NPK / <i>Rhizobium</i>	40	7	50
NPK / Témoin	53	34	33

absolu, sauf pour la longueur de la racine qui augmente de 25%. Ces résultats confirment qu'il n'y a pas de fixation d'azote par la souche ORS278, mais que celle-ci agit fortement sur la croissance racinaire du riz, ce qui explique sans doute l'augmentation importante de croissance du riz observée pour le traitement ORS278 + NPK.

C. DISCUSSION ET CONCLUSION

En inoculant au riz sauvage cultivé *in vitro* la souche recombinante marquée par le gène rapporteur *lacZ*, nous avons pu montrer que la souche ORS278, non seulement colonise rapidement et de façon intense la surface de la racine, mais aussi pénètre entre les cellules superficielles du cortex de la racine du riz, et parfois même à l'intérieur de quelques cellules. Nous avons ainsi montré que les *Bradyrhizobium* photosynthétiques et le riz sauvage étaient de véritables bactéries endophytes du riz sauvage. De plus, l'attachement de la souche ORS278 aux cellules de la coiffe est apparu spécifique dans la mesure où une souche témoin de *Bradyrhizobium* d'*Acacia mangium* ne possédait pas cette propriété. Il serait intéressant de vérifier si cette "spécificité" d'attachement n'est pas liée à la présence de pili de type IV, comme cela vient d'être montré chez *Azoarcus*, bactérie endophyte du riz (Plessl *et al.*, 2000). Dans ce dernier cas, l'induction des pili est sous la dépendance des gènes de l'opéron *pilAB*, qui s'exprime en conditions de carence en source d'énergie. Une colonisation artificielle des racines de différentes céréales avait déjà été obtenue par Al-Mallah *et al.*, (1989), Cocking *et al.*, (1992, 1995), et Gough *et al.*, (1996), après inoculation par plusieurs souches de *Bradyrhizobium*, la souche ORS310 d'*Aeschynomene*, (Alazard, 1991) ainsi que la souche CP23 isolée de la non légumineuse *Parasponia*. Contrairement à la souche ORS278 qui colonise l'ensemble de la racine, ces deux souches de rhizobium infectent préférentiellement les points d'émergence des racines latérales du riz, du blé et du maïs par "crack entry" et pénètrent par voie intercellulaire entre les premières assises des cellules du cortex racinaire. Cocking *et*

al., (1995) ont montré que la souche d'*Azorhizobium caulinodans* ORS571 était également capable d'infecter artificiellement suivant un même processus les racines du blé et du riz. D'autres bactéries fixatrices d'azote, dont *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, sont également naturellement présentes dans la rhizosphère ou les racines du riz (Bally *et al.*, 1983; Ladha, 1986; Watanabe et Barriquio, 1979; Chanway, 1996; Yanni *et al.*, 1997), et certaines d'entre elles sont considérées comme de véritables endophytes. Parmi celles-ci, les bactéries appartenant au genre *Azoarcus* sont naturellement associées à plusieurs variétés de riz sauvage ou cultivé d'Asie (Plessl *et al.*, 2000). Les résultats que nous avons obtenus confirment donc que l'habitat des rhizobiums au sens large ne se limite pas aux nodules des légumineuses et au sol, et montrent que les *Bradyrhizobium* photosynthétiques sont de véritables bactéries endophytes du riz sauvage.

L'inoculation en serre des racines de riz par les souches ORS2011 et ORS278 a permis d'obtenir une augmentation de croissance significative et un gain de rendement en grains compris entre 10 à 20%. Ces résultats ont été obtenus dans un sol relativement riche en azote, alors qu'aucune augmentation du rendement en grains n'est observée avec la même souche ORS278 dans un sol sableux très pauvre en azote. Par contre, dans cette dernière expérience, l'inoculation induit une nette croissance du système racinaire, ce qui implique un effet phytohormonal important de cette souche. Le même effet est observé au champ en pépinière où l'inoculation induit jusqu'à 55% d'augmentation de la longueur de la racine. Cet effet "rhizogénèse" permet sans doute une meilleure exploration du sol par les racines et peut parfaitement expliquer le gain de 31% de la longueur de la tige et de 24% du diamètre au collet. De plus, la fixation d'azote mesurée dans la rhizosphère du riz cultivé en serre est très faible, les plants inoculés en pépinière avec le rhizobium seul restent jaunes et ont une faible croissance. Toutes ces données suggèrent fortement que le facteur principal de l'association des *Bradyrhizobium* avec le riz n'est pas la

fixation de l'azote mais un effet hormonal agissant sur la croissance de la racine. Contrairement à la symbiose *Rhizobium*-Légumineuses où la capacité à fixer l'azote des bactéries représente un élément majeur indispensable à la croissance de la plante-hôte, l'association *Bradyrhizobium*-riz pourrait donc être caractérisée par une production d'hormone végétale par la bactérie.

On connaît déjà le cas de bactéries dites « PGPR » (Plant Growth Promoting Rhizobactéria) capables de produire des phytohormones qui peuvent ainsi induire des modifications du développement de la racine, bénéfiques pour la plante (Jacoud *et al.*, 1998 ; Fallik *et al.*, 1994). C'est le cas des bactéries appartenant à différents genres tels que *Acetobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Azorhizobium*, ou *Pseudomonas* qui ont été utilisées pour l'inoculation des céréales, avec des résultats positifs (Rolfe *et al.*, 1997, 2000 ; Webster *et al.*, 1997 ; Yanni *et al.*, 1997 ; Kennedy *et al.*, 1997 ; Reddy *et al.*, 1997 ; Jacoud *et al.*, 1999). Un des modes d'action les plus importants de ces bactéries PGPR sur les plantes concerne la production d'une auxine : l'acide indole acétique (AIA), connue pour son pouvoir rhizogène.

Très récemment, Prithiviraj *et al.*, (2000) ont également montré que les facteurs de nodulation (facteurs Nod) purifiés de *Bradyrhizobium japonicum* appliqués à très faible concentration (10^{-9} à 10^{-12} M) sur des graines en germination de céréales et de tomate induisaient une augmentation très significative de l'élongation de la racine. Ainsi, la souche ORS278 pourrait produire des facteurs Nod qui induiraient, comme une phytohormone, l'augmentation observée de la croissance racinaire. Cette hypothèse ne pourra cependant être vérifiée que lorsque nous aurons réussi à caractériser les gènes *nod* codant pour la biosynthèse des facteurs Nod de cette souche.

Nous avons d'autre part montré que le choix d'une souche comme inoculum était très important puisque certaines souches de *Bradyrhizobium* photosynthétiques

avaient un effet négatif sur la croissance du riz et le rendement en grains. L'effet de l'inoculation du riz dépend donc de la souche sélectionnée. Une telle diversité dans la réponse à l'inoculation avait déjà été observée par Yanni *et al.*, (1997) sur le riz inoculé par diverses souches de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Dans notre système *Bradyrhizobium*-riz, nous pouvons donc recommander la souche ORS278 comme la meilleure souche sélectionnée. Sur le plan appliqué, il sera cependant important, afin de limiter l'emploi d'engrais azoté très coûteux pour les paysans africains, de vérifier si l'effet phytohormonal de cette souche ORS278 permet également de diminuer la quantité d'engrais azoté nécessaire à la culture de riz. Les expériences actuellement en cours dans les rizières de Guinée devraient répondre à la plupart de ces questions.

CHAPITRE III:

**Recherche des mécanismes intervenant dans
l'association *Bradyrhizobium* photosynthétique-riz
sauvage *Oryza breviligulata***

A. INTRODUCTION

Chez les rhizobiums, deux familles de gènes jouent un rôle clef dans l'interaction avec les Légumineuses : Les gènes de nodulation (gènes *nod*) interviennent dans la reconnaissance entre la plante et la bactérie et vont induire chez la plante, une réponse cellulaire aboutissant à la formation de nodules et, les gènes de fixation d'azote (gènes *nif*) qui permettent à la bactérie de transformer l'azote atmosphérique en ion ammonium assimilable par la plante.

L'objectif initial du travail rapporté dans ce chapitre était donc de savoir si ces gènes symbiotiques étaient exprimés dans l'association avec le riz, et quel rôle ils y jouaient. La première étape de mon travail a donc consisté à caractériser (ou tenter de caractériser) les gènes *nod* et les gènes *nif* de la souche type ORS278 afin d'obtenir des mutants bactériens qui nous permettent de répondre aux deux questions suivantes : 1) Les facteurs de nodulation (facteurs Nod) sont-ils produits au cours de l'infection du riz comme dans la symbiose avec les légumineuses, 2) Le riz bénéficie-t-il de la fixation d'azote de la bactérie, ou au contraire, comme le laissent supposer les résultats présentés dans le chapitre précédent, l'activité nitrogénase et le transfert d'azote fixé vers le riz sont ils marginaux ?

La stratégie envisagée pour répondre à ces deux questions a donc été d'isoler les gènes bactériens correspondant aux gènes de nodulation (gènes *nod*) et aux gènes de fixation d'azote (gènes *nif*), puis de les muter à l'aide d'un gène rapporteur afin d'étudier leur expression et leurs effets au cours de l'infection du riz.

Nous n'avons cependant pu répondre qu'en partie aux objectifs que nous nous étions fixés. En effet, alors que chez tous les rhizobiums connus, les gènes *nod* communs sont conservés et peuvent ainsi être facilement isolés par PCR, nous n'avons pu, malgré les différentes et nombreuses stratégies utilisées (PCR, complémentation fonctionnelle, hybridation ADN/ADN), isoler les gènes de nodulation de la souche ORS278 ni ceux des *Bradyrhizobium* endophytes appartenant au groupe III. Nous avons alors été amenés à étendre notre étude aux gènes *nod* des *Bradyrhizobium* d'*Aeschynomene* des groupes I et II dont nous avons pu isoler et caractériser les gènes *nodA*. La réalisation d'une banque d'ADN génomique de la souche ORS285, souche type du groupe II, nous a permis de caractériser le cluster *nodABC* de cette souche.

Pour l'isolement des gènes *nif*, nous avons utilisé une banque d'ADN génomique de la souche ORS278 qui était déjà disponible au laboratoire. Le travail rapporté dans ce chapitre décrit l'identification, le clonage, et le séquençage du cluster *nifHDK* de cette souche. La caractérisation de l'opéron *nifHDK* d'ORS278 nous a ensuite permis la construction d'un mutant (*nif*⁻) non fixateur d'azote. Nous avons étudié l'expression des gènes *nif* à l'aide de ce mutant au cours de la colonisation et l'infection du riz. Par ailleurs, afin de compléter les mesures effectuées en serre (voir chapitre II), nous avons mesuré, par la méthode de réduction d'acétylène (ARA), l'activité fixatrice d'azote de la souche ORS278 inoculée *in vitro* aux racines du riz.

Tableau 1. Couples d'amorces utilisés pour l'isolement des gènes *nod* chez la souche ORS278 et chez d'autres souches du groupe III.

N°	Couple d'amorces	Séquences des amorces
1	<i>nodA1f</i> <i>nodAb1r</i>	5'-TGC-RGT-GGA-ARN-TRB-VYT-GGG-AAA- 3' 5'-GGN-CCG-TCR-TCR-AAS-GTC-ARG-TA- 3'
2	<i>nodAf brad</i> <i>nodAr brad</i>	5'-GTY-CAG-TGG-AGS-STK-CGC-TGG-G- 3' 5'-TCA-CAR-CTC-KGG-CCC-GTT-CCG- 3'
3	<i>nodA2.322f</i> <i>nodA2. 322r</i>	5'-ACG-CGC-AGC-CCT-TCG-AAG-GT- 3' 5'-GTA-CGC-GAA-CTC-CAG-GGG-TC- 3'
4	<i>nodAf brad</i> <i>nodAb1r</i>	5'-GTY-CAG-TGG-AGS-STK-CGC-TGG-G- 3' 5'-GGN-CCG-TCR-TCR-AAS-GTC-ARG-TA- 3'
5	<i>nodAunivf145c</i> <i>nodAr brad</i>	5'-TGG-GCS-GGN-GCN-AGR-CCT-GA- 3' 5'-TCA-CAR-CTC-KGG-CCC-GTT-CCG- 3'
6	<i>nodAunivf145c</i> <i>nodB1r</i>	5'-TGG-GCS-GGN-GCN-AGR-CCT-GA- 3' 5'-GGN-CCG-TCR-TCR-AAS-GTC-ARG-TA- 3'
7	<i>nodAunivf145u</i> <i>nodAr brad</i>	5'-TGG-GCS-GGN-GCN-AGR-CCB-GA- 3' 5'-TCA-CAR-CTC-KGG-CCC-GTT-CCG- 3'
8	<i>nodAunivf145u</i> <i>nodB1r</i>	5'-TGG-GCS-GGN-GCN-AGR-CCB-GA- 3' 5'-GGN-CCG-TCR-TCR-AAS-GTC-ARG-TA- 3'
9	<i>nodC 538f</i> <i>nodC 830r1</i>	5'-ATY-GAY-ATG-GAR-TAY-TGG-CT- 3' 5'-CTN-CGN-GCC-CAR-CGN-AGT-TGY-TG- 3'
10	<i>nodC 538f</i> <i>nodC 830r2</i>	5'-ATY-GAY-ATG-GAR-TAY-TGG-CT- 3' 5'-CTN-CGN-GCC-CAR-CGN-AGT-TG- 3'
11	<i>nodC 554f</i> <i>nodC 830r2</i>	5'-ATG-GAR-TAY-TGG-CTN-GSB-TGY-AA- 3' 5'-CTN-CGN-GCC-CAR-CGN-AGT-TG- 3'
12	<i>nodAunivf277bradu</i> <i>nodB76r</i>	5'-GCN-GTN-CGN-CCN-GAY-CTN-GA- 3' 5'-GGR-TKN-GNN-CCR-TCR-TCR-AAN-GT- 3'
13	<i>nodAunivf277bradu</i> <i>nodB229r</i>	5'-GCN-GTN-CGN-CCN-GAY-CTN-GA- 3' 5'-TCN-GGR-TGN-GTC-ATN-GTR-TG- 3'
14	<i>nodAunivf145u</i> <i>nodB229r</i>	5'-TGG-GCS-GGN-GCN-AGR-CCB-GA- 3' 5'-TCN-GGR-TGN-GTC-ATN-GTR-TG- 3'
15	<i>nodAunivf145brad</i> <i>nodB229r</i>	5'-TGG-GCC-GGY-GCR-MGR-CCT-GA- 3' 5'-TCN-GGR-TGN-GTC-ATN-GTR-TG- 3'
16	<i>nodAunivf145brad</i> <i>nodAunivr277bradu</i>	5'-TGG-GCC-GGY-GCR-MGR-CCT-GA- 3' 5'-GCN-GTN-CGN-CCN-GAY-CTN-GA- 3'
17	278 <i>nodCf</i> 278 <i>nodCr</i>	5'-ATG-TGC-TGC-TGT-GGS-CCR-TGC-GC- 3' 5'-AGG-CCG-TCT-GGA-ACR-ACT-GT- 3'
18	TSnodD 1 a TSnodB1	5'-CAG-ATC-NAG-DCC-BTT-GAA-RG-CA- 3' 5'-AGG-ATA-YCC-GTC-GTG-GTG-CAG-GAG-CA- 3'
19	TSnodD 1 b TSnodB1	5'-CAG-ATC-NAG-DCC-BTT-GAA-CCG-CA- 3' 5'-AGG-ATA-YCC-GTC-GTG-GTG-CAG-GAG-CA- 3'

B. RESULTATS

1. Essai d'isolement des gènes de nodulation chez ORS278

Nous avons entrepris d'isoler les gènes de nodulation de la souche ORS278 pour étudier leur rôle dans l'interaction *Bradyrhizobium*-riz. Pour cela plusieurs stratégies ont été utilisées.

1.1. Isolement par PCR

Nous avons utilisé différents couples d'amorces dégénérés correspondant à différentes régions consensus des gènes *nod* communs (gènes *nodABC*) pour amplifier la région *nod* correspondante chez ORS278 (Tableau 1).

Quelque soit le couple d'amorce utilisé, le programme de PCR employé, aucun produit d'amplification de la taille attendue n'a été obtenu avec l'ADN génomique de la souche ORS278. Suite à ces essais infructueux sur la souche ORS278, nous avons testé les différentes amorces précédemment définies sur quelques souches isolées du riz ainsi que sur différentes souches d'*Aeschynomene* du groupe III, groupe auquel appartient la souche ORS278. Dans certains cas et à l'aide de certaines amorces, de rares produits d'amplification ont pu être obtenus, mais leurs séquençages ont révélé qu'ils correspondaient à des amplifications non spécifiques.

Nous avons donc essayé une autre stratégie, la complémentation fonctionnelle.

1.2. Isolement par complémentation

Pour cela, nous avons commencé par construire une banque d'ADN génomique de la souche ORS278 à l'aide d'un cosmide (plasmide pCPP47i) qui est stable dans toute une série de bactéries Gram⁻. Deux méthodes ont été alors employées :

- La complémentation fonctionnelle d'un *Bradyrhizobium japonicum nod⁻* (La souche AN279 chez laquelle le gène *nodB* a été disrupté) par différents pools de la banque d'ADN génomique de la souche ORS278. Après un croisement tripartite avec la souche S17-1, les transformants ont été inoculés massivement à des plants de *Macroptilium atropurpureum* (Siratro), espèce à large spectre d'hôte nodulée par les *Bradyrhizobium*. Un mois après inoculation, aucun nodule ne s'est formé sur les racines des plantes inoculées, ce qui suggère que cette complémentation n'a pas fonctionné. Nous avons alors essayé une seconde méthode :

- L'extension du spectre d'hôte des souches isolées des groupes I (ORS272, ORS302), et II (ORS347) aux *Aeschynomene* du groupe III. Afin de clarifier nos résultats, rappelons que trois groupes d'inoculation croisée ont été définis chez les *Aeschynomene* (Alazard, 1985). Le groupe I ne forme jamais de nodules de tiges et est nodulé par des *Bradyrhizobium* non photosynthétiques, à large spectre d'hôte. Le groupe II et III forment des nodules de tiges. Le groupe III, très spécifique est exclusivement nodulé par des *Bradyrhizobium* photosynthétiques.

Trois croisements en masse indépendants ont donc été réalisés en présence de la souche S17-1, entre chacune des trois souches des groupes I et II et différents pools

de la banque d'ADN génomique de la souche ORS278. Après croisement, des inoculations massives des plantes d'*Aeschynomene sensitiva* appartenant au groupe III ont été réalisées. Dans ce cas également, aucun nodule ne s'est formé sur les plantes d'isolement. Cette seconde approche ne nous a donc pas non plus permis d'isoler les gènes de nodulation chez la souche ORS278. Nous avons donc essayé une dernière stratégie, l'hybridation sonde froide.

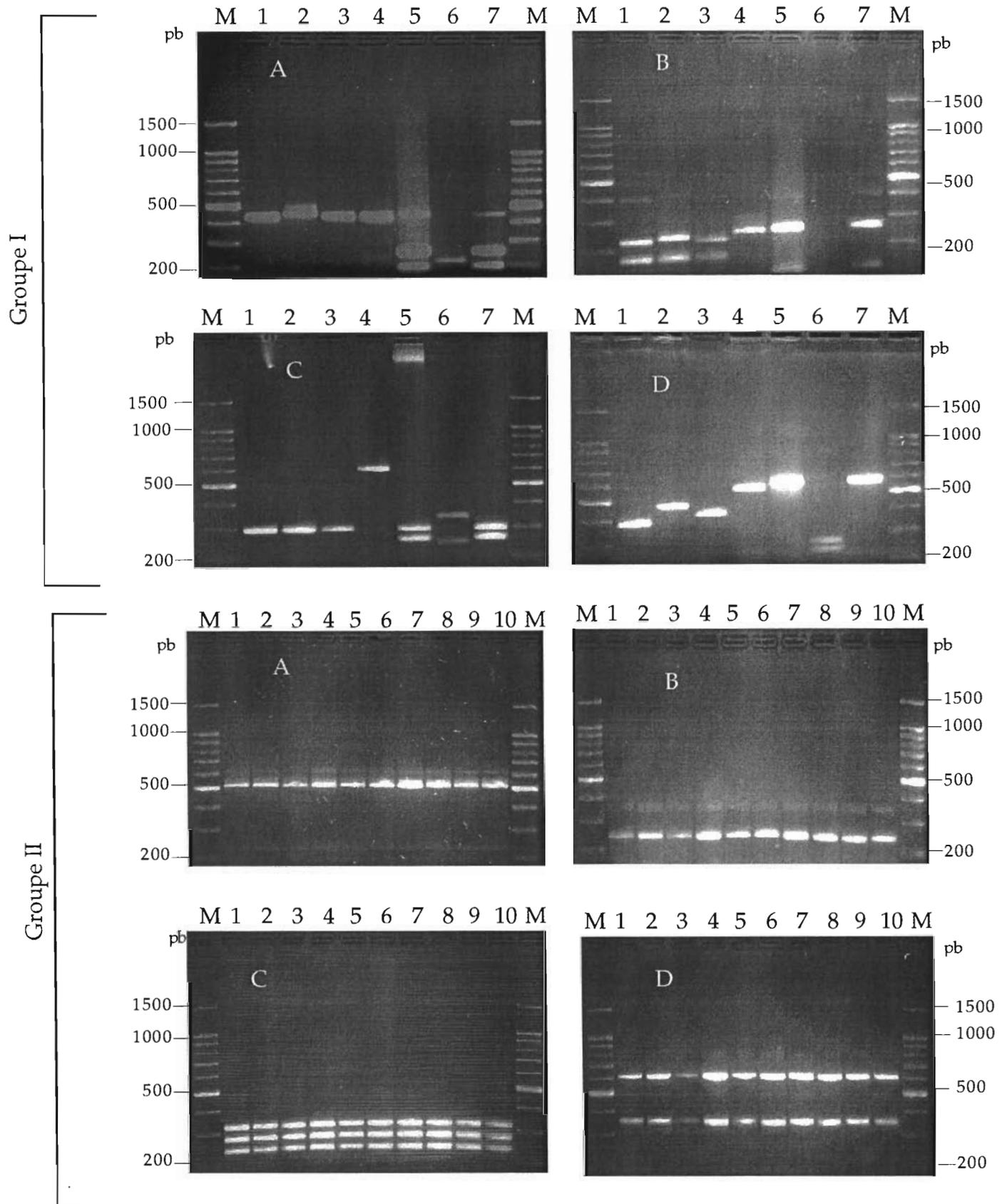
1.3. Isolement par hybridation

L'ADN génomique de la souche ORS278 a été digéré par différentes enzymes de restrictions (*EcoR* I, *BamH* I, *Hind* III, *EcoR* I / *BamH* I). Les fragments d'ADN ont été séparés par migration sur gel d'agarose et transférés sur membrane de nylon. La membrane a été hybridée avec 2 sondes correspondant aux gènes *nodABC* de *Bradyrhizobium japonicum* et de la souche ORS285.

Aucun signal d'hybridation n'a été observé, même en utilisant des conditions de faible stringence pour les lavages des sondes. Cette dernière stratégie a donc été également vouée à l'échec.

Face à toutes ces difficultés, nous avons abandonné notre idée initiale d'essayer de construire un mutant *nod*⁻ des *Bradyrhizobium* photosynthétiques d'*Aeschynomene* du groupe III pour étudier le rôle de ces gènes au cours de l'interaction *Bradyrhizobium*-riz. Cependant, il nous est apparu intéressant de voir si cette difficulté d'isolement des gènes *nod* était un problème lié uniquement à ce groupe spécifique de *Bradyrhizobium* photosynthétiques. Pour cela, nous avons isolé et étudié la diversité des gènes *nod* chez les autres *Bradyrhizobium* photosynthétiques et non photosynthétiques d'*Aeschynomene* associés aux groupes de nodulation I et II.

Figure 1. Analyse des Profils de restriction du gène *nodA* isolés des *Bradyrhizobium* du groupe I et du groupe II. A, *Sau96* I; B, *Hae* III; C, *Hinf* I et D, *Bcn* I.



Groupe I, puits: M, Marqueur de poids moléculaire de 100 paires de bases (pb); 1, ORS301; 2, ORS302; 3, ORS304; 4, ORS305; 5, ORS309; 6, ORS336; 7, ORS358.

Groupe II, puits: M, Marqueur de poids moléculaire de 100 paires de bases (pb); 1, ORS285; 2, ORS287; 3, ORS320; 4, ORS322; 5, ORS324; 6, ORS335; 7, ORS352; 8, ORS353; 9, ORS357; 10, ORS362.

2. Diversité des gènes *nod* chez les *Bradyrhizobium* photosynthétiques et non photosynthétiques d'*Aeschynomene* des groupes I et II.

Nous avons abordé la diversité des gènes *nod* chez les *Bradyrhizobium* d'*Aeschynomene* par l'étude du gène *nodA*. Ce gène est impliqué dans le transfert de la chaîne acyl au squelette chitine oligosaccharide lors de la synthèse des facteurs Nod. Il a été choisi d'une part parce qu'il est commun et unique à l'ensemble des rhizobia, et d'autre part, parce c'est un bon marqueur de nodulation (Boivin et Giraud, 1999). Nous avons isolé ce gène par PCR sur une quinzaine de souches de *Bradyrhizobium* d'*Aeschynomene* appartenant aux groupes I et II.

2.1. Chez les souches non photosynthétiques des groupes I et II

La région *nodA* de cinq souches du groupe I (ORS301, ORS302, ORS304, ORS305, et ORS309) et de deux souches du groupe II (ORS336 et ORS358) non photosynthétiques, a pu être amplifiée à l'aide du couple d'amorces dégénérées *nodA*_{brad} (5'-GTY-CAG-TGG-AGS-STK-CGC-TGG-G-3')/*nodA*_{rbrad} (5'-TCA-CAR-CTC-KGG-CCC-GTT-CCG-3'). Ce couple d'amorces a été déterminé à partir de régions consensus, définies après alignement des gènes *nodA* déjà décrits chez différentes espèces de bradyrhizobia. Pour la réaction de PCR, nous avons utilisé le programme d'amplification « Touch down » (voir matériels et méthodes).

Le produit d'amplification obtenu pour chaque souche a été hydrolysé par 4 endonucléases de restriction (*Hae* III, *Hinf* I, *Sau*96 I, *Bcn* I) et les fragments résultants ont été séparés par électrophorèse.

Les résultats d'analyses PCR-RFLP de la région *nodA* des souches non photosynthétiques du groupe I et II (Figure 1) révèlent l'existence d'une grande diversité de ce gène entre ces différentes souches.

2.2. Chez les souches photosynthétiques du groupe II

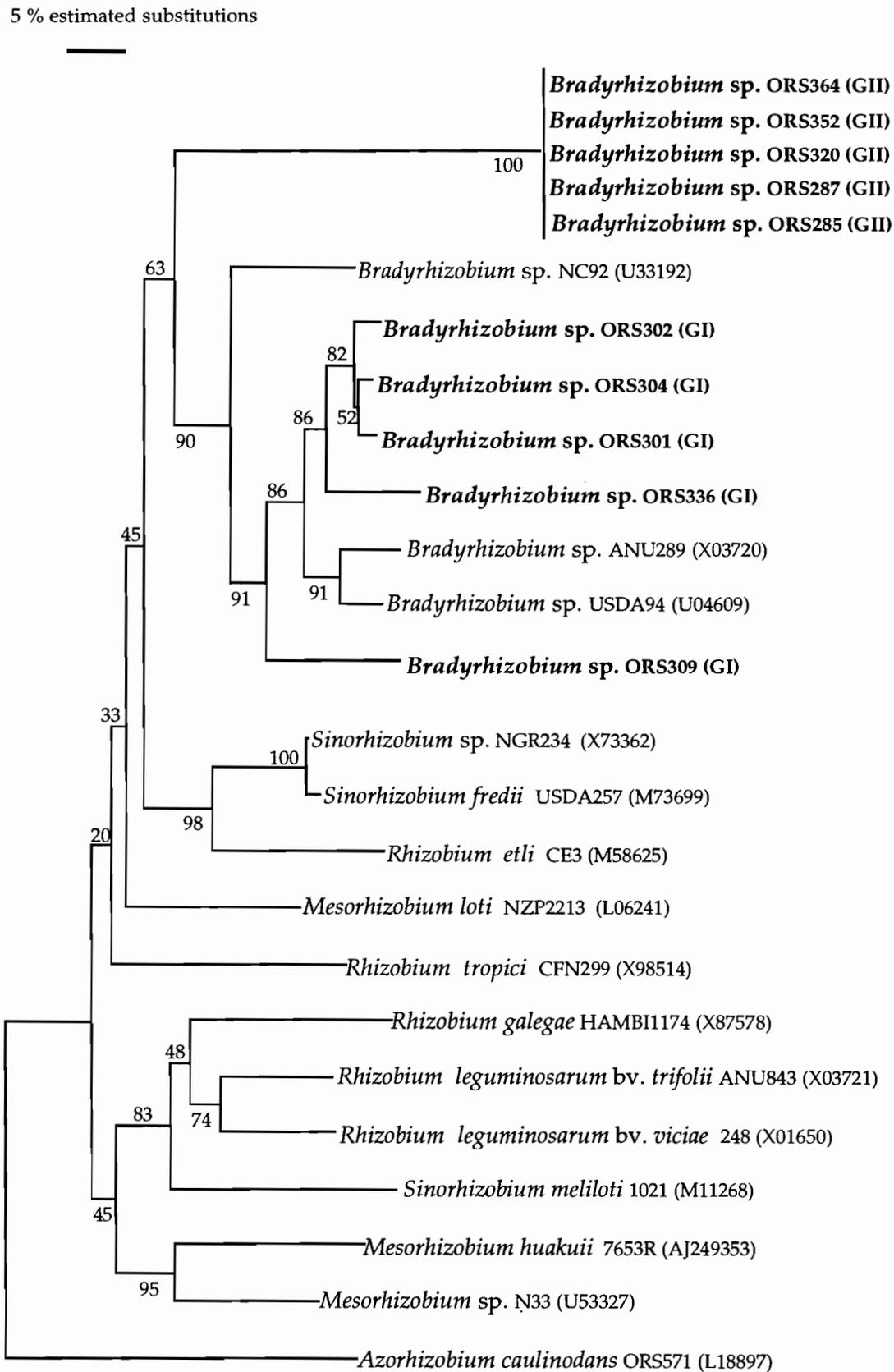
Nous avons étudié au total 10 souches (ORS285, ORS287, ORS320, ORS322, ORS324, ORS335, ORS352, ORS353, ORS357 et ORS362) appartenant au groupe II photosynthétique. Un couple d'amorces *nodA1f* (5'-TGC-RGT-GGA-ARN-TRB-VYT-GGG-AAA-3') / *nodB1r* (5'-GGN-CCG-TCR-TCR-AAS-GTC-ARG-TA-3') (Haukka *et al.*, 1998) nous a permis d'amplifier le gène *nodA* chez ces souches. L'amplification du gène et l'étude du polymorphisme par PCR-RFLP ont été réalisées comme précédemment.

Les résultats d'analyses PCR-RFLP de la région *nodA* des souches du groupe II (Figure 1) montrent que tous les profils de RFLP sont identiques quelque soit l'enzyme de restriction utilisée. Le gène *nodA* apparaît ainsi fortement conservé chez les souches du groupe II.

3. Séquençage de différents gènes *nodA*

Le produit de PCR *nodA* de certaines souches photosynthétiques et non photosynthétiques représentantes du groupe I et II a été séquencé et l'analyse des séquences par comparaison avec celles déjà disponibles dans GenBank (procédure BLAST) confirme bien qu'il s'agit dans tous les cas de gène *nodA*. La comparaison des séquences (figure 2) entre elles confirme les résultats précédemment obtenus à savoir :

Figure 3. Dendrogramme basé sur la comparaison des séquences du gène *nodA* obtenu par la méthode du neighbour-joining et montrant la position phylogénétique des *Bradyrhizobium* appartenant aux groupes I et II (en caractères gras) parmi les autres rhizobia.



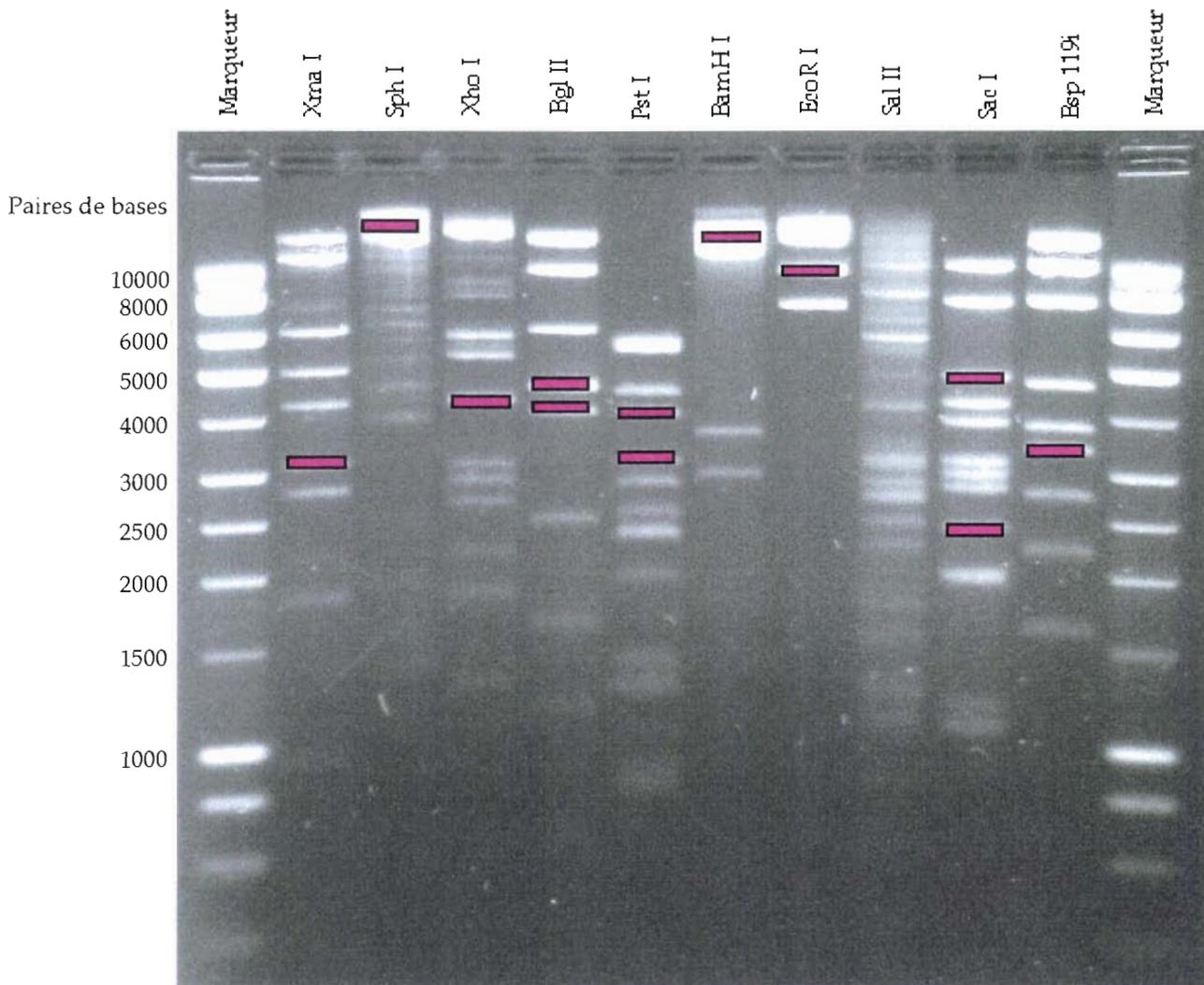
Les numéros entre parenthèses correspondent aux numéros d'accès des séquences dans GenBank. Les valeurs de bootstrap significatives sont indiquées aux points d'embranchement. L'échelle représente le pourcentage de substitutions.

- Un degré élevé de polymorphisme du gène *nodA* chez les souches non photosynthétiques des groupes I et II avec un pourcentage d'homologie variant de 73,78 à 96,62%.
- Une parfaite conservation de ce gène (100% de similarité) chez les souches photosynthétiques du groupe II.

L'arbre phylogénétique (Figure 3) construit à partir des séquences *nodA* des *Bradyrhizobium* des groupes I et II nous montre que les souches appartenant au groupe II photosynthétique constituent un groupe à part, avec un gène *nodA* très différent et distinct de celui des *Bradyrhizobium* décrits à ce jour. Les séquences *nodA* de ces *Bradyrhizobium* photosynthétiques du groupe II présentent seulement 63% de similarité avec les séquences *nodA* des autres *Bradyrhizobium* déjà décrits. Inversement les séquences *nodA* des *Bradyrhizobium* non photosynthétiques des groupes I et II sont assez proches de ceux des autres *Bradyrhizobium* déjà décrits avec un fort pourcentage de similarité variant de 80 à 88%.

Ces résultats sont en accord avec l'analyse phylogénétique réalisée sur ces souches par Molouba *et al.*, (1999) qui montraient que les *Bradyrhizobium* photosynthétiques d'*Aeschynomene* se regroupent dans un cluster homogène et distinct des autres *Bradyrhizobium*, alors que les isolats non photosynthétiques des *Aeschynomene* se répartissent au niveau des différentes espèces de *Bradyrhizobium* décrites (*B. elkanii*, *B. japonicum*).

La forte divergence des séquences *nodA* des *Bradyrhizobium* photosynthétiques du groupe II nous a incité à caractériser les gènes *nodABC* commun d'un représentant de ce groupe. Nous avons choisi la souche ORS285 pour notre étude. C'est une souche isolée des nodules de tiges d'*Aeschynomene afraspera* (Molouba *et al.*, 1999), elle est photosynthétique et nodule aussi bien les *Aeschynomene* du groupe II que ceux du groupe III.



■ Fragment d'ADN hybridant avec la sonde A.

Figure 4. Analyse par hybridation des profils de restriction du clone STM75.

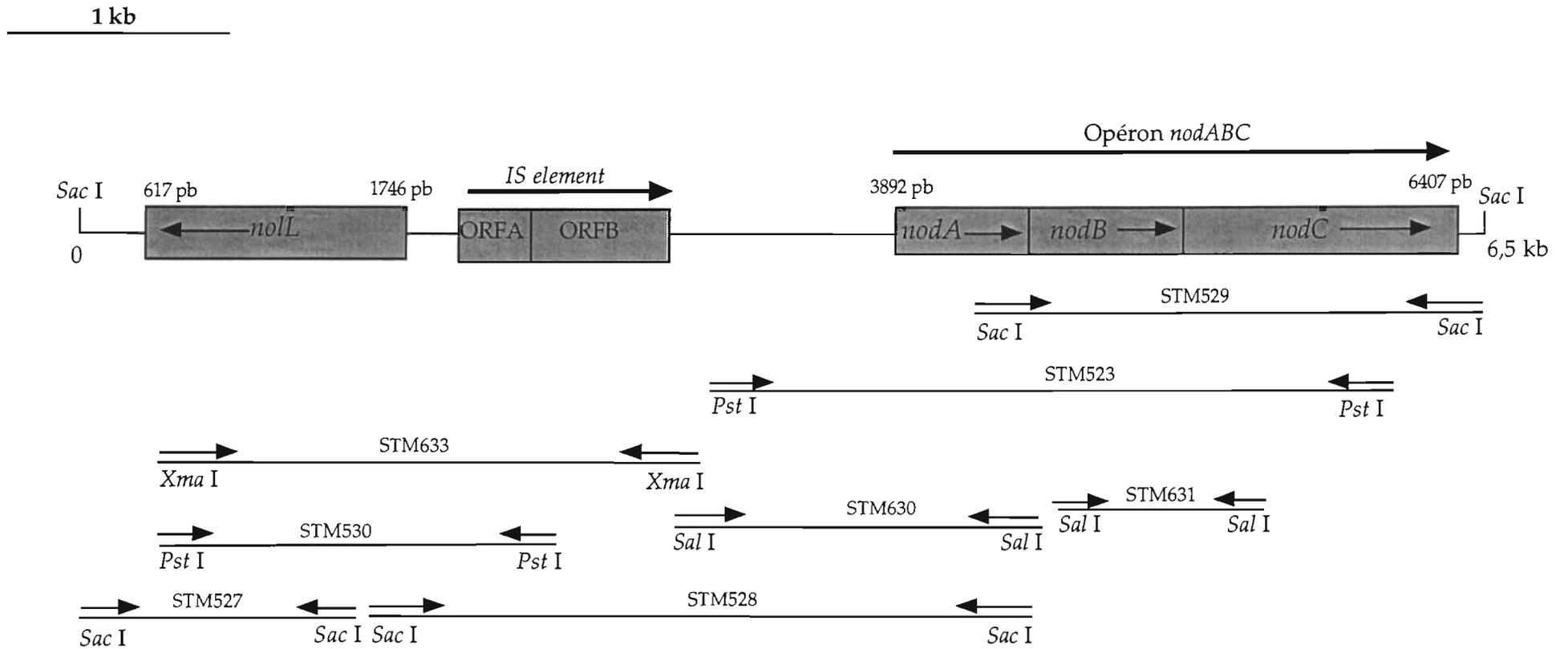


Figure 5. Organisation des gènes de nodulation (*nodABC*) chez la souche ORS285 et localisation des différents fragments sous clonés pour le séquençage.

4. Caractérisation de l'opéron *nodABC* chez la souche ORS285

Afin d'isoler entièrement les gènes *nod* communs de la souche ORS285, nous avons été amenés à réaliser une banque d'ADN génomique de cette bactérie. Le cosmide SuperCos 1 de Stratagene a été utilisé comme vecteur de clonage. La banque obtenue contient environ 1920 clones représentatifs du génome de la souche ORS285.

Le screening de la banque a été réalisé par PCR en utilisant le couple d'amorces *nod*Asp.285f (5'-ACG-CGC-TCC-CGT-TCA-TGT-CG-3') / *nod*Asp.285r (5'-GAA-ATA-CAA-GCA-CCA-ACG-GC-3') spécifique du gène *nodA* des *Bradyrhizobium* photosynthétiques du groupe II.

Six clones positifs ont été ainsi isolés par PCR et confirmés par hybridation en utilisant une sonde (sonde A) correspondant au gène *nodA* de la souche ORS285. Le clone STM75 qui contient un insert d'environ 35 kb a été retenu. Nous avons alors cherché à sous cloner la région correspondante uniquement au gène *nodABC*. Pour cela, le clone STM75 a été digéré par différentes enzymes de restriction (figure 4) et les fragments de restriction obtenus ont été séparés sur gel d'agarose, transférés sur membrane de nylon et hybridés avec la sonde A. Plusieurs fragments d'ADN d'une taille comprise entre 2 et 6 kb, hybridant avec la sonde A, ont été sous clonés dans du pUC 18 (figure 4) et les extrémités de ces fragments ont été séquencées à l'aide des amorces universelles *M13f/M13r*, pour confirmer qu'ils correspondaient bien à la région des gènes *nod*.

Une région de 6,5 kb qui contient le gène *nodABC* de la souche ORS285 a été ainsi entièrement isolée et séquencée (Figure 5). La séquence a été déposée dans GenBank sous le numéro d'accès AF284858. Cette région contient quatre phases ouvertes de lecture (ORF) codant des protéines présentant des similarités avec des

protéines Nod connues. Basées sur leur similarité de séquences, 3 de ces ORF localisées de la position 3892 à 6407 ont été désignées comme les gènes *nodA*, *nodB* et *nodC*. Ces trois gènes présentent la même organisation que celle retrouvée chez la majorité des rhizobia. La séquence *nodB* présente 62% à 61% d'homologie avec la séquence des gènes *nodB* des autres *Bradyrhizobium* disponibles dans GenBank et la séquence du gène *nodC* présente 63% d'homologie avec celle de la souche N33 de *Rhizobium* sp., et 53% d'homologie avec le gène *nodC* de la souche SNU001 de *Bradyrhizobium* sp. La quatrième ORF localisée entre la position 1746 et 617 montre 55% de similarité avec le gène *nolL* de *Rhizobium elti*. Ce gène *nolL* est responsable de l'acétylation du résidu fucosyl des facteurs de nodulation (Corvera *et al.*, 1999) ce qui suggère que les facteurs Nod des souches photosynthétiques du groupe II sont fucosylés. En effet, au cours de notre étude nous avons isolé chez la souche ORS285 une région correspondant au gène *nodZ*. Cette région a été isolée par PCR en utilisant le couple d'amorce TS*nodZ*4 (-AAT-RTC-TTC-GCC-RTT-RCC-RTG-CC-) et TS*nodZ*5b (-ACC-GGS-TTT-GGT-GAC-TGY-YTW-TG-).

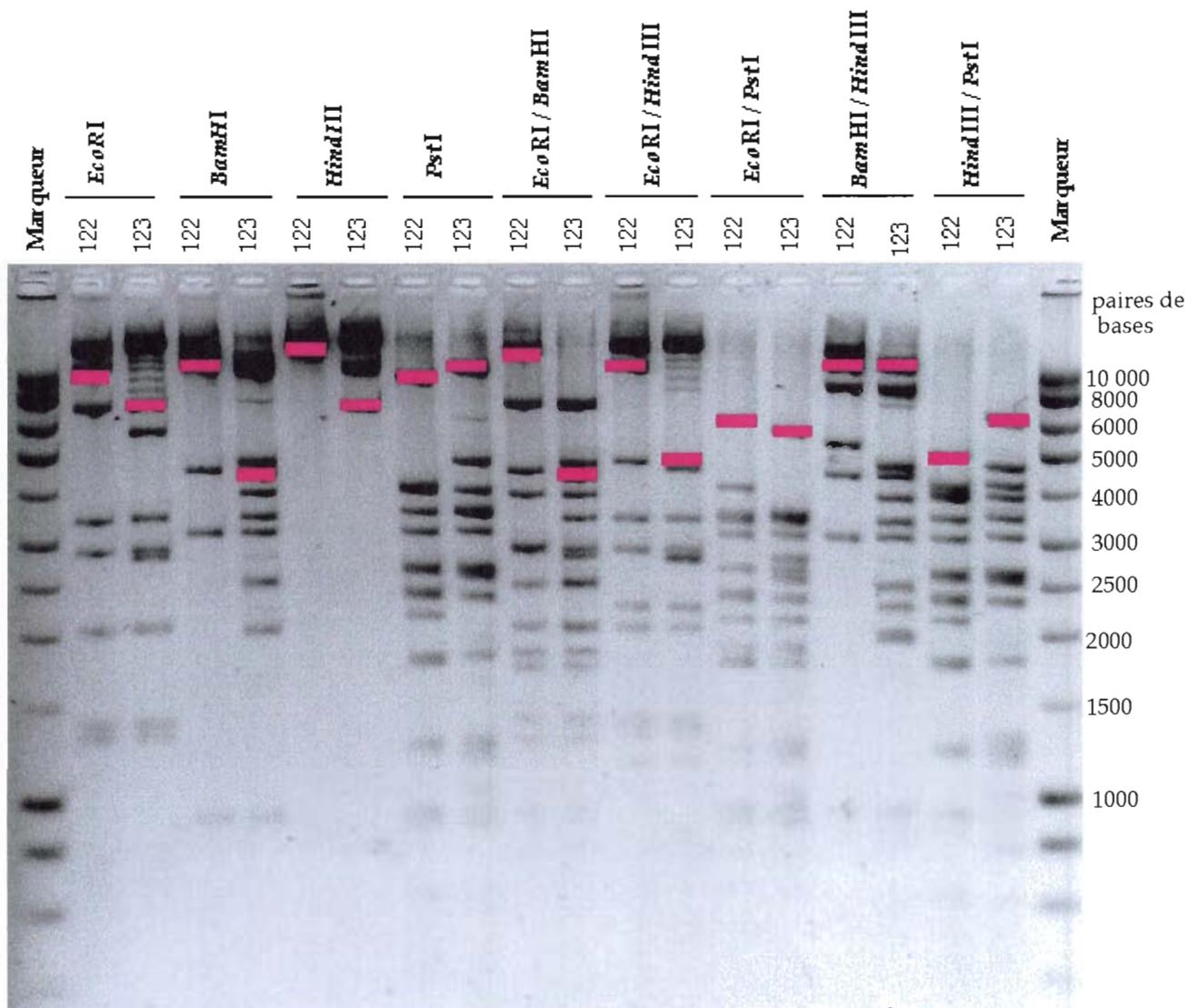
Le produit du gène *nodZ* intervient dans la fucosylation et la 6-O-arabinosylation des facteurs Nod (Stacey *et al.*, 1994). Il est à noter que le caractère fucosylé des facteurs Nod semble être une propriété commune chez les *Bradyrhizobium* étudiés à ce jour (Sanjuan *et al.*, 1992 ; Carlson *et al.*, 1993).

De façon surprenante, la région de 4 kb séquencée en amont du gène *nodA* ne révèle pas la présence du gène *nodD*, ce qui est différent de l'organisation généralement rencontrée chez la plupart des rhizobia. Par contre nous observons entre le gène *nodA* et le gène *nolL*, la présence d'une séquence d'insertion appelée IS (pour « Insertion element ») présentant une forte homologie avec les séquences IS de la famille IS3 (Mahillon *et al.*, 1988). L'analyse de cette séquence IS de la souche ORS285 montre deux ORFs, ORFA et ORFB (Figure 5).

Tableau 2. Amplification de la région IS chez différentes souches de *Bradyrhizobium* d'*Aeschynomene* et du riz sauvage (avec le couple d'amorces ISf / ISr).

Souches	Groupe	bchl <i>a</i>	ISf / ISr *
ORS301	I	-	-
ORS302	I	-	-
ORS304	I	-	-
ORS305	I	-	-
ORS309	I	-	-
ORS377	I	-	-
ORS379	I	-	-
ORS336	II	-	-
ORS358	II	-	-
ORS347	II	-	-
ORS364	II	+	+
ORS320	II	+	+
ORS322	II	+	+
ORS324	II	+	+
ORS285	II	+	+
ORS287	II	+	+
ORS335	II	+	+
ORS353	II	+	+
ORS357	II	+	+
ORS362	II	+	+
ORS363	II	+	+
ORS268	III	+	-
ORS277	III	+	-
ORS278	III	+	-
ORS279	III	+	-
ORS282	III	+	-
ORS371	III	+	-
ORS380	III	+	-
BTAi1	III	+	-
ORS2007	III	+	-
ORS2009	III	+	-
ORS2008	III	+	-
ORS2010	III	+	-
ORS2011	III	+	-
ORS2012	III	+	-
ORS2013	III	+	-
ORS2014	III	+	-

* + : obtention d'un produit d'amplification de 1300 pb ; - : Pas d'amplification.
bchl, bactériochlorophylle.



■ Fragment d'ADN hybridant avec la sonde B.

Le marqueur utilisé est le Smart Ladder.

Figure 6. Analyse par hybridation des profils de restriction des clones STM122 et STM123.

La phase ouverte de lecture ORFA débute par un codon ATG et code pour une protéine putative de 88 amino-acides. Elle montre 59% d'homologie avec une transposase putative identifiée chez *Yersinia pestis*, 50% d'homologie avec un élément d'insertion ORFA (de la famille ISD) identifiée chez *Desulfovibrio vulgaris* (Fu *et al.*, 1998), 48% d'identité avec une ORFA (de la famille IS1222) identifiée chez *Enterobacter agglomerans* (Steibl *et al.*, 1995).

La phase ouverte de lecture ORFB chevauche le codon de terminaison de ORFA et code pour une protéine putative de 244 amino-acides. Elle présente aussi une homologie avec les séquences d'insertions de la famille IS3. Nous avons noté 41% d'identité avec une transposase putative chez *Yersinia pestis*, 38% d'homologie avec une ORFB de IS1222 (Fu *et al.*, 1998) et 32% d'identité avec une ORFB de ISD1 (Steibl *et al.*, 1995).

Nous nous sommes également intéressés à étudier la distribution de cet IS chez les autres souches de *Bradyrhizobium* d'*Aeschynomene*. La région IS a été recherchée par PCR chez les souches appartenant aux trois groupes d'inoculation croisée ainsi que chez les souches isolées du riz. Nous avons utilisé le couple d'amorces Isf (5'-AGC-CCA-GCG-ACC-TAT-TTT-AG-3')/ISr (5'-GCC-TCG-ATG-AAA-GCA-TTG-TC-3') défini à partir de la séquence IS identifiée chez ORS285. Les résultats obtenus (Tableau 2) montrent que toutes les souches photosynthétiques du groupe II, et uniquement celles-ci, donnent un produit d'amplification de la taille attendu, ce qui laisse penser que cette région IS est spécifique aux *Bradyrhizobium* photosynthétiques du groupe II.

Les paragraphes 2, 3, et 4 ont fait l'objet d'une publication ; (Chaintreuil *et al.*, FEMS, 2000), voir annexe.

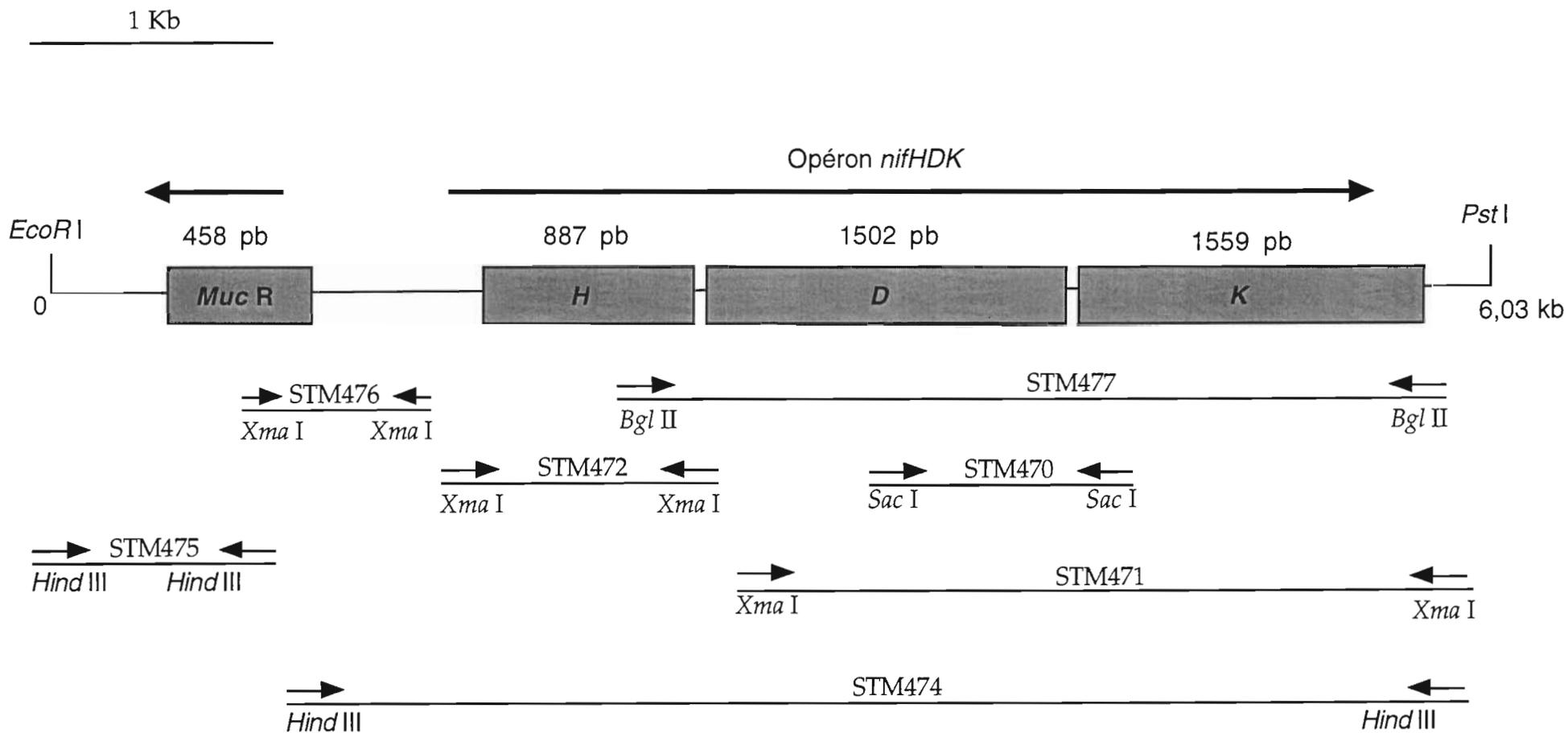


Figure 7. Organisation des gènes de nitrogénase (*nifHDK*) chez la souche ORS278 et localisation des différents fragments sous clonés pour le séquençage.

5. Isolement et Caractérisation des gènes de la fixation de l'azote (gènes *nifHDK*) chez la souche ORS278.

Pour isoler les gènes de structure de la nitrogénase chez la souche ORS278, nous avons utilisé une banque d'ADN génomique de cette bactérie qui était déjà disponible au laboratoire. Le screening de cette banque a été réalisé par PCR avec un couple d'amorces universelles *nifK* 146 (5'-GTG-GCT-GCC-CAC-GAA-GCT-TGG-3') et *nifD* 85 (5'-CAC-TGC-TAC-CGG-TCG-ATG-AA-3') (Rome *et al.*, 1996) fréquemment utilisé pour isoler les gènes *nif* chez différents microorganismes. Quatre clones positifs ont ainsi été obtenus. Après vérification de ces clones par hybridation avec une sonde correspondant au gène *nif* (sonde B), le clone STM122 qui contient un insert d'environ 35 kb a été retenu. Nous avons alors cherché à sous cloner la région correspondante uniquement au cluster *nifHDK*. Pour cela nous avons entrepris la même démarche que celle précédemment utilisée pour caractériser le cluster *nodABC* de la souche ORS285. Ainsi, le clone STM122 a été digéré par différentes enzymes de restriction et les fragments d'ADN obtenus ont été séparés sur gel d'agarose (figure 6), transférés sur membrane de nylon puis, hybridés avec la sonde B. Un fragment *EcoR* I/*Pst* I de 6 kb s'hybridant avec la sonde B a été purifié et sous cloné dans le vecteur pUC18. Ce fragment a été entièrement séquencé et analysé selon la figure 7.

Quatre ORF ont été identifiées. Trois d'entre elles localisées de la position 1630 à 5740 correspondent aux gènes *nifH*, *nifD*, et *nifK*. Ces trois gènes présentent la même organisation que celle généralement retrouvée chez la majorité des organismes fixateurs d'azote. La séquence *nifH* d'ORS278 présente 95 à 74% d'homologie avec les séquences *nifH* identifiées chez d'autres microorganismes et disponibles dans

Tableau 3. Pourcentage d'identité obtenu* sur 4 gènes (*nifH*, *nifD*, *nifK*, et *MucR*) de la souche ORS278.

Souche	<i>nifH</i> (%)	<i>nifD</i> (%)	<i>nifK</i> (%)	<i>MucR</i> (%)
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	95			
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	92	88	84	
<i>Thiobacillus ferrooxydans</i>	85	76	70	
<i>Azospirillum brasiliense</i>	81	75	61	
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	80	77	66	
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (NGR234)	78	74	63	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	74	69	48	
<i>Sinorhizobium meliloti</i>				54

* Par comparaison des séquences avec celles disponibles dans GenBank.

Tableau 4. Caractéristiques structurales et fonctionnelles des gènes *nifH*, *nifD*, *nifK*, et *MucR* de la souche ORS278.

Gènes	Fonction	Localisation	Nombre d'A.A	Sens	Phase
<i>MucR</i>	Régulation de la biosynthèse d'exopolysaccharides	743 ⇒285	152	reverse	-3
<i>nifH</i>	Nitrogénase protéine II	1630 ⇒2517	296	foward	+1
<i>nifD</i>	Nitrogénase protéine I α	2595 ⇒4097	500	foward	+3
<i>nifK</i>	Nitrogénase protéine I β	4181 ⇒5740	519	foward	+2

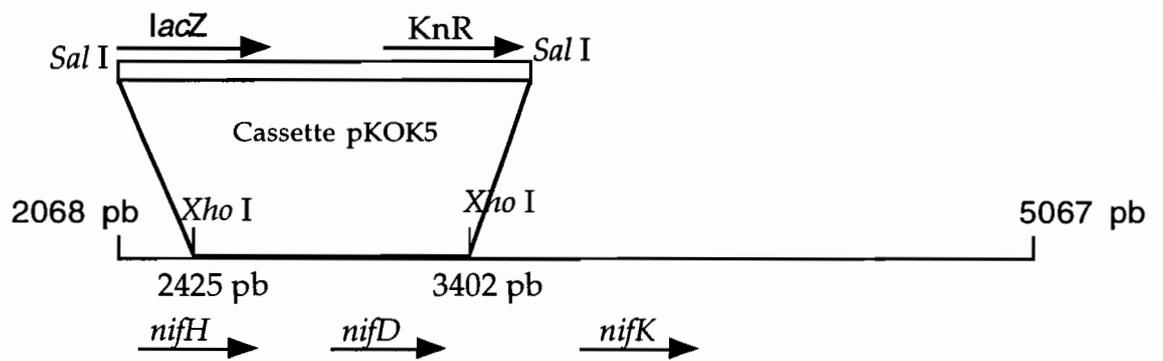


Figure 8. Structure génétique de la mutation *nif*⁻ de la souche ORS278.

GenBank (tableau 3). Au niveau de la comparaison du cluster *nifHDK* de la souche ORS278, la plus forte similarité (95%) a été retrouvée avec le gène *nifH* d'*Azorhizobium caulinodans*. Nous n'avons pas obtenu plus d'informations sur les gènes *nifD* et *nifK* de ce microorganisme dans les banques de données. On remarque par ailleurs que, les séquences *nifD* et *nifK* d'ORS278 présentent respectivement 88% et 84% d'homologie avec celles de *Bradyrhizobium japonicum*. La quatrième ORF localisée de la position 743 à 285 montre 54% de similarité avec la protéine hypothétique *MucR* de *Sinorhizobium meliloti*. Cette protéine code pour la régulation de la biosynthèse des exopolysaccharides (Rüberg *et al.*, 1999 ; Martin *et al.*, 2000). Elle joue un rôle important dans la régulation de la production du galactoglucan, un exopolysaccharide impliqué dans le processus d'infection du nodule chez *Medicago sativa* (Gonzalez *et al.*, 1996) et dans le mécanisme d'adaptation ou de symbioses sous certaines conditions environnementales (Martin *et al.*, 2000).

Les caractéristiques structurales et fonctionnelles des gènes *nifHDK* et *MucR* d'ORS278 sont données dans le tableau 4.

5.1. Construction d'un mutant *nif⁻* de la souche ORS278

Dans le chapitre II de cette thèse, nous avons émis l'hypothèse que la fixation d'azote n'était pas un facteur important dans l'association *Bradyrhizobium*-riz. Pour vérifier notre hypothèse un mutant *nif⁻* a été construit. Ce mutant M4 a été obtenu après délétion d'un fragment *Bgl* II de 3,6 kb et insertion d'une cassette pKOK5 contenant le gène rapporteur *lacZ* et le gène de résistance à la kanamycine (figure 8). Le mutant est délété des gènes *nifHD* et de l'extrémité 5' du gène *nifK*. La construction de ce mutant a été vérifiée par PCR, et par hybridation ADN/ADN avec une sonde *nif* et une sonde *lacZ*.

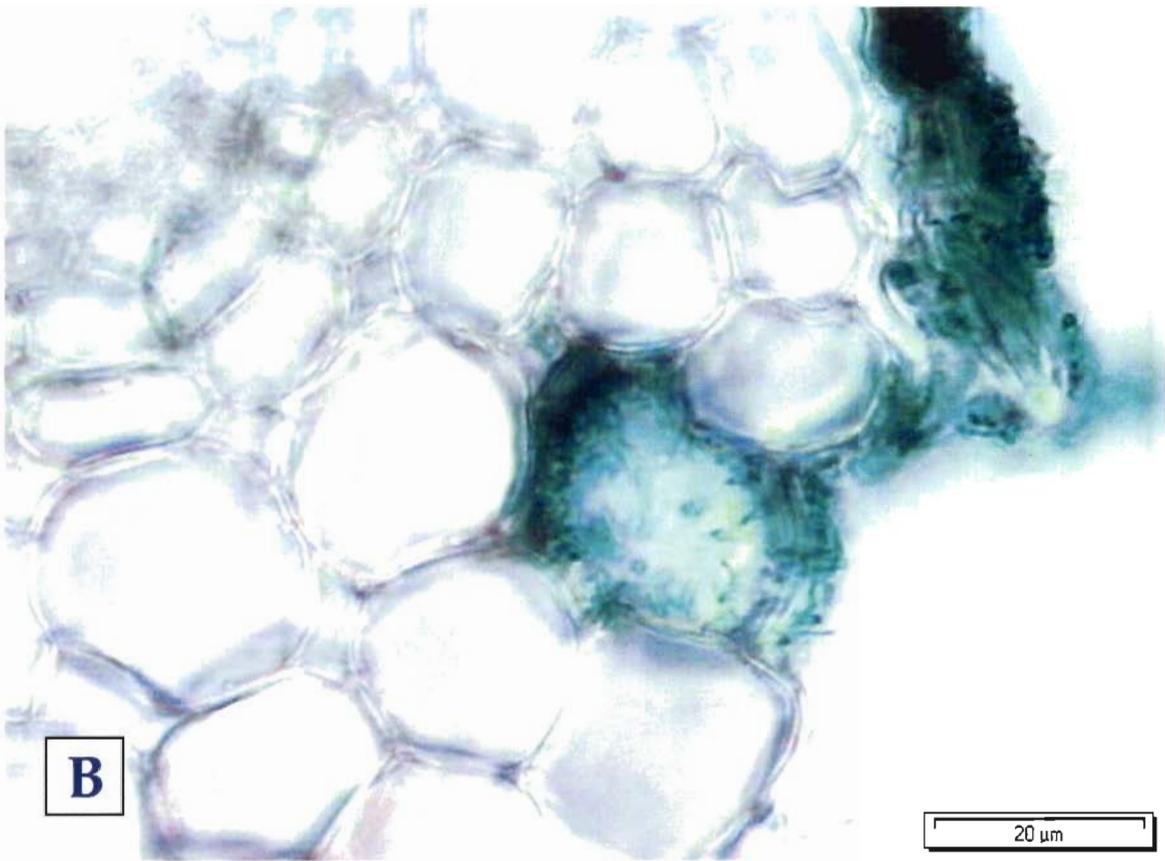
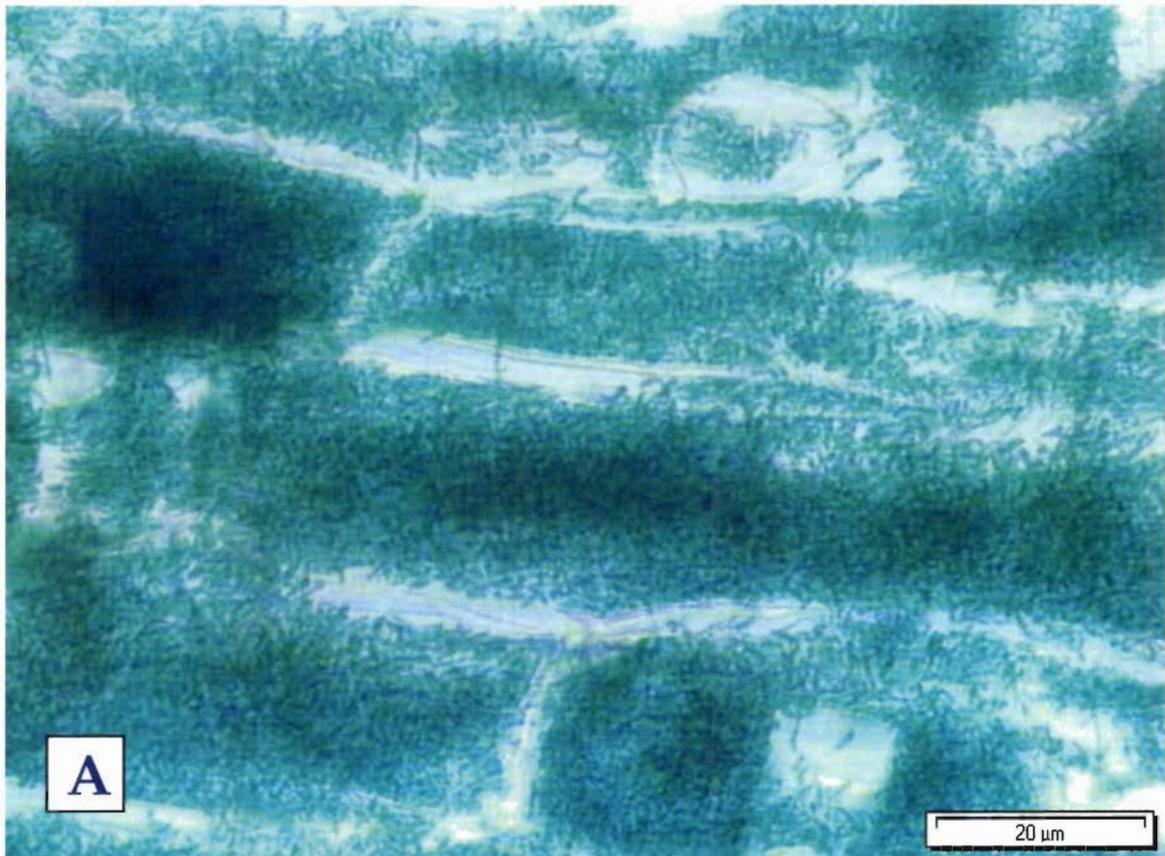


Figure 10 : Observation en microscopie photonique de l'activité β galactosidase du mutant *nif* (M4). **A** : Prolifération bactérienne à la surface racinaire ; montage entre lame et lamelle de racines entières. **B** : Pénétration de la bactérie dans une cellule du rhizoderme ; coupe transversale, épaisseur 40 μ m.

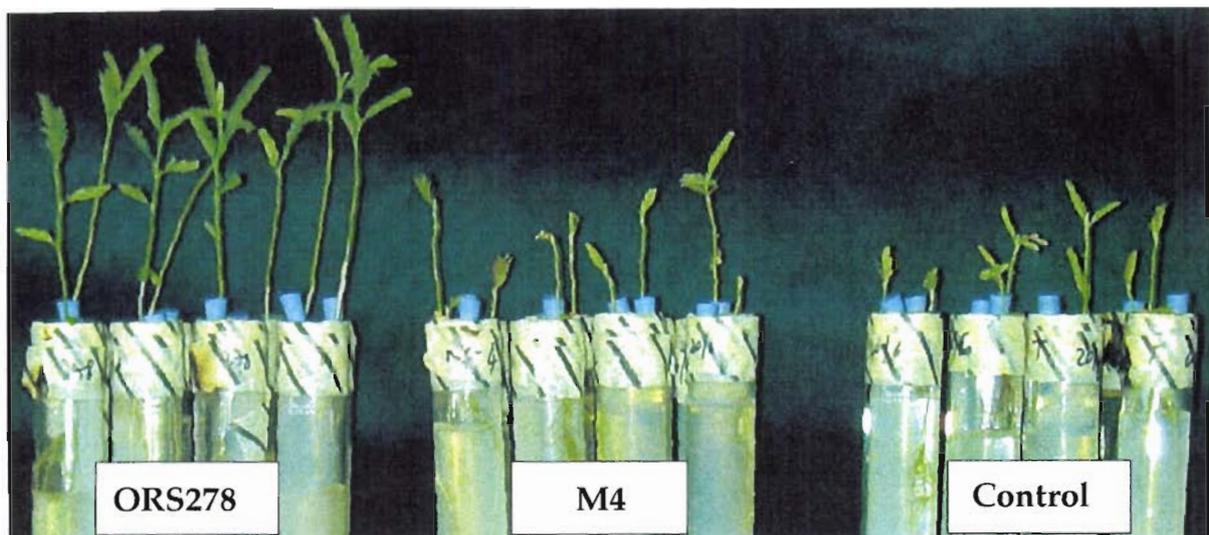


Figure 9. Mise en évidence du phénotype Fix⁻ de la souche mutante M4 sur les plants d'*Aeschynomene sensitiva* cultivés en tube Gibson.

Nous avons tout d'abord vérifié que cette mutation entraîne bien un phénotype Fix⁻ chez la plante hôte. Pour cela, la souche sauvage ORS278 et la souche mutée M4 ont été inoculées séparément dans des tubes Gibson contenant des jeunes plants d'*Aeschynomene sensitiva* poussant sur milieu Jensen sans azote.

Un mois après inoculation, nous avons noté que les plants inoculés par la souche M4 nodulaient normalement mais, ces nodules restaient totalement inefficients. En effet, les plants inoculés avec le mutant ne présentaient une faible croissance contrairement aux plants inoculés avec la souche ORS278 et la couleur des feuilles était jaune comme celle des plants témoins non inoculés (figure 9). Ces résultats montrent que nous avons bien inactivé le gène *nif* de la souche M4.

5.2. Etude de l'expression des gènes *nif*⁻

Afin d'étudier l'expression des gènes *nif* au niveau des racines de riz sauvage cultivé *in vitro*, nous avons inoculé ces racines par la souche M4 et suivi l'activité du gène rapporteur *lacZ* sous le contrôle du promoteur *nif*. Les observations ont été faites au microscope photonique, sur racines entières ou après coupe au Vibratome (40 µm).

Quinze jours après l'inoculation, on observe une activité β-galactosidase au niveau de l'ensemble des zones superficielles d'infection du riz par la bactérie (Figure 10A). Par ailleurs, nous observons aussi que certaines régions intercellulaires du rhizoderme sont envahies par des bactéries qui présentent également une activité β-galactosidase (figure 10B). Ces résultats confirment que les gènes *nif* sont bien exprimés au cours de cette interaction *Bradyrhizobium*-riz sauvage.

6. Mesure de l'activité réductrice de l'acétylène

La mise en évidence de l'activité réductrice de l'acétylène a été faite par la méthode de Hardy *et al.*, (1973). Les racines de riz ont été inoculées en culture *in vitro* dans des boîtes de Pétri par la souche de *Bradyrhizobium* photosynthétique d'*Aeschynomene* ORS278. Quatre semaines après inoculation, nous avons noté au niveau des racines une activité réductrice d'acétylène faible mais significative de l'ordre de 1,7 nmol/C₂H₄/h/plante.

C. DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons essayé de voir si les gènes symbiotiques qui s'expriment dans la nodulation des légumineuses (gènes *nodABC*) étaient également impliqués dans le processus d'infection du riz. On considère généralement que les gènes *nodABC* sont présents chez tous les rhizobia. Pourtant, malgré l'utilisation de différentes stratégies (définition d'une série d'amorces, essai de complémentation par croisement avec une banque conjugative d'ADN génomique d'ORS278, extension du spectre d'hôte de bactéries, hybridation ADN/ADN sonde froide) nous n'avons pas pu isoler de gènes *nod* chez la souche ORS278 et chez les autres souches du groupe III, ce qui laisse penser que ces *Bradyrhizobium* du groupe III très spécifique auraient des gènes *nod* communs très différents de tous les gènes *nod* connus actuellement. Ces gènes de nodulation déterminent une certaine variabilité structurale des facteurs Nod (longueur de la chaîne oligosaccharidique et nature de l'acide gras), et plusieurs études ont montré l'existence d'une corrélation étroite entre la structure des facteurs Nod et la spécificité de nodulation des souches (Lortet *et al.*, 1996 ; Lorquin *et al.*, 1997a, b). Il semblerait donc que les facteurs Nod des *Bradyrhizobium* appartenant au groupe III soient aussi très différents des autres facteurs Nod connus. Il serait alors très intéressant de persister dans cette étude sur l'isolement des gènes *nod* des souches associées à ce groupe spécifique, surtout dans l'hypothèse exposée au chapitre II d'une action hormonale positive des facteurs Nod sur la croissance du système racinaire du riz.

L'isolement et le séquençage du gène *nodA* des souches associées aux groupes I et II nous a permis d'établir leur position phylogénétique par rapport aux autres souches de *Bradyrhizobium*. Nous avons ainsi pu mettre en évidence chez les *Bradyrhizobium* photosynthétiques du groupe II des gènes *nod* phylogénétiquement très éloignés des gènes *nod* précédemment décrits, tandis que les souches associées au groupe I ont des gènes *nod* très proches des autres *Bradyrhizobium*. La mise en évidence de l'éloignement phylogénétique des souches du groupe II nous a amené à caractériser le cluster *nodABC* de la souche ORS285 représentante de ce groupe. Contrairement à ce que l'on attendait, aucun gène régulateur *nodD* n'a été identifié en amont de la région *nodA* chez ORS285 comme cela a été décrit chez la plupart des *Rhizobium*. Ce résultat a donc limité nos investigations sur la démarche envisagée pour arriver à surproduire les facteurs Nod de cette souche afin d'étudier leurs structures.

Nous avons identifié de nouvelles séquences d'insertion (*IS*) sur ce cluster et, nous avons montré que ces séquences sont spécifiques aux souches photosynthétiques du groupe II. Des éléments d'insertion ont déjà été identifiés sur le génome de plusieurs bactéries et sont connus comme étant des éléments d'ADN mobiles capables de s'insérer sur plusieurs sites dans le génome (Mahillon *et al.*, 1988). Ils jouent un rôle très important dans l'évolution et l'adaptation des bactéries (Biondi *et al.*, 1999 ; Schedock et Long, 1994). Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que ces éléments d'insertions jouent un rôle dans le réarrangement ou dans le transfert des gènes de nodulation chez les *Bradyrhizobium* photosynthétiques associés au groupe II.

Nous avons également essayé de déterminer le rôle de la fixation d'azote dans l'association *Bradyrhizobium*-riz. A partir d'une banque d'ADN génomique de la souche ORS278, nous avons isolé par PCR un clone contenant le cluster *nifHDK* codant pour les différentes sous-unités de la nitrogénase. Ce cluster a été entièrement

séquencé, ce qui nous a permis de construire une souche mutante *nif⁻* (la souche M4) par délétion des gènes *nifHD* et insertion du gène rapporteur *lacZ*. Cette souche marquée, a été inoculée aux racines de riz en culture *in vitro*. L'analyse histochimique de l'activité β -galactosidase confirme l'expression des gènes *nif* au niveau des zones d'infection des racines de riz par la souche mutée. Aussi les racines de riz sauvage, inoculées en culture *in vitro* par la souche sauvage ORS278 montre une activité réductrice d'acétylène de l'ordre de 1,7 nmol/C₂H₄/h/plante.

Ces résultats rejoignent ceux de Sabry *et al.*, (1997) qui ont montré que les racines de plants de maïs inoculés en pot avec la souche ORS571 d'*Azorhizobium caulinaudans*, montrent après analyse microscopique, une invasion des bactéries entre les cellules du cortex racinaire, et également à l'intérieur du xylème et des méristèmes racinaires (Sabry *et al.*, 1997). Ces auteurs ont également observé après une telle inoculation, une augmentation du poids sec de la plante et vraisemblablement une activité de la nitrogénase donc, une fixation d'azote. De même, l'expression de *nifH* d'*Azospirillum brasilense* est observée à la surface des racines de blé inoculées avec une fusion *lacZ* et *gus* (Arsène *et al.*, 1994). De même que l'expression du gène *nifH* de la souche BH72 d'*Azoarcus* sp. est aussi observée dans l'association de la bactérie avec les racines de jeunes plants de riz (Reinhold-Hurek et Hurek, 1997), indiquant ainsi que la rhizosphère du riz est un environnement favorable à la fixation biologique de l'azote par *Azoarcus* sp. (Egener *et al.*, 1998).

Nos résultats confirment donc la présence d'une activité fixatrice d'azote de la souche ORS278 au cours de l'interaction avec le riz sauvage. Cependant, cette activité reste faible et nous ne pouvons conclure qu'il y a eu un transfert de cet azote fixé de la bactérie vers le riz. Des mesures de ¹⁵N seraient donc nécessaires pour mettre en évidence un tel transfert. Des études en serre sont également envisagées pour étudier grâce au mutant M4, les effets de l'inactivation des gènes *nif* sur la croissance du riz

grâce au mutant M4, les effets de l'inactivation des gènes *nif* sur la croissance du riz et sur les gains de production en grains. Ceci nous permettra alors de déterminer le rôle réel de la fixation d'azote au cours de l'interaction *Bradyrhizobium*-riz.

Les résultats que nous avons obtenus dans ce chapitre suggèrent fortement que la fixation de l'azote n'est pas un facteur important dans l'association avec le riz, ce qui renforce l'hypothèse retenue dans le chapitre 2 du rôle clef de la production d'une molécule de type phytohormone par la souche ORS278 lorsqu'elle colonise et infecte les racines du riz.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail de thèse nous avons mis en évidence une nouvelle association entre le riz et une bactérie photosynthétique appartenant au genre *Bradyrhizobium*. Nous discutons donc ici des principaux résultats obtenus au cours de l'étude de cette association originale.

1. Les rhizobiums, bactéries symbiontes des légumineuses, sont également des bactéries endophytes du riz

Les *Bradyrhizobium* photosynthétiques étaient jusqu'à présent connus pour leur capacité à former spécifiquement des nodules fixateurs d'azote sur les tiges de plusieurs espèces de légumineuses aquatiques appartenant au genre tropical *Aeschynomene*, et particulièrement sur deux espèces typiques des mares temporaires africaines, *A. indica* et *A. sensitiva* (Alazard, 1990 ; Molouba *et al.*, 1999). Au cours de ce travail, j'ai ainsi pu montrer pour la première fois que le riz sauvage *Oryza breviligulata* qui pousse du Sénégal à la Guinée dans les mêmes biotopes aquatiques que les *Aeschynomene*, hébergent également dans ses racines les mêmes *Bradyrhizobium* photosynthétiques. Ces bactéries sont aussi présentes dans l'eau de la mare où pousse le riz. Dans ces milieux aquatiques particuliers où le riz sauvage domine largement les *Aeschynomene* et les autres espèces végétales, il apparaît donc, contrairement à ce que l'on pensait jusqu'à présent, que les *Bradyrhizobium* sont beaucoup plus nombreux dans les racines du riz que dans les nodules des *Aeschynomene*. En effet, dans les eaux profondes où pousse *Oryza breviligulata*, cette espèce produit de très nombreuses racines flottantes qui constituent autant d'habitats pour les *Bradyrhizobium* endophytes. La découverte de cette niche écologique insoupçonnée jusqu'à présent pour des rhizobiums permet d'affirmer que ces

Bradyrhizobium photosynthétiques sont parmi les bactéries dominantes des milieux aquatiques africains à riz sauvage, et confirme le caractère aquatique de ces bactéries associées aux plantes. Pour expliquer une telle diversité d'associations symbiotiques ou endophytiques pour une même bactérie, une hypothèse pourrait être qu'une bactérie ancestrale aquatique, photosynthétique et associée au riz aurait pu recevoir par transfert latéral des gènes de nodulation lui permettant de former des nodules de tiges sur une légumineuse. Cette bactérie, gardant ainsi un avantage de survie supplémentaire dans un milieu où les changements environnementaux (inondation, dessèchement) sont brutaux, aurait donc conservé des caractères ancestraux lui permettant de s'associer à l'espèce végétale dominante de ce milieu, le riz sauvage.

2. La photosynthèse, un caractère important pour la survie des bactéries associées au riz ?

Les *Bradyrhizobium* endophytes du riz et symbiontes des *Aeschynomene* présentent la caractéristique unique parmi les autres rhizobiums de posséder de la bactériochlorophylle et un centre réactionnel de la photosynthèse actif (Giraud *et al.*, 2000). Ces souches photosynthétiques endophytes du riz peuvent donc utiliser la lumière comme source d'énergie. Sur le plan taxonomique, nous avons montré que les *Bradyrhizobium* endophytes du riz appartiennent aux groupes des *Bradyrhizobium* photosynthétiques des *Aeschynomene* avec lesquels ils forment un groupe bien distinct à l'intérieur du grand groupe des *Bradyrhizobium* (Molouba *et al.*, 1999, Chaintreuil *et al.*, 2000). Les bactéries photosynthétiques sont souvent considérées comme les ancêtres des *Bradyrhizobium* (van Berkum *et al.*, 1995). Ces derniers, adaptés à la nodulation des racines auraient perdu leurs propriétés photosynthétiques, sauf dans le cas de la nodulation de tige où les bactéroïdes sont

exposés à la lumière. Chez les *Aeschynomene*, cette propriété permettrait aux bactéries une meilleure survie sur la tige, notamment en leur fournissant l'ATP nécessaire aux premiers stades de l'infection (Giraud et al., 2000).

Dans l'association avec le riz, il serait donc intéressant de savoir si le caractère photosynthétique est également bénéfique pour les *Bradyrhizobium* et/ou la plante. Dans les mares temporaires où pousse le riz sauvage, la profondeur de l'eau varie entre 0.5 m et 2 m, et cette eau, généralement claire laisse passer la lumière, même sous le couvert du riz. De nombreuses racines nodales sont donc exposées à la lumière, ce qui pourrait expliquer la présence à priori surprenante de bactéries photosynthétiques à l'intérieur des racines de riz. Comme sur les tiges des *Aeschynomene*, la photosynthèse pourrait donc constituer pour ces *Bradyrhizobium* un avantage sélectif important en leur procurant un complément énergétique nécessaire à leur survie dans ces milieux aquatiques pauvres en substrats carbonés et azotés. A contrario, il semble qu'un riz ne produisant pas de racines flottantes, représenterait une niche écologique moins intéressante au développement des bactéries photosynthétiques. Cependant, les résultats que nous avons obtenus en pépinières exondées où l'ensemble des racines du riz est dans le sol hors de l'action de la lumière semblent démontrer que la photosynthèse n'est pas un facteur déterminant de l'association riz/*Bradyrhizobium*. De plus, la souche *LacZ* marquée que nous avons utilisé pour étudier la colonisation des racines du riz est mutée dans le gène photosynthétique *pufLM*, et ne présente *in vitro* aucune différence visible avec la souche sauvage ORS278 dans sa capacité colonisatrice. Ainsi, le caractère photosynthétique pourrait être important aux *Bradyrhizobium* uniquement dans leur vie libre en milieu aérobie ou micro-aérobie aquatique, où aucune source de carbone autre que le CO₂ n'est disponible.

3. Spécificité de nodulation et d'association avec le riz

En symbiose avec les légumineuses, les *Bradyrhizobium* photosynthétiques que nous avons isolés sont tous caractérisés par une grande spécificité puisqu'ils nodulent exclusivement les espèces à nodules de tige d'*Aeschynomene* qui appartiennent au groupe III (Alazard et Duhoux, 1988). Chez le riz, il semble difficile de parler de spécificité d'infection puisque de nombreux genres bactériens très différents sont aussi capables de coloniser la rhizosphère et les couches superficielles du cortex racinaire du riz. Nous avons cependant mis en évidence une grande différence entre les souches de *Bradyrhizobium* photosynthétiques dans l'efficacité de leur association avec le riz, sans qu'il soit pour l'instant possible de déterminer s'il s'agit d'une différence dans la spécificité d'infection. Avec la souche ORS278, nous avons observé un attachement polaire des bactéries aux cellules de la coiffe du riz sauvage, attachement que l'on n'observe pas avec une autre souche de *Bradyrhizobium* d'*Acacia mangium* et qui peut donc être considéré comme spécifique. Comme chez *Azospirillum* (Vande Broek et Vanderleyden, 1995), et *Azoarcus* (Plessl *et al.*, 2000), le flagelle bactérien polaire, les pili de type IV, ainsi que les polysaccharides de surface, pourraient jouer un rôle important dans l'attachement des *Bradyrhizobium* aux racines de riz et dans la colonisation des espaces intercellulaires. Il serait donc intéressant de disposer à l'avenir de mutants bactériens affectés dans l'attachement aux cellules végétales afin de caractériser ce mécanisme essentiel pour une association efficace avec le riz.

Nous avons également montré que la souche ORS278 était capable de coloniser aussi bien les racines du riz sauvage *Oryza breviligulata* que d'autres espèces ou variétés de riz cultivés, *O. sativa* (variété IR64, IRRI, Philippines) et *O. glaberrima* (variété TOG 5681, ADRAO).

Les facteurs Nod qui sont à la base de la spécificité de nodulation chez les légumineuses ont-ils un rôle dans l'association avec le riz ? Les résultats de Gough *et al.* (1996) montrant que les gènes Nod d'*Azorhizobium caulinodans* ne sont pas induits en présence du blé tendraient à montrer que les facteurs Nod n'interviennent pas dans les mécanismes d'infection *in vitro* des racines des céréales. Ces résultats avec *Azorhizobium* vont donc dans le sens d'une non spécificité de l'étape de colonisation et d'infection des racines des céréales. Cependant, avec la souche ORS278 qui appartient à une autre branche des rhizobiacées, il sera important à l'avenir de vérifier si les gènes *nod* s'expriment dans le riz. Dans notre étude, nous n'avons pu le montrer car nous n'avons pas réussi à isoler les gènes de nodulation de cette souche de *Bradyrhizobium*.

4. L'infection chez les *Aeschynomene* et le riz : deux processus primitifs proches ?

Chez les *Aeschynomene* à nodules de tige, le processus d'infection par les *Bradyrhizobium* photosynthétiques est différent de celui qu'on observe chez la plupart des autres légumineuses (Dupuy et Truchet, communication personnelle). L'infection démarre par une phase d'invasion intercellulaire directe au niveau des points d'émergence des racines latérales, sans formation de cordons d'infection dans les poils absorbants comme chez la luzerne par exemple (Wood et Newcomb, 1989). A partir de poches intercellulaires où les rhizobia se multiplient, les bactéries envahissent directement les cellules du cortex racinaire par dissolution de leur paroi et sans formation de cordons d'infection. L'infection se propage ensuite par divisions successives des cellules infectées qui vont ainsi former le tissu nodulaire.

Chez le riz, dans les premiers stades de l'infection par les *Bradyrhizobium*, on observe un processus d'infection intercellulaire très proche de celui des *Aeschynomene*, puisque, après la phase de colonisation de la coiffe et de la surface racinaire, des poches de multiplication sont également observées au niveau des fissures formées par l'émergence des racines secondaires. De plus, régulièrement, des cellules du cortex du riz sont envahies par les *Bradyrhizobium* sans doute de façon directe par dissolution de la paroi de la même façon que pour les cellules d'*Aeschynomene*. Cependant, contrairement aux cellules infectées d'*Aeschynomene*, ces cellules de riz infectées ne se multiplient pas et l'infection intracellulaire est donc bloquée à ce stade. Il serait intéressant d'étudier de façon plus approfondie cette infection intracellulaire du riz pour voir si les cellules infectées sont bien vivantes et si les bactéries fixent l'azote à l'intérieur de ces cellules. Des essais de culture *in vitro* de telles cellules isolées pourraient nous permettre de répondre à ces questions.

5. L'association riz/*Bradyrhizobium* : un effet PGPR, une fixation d'azote très faible.

La présence des *Bradyrhizobium* à l'intérieur même des racines de riz correspond t-elle à une véritable symbiose fixatrice d'azote ? Les résultats que nous avons obtenus en serre et en pépinière au champ nous permettent de répondre par la négative puisque les activités fixatrices d'azote des racines de riz infectées que nous avons mesurées sont très faibles (25 nmol/C₂H₄/h/plante et (1,7 nmol/C₂H₄/h/plante), et ne permettent pas d'expliquer les gains de croissance ou l'augmentation des rendements en grains observés dans les expériences en serres. Reddy *et al.*, (1997), avaient également montré que la fixation d'azote n'intervenait pas dans l'association entre le riz et *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Par contre,

nous avons mis en évidence pour la première fois chez un rhizobium, un effet stimulateur important sur la croissance racinaire du riz qui est nettement stimulée (jusqu'à 50%) par l'inoculation de la souche ORS278. L'augmentation de la croissance du riz semble donc être le résultat de cet effet PGPR du *Bradyrhizobium* photosynthétique, qui permet en outre une meilleure exploration du sol par les racines. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons donc recherché et caractérisé les gènes *nif* de la souche ORS278, et construit un mutant *nif*⁻ de cette souche.

Chez les bactéries PGPR, il est connu que l'augmentation de la croissance racinaire est due à la production de différentes hormones végétales dont la principale correspond à l'Acide Indole Acétique (AIA). Il aurait été intéressant de caractériser les hormones végétales produites par la souche ORS278 au contact des racines du riz. En effet, plusieurs hypothèses sont possibles et mériteront d'être explorées à l'avenir : soit la souche ORS278 produit une auxine ou une cytokinine classiques comme les phytohormones produites par la plupart des bactéries PGPR, soit il s'agit d'une hormone végétale nouvelle. Cette deuxième hypothèse est la plus séduisante quand on sait que les facteurs Nod jouent également le rôle de phytohormones. En effet, comme déjà mentionné dans le chapitre II, il a été récemment montré que les facteurs Nod purifiés de *Bradyrhizobium japonicum*, étaient capables d'augmenter à très faible concentrations la croissance racinaire de jeunes plantules de nombreuses espèces végétales différentes, y compris les non-légumineuses comme le maïs (Prithiviraj *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent que l'effet PGPR sur le riz, pourrait être dû à la production de facteurs Nod particuliers par la souche ORS278. Ceci signifierait donc que les gènes *nod* de la souche ORS278 s'exprimeraient en présence du riz, ce qui peut paraître en contradiction avec les résultats de Gough *et al.*, (1996) sur *Azorhizobium caulinodans*. Il ne serait pas impossible que la souche ORS278 ait plusieurs copies de gène *nodD*, dont l'une s'exprimerait en présence des exsudats

racinaires de riz. Comme malgré tous nos efforts, nous n'avons jusqu'à présent pas pu identifier les gènes de nodulation dont le gène *nodD* de cette souche, ceci reste une hypothèse. Ainsi, les travaux à venir devront s'orienter en priorité vers l'isolement des gènes de nodulation de la souche ORS278. Dans ce but, un projet de séquençage partiel de l'îlot symbiotique (gènes *nif* et *nod*) de cette souche a donc été déposé à la GENOPOLE.

6. Vers l'inoculation des rizières

Soucieuse de concrétiser mes résultats et de les transférer sur le terrain, nous avons récemment inoculé une rizière en Guinée Conakry afin que les paysans puissent directement bénéficier des retombées potentielles de l'inoculation du riz par les *Bradyrhizobium* photosynthétiques. Les expériences se poursuivent actuellement jusqu'à la récolte prévue fin Décembre 2000, mais les résultats que nous avons déjà obtenus en sortie de pépinière sont très encourageants puisque l'augmentation de croissance est de 31% pour la longueur de la tige, de 24% pour la largeur au collet et de 55% pour la longueur de la racine. Rappelons qu'une équipe américaine a récemment obtenu de bons résultats, quoique moins spectaculaires, en Egypte avec des *Rhizobium* de trèfle (Yanni *et al.*, 2000). Ces derniers résultats ainsi que ceux que j'ai obtenus et présentés lors du dernier congrès de fixation de l'azote à Séville ont suscité un grand intérêt dans la communauté scientifique internationale. Sur le plan des applications, mon travail qui se termine actuellement doit donc être confirmé et poursuivi au champ car, les applications qui pourraient en découler sont importantes pour le développement d'une riziculture tropicale durable dans les pays en voie de développement. En développant une meilleure exploitation par les racines du riz des éléments nutritifs du sol, l'inoculation devrait également permettre de diminuer la

dose d'engrais, même si, comme nous l'avons vu, la fixation d'azote reste extrêmement faible. On peut donc également envisager pour les pays du nord, des inoculations par les *Bradyrhizobium* photosynthétiques qui permettent de réduire l'emploi des engrais chimiques (nitrates) coûteux en énergie et polluants, et qui répondent mieux aux normes de l'agriculture biologique. Cette technique simple d'inoculation pourrait ainsi limiter l'eutrophisation des eaux de surface et la pollution des nappes phréatiques, telles qu'on peut les rencontrer par exemple dans la riziculture camarguaise.

Bien qu'on en soit encore très éloigné, nos travaux devraient donc contribuer à relancer l'espoir de transférer aux céréales comme le riz la capacité de fixer l'azote de l'air. Un *Bradyrhizobium* endophyte du riz capable d'excréter au profit de la plante de l'ammonium directement assimilable par la plante permettrait en effet d'assurer la nutrition azotée de la plante. Les recherches futures devront donc s'orienter sur les deux partenaires de cette association, du côté bactérien en couplant l'effet PGPR à un transfert d'azote fixé vers la céréale, et du côté plante en exploitant les caractères "primitifs" d'*Oryza breviligulata*, qui est l'ancêtre du riz africain cultivé *O. glaberima*. Bien que nous ayons obtenu des résultats sur des variétés de riz cultivés, il serait intéressant de savoir si le riz sauvage a conservé des gènes primitifs lui permettant une association bénéfique avec les rhizobiums. Dans ce cas, il faudrait envisager le transfert de ces gènes à diverses variétés de riz cultivé, ou la sélection de variétés cultivées aptes à s'associer avec les *Bradyrhizobium*. Les généticiens du riz n'ont jusqu'à présent jamais considéré l'association avec les bactéries endophytes comme un caractère intéressant, nos résultats montrent qu'une sélection ou création variétale tenant compte de ce potentiel devrait à l'avenir être pris en compte.

Sur le plan appliqué comme pour la recherche fondamentale, le système *Bradyrhizobium*-riz que nous avons découvert pourrait à l'avenir servir de modèle

dans l'étude des associations bénéfiques entre les bactéries, et plus spécialement les rhizobiums et les graminées. Plus de la moitié de la population mondiale dépend du riz pour son alimentation de base. Une augmentation de 15 % du rendement du riz constitue donc un immense défi qui justifie largement la poursuite des recherches que nous avons initié sur les *Bradyrhizobium* photosynthétiques endophytes du riz.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 **Aiguillera, M. M., N. C. Hodge, R. E. Stall, and G. C. Smart. (1993).** Bacterial symbionts of *Steinernema scapterisci*. *J. Invertebr. Pathol.* **62**:68-72.
- 2 **Alazard, D. (1985).** Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**:732-734.
- 3 **Alazard, D. (1990).** Nitrogen fixation in pure cultures by rhizobia isolated from stem nodules of tropical *Aeschynomene* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**:177-182.
- 4 **Alazard, D. (1991).** La nodulation caulinaire dans le genre *Aeschynomene*. Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard-Lyon I. 176 pages.
- 5 **Alazard, D., and E. Duhoux. (1988).** Diversity of stem nodulation sites in *Aeschynomene* sp. *J. plant Physiol.* **132**:123-125.
- 6 **Alazard, D., and E. Duhoux. (1990).** Development of stem nodules in a tropical forage legume, *Aeschynomene afraspera*. *J. Exp. Bot.* **41**:1199-1206.
- 7 **Alberti, M., D. E. Burke, and J. E. Hearst. (1994).** Structure and sequence of the photosynthesis gene cluster. In *Anoxygenic photosynthetic bacteria*, R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer (eds), Kluwer Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- 8 **Allen, O. N., and E. K. Allen. (1981).** The *Leguminosae* : a source book of characteristics, uses and nodulation. University of Wisconsin Press, (Madison, USA) pp. 21-25.
- 9 **Al-Mallah, M. K., M. R. Davey, and E. C. Cocking. (1989).** Formation of nodular structures on rice seedlings by rhizobia. *J. Exp. Bot.* **40**:473-478.
- 10 **Alnor, D., N. Frimodt-Moller, F. Espersen, and W. Frederiksen. (1994).** Infections with the unusual human pathogens *Agrobacterium* species and *Onchrobacterium anthropi*. *Clin. Infect. Dis.* **18**:914-920.
- 11 **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lippman. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
- 12 **Applebaum, E. R., D. V. Thomson, K. Idler, and N. Chartrain. (1988).** *Rhizobium japonicum* USDA191 has two *nodD* genes that differ in primary structure and function. *J. Bacteriol.* **170**:12-20.
- 13 **Armager, N., V. Macheret, and G. Laguerre. (1997).** *Rhizobium gallicum* sp. Nov., and *Rhizobium giardinii* sp. Nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:996-1006.
- 14 **Arnold, W., A. Rump, W. Klipp, U. B. Priefer, and A. Pühler.(1988).** Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Mol. Biol.* **203**:715-738.

- 15 **Arora, N. (1954).** Morphological development of the root and stem nodules of *Aeschynomene indica* L. *Phytomorphology*. **4**:211-216.
- 16 **Arsène, F., S. Katupitiya, I. R. Kennedy, and C. Elmerich. (1994).** Use of *lacZ* fusions to study the expression of *nif* genes of *Azospirillum brasilense* in association with plants. *Mol. Plant-Microbe. Interact.* **7**:748-757.
- 17 **Asad, S., Y. W. Fang, K. L. Wycoff, and A. M. Hirsch. (1994).** Isolation and characterization of cDNA and genomic clones of *MsENOD40*; Transcripts are detected in meristematic cells of alfalfa. *Protoplasma*. **183**:10-23.
- 18 **Babic, I., M. Fischer-Le Saux, E. Giraud, and N. Boemare. (2000).** Occurrence of natural dioxenic associations between the symbiont *Photorhabdus luminescens* and bacteria related to *Ochrobactrum* spp. in tropical entomopathogenic *Heterorhabditis* spp. (Nematoda, Rhabditida). *Microbiology*. **146**:709-718.
- 19 **Baldani, J. I., V. L. D. Baldani, L. Seldin, and J. Döbereiner. (1986).** Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**:86-93.
- 20 **Baldani, J. I., L. Caruso, V. L. D. Baldani, S. R. Goi, and J. Döbereiner. (1997).** Recent advances in BNF with non-Legume plants. *Soil. Biol. Biochem.* **29**:911-922.
- 21 **Bally, R., D. Thomas-Bauzon, T. heulin, J. balandreau, C. Richard, and J. D. Ley. (1983).** Detremination of the most frequent N₂-fixing bacteria in a rice rhizosphere. *Can. J. Microbiol.* **29**:881-887.
- 22 **Barbieri, P., T. Zanelli, E. Galli, and G. Zanetti. (1986).** Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. *FEMS Microbiol. Lett.* **36**:87-90.
- 23 **Barbieri, P., and E. Galli. (1993).** Effect on Wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indol-3-acetic acid production. *Res. Microbiol.* **144**:69-75.
- 24 **Barbour, W. M., D. R. Hatterman, and G. Stacey. (1991).** Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Appl. Environm. Microbiol.* **57**:2635-2639.
- 25 **Barrios, S. et V. Gonzales. (1971).** Rhizobial symbiosis on Venezuelan savannas. *Plant Soil* **34**:707-719.
- 26 **Barraquio, W. L., and I. Watanabe. (1981).** Occurrence of aerobic nitrogen fixing bacteria in wetland and dryland plants. *Soil Sci. Plant Nutr.* **27**:121-125.
- 27 **Barraquio, W. L., L. Revilla, and J. K. ladha. (1997).** Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant Soil.* **194**:15-24.

- 28 **Bashan, Y., and H. Levanony. (1990).** Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* **36**:591-608.
- 29 **Bashan, Y. (1999).** Interaction of *Azospirillum* spp. in soils : a review. *Biol. Fert. Soils.* **29**:246-256.
- 30 **Bauer, W. B. (1981).** Infection of legume by rhizobia. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **32**:407-449.
- 31 **Bauer, C. E., and B. L. Mars. (1988).** *Rhodobacter capsulatus puf* operon encodes a regulatory protein (*PufQ*) for bacteriochlorophyll synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:7074-7078.
- 32 **Bauer, C. E., D. A. Young, and B. L. Mars. (1988).** Analysis of the *Rhodobacter capsulata puf* operon. Location of the oxygen-regulated promoter region and identification of an additional pf-encoded gene. *J. Biol. Chem.* **263**:4820-4827.
- 33 **Bauer, D. W., and A. Collmer. (1997).** Molecular cloning, characterisation and mutagenesis of a *pel* gene from *Pseudomonas syringae* bv. *lachrymans* encoding a member of the *Erwinia chrysantemi pelADE* family of pectate lyases. *Mol. Plant microbe. Interact.* **10**:369-379.
- 34 **Beatty, J. T. (1995).** Organization of photosynthesis gene transcripts. *Anoxygenic Photosyntetic Bacteria.* The Netherlands, Kluwer Acad. Pub. 1209-1219.
- 35 **Bec-Ferté, M. P., H. B. Krishnan, D. Promé, A. Saavagnac, S. G. Pueppke, and J. C. Promé. (1994).** Structures of Nod Factors from the nitrogen-fixing soybean symbiont *Rhizobium fredii* USDA257. *Biochemistry* **33**:11782-11788.
- 36 **Becker, M., J. K. Ladha, and J. C. G. Ottow. (1988).** Stem nodulating legumes as green manure for lowland rice. *Philipp. J. Crop. Sci.* **13**:121-127.
- 37 **Bélanger, J. G., and G. Gingras. (1988).** Structure and expression of the *puf* operon messenger RNA in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* **263**:7639-7645.
- 38 **Belasco, J. G, J. T. Beatty, C. W. Adams, A. von Gabain, and S. N. Cohen. (1985).** Differential expression of photosynthetic in *Rhodopseudomonas capsulata* results from segmental differences in stability within a polycistronic transcript. *Cell* **40**:171-181.
- 39 **Beringer, J. E. (1974).** R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **84**:188-198.
- 40 **Bertrand, H. (1997).** Stimulation de l'absorption minérale et de la croissance du colza inoculé avec des bactéries isolées de son rhizoplan. Thèse de Docteur. Université Claude Bernard. Lyon I. 81 P.
- 41 **Bertrand, H., C. Plassard, X. Pinochet, B. Touraine, P. Normand, and J. C. Cleyet-Marel. (2000).** Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Can. J. Microbiol.* **46**:229-236.

- 42 **Biondi, E.G., Fancelli, S. and Bazzicalupo, M. (1999)** ISRm10: a new insertion sequence of *Sinorhizobium meliloti*: nucleotide sequence and geographic distribution. FEMS Microbiol. Lett. **181**:171-176.
- 43 **Boddey, R. M., P. M. Chalk, R. L. Victoria, E. Matsui, and J. Döbereiner. (1983)**. The use of the ¹⁵N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv. *batatais*. Can. J. Microbiol. **29**:1036-1045.
- 44 **Boddey, R. M., O. C. Oliveira, S. Urquiaga, V. M. Reis, F. L. de Olivares, V. L. D. Baldani, and J. Döbereiner. (1995)**. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. Plant Soil. **174**:195-209.
- 45 **Boivin, C., I. Ndoye, G. Lortet, A. N'diaye, P. de lajudie, and B. Dreyfus. (1997a)**. The *Sesbania* root symbionts *Sinorhizobium saheli* and *S. teranga* bv. *sesbaniae* can form stem nodules on *sesbania rostrata*, although they are less adapted to stem nodulation than *Azorhizobium caulinodans*. Appl. Environm. Microbiol. **63**:1040-1047.
- 46 **Boivin, C., I. Ndoye, F. Molouba, P. de Lajudie, N. Dupuy, and B. L. Dreyfus. (1997b)**. Stem nodulation in legumes : diversity, mechanisms and unusual characters. Critic Rev. Plant. Sci. **16**:1-30.
- 47 **Boivin, C., and E. Giraud. (1999)**. Molecular symbiotic characterization of rhizobia : Toward a polyphasic approach using Nod factors and *nod* gene ? P. 295-299. In : Highlights of Nitrogen Fixation Research. (Martinez-Romero, E., and G. Hernandez. (eds), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New-york.
- 48 **Bonafassi, E., M. Fischer-Le Saux, N. Boemare, A. Lanois, C. Laumond, and G. Smart. (1999)**. Gnotobiological study of infective juveniles and symbionts of *Steinernema scapterisci* : a model to clarify the concept of the natural occurrence of monoxenic associations in entomopathogenic nematodes. J. Invertebr. Pathol. **74**:164-172.
- 49 **Breedweld, M. W., and K. J. Miller. (1994)**. Cyclic β -glucans of members of the family *Rhizobiaceae*. Microbiol. Rev. **58**:145-161.
- 50 **Brewin, N. J. (1991)**. Development of the legume root nodule. Annu. Rev. Cell. Biol. **7**, 191-226.
- 51 **Brockwell, J. (1980)**. Experiments with crop and pasture legumes. Principle and practice, P. 417-488. In F. J. Bergersen (ed.), Methods for evaluating biological nitrogen fixation. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 52 **Burke, D. M., M. Alberti, and J. E. Hearst. (1991)**. Chlorophyll Fe-proteins and other chlorophyll biosynthesis genes from *Rhodobacter capsulatus* to higher plants, abstr. T/pm-B5. Photochem. Photobiol. **53**(Suppl.):85S-86S.
- 53 **Caetano-Anollés, G., L. G. Wall, A. T. de Micheli, E. M. Macchi, W. D. Bauer, and G. Favelukes. (1988)**. Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. Plant Physiol. **86**:1228-1235.

- 54 **Cavalcante, V., and J. Döbereiner. (1988).** A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil.* 108:23-31.
- 55 **Càradenas, L., J. Dominguez, C. Quinto, I. M. Lopez-Lara, J. J. B. Lugtenberg, H. P. Spaink, G. J. Rademaker, J. Haverkamp and J. E. Thomas-Oates. (1995).** Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium elti*. *Plant Mol. Biol.* 29:453-464.
- 56 **Carlson, R. W., S. J. Juan, U. R. Bhat, J. Glushka, H. P. Spaink, A. H. M. Wijffjes, A. N. N. van Brussel, T. J. W. Stokkermans, N. K. Peters, and G. Stacey. (1993).** The structures and biological activities of the lipo-ologosaccharide nodulation signals produced by type-1 and type-2 strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Biol. Chem.* 268:18372-18381.
- 57 **Cavalcante, V., and J. Döbereiner. (1988).** A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil.* 108:23-31.
- 58 **Chaintreuil, C., E. Giraud, Y. Prin, J. Lorquin, A. BA, M. Gillis, P. de Lajudie, and B. Dreyfus. (2000).** Photosynthetic bradirhizobia are natural endophytes of the african wild rice *Oryza breviligulata*. *Appl. Environ. Microbiol.* December 2000, Volume 66, issue 12.
- 59 **Chaintreuil, C., B. C. Boivin, B. Dreyfus, and E. Giraud. (2000).** Characterization of the common nodulation genes of the photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. ORS285 reveals the presence of a new Insertion Sequence upstream of *nodA*.
- 60 **Chandler, M. R. (1978).** Some observations on infection of *Arachis hypogea* L. by *Rhizobium*. *J. Exp. Bot.* 29:749-755.
- 61 **Chandler, M. R., R. A. Date, and R. J. Roughley. (1982).** Infection and root-nodule development in *Stylosanthes* species by *Rhizobium*. *J. Exp. Bot.* 33:47-57.
- 62 **Chanway, C. P. (1996).** Endophytes : they're not just fungi ! *Can. J. Bot.* 74 :321-322.
- 63 **Chanway, C. P. (1997).** Bacterial endophytes : ecological and pratical implications. *Sydowia.* 50(2):149-170.
- 64 **Charon, C., C. Sousa, M. Crespi, and A. Kondodosi. (1999).** Alteration of END40 expression modifies *Medicago truncatula* root nodule development induced by *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell.* 11:1953-1966.
- 65 **Chen, W. X., G. H. Yan, and J. L. Li. (1988).** Numerical taxonomic study of fastgrowing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst.Bacteriol.* 38:392-397.
- 66 **Chen, W. X., G. Li, Y. Qi, E. T. Wang, H. L. Yuan, and J. L. Li. (1991).** *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:275-280.

- 67 **Chen, W. X., G. H. Yan, and J. L. Li. (1995).** Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid alpine environment in Xinjiang, People's Republic of China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:153-159.
- 68 **Chen, W. X., Z. Y. Tan, J. L. Gao, Y. Li, and E. T. Wang. (1997).** *Rhizobium hainanense* sp. nov. Isolated from tropical legumes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:870-873.
- 69 **Christenson, J. C., A. T. Pavia, K. Seskin, D. Brockmeyer, E. Y. Korgenski, E. Jenkins, J. Pierce, and J. A. Daly. (1997).** Meningitis due to *Ochrobactrum anthropi* : an emerging nosocomial pathogen. A report of 3 cases. *Pediatr. Neurosurg.* **27**:218-221.
- 70 **Clayton, R. K. (1966).** Spectroscopic analysis of bacteriochlorophylls *in vitro* and *in vivo*. *Photochem. Photobiol.* **5**:669-677.
- 71 **Cleland, R. E. (1990).** Auxin and cell elongation. *In* : Plant hormones and their role in plant growth and development. Davies, P. J. (Ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands. P. 132-148.
- 72 **Cocking, E. C., M. R. Davey, S. L. Kothari, J. S. Srivastava, Y. Jing, R. W. Ridge and B. G. Rolfe. (1992).** Altering the specificity control of the interaction between rhizobia and plants. *Symbiosis.* **14**:123-130.
- 73 **Cocking, E. C. (1995).** Interaction of rhizobia from legume stem nodules with rice and wheat for symbiotic nitrogen fixation. *In* Biological Nitrogen Fixation Working Group. International Rice Research Institute, Manila, Philippines. May 2-4.
- 74 **Cogdell, R. J., and R. J. Frank. (1987).** How carotenoids function in photosynthetic bacteria. *Biochim Biophys. Acta.* **895**: 63-79.
- 75 **Cogdell, R. J., P. K. Fyfe, S. J. Barrett, S. M. Prince, A. A. Freer, N. W. Isaacs, P. McGlynn, and C. N. Hunter. (1996).** The purple bacterial photosynthetic unit. *Photosynth. Research.* **48**:55-63.
- 76 **Coomber, S. A., M. Chaudhri, A. Connor, G. Britton, and C. N. Hunter. (1990).** Localized transposon Tn5 mutagenesis of the photosynthetic gene cluster of *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* **4**:977-989.
- 77 **Cooney, J. J., H. W. Marks, Jr., and A. M. Smith. (1966).** Isolation and identification of canthaxanthin from *Micrococcus roseus*. *J. Bacteriol.* **92**:342-345.
- 78 **Corvera, A., D. Promé, J-C. Promé, E. M. Romero, and D. Romero. (1999).** The *nolL* Gene from *Rhizobium elti* determines nodulation efficiency by mediating the acetylation of the fucosyl residue in the nodulation factor. *MPMI.* **12**:236-246.
- 79 **Csanadi, G., J. Szecsi, P. Kalo, P. Kiss, G. Endre, A. Kondorosi, E. Kondorosi, and G. B. Kiss. (1994).** *Enod12*, an early nodulin gene, is not required for nodule formation and efficient Nitrogen fixation in alfalfa. *Plant Cell.* **6**:201-213.

- 80 **Czygan, F. C. (1968).** Sekundär-Carotinoide in Grünalgen. I. Chemie, vorkommen und faktoren welche die bildung dieser polyene beeinflussen. *Archiv für Mikrobiologie* **61**:81-102.
- 81 **Dangeard, P. A. (1926).** Recherches sur les tubercules radicaux des légumineuses. 270 P. *Le Botaniste*, série 16, Paris.
- 82 **Davis, E. O., and A. W. B. Jonhston. (1990).** Regulatory functions of the three *nodD* genes of *Rhizobium leguminosarium* bv. *phaseoli*. *Mol. Microbiol.* **4**:933-941.
- 83 **Dazzo, F. B., C. A. Napoli, and D. H. Hubell. (1976).** Adsorption of bacteria to roots as roots as related to host specificity in the *Rhizobium*-clover symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**:166-171.
- 84 **Dean, D. R., and M. R. Jacobson. (1992).** Biochemical genetics of nitrogenase. *In* : Biological Nitrogen Fixation. (Stacey G., Burris R. H., Evans H.J. (eds), Chapman and Hall, New-york, pp. 763-834.
- 85 **Dean, D. R., J. Bolin, and L. Zheng. (1993).** Nitrogenase metalloclusters : structure, organization and synthesis. *J. Bacteriol.* **175**:6737-6744.
- 86 **De Jong, A. J., R. Heidstra, H. P. Spaink, M. V. Hartog, E. A. Meijer, T. Hendriks, F. L. Schiavo, M. Terzi, T. Bisseling, A. Van Kammen, and S. C. de Vries. (1993).** *Rhizobium* lipooligosaccharides rescue a carrot somatic embryo mutant. *Plant Cell.* **5**:615-620.
- 87 **de Lajudie, P., A. Willems, G. Nick, F. Moreira, F. Molouba, B. Hoste, U. Torck, M. Neyra, K. Lindström, M. T. Collins, B. L. Dreyfus, and M. Gillis. (1998a).** Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:369-382.
- 88 **de Lajudie, P., E. Fulele-Laurent, A. Willems, U. Torck, R. Coopman, M. D. Collins, K. Kersters, B. L. Dreyfus, and M. Gillis. (1998b).** Description of *Allorhizobium undicola* gen. nov. Sp. for nitrogen-fixing bacteria efficiently nodulating *Neptunia natans* in Senegal. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:1277-1290.
- 89 **de Lajudie, P., A. Willems, B. Pot, D. Dewetting, G. Maestrojuan, M. Neyra, M. D. Collins, B. Dreyfus, K. Kersters, and M. Gillis. (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. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:715-733.
- 90 **De Ley, J. (1991).** The proteobacteria : ribosomal RNA cistron similarities and bacterial taxonomy. P. 2109-2140. *In* Balows, A., H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.). *The Prokaryotes*, 2th ed. Vol. 2. Springer-Verlag, New York.
- 91 **Dénarié, J., F. Débellé, and C. Rosenberg. (1992).** Signaling and host range variation in nodulation. *Ann. Rev. Microbiol.* **46**:497-531.

- 92 **Dénarié J., F. Débellé, and J. C. promé. (1996).** *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors : signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **65**:503-535.
- 93 **Dénarié, J., and P. Roche. (1992).** *Rhizobium* nodulation signals. In : Verma DPS (éd) *Molecular signals in plant-microbe communications*, pp 295-324. Boca Raton Florida : CRC Press.
- 94 **Denèfle, P., A. Kush, F. Norel, A. Paquelin, and C. Elmerich. (1987).** Biochemical and genetic analysis of the region of *Rhizobium* ORS571. *Mol. Gen. Genet.* **207**:280-287.
- 95 **Dentice di Accadia, F., O. Griбанovski-Sassu, A. Romagnoli, and L. Tuttobello. (1966).** Isolation and identification of carotenoids produced by a green alga (*Dictyococcus cinnabarinus*) in submerged culture. *Biochem. J.* **101**, 735-740.
- 96 **Dentice di Accadia, F., O. Griбанovski-Sassu, and N. Lozano Reyes. (1968).** Blushing effects of some carbohydrates on the green alga *Dictyococcus cinnabarinus*. *Experientia* **24**:1177-1179.
- 97 **Djordjevic, M. A., P. R. W Schofield, N. A Morisson, B. J Bassam, J. Plazinski, J. M. Watson, and B. G. Rolfe. (1985a).** *Rhizobium* nodulation genes involved in root hair curling (Hac) are functionally conserved. *Plant Mol. Biol.* **4**:147-160.
- 98 **Döbereiner, J., and V. L. D. Baldani. (1982).** Bases científicas para uma agricultura biológica. *ciencia e cultura São Paulo.* **34**:869-881.
- 99 **Döbereiner, J. (1992a).** Recent changes in concepts of plant bacteria interactions : Endophytic N₂ fixing bacteria. *ciencia e cultura.* **44**:310-313.
- 100 **Döbereiner, J. (1992b).** History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis.* **13**:1-13.
- 101 **Döbereiner, J., V. L. D. Baldani, F. L. Olivares, and V. M. Reis. (1994).** Endophytic diazotrophs : The key to graminaceous plants. In *Nitrogen Fixation with Non-Legumes.* (N. A. Hegazi, M. Fayez, and M. Monib, Eds). pp. 395-408 American University in Cairo Press. Cairo, Egypt.
- 102 **Döbereiner, J., V. L. D. Baldani, and V. M. Reis. (1995).** Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In *Azospirillum VI and related microorganisms.* Eds. I. Fendrik, M. del Gallo, J. Vanderleyden and M. de Zamarocy. pp 3-14. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- 103 **Doignon-Bourcier, F., A. Sy, A. Willems, U. Torck, B. Dreyfus, M. Gillis, and P. de Lajudie. (1999).** Diversity of Bradyrhizobia from 27 tropical *Leguminosae* species native of Senegal. *System. Appl. Microbiol.* **22**:647-661.
- 104 **Doyle, J. J. (1998).** Phylogenetic perspectives on nodulation :evolving views of plants ans symbiotic bacteria. *Trends Plants Sci.* **3**:473-478.

- 105 **Dreyfus, B., and Y. R. Dommergues. (1981a).** Nitrogen-fixing nodules induced by *Rhizobium* on the stem of the tropical legume *Sesbania rostrata*. FEMS Microbiol. Lett. **10**:313-317.
- 106 **Dreyfus, B. L., C. Elmerich, and Y. R. Dommergues. (1983).** Free-living *Rhizobium* strain Able To Grow on N₂ as the sole Nitrogen source. Appl. Env. Microbiol. **45** (2):711-713.
- 107 **Dreyfus, B. L., D. Alazard, and Y. R. Dommergues. (1984).** Stem-nodulating rhizobia. In current Perspectives in Microbial Ecology/ed. by M. J. Klug and C. A. Reddy. Washington DC : American Society Microbiology. pp 161-169.
- 108 **Dreyfus, B. L., J. L. Garcia, and M. Gillis. (1988).** Characterization of *Azorhizobium caulinaudans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. Int. J. Syst. Bacteriol. **38**:89-98.
- 109 **Duhoux, E. (1984).** Ontogénèse des nodules caulinaires de *Sesbania rostrata* (Légumineuse). Can. J. Bot. **62**:982-994.
- 110 **Duhoux, E., and B. L. Dreyfus. (1982).** Nature des sites d'infection par le *Rhizobium* de la tige de *Sesbania rostrata* (Brem.) C. R. Acad. Sci. (Paris) **349**:407-411.
- 111 **Dupuy, N. (1993).** Contribution à l'étude de la symbiose fixatrice d'azote entre *Acacia albida* et *Bradyrhizobium* sp. 158p. Thèse : Microbiologie : Lilles Flandres. N°1108.
- 112 **Dupuy, N., A. Willems, B. Pot, D. Dewettinck, J. Vandebrouaene, G. Maestrojuan, B. Dreyfus, K. Kersters, M. D. Collins, and M. Gillis. (1994).** Phenotypic and genotypic characterization of *Bradyrhizobia* nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. Int. J. Syst. Bacteriol. **44**:461-473.
- 113 **Dusha, I., A. Bakos, A. Kondorosi, F. J. De Bruijn, and J. Schell. (1989).** The *Rhizobium meliloti* early nodulation genes (*nodABC*) are nitrogen-regulated. Isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on alfalfa in the presence of ammonium. Mol. Gen. Genet. **219**:89-96.
- 114 **Eady, R. R. (1986).** Enzymology in free-living diazotrophs. In: Brogton, W. J. and A. Pühler (editors), Nitrogen fixation (Molecular Biology) Clarendon Press, Oxford, pp.1-49.
- 115 **Eaglesham, A. R. J., and A. A. Szalay. (1983).** Aerial stem nodules on *Aeschynomene* spp. Plant Sci. Lett. **29**:265-272.
- 116 **Eaglesham, A. R. J., J. M. Ellis, W. R. Evans, D. E. Fleishmann, M. Hungria, and R. W. F. Hardy. (1990).** The first photosynthetic N₂-fixing *Rhizobium* : Characteristics. pp. 805-811. In Nitrogen fixation : Achievements and objectives. Gresshoff, P.M., R. L. Stacey and W. E. Newton (eds), Chapman & Hall, New York.

- 117 Eardly, B. D., L. A. Mareron, N. H. Smith, D. A. Johnson, M. D. Rumbaugh, and R. K. Selander. (1990). Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:187-194.
- 118 Egner, T., T. Hurek, and B. Reinhold-Hurek. (1998). Use of green fluorescent protein to detect expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. BH72, a grass-associated diazotroph, on rice roots. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **11**:71-75.
- 119 Eimhjellen, K. E., O. Aasmundrud, et A. Jensen. (1963). A new bacterial chlorophyll. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **10**:232-236.
- 120 Elmerich, C. (1991). Genetics and regulation of Mo-nitrogenase. In : *Biology and Biochemistry of Nitrogen fixation* (Dilworth M. J., Glenn A. R., eds). Elsevier, Amsterdam, pp.103-141.
- 121 Elmerich, C., W. Zimmer, and C. Vielle. (1992). Associative nitrogen-fixing bacteria. In : *Biological Nitrogen Fixation*. Evans, H., R. Burris, and G. Stacey (eds), Chapman and Hall, New-york. pp. 211-257.
- 122 Evans, W. R., D. E. Fleischman, H. E. Calvert, P. V. Pyati, G. M. Alter, and N. S. S. Rao. (1990). Bacteriochlorophyll and photosynthetic reaction centers in *Rhizobium* strain BTAi1. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3445-3449.
- 123 Everitt, B.S. (1993). *Cluster analysis*. John Wiley and Sons Inc., Ny. USA.170 pages.
- 124 Fallik, E., S. Sarig, and Y. Okon. (1994). Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. In : *Azospirillum/plant associations*. Edited by Y. Okon. CRC Press, Boca Raton. pp. 57-75.
- 125 Farchaus, J. W., W. P. Barz, H. Grünberg, and D. Oersterhelt. (1992). Studies on the expression of the PufX polypeptide and its requirement for photoheterotrophic growth in *Rhodobacter sphaeroides*. *EMBO J.* **11**:2779-2788.
- 126 Fellay, R., P. Rochepeau, B. Relic, and W. J. Broughton. (1995). Signals to and emanating from *Rhizobium* largely control symbiotic specificity in pathogenesis and host specificity in plant diseases. *Histopathological, biochemical, genetic and molecular bases*. Vol. 1 : Prokaryotes (eds U. S. Singh, R. P. Singh, and K. Kohmoto, Pergamon/Elsevier Science Ltd., Oxford, pp. 199-220.
- 127 Firmin, J. L., K. E. Wilson, R. W. Carlson, A. E. Davies, and J. A. Downie. (1993). Resistance to nodulation of cv. Afghanistan peas is overcome by *nodX*, which mediates an O-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipo-oligosaccharide nodulation factor. *Mol. Microbiol.* **10**:351-360.
- 128 Fischer, H. M. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in Rhizobia. *Microbil. Rev.* **58**:352-386.
- 129 Fischer, R. F., and S. R. Long. (1992). *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature* **35**:655-660.

- 130 **Fisher, H. M. (1994).** Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* **58**:352-386.
- 131 **Fonstein, M., and R. Haselkorn. (1993).** Chromosomal structure of *Rhodobacter capsulatus* strain SB1003: cosmid encyclopedia and high resolution physical and genetic map. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:2522-2526.
- 132 **Foppen, F. H. (1971).** Tables for the identification of carotenoid pigments. *Chromatogr. Rev.* **14**:133-298.
- 133 **Fu, R. and Voordouw, G. (1998).** ISD1, an insertion element from the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: structure, transposition, and distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:53-61.
- 134 **Fuerst, J. A., J. A. Hawkins, A. Holmes, L. I. Sly, C. J. Moore, and E. Stackerbrandt. (1993).** *Porphyrobacter neustonensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic bacteriochlorophyll-synthesizing budding bacterium from fresh water. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:125-134.
- 135 **Galiana, A., J. Chaumont, H. G. Diem, and Y. R. Dommergues. (1990).** Nitrogen-fixing potential of *A. mangium* and *A. auriculiformis* seedlings inoculated with *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* spp. *Biol. Fertil. Soils.* **9**:261-267.
- 136 **Gaworzewska, E. T., and M. J. Carlile. (1982).** Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarium* and other bacteria towards root exudates from legumes and others plants. *J. gen. Microbiol.* **128**:1179-1188.
- 137 **Geelen, D., P. Mergaert, R. A. Geremia, S. Goormachtig, M. Van Montagu, and M. Holsters. (1993).** Identification of *nodSUII* genes on Nod locus 1 of *Azorhizobium caulinodans*: evidence that *nodS* encodes a methyltransferase involved in Nod factor modification. *Mol. Microbiol.* **9**:145-154.
- 138 **Geelen, D., K. Goethals, M. Van Montagu, and M. Holsters. (1995b).** The *nodD* locus from *Azorhizobium caulinodans* is flanked by two repetitive elements. *Gene* **164**:107-111.
- 139 **Gibbons, A. M., and K. F. Gregory. (1972).** Relatedness among *Rhizobium* and *Agrobacterium* species determined by three methods of nucleic acid hybridization. *J. Bacteriol.* **11**:129-141.
- 140 **Gillis, M., T. Van Van, R. Bardin, M. Goor, P. Hebbbar, A. Willems, P. Segers, K. Kersters, T. Heulin, and M. P. Fernandez. (1995).** Polyphasic taxonomy in the Genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int. J. Syst.* **45**:274-289.
- 141 **Giraud, E., L. Hannibal, J. Fardoux, A. Verméglio, and B. Dreyfus. (2000).** Effect of *Bradyrhizobium* photosynthesis on stem nodulation with *Aeschynomene sensitiva*. Soumis à PNAS

- 142 **Glick, B. R. (1995).** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41**:109-117.
- 143 **Goethals, K., M. Van Montagu, and M. Holsters (1990).** Identification and characterization of a functional *nodD* gene in *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *J. Bacteriol.* **172**:2658-2666.
- 144 **Gonzalez, J. E., B. L. Reuhs, and G. C. Walker. (1996).** Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:8636-8641.
- 145 **Goodwin, T. W. (1956).** The carotenoids of photosynthetic bacteria. II. The carotenoids of a number of non-sulfur purple bacteria (*Athiorhodaceae*). *Arch. Mikrobiol.* **24**:313-322.
- 146 **Goodwin, T. W. (1980).** The biochemistry of the carotenoids, vol. 1, plants, 2nd ed., pp. 257-345. Chapman & Hall, Ltd., London.
- 147 **Goodwin, T. W., and H. G. Osman. (1954).** Studies on carotenogenesis : Spirilloxanthin synthesis by washed cells of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem. J.* **56**:222-227.
- 148 **Gough, C., G. Webster, J. Vasse, C. Batchelor, K. O'Callahan, M. Davey, J. dénarié, and E. Cocking. (1996).** Specific flavonoids stimulate intercellular colonization of non-legumes by *Azorhizobium caulinodans*. In *Biology of plant-Microbe Interactions* Eds. G. Stacey, B. Mullin and P. Gresshoff, Int. Soc. Mol. Plant-Microbe Int., Minneapolis, MN.
- 149 **Graham, P. H., M. J. Sadowsky, H. H. Keyser, Y. M. Barnett, R. S. Bradley, J. E. Cooper, D. J. de Ley, B. D. W. Jarvis, E. B. Roslycky, B. W. Strijdom, and J. P. W. Young. (1991).** Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root and stem nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:582-587.
- 150 **Green, P. N., I. J. Bousfield, and D. Hood. (1988).** Three new *Methylobacterium* species: *M. rhodesianum* sp. nov., *M. sp. nov.*, and *M. fujisawaense* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**:124-127.
- 151 **Gualtieri, G., and T. Bisseling. (2000).** The evolution of nodulation. *Plant. Mol. Biol.* **42**:181-194.
- 152 **Györgypal, Z., N. Iyer, and A. Kondorosi (1988).** Three regulatory *nodD* alleles of diverged-flavonoid specificity are involved in host-dependent nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. genet* **212**:85-92.
- 153 **Hagen, G. (1990).** The control of gene expression by auxin. In : *Plant hormones and their role in plant growth and development.* Davies, P. J. (Ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands. P. 149-163.
- 154 **Hagerup, O. (1928).** En hygروفil baelgplante (*Aeschynomene aspera* L.) med bakterieknolde paa staenglen. *Dansk. Bot. Arkiv.* **14**:1-9.

- 155 Hallmann, J., A. Quadt-Hallmann, W. F. Mahafee, and J. W. Kloepper. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* **43**:895-914.
- 156 Häne, B. G. K., K. Jäger, and H. G. Drexler. (1993). The Pearson product-moment correlation coefficient is better suited for identification of DNA fingerprint profiles than band matching algorithms. *Electrophoresis.* **14**:967-972.
- 157 Harashima, K., T. Shiba, T. Totsuka, U. Simidu, and N. Taga. (1978). Occurrence of bacteriochlorophyll *a* in a strain of an aerobic heterotrophic bacterium. *Agric Biol. Chem.* **42**:1627-1628.
- 158 Harashima, K., J. Hayasaki, T. Ikari, and T. Shiba. (1980). O₂-stimulated synthesis of bacteriochlorophyll and carotenoids in marine bacteria. *Plant cell Physiol.* **2**:1283-1294.
- 159 Hardy, R. W. R., R. C. Burns, and R. D. Holsten. (1973). Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of N₂ fixation. *Soil Biol. Biochem.* **5**:47-81.
- 160 Haukka, K., K. Lindström, and P. W. Young. (1998). Three Phylogenetic Group of *nodA* and *nifH* Genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* Isolates from Leguminous Trees Growing in Africa and Latin America. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:419-426.
- 161 Heidstra R., R. Geurts, H. Franssen, H. P. Spaink, A. Van Kammen, and T. Bisseling. (1994). Root hair deformation activity of Nod factors and their fate in *Vicia sativa*. *Plant physiol.* **105**:787-797.
- 162 Hernandez-Lucas, I., E. Martinez-Romero, and S. G. Pueppke. (1995). Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2775-2779.
- 163 Hilali, A., D. Prevost, W. J. Broughton, and H. Antoun. (2000). Potential use of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii as a plant growth promoting rhizobacteria on wheat. In : 17th North American conference on symbiotic Nitrogen. July 23-28, 2000. Université Laval, Québec, Canada. Eds. Agriculture and Agri-food Canada. P. 81.
- 164 Hill, S. (1992). Physiology of nitrogen fixation in free-living heterotrophs. In : Biological Nitrogen Fixation. Evans, H., R. Burris, and G. Stacey (eds), Chapman and Hall, New-york. pp. 87-134.
- 165 Homer, M. J., T. D. Paustian, V. K. Shah, and G. P. Roberts. (1993). The *nifY* product of *Klebsiella pneumoniae* is associated with apodinitrogenase and dissociates upon activation with the iron-molybdenum cofactor. *J. bacteriol.* **175**:4907-4910.
- 166 Honma, M. A., M. Asomaning, and F. M. Ausubel. (1990). *Rhizobium meliloti nodD* genes mediate host-specific activation of *nodABC*. *J. bacteriol.* **172**:901-911.
- 167 Horvath, B., E. Kondorosi, M. John, J. Schmidt, I. Török, Z. Györgypal, I. Barabas, U. Wieneke, J. Schell, and A. Kondorosi. (1986). Organization, structure and

- symbiotic function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes determining host specificity for alfalfa. *Cell*. **46**:335-343.
- 168 Horvath, B., R. Heidstra, M. Lados, M. Moerman, H. P. Spaink, J. C. Promé, A. Van Kammen, and T. Bisseling. (1993). Lipo-oligosaccharides of *Rhizobium* induce infection-related early nodulin gene expression in pea root hairs. *Plants J*. **4**:727-733.
- 169 Hungria, M., J. M. Ellis, W. F. Hardy, and A. R. J. Eaglesham. (1993). Light-stimulated $^{14}\text{CO}_2$ uptake and acetylene reduction by bacteriochlorophyll containing stem nodule isolate BTAi1. *Biol. Fertil. Soils*. **15**:208-214.
- 170 Hurek, T., B. Reinhold-Hurek, M. Van Montagu, and E. Kelleberger. (1994b). Root colonization and systematic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *J. Bacteriol*. **176**:1913-1923.
- 171 Jacoud, C., D. Job, P. Wadoux, and R. Bally. (1999). Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. *Can. J. Microbiol*. **45**:339-342.
- 172 Jacoud, C., D. Faure, P. Wadoux, and R. Bally. (1998). Development of a strain-specific probe to follow inoculated *Azospirillum lipoferum* CRT1 under field conditions and enhancement of maize root development by inoculation. *FEMS Microbiol. Ecol*. **27**:43-51.
- 173 Jacquot, M., G. Clément, A. Ghesquière, J-C. Glaszmann, E. Guiderdoni, and D. Tharreau. (1997). Les riz. In : L'amélioration des plantes tropicales, Charrier, A., M. Jacquot, S. Hamon, and D. Nicolas. (eds), Repères. CIRAD, ORSTOM. P.533-564. Montpellier, France.
- 174 James, E. K., J. I. Sprent, J. M. Sutherland, S. G. Mcinroy, and F. R. Minchin. (1992). The structure of nitrogen fixing root nodules on the aquatic mimosoid legume *Neptunie plena*. *Annals of Botany*. **69**:173-180.
- 175 James, E. K., and F. L. Olivares. (1998). Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Crit. Rev. Plant Sci*. **17**:77-119.
- 176 Jarvis, B. D. W., C. E. Pankhurst, and J. J. Patel. (1982). *Rhizobium loti* a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol*. **32**:378-380.
- 177 Jarvis, B. D. W., M. Gillis, and J. De Ley. (1986). Intra- and intergeneric similarities between the ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species and some related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol*. **36**:129-138.
- 178 Jarvis, B. D. W., H. L. Dower, and J. P. W. Young. (1992). Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* species and some related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol*. **42**:93-96.
- 179 Jarvis, B. D. W., P. Van Berkum, W. X. Chen, S. M. Nour, M. P. Fernandez, J. C. Cleyet-Marel, and, M. Gillis. (1997). Transfert of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*,

- Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. Nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **47**:895-898.
- 180 **Jenick, J., et J. Kubikova. (1969).** Root systems of tropical trees. III The Heterorhizis of *Aeschynomene elaphroxylon* (Guill. et Perr.) Taub., Preslia **14**:59-65.
- 181 **Jordan, D. C. (1982).** Transfert of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing root nodule bacteria from leguminous plants. Int. J. Syst. Bacteriol. **32**:136-139.
- 182 **Jordan, D. C. (1984).** Rhizobiaceae, In Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), The Williams & Wilkins Co., Baltimore. pp 234-254.
- 183 **Journet, E. P., M. Pichon, A. Dedieu, F. de Billy, G. Truchet, and D. G. Barker (1994).** *Rhizobium meliloti* Nod factor elicit cell-specific transcription of the *ENOD12* gene in transgenic alfalfa. The Plant Journal, **6**:241-249.
- 184 **Kalpulnik, Y., Y. Okon, and Y. Henis. (1985b).** Changes in root morphology of wheat caused *Azospirillum* inoculation. Can. J. Microbiol. **31**:881-887.
- 185 **Kennedy, I. R., L. L. Pereg-Gerk, C. Wood, R. Deaker, K. Gilchrist, and S. Katupitiya. (1997).** Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops : Facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat. Plant and Soil. **194**:65-79.
- 186 **Kerstens, K. (1985).** Numerical methods in the classification of bacteria by electrophoresis of their proteins. Computer-assisted bacterial systematic. London, Academic press.
- 187 **Khammas, K. M., E. Ageron, P. A. D. Grimont, and P. Kaiser. (1989).** *Azospirillum irakense* sp. nov. a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. Research in Microbiology. **140**:679-693.
- 188 **Kiley, P. J., and S. Kaplan. (1987).** Cloning, DNA sequence, and expression of the *Rhodobacter spheroides* light-harvesting B800-850- α and B800-850- β genes. J. Bacteriol. **169**:3268-3275.
- 189 **Kiredjian, M., B. Holmes, K. Kersters, J. Guilvout, and J. De Ley. (1986).** *Alcaligenes piechaudii*, a new species from human clinical specimens and the environment. Int. J. Syst. Bacteriol. **38**:351-358.
- 190 **Klob, W., and P. Martin. (1985).** Response of plant roots to inoculation with *Azospirillum brasiliense* and to application of indole-acetic acid. In : *Azospirillum* III : Genetics, Physiology, Ecology, Klingmüller W. (Ed.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. P. 215-221.
- 191 **Klopper, J. W., and C. J. Beauchamp. (1992).** A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. Can. J. Microbiol. **38**:1219-1232.

- 192 **Kokotek, W., and W. Lotz. (1989).** Construction of *lacZ*-kanamycin-resistance cassette, useful for site-directed mutagenesis and as promoter probe. *Gene*. **84**:467-471.
- 193 **Kondorosi, A. (1992).** Regulation of nodulation genes in rhizobia. In *Molecular Signals in Plant-Microbe Communication*. D. P. S. Verma ed. (CRC Press: Boca Raton), pp. 325-340.
- 194 **Kondorosi, E., J. Gyuris, J. Schmidt, M. John, E. Duda, B. Hoffman, J. Schell, and A. Kondorosi. (1991b).** Identification of NolR, a negative transacting factor controlling the *nod* regulon in *Rhizobium meliloti*. *J. Mol. Biol.* **222**:885-886.
- 195 **Kouchi, H., K. Takane, R. B. So, J. K. Ladha, and P. M. Reddy. (1999).** Rice *ENOD40*: isolation and expression analysis in rice and transgenic soybean root nodules. *Plant J.* **18**:121-129.
- 196 **Kretschmer, A. E., and R. C. Bullock. (1979).** *Aeschynomene* spp. distribution and potential use. *Soil Crop Sci. Soc. Fla. Proc.* **39**:145-152.
- 197 **Krinsky, N. I., and T. H. Goldsmith. (1960).** The carotenoids of a flagellated alga, *Euglena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **91**:271-279.
- 198 **Kuykendall, L. D., B. Saxena, T. E. Devine, and S. E. Udell. (1992).** Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982) and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* **38**:501-505.
- 199 **Ladha, J. K. (1986).** Studies on nitrogen fixation by free-living and rice-plant associated bacteria in wetland rice field. *Bionature* **6**:47-58.
- 200 **Ladha, J. K., A. Padre, G. Punzalan, and I. Watanabe. (1987).** Nitrogen fixing (C_2H_2 -reducing) activity and plant growth characters of 16 wetland rice varieties. *Soil Sci. Plant Nutr.* **33**:187-200.
- 201 **Ladha, J. K., S. Miyan, and M. Garcia. (1989b).** *Sesbania rostrata* as a green manure for lowland rice: growth N_2 fixation, *Azorhizobium* sp. inoculation, and effects on succeeding crop yields and nitrogen balance. *Biol. Fertil. Soils.* **7**:191-197.
- 202 **Ladha, J. K., and R. B. So. (1994).** Numerical Taxonomy of photosynthetic rhizobia nodulating *Aeschynomene* species. *Int. J. Syst. Bact.* **44**:62-73.
- 203 **Ladha, J. K., R. P. Pareek, and M. Becker. (1992).** Stem nodulating legume *Rhizobium* symbiosis and its agronomic use in lowland rice. pp. 147-192. In *Advances in soil science*, vol. 20, Stewart, B. A. (ed.), Springer-Verlag, New York.
- 204 **Ladha, J. K., F. J. de Bruijn, and K. A. Malik. (1997).** Introduction: Assessing opportunities for nitrogen fixation in rice-a frontier project. *Plant and Soil.* **194**:1-10.
- 205 **Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London).* **227**:680-685.

- 206 **Laguerre, G., M. P. Fernandez, V. Edel, P. Normand, and N. Armager. (1993b)** genomic heterogeneity among french *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:761-767.
- 207 **Lancelle, S. A., and J. G. Torrey. (1984).** Early development of *Rhizobium* induced root nodules of *Parasponia rigida*. I. Infection and early nodule initiation. *Protoplasma* **123**:26-37.
- 208 **Lee, J. K., P. J. Kiley, and S. Kaplan. (1989).** Postranscriptional expression control of *puc* operon expression of B800-850 light harvesting complex formation in *Rhodobacter spheroides* 2.4.1. *J. Bacteriol.* **171**:3391-3405.
- 209 **Lerouge, P., P. Roche, C. Faucher, F. Maillet, G. Truchet, J.C. Promé, and J. Dénarié. (1990).** Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acetylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature (London)* **344**:781-784.
- 210 **Levanony, H., and Y. Bashan. (1989).** Enhancement of cell division in wheat root tips and growth of root elongation zone induced by *Azospirillum brasilense*. *Cd. Can. J. Bot.* **67**:2213-2216.
- 211 **Levanony, H., Y. Bashan, B. Romano, and E. Klein. (1990).** Enhancement of cell division in wheat roots tips and growth of root elongation zone induced by *Azospirillum brasilense*. *Cd. Can. J. Bot.* **67**:2213-2216.
- 212 **Liaaen-Jensen, S., et A. Jensen. (1971).** Quantitative determination of carotenoids in photosynthetic tissues. pp. 586-602. *In* San Pietro, A. (ed), *Methods in Enzymology*, vol. 23, Academic Press, New York and London.
- 213 **Lin, W., Y. Okon, and R. W. F. Hardy. (1983).** Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:1775-1779.
- 214 **Lindström, K. (1989).** *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:365-367.
- 215 **Lindström, K., P. Van berkum, M. Gillis, E. Martinez, N. Novikova, and B. Jarvis. (1995).** Report from the roundtable on *Rhizobium* taxonomy. *In*: Nitrogen fixation: Fundamentals and Applications. Tikhonovitch I. A., Provorov N. A., Romanov V. I. and Newton W. E. (eds). Kluwer Academic Publishers (Netherlands) pp. 807-810.
- 216 **Lindström, K. (1998).** Résultats non publiés. (voir référence Nick, G. 1998).
- 217 **Lopez-lara, I. M., K. M. G. M. Van den Drift, A. A. N. Van brussel, J. Haverkamp, B. J. J. Lugtenberg, J. E. Thomas-Oates, and H. P. Spaink. (1995b).** Induction of nodule primordia on *Phaseolus vulgaris* and *Acacia* by lipo-chitine oligosaccharide nodulation signals from broad host-range *Rhizobium* strains GRH2. *Plant. Mol. Biol.* **29**:465-477.

- 218 **Lorquin, J., G. Lortet, M. Ferro, N. Mear, B. Dreyfus, J-C. Promé, and C. Boivin. (1997a).** Nod factors from *Sinorhizobium saheli* and *S. teranga* bv. *sesbaniae* are both arabinosylated and fucosylated, a structural feature specific to *sesbania rostrata* symbionts. *Mol. Plant-Microbe*. 10 :879-890.
- 219 **Lorquin, J., F. Molouba, and B. L. Dreyfus. (1997b).** Identification of the carotenoid pigment canthaxanthin from photosynthetic *Bradyrhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1151-1154.
- 220 **Lorquin, J., F. Molouba, N. Dupuy, S. NDiaye, D. Alazard, M. Gillis, and B. L. Dreyfus. (1993).** Diversity of photosynthetic *Bradyrhizobium* strains from stem nodules of *Aeschynomene* species. p. 683-689. In Palacios, R., J. Mora, W. E. Newton (ed), *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston.
- 221 **Lortet, G., N. Mear, J. Lorquin, B. Dreyfus, P. de Lajudie, C. Rosenberg, and C. Boivin. (1996).** Nod factor thin-layer chromatography profiling as a tool to characterize symbiotic specificity of rhizobial strains : application to *Sinorhizobium saheli*, *S. teranga* and *Rhizobium* sp. Strains isolated from *Acacia* and *Sesbania*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:736-747.
- 222 **Loureiro, M. F., S. M. de Faria, E. K. James, A. Pott, and A. A. Franco. (1994).** Nitrogen-fixing stem nodules of the legumes *Discolobium pulchellum* benth. *New Phytol.* 128:283-295.
- 223 **Loureiro, M. F., James, E. K., Sprent, J. L., et A. A. Franco. (1995).** Stem and root nodules on the tropical wetland legume *Aeschynomene fluminensis*. *New Phytologist.* 130:531-544.
- 224 **Mahillon, J., and Chandler, M. (1988).** Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:725-774.
- 225 **Marrs, B. (1981).** Mobilization of the genes for photosynthesis from *Rhodospseudomonas capsulata* by a promiscuous plasmid. *J. Bacteriol.* 146:1003-1012.
- 226 **Martín, M., J. Lloret, M. Sanchez-Contreras, I. Bonilla, and R. Rivilla. (2000).** MucR is necessary for galactoglucan production in *Sinorhizobium meliloti* EFB1. *MPMI.* 13:129-135.
- 227 **Martinez-Romero, E., L. Segovia, F. M. Mercante, A. A. Franco, P. Graham, and M. A. Pardo. (1991).** *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* spp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:417-426.
- 228 **Martinez-Romero, E., and J. Caballero-Mellado. (1996).** *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit. Rev. Plant Sciences.* 15:113-140.
- 229 **McCardell, A. J., M. J. sadowsky, and P. B. Gregan. (1992).** Genetics and improvement of biological nitrogen fixation. In : Metting FB Jr (éd) *Soil microbial ecology*, pp 151-175. New York : Marcel Dekker.

- 230 **Meeks, J. C. (1998).** Symbiosis between Nitrogen-fixing cyanobacteria and plant. *BioScience*. **48**:266-276.
- 231 **Mergaert, P., M. van Montagu, J. C. Promé, and M. Holsters. (1993).** Three unusual modifications, a D-arabinosyl, an N-methyl, and a carbamoyl group, are present on the Nod factors of *Azorhizobium caulinodans* strains ORS571. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**:1551-1555.
- 232 **Mergaert, P., M. Ferro, W. D'Haese, M. van Montagu, M. Holsters, and J. C. Promé. (1997a).** Nod factor of *Azorhizobium caulinodans* strains ORS571 can be glycosylated with an arabinosyl group, a fucosyl group, or both. *Mol. Plant-Microbe interact.* **10**:683-687.
- 233 **Mergaert, P., M. van Montagu, and M. Holsters. (1997b).** Molecular mechanism of Nod factors diversity. *Mol. Microbiol.* **25**:811-817.
- 234 **Merrick, M. J. (1993).** Organisation and regulation of nitrogen fixation genes. In :New horizons in Nitrogen Fixation (Palacios R., J. Mora, W. E. Newton, eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 43-54.
- 235 **Minchin, F. R., J. F. Witty, J. E. Seehy, and M. Muller. (1983).** A major error in the acetylene reduction assay. *J. Exp. Bot.* **34**:641-649.
- 236 **Miyata, K., S. Yamada, T. Fukuo, and S. Kawate. (1983).** Bacteriochlorophyll formation by methanol-utilizing bacterium. In Abstracts of Annual Meeting of Agricultural Chemical Society of Japan. 379-384.
- 237 **Moller, L. V. M., J. P. Arends, H. J. M. Harmsen, A. Talens, P. Terpstra, and M. J. H. Slooff. (1999).** *Ochrobactrum intermedium* infection after liver transplantation. *J. Clin. Microbiol.* **37**:241-244.
- 238 **Molouba, F., J. Lorquin, A. Willems, B. Hoste, E. Giraud, B. Dreyfus, M. Gillis, P. de Lajudie, and C. Masson-Boivin. (1999).** Photosynthetic bradyrhizobia from *Aeschynomene* spp. are specific to stem-nodulated species and form a separate 16S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3084-3094.
- 239 **Moreira, F., M. Gillis, B. Pot, K. Kersters, and A. A. Franco. (1993).** Characterization of rhizobia from different divergence groups of tropical *Leguminosae* by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**:135-146.
- 240 **Moreira, F. M. S., K. Haukka, and J. P. W. Young. (1998).** Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. *Mol. Ecol.* **7**:889-895.
- 241 **Murty, M. G., and J. K. Iadha. (1988).** Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. *Plant and Soil.* **108**:281-285.

- 242 Mylona, P., K. Pawlowski, and T. Bisseling (1995). Symbiotic nitrogen fixation. *Plant cell*. 7:869-885.
- 243 Nagashima, K. V. P., K. Matura, S. Ohya and K. Shimada. (1994). Primary structure and transcription of genes encoding B870 and photosynthetic reaction center apoproteins from *Rubrivivax gelatinosus*. *J. Biol. Chem.* 269:1-8.
- 244 Nakamura, L. K. (1984). *Bacillus pulvifaciens* sp. nov. nom. Rev. Int. J. Syst. Bacteriol. 34:410-413.
- 245 Nap, J.P., and T. Bisseling. (1990). Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis : the legume root nodosit . *Science*. 250:948-954.
- 246 N'doye, I., F. de Billy, J. Vasse, B. Dreyfus, and G. Truchet. (1994). Root nodulation of *Sesbania rostrata*. *J. Bacteriol.* 176:1060-1068.
- 247 Ndoye, I., B. Dreyfus, and M. Becker. (1996). *Sesbania rostrata* as green manure for lowland rice in Casamance (Senegal). *Trop. Agric.* 73:234-237.
- 248 Newcomb, W. (1981). Nodule morphogenesis and differentiation. In K. L. Giles and A. G. Atherly (ed.), *International Review of cytology, Biology of the Rhizobiaceae*. Academic Press. Supplement 13:247-294.
- 249 Newton, W. E. (1998). Nitrogénase : fonction et évolution. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 13:238-241.
- 250 Nick, G., P. de Lajudie, B. D. Eardly, S. Suomalainen, L. Paulin, X. Zhang, M. Gillis, and K. Lindstrom. (1999). *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov. isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:1359-1368.
- 251 Norel, F., and C. Elmerich. (1987). Nucleotid sequence and functional analysis of the two *nifH* copies of *Rhizobium* ORS571. *J. Gen. Microbiol.* 133:1563-1576.
- 252 Nour, S. M., M. P. Fernandez, P. Normand, and J. C. Cleyet-Marel. (1994a). *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer aeratum* L.). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:511-522.
- 253 Nour, S. M., J. C. Cleyet-Marel, P. Normand, and M. P. Fernandez. (1995). Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer aeratum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:640-648.
- 254 O'Hara, G. W., M. R. Davey, and J. A. Lucas. (1981). Effect of inoculation of *Zea mays* with *Azospirillum brasilense* strains under temperate conditions. *Can. J. Microbiol.* 27:871-877.
- 255 Okon, Y. P. G. (1985). *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. *TIBTech.* 3:223-228.

- 256 **Okon, Y., and C. A. Labandera Gonzalez. (1994).** Agronomic application of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* **26**:1591-1601.
- 257 **Omar, A. M. N., C. Richard, P. Weinhard, and J. Balandreau. (1989b).** Using the spermosphere model technique to describe the dominant nitrogen-fixing microflora associated with wetland rice in two Egyptian soil. *Biol. Fertil. Soils.* **7**:158-163.
- 258 **Orgambide, G. G., J. Lee, R. I. Hollingsworth, and F. B. Dazzo. (1995).** Structurally diverse chitooligosaccharide Nod factors accumulate primarily in membranes of wild type *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Biochemistry.* **34**:3832-3840.
- 259 **Ouchane, S. (1997).** Organisation et expression des gènes *puf* et *crt* de la bactérie pourpre *Rubrivivax gelatinosus*. Rôle photoprotecteur des caroténoïdes. Thèse, de l'Université Paris XI Orsay. 137 pages.
- 260 **Papadopoulou, K., A. Roussis, and P. Katinakis. (1996).** *Phaseolus ENOD40* is involved in symbiotic and non- symbiotic organogenetic processes: Expression during nodule and lateral root development. *Plant Mol. Biol.* **30**:403-417.
- 261 **Patten, C. L., and B. R. Glick. (1996).** Bacterial biosynthesis of indol-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* **42**:207-220.
- 262 **Pereira, J. O. (1995).** Microrganismos endofíticos em espécies tropicais. In *Anais 20a. Reunião Anual de Genética de Microrganismos.* Vol. 20 P. 3. Sociedade Brasileira de Genética, Piracicaba, Sao Paulo.
- 263 **Petracek, F. J., and L. Zechmeister. (1956).** Determination of partition coefficients of carotenoids as a tool in pigments analysis. *Anal. Chem.* **28**:1484-1485.
- 264 **Pfennig, N. (1978).** General physiology and ecology of photosynthetic Bacteria. In *The Photosynthetic Bacteria.* Clayton, R. K., and Sistrom, W. R. (eds), pp. 3-18. Plenum Press, New York and London.
- 265 **Plessl, J., J. Dörr, T. Hurek, and B. Reinhold-Hurek. (2000).** Interaction of *Azoarcus* spp. with rice: Role of type VI pili. In: *Fourth European nitrogen fixation conference.* Septembre 16-20/2000 Sevilla-Spain. pp 31.
- 266 **Polhill, R. M., and P. H. Raven. (1981).** *Advances in legume systematics. Part I.* Kew, Royal Botanic Gardens.
- 267 **Porteres, R. (1950).** Vieilles agricultures de l'Afrique intretropicale : centres d'origine et de diversification variétale primaire et berceaux de l'agriculture antérieure au XVIe siècle. *L'agronomie tropicale,* **5**:489-507.
- 268 **Poupot, R., E. Martinez-Romero, and J. C. Promé. (1993).** Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or nonsulfated chitopentasaccharides containing an N-methyl-N-acetylglucosamyl terminus. *Biochemistry.* **32**:10430-10435.

- 269 **Poupot, R., E. Martinez-Romero, F. Mallet, and J. C. Promé. (1995a).** *Rhizobium tropici* nodulation factor sulfation is limited by the quantity of activated form of sulfate. *FEBS letters*. **368**:536-540.
- 270 **Price, N. P. J., B. Relic, F. Talmont, A. Lewin, D. Promé, S. G. Pueppke, F. Maillet, J. Dénarié, J. C. Promé, and W. J. Broughton. (1992).** Broad-host-range *Rhizobium* species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are o-acetylated or sulphated. *Mol. Microbiol.* **6**:3575-3584.
- 271 **Prin, Y., and M. Rougier. (1986).** Cytological and histochemical characteristics of axenic roots surface of *Alnus glutinosa*. *Can. J. Bot. Fr.* **119**:571-580.
- 272 **Prithviraj, B., X. Zhou, A. Souleimanov, and D. L. Smith. (2000).** NodBj V (C18 :1 ; MeFeu), a host specific bacteria-to-plant signal molecule, enhances germination and early growth of diverse crop plants. *In* :17th North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation. P.36. Université Laval, Quebec, Canada.
- 273 **Pueppke, S. G. (1983).** *Rhizobium* infection threads in roots hairs of *Glycine max* (L.) Merr., *Glycine soja* Sieb. & Zucc., and *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Can. J. Microbiol.* **29**:69-76.
- 274 **Pueppke, S. G., and W. J. Broughton. (1999).** *Rhizobium* sp. Strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol Plant Microbe Interact.* **12**:293-318.
- 275 **Quandt, J., and M. F. Hynes. (1993).** Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. Elsevier Sciences Publishers. **127**:15-21.
- 276 **Quinto, C., H. de la Vega, M. Flores, L. Fernandez, T. Ballado, G. Soberon, and R. Palacios. (1982).** Nitrogen fixation genes are reiterated in *Rhizobium 1* *Nature*. **299**:724-726.
- 277 **Rainey, F. A., and J. Wiegel. (1996).** 16S ribosomal DNA sequence analysis confirms the close relationship between the genera *Xanthobacter*, *Azorhizobium*, and *Aquabacter* and reveals a lack of phylogenetic coherence among *Xanthobacter* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:607-610.
- 278 **Reddy, P. M., J. K. Ladha, R. So, R. Hernandez, M. C. Ramos, O. R. Angeles, F. B. Dazzo, and F. J. De Bruijn. (1997).** Rhizobial communication with rice roots: Induction of phenotypic changes, mode of invasion and extent of colonization. *Plant Soil.* **194**:81-98.
- 279 **Reinhold-Hurek, B., T. Hurek, M. Gillis, B. Hoste, M. Vancanneyt, K. Kersters, and J. De Ley. (1993).** *Azoarcus* gen. nov. nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *International Journal of Systematic bacteriology.* **43**:574-584.

- 280 Reinhold, B., and T. Hurek. (1997). *Azoarcus* spp. and their interaction with grass roots. *Plant Soil*. **194**:57-64.
- 281 Reinhold, B., and T. Hurek. (1998). Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol.* **6**:139-144.
- 282 Rinaudo, G., (1982). Fixation hétérotrophe de l'azote dans la rhizosphère du riz. Thèse Doctorat Etat, Université Paris-Sud.
- 283 Rinaudo, G., S. Orenga, M. P. Fernandez, H. Meugnier, and R. Bardin. (1991). DNA homologies among members of the genus *Azorhizobium* and other stem and root-nodulating bacteria isolated from the tropical legume *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:114-120.
- 284 Robertson, B. K., B. L. Dreyfus, and M. Alexander. (1995). Ecology of stem-nodulating *Rhizobium* and *Azorhizobium* in four vegetation zones of senegal. *Microb. Ecol.* **29**:71-81.
- 285 Roche, P., F. Debellé, F. Maillet, P. Lerouge, C. Faucher, G. Truchet, J. Dénarié, and J. C. Promé. (1991b). Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*. *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipooligosaccharide signals. *Cell*. **67**:1131-1143.
- 286 Röhrig, H., J. Schimdt, R. Walden, I. Czaja, E. Miklasevics, U. Wieneke, J. Schell, and M. John. (1995). Growth of tobacco protoplasts stimulated by synthetic lipochitooligosaccharides. *Sciences*. **269**:841-843.
- 287 Rolfe, B. G., M. A. Djordjevic, J. J. Weinman, U. Mathesius, C. Pittock, E. Gartner, K. M. Ride, Z. M. Dong, M. McCully, and J. McIver. (1997). Root morphogenesis in legumes and cereals and the effect of bacterial inoculation on root development. *Plant. Soil*. **194**:131-134.
- 288 Rolfe, B. G., F. M. Perrine, J. Stefaniak, J. J. Weinman, H. Chen, U. Mathesius, and M. A. Djordjevic. (2000). New aspects of nitrogen fixation research : Interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* strains with the non-legume rice. Fourth European nitrogen fixation conference. Septembre 16-20/2000 Sevilla-Spain. P. 154.
- 289 Rome, S., B. Brunel, P. Normand, M. P. Fernandez, and J. C. Cleyet-Marel. (1996a). Evidence for two genomic species of *Rhizobium* associated with *M. truncatula*. *Arch. Microbiol.* **165**:285-288.
- 290 Rome, S., M. P. Fernandez, B. Brunel, P. Normand, and J. C. Cleyet-Marel. (1996b). *Sinorhizobium medicae* sp. Nov., isolated from annual *Medicago* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:972-980.
- 291 Rosenberg, C. (1997). Signaux symbiotiques chez *Rhizobium*. In : Assimilation de l'azote chez les plantes. (Morot-Gaudry J.F. ed.), INRA éditions, pp.149-162.
- 292 Rossen, L., A. W. B. Johnston, and J. A. Downie. (1984). DNA sequence of the *nodA*, *B* and *C* required for root hair curling. *Nucleic Acid re.* **12**:9497-9508.

- 293 **Rossen, L., C. A. Shearman, A. W. B. Johnston, and J. A. Downie. (1985).** The *nodD* gene of *Rhizobium leguminosarum* is autoregulator and in the presence of plant exudate induces the *nodA, B, C* genes. *EMBO J.* **4**:3369-3373.
- 294 **Rüberg, S. A. Pühler, and A. Becker. (1999).** Biosynthesis of the exopolysaccharide galactoglucan in *Sinorhizobium meliloti* is subject to a complex control by the phosphate-dependent regulator Phob and the proteins ExpG and MucR. *Microbiology.* **145**:603-611.
- 295 **Sabry, S., S. A. Saleh, C. A. Batchelor, J. Jones, J. Jotham, G. Webster, S. L. Kothari, M. R. Davey and E. C. Cocking. (1997).** Endophytic establishment of *Azorhizobium caulinodans* in wheat. *Proc. Roy. Soc. Lond.:Biol. Sci.* **264**:341-346.
- 296 **Saitoh, S., S. Takaichi, K. Shimada, et Y. Nishimura. (1995).** Identification and subcellular distribution of carotenoids in the aerobic photosynthetic bacterium, *Pseudomonas radiora* strain MD-1. *Plant Cell Physiol.* **36**:819-823.
- 297 **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. (1989).** Molecular cloning : a Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory.
- 298 **Sanjuan, J., R. W. Carlson, H. P. Spaink, U. R. Baht, W. M. Barbour, J. Glushka, and G. Stancey. (1992).** A 2-O-methylfucose moiety is present in the lipooligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:8789-8793.
- 299 **Sato, K. (1978).** Bacteriochlorophyll formation by facultative methylotrophs, *Protaminobacter ruber* and *Pseudomonas* AM1. *FEBS Lett.* **85**:207-210.
- 300 **Schaede, R. (1940).** Die Knöllchen der adventiven Wasserwurzeln von *Neptunia oleacera* und ihre Bacteriensymbiose. *Planta* **31** :1-21.
- 301 **Schafer, A., R. Konrad, T. Kuhnigk, P. Kampf, H. Hertel, and H. König. (1996).** Hemicellulose-degrading bacteria and yeasts from the termite gut. *J. Appl. Bacteriol.* **80**:471-478.
- 302 **Schedock, J. and Long, S. R. (1994).** An open reading frame downstream of *Rhizobium meliloti* nodQ1 shows nucleotide sequence similarity to an *Agrobacterium tumefaciens* insertion sequence. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**:151-153.
- 303 **Schlaman, H. R. M., D. A. Phillips, and E. Kondorosi. (1998).** Genetic organization and transcriptional regulation of Rhizobial nodulation genes. P. 361-386. In H. P. Spaink, A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas (ed.), *The Rhizobiaceae, molecular biology of model plant-associated bacteria.*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 304 **Schmidt, J., H. Röhrig, M. John, U. Wieneke, G. Stacey, C. Koncz, and J. Schell. (1993).** Alteration of plant growth and development by *Rhizobium nodA* and *nodB* genes involved in the synthesis of oligosaccharides signals molecules. *The Plant Journal.* **4**:651-658.

- 305 Scholla, M. H., and G. H. Elkan. (1984). *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulate soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**:484-486.
- 306 Schultze M., B. Quiclet-Sire, E. Kondorosi, H. Virelizier, J. N. Glushka, G. Endre, S. D. Géro, and A. Kondorosi. (1992). *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipo-oligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:192-196.
- 307 Schultze, M., E. kondorosi, P. Ratet, M. Buiré and A. Kondorosi. (1994). Cell and molecular biology of *Rhizobium*-plant interactions. *Int. Rev. Cytol.* **156**:1-75.
- 308 Second, G. (1985). Relations évolutives chez le genre *Oryza* et processus de domestication des riz. ORSTOM, Paris, France, collection Etudes et thèses, 189p.
- 309 Second, G. (1986). La domestication en régime autogame : exemple des riz (*Oryza* spp.). *Bulletin de la société botanique de France, actualités botaniques.* **133**:35-44.
- 310 Segovia, L., Young J. P. W., and E. Martinez-Romero. (1993). Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium elti* sp. nov. *Int. J. Syst. bacteriol.* **4**:374-377.
- 311 Sen, M. A. (1929). Is bacterial associaton factor in nitrogen assimilation by rice plant. *Agric. J. India.* **24**:229-231.
- 312 Snedecor, G. W., and W. E. Cochran. (1989). *Statistical Methods*, 8th Edn. Iowa States University Press, Ames, USA. 503 p.
- 313 Sganga, M. w., and C. E. Bauer. (1992). Regulation factors controlling photosynthetic reaction center an light harvensting gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *Cell.* **68**:945-954.
- 314 Shiba, T. (1989). Overview of the aerobic photosynthetic bacteria. *In Aerobic Photosynthetic Bacteria.* pp. 1-8. Harashima, K., T. Shiba and N. Murata (eds), Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- 315 Shiba, T. (1991). *Roseobacter litoralis* gen. nov., and *Roseobacter denitrificans* sp. nov., aerobic pink-pigmented bacteria which contain bacteriochlorophyll a. *System. Appl. Microbiol.* **14**:140-145.
- 316 Shimada, K., H. Hayashi, et M. Tasumi. (1985). Bacteriochlorophyll-protein complexes of aerobic bacteria, *Erythrobacter longus* and *Erythrobacter* species OCh 114. *Arch. Microbiol.* **143**:244-247.
- 317 Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering : transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biol. Technology.* **1**:37-45.
- 318 So, R. B., J. K. Ladha, J. Peter, and W. Young. (1994). Photosynthetic symbionts of *Aeschynomene* spp. form a cluster with bradyrhizobia on the basis of fatty acid and rRNA analyses. *Int. J. Bact.* **44**:392-403.

- 319 Soltis, D. E., P. S. Soltis, D. R. Morgan, S. M. Swensen, B. C. Mullin, J. M. Dowd, and P. G. Martin. (1995). Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2647-2651.
- 320 Soltis, P. S., D. E. Soltis, and M. W. Chase. (1999). Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology. *Nature* 402:402-404.
- 321 Spaink, H. P., Hokker R. J. H., Wijfelman C. A., Pees E., and B. J. J. Lugtenberg. (1987a). Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol. Biol.* 9:27-39.
- 322 Spaink, H. P., D. M. sheeley, A. A. N. Van Brussel, J. Glushka, W. S. York, T. Tak, O. Geiger, P. E. Kennedy, V. N. Reinhold, and B. J. J. Lugtenberg. (1991). A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature.* 354:125-130.
- 323 Spaink, H. P. (1995). The molecular basis of infection and nodulation by *rhizobia* : The ins and outs of sympathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:345-368.
- 324 Spaink, H. P., G. V. Bloemberg, A. A. N. Van Brussel, B. J. J. Lugtenberg, K. M. G. M. Van der Drift, J. Haverkamp, and J. E. Thomas-oates. (1995). Host specificity of *Rhizobium leguminosarum* is determined by the hydrophobicity of highly unsaturated fatty acid moieties of the nodulation factors. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:155-164.
- 325 Spaink, H. P., Wijfjes A. H. M., and B. J. J. Lugtenberg. (1995b). *Rhizobium* NodI and NodJ proteins play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligosaccharides. *J. Bacteriol.* 177:6276-6281.
- 326 Sprent, J. I., and S. M. de Faria. (1988). Mechanism of infection of plants by nitrogen fixing organisms. *Plant and soil.* 110:157-165
- 327 Sprent, J. I. (1995). Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. *Soil. Biol. Biochem.* 27:401-407.
- 328 Stacey, G., S. Luka, J. Sanjuan, Z. Banfalvi, A. J. Nieuwkoop, Y. Chun, L. S. Forsberg and R. Carlson. (1994). *nodZ*, a unique host-specific nodulation gene, is involved in the fucosylation of the lipo-oligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 176:620-633.
- 329 Stackebrandt, E., R. G. E. Murray, and H. G. Trüper. (1998). *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the « purple bacteria and their relatives ». *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38:321-325.
- 330 Staehelin, C., J. Granada, J. Müller, A. Wiemken, R. B. Mellor, G. Felix, M. Regenass, W. J. Broughton, and T. Boller (1994b). Perception of *Rhizobium* nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:2196-2200.

- 331 **Steibl, H. D. and Lewecke, F. M. (1995).** IS1222: analysis and distribution of a new insertion sequence in *Enterobacter agglomerans* 339. *Gene* **156**:37-42.
- 332 **Stoltzfus, J. R., R. So, P. P. Malarvizhi, J. K. Ladha, and F. J. Bruijn. (1997).** Isolation of endophytic bacteria from rice assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant Soil*. **194**:25-36.
- 333 **Suessenguth, K. Von, et R. Beyerle. (1936).** Über bakterien-sknollschen am spross von *Aeschynomene paniculata* Willd. *Hedwigia* **75**:234-237.
- 334 **Takaichi, S., K. Shimada, and J. Ishidsu. (1990).** Carotenoids from the aerobic photosynthetic bacterium, *Erythrobacter longus* : β -carotene and its hydroxyl derivatives. *Arch. Microbiol.* **153**:118-122.
- 335 **Tarrand, J. J., N. R. Krieg, and J. Döbereiner. (1978).** A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) com. Nov. and *Azospirillum brasiliense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* **8**:967-980.
- 336 **Taylor, D. P., S. N. Cohen, W. G. Clark, and B. L. Marrs. (1983).** Alignment of genetic and restriction maps of the photosynthesis region of the *Rhodospseudomonas capsulata* chromosome by a conjugation-mediated marker rescue technique. *J. Bacteriol.* **154**:580-590.
- 337 **Tichy, H., K. Albien, N. Gad'on, and G. Drews. (1991).** Analysis of the *Rhodobacter capsulatus puc* operon : the *pucC* gene plays a central role in the regulation of LHI expression. *EMBO J.* **10**:2949-2955.
- 338 **Tien, T. M., M. H. Gaskins, and D. H. Hubbel. (1979).** Plant growth substances produces by *Azospirillum brasiliense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* **37**:1016-1024.
- 339 **Timmers, A. C., M. C. Auriac, and G. Truchet. (1999).** Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development.* **126**:3617-3628.
- 340 **Truchet, G., F. Débellé, J. Vasse, B. Terzhagi, A. M. Garnerone, C. Rosenberg, J. Batut, F. Mallet, and J. Dénarié. (1985).** Identification of a *Rhizobium meliloti* pSym2011 region controlling the host specificity of root hair curling and nodulation. *J. bacteriol.* **164**:1200-1210.
- 341 **Trüper, H. G., and L. de Clari. (1997).** Taxonomie note : necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) in « apposition ». *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:908-909.
- 342 **Tsien, H. C., B. L. Dreyfus, and E. L. Schmidt. (1983).** Initial stages in the morphogenesis of nitrogen-fixing stem nodules of *Sesbania rostrata*. *J. bacteriol.* **156**:888-897.

- 343 **Turgeon, B. G., and W. D. Bauer. (1982).** Early events in the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. Time course and cytology of the initial infection process. *Can. J. Bot.* **60**:152-161.
- 344 **Turgeon, B. G., and W. D. Bauer. (1985).** Ultrastructure of infection thread development during the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. *Planta* **163**:328-349.
- 345 **t'Mannetje, L. (1967).** A re-examination of the taxonomy of the genus *Rhizobium* and related genera using numerical analysis. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* **33**:477-491.
- 346 **Ungers, G. E., and, J. J. Cooney. (1968).** Isolation and characterization of carotenoid pigments of *Micrococcus roseus*. *J. Bacteriol.* **96**:234-241.
- 347 **Urakami, T., and K. Komagata. (1984).** *Proto-monas*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**:188-201.
- 348 **Van Berkum, P., and B. B. Bohlool. (1980).** Evaluation of nitrogen fixation by bacteria in association with roots of tropical grasses. *Microbiol. Rev.* **44**:491-517.
- 349 **Van Berkum, P., R. E. Tully, and D. L. Keister. (1995).** Nonpigmented and bacteriochlorophyll-containing bradyrhizobia isolated from *Aeschynomene indica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:623-629.
- 350 **Van Berkum, P., D. Beyene, G. Bao, T. A. Campbell, and B. D. Eardly. (1998).** *Rhizobium mongolense* sp. nov. Is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *medicago ruthenica* (L.) Ledebourg. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:13-22.
- 351 **Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. De Vos, K. Kersters, and J. Swings. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**:407-438.
- 352 **Vande Broek, A., and J. Vanderleyden. (1995).** Review : genetics of the *Azospirillum*-plant root association. *Crit. Rev. Plant. Sci.* **14**:445-466.
- 353 **van de Sande, K., K. Pawlowski, I. Czaja, U. Wieneke, J. Schell, J. Schimdt, R. Walden, M. Matvienko, J. Wellink, A. Vankammen, H. Franssen, and T. Bisseling. (1996).** Modification of phytohormone response by a peptide encoded by *ENOD40* of legumes and a nonlegume. *Sciences.* **273**:370-373.
- 354 **Van Nieuwenhove, C., L. Van Holm, S. A. Kulasoorya, and K. Vlassak. (2000).** Establishment of *Azorhizobium caulinodans* in the rhizosphere of Wetland rice (*Oryza sativa* L.). *Biol. Fertil. Soils.* **31**:143-149.
- 355 **Van Rhijn, P. J. S., and J. Vanderleyden. (1995).** The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* **59**:124-142.

- 356 **Van Rhijn, P. J. S., B. Feys, C. Verreth, and J. Vanderleyden. (1993).** Multiple copies of *nodD* in *Rhizobium tropici* CIAT899 and BR816. *J. bacteriol.* **175**:438-447.
- 357 **Vauterin, L., and P. Vauterin. (1992).** Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. *Eur. Microbiol.* **1**:37-41.
- 358 **Vazquez, M., A. Davalos, A. De las Penas, F. Sanchez, and C. Quinto. (1991).** Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarium* bv. *Phaseoli* strains. *J. bacteriol.* **173**:1251-1258.
- 359 **Verma, D. P. S., and S. R. Long. (1983).** The Molecular biology of Rhizobium-legume symbiosis. *Int. Rev. Cytol.* **14**:211-245.
- 360 **Verma, D. P. S. (1992).** Signals in roots nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *The Plant Cell.* **4**:373-382.
- 361 **Vijn, I., F. Martinez-Abarca, W. C. Yang, L. das Neves, A. van Brussel, A. Van Kammen, and T. Bisseling. (1995a).** Early nodulin gene expression during Nod factor-induced processes in *Vicia sativa*. *Plant J.* **8** :111-119.
- 362 **Vincent, J. M. (1970).** A manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, United Kingdom.
- 363 **Wang, S. P., and G. Stacey. (1991).** Studies of the *Bradyrhizobium japonicum nodD1* promoter: a repeated structure for the *nod* box *J. bacteriol.* **173**:3356-3365.
- 364 **Wang, E. T., P. van Berkum, D. Beyene, X. H. Sui, O. Dorado, W. X. Chen, and E. Martinez-Romero. (1998).** *Rhizobium huautlense* sp. nov. A symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:687-699.
- 365 **Wang, E. T., P. van Berkum, D. Beyene, W. X. Chen, and E. Martinez-Romero. (1999).** Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:51-65.
- 366 **Watanabe, I., And W. Barraquio. (1979).** Low levels of fixed nitrogen required for isolation of free-living N₂-fixing organisms from rices roots. *Nature.* **277**:565-566.
- 367 **Watanabe, I., R. So, J. K. Ladha, Y. Fujimura, and H. Kuraishi. (1987b).** A new nitrogen-fixing species of *Pseudomonas* : *Pseudomonas diazotrophicus* sp. nov. isolated from the root of wetland rice. *Can. J. Microbiol.* **33**:670-678.
- 368 **Wayne, L. G. D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. A. D. Grimont, P. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore, W. E. C. Moore, R. G. E. Murray, E. Stackebrandt, M. P. Starr, and H. G. Trüpper. (1987).** Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**:463-464.

- 369 Webster, G., C. Gough, J. Vasse, C. A. Batchelor, K. J. O'Callaghan, S. L. Kothari, M. R. Davey, J. Dénarié, and E. C. Cocking. (1997). Interactions of rhizobia with rice and wheat. *Plant Soil*. **194**:115-122.
- 370 Wellington, C. L., and J. T. Beatty. (1991b). Overlapping mRNA transcripts of photosynthesis gene operons in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **173**:1432-1443.
- 371 Wellington, C. L., C. E. Bauer, and J. T. Beatty. (1992). Photosynthesis gene superoperons in purple nonsulfur bacteria : The tip of the iceberg. *Can. J. Microbiol.* **38**:20-27.
- 372 Wiessner, C., I. Dunger, and H. Michel. (1990). Structure and transcription of the genes encoding the B1015 light-harvesting complex β et α subunits and the photosynthetic reaction center L, M, and cytochrome *c* subunits from *Rhodospseudomonas viridis*. *J. Bacteriol.* **172**:2877-2887.
- 373 Willems, A., and M. D. Collins. (1992). Evidence for a close genealogical relationship between *Afipia*, the causal organism of cat scratch disease, *Bradyrhizobium japonicum* and *Blastobacter denitrificans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **96**:241-246.
- 374 Willems, A., and M. D. Collins. (1993). Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:305-313.
- 375 Wilson, D. (1995). Endophyte : the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*. **73**:274-276.
- 376 Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**:221-271.
- 377 Wood, S. M., and W. Newcomb. (1989). Nodule morphogenesis : teh early infection of alafalfa (*Medicago sativa*) root hairs by *Rhizobium meliloti*. *Can. J. bot.* **67**:3108-3122.
- 378 Xu, L. M., C. Ge, Z. Cui, J. Li, and H. Fan. (1995). *Bradyrhizobium liaonengense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:706-711.
- 379 Yanagi, M., and K. Yamasato. (1993). Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol. Lett.* **107**:115-120.
- 380 Yang, W.-C., P. Katinakis, P. Hendriks, A. Smolders, F. de Vries, J. spee, A. van Kammen, T. Bisseling, and H. Franssen. (1993). Characterization of *GmENOD40*, a gene showing novel patterns of cell-specific expression during soybean nodule development. *Plant J.* **3**:573-585.
- 381 Yannisch-Perron, C., J. Viera, and J. Messing. (1985). pUC18. *Gene*. **33**:103-109.
- 382 Yanni, Y. G., R. Y. Rizk, V. Corich, A. Squartini, K. Ninke, S. Philip-Hollingsworth, G. Orgambide, F. De Bruijn, J. Stolfus, D. Buckley, T. M. Schmidt, P. F. Mateos, J. K. Ladha, and F. B. Dazzo. (1997). Natural endophytic

- association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant Soil*. **194**:99-114.
- 383 **Yanni, Y. G., R. Rizk, J. May-Flores, and F. Dazzo. (2000).** Potential of the rice root occupant *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* as a plant growth-promoting biofertilizer for rice. In : 17th North American conference on symbiotic Nitrogen. July 23-28, 2000. Université Laval, Québec, Canada. Eds. Agriculture and Agri-food Canada. P. 79.
- 384 **Yatazawa, M., et S. Yoshida. (1979).** Stem nodules in *Aeschynomene indica* and their capacity of nitrogen fixation. *Phys. Plantarum* **45**:293-295.
- 385 **Yen, H.-C., and B. Marrs. (1976).** Map of genes for carotenoid and bacteriochlorophyll biosynthesis in *Rhodospseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.* **126**:619-629.
- 386 **Yildiz, F. H., H. Gest, and C. E. Bauer. (1992).** Conservation of the photosynthesis gene cluster in *Rhodospirillum centenum*. *Mol. Microbiol.* **6**:2683-2691.
- 387 **Young, D. A., C. E. Bauer, J. C. Williams, and B. L. Marrs. (1989).** Genetic evidence for superoperonal of genes for photosynthetic pigments and pigment binding proteins in *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Gen. Genet.* **218**:1-12.
- 388 **Young, J. P. W., H. L. Downer, and B. D. Eardly. (1991).** Phylogeny of the phototropic *Rhizobium* strain BTAi1 by PCR-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* **173**:2271-2277.
- 389 **Young, J. P. W. (1992).** Phylogenic classification of nitrogen-fixing organisms. In :Biological Nitrogen Fixation. Evans, H., R. Burris, and G. Stacey (eds), Chapman and Hall, New-york. pp. 43-86.
- 390 **Young, J. P. W., and K. Haukka. (1996).** Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol.* **133**:87-94.
- 391 **Young, J. M. (1999).** Correction to the authority of *Rhizobium leguminosarum*. *Int. J. Syst. Bact.* **49**:1943.
- 392 **Youvan, D. C., E. J. Bylina, M. Alberti, H. Begusch, J. E. Hearst. (1984).** Nucleotide and deduced polypeptide sequence of the photosynthetic reaction center, B870 antenna, and flanking polypeptides from *Rhodospseudomonas capsulata*. *Cell.* **37**:949-957.
- 393 **Youvan, D. C., and S. Ismail. (1985).** Light-harvesting II (B800-850 complex) structural genes from *Rhopseudomonas capsulata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**:58-62.
- 394 **Yurkov, V., and V. M. Gorlenko. (1990).** *Erythrobacter sibericus* sp. nov., a new fresh-water aerobic bacterial species containing bacteriochlorophyll *a*. *Microbiology* **59**:85-89.

- 395 **Yurkov, V., N. Gad'on, and G. Drews. (1993).** The major part of polar carotenoids of the aerobic bacteria *Roseococcus thiosulfatophilus* RB3 and *Erythromicrobium ramosum* E5 is not bound to the bacteriochlorophyll a complexes of the photosynthetic apparatus. *Arch. Microbiol.* **160**:372-376.
- 396 **Zsebo, K. M., and J. E. Hearst. (1984).** Genetic physical mapping of a photosynthetic gene cluster from *R. capsulatus*. *Cell* **37**:937-947.
- 397 **Zheng, L., R. H. White, V. L. Cash, R. F. Jack, and D. R. Dean. (1993).** Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:2754-2758.

ANNEXES

Tableau 1. Liste des souches utilisées dans ce travail^a

Souches	no LMG	Plante hôte	Origine géographique	Référence	Crt type ^b
<i>Bradyrhizobium</i> sp.					
ORS402		<i>Oryza breviligulata</i>	Joal (Sénégal)	Ce travail	W
ORS404		<i>Oryza breviligulata</i>	Joal (Sénégal)	Ce travail	DP
ORS405		<i>Oryza breviligulata</i>	Joal (Sénégal)	Ce travail	W
ORS406		<i>Oryza breviligulata</i>	Joal (Sénégal)	Ce travail	W
ORS408		<i>Oryza breviligulata</i>	Joal (Sénégal)	Ce travail	DP
ORS2005		<i>Oryza breviligulata</i>	Joal (Sénégal)	Ce travail	O
ORS2006		<i>Oryza breviligulata</i>	Joal (Sénégal)	Ce travail	DP
ORS2007		<i>Oryza breviligulata</i>	Joal (Sénégal)	Ce travail	O
ORS2008		<i>Oryza breviligulata</i>	Joal (Sénégal)	Ce travail	DP
ORS2009		<i>Oryza breviligulata</i>	Joal (Sénégal)	Ce travail	DP
ORS2010		<i>Oryza breviligulata</i>	Joal (Sénégal)	Ce travail	DP
ORS2011		<i>Oryza breviligulata</i>	Joal (Sénégal)	Ce travail	O
ORS2012		<i>Oryza breviligulata</i>	Joal (Sénégal)	Ce travail	DP
ORS2013		<i>Oryza breviligulata</i>	Joal (Sénégal)	Ce travail	DP
ORS2014		<i>Oryza breviligulata</i>	Joal (Sénégal)	Ce travail	O
ORS2019		<i>Oryza breviligulata</i>	Joal (Sénégal)	Ce travail	O
STM478		<i>Oryza breviligulata</i>	Guinée	Ce travail	DP
STM481		<i>Oryza breviligulata</i>	Guinée	Ce travail	DP
STM482		<i>Oryza breviligulata</i>	Guinée	Ce travail	DP
STM515		<i>Oryza breviligulata</i>	Guinée	Ce travail	DP
ORS266	15442	<i>A. tambacoundensis</i>	Sénégal	238	LP
ORS272	15408	<i>A. schimperi</i>	Sénégal	238	W
ORS276	12185	<i>A. sensitiva</i>	Sénégal	238	
ORS278	12187	<i>A. sensitiva</i>	Sénégal	238	O
ORS279	12188	<i>A. sensitiva</i>	Sénégal	238	
ORS280	15411	<i>A. indica</i>	Sénégal	238	
ORS287	15378t1	<i>A. afraspera</i>	Sénégal	238	LP
ORS288	12189	<i>A. afraspera</i>	Sénégal	238	
ORS292	12205	<i>A. sensitiva</i>	Sénégal	238	
ORS294	12192	<i>A. sensitiva</i>	Sénégal	238	LP
ORS296	12194	<i>A. sensitiva</i>	Sénégal	238	
ORS297	12195	<i>A. sensitiva</i>	Sénégal	238	LP
ORS299	15399	<i>A. sensitiva</i>	Sénégal	238	
ORS302	10296	<i>A. pfundii</i>	Sénégal	Alazard	W
ORS306	11797	<i>A. indica</i>	Sénégal	2	LP
ORS308	15401	<i>A. afraspera</i>	Sénégal	3	LP
ORS313	15416	<i>A. afraspera</i>		Alazard	
ORS317	15147	<i>A. afraspera</i>		Alazard	
ORS324	8295	<i>A. afraspera</i>	Sénégal	4	LP
ORS331	11799	<i>A. tambacoundensis</i>	Sénégal	4	LP
ORS337	8299t2	<i>A. afraspera</i>	Sénégal	3	
ORS342	15383	<i>A. indica</i>	Sénégal	238	
ORS344	12198	<i>A. indica</i>	Sénégal	238	
ORS347	10298	<i>A. afraspera</i>	Sénégal	Alazard	
ORS348	12200	<i>Aeschynomene</i> sp.	Sénégal	238	
ORS354	15424	<i>A. afraspera</i>		2	
ORS352	15384	<i>A. afraspera</i>	Sénégal	2	LP
ORS359	12201	<i>A. sensitiva</i>	Sénégal	238	LP
ORS362	10305	<i>A. afraspera</i>	Sénégal	4	
ORS364	11802	<i>A. nilotica</i>	Sénégal	4	LP
ORS368	15387	<i>A. indica</i>	Sénégal	238	
ORS371	11804	<i>A. indica</i>	Sénégal	238	DP
ORS377	15420	<i>A. elaphroxylon</i>	Sénégal	238	W
ORS378	15421	<i>A. elaphroxylon</i>	Sénégal	238	W
ORS379	15422	<i>A. elaphroxylon</i>	Sénégal	238	W
ORS381	15423	<i>A. elaphroxylon</i>	Sénégal	238	W

Tableau 1. Liste des souches utilisées dans ce travail^a

ORS384	15390	<i>A. indica</i>	Sénégal	238	LP
ORS385	15391	<i>A. indica</i>	Sénégal	238	
ORS386	11815	<i>A. indica</i>	Sénégal	238	LP
ORS392	12205	<i>A. indica</i>	Sénégal	238	O
ORS400	12207	<i>A. indica</i>	Sénégal	238	
ORS29	15165	Unknown	Sénégal	101	
ORS31	15167	<i>Indigofera tinctoria</i>	Sénégal	101	
ORS87	15177	<i>Tephrosia purpurea</i>	Sénégal	101	
ORS90	R-2196	<i>Tephrosia purpurea</i>	Sénégal	101	
ORS110	10666	<i>Faidherbia albida</i>	Sénégal	110	
ORS122	10678	<i>Acacia albida</i>	Sénégal	110	
ORS123	10679	<i>Acacia albida</i>	Sénégal	110	
ORS124	10680	<i>Acacia albida</i>	Sénégal	110	
ORS127	10683	<i>Acacia albida</i>	Sénégal	110	
ORS133	10689	<i>Faidherbia albida</i>	Sénégal	110	
ORS140	10696	<i>Acacia albida</i>	Sénégal	110	
ORS167	10710	<i>Acacia albida</i>	Sénégal	110	
ORS169	10712	<i>Faidherbia albida</i>	Sénégal	110	
ORS175	10718	<i>Faidherbia albida</i>	Sénégal	110	
ORS182	10721	<i>Acacia albida</i>	Sénégal	110	
ORS183	10722	<i>Acacia albida</i>	Sénégal	110	
ORS523	R-2194	<i>Indigofera Sénégalensis</i>	Sénégal	101	
ORS520	R-2192	<i>Indigofera Sénégalensis</i>	Sénégal	101	
ORS935	15269	<i>Rhynchosia minima</i>	Sénégal	101	
ORS937	15271	<i>Rhynchosia minima</i>	Sénégal	101	
ORS976	R-2197	<i>Indigofera Sénégalensis</i>	Sénégal	101	
ORS979	15275	<i>Indigofera Sénégalensis</i>	Sénégal	101	
ORS980	15276	<i>Indigofera Sénégalensis</i>	Sénégal	101	
ORS984	15279	<i>Indigofera Sénégalensis</i>	Sénégal	101	
ORS1217	15301	<i>Indigofera Sénégalensis</i>	Sénégal	101	
ORS1218	R-2200	<i>Indigofera Sénégalensis</i>	Sénégal	101	
ORS1219	15302	<i>Indigofera Sénégalensis</i>	Sénégal	101	
ORS1228	15304	<i>Indigofera astragalina</i>	Sénégal	101	
ORS1810	15242	<i>Crotalaria lathyroides</i>	Sénégal	101	
ORS1813	15244	<i>Crotalaria hyssopifolia</i>	Sénégal	101	
ORS1814	15245	<i>Crotalaria hyssopifolia</i>	Sénégal	101	
ORS1819	15249	<i>Crotalaria retusa</i>	Sénégal	101	
ORS1820	15250	<i>Indigofera hirsuta</i>	Sénégal	101	
ORS1823	15367	<i>Indigofera hirsuta</i>	Sénégal	101	
ORS1824	15153	<i>Indigofera hirsuta</i>	Sénégal	101	
ORS1844	15266	<i>Chamaecrista sp.</i>	Sénégal	101	
ORS1848	15373	<i>Indigofera hirsuta</i>	Sénégal	101	
ORS1849	15374	<i>Indigofera hirsuta</i>	Sénégal	101	
ORS1898	15699	<i>Tephrosia bracteolata</i>	Sénégal	101	
ORS1903	15702	<i>Tephrosia villosa</i>	Sénégal	101	
BTAi1	11795	<i>A. indica</i>	United States	114	LP
BR3606	9959	<i>Acacia mollissima</i>	Brésil	237	
BR3621	9966	<i>Acacia mangium</i>	Brésil	237	
CB 756	82369	<i>Macrotylona africanum</i>	Zimbabwe		
NZP2192	6161	<i>Lotus corniculatus</i>	Nouvelle Zélande		
NZP2309	6128	<i>Lotus pedunculatus</i>	Australie		
NZP2314	6129	<i>Lotus pedunculatus</i>	Australie		
MSDJ 718		<i>Lupinus luteus</i>	France		
TAL309	82366				
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>					
USDA135	8321	<i>Glycine max</i>	United States		
USDA110		<i>Glycine max</i>	United States		
MAR1589	14312	<i>Arachis hypogea</i>			

Tableau 1. Liste des souches utilisées dans ce travail^a

NZP5533	6136	<i>Glycine max</i>	United States	
NZP5549T	6138T	<i>Glycine max</i>	Japon	
Bonnier 3.1	4252	<i>Glycine max</i>		
1BOa2	4262	<i>Albizia julibrissin</i>		
AN279				
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>				
SFI 2062	18231	<i>Glycine max</i>	Chine	376
SFI 2281	18230	<i>Glycine max</i>	Chine	376
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>				
NZP 5532	6135	<i>Glycine max</i>	United States	196
NZP 5531T	6134T	<i>Glycine max</i>	United States	196

^a Les souches photosynthétiques sont en gras. Abréviations et désignations : ORS, Collection de souches de l'Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France; LMG, collection de souches du Laboratoire de microbiologie, Université de Gand Belgique; STM, collection de souches du Laboratoire de Symbioses Tropicales et Méditerranéenne, IRD, Montpellier, France; BR, collection du CNPBS-EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa em Biologia do solo, Seropédica, and Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria, Rio de Janeiro, Brésil; INPA, Culture Collection of National Institute of Amazonia Research, Manaus, Brésil; NZP, Culture Collection of the Department for Scientific and Industrial Research, Biochemistry Division, Palmerston North, New, Zealand; USDA, U.S. Department of Agriculture, Beltsville, Md.; TAL, Culture Collection of Nitrogen Fixation in Tropical Agricultural Legumes (NifTAL), University of Hawaiï, Paia; MSDJ, Collection de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Microbiologie des Sols, Dijon, France; MAR, Culture Collection of Soil Productivity Research Laboratory, Marondera, Zimbabwe; SFI, Culture Collection of Soils and Fertilizers Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, People's Republic of China.

^b Crt, caroténoïde. W, blanc (souches ne contenant ni Bchl a ni caroténoïde). DP, rose foncé. O, orange. LP, rose pâle.

Tableau 2. Souches et plasmides utilisés pour la complémentation et les clonages.

Désignation	Génotypes et / ou caractéristiques principales	Références / origine
<u><i>Bradyrhizobium sp.</i></u>		
AN279	<i>Bradyrhizobium japonicum nodB⁻, Tc^R</i>	Don du Dr Gary Stacey de l'Université de Tennessee (USA).
<u><i>E. coli</i></u>		
Banque ADNg de la souche ORS278	Fragment de 35 kb portant les gènes de nodulation clonés dans le pCPP47i, Tc ^r	Ce travail
S17-1	<i>E. coli</i> , thi pro hsdR hsdM ⁺ recA (F ⁻) lambda portant dans le chromosome une insertion RP4-2-(TC ::Mu-Km ::Tn7), Ap ^s , Tc ^s , Km ^s	Simon <i>et al.</i> , 1983
<u>Plasmides</u>		
pUC18	Amp ^r , vecteur de clonage	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pKOK5	Amp ^r , Km ^r , pSUP202, (cassette lacZ-Km ^r)	Kokotek <i>et al.</i> , 1989
SuperCos 1	Km ^r , vecteur de clonage	Stratagene
PCPP47i	Tc ^r , vecteur de clonage	Bauer et Colmell, 1997
pJQ200mp18	Gn ^r , SacB ^s , plasmide suicide	Quandt et Hynes, 1993

Photosynthetic Bradyrhizobia Are Natural Endophytes of the African Wild Rice *Oryza breviligulata*

CLÉMENCE CHAINTREUIL,¹ ERIC GIRAUD,¹ YVES PRIN,¹ JEAN LORQUIN,² AMADOU BÂ,²
MONIQUE GILLIS,³ PHILIPPE DE LAJUDIE,¹ AND BERNARD DREYFUS^{1*}

Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, IRD, INRA, AGRO-M, CIRAD, TA10/J, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex 5, France¹; Laboratoire de Microbiologie, ISRA/IRD/UCAD, Dakar, Sénégal²; and Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Ghent, Belgium³

Received 6 April 2000/Accepted 31 August 2000

We investigated the presence of endophytic rhizobia within the roots of the wetland wild rice *Oryza breviligulata*, which is the ancestor of the African cultivated rice *Oryza glaberrima*. This primitive rice species grows in the same wetland sites as *Aeschynomene sensitiva*, an aquatic stem-nodulated legume associated with photosynthetic strains of *Bradyrhizobium*. Twenty endophytic and aquatic isolates were obtained at three different sites in West Africa (Senegal and Guinea) from nodal roots of *O. breviligulata* and surrounding water by using *A. sensitiva* as a trap legume. Most endophytic and aquatic isolates were photosynthetic and belonged to the same phylogenetic *Bradyrhizobium*/*Blastobacter* subgroup as the typical photosynthetic *Bradyrhizobium* strains previously isolated from *Aeschynomene* stem nodules. Nitrogen-fixing activity, measured by acetylene reduction, was detected in rice plants inoculated with endophytic isolates. A 20% increase in the shoot growth and grain yield of *O. breviligulata* grown in a greenhouse was also observed upon inoculation with one endophytic strain and one *Aeschynomene* photosynthetic strain. The photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278 extensively colonized the root surface, followed by intercellular, and rarely intracellular, bacterial invasion of the rice roots, which was determined with a *lacZ*-tagged mutant of ORS278. The discovery that photosynthetic *Bradyrhizobium* strains, which are usually known to induce nitrogen-fixing nodules on stems of the legume *Aeschynomene*, are also natural true endophytes of the primitive rice *O. breviligulata* could significantly enhance cultivated rice production.

Bacteria of the genera *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*, and *Azorhizobium*, commonly known as rhizobia, have great environmental and agricultural importance because their symbioses with legumes are responsible for most of the atmospheric nitrogen fixed on earth. These microorganisms are soil bacteria able to elicit the formation of new organs, called nodules, on most species of the family *Fabaceae* and on the nonleguminous *Parasponia*, in which they reduce atmospheric nitrogen to ammonia to the benefit of the host plant. In the absence of leguminous plants, populations of rhizobia are commonly found in soils where they can survive saprophytically. Recently, the natural habitat of rhizobia was extended to a third niche, the roots of graminaceous plants. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* was shown to be naturally present inside the roots of rice grown in rotation with clover in Egypt, without forming any nodule-like structure (44). Such habitats inside roots of cereals and grass plants have already been identified as an important reservoir for various N₂-fixing endophytic bacteria, known as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), such as *Acetobacter diazotrophicus* (11, 36) and *Herbaspirillum seropedicae* (5, 7, 22) in sugar cane, *Azoarcus* spp. (34, 35) in Kallar grass (*Leptochloa fusca*), and *Azospirillum* spp. (6) in maize and rice. Like most of these PGPR on their homologous graminaceous host plants, *R. leguminosarum* was shown to efficiently promote rice growth after field inoculation (44).

Rice (*Oryza sativa* L.) is the most important food crop in developing countries. The high-yielding rice varieties of the "Green Revolution" have resulted in large increases in rice

production but require large amounts of nitrogen fertilizers, which contribute to nitrate contamination of soils and ground-water supplies, often leading to health hazards and environmental pollution. Therefore, endophytic rhizobia, known to directly supply biologically fixed nitrogen to the legume plant, may also have great potential to improve sustainable rice production.

In order to discover other natural rice-rhizobium associations, we screened sustainable primitive rice production systems where N fertilizer has never been applied. In Africa, the wetland wild rice *Oryza breviligulata*, which is the ancestor of the African cultivated rice *Oryza glaberrima* (38), has been harvested and consumed in the Sahelian and Sudanian regions for more than 10,000 years. *O. breviligulata* grows spontaneously in temporary ponds, wetland plains, and river deltas of the semiarid and semihumid regions of Africa. It grows in 0.5- to 1.5-m-deep water, where it floats and forms numerous nodal and aquatic roots. This primitive rice species is frequently found growing in association with several aquatic legumes belonging to the genera *Aeschynomene* and *Sesbania* (1, 14, 19). Among these aquatic species, *Aeschynomene indica* and *Aeschynomene sensitiva* form stem nodules with photosynthetic *Bradyrhizobium* strains (26), and *Sesbania rostrata* forms stem nodules with *Azorhizobium caulinodans* (29). We therefore screened three *O. breviligulata* growing sites in West Africa (two sites in Senegal and one in Guinea) for natural associations of photosynthetic bradyrhizobia and/or azorhizobia with the rice roots.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of endophytic rhizobia from wild rice. Young nodal roots of 10 different *O. breviligulata* plants per site were collected at the flowering stage in wild-paddy fields of Senegal and Guinea (West Africa) where the water was 30 cm to 1 m deep. Roots were cleaned thoroughly with tap water, rinsed with sterile deionized water, drained on absorbent paper, and cut into 3- to 5-cm-long

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, TA10/J, Campus de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex 5, France. Phone: 334 67 59 38 82. Fax: 334 67 59 38 02. E-mail: dreyfus@mpl.ird.fr.

TABLE 1. Photosynthetic endophytic and aquatic strains used in the present study

Bacterial strain ^a	Source	Geographic origin	Nodulation specificity ^b			Crt type ^c
			<i>Aeschynomene elaphroxylon</i> (group I)	<i>A. afraspera</i> (group II)	<i>A. sensitiva</i> (group III)	
ORS402	Rice root	Joal (Senegal)	0	0	E	W
ORS404	Water	Joal (Senegal)	0	0	E	DP
ORS405	Water	Joal (Senegal)	0	0	I	W
ORS406	Water	Joal (Senegal)	0	0	I	W
ORS408	Water	Joal (Senegal)	0	0	E	DP
ORS2005	Rice root	Joal (Senegal)	0	0	E	O
ORS2006	Rice root	Joal (Senegal)	0	0	E	DP
ORS2007	Rice root	Joal (Senegal)	0	0	E	O
ORS2008	Rice root	Joal (Senegal)	0	0	E	DP
ORS2009	Rice root	Joal (Senegal)	0	0	E	DP
ORS2010	Water	Joal (Senegal)	0	0	E	DP
ORS2011	Rice root	Joal (Senegal)	0	0	E	O
ORS2012	Rice root	Joal (Senegal)	0	0	E	DP
ORS2013	Water	Joal (Senegal)	0	0	E	DP
ORS2014	Rice root	Joal (Senegal)	0	0	E	O
ORS2019	Water	Joal (Senegal)	0	0	E	O
STM478	Rice root	Kapachez (Guinea)	0	0	E	DP
STM481	Rice root	Kapachez (Guinea)	0	0	E	DP
STM482	Rice root	Kapachez (Guinea)	0	0	E	DP
STM515	Rice root	Kapachez (Guinea)	0	0	E	DP

^a Designations: ORS, collection of the Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France; STM, collection of the Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, Montpellier, France. Bacterial strains listed here are new isolates.

^b 0, no nodulation; I, ineffective root nodulation; E, effective root nodulation.

^c Crt, carotenoid; W, white (strain lacking Bchl *a* and carotenoid); DP, dark pink; O, orange.

sections. Five grams of sections from each individual collected plant was then transferred to a sterile 250-ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of sterile water, shaken for 15 min, and washed twice in 50 ml of sterile distilled water. Sections were then aseptically transferred to another sterile 250-ml Erlenmeyer flask and surface sterilized as follows. They were placed in 96% ethanol for 1 min, washed with sterile distilled water, then sterilized with 0.1% HgCl₂ for 5 min, and washed six times with sterile distilled water. As a control to check for superficial contamination, for each individual plant, 200 µl of water from the final rinse was inoculated on plates containing tryptone-glucose-yeast extract agar (TY) medium (Difco, Detroit, Mich.). No individual root sample resulting in contamination on TY plates was retained for isolation of endophytic rhizobia. Sections were aseptically crushed in a Waring blender containing 100 ml of sterile water, and 0.5 ml of the root homogenate was then aseptically inoculated into 4-day-old young seedlings of *A. sensitiva*, *S. rostrata*, and *Acacia albida* grown in Gibson tubes (41) (see below). Enumeration of rhizobia from surface-sterilized root homogenates, non-surface-sterilized roots, or rice field water was performed by the plant infection most-probable-number (MPN) technique as described by Brockwell (10).

Legume cultivation and rhizobium isolation from nodules. Seeds of *A. sensitiva*, *A. indica*, *Aeschynomene afraspera*, *S. rostrata*, and *F. albida* were scarified, surface sterilized for 45 min with concentrated sulfuric acid, and rinsed six times with sterile distilled water. Seeds were incubated to germinate in sterile petri dishes on 0.8% agar yeast extract-mannitol (YEM) medium (41). After 24 to 48 h, seeds showing no contamination were transferred to Gibson tubes containing nitrogen-free Jensen seedling agar (23) and grown under continuous light (20 W/m²) at 28°C. Two days later, legume species (eight replications for each treatment) were aseptically inoculated with rhizobial cultures or root homogenate. Three-week-old nodulated plants were collected, and nodules were picked, washed, and surface sterilized by immersion in HgCl₂ (0.1%) for 5 min. From this stage, the nodules were manipulated aseptically. Nodules were rinsed six times in sterile distilled water and then crushed in a drop of sterile water, and the suspension was streaked onto YEM plates. After 1 week of incubation at 28°C under aerobic conditions, colonies were checked for purity by repeated streaking on YEM medium and by microscopic examination of living cells. Isolates were checked for nodulation on their original host plants.

Bacterial strains and culture growth conditions. The bacterial isolates used in this study are listed in Table 1. All *Bradyrhizobium* strains were maintained on YEM medium. All strains were stored at -80°C on YEM medium adjusted to 20% (vol/vol) glycerol. Representative and type strains of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii* and various clusters of *Bradyrhizobium* strains previously described (13, 15, 26, 27) were included in this study (Table 2).

Rice cultivation and nitrogen fixation activity. Wild rice seeds were hulled, placed in 96% ethanol for 15 min, rinsed twice with sterile water, sterilized for 25 min in 0.1% HgCl₂, and rinsed six times in sterile distilled water. Seeds were germinated in the dark at 30°C for 2 days on plates containing semisolid TY medium (0.8% agar-agar [wt/vol]). Plantlets with a 1- to 2-cm-long root showing no contamination were soaked for 5 min in an axenic mid-log-phase rhizobial culture. The inoculated rootlet was packed between two sterile filter papers in a

large petri plate containing Jensen nitrogen-free medium. The plants were grown at 28°C for 3 to 4 weeks in growth chambers. Nitrogen-fixing activity was estimated by measurement of the acetylene-reducing activity of roots by the method of Hardy et al. (21).

Greenhouse rice inoculation experiments. Two-week-old rice plantlets grown on sterile sand in a nursery and previously inoculated were transplanted into pots containing 5 kg of local unsterilized sandy soil (psamment) with 93% sand. The first control consisted of noninoculated, non-N-fertilized plantlets, and the second control comprised noninoculated but N-fertilized plantlets that received 5 mM KNO₃ added in two equal doses 15 days after transplanting and at the mid-tillering stage. The experiment was arranged in a randomized design with six replicates for each treatment. Pots were watered with tap water and, every 2 weeks, with nitrogen-free Jensen's plant growth medium, to maintain a 2-cm waterhead above the soil surface. Experiments were performed in a greenhouse between June and October at 27 to 34°C with a day length of about 12 h. All *O. breviligulata* plants were harvested 115 days after transplanting. Grain, shoot, and leaf yields were evaluated.

Microscopic examination of endophytes within rice roots. At days 15 and 30 after inoculation with a *lacZ*-tagged strain of ORS278 (strain M10) (E. Giraud and L. Hannibal, personal communication), roots were histochemically treated as described earlier by Boivin et al. (8) and screened under an Olympus SZH10 stereomicroscope. Control roots inoculated with the wild-type strain ORS278 and the *Bradyrhizobium* strain Aust13c originally isolated from *Acacia mangium* (20) were also examined. Transverse sections (40 µm thick) were made using a Leica VT1000S Vibratome. Microscopic preparations were examined with an Olympus Provis microscope.

Photosynthetic pigment determination. Cultures were grown at 30°C for 7 days under aerobic conditions on a cycle of 15 h of light and 9 h of darkness. Bacteriochlorophyll *a* (Bchl *a*) was extracted under dim light with cold acetone-methanol (7:2, vol/vol) at 4°C for 30 min (25). The supernatant was analyzed using a Beckman DU40 spectrophotometer. Absorption spectra were obtained by scanning over a wavelength range from 350 to 800 nm. Carotenoids were further purified and analyzed by high-pressure liquid chromatography (HPLC) or thin-layer chromatography (TLC) as previously described (25).

16S amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). Strains were grown at 28°C for 5 days on YEM. Total DNA was purified by a slightly modified technique from Pitcher et al. (31) described by Doignon-Bourcier et al. (13). The primers and the general conditions for 16S rRNA gene PCR amplification were those described by Doignon-Bourcier et al. (13) except that amplifications were carried out in a Gene Amp PCR System 2400 (Perkin-Elmer). Endonuclease restriction of PCR products was performed with *Hinf*I, *Dde*I, *Mwo*I, *Alu*I, and *Hha*I. Restricted DNA was then analyzed by horizontal agarose gel electrophoresis using Metaphor agarose (FMC Bioproducts). Clustering was obtained by restriction profile analyses using the GelCompar 4.2 software package (40). The Dice coefficient (Tol, 0.3%; Opt, 0.50%; minimum area, 0.0%) and UPGMA (unweighted pair group method using average linkage) clustering were used.

Analysis of the 16S rRNA genes. We amplified the nearly full-length 16S rDNA of six photosynthetic strains by using the two specific oligonucleotide

TABLE 2. Reference strains used in this study^a

Bacterial strain	LMG no.	Original host plant	Geographic origin	Reference or source	Crt type spectrum ^b
Photosynthetic <i>Bradyrhizobium</i> spp.					
ORS266	15442	<i>Aeschynomene tambacoundensis</i>	Senegal	26	LP
ORS276	12185	<i>Aeschynomene sensitiva</i>	Senegal	26	
ORS278	12187	<i>Aeschynomene sensitiva</i>	Senegal	26	O
ORS279	12188	<i>Aeschynomene sensitiva</i>	Senegal	26	
ORS280	15411	<i>Aeschynomene indica</i>	Senegal	26	
ORS287	15378t1	<i>Aeschynomene afraspera</i>	Senegal	26	LP
ORS288	12189	<i>Aeschynomene afraspera</i>	Senegal	26	
ORS292	12205	<i>Aeschynomene sensitiva</i>	Senegal	26	
ORS294	12192	<i>Aeschynomene sensitiva</i>	Senegal	26	LP
ORS296	12194	<i>Aeschynomene sensitiva</i>	Senegal	26	
ORS297	12195	<i>Aeschynomene sensitiva</i>	Senegal	26	LP
ORS299	15399	<i>Aeschynomene sensitiva</i>	Senegal	26	
ORS306	11797	<i>Aeschynomene indica</i>	Senegal	1	LP
ORS308	15401	<i>Aeschynomene afraspera</i>	Senegal	3	LP
ORS324	8295	<i>Aeschynomene afraspera</i>	Senegal	2	LP
ORS331	11799	<i>Aeschynomene tambacoundensis</i>	Senegal	2	LP
ORS337	8299t2	<i>Aeschynomene afraspera</i>	Senegal	3	
ORS342	15383	<i>Aeschynomene indica</i>	Senegal	26	
ORS344	12198	<i>Aeschynomene indica</i>	Senegal	26	
ORS348	12200	<i>Aeschynomene</i> sp.	Senegal	26	
ORS352	15384	<i>Aeschynomene afraspera</i>	Senegal	1	LP
ORS359	12201	<i>Aeschynomene sensitiva</i>	Senegal	26	LP
ORS362	10305	<i>Aeschynomene afraspera</i>	Senegal	2	
ORS364	11802	<i>Aeschynomene nilotica</i>	Senegal	2	LP
ORS368	15387	<i>Aeschynomene indica</i>	Senegal	26	
ORS371	11804	<i>Aeschynomene indica</i>	Senegal	26	DP
ORS377	15420	<i>Aeschynomene elaphroxylon</i>	Senegal	26	W
ORS378	15421	<i>Aeschynomene elaphroxylon</i>	Senegal	26	W
ORS379	15422	<i>Aeschynomene elaphroxylon</i>	Senegal	26	W
ORS381	15423	<i>Aeschynomene elaphroxylon</i>	Senegal	26	W
ORS384	15390	<i>Aeschynomene indica</i>	Senegal	26	LP
ORS385	15391	<i>Aeschynomene indica</i>	Senegal	26	
ORS386	11815	<i>Aeschynomene indica</i>	Senegal	26	LP
ORS392	12205	<i>Aeschynomene indica</i>	Senegal	26	O
ORS400	12207	<i>Aeschynomene indica</i>	Senegal	26	
ORS29	15165	Unknown	Senegal	13	
ORS31	15167	<i>Indigofera tinctoria</i>	Senegal	13	
ORS87	15177	<i>Tephrosia purpurea</i>	Senegal	13	
ORS90	R-2196	<i>Tephrosia purpurea</i>	Senegal	13	
ORS110	10666	<i>Acacia albida</i>	Senegal	15	
ORS122	10678	<i>Acacia albida</i>	Senegal	15	
ORS123	10679	<i>Acacia albida</i>	Senegal	15	
ORS124	10680	<i>Acacia albida</i>	Senegal	15	
ORS127	10683	<i>Acacia albida</i>	Senegal	15	
ORS133	10689	<i>Acacia albida</i>	Senegal	15	
ORS140	10696	<i>Acacia albida</i>	Senegal	15	
ORS167	10710	<i>Acacia albida</i>	Senegal	15	
ORS169	10712	<i>Acacia albida</i>	Senegal	15	
ORS175	10718	<i>Acacia albida</i>	Senegal	15	
ORS182	10721	<i>Acacia albida</i>	Senegal	15	
ORS183	10722	<i>Acacia albida</i>	Senegal	15	
ORS523	R-2194	<i>Indigofera senegalensis</i>	Senegal	13	
ORS520	R-2192	<i>Indigofera senegalensis</i>	Senegal	13	
ORS935	15269	<i>Rhynchosia minima</i>	Senegal	13	
ORS937	15271	<i>Rhynchosia minima</i>	Senegal	13	
ORS976	R-2197	<i>Indigofera senegalensis</i>	Senegal	13	
ORS979	15275	<i>Indigofera senegalensis</i>	Senegal	13	
ORS980	15276	<i>Indigofera senegalensis</i>	Senegal	13	
ORS984	15279	<i>Indigofera senegalensis</i>	Senegal	13	
ORS1217	15301	<i>Indigofera senegalensis</i>	Senegal	13	
ORS1218	R-2200	<i>Indigofera senegalensis</i>	Senegal	13	
ORS1219	15302	<i>Indigofera senegalensis</i>	Senegal	13	
ORS1228	15304	<i>Indigofera astragalina</i>	Senegal	13	
ORS1810	15242	<i>Crotalaria lathyroides</i>	Senegal	13	
ORS1813	15244	<i>Crotalaria hyssopifolia</i>	Senegal	13	
ORS1814	15245	<i>Crotalaria hyssopifolia</i>	Senegal	13	

Continued on following page

TABLE 2—Continued

Bacterial strain	LMG no.	Original host plant	Geographic origin	Reference or source	Crt type spectrum ^b
ORS1819	15249	<i>Crotalaria retusa</i>	Senegal	13	
ORS1820	15250	<i>Indigofera hirsuta</i>	Senegal	13	
ORS1823	15367	<i>Indigofera hirsuta</i>	Senegal	13	
ORS1824	15153	<i>Indigofera hirsuta</i>	Senegal	13	
ORS1844	15266	<i>Chamaecrista</i> sp.	Senegal	13	
ORS1848	15373	<i>Indigofera hirsuta</i>	Senegal	13	
ORS1849	15374	<i>Indigofera hirsuta</i>	Senegal	13	
ORS1898	15699	<i>Tephrosia bracteolata</i>	Senegal	13	
ORS1903	15702	<i>Tephrosia villosa</i>	Senegal	13	
BTAi1	11795	<i>Aeschynomene indica</i>	United States	16	LP
BR3606	9959	<i>Acacia mollissima</i>	Brazil	27	
BR3621	9966	<i>Acacia mangium</i>	Brazil	27	
CB756	8319	<i>Macrotylona africanum</i>	Zimbabwe		
NZP2192	6161	<i>Lotus corniculatus</i>	New Zealand		
NZP2309	6128	<i>Lotus pedunculatus</i>	Australia		
NZP2314	6129	<i>Lotus pedunculatus</i>	Australia		
MSDJ718		<i>Lupinus luteus</i>	France		
TAL309	8316				
Nonphotosynthetic <i>Bradyrhizobium</i> spp.					
ORS272	15408	<i>Aeschynomene schimperi</i>	Senegal	26	
ORS313	15416	<i>Aeschynomene afraspera</i>		2	
ORS317	15147	<i>Aeschynomene afraspera</i>		2	
ORS354	15424	<i>Aeschynomene afraspera</i>		2	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>					
USDA135	8321	<i>Glycine max</i>	United States		
USDA110		<i>Glycine max</i>	United States		
MAR1589	14312	<i>Arachis hypogaea</i>			
NZP5533	6136	<i>Glycine max</i>	United States		
NZP5549T	6138T	<i>Glycine max</i>	Japan		
Bonnier 3.1	4252	<i>Glycine max</i>			
1BOa2	4262	<i>Albizia julibrissin</i>			
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>					
SFI 2062	18231	<i>Glycine max</i>	China	43	
SFI 2281	18230	<i>Glycine max</i>	China	43	
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>					
NZP 5532	6135	<i>Glycine max</i>	United States	24	
NZP 5531T	6134T	<i>Glycine max</i>	United States	24	

^a Photosynthetic strains are in boldface. Designations: ORS, collection of the Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France; LMG, collection of bacteria of the Laboratorium voor Microbiologie, University of Ghent, Ghent, Belgium; BR, strain from the Centro Nacional de Pesquisa em Biologia do Solo (CNPBS), Seropédica, and Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Rio de Janeiro, Brazil; INPA, National Institute of Amazonia Research, Manaus, Brazil; NZP, Culture Collection of the Department for Scientific and Industrial Research, Biochemistry Division, Palmerston North, New Zealand; USDA, U.S. Department of Agriculture, Beltsville, Md.; TAL, Nitrogen Fixation in Tropical Agricultural Legumes (NifTAL), University of Hawaii, Paia; MSDJ, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Microbiologie des Sols, Dijon, France; MAR, Soil Productivity Research Laboratory, Marondera, Zimbabwe; SFI, Soils and Fertilizers Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, People's Republic of China.

^b Crt, carotenoid; W, white (strain lacking Bchl *a* and carotenoid); DP, dark pink; O, orange; LP, light pink.

primers FGPS6, 5'-GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG-3' (sense; positions 6 to 27 by *Escherichia coli* numbering), and FGPS1509, 5'-AAGGAGGGGATC CAGCCGCA-3' (antisense; positions 1540 to 1521 by *E. coli* numbering), according to the method of Normand et al. (30). PCR products were purified with a QIAquick Gel extraction Kit (Qiagen, Courtabouef, France). The ABI Prism BigDye Terminator Cycle sequence kit (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) was used to directly sequence the purified PCR product. Sequencing reactions were analyzed on an Applied Biosystems model 310 DNA sequencer.

DNA sequence analysis. The six 16S rDNA sequences obtained were compared to the GenBank database by using the algorithm BLASTN (4) to identify the most similar 16S rDNA sequences. An alignment was performed, using the PILEUP program (12), with a set of sequences of representatives of the most closely related genera identified. A phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method (37), and a bootstrap confidence analysis was performed on 1,000 replicates to determine the reliability of the tree topology obtained (18).

Nucleotide sequence accession numbers. The GenBank accession numbers for the 16S rRNA gene sequences of strains ORS2005, ORS2006, ORS2011, ORS2012, STM481, and ORS278 are AF230718, AF230719, AF230720, AF230721, AF239254, and AF239255, respectively.

RESULTS

Isolation of endophytic rhizobia from wild rice. Nitrogen-fixing nodules were formed within 2 weeks on the roots of *A. sensitiva*, used as a trap legume host and previously inoculated with crushed surface-sterilized nodal roots of *O. breviligulata*. Thirteen endophytic rhizobial isolates were independently obtained from these *Aeschynomene* nodules (Fig. 1 and Table 1). Of these, nine isolates (ORS2005, ORS2006, ORS2007, ORS2008, ORS2009, ORS2011, ORS2012, ORS2014, and ORS402) were obtained from two distant temporary ponds of the coastal region of Joal and Nianing in Senegal. The other four isolates (STM478, STM481, STM482, and STM515) were obtained from deep-water wild rice growing in the Baga wetland coastal region of Guinea; located 600 km south of the Senegalese sampling sites. Both of the other legumes used as

trap hosts for rice endophytic rhizobia, *S. rostrata* and *A. albidia*, failed to develop any nodules upon inoculation with crushed rice roots.

Isolation of aquatic rhizobia from rice field water. In order to compare the endophytic and aquatic rhizobia, water samples from the two wild rice growing sites in Senegal were also tested for the presence of free rhizobia (Fig. 1). Six isolates (ORS404, ORS405, ORS406, ORS408, ORS2010, and ORS2013) were obtained from nodules of *A. sensitiva* previously inoculated with water samples. One isolate (ORS2019) was obtained by direct streaking of the water sample onto YEM plates and was selected as a result of its pink pigmentation.

Symbiotic characterization of endophytic and aquatic rhizobial isolates. To determine to which specificity group the endophytic and aquatic rhizobia belonged, we performed root inoculation tests with representative plants of different nodulation groups as defined by Alazard (1). The 20 endophytic and aquatic isolates showed a very specific nodulation pattern: they nodulated only *A. sensitiva* and *A. indica*, two species belonging to the most specific *Aeschynomene* cross-inoculation group (Table 1). Nodules were effective, except for those induced by both aquatic isolates, ORS405 and ORS406, that did not fix nitrogen. None of the isolates induced nodulation on *A. afraspera*, which belongs to another *Aeschynomene* cross-inoculation group, or on *A. albidia*, a nonspecific host known to be nodulated by a broad range of typical promiscuous "cowpea" *Bradyrhizobium* strains.

Photosynthetic properties of endophytic and aquatic rhizobia. All isolates developed typical slow-growing *Bradyrhizobium* colonies on YEM plates. With the exception of isolates ORS402, ORS405, and ORS406, which formed white colonies, all isolates synthesized pink or orange pigments on yeast-mannitol solid or liquid culture medium (Table 1), particularly when exposed to light, suggesting the presence of carotenoids and photosynthetic pigments (17, 25). All pigmented isolates produced an absorbance peak at 770 nm, characteristic of Bchl *a*, and peaks around 400 to 500 nm, corresponding to carotenoids. No Bchl *a* or carotenoids were observed in isolates ORS402, ORS405, and ORS406.

All pigmented isolates (ORS404, ORS408, ORS478, ORS481, ORS482, ORS515, ORS2005, ORS2006, ORS2007, ORS2008, ORS2009, ORS2010, ORS2011, ORS2012, ORS2013, ORS2014, and ORS2019), and one nonpigmented isolate (ORS402) gave a fragment of the expected size (926 bp) using the primers defined from the *pufLM* sequence of *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278 as described by Molouba et al. (26). The sequences of the amplified products obtained with two representative endophytic isolates (ORS2005 and ORS2011) were homologous to those of the *pufLM* genes. No PCR products were obtained with isolates ORS405 and ORS406.

ARDRA. We also performed ARDRA to compare the 20 new isolates with *Bradyrhizobium* strains representative of the ARDRA groups previously described (13, 26). The results are shown as a dendrogram in Fig. 2. At a mean Dice similarity coefficient (S_D) of 76%, we distinguished three main clusters. All the endophytic and aquatic isolates, except ORS405 and ORS406, grouped in the same major cluster together with photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strains from *Aeschynomene*. The two other main clusters, containing the type strains of the three named *Bradyrhizobium* species, were previously described by Doignon-Bourcier et al. (13).

16S rRNA gene sequence analysis. We determined the 16S rRNA gene sequences of the representative endophytic strains ORS2005, ORS2006, ORS2011, ORS2012, and STM481. All five sequences were identical and were 2, 6, 9, and 10 bp different from those of ORS278, USDA4377, BTAi1, and *Blasto-*

bacter denitrificans strain LMG8443, respectively. A phylogenetic tree was constructed to determine the position of these isolates among other *Bradyrhizobium* strains (Fig. 3). All the endophytes formed a separate branch together with the photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strains ORS278, BTAi1, and USDA 4377 from *Aeschynomene* and the aquatic strain *B. denitrificans* (LMG8443). This grouping was supported by a bootstrap value of 100% and was distinct from the five other well-separated clusters including, respectively, *B. japonicum*, *B. elkanii*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Nitrobacter winogradskyi*, and *Afipia felis* (Fig. 3).

Numeration of endophytic and aquatic rhizobia. We found a population density of $\sim 5.0 \times 10^6$ endophytic rhizobia per g (fresh weight) of surface-sterilized rice roots. When the roots were not surface sterilized, the total population density of rhizobia reached $\sim 2.5 \times 10^7$ rhizobia per g of roots. Populations of aquatic rhizobia able to nodulate *Aeschynomene* were evaluated as $\sim 1.1 \times 10^2$ rhizobia per ml of water.

Inoculation with endophytic rhizobia of the wild rice grown in a greenhouse. Sixteen rice endophytic and aquatic isolates and two photosynthetic *Bradyrhizobium* strains from *Aeschynomene* were inoculated on rice plants grown in sandy soil without added N fertilizer. After growth, the dry weights of shoots and leaves and of grains were determined; results are shown in Table 3. The endophytic isolate ORS2011 and the *Aeschynomene* photosynthetic *Bradyrhizobium* strain ORS278 produced the highest effects of inoculation, giving 20% increases in both shoot and grain yields. Inoculation with most other isolates, including strain BTAi1, resulted in dry weights of shoots and leaves similar to those of the N-fertilized control. With half of these isolates, however, no inoculation effect was observed on grain yields, which remained very low, as in the noninoculated, nonfertilized control.

Colonization and infection of wild rice roots by photosynthetic rhizobia. Because the photosynthetic *Bradyrhizobium* strain ORS278 was the strain with the highest inoculation effect on the growth and grain yield of rice grown in a greenhouse, we used a marked derivative of ORS278 (strain M10) to trace the infection process in rice roots. Strain M10 was constructed independently from this work by insertion of a *lacZ* reporter gene in the photosynthetic *puf* gene (Giraud and Hannibal, personal communication). The *lacZ* reporter gene was shown to be strongly expressed under the culture conditions we used for rice growth. The wild-type strain ORS278 and the nonphotosynthetic *Bradyrhizobium* strain Aust13c from *A. mangium* were used as controls. Fifteen days after inoculation of *O. breviligulata* with strain M10, histochemical staining of β -galactosidase activity revealed a strong bacterial colonization of the root cap which exhibited a dense blue staining (Fig. 4A). This colonization was particularly dense at the surface of the mucilage drop that covers the root apex (Fig. 4B). Senescent root cells, sloughed off the root cap, often exhibited a hairbrush shape (Fig. 4C), due to polar attachment of bacterial cells covering their surfaces. Polar attachment also occurred with the wild-type strain ORS278. By contrast, despite colonization of the mucilage, we never observed such polar attachment with the nonphotosynthetic *Bradyrhizobium* strain Aust13c (data not shown). Thirty days after inoculation, clusters of sloughed root cap cells were still observed far from the root tip, embedded in mucilage and densely colonized by *Bradyrhizobium* (Fig. 4E). An intense bacterial colonization of the root surface originated from these clusters (Fig. 4E). Bacteria appeared lined up along the borders of adjacent epidermal cells (Fig. 4G). Bacterial invasion developed deeper in the intercellular spaces as revealed by cross sections (Fig. 4H). A few intracellular infections were also regularly observed in epi-

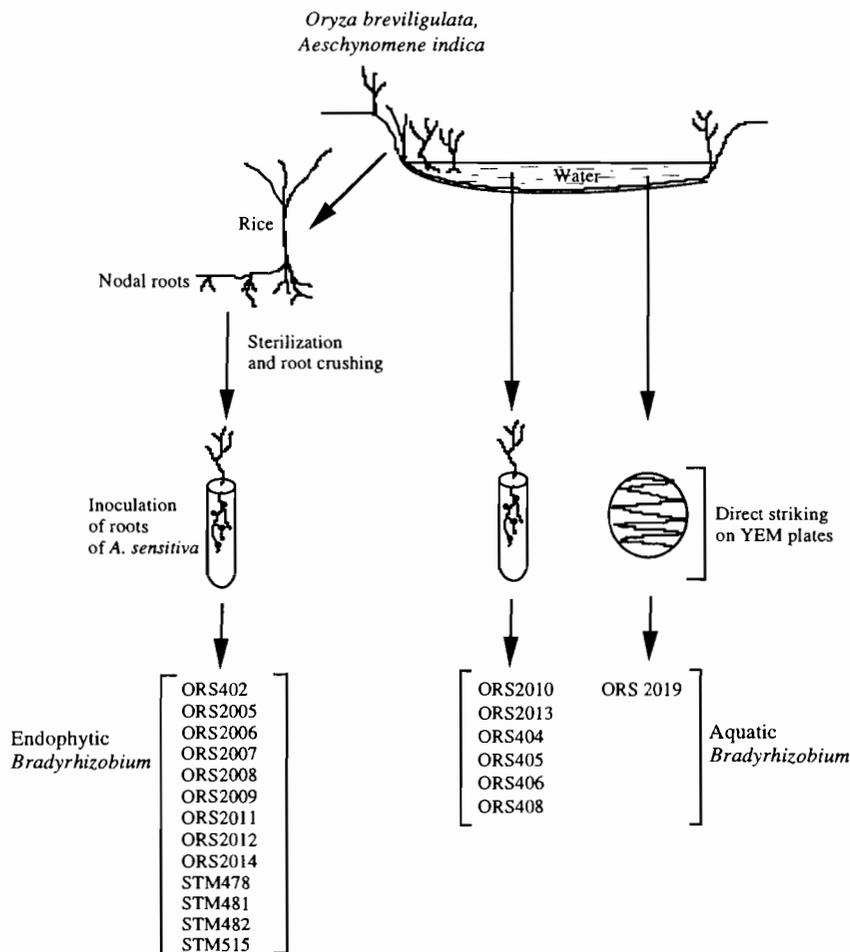


FIG. 1. Isolation of endophytic and aquatic *Bradyrhizobium* strains.

dermal cells filled with bradyrhizobia (Fig. 4I). In the zone of emergence of lateral roots, dense bacterial proliferation was observed in the fissures caused by protruding lateral roots (Fig. 4D), where bacterial proliferation commonly reached four to five cell layers deep (Fig. 4F).

Nitrogen-fixing activity in the rice rhizosphere. A low but significant level of nitrogen-fixing activity, as measured by the acetylene reducing activity, was detected (1.7 nmol of $C_2H_4/h/plant$) on 4-week-old rice plants artificially grown in growth chambers in large petri dishes and inoculated with the photosynthetic strain ORS278. No acetylene reducing activity was detected with the noninoculated rice control.

DISCUSSION

Photosynthetic *Bradyrhizobium* strains are known to specifically induce nitrogen-fixing nodules on stems and roots of aquatic legumes of the genus *Aeschynomene* (26). We report here for the first time that these photosynthetic symbiotic bacteria also form a natural endophytic association with the wild rice species *O. breviligulata*. The surfaces and interiors of the rice roots, which we found densely colonized by *Aeschynomene*-nodulating *Bradyrhizobium* strains, therefore appear in nature as unexpected niches, much more abundant than root and stem nodules of the aquatic legumes. Photosynthetic *Bradyrhizobium* strains were also directly isolated from water, thus confirming their aquatic character (9), which could result in a

bacterial selective advantage in the absence of rice or legume hosts. Yanni et al. (44) previously reported endophytic association between another rhizobial species, *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, and rice grown in Egypt in rotation with the legume *Trifolium alexandrinum*. Our results with *O. breviligulata* thus suggest that rhizobia could be usual endophytic bacteria of various primitive and cultivated rice species.

Growth stimulation of different cereals such as wheat or rice following seed inoculation with nonphotosynthetic rhizobia such as *R. leguminosarum* (44) or *Azorhizobium* (42) strains has been previously reported. We therefore conducted greenhouse experiments to measure plant growth responses to inoculation with photosynthetic endophytic isolates. Inoculation with both the photosynthetic isolate ORS2011 and the *Aeschynomene* photosynthetic strain ORS278 resulted in statistically significant increases in shoot and grain yields, indicating their potential ability to enhance rice production. As we detected a nitrogen-fixing activity in inoculated rice plants, nitrogen fixation could contribute to this plant growth-promoting response. Nitrogenase activity had previously been detected in wheat inoculated with *Azorhizobium* strain ORS571, but only when succinate was added to the plant growth medium (42). Photosynthetic *Bradyrhizobium* strains are known to fix nitrogen under free-living conditions (2). However, we cannot conclude that the low N_2 fixation activity detected would support on its own a major role in the increase in shoot and grain yields. It has been shown that rhizobia can secrete indoleacetic acid and

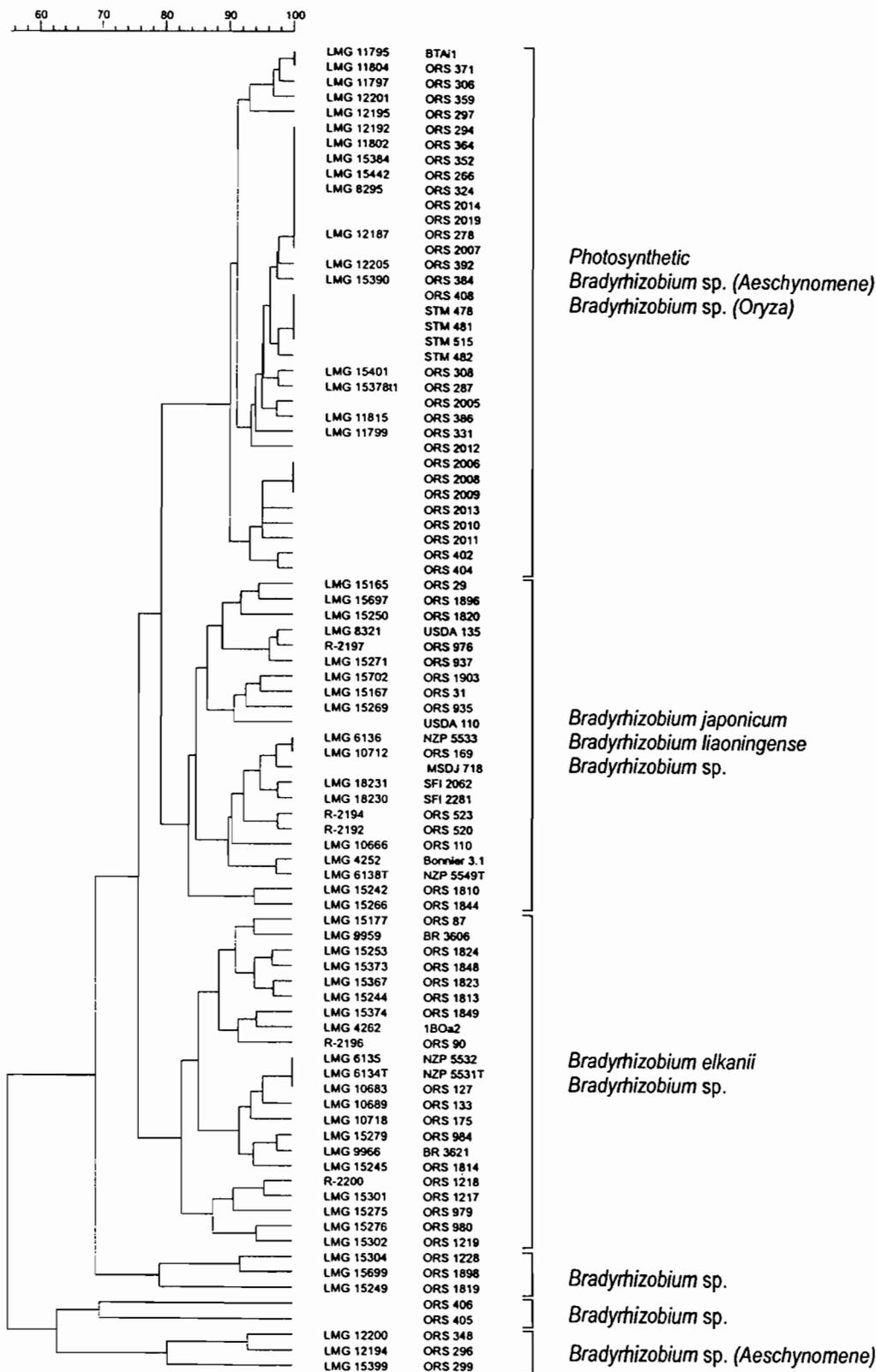


FIG. 2. Dendrogram based on UPGMA clustering of Dice correlation values (S_D) of normalized and combined ARDRA patterns of new isolates and reference *Bradyrhizobium* strains obtained with the restriction enzyme combination *Hinf*I, *Dde*I, *Mwo*I, *Alu*I, and *Hha*I. The scale represents S_D values converted to percentages.

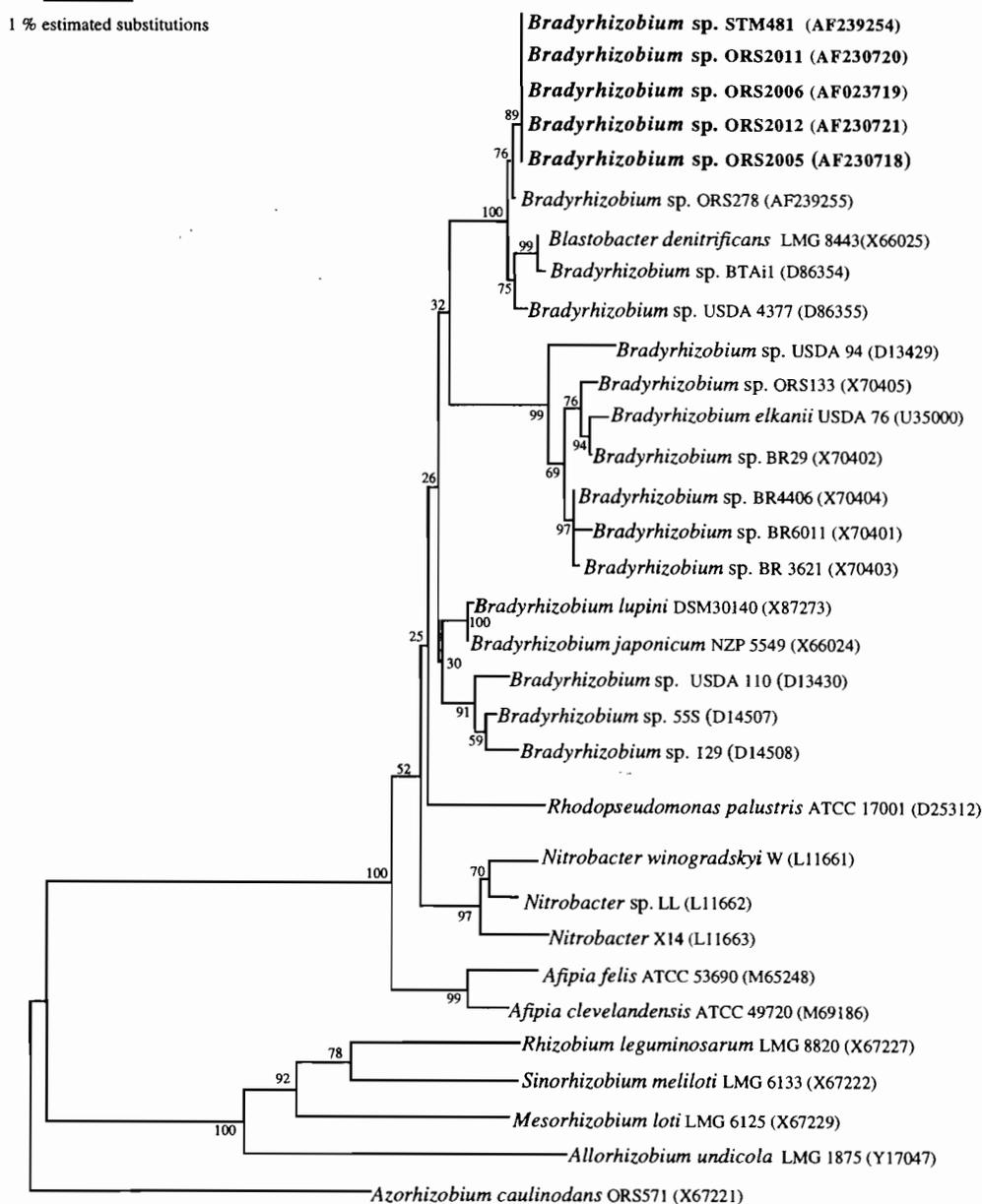


FIG. 3. Neighbor-joining dendrogram of 16S rDNA sequences showing the position of endophytic strains (boldfaced) isolated from wild rice among bradyrhizobia and closely related taxa. Bootstrap values, expressed as percentages of 1,000 replications, are given at the branching points. Numbers in parentheses are the accession numbers of the sequences used. The bar represents 1 estimated substitution per 100 nucleotide positions.

gibberellic acid phytohormones (44). The free N_2 -fixing strains ORS2011 and ORS278 could thus represent an interesting model to determine the respective roles of N_2 fixation and phytohormone production in the significant benefit to rice.

By microscopic examination, we were able to distinguish two main stages of bradyrhizobial colonization of the rice root. The first step was the root cap colonization, followed by a strong bacterial multiplication covering large areas of the root surface. The root cap is known as one of the main sites of polysaccharide secretion by specialized plant cells completely embedded in a mucilage gel-like matrix which has been described as a substrate as well as a niche of proliferation for a wide range of soil microorganisms (32). As the root growth goes on, root cap cells are continuously renewed, and senescent cells are sloughed off along the root. This step, characterized by the

polar attachment of the rhizobial cells to the sloughed cells, could be considered characteristic, since a nonphotosynthetic *Bradyrhizobium* strain from *A. mangium* showed no attachment to rice cells. Such oriented attachment has also been observed on the root hairs and root epidermis of rice artificially inoculated with *A. caulinodans* strain ORS571 (33). In *O. breviligulata*, attachment of photosynthetic *Bradyrhizobium* to root cap cells could facilitate the dispersal of the bacteria all along the root. We indeed observed an intense bacterial colonization of large areas of root surface, starting from the sloughed cells acting as an inoculant. Bacteria appeared lined up along the borders of epidermal root cells. Such a preferential location could result from a better bacterial proliferation favored by the presence of intercellular mucilage.

The second step of infection was the intercellular invasion of

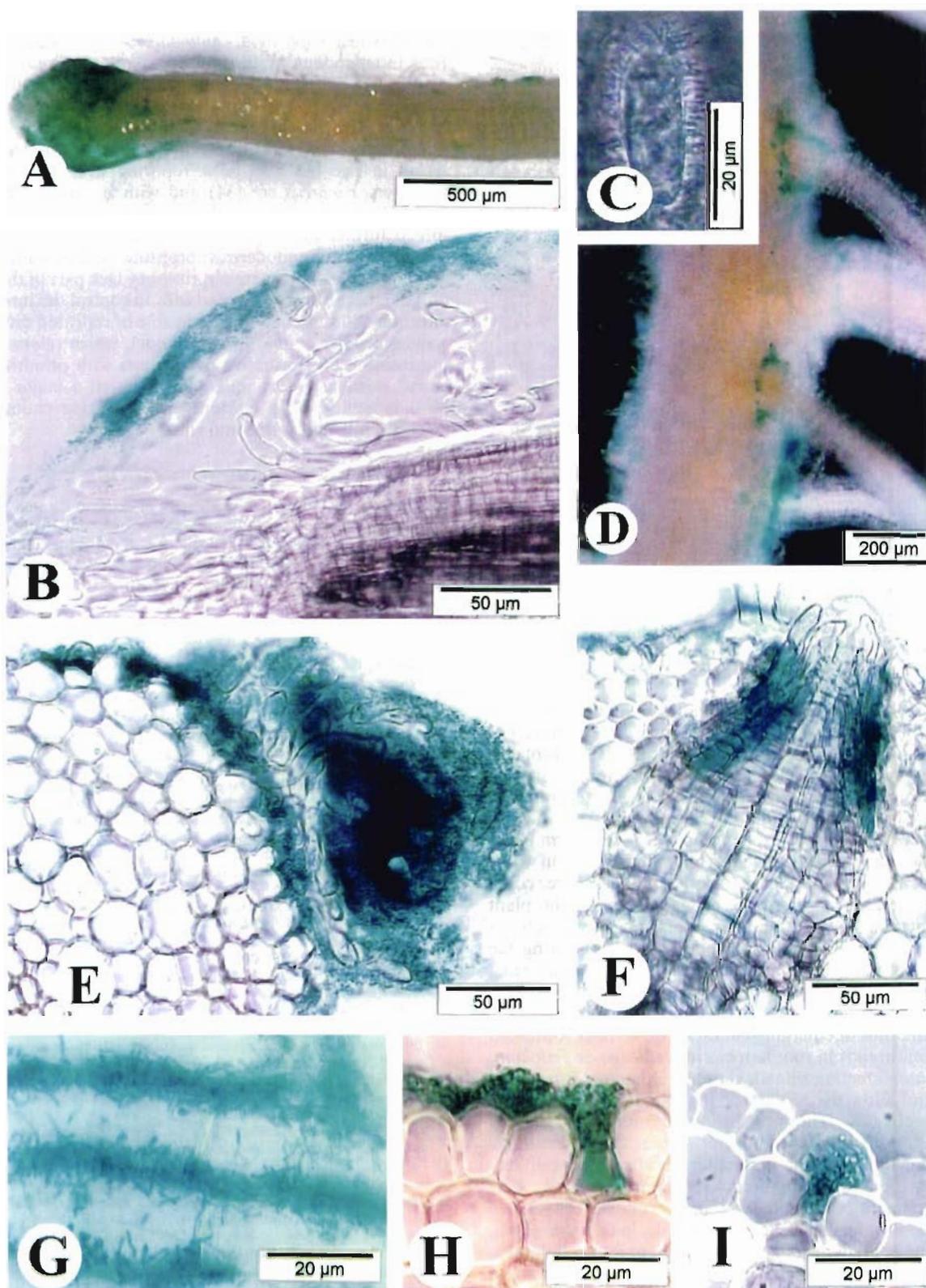


FIG. 4. Stereo- and light microscopic observations of *O. breviligulata* seedlings inoculated with a *lacZ*-tagged *Bradyrhizobium* ORS278 strain (M10). (A to C) Fifteen days after inoculation; (D to I) 30 days after inoculation. (A) Stereomicroscopic observation from the root apex to the root hair zone. An intense blue coloration occurs on the root cap surface, revealing a dense bacterial colonization. (B) Longitudinal section of the root apex showing the dense colonization of the mucilage drop that covers the root cap, viewed by bright-field microscopy. (C) A sloughed root cap covered with *Bradyrhizobium* cells attached in a polar way, observed by phase-contrast microscopy. (D) Colonization of the cracks at the emergence sites of lateral roots, observed by stereomicroscopy. (E) Cross section of the elongation zone of a root with densely colonized root cap remnants, from which the bacteria colonize the root surface, observed by bright-field microscopy. (F) Deep colonization of cracks at the emergence of a lateral roots, as seen in a cross section by bright-field microscopy. (G) Colonization of the root surface along borders of epidermal cells, observed by bright-field microscopy. (H) Cross section of a root with proliferation in the intercellular space between two epidermal cells, observed by bright-field microscopy. (I) Intracellular colonization of an epidermal cell by ORS278, observed by bright-field microscopy.

TABLE 3. Effect of inoculation with endophytic and nonendophytic photosynthetic *Bradyrhizobium* strains on shoot and grain yields of *O. breviligulata* grown in a greenhouse

Strain ^a	Dry wt ^b (g) of:	
	Shoots and leaves	Grain
ORS405	19.7†,‡	1.9‡
ORS2019	16.7‡	3.5‡
ORS404	20.7†,‡	4.5‡
ORS2012	21.4†,‡	4.6‡
ORS402	23.0†	4.9‡
ORS408	26.4†	5.0‡
ORS2014	24.3†	6.1‡
ORS2008	23.6†	6.8†,‡
ORS2010	20.5†,‡	7.4†
ORS406	22.4†	7.5†
ORS2005	22.4†	8.1†
ORS2009	23.2†	8.6†
ORS2013	21.8†,‡	8.7†
ORS2007	24.3†	9.4*,†
ORS2006	27.5*,†	9.6*,†
ORS2011	29.7*	10.3*
ORS278	30.1*	12.0*
BTAii	23.4†	7.2†
Control (noninoculated)	16.7‡	5.0‡
Control (N fertilization)	23.0†	8.5†

^a ORS strains are from the collection of the Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France.

^b Values with different symbols differ significantly at the $P < 0.01$ level. Analysis of variance was carried out by Fisher's test (39). Six replicates were performed per treatment.

epidermal cells, which constituted the true endophytic stage. Simultaneously with bacterial root surface colonization, numerous lateral roots emerge, producing fissures in the root epidermis and underneath cell layers. These fissures are sites of intense intercellular bacterial proliferation. Bacteria invade the fissure via disjoined epidermis cells and migrate towards deeper layers of cortical cells, between which they form pockets of proliferating bacteria. Such an endophytic stage, in which bacterial cells are densely packed in a confined space, could constitute preferential sites of exchanges between the plant and the bacteria. These large intercellular pockets closely resemble the intercellular infection pockets formed during the early stages of nodulation by rhizobia in aquatic legumes such as *S. rostrata* (28) and *A. afraspera* (3). In these tropical legumes, infection starts intercellularly, directly through "crack entry" at the sites of emerging lateral roots, without formation of infection threads in root hairs as in *Medicago* or *Trifolium*. In *S. rostrata*, infection threads develop ultimately from these pockets and allow the release of the bacteria into the meristematic cells (28). The most primitive infection process is found in *A. afraspera*, where bacteria from the intercellular pockets directly invade the host cell by localized cell wall degradation, without any formation of infection threads (3). Further development of the nodule occurs by repeated division of the infected host legume cells. Interestingly, in *O. breviligulata*, photosynthetic bradyrhizobia are also present intracellularly in cortical cells. However, unlike in *Aeschynomene*, the number of invaded cells remained limited in *O. breviligulata*, and no division of these infected cells was observed. This intracellular invasion could thus be the ultimate stage of rice infection by *Bradyrhizobium*. Nevertheless, the infection process in the monocotyledonous plant *O. breviligulata* by the same photosynthetic bradyrhizobia seems to be very similar to the first stages of infection in the leguminous dicotyledonous plant

Aeschynomene. Webster et al. (42) showed that colonization of rice and wheat roots by *A. caulinodans* strain ORS571 was *nod* gene independent. With the photosynthetic *Bradyrhizobium* strain ORS278, one hypothesis could also be that, in both *A. sensitiva* and *O. breviligulata*, expression of *nod* genes is not necessary for the first steps of infection involving primitive "crack entry" and direct intercellular invasion. Intracellular invasion in rice has also been reported with the endophytic bacterium *Azoarcus* sp. (34) and with *A. caulinodans* strain ORS571 (33). The reason why intracellular infection does not spread further in rice is not yet elucidated. One hypothesis could be that the endodermis constitutes a thick-walled boundary to infection. Alternatively, rice may lack part of the genetic program necessary for invaded cells to control the intracellular infection and subsequently be capable of repeated divisions. In conclusion, the *O. breviligulata* model, which offers a unique combination of a primitive rice species with primitive "crack entry" rhizobial infection, could represent a major step forward in achieving an efficient nitrogen-fixing endosymbiotic association between rice and rhizobia.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a Ph.D. scholarship granted by IRD to Clémence Chaintreuil. Monique Gillis is indebted to the Fund for Scientific Research-Flanders (Belgium) and personnel grants.

We thank Catherine Boivin for comments on the manuscript and helpful discussions, and Mathieu Faye and Moustapha Ndiaye for technical assistance.

REFERENCES

- Alazard, D. 1985. Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. Appl. Environ. Microbiol. 50:732-734.
- Alazard, D. 1991. La nodulation caulinaire dans le genre *Aeschynomene*. Ph.D. thesis. University Claude Bernard-Lyon I, Lyon, France.
- Alazard, D., and E. Duhoux. 1990. Development of stem nodules in a tropical forage legume, *Aeschynomene afraspera*. J. Exp. Bot. 41:1199-1206.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lippman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.
- Baldani, J. I., V. L. D. Baldani, L. Seldin, and J. Döbereiner. 1986. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. 36:86-93.
- Bashan, Y. 1999. Interaction of *Azospirillum* spp. in soils: a review. Biol. Fertil. Soils 29:246-256.
- Boddey, R. M., O. C. Oliveira, S. Urquiaga, V. M. Reis, F. L. de Olivares, V. L. D. Baldani, and J. Döbereiner. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. Plant Soil 174:195-209.
- Boivin, C., S. Camut, C. A. Malpica, G. Truchet, and C. Rosenberg. 1990. *Rhizobium meliloti* genes encoding catabolism of trigonelline are induced under symbiotic conditions. Plant Cell 2:1157-1170.
- Boivin, C., I. Ndoye, F. Molouba, P. de Lajudie, N. Dupuy, and B. L. Dreyfus. 1997. Stem nodulation in legumes: diversity, mechanisms and unusual characters. Crit. Rev. Plant Sci. 16:1-30.
- Brockwell, J. 1980. Experiments with crop and pasture legumes. Principle and practice, p. 417-488. In F. J. Bergersen (ed.), Methods for evaluating biological nitrogen fixation. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
- Cavalcante, V., and J. Döbereiner. 1988. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugar cane. Plant Soil 108:23-31.
- Devereux, J., P. Haeberli, and O. Smithies. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nucleic Acids Res. 12:387-395.
- Doignon-Bourcier, F., A. Sy, A. Willems, U. Torck, B. Dreyfus, M. Gillis, and P. de Lajudie. 1999. Diversity of bradyrhizobia from 27 tropical *Leguminosae* species native of Senegal. Syst. Appl. Microbiol. 22:647-661.
- Dreyfus, B., and Y. R. Dommergues. 1981. Nitrogen-fixing nodules induced by *Rhizobium* on the stem of the tropical legume *Sesbania rostrata*. FEMS Microbiol. Lett. 10:313-317.
- Dupuy, N., A. Willems, B. Pot, D. Dewettinck, I. Vandenbruaene, G. Maestroujan, B. Dreyfus, K. Kersters, M. D. Collins, and M. Gillis. 1994. Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. Int. J. Syst. Bacteriol. 44:461-473.
- Eaglesham, A. R. J., and A. A. Szalay. 1983. Aerial stem nodules on *Aeschynomene* spp. Plant Sci. Lett. 29:265-272.
- Eaglesham, A. R. J., J. M. Ellis, W. R. Evans, D. E. Fleischman, M. Hungria, and R. W. F. Hardy. 1990. The first photosynthetic N₂-fixing *Rhizobium*:

- characteristics, p. 805-811. In P. M. Gresshoff, L. E. Roth, G. Stacey, and W. L. Newton (ed.), Nitrogen fixation: achievements and objectives. Chapman and Hall, New York, N.Y.
18. Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:424-429.
 19. Fleischman, D., and D. Kramer. 1998. Photosynthetic rhizobia. *Biochim. Biophys. Acta* 1364:17-36.
 20. Galiana, A., J. Chaumont, H. G. Diem, and Y. R. Dommergues. 1990. Nitrogen-fixing potential of *A. mangium* and *A. auriculiformis* seedlings inoculated with *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* spp. *Biol. Fertil. Soils* 9:261-267.
 21. Hardy, R. W. F., R. C. Burn, and R. D. Holten. 1973. Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of N₂ fixation. *Soil Biol. Biochem.* 43:47-87.
 22. James, E. K., and F. L. Olivares. 1998. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17:77-119.
 23. Jensen, H. L. 1942. Nitrogen fixation in leguminous plants. I. General characters of root nodule bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia. *Proc. Int. Soc. N.S.W.* 66:68-108.
 24. Kuykendall, L. M., B. Saxena, T. E. Devine, and S. E. Udell. 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 38:501-503.
 25. Lorquin, J., F. Molouba, and B. L. Dreyfus. 1997. Identification of the carotenoid canthaxanthin from photosynthetic *Bradyrhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1151-1154.
 26. Molouba, F., J. Lorquin, A. Willems, B. Hoste, E. Giraud, B. Dreyfus, M. Gillis, P. de Lajudie, and C. Masson-Boivin. 1999. Photosynthetic bradyrhizobia from *Aeschynomene* spp. are specific to stem-nodulated species and form a separate 16S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3084-3094.
 27. Moreira, F., M. Gillis, B. Pot, K. Kersters, and A. A. Franco. 1993. Characterization of rhizobia from different divergence groups of tropical *Leguminosae* by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Syst. Appl. Microbiol.* 16:135-146.
 28. Ndoye, I., F. de Billy, J. Vasse, B. Dreyfus, and G. Truchet. 1994. Root nodulation of *Sesbania rostrata*. *J. Bacteriol.* 176:1060-1068.
 29. Ndoye, I., B. Dreyfus, and M. Becker. 1996. *Sesbania rostrata* as green manure for lowland rice in Casamance (Senegal). *Trop. Agric.* 73:234-237.
 30. Normand, P., B. Cournoyer, P. Simonet, and S. Nazaret. 1992. Analysis of a ribosomal RNA operon in the actinomycete *Frankia*. *Gene* 111:119-124.
 31. Pitcher, D. G., N. A. Saunders, and R. J. Owen. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* 8:151-156.
 32. Prin, Y., and M. Rougier. 1986. Cytological and histochemical characteristics of axenic root surfaces of *Alnus glutinosa*. *Can. J. Bot. Fr.* 119:571-580.
 33. Reddy, P. M., J. K. Ladha, R. So, R. Hernandez, M. C. Ramos, O. R. Angeles, F. B. Dazzo, and F. J. De Bruijn. 1997. Rhizobial communication with rice roots: induction of phenotypic changes, mode of invasion and extent of colonization. *Plant Soil* 194:81-98.
 34. Reinhold, B., and T. Hurek. 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol.* 6:139-144.
 35. Reinhold, B., T. Hurek, E.-G. Niemann, and I. Fendrik. 1986. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of Kallar grass. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:520-526.
 36. Rolfe, B. G., M. A. Djordjevic, J. J. Weinman, U. Mathesius, C. Pittock, E. Gartner, K. M. Ride, Z. M. Dong, M. McCully, and J. McIver. 1997. Root morphogenesis in legumes and cereals and the effect of bacterial inoculation on root development. *Plant Soil* 194:131-134.
 37. Saltou, R. R., and M. Nei. 1987. A neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 44:406-425.
 38. Second, G. 1986. La domestication en régime autogame: exemple des riz (*Oryza* spp). *Bull. Soc. Bot. Fr. Act. Bot.* 133:35-44.
 39. Snedecor, G. W., and W. E. Cochran. 1989. *Statistical methods*, 8th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
 40. Vauterin, L., and P. Vauterin. 1992. Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. *Eur. Microbiol.* 1:37-41.
 41. Vincent, J. M. 1970. *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, United Kingdom.
 42. Webster, G., C. Gough, J. Vasse, C. A. Batchelor, K. J. O'Callaghan, S. L. Kothari, M. R. Davey, J. Dénarié, and E. C. Cocking. 1997. Interactions of rhizobia with rice and wheat. *Plant Soil* 194:115-122.
 43. Xu, L. M., C. Ge, Z. Cul, J. Li, and H. Fan. 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:706-711.
 44. Yanni, Y. G., R. Y. Rizk, V. Corich, A. Squartini, K. Ninke, S. Phillip-Hollingsworth, G. Orgambide, F. De Bruijn, J. Stolz, D. Buckley, T. M. Schmidt, P. F. Mateos, J. K. Ladha, and F. B. Dazzo. 1997. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant Soil* 194:99-114.

Article accepté dans Federation of European Microbiology Societies (FEMS).

**Characterization of the common nodulation genes of the photosynthetic
Bradyrhizobium sp. ORS285 reveals the presence of a new Insertion
Sequence upstream of *nodA***

**CLEMENCE CHAINTREUIL*, CATHERINE BOIVIN*, BERNARD DREYFUS*
and ERIC GIRAUD*†**

*Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, IRD, CIRAD, AGRO-M, INRA.
TA 10/J, Campus de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

† **Corresponding author:** ERIC GIRAUD, IRD, LSTM TA 10/J, Campus de Baillarguet,
34398 Montpellier Cedex 1, France.

Phone: (33) 467593783, Fax: (33) 467593802, Email: Giraud@mpl.ird.fr

Keywords: nodulation gene, photosynthetic *Bradyrhizobium*, *nodA*, insertion sequence,
Aeschynomene.

ABSTRACT

We isolated and characterized *nodA* genes from photosynthetic and non-photosynthetic rhizobia nodulating the legume genus *Aeschynomene*, and found that the *nodA* sequence from photosynthetic stem-nodulating bacteria was phylogenetically distant from the other already described *nodA* genes. Characterization of the photosynthetic strain ORS285 common *nod* gene cluster (*nodABC*) showed, upstream of *nodA*, the presence of a new insertion sequence element belonging to the IS3 family and specific to a group of photosynthetic strains from *Aeschynomene*.

1. INTRODUCTION

Some species of the genus *Aeschynomene* have the unusual capacity to develop stem nodules, a property shared only with a very few species of the genera *Sesbania*, *Neptunia* and *Discolobium*. A number of stem isolates from *Aeschynomene* are of special interest because of their ability to develop a photosynthetic system [1], which is a rare trait in rhizobia. Three cross-inoculation groups among *Aeschynomene* species have been described [2]. Group I never forms stem nodules and is nodulated by the typical, broad host range, non-photosynthetic *Bradyrhizobium* strains. The two other groups, II and III, develop stem nodulation. Group III is exclusively nodulated by photosynthetic rhizobia, which are highly specific to that group [3]. Group II is intermediary as it is nodulated by both non-photosynthetic *Bradyrhizobium*, and with photosynthetic strains which are also able to nodulate group III [3].

In the rhizobium-legume interaction, specificity is mainly controlled by Nod factors recognized by the host plant. All Nod factors are chitin oligomers mono N-acylated at the non reducing end and diversely substituted at both ends of the molecules by substitutions that confer plant-specificity. The various substitutions are encoded by host-specific *nod* genes the presence of which depends upon the bacterial strain or species. The synthesis of the N-acylated oligosaccharide core of the Nod factors is controlled by the *nodABC* genes, which are present in all rhizobia. The *nodA* gene, involved in the transfer of an acyl chain to the chitin oligosaccharide backbone Nod factor, has been shown to be a good nodulation marker [4].

In this study, we isolated and characterized the *nodA* genes of different photosynthetic and non-photosynthetic *Aeschynomene* rhizobia, and phylogenetically compared their sequence divergence. We found that the *nodA* gene sequence from photosynthetic bacteria was distant from that of the already described rhizobia and, therefore, we sequenced a 6,5 kb fragment containing the common nodulation gene *nodABC*. Here, we report the presence of a new insertion sequence element (IS) upstream of the *nodA* gene specific to group II photosynthetic strains.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

All the strains used are reported in table 1. The strains were cultured on YEM medium at 37°C. All strains were stored at -80°C on YEM medium adjusted to 20% (vol/vol) glycerol.

2.2. PCR amplification, DNA sequencing and sequence analysis

The *nodA* genes from group I and II non-photosynthetic *Bradyrhizobium* strains were amplified using the degenerated primers *nodAf.brad* (5'-GTYCAGTGGAGSSTKCGCTGGG-3')/*nodAr.brad* (5'-TCACARCTCKGGCCCGTTCCG-3') whereas the *nodA* genes from the photosynthetic strains were amplified using the degenerated primers *nodA1f* (5'-TGCRGTGGAARNTRBVYTGGA-3')/*nodAb1r* (5'-GGNCCGTCRTRCRAASGTCARGTA-3'). These four degenerate primers were defined from conserved motifs of NodA sequences available from the databanks. The primers *Isf* (5'-AGCCCAGCGACCTATTTAG-3') and *Isr* (5'-GCCTCGATGAAAGCATTGTC-3') which amplified a 822-bp fragment inside the Insertion Sequence identified in ORS285 were used to check for the presence of this IS element in the different *Aeschynomene* symbionts.

A touchdown PCR was performed for primer pairs *nodAf.brad/nodAr.brad* and *nodA1f/nodAb1r* (annealing temperature 60°C to 50°C in 20 cycles) as previously described [5]. For the primers pairs *Isf/Isr* (annealing temperature of 55°C), the standard PCR method was used. PCR products were purified with a QIAquick Gel extraction Kit (Qiagen, France). The ABI Prism BigDye Terminator Cycle sequence Kit (Applied Biosystems Foster City,

Calif.) was used to directly sequence the purified PCR with the primers used for the amplification. Sequencing reactions were analyzed on an Applied Biosystem model 310 DNA sequencer. An alignment was performed, using the program PILEUP [6], with a set of available NodA sequences. A phylogenetic tree was constructed by the Neighbor-Joining method [7], and a bootstrap confidence analysis was performed on 1000 replicates to determine the reliability of the tree topology so obtained [8].

2.3. Construction and screening of a genomic library of *Bradyrhizobium* ORS285.

Total DNA of *Bradyrhizobium* strain ORS285 was subjected to a partial digestion with *Sau3AI* and dephosphorylated by alkaline phosphatase treatment. Fragments were then ligated to SuperCos I *XbaI/BamHI* arms (Stratagene, La Jolla, Calif.) as instructed by the manufacturer. Ligated DNA was packaged by using the Gigapack III Gold packaging extract (Stratagene). Screening was performed by PCR using the primers nodA.sp.285.f (5'ACGCGCTCCCGTTCATGTCG-3')/nodA.sp.285r (5'-GAAATACAAGCACCAACGGC-3') which were designed from the *nodA* sequence of ORS285.

2.4. Nucleotide sequence accession number.

The DNA sequences of the common *nod* genes of ORS285 strain have been submitted to the GenBank database under accession number AF284858.

3. Results and discussion

The *nodA* genes of both photosynthetic and non-photosynthetic *Aeschynomene* nodulating rhizobia were first isolated by PCR. By using the degenerated primers nodAf.brad/nodAr.brad, products of the expected size were obtained from all tested non-photosynthetic *Bradyrhizobium* strains isolated from either group I (e.g. ORS301, ORS302, ORS304, ORS309) or group II (e.g. ORS336). In contrast, all photosynthetic strains nodulating *Aeschynomene* group II (e.g. ORS285, ORS287, ORS364) gave a positive amplification signal when using the degenerate primers nodA1f/nodAb1r. In spite of testing numerous primers defined from the consensus region of either NodA, or NodB or NodC, we did not succeed in isolating the common *nod* genes from group III photosynthetic strains.

These results indicate a great divergence of the symbiotic genes as compared with the other rhizobia, which could be related to the extreme narrow host-specificity of the group III photosynthetic strains.

Sequence analysis revealed that the *nodA* gene sequences from Groups I and II non-photosynthetic *Bradyrhizobium* tested strains are polymorphic with a percentage of similarity ranging from 73.78% to 96.62% at the DNA level. In contrast, the *nodA* gene sequences of the group II photosynthetic strains were found to be 100% identical, demonstrating that this symbiotic gene is very well conserved between these photosynthetic *Bradyrhizobium*. Phylogenetic NodA sequence analysis between the different rhizobia revealed that the *nodA* gene from the group II photosynthetic strains constituted a new branch, related but distinct from the other *Bradyrhizobium nodA* gene (Fig1). Sequence similarity of NodA from those photosynthetic strains with other NodA *Bradyrhizobium* species was low (63%). These data are in full agreement with previous phylogenetic studies which showed that photosynthetic *Aeschynomene* strains form an homogenous and distinct cluster [3], for which a new species should be proposed. Conversely, NodA sequences from the non-photosynthetic group I and II strains intertwined with the other species of *Bradyrhizobium* (Fig1), and the sequence similarity for this genus was high, ranging from 80% to 88%, thus confirming their taxonomic position within the *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* branches [4].

The high level of divergence of the NodA sequence of photosynthetic strains led us to characterized their complete common *nodABC* genes. Two specific primers *nodA.sp.285.f/nodA.sp.285r* based on *nodA* gene sequence were designed for the PCR screening of a DNA genomic library for strain ORS285 used as a model for group II photosynthetic *Bradyrhizobium*. A positive clone (pSTM75) which contained an insert of approximately 35-kb was used to characterize the common nodulation genes.

A 6.5-kb region in the inserted DNA fragment of the pSTM75 cosmid, showing a positive hybridization signal to the *nodA* gene used as probe, was sequenced and analyzed, as shown in Fig. 2. This nucleotide sequence had 4 open reading frames (ORFs) encoding proteins with similarity to known Nod Proteins (Fig. 2). Based on sequence similarities, 3 of these ORFs

located from position 3992 to 6407 were assigned to *nodA*, *nodB* and *nodC* genes which presented the same classical organization as already found for other rhizobia. The *nodB* sequence showed 62% to 61% homology with the other *Bradyrhizobium nodB* genes available in databanks, and the *nodC* sequenc, 63% homology with that of *Rhizobium* sp. strain N33 and 53% homology with the *nodC* gene of *Bradyrhizobium* sp. strain SNU001. The fourth ORF encoding a putative Nod protein was located from position 1746 to 617 and showed 55 % amino acid homology with the *noll* gene from *R. etli* (Fig. 2). The *noll* gene has been shown to be responsible for the acetylation of the fucosyl residue in the nodulation factor [9], which indicates that Nod factors of photosynthetic strains are fucosylated, as already found for all *Bradyrhizobium* studied so far [10-12]. Indeed, we have detected by PCR in strain ORS285 (data not shown) a sequence homologous to the *nodZ* gene which encodes a fucosyl transferase.

Interestingly, we did not find a *nodD* regulatory gene upstream of *nodA*, as usually described for most rhizobia. Instead, we found in the 2-kb region located between *nodA* and *noll*, an unexpected putative insertion element showing homology to IS sequences belonging to the IS3 family [13]. The analysis of this IS sequence revealed the presence of two ORFs, *OrfA* and *OrfB* (Fig. 2). The *OrfA*, starting with an ATG, encoded a putative protein of 88-aa and showed a strong homology to, a putative transposase identified in *Yersinia pestis* (59% of identity), the *OrfA* of ISD, an insertion element found in *Desulfovibrio vulgaris* (50% of identity) [14], the *OrfA* of IS1222 from *Enterobacter agglomerans* (48 % of identity) [15], and also other members of the IS3 family. The *OrfB*, for which the proposed start codon overlapped the stop codon of *OrfA*, encoded a putative protein of 244-aa and also showed homology to the same insertion sequences of the IS3 family. The greatest homologies found were 41% identity with the *Yersinia pestis* putative transposase, and 38% and 32% identity with the *OrfBs* of IS1222 [14] and ISD1 [15], respectively.

The distribution of this IS element among *Aeschynomene* rhizobia was investigated by PCR. All of the photosynthetic strains from group II, and only those, gave an amplified fragment of the expected size, indicating that this IS elements is specific to this group of photosynthetic

Bradyrhizobium. IS elements have been identified as mobile DNA elements in the genome of a wide range of bacterial genera and species [13]. They have been postulated to play an important role in the evolution and adaptation of bacteria. They have been also identified inside or flanking the symbiotic gene [16-17] where they could play an important role in the generation of nodulation polymorphism and consequently in the evolution of different symbiotic phenotypes. Therefore, we can hypothesis that the transposition events within nodulation genes could have played a role, either by gene rearrangement or gene transfer, in the adaptation of photosynthetic bacteria to *Aeschynomene* stem-nodulation.

Acknowledgements.

This work was supported in part by CNRS (Dynamique de la Biodiversité et Environnement). C. Chaintreuil is indebted to IRD for a doctoral grant.

References

- [1] Fleischman, D. and Kramer, D. (1998) Photosynthetic rhizobia. *Biochim. Biophys. Acta* 1364, 17-36.
- [2] Alazard, D. (1985) Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 732-734.
- [3] Molouba, F., Lorquin, J., Willems, A., Hoste, B., Giraud, E., Dreyfus, B., Gillis, M., de Lajudie, P. and Masson-Boivin, C. (1999) Photosynthetic Bradyrhizobia from *Aeschynomene* spp. are specific to stem nodulated species and form a separate 16S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group. *Appl. Environ. Microbiol.* 6, 3084-3094.
- [4] Boivin, C. and Giraud E. (1999) Molecular symbiotic characterization of rhizobia: towards a polyphasic approach using Nod factors and *nod* genes. p 295-299. In: *Highlights of Nitrogen Fixation Research*. Martinez E. and Hernandez G., eds. Plenum Publishing Corporation.

-
- [5] Hannibal, L., Lorquin, J., Angles d'Ortoli, N., Garcia, N., Chaintreuil, C., Masson-Boivin, C., Dreyfus, B. and Giraud, E. (2000) Characterization of Canthaxanthin Biosynthesis Genes from the Photosynthetic Bacterium *Bradyrhizobium* sp. Strain ORS278. *J. Bacteriol.* 182: 3850-3853.
- [6] Devereux, J., Haeberli, P. and Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12, 387-395.
- [7] Saitou, R. R. and Nei, M. (1987) A neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 44, 406-425.
- [8] Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- [9] Corvera, A., Promé, D., Promé, J.C., Martinez-Romero, E. and Romero, D. (1999) The *nolL* gene from *Rhizobium elti* determines nodulation efficiency by mediating the acetylation of the fucosyl residue in the nodulation factor. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 236-246.
- [10] Carlson, R. W., Sanjuan, J., Bhat, U. R., Glushka, J., Spaink, H. P., Wijfjes, A. H. M., van Brussel, A. A. N., Stokkermans, T. J. W., Peters, N. K. and Stacey, G. (1993) The structures and biological activities of the lipo-oligosaccharide nodulation signals produced by type-1 and type-2 strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Biol. Chem.* 268, 18372-18381.
- [11] Sanjuan, J., Carlson, R. W., Spaink, H. P., Baht, U. R., Barbour, W. M., Glushka, J. and Stacey, G. (1992) A 2-*O*-methylfucose moiety is present in the lipo-oligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8789-8793.
- [12] Ferro, M., et al. Personal communication.
- [13] Mahillon, J., and Chandler, M. (1988) Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 725-774.

- [14] Fu, R. and Voordouw, G. (1998) ISD1, an insertion element from the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: structure, transposition, and distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 53-61.
- [15] Steibl, H. D. and Lewecke, F. M. (1995) IS1222: analysis and distribution of a new insertion sequence in *Enterobacter agglomerans* 339. *Gene* 156, 37-42.
- [16] Biondi, E.G., Fancelli, S. and Bazzicalupo, M. (1999) ISRm10: a new insertion sequence of *Sinorhizobium meliloti*: nucleotide sequence and geographic distribution. *FEMS Microbiol. Lett.* 181, 171-176.
- [17] Schedock, J. and Long, S. R. (1994) An open reading frame downstream of *Rhizobium meliloti* nodQ1 shows nucleotide sequence similarity to an *Agrobacterium tumefaciens* insertion sequence. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7, 151-153.

LEGENDS

Table 1. Characteristics of the strains used in this work.

Figure 1. Phylogenetic tree based on the NodA sequences using the Neighbor-joining method. Bootstrap values, expressed as percentages of 1000 replications, are given at the branching points. Numbers, in parentheses, are the accession numbers of the sequences used. The NodA sequence of the *Bradyrhizobia* belonging to group I and II (presented in bold) are available upon request. The NodA sequence from *B. japonicum* USD110 was kindly provided by Tomasz Stepkowski. The bar represents one estimated substitution per 100 nucleotide positions.

*, Photosynthetic strain.

GI, Group I.

GII, Group II.

Figure 2. Physical map of the common nodulation gene region in *Bradyrhizobium* sp. strain ORS285.

1 % estimated substitutions

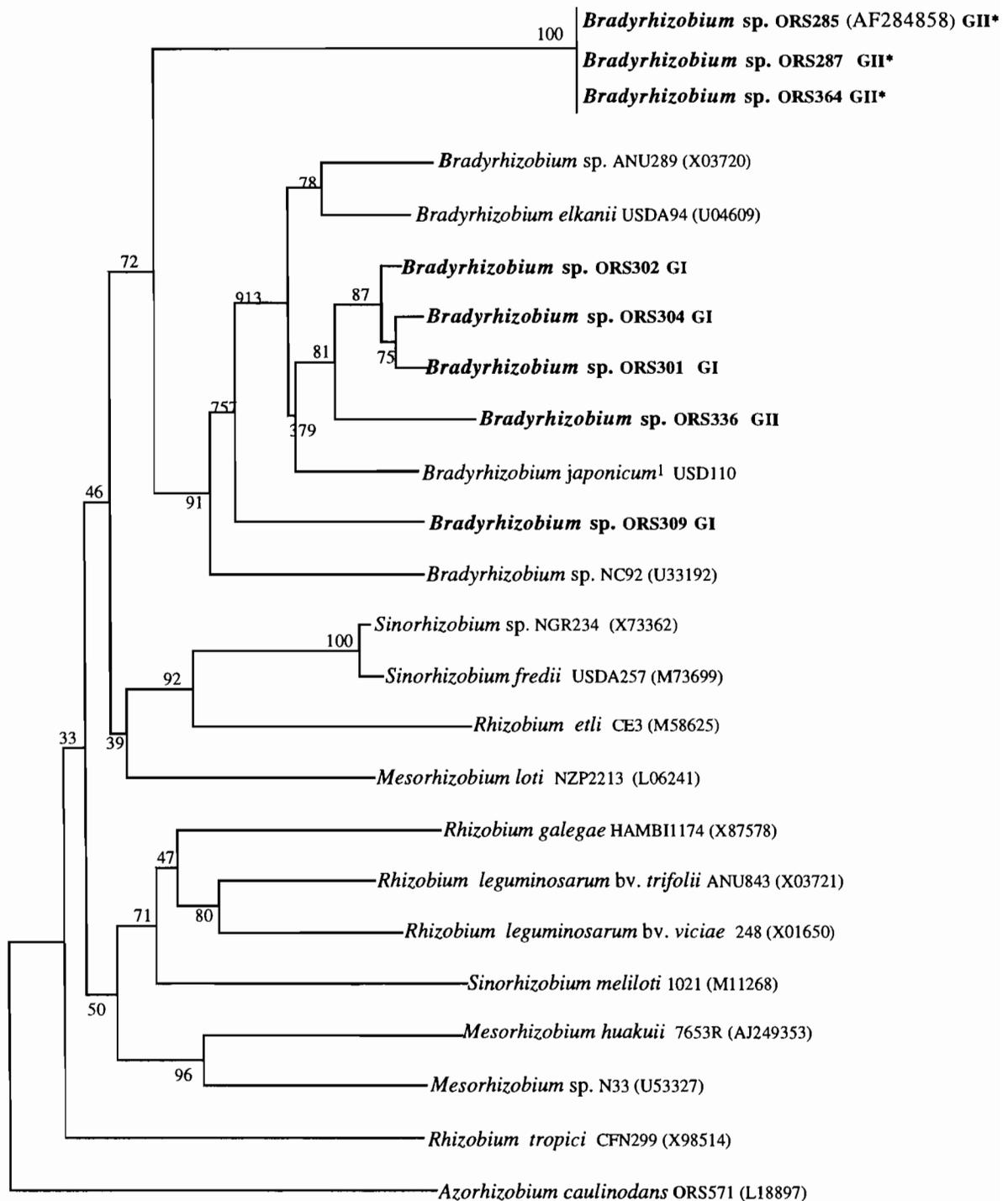


Figure 1. Phylogenetic tree based on the NodA sequences using the Neighbor-joining method.

Bacterial strain	Original host plant	Group	Photosynthetic character	Reference
ORS301	<i>A. americana</i>	I	-	[2]
ORS302	<i>A. pfundii</i>	I	-	[2]
ORS304	<i>A. elaphroxylon</i>	I	-	[2]
ORS309	<i>A. uniflora</i>	I	-	[3]
ORS285	<i>A. afraspera</i>	II	+	[3]
ORS287	<i>A. afraspera</i>	II	+	[3]
ORS336	<i>A. afraspera</i>	II	-	[3]
ORS364	<i>A. nilotica</i>	II	+	[3]

Table 1. Characteristics of the strains used in this work.

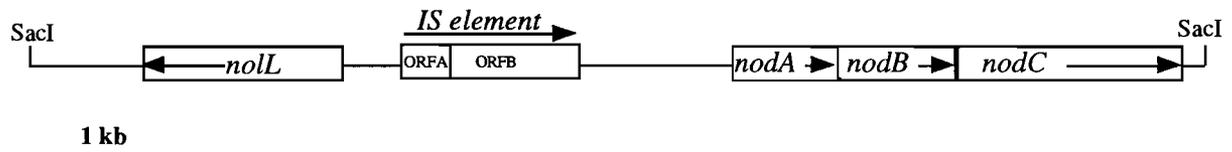


Figure 2. Physical map of the common nodulation gene region in *Bradyrhizobium* sp. strain ORS285.

Isolation and Characterization of Canthaxanthin Biosynthesis Genes from the Photosynthetic Bacterium *Bradyrhizobium* sp. Strain ORS278

LAURE HANNIBAL,¹ JEAN LORQUIN,^{2†} NICOLAS ANGLES D'ORTOLI,¹ NELLY GARCIA,¹
CLEMENCE CHAINTREUIL,¹ CATHERINE MASSON-BOIVIN,¹ BERNARD DREYFUS,¹
AND ERIC GIRAUD^{1*}

Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, IRD, CIRAD, AGRO-M, INRA, 34398 Montpellier, France,¹ and Laboratoire de Microbiologie des sols, IRD/ISRA, 1386 Dakar, Senegal²

Received 2 February 2000/Accepted 17 April 2000

A carotenoid biosynthesis gene cluster involved in canthaxanthin production was isolated from the photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278. This cluster includes five genes identified as *crtE*, *crtY*, *crtI*, *crtB*, and *crtW* that are organized in at least two operons. The functional assignment of each open reading frame was confirmed by complementation studies.

Bradyrhizobium strains isolated from *Aeschynomene* stem nodules are photosynthetic (4; see reference 6 for a review), which is a rare trait in *Rhizobium* bacteria. These strains exhibit a photoheterotrophic and strictly aerobic photosynthesis (6; A. Vermiglio, personal communication). In culture, most of these stem isolates show the same pink coloration, while a few strains produce orange pigmentation (12, 16). Pigment analyses showed that bacteriochlorophyll and spirilloxanthin, two pigments of the light harvesting system, are common to all of these photosynthetic *Bradyrhizobium* strains, whereas orange strains produce an additional bicyclic carotenoid, canthaxanthin (4,4'-diketo- β -carotene) (12). This was the first report on the presence of this carotenoid in photosynthetic bacteria. *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278 produces the highest quantity of canthaxanthin of all tested photosynthetic bacteria; canthaxanthin represents 85% of its total carotenoid content (12).

Contrary to anaerobic purple phototrophic bacteria, aerobic phototrophic bacteria synthesize an unusually diverse variety of carotenoids, including photosynthetic carotenoids such as spirilloxanthin or spheroidenone, and often a large amount of bicyclic carotenoid (β -carotene and hydroxyl derivatives) (24; see reference 26 for a review). These carotenoids were shown to not be bound to the photosynthetic apparatus of these aerobic bacteria (17, 27) and their function is still unclear—they could have a protective role against photo-oxidative damage, as already observed for several carotenoids (19, 25).

Synthetic canthaxanthin is applied for both direct and indirect food coloring (10, 23). In cosmetology and pharmacology, it is also combined with β -carotene for use as a dermal photoprotector (8). Canthaxanthin is, therefore, a pigment of high economic value, but its level in *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278 (1.43 mg/g of dry cell weight) remains insufficient for this organism to be a realistic candidate for natural canthaxanthin production (12). However, it could be possible to enhance the production of canthaxanthin by cloning carotenoid biosynthesis genes of this strain.

In this paper, we describe the cloning and characterization

of the canthaxanthin gene cluster of *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278.

Isolation of a carotenoid gene cluster. The genes *crtB* and *crtI*, encoding, respectively, phytoene synthase and phytoene desaturase, two enzymes involved in the initial steps of carotenoid biosynthesis (Fig. 1), have been isolated and characterized in various microorganisms (1, 9, 11, 14, 15, 21). In all of these cases, these genes were found to be adjacent and oriented in the same direction. Comparison of the deduced amino

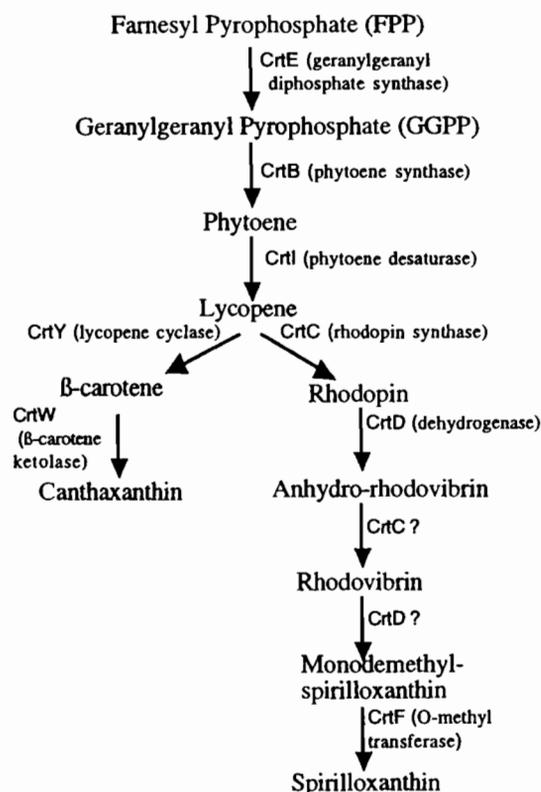


FIG. 1. Scheme of the canthaxanthin (15) and spirilloxanthin (20) biosynthesis pathways.

* Corresponding author. Mailing address: LSTM TA 10/J, Campus de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France. Phone: (33) 467593783. Fax: (33) 467593802. E-mail: Giraud@mpl.ird.fr.

† Present address: IRD, Université de Provence, 13288 Marseille, France.

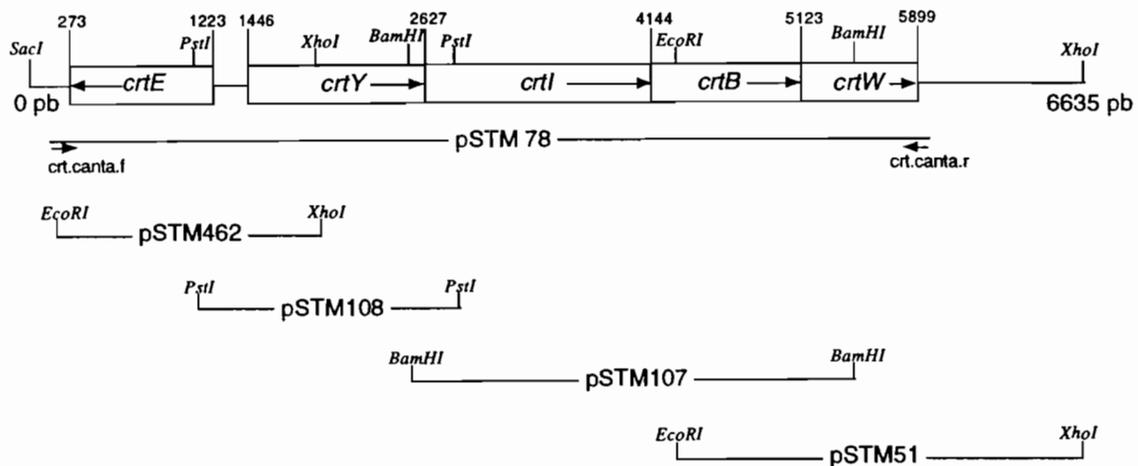


FIG. 2. Organization of the canthaxanthin biosynthesis gene cluster of *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278 and locations of various subcloned fragments. The restriction fragments are inserted into pUC18 (pSTM108, pSTM107, and pSTM51) or pUC19 (pSTM462), the *crt* genes are transcribed from the *lac* promoter of the vector. In the plasmid pSTM78, the insert was obtained by Long PCR using the primers *Crt.canta.f* (5'-GCAACCGGTACCCGAGTTAATTCGCTCGGAATG-3') and *Crt.canta.r* (5'-ATGGTGAAGCTTATGCGGCAGCGGGTTAGTC-3') and was cloned into pGEM-T (Promega). In pSTM78, the *crtY*, *crtI*, *crtB*, and *crtW* genes are under *lac* promoter control.

acid sequences of the CrtI and CrtB proteins from *Erwinia uredovora*, *Erwinia herbicola*, *Flavobacterium* sp. strain ATCC 21588, *Rhodobacter sphaeroides*, and *Agrobacterium aurantiacum* revealed well-conserved domains at the C-terminal end of CrtI (LVGAGTHPG) and in the central region of CrtB (QLTNIARD). These motifs were chosen for designing the degenerated primers CrtIf (5'-GTNGGNGCRGGCACNCA YCC-3') and CrtBr (5'-TCGCGRGCRATRTTSGTSARRTG-3'). PCR amplification was performed with a Perkin-Elmer model 2400 thermocycler in a 50- μ l (total volume) reaction mixture containing 100 ng of strain ORS278 genomic DNA, each deoxynucleotide triphosphate (200 μ M), primers (0.8 μ M each), MgCl₂ (1.5 mM), 1.25 U of *Taq* DNA polymerase (Promega, Charbonnières, France), and the buffer supplied with the enzyme. A touchdown PCR (3) was done as follows: initial denaturation at 94°C for 5 min followed by 20 cycles consisting of a 30-s denaturation at 94°C, 30 s at an annealing temperature of 60 to 50°C, and a 1-min primer extension at 72°C, followed by 15 cycles consisting of a 30-s denaturation at 94°C, 30 s at an annealing temperature at 50°C, and a 1-min primer extension at 72°C. After the final elongation step at 72°C for 7 min, the amplified 620-bp fragment obtained (probe A) was purified by a Wizard procedure and was ligated into a pGEM-T vector (Promega). The ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) was used to sequence the cloned PCR product with the universal oligonucleotides M13 forward and M13 reverse. Sequencing reactions were analyzed on an Applied Biosystems model 310 DNA sequencer. The sequence of the amplified 620-bp fragment was highly similar to known CrtB sequences at the amino acid level.

Two specific primers, CrtIBfow.ORS278 (5'-ATTCGCAGC GGCTCGAAGAG-3') and CrtIBrev.ORS278 (5'-GATCGCC GACATCATCAGC-3'), based on the sequence of the amplified DNA fragment, were designed for PCR screening of a library of the ORS278 strain constructed with the SuperCos I cosmid vector kit (Stratagene, La Jolla, Calif.), as instructed by the manufacturer. Four positive clones were isolated and confirmed by Southern blot analysis by using the 620-bp fragment as a probe. Clone pSTM73, containing an insert of approximately 35 kb, was used to characterize this *crt* gene cluster.

Structure of the canthaxanthin *crt* gene cluster. A 6.5-kb region in the inserted DNA fragment of the pSTM73 cosmid, showing a positive hybridization signal to probe A, was sequenced and analyzed as shown in Fig. 2. This nucleotide sequence had five open reading frames (ORFs) encoding proteins with similarity to known Crt enzymes (Fig. 3). Based on sequence similarity (45% amino acid identity with CrtY of *E. herbicola*), one of these ORFs was assigned to a *crtY* gene which encodes lycopene cyclase, a key enzyme that converts lycopene into the cyclic carotenoid β -carotene. Another ORF was similar in sequence to a *crtW* gene encoding a β -carotene ketolase that synthesizes canthaxanthin from β -carotene via echinenone (15). This indicated that we had isolated a *crt* gene cluster involved in canthaxanthin biosynthesis. Four of the five ORFs, identified as *crtY*, *crtI*, *crtB*, and *crtW*, were found to be clustered in this order in the same orientation, whereas the ORF *crtE* preceded these four but was oriented in the opposite direction (Fig. 2). The *crtY*, *crtI*, and *crtB* genes are closely linked physically; i.e., the stop codons of *crtY* and *crtI* overlap the start codon of the following ORF, suggesting that these

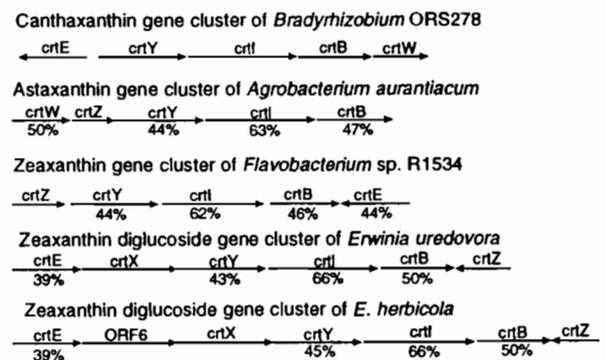


FIG. 3. Comparison of the organization of the cyclic carotenoid gene clusters of *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278, *A. aurantiacum* (15), *Flavobacterium* sp. strain R1534 (21), *E. uredovora* (14), and *E. herbicola* (9). Arrows represent the orientations of ORFs. The percentage values below the genes indicate the percentages of amino acid identity compared to *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278.

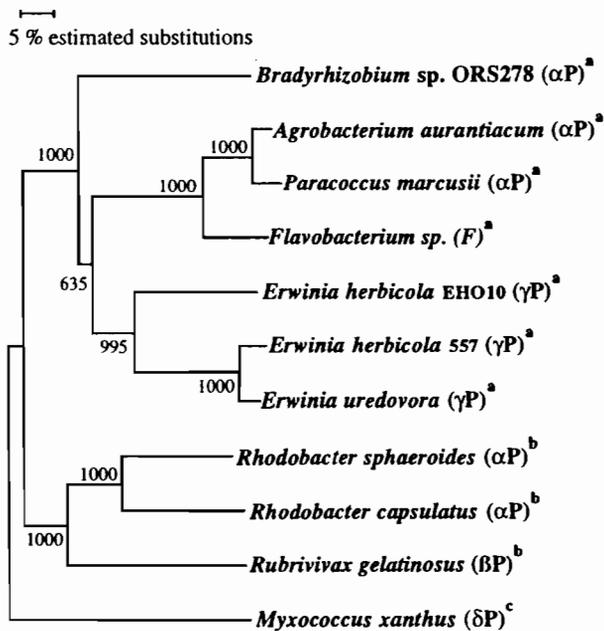


FIG. 4. Phylogenetic tree based on the CrtB sequences and constructed by using the neighbor-joining method (22). Bootstrap values (5), expressed as percentages of 1,000 replications, are given at the branching points. P, *Proteobacteria*; F, *Flavobacteria*; a, bicyclic carotenoid; b, acyclic carotenoid; c, monocyclic carotenoid. GenBank accession numbers are as follows: AF218415, *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278; D58420, *A. aurantiacum*; Y15112, *Paracoccus marcusii*; U62808, *Flavobacterium* sp.; M87280, *E. herbicola* EHO10; M90698, *E. herbicola* 557; D90087, *E. uredovora*; AF195122, *R. sphaeroides*; X52291, *Rhodobacter capsulatus*; U87626, *Rubrivivax gelatinosus*; Z211955, *Myxococcus xanthus*.

genes are translationally coupled (18). Note that the *crtY*, *crtI*, and *crtB* genes always occurred in this order and were oriented in the same direction in the other cyclic carotenoid biosynthesis clusters described previously (see Fig. 3).

Phylogenetic trees were constructed with available CrtI and CrtB sequences. The CrtB proteins (Fig. 4) and the CrtI proteins (data not shown) formed two distinct clusters which do

not correlate with the taxonomical position of the strains, but rather with the nature of the carotenoid (cyclic or noncyclic) synthesized under the control of *crtI* and *crtB*. The fact that α - and γ -*Proteobacteria* and *Flavobacteria* group in the same cluster (Fig. 4) suggests that lateral gene transfer has occurred between these phylogenetically unrelated bacteria. Moreover, the fact that strain ORS278 genes are clustered with *crtI* and *crtB* genes from nonphotosynthetic strains producing cyclic carotenoids rather than with photosynthetic strains producing photosynthetic carotenoids raises the question of whether an additional copy of the *crtI* and *crtB* genes involved in the biosynthesis of spirilloxanthin does exist. The *crtC* and *crtD* genes, which were reported to be involved in the biosynthesis of spirilloxanthin from lycopene (20), have just been isolated in another cosmid which did not overlap the pSTM73 cosmid (*E. Giraud and B. Dreyfus*, unpublished data). We are currently investigating if another copy of the *crtI* and *crtB* genes is physically linked to these *crtC* and *crtD* genes, as has been found in photosynthetic bacteria (1, 11).

Carotenoid production in *Escherichia coli* transformants. *E. coli* transformants carrying the entire *crt* gene cluster of canthaxanthin from strain ORS278, cloned in pGEMT (pSTM78) or SuperCosI (pSTM73), did not produce any carotenoids (Table 1), suggesting that these genes are not expressed or that their products are not functional in *E. coli*. Misawa et al. (15) constructed *E. coli* transformants which accumulate each precursor of the zeaxanthin biosynthesis pathway by introducing various combinations of *E. uredovora crt* genes. To check the functionality of the different ORFs identified in strain ORS278, we complemented several carotenoid-accumulating *E. coli* transformants with plasmids carrying various *crt* genes of strain ORS278 and analyzed carotenoids synthesized by high-pressure liquid chromatography (Table 1). The conditions were as follows: 5- μ m Hypersil C₁₈ column (250 by 4.6 mm; Alltech, Templemars, France), eluent of acetonitrile-methanol-isopropanol (85/10/5, vol/vol/vol), flow rate of 1 ml/min, and detection at 470 nm (450 nm for β -carotene). Peaks were compared and coeluted with standard compounds then identified by their visible spectra and partition coefficients (12).

When plasmid pSTM78 carrying the complete *crt* cluster

TABLE 1. Analysis of carotenoids accumulated in *E. coli* transformants carrying various combinations of *crt* genes from *E. uredovora* and *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278^a

<i>E. coli</i> host strain characteristics		<i>E. coli</i> transformant characteristics after complementation	
Plasmid (<i>crt</i> genes of <i>E. uredovora</i> carried)	Carotenoid accumulated ^d	Plasmid introduced ^d (<i>crt</i> genes of ORS278 carried)	Carotenoid accumulated ^{d,f}
None	— ^g	pSTM73 (<i>crtE crtY crtI crtB crtW</i>)	—
None	—	pSTM78 (<i>crtE crtY crtI crtB crtW</i>)	—
pACCRT-E ^b (<i>crtE</i>)	GGPP	pSTM78 (<i>crtE crtY crtI crtB crtW</i>)	Canthaxanthin (100%) [95.4]
pSTM420 (<i>crtI crtB crtY</i>)	—	pSTM462 (<i>crtE</i>)	β -Carotene (98%), nic ^h (2%)
pACCRT-E ^b (<i>crtE</i>)	GGPP	pSTM107 (<i>crtI crtB</i>)	Lycopene (100%)
pACCRT-EB ^b (<i>crtE crtB</i>)	Phytoene	pSTM107 (<i>crtI crtB</i>)	Lycopene (100%)
pACCRT-EIB ^b (<i>crtE crtI crtB</i>)	Lycopene	pSTM108 (<i>crtY</i>)	β -Carotene (100%)
pACCRT-EIBY ^b (<i>crtE crtI crtB crtY</i>)	β -Carotene	pSTM51 (<i>crtW</i>)	Canthaxanthin (90%) [800], echinenone (2%), nic (8%)

^a Transformants were grown in Luria-Bertani medium for 36 h in the presence of ampicillin (50 μ g/ml), chloramphenicol (30 μ g/ml), and 0.125 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside. The carotenoids were extracted according to the method of Lorquin et al. (12).

^b The plasmids used were described by Misawa et al. (15). Plasmid pSTM420 was obtained after deletion by *Sa*I digestion of the *crtE* gene from the plasmid pACCRT-EIBY.

^c The carotenoids found in *E. coli* host strains are in accordance with the findings of Misawa et al. (15).

^d Details on insertion of the various constructed plasmids are presented in Fig. 2.

^e The percentage of the accumulated carotenoid of the total carotenoid content is indicated in parentheses.

^f In square brackets, total (*cis* plus *trans*) canthaxanthin level is indicated in micrograms per gram of dry cell weight.

^g —, carotenoids not detected.

^h nic, nonidentified compound.

of *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278 was introduced into the *E. coli* transformant that had accumulated geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) as a result of the presence of the *crfE* gene of *E. uredoovora*, the new transformant obtained was shown to accumulate canthaxanthin. This result indicates that the *crfY*, *crfI*, *crfB*, and *crfW* genes are functional and allow the production of canthaxanthin in *E. coli*. Nevertheless, the amount of canthaxanthin produced remains lower than in the wild-type strain ORS278. When plasmid pSTM462 carrying the *crfE* gene of *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278 under the *lac* promoter was introduced into an *E. coli* transformant containing the *crfI*, *crfB*, and *crfY* genes of *E. uredoovora*, the new transformant accumulated β -carotene, showing the functionality of the *crfE* gene.

In this study, we cloned and characterized all of the *crf* genes of *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278 necessary for canthaxanthin biosynthesis. This is the first report of a cyclic carotenoid biosynthesis gene cluster in a photosynthetic bacterium. It would be interesting to determine the genetic links of this canthaxanthin *crf* gene cluster to the photosynthetic gene cluster. In *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278, canthaxanthin production is stimulated by light (13), suggesting that the expression of canthaxanthin biosynthesis genes is regulated by photoinduction, as already reported for other pigments in different organisms (2, 7). Production of this pigment could be optimized by identifying the signal transduction system controlling canthaxanthin biosynthesis. However, characterization of the entire *crf* gene cluster necessary for canthaxanthin biosynthesis already provides a basis for the construction of a recombinant strain that could overproduce this carotenoid.

Nucleotide sequence accession number. The DNA sequence obtained in this study has been deposited in the GenBank database under accession no. AF218415.

We thank N. Misawa for kindly providing the plasmids carrying the *crf* genes of *E. uredoovora* used in this study.

REFERENCES

- Armstrong, A. G., M. Alberti, F. Leach, and J. E. Hearst. 1989. Nucleotide sequence, organization, and nature of the protein products of the carotenoid biosynthesis gene cluster of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Gen. Genet.* **216**: 254–268.
- Bramley, P. M., and A. Mackenzie. 1988. Regulation of carotenoid biosynthesis. *Curr. Top. Cell Regul.* **29**:291–343.
- Don, R. H., P. T. Cox, B. Wainwright, K. Baker, and J. S. Mattick. 1991. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* **19**:4008.
- Eaglesham, A. R. J., J. M. Ellis, W. R. Evans, D. E. Fleischman, M. Hungria, and R. W. F. Hardy. 1990. The first photosynthetic N_2 -fixing Rhizobium: characteristics, p. 805–811. In P. M. Gresshoff, L. E. Roth, G. Stacey, and W. L. Newton (ed.), *Nitrogen fixation: achievements and objectives*. Chapman and Hall, New York, N.Y.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783–791.
- Fleischman, D., and D. Kramer. 1998. Photosynthetic rhizobia. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**:17–36.
- Fontes, M., R. Ruiz-Vázquez, and F. J. Murillo. 1993. Growth phase dependence of the activation of a bacterial gene for carotenoid synthesis by blue light. *EMBO J.* **12**:1265–1275.
- Goralczyk, R., S. Buser, J. Bausch, W. Bee, U. Zühlke, and F. M. Barker. 1997. Occurrence of birefringent retinal inclusions in cynomolgus monkeys after high doses of canthaxanthin. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **38**:741–752.
- Hundle, B., M. Alberti, V. Nivelstein, P. Beyer, H. Kleinig, G. A. Armstrong, D. H. Burke, and J. E. Hearst. 1994. Functional assignment of *Erwinia herbicola* Eho10 carotenoid genes expressed in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **245**:406–416.
- Kläui, H. 1982. Industrial and commercial uses of carotenoids, p. 309–328. In G. Britton and T. W. Goodwin (ed.), *Carotenoid chemistry and biochemistry*. Pergamon Press, Inc., Oxford, England.
- Lang, H. P., R. J. Cogdell, A. T. Gardiner, and C. N. Hunter. 1994. Early steps in carotenoid biosynthesis: sequence and transcriptional analysis of *crfI* and *crfB* genes of *Rhodobacter sphaeroides* and overexpression and reactivation of *crfI* in *Escherichia coli* and *R. sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **176**:3859–3869.
- Lorquin, J., F. Molouba, and B. L. Dreyfus. 1997. Identification of the carotenoid canthaxanthin from photosynthetic *Bradyrhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1151–1154.
- Lorquin, J., F. Molouba, N. Dupuy, S. Ndiaye, D. Alazard, M. Gillis, and B. L. Dreyfus. 1993. Diversity of photosynthetic *Bradyrhizobium* strains from stem nodules of *Aeschynomene* species, p. 683–689. In R. Palacios, J. Mora, and W. E. Newton (ed.), *New horizons in nitrogen fixation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Misawa, N., M. Nagakawa, K. Kobayashi, S. Yamano, Y. Izawa, K. Nakamura, and K. Harashima. 1990. Elucidation of the *Erwinia uredoovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**:6704–6712.
- Misawa, N., Y. Satomi, K. Kondo, A. Yokoyama, S. Kajiwara, T. Saito, T. Ohtani, and W. Miki. 1995. Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J. Bacteriol.* **177**:6575–6584.
- Molouba, F., J. Lorquin, A. Willems, B. Hoste, E. Giraud, B. Dreyfus, M. Gillis, P. de Lajudie, and C. Masson-Boivin. 1999. Photosynthetic bradyrhizobia from *Aeschynomene* spp. are specific to stem nodulated species and form a separate 16S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3084–3094.
- Noguchi, T., H. Hayashi, K. Shimada, S. Takaichi, and M. Tasumi. 1992. *In vivo* states and function of carotenoids in an aerobic photosynthetic bacterium, *Erythrobacter longus*. *Photosynth. Res.* **31**:21–30.
- Oppenheim, D. S., and C. Yanofsky. 1980. Translational coupling during expression of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Genetics* **95**:785–795.
- Ouchane, S., M. Picaud, C. Vernotte, and C. Astier. 1997. Photooxidative stress stimulates illegitimate recombination and mutability in carotenoid-less mutants of *Rubrivivax gelatinosus*. *EMBO J.* **16**:4777–4787.
- Ouchane, S., M. Picaud, C. Vernotte, F. Reiss-Husson, and C. Astier. 1997. Pleiotropic effects of *puf* interposon mutagenesis on carotenoid biosynthesis in *Rubrivivax gelatinosus*. *J. Biol. Chem.* **272**:1670–1676.
- Pasamontes, L., D. Hug, M. Tessier, H. P. Hohmann, J. Schierle, and A. P. G. M. van Loon. 1997. Isolation and characterization of the carotenoid biosynthesis genes of *Flavobacterium* sp. strain R1534. *Gene* **185**:35–41.
- Saitou, R. R., and M. Nei. 1987. A neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406–425.
- Simpson, K. L., T. Katayama, and C. O. Chichester. 1981. Carotenoids in fish feeds, p. 463–538. In J. C. Bauernfeind (ed.), *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors*. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
- Takaichi, S., K. Shimada, and J. I. Ishidzu. 1990. Carotenoids from the aerobic photosynthetic bacterium, *Erythrobacter longus*: β -carotene and its hydroxyl derivatives. *Arch. Microbiol.* **153**:118–122.
- Tuveson, R. W., R. A. Larson, and J. Kagan. 1988. Role of cloned carotenoid genes expressed in *Escherichia coli* in protecting against inactivation by near-UV light and specific phototoxic molecules. *J. Bacteriol.* **170**:4675–4680.
- Yurkov, V. V., and J. T. Beatty. 1998. Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:695–724.
- Yurkov, V. V., N. Gad'on, and G. Drews. 1993. The major part of polar carotenoids of the aerobic bacteria *Roseococcus thiosulfatophilus*, RB3 and *Erythromicrobium ramosum*, E5 is not bound to the bacteriochlorophyll a complexes of the photosynthetic apparatus. *Arch. Microbiol.* **160**:372–376.

ABSTRACT

We have shown for the first time that rhizobia, bacteria which usually form nitrogen-fixing nodules on roots of leguminous plants, are also endophytic bacteria of the wild rice *Oryza breviligulata*. This rice species is growing in temporary ponds of West Africa and is considered to be the ancestor plant of *O. glaberrima*, the african cultivated rice species.

Using molecular characterization methods, we identified these endophytic rhizobia as photosynthetic *Bradyrhizobium*, a species up to now known to form stem nodules on two species of aquatic legumes, *Aeschynomene indica* et *A. sensitiva* which growth in the same waterlogged soils as *O. breviligulata*. We have characterized and sequenced the nitrogen fixation genes (*nif* genes) of these photosynthetic *Bradyrhizobium*, which are able to use light as energy.

We also evaluated the ability of the photosynthetic *Bradyrhizobium* to colonize the roots of *O. breviligulata* by using a *LacZ* ORS278 tagged strain. Results showed a specific attachment of the strain to the cells of the root cap, followed by an intense colonization of the root surface and a deep intercellular penetration.

Photosynthetic *Bradyrhizobium* strains were inoculated to several cultivated rice species (*O. sativa*, *O. glaberrima*) both in glasshouse and in the field. In Guinea (West Africa) paddy fields, we observed an important positive effect of inoculation by strain ORS278 of the rice growth in nurseries. The length of roots was increased by 55%, and both the stem height and the width of the stem base by 25%. The increase of the rice growth appears to result from the production of phyto-hormones by the photosynthetic *Bradyrhizobium*, and not from nitrogen supply to rice through nitrogen fixation.

Keywords : *Oryza breviligulata*, photosynthetic *Bradyrhizobium*, rice bacterial endophytes, PGPR bacteria, rice inoculation.

RESUME

Nous avons montré pour la première fois que des rhizobiums, bactéries qui forment habituellement des nodules fixateurs d'azote sur les racines des plantes de la famille des légumineuses étaient également des bactéries endophytes associées aux racines du riz sauvage *Oryza breviligulata*. Cette espèce pousse dans les mares temporaires d'Afrique de l'Ouest du Sénégal à la Guinée et est considérée comme l'ancêtre du riz africain cultivé *O. glaberrima*. En utilisant des méthodes de caractérisation moléculaire, ces rhizobiums endophytes du riz ont été identifiés comme des *Bradyrhizobia* photosynthétiques, des souches qui étaient jusqu'à présent connue pour former des nodules de tiges sur deux espèces de légumineuses aquatiques, *Aeschynomene indica* et *A. sensitiva* qui poussent dans les mêmes biotopes qu'*O. breviligulata*. Ces *Bradyrhizobia* photosynthétiques sont capables d'utiliser la lumière comme source d'énergie, et nous avons caractérisé et séquencé leurs gènes de fixation de l'azote (gènes *nif*). Nous avons également évalué la capacité de colonisation *in vitro* des racines du riz par les *Bradyrhizobium* en utilisant une souche *lacZ* marquée de la souche type ORS278. Les résultats de cette étude cytologique montrent un attachement spécifique précoce du *Bradyrhizobium* aux cellules de la coiffe suivie d'une colonisation intense de la surface et des espaces intercellulaires. Le cytoplasme de quelques cellules du cortex de la racine est envahi par les bactéries mais, ces cellules ne se multiplient pas. Les *Bradyrhizobium* photosynthétiques ont été inoculés à plusieurs espèces de riz cultivés (*O. sativa*, *O. glaberrima*) en serre et au champ afin de mesurer l'effet de l'inoculation sur le riz. Dans des rizières de Guinée, on observe un effet positif très important de l'inoculation sur la croissance du riz en pépinière, en particulier sur système racinaire qui gagne 55% en longueur et la base de la tige 25% en largeur. L'augmentation de la croissance du riz semble être le résultat d'une production de phytohormones par le *Bradyrhizobium* photosynthétique, et non d'un apport d'azote par la fixation biologique de l'azote.

MOTS-CLES : *Oryza breviligulata*, *Bradyrhizobium* photosynthétiques, Endophytes du riz, bactéries PGPR, inoculation du riz.

DISCIPLINE : Développement et Adaptation des Plantes.

INTITULÉ ET ADRESSE DU LABORATOIRE DE RATTACHEMENT

Institut de Recherche pour le Développement

Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes

IRD, INRA, AGRO-M, CIRAD

TA10/J

Campus International de Baillarguet

34398 Montpellier cedex 5.
