

THESE
présentée

devant L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention

du **DIPLÔME DE DOCTORAT**

(arrêté du 30 mars 1992)

Spécialité : Ecologie Microbienne

Présentée et soutenue publiquement le

16 Mars 2001

Par

Abdoulaye SY

**CARACTERISATION DE *METHYLOBACTERIUM NODULANS* :
UNE NOUVELLE ESPECE BACTERIENNE NODULANT LES CROTALAIRES**

Directeur de thèse : M. Bernard DREYFUS

JURY

M. Philippe NORMAND	Directeur de Recherches - CNRS, Lyon	Président
M. Frans DE BRUIJN	Directeur de Recherches - CNRS, Toulouse	Rapporteur
Mme. Monique GILLIS	Professeur - Université de Gand, Belgique	Rapporteur
M. Yvan MOENNE-LOCCOZ	Professeur - Université Claude Bernard, Lyon	Examineur
M. Bernard DREYFUS	Directeur de Recherches - IRD, Montpellier	Examineur
M. Eric GIRAUD	Ingénieur de Recherches - IRD, Montpellier	Examineur

A mes parents

A mes frères et sœurs

A mes cousins Aboubakry et Ibrahima

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au LSTM (Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes) de L'UMR 113 (INRA/AGRO-M/CIRAD/IRD) de Montpellier.

Je remercie Bernard DREYFUS directeur du laboratoire de m'avoir accueilli dans équipe depuis mon DEA, d'avoir guidé mes pas dans la recherche et d'avoir accepté de diriger ce travail de thèse. Sa compétence, son soutien et sa confiance n'ont jamais fait défaut.

Une mention spéciale à Eric GIRAUD, qui a suivi, inspiré et corrigé ce travail. Son esprit critique, sa rigueur scientifique, son enthousiasme et sa sympathie m'ont été d'un apport considérable pour la réalisation de ce travail. Je garderais un souvenir inoubliable des trois années ô combien enrichissantes passées à ses côtés.

Je remercie Philippe de LAJUDIE et Catherine BOIVIN pour leurs conseils précieux tout au long de ce travail, Yves PRIN pour sa participation active pour les coupes de nodule, et Philippe JOURAND pour son aide efficace.

Que l'ensemble du personnel du LSTM et tout particulièrement les stagiaires et thésards reçoivent ici l'expression de ma sincère reconnaissance. Je ne prendrais pas le risque de citer de noms au risque d'en oublier certains.

Mon parcours a commencé au Laboratoire de microbiologie des sols de l'IRD à Dakar. Je tiens à remercier tout le personnel et les amis de cette sympathique et chaleureuse équipe. Je remercie également Mrs Amadou Tidiane BA et Ibrahima NDOYE du département de biologie végétale de l'université de Dakar.

J'adresse toute ma considération à Madame Monique GILLIS et à Mr Frans DE BRUIJN qui ont spontanément accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier également, Mrs Philippe NORMAND et Yvan MOENNE-LOCCOZ qui me font l'honneur de participer à ce jury.

Merci à tous.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE

1

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

6

I - GENERALITES SUR LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE

6

II - LA SYMBIOSE RHIZOBIUMS-LEGUMINEUSES

7

II - 1 - Les légumineuses

8

II - 2 - Les rhizobiums

9

III - LA TAXONOMIE BACTERIENNE

9

III - 1 - Les outils de la taxonomie polyphasique

11

III - 1 - 1 - Les méthodes génotypiques

12

A - Détermination du pourcentage Guanine + cytosine

12

B - L'hybridation ADN/ADN

12

C - Les homologues de séquences d'ARNr

13

D - Le typage génétique

15

III - 1 - 2 - Les méthodes phénotypiques

18

III - 2 - La taxonomie des rhizobiums

19

A - Le genre *Azorhizobium*

21

B - Le genre *Bradyrhizobium*

21

C - Le genre *Rhizobium*

23

D - Le genre *Sinorhizobium*

23

E - Le genre *Mesorhizobium*

24

F - Le genre *Allorhizobium*

25

IV - LES MECANISMES DE LA SYMBIOSE

26

IV - 1 - Les gènes de nodulation

27

A - Les gènes *nod* communs

27

B - Les gènes *nod* spécifiques

28

C - Les gènes <i>nod</i> régulateurs	29
IV - 2 - Les facteurs de nodulation ou facteurs nod	30
V - LES CROTALAIRES	31
V - 1 - Généralités	31
V - 2 - Biochimie et toxicité des crotalaires	32
V - 3 - Utilisations des crotalaires	34
VI - LE GENRE <i>METHYLOBACTERIUM</i>	37
VI - 1 - Les bactéries méthylotrophes	37
VI - 2 - Taxonomie du genre <i>Methylobacterium</i>	38
VI - 3 - Phylogénie des méthylotrophes	42
VI - 4 - L'écologie des <i>Methylobacterium</i>	43
VI - 5 - La physiologie	44
VI - 5 - 1 - Oxydation du méthanol	44
VI - 5 - 2 - Oxydation et assimilation du formaldéhyde	46
VI - 6 - Génétique et organisation des gènes	47
VI - 6 - 1 - La mutagénèse	48
VI - 6 - 2 - Clonage et systèmes de transfert	49
VI - 6 - 3 - Organisation des gènes de la MDH	50
A - Les gènes <i>mx</i> a	52
B - Les gènes <i>mx</i> b, <i>mx</i> c et <i>mx</i> d	53
C - Les gènes de la PQQ	54

MATERIEL ET METHODES

I - ISOLEMENT ET CONSERVATION DES SOUCHES	56
II - LES MILIEUX DE CULTURE	56
II - 1 - Cultures bactériennes	56
A - Milieu YM (Vincent, 1970)	56
B - Milieu LB (Luria Bertani)	57

C - Milieu TY tamponné (Beringer, 1974)	57
D - Milieu M72 (Green, 1991)	57
E - Milieu TYGPN	58
II - 2 - Culture des plantes en tubes Gibson	58
A - Milieu Jensen (Vincent, 1970)	58
III - TESTS DE NODULATION	58
IV - MESURE DE L'ACTIVITE REDUCTRICE D'ACETYLENE (ARA)	59
V - PREPARATION DES EXTRAITS PROTEIQUES	60
A - Culture et récolte des bactéries	61
B - Extraction des protéines et électrophorèse	62
C - Analyse des profils protéiques	62
D - Les solutions	63
VI - EXTRACTION D'ADN	64
A - Extraction de l'ADN génomique bactérien	64
B - Extraction de l'ADN génomique chez les plantes	65
C - Extraction d'ADN plasmidique	65
VII - AMPLIFICATION DE L'ADN PAR PCR	65
A - Principe	65
B - Conditions d'amplification et amorces utilisées	66
VIII - DIGESTION DES PRODUITS D'AMPLIFICATION	67
IX - CONSTRUCTION D'UNE BANQUE D'ADN GENOMIQUE TOTAL d'ORS 2060	68
A - Obtention des clones de la banque	68
B - Criblage des clones de la banque	69
X - HYBRIDATION PAR SONDE FROIDE	70
A - Transfert de l'ADN sur membrane de Nylon	70
B - Préparation des sondes	70
C - L'hybridation de la sonde	70
XI - SOUS-CLONAGE ET SEQUENCAGE DES GENES	72

A - les plasmides	72
B - La ligation	72
C - Obtention des cellules compétentes	73
D - la transformation	73
E - Séquençage	74
F - Analyse et alignement des séquences	74
XII - CONSTRUCTION D'UN MUTANT MXAF ⁻	75
A - Stratégie : la recombinaison homologue	75
B - La conjugaison	76
XIII - TESTS D'UTILISATION DES SUBSTRATS CARBONES	76

CHAPITRE I

I - INTRODUCTION	78
II - RESULTATS ET DISCUSSION	81
III - CONCLUSIONS	83

CHAPITRE II

I - INTRODUCTION	97
II - RESULTATS	99
II - 1 - Collection de souches	99
II - 2 - Spécificité de nodulation	99
II - 3 - Analyse des profils protéiques sur gel de polyacrylamide	103
II - 3 - 1 - Les souches à croissance lente	103
II - 3 - 2 - Les souches à croissance rapide	106
II - 4 - Polymorphisme du gène de l'ARNr 16S	107
II - 4 - 1 - Amplification du gène de l'ARNr 16S	107
II - 4 - 2 - Digestion des produits d'amplification de l'ADNr 16S	

(ARDRA)	107
II - 5 - Séquençage de l'ADNr 16S	108
II - 6 - Analyse phylogénétique des séquences de l'ADNr 16S	109
II - 7 - Etude du polymorphisme du gène <i>nodA</i>	111
II - 7 - 1 - Amplification du gène <i>nodA</i>	111
II - 7 - 2 - Digestion des produits d'Amplification du gène	
<i>nodA</i>	111
II - 8 - Analyse phylogénétique du gène <i>nodA</i>	112
II - 9 - Etude de l'organisation des gènes de nodulation	113
II - 9 - 1 - Banque d'ADN génomique d' ORS 2060 et sélection des	
clones nod	113
II - 9 - 2 - Sous-Clonage et séquençage des gènes de	
nodulation	114
II - 10 - Analyse phylogénétique des séquences ITS de	
Crotalaires	115
III - DISCUSSION	117
III - 1 - Spécificité de nodulation chez les crotalaires	117
III - 2 - <i>Methylobacterium</i> , un nouveau genre symbiotique	118
III - 3 - Liens phylogénétiques des gènes de nodulation	120
III -4 - Organisation des gènes de nodulation Chez " <i>M. nodulans</i> "	122
III - 5 - Divergence entre la classification morphologique des	
crotalaires et la phylogénie basée sur les séquences ITS.	124
IV - CONCLUSION	125

CHAPITRE III

I - INTRODUCTION	127
II - RESULTATS	130
II - 1 - Caractérisation du gène <i>mxoF</i> chez " <i>M. nodulans</i> "	130

A - Recherche du gène chez les différentes souches de crotalaires	130
B - Clonage et séquençage du gène <i>mxoF</i> de " <i>M. nodulans</i> " ORS 2060	130
II - 2 - Identification d'un gène homologue au gène <i>mxoF</i> chez les rhizobiums	131
II - 3 - Analyse phylogénétique des séquences <i>mxoF</i> et <i>mxoF'</i>	132
II - 4 - Etude de la méthylotrophie	134
A - L'oxydation du méthanol	134
B - Utilisation de différents substrats carbonés	135
II - 5 - Etudes des propriétés symbiotiques chez <i>Methylobacterium</i>	137
A - Tests de nodulation	137
B - Isolement des gènes de nodulation	138
II - 6 - Etude du rôle de la méthylotrophie dans la symbiose	138
A - Construction d'un mutant non méthylotrophe	138
B - Effet de la méthylotrophie sur la symbiose	139
III - DISCUSSION	141

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	144
--	------------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	155
------------------------------------	------------

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

<u>ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	page
Tableau 1. Classification des bactéries symbiotiques des légumineuses.	21
Tableau 2. Critères de définition de nouveaux taxons de rhizobiums.	22
Tableau 3. Structure chimique des facteurs Nod produits par les rhizobia.	30
Tableau 4. Les différentes espèces de <i>Crotalaria</i> du Sénégal et leur classification d'après Polhill, (1982).	31
Tableau 5. Alcaloïdes et d'acides aminés toxiques dans les graines de Crotalaires Africaines d'après Polhill, (1982).	34
Tableau 6. Les différentes espèces de <i>Methylobacterium</i> .	42
Tableau 7. Désignation des gènes d'oxydation du méthanol chez les bactéries méthylotrophes.	51
Figure 1. Pouvoirs discriminatifs des techniques de taxonomie.	11
Figure 2. Arbre phylogénétique des rhizobiums.	20
Figure 3. Interactions entre le <i>Rhizobium</i> et la racine de la plante.	26
Figure 4. Carte des gènes de nodulation de quelques rhizobiums.	27
Figure 5. Position de <i>Methylobacterium</i> dans les α -protéobactéries.	43
Figure 6. Oxydation et assimilation du méthane et du méthanol chez les méthylotrophes.	45
Figure 7. Oxydation du formaldéhyde chez les bactéries méthylotrophes.	46
Figure 8A. Assimilation du formaldéhyde par la voie de la ribulose monophosphate.	47
Figure 8B. Assimilation du formaldéhyde par la voie de la sérine.	47
 <u>MATERIEL ET METHODES</u>	
Tableau 8. Amorces utilisées pour les réactions d'amplification.	67

Tableau 9. Enzymes de restriction et leurs sites de reconnaissance.	67
Tableau 10. Amorces utilisées pour le séquençage de gènes étudiés.	75
Figure 9. Sites de prélèvement des nodules de <i>Crotalaria</i> .	56
Figure 10A. Programme PCR Classique pour amorces spécifiques.	66
Figure 10B. Programme "Touch-down" PCR pour amorces dégénérées.	66
Figure 11. Construction d'une banque d'ADNg de la souche ORS 2060.	68
Figure 12. Programme utilisé pour effectuer les réactions de séquence.	74
Figure 13. Position des amorces pour le séquençage de l'ADNr 16S.	74
Figure 14. Construction du mutant <i>mxoF</i> ⁻ de la souche ORS 2060.	76

CHAPITRE II

Tableau 11. Collection des souches de Crotalaires du Sénégal.	100
Tableau 12. Spécificité de nodulation chez les différentes espèces de <i>Crotalaria</i> .	101
Tableau 13. Spécificité de nodulation au sein du genre <i>Crotalaria</i> .	102
Tableau 14. Nomenclature et origine des souches de référence.	105
Tableau 15. Récapitulatif des profils de restriction de l'ADNr 16S.	107
Tableau 16. Matrice de distances des séquences d'ADNr 16S des différents isolats et des espèces de <i>Methylobacterium</i> .	110
Tableau 17. Récapitulatif des profils de restriction du gène <i>NodA</i> .	112
Figure 15. Dendrogramme SDS-PAGE des souches de Crotalaires.	104
Figure 16. Séquences du gène de l'ARNr 16S des souches ORS 2060 et ORS1924.	108
Figure 17. Positionnement des souches ORS 2060 et 1929 sur l'arbre phylogénétique des rhizobia.	109
Figure 18. Phylogénie entre la souche ORS 2060 et les différentes espèces de <i>Methylobacterium</i> .	111

Figure 19. Arbre phylogénétique des protéines NodA.	113
Figure 20a. Hybridation avec une sonde nod des profils de restrictions du clone nod 4-6-6 ou STM 223.	114
Figure 20b. Clonage des gènes de nodulation de la souche ORS 2060.	114
Figure 21. Organisation du cluster des gènes nod chez ORS 2060.	115
Figure 22. Phylogénie des séquences ITS de 16 espèces de crotalaires.	116

CHAPITRE III

Tableau 18. Identité des fragments amplifiés chez les rhizobiums avec les séquences protéiques des gènes <i>mxoF</i> et <i>mxoF'</i> de <i>M. extorquens</i> et du gène <i>xoxF</i> de <i>P. denitrificans</i> .	133
Tableau 19. Assimilation des composés carbonés par " <i>M. nodulans</i> " et la souche de <i>Lotononis bainesii</i> 4-46.	136
Tableau 20. Tests de nodulation chez les espèces de <i>Methylobacterium</i> .	138
Figure 23. Amplifiats du gène <i>mxoF</i> des souches de crotalaires.	130
Figure 24a. Hybridation des fragments de restriction avec la sonde <i>mxoF</i> .	131
Figure 24b. Sous-Clonage et séquençage du clone STM 245.	131
Figure 25. séquence de la protéique <i>mxoF</i> de " <i>M. nodulans</i> " ORS 2060.	132
Figure 26. Arbre phylogénétique basé sur les séquences aminoacides du gène <i>mxoF</i> et des gènes homologues identifiés chez les différentes espèces de rhizobiums.	133
Figure 27. Arbre phylogénétique basé sur les séquences protéiques complètes <i>mxoF</i> , <i>mxoF'</i> et <i>xoxF'</i> des bactéries méthylo trophes.	134
Figure 28. Croissance de " <i>M. nodulans</i> " sur M72 avec du méthanol 50 mM.	135
Figure 29. Croissance de " <i>M. nodulans</i> " sur M72 contenant du méthanol à différentes concentrations.	135
Figure 30. Croissance de " <i>M. nodulans</i> " sur M72 avec de l'éthanol 50 mM.	137
Figure 31. Croissance des mutants obtenus sur alcool allylique sur M72 contenant du méthanol 10 ml/l.	139

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. Alignement des séquences des gènes *nodA* des souches à croissance rapide de crotalaires.

Annexe 2. Alignement des séquences des gènes *nodA* des souches à croissance lente de crotalaires.

Annexe 3. Alignement des séquences des gènes *nodA* des souches de *Lotononis bainesii*.

Annexe 4. Séquence nucléotidique du fragment XmaI de 7 kb contenant les gènes de nodulation.

Annexe 5. Alignement multiple des séquences ITS obtenu chez 16 individus de la tribu des *Crotalariae*.

Annexe 6. Séquence nucléotidique du clone STM 245 contenant le gène *mxoF*, (position 1583 à 3472).

ABREVIATIONS

bv.	biovar
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
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
DO	densité optique ou absorbance
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique
Facteur Nod	facteur de nodulation
ITS	Internal Transcribed spacer
kb	Kilobase
nm	nanomètre
MDH	Méthanol deshydrogénase
ORS	collection ORSTOM
ORF	phase de lecture ouverte
PCR	Polymérase Chain Reaction
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
ADAP	Acide Acétyldiaminopropionique
ODAP	Acide Oxalyldiaminopropionique
ODAB	Acide oxalyldiaminobutyrique
STM	Laboratoire des Symbioses tropicales et Méditerranéennes
PQQ	Pyrroloquinoline quinone
min	Minute

W/m²	Watt par mètre carré
mA	milliampère
KV	Kilovolte
M	molaire
mM	millimolaire
μF	Microfarad
MCS	Multicloning site
Pmol	picomole
μg	microgramme
LMG	Laboratoire de Microbiologie de Gand
ΔT_M	différence entre la température moyenne de demi-renaturation (T _m) d'un hybride hétérologue et la T _m d'un hybride homologue
NaPBS	Na Phosphate Buffered Saline
UPGMA	Unweighted pair Group Method Average

INTRODUCTION GENERALE

En Afrique subsaharienne, l'agriculture traditionnelle a longtemps été caractérisée par l'alternance d'une mise en culture des sols, suivie d'un abandon cultural après la baisse des rendements. Cette seconde phase permettait la remontée de la fertilité des sols grâce à une jachère de longue durée qui favorisait un retour vers une savane arbustive ou arborée (Serpantié et Floret, 1994). Ce système de cycles, culture-jachère longue a parfaitement fonctionné jusqu'à une époque plus ou moins récente. Actuellement, la pression démographique et le besoin important de terres cultivables ont considérablement raccourci le temps de jachère, et celle-ci, lorsqu'elle n'a pas totalement disparu, ne joue plus que partiellement son rôle de reconstitution de la fertilité des sols. Or, le coût élevé des engrais chimiques, ainsi que la faible disponibilité de fumier et de matière organique, ne permettent pas aux paysans africains de compenser l'épuisement prématuré des sols dû au raccourcissement de la jachère. Une des solutions durables pour inverser cette tendance passe par une amélioration de l'efficacité de cette jachère courte dans le maintien de la fertilité des sols, notamment en favorisant un enrichissement des jachères en légumineuses.

Les légumineuses tropicales spontanées de jachères, annuelles ou pérennes sont mal connues des agriculteurs qui les ont longtemps considérées comme de simples mauvaises herbes. Pourtant, grâce à leur symbiose avec les rhizobiums qui forment des nodules fixateurs d'azote sur leurs racines et parfois sur leurs tiges, elles jouent un rôle très important dans le maintien et l'amélioration de la fertilité des sols, comme fourrage pour les animaux, et plus généralement dans la protection de l'environnement. Mais ce n'est que récemment (Doignon-Bourcier, 1999) que l'on a commencé à étudier de façon approfondie la nodulation et la fixation d'azote de ces petites légumineuses, dont plusieurs sont des espèces menacées par le surpâturage ou la désertification. Un premier travail de

prospection botanique sur l'ensemble du Sénégal, avait préalablement permis de constituer une collection de graines de petites légumineuses de jachères et d'étudier leurs propriétés germinatives en milieu aride (Neffaty, 1994 ; Sy, 1995 ; Sy *et al.*, 1997). Parallèlement, l'isolement des premières souches de rhizobiums à partir des nodules récoltés sur le terrain (Doignon-Bourcier *et al.*, 1999) avait confirmé que les petites légumineuses de jachères étaient nodulées par des souches bactériennes appartenant au genre *Bradyrhizobium*. Ce genre bactérien, classiquement associé à la grande majorité des légumineuses tropicales, est caractérisé par un large spectre d'hôte qui lui permet de fixer efficacement l'azote dans les nodules de nombreuses espèces différentes de légumineuses tropicales. Ainsi une même souche bactérienne peut indifféremment noduler un *Indigofera*, un *Tephrosia* ou un *Alysicarpus* (Doignon-Bourcier *et al.*, 1999). Seule exception parmi les légumineuses étudiées, nous avons observé au cours des tests préliminaires sur les petites légumineuses que certaines espèces appartenant au genre *Crotalaria* n'étaient pas nodulées par les *Bradyrhizobium* et présentaient donc une spécificité de nodulation inhabituelle. Après avoir participé à l'étude de la diversité des rhizobiums des légumineuses de jachère, nous nous sommes donc particulièrement intéressés au genre *Crotalaria* dont plus de trente espèces sont communément rencontrées dans les jachères du Sénégal. Les crotalaires, comme l'ensemble des petites légumineuses spontanées, peuvent également améliorer la fertilité des sols de jachère. De plus, outre leur potentiel fixateur d'azote, les crotalaires présentent un deuxième avantage agronomique : elles sont connues pour être d'excellentes plantes pièges pour les nématodes et limitent donc fortement les populations de ces importants ravageurs des cultures. Ces propriétés font que certaines espèces de crotalaires sont utilisées

à travers le monde à la fois pour éliminer les populations de nématodes et comme engrais vert pour enrichir le sol en azote.

PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE

L'objectif principal de ce travail a donc consisté à caractériser la diversité et les propriétés symbiotiques des rhizobiums associés aux espèces du genre *Crotalaria* afin de pouvoir disposer ultérieurement de souches performantes pouvant être employées comme inoculum pour l'utilisation au champ des espèces de crotalaires qui présentent d'importantes potentialités agronomiques.

Dans le premier chapitre, nous nous sommes consacrés à l'étude générale de la diversité des souches de rhizobiums à croissance lente associées à plusieurs espèces de petites légumineuses et à leurs relations phylogénétiques avec les différents groupes de *Bradyrhizobium* sp. précédemment décrits, ainsi que les espèces types de *Bradyrhizobium*.

Dans le deuxième chapitre, nous nous sommes intéressés spécifiquement à la caractérisation d'une collection de plus d'une centaine de souches isolées de crotalaires poussant au Sénégal.

Les propriétés symbiotiques des différentes souches de cette collection ont été étudiées par l'intermédiaire de tests d'inoculations croisés sur différentes espèces de crotalaires ainsi que sur d'autres légumineuses tropicales dont les bactéries symbiotiques sont bien caractérisées. Ces tests de nodulation ont fait ressortir qu'un groupe de souches à croissance rapide isolées de certaines espèces de crotalaires était spécifique de ces dernières espèces, alors que les autres isolats à croissance lente avaient un spectre d'hôte large typique des *Bradyrhizobium*.

L'analyse par SDS-PAGE réalisée dans une première étape a montré également que les souches à croissance rapide, très spécifiques, forment un groupe homogène et distinct des autres isolats et des autres espèces de rhizobiums connues.

La caractérisation génotypique et phylogénétique de ce groupe a montré que les symbiotes spécifiques de crotalaires appartiennent, de façon surprenante, au genre *Methylobacterium* qui ne renfermait jusqu'à présent que des bactéries méthylotrophes non symbiotiques.

Les bactéries du genre *Methylobacterium* sont largement réparties dans la nature, partout où les composés à un carbone sont abondants. Elles sont capables d'assimiler les composés en C_1 comme source de carbone et d'énergie. Ainsi les *Methylobacterium* peuvent oxyder le méthanol en formaldéhyde qui est par la suite utilisé par les voies d'assimilation et pour fournir de l'énergie. L'oxydation du méthanol est réalisée par l'intermédiaire d'une enzyme, la méthanol deshydrogénase (MDH). Ces bactéries vivent souvent en association avec les plantes, sur les surfaces foliaires ou comme contaminants des cultures cellulaires végétales (Corpe et Basile, 1982 ; Holland, 1997 ; Holland et Polacco, 1994), mais aucune espèce de *Methylobacterium* n'avait jusqu'à présent été décrite comme bactérie symbiotique et fixatrice d'azote en association avec des légumineuses. Les souches spécifiques de crotalaires constituent donc la première espèce de *Methylobacterium* symbiotique des légumineuses pour laquelle nous avons proposé le nom de "*Methylobacterium nodulans*".

La découverte de cette nouvelle association symbiotique *Crotalaria*-"*Methylobacterium nodulans*" pose la question de la co-évolution entre les crotalaires et leurs symbiotes spécifiques et atypiques. Pour répondre à cette interrogation, notre démarche a consisté à faire une analyse comparative entre la

phylogénie des gènes de nodulation en particulier le gène *nodA* qui gouverne la spécificité de nodulation, la phylogénie de la région ITS des différentes espèces de crotalaires et le regroupement de ces espèces de crotalaires en différents groupes d'inoculation croisés.

Dans le troisième chapitre, nous avons étudié le caractère méthylotrophe des souches spécifiques de crotalaires. Nous avons en particulier caractérisé le gène *mxoF* qui code pour la grande sous unité de la MDH chez les bactéries méthylotrophes et déterminé la capacité de ces souches à pousser sur différents substrats mono-carbonés. Nous avons montré en outre que ce caractère méthylotrophe n'était pas un caractère ubiquiste retrouvé chez tous les rhizobiums mais spécifique à ce groupe de souches. Nous nous sommes alors intéressé à déterminer si ce caractère méthylotrophe jouait un rôle durant cette interaction. Pour cela nous avons construit des mutants non méthylotrophes et étudié leur effet sur la nodulation et la fixation d'azote.

En conclusion, nous présenterons particulièrement les perspectives appliquées et fondamentales qui pourraient à l'avenir découler de la découverte de ce nouveau groupe original de bactéries symbiotiques.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I - GENERALITES SUR LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE

L'azote est un facteur limitant des productions végétales, bien que l'atmosphère en constitue une réserve inépuisable. Ce paradoxe est dû au fait que les végétaux, comme tous les organismes eucaryotes sont incapables d'utiliser directement l'azote moléculaire N_2 . Seuls certains procaryotes appelés fixateurs d'azote sont capables de réduire l'azote moléculaire en ammoniacque assimilable par les plantes.

L'azote fixé, c'est-à-dire les formes d'azote combiné directement assimilables par les êtres vivants, représente un infime pourcentage, moins de 0,001% de l'azote total de la biosphère. Si bien que la molécule N_2 doit être fixée par un processus naturel, qu'il soit biologique (fixation biologique de l'azote) ou non biologique (éclairs, combustions et volcanismes) ou par un procédé artificiel de synthèse (essentiellement la production d'ammoniacque par le procédé industriel). Le procédé biologique est responsable de 65% de la fixation annuelle tandis que le procédé industriel ne couvre que 25% (Newton, 1998).

Les microorganismes fixateurs d'azote appartiennent à deux des trois règnes primaires, les archaebactéries et les eubactéries (Young, 1992). Parmi les eubactéries, la propriété de fixer l'azote a été mise en évidence chez des organismes de métabolismes très différents comme les anaérobies, les aérobies, les bactéries photosynthétiques, les cyanobactéries et les actinomycètes. Tandis que certains fixent l'azote à l'état libre, d'autres ne fixent l'azote qu'en association symbiotique avec une plante-hôte.

Les fixateurs libres comprennent des genres très divers : des bactéries aérobies chimioorganotrophes (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*

diazotrophicus), des bactéries anaérobies strictes (*Clostridium*) ou des aérobies facultatifs (*Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*), des bactéries phototrophes à photosynthèse anoxygénique (*Rhodobacter*, *Rhodospirillum*) et des cyanobactéries (*Synechococcus*). Certains fixateurs libres dont *Azospirillum*, *Azotobacter paspali*, *Alcaligenes* et *Campilobacter* ont été décrits comme formant de véritables associations avec les racines des plantes (Elmerich *et al.*, 1992). La colonisation d'*Azospirillum* dans les espaces intercellulaires de l'épiderme et du cortex racinaire a été montrée chez le maïs et le sorgho.

La réduction de l'azote est coûteuse en énergie, et les systèmes les plus efficaces sont ceux qui permettent un couplage entre la photosynthèse et la fixation biologique de l'azote. Dans ces associations fixatrices d'azote, le microorganisme induit l'apparition de structures différenciées appelées nodules chez le partenaire végétal, et lui fournit une grande partie de l'azote nécessaire à sa croissance. C'est le cas des systèmes qui associent la majorité des plantes de la famille des légumineuses aux bactéries appelées collectivement rhizobiums, et les actinomycètes du genre *Frankia* associés aux plantes ligneuses appartenant à différentes familles de dicotylédones dont les genres *Alnus*, *Eleagnus*, *Casuarina* ou *Myrica* (Benson et Sylvester, 1993).

II - LA SYMBIOSE RHIZOBIUMS-LEGUMINEUSES

La symbiose rhizobiums-légumineuses est la symbiose la plus étudiée et la mieux connue (Allen et Allen, 1981). Elle représente plus de la moitié de l'azote fixé annuellement par voie biologique (Hardy et Havelka, 1975) et constitue une association extrêmement importante du point de vue écologique et agronomique.

La symbiose se traduit chez la plante-hôte par la formation de structures différenciées et spécialisées, appelées nodules ou nodosités, localisées le plus souvent au niveau des racines et dans certains cas au niveau des tiges. Ces organes, biotopes à l'intérieur desquels les bactéries se multiplient sont le véritable siège de la fixation de l'azote atmosphérique.

La symbiose permet l'enrichissement naturel du sol en azote et la réduction des apports en engrais chimiques très coûteux dont les applications massives entraînent une pollution des eaux par lessivage des sols. Une partie de l'azote fixé par la symbiose est restituée au sol par excrétion directe au niveau des racines et des nodules ou par la décomposition de la matière végétale.

II - 1 - Les légumineuses

Les légumineuses constituent un des groupes de végétaux supérieurs les plus abondants et les plus diversifiés (Allen et Allen, 1981). Elles sont subdivisées en trois sous-familles : les *Fabaceae* D. C. (71%), les *Mimosoideae* Kunth. (15%), les *Caesalpinoideae* Kunth. (14%) et comptent environ 19 000 espèces réparties en 750 genres. La famille des légumineuses comprend aussi bien des plantes herbacées annuelles que des plantes ligneuses qui colonisent aussi bien les régions tropicales que les régions tempérées ou arctiques du globe terrestre (Young et Johnston, 1989). Les légumineuses présentent une importance économique majeure. De nombreuses espèces constituent des ressources en fourrage, bois, aliments, ou présentent des propriétés médicinales. Par ailleurs, certaines espèces jouent un rôle écologique important en particulier pour la stabilisation et la fertilisation des sols. La majorité des légumineuses sont capables de former des nodules avec les rhizobiums. Au moins 97% des espèces examinées de *Fabaceae* et 90% de celles des *Mimosoideae* portent des nodules. Alors que

seulement 23% des espèces de *Caesalpinoideae* étudiées forment des nodules (De Faria *et al.*, 1989 ; Sprent et Raven, 1992). Le fait que la sous-famille des *Caesalpinoideae*, sous-famille la plus primitive, contienne essentiellement des espèces non nodulées, suggère que le phénomène de la symbiose est apparu bien après la différenciation de l'ancêtre commun à toutes les légumineuses (Young et Johnston, 1989).

II - 2 - Les rhizobiums

Les bactéries fixatrices d'azote associées aux légumineuses ou rhizobiums sont des bactéries aérobies, Gram négatives, mobiles, sans spores qui appartiennent à la famille des *Rhizobiaceae* (Jordan, 1984). Du point de vue phylogénétique, elles font partie de la sous-classe alpha des protéobactéries (Stackebrandt *et al.*, 1988). Les rhizobiums partagent la famille des *Rhizobiaceae* avec les genres *Agrobacterium* et *Phyllobacterium* qui sont tous impliqués dans des interactions spécifiques avec des plantes (Jordan, 1984). Les souches de *Phyllobacterium* induisent des nodules sur les feuilles de certaines plantes de la famille des *Myristinaceae* et des *Rubiaceae*, alors que les souches d'*Agrobacterium* induisent des tumeurs sur les racines et les tiges de plusieurs plantes.

III - LA TAXONOMIE BACTERIENNE

La taxonomie, étude des relations qui existent entre les organismes englobe, la classification, la nomenclature et l'identification. Ces trois parties consistent respectivement : à classer et à arranger les organismes dans des groupes sur la base de similarités (classification), à donner des noms aux groupes

trouvés (nomenclature) et enfin à identifier des organismes inconnus pour déterminer s'ils appartiennent aux groupes déjà définis (Vandamme *et al.*, 1996). Dans la taxonomie bactérienne, l'identification d'une bactérie à une espèce donnée reste un des aspects les plus délicats mais aussi des plus importants. En effet, si les animaux et les plantes sont riches en détails morphologiques qui constituent la base de leur classification, les bactéries de leur côté possèdent des caractéristiques morphologiques simples qui ne peuvent pas être utilisées pour les classer (Woese, 1987). Différents schémas de classification ont existé qui reflétaient l'état des connaissances du moment, en particulier le manuel Bergey's (Krieg et Holt, 1984), qui était basé sur l'observation au microscope et sur différents tests biochimiques permettant de classer de façon séquentielle les microorganismes : photosynthétiques ou non, gram + ou non, respiration aérobie ou non, etc.

Depuis plus d'une vingtaine d'années, les taxonomistes bactériens reconnaissent la nécessité de ne plus baser le système de classification des bactéries sur des similarités de fonction (diazotrophes, phototrophes) et d'adopter une approche nécessitant la convergence du maximum de données (phénotypiques, génotypiques, phylogénétiques) pour déterminer les groupes taxonomiques ou taxons bactériens. Cette approche, appelée taxonomie polyphasique a considérablement modifié la perception que les taxonomistes bactériens avaient des relations entre divers groupes de microorganismes (Olsen *et al.*, 1994). Progressivement il a été reconnu que la classification bactérienne devait également refléter le plus fidèlement possible les relations naturelles entre les bactéries. En effet, ces organismes présentent entre eux des relations de parenté ou de phylogénie. Ces relations phylogénétiques entre les bactéries ont été difficiles à appréhender, mais les progrès de la biologie moléculaire ont

TECHNIQUES

NIVEAU TAXONOMIQUE

	Famille	Genre	Espèce	Souche
Polymorphisme des fragments de restriction (RFLP)				
Analyse des fragments de restriction de faible fréquence (LFRFA, PFGE)				
Ribotypage (Séquençage ARNr 16S)				
Amplification d'ADN (AFLP, AP-PCR, REP-PCR, ERIC-PCR, DAF, RAPD, ARDRA)				
Typage phagique et bactériocine				
Techniques de sérologie				
Zymogrammes				
Profils protéiques				
Hybridation ADN/ADN				
%G + C				
†DNA-PCR				
Marqueurs chimiotaxonomiques (Polyamines, quinones)				
Analyse des acides gras				
Structure de la paroi cellulaire				
Analyses phénotypiques (classiques, API, BIOLOG)				
Séquençage ARN†				
Sondes ADN				
Séquençage ADN				

Figure 1. 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.

permis d'estimer l'évolution bactérienne à l'aide de molécules qualifiées "d'horloges moléculaires universelles". Il s'agit de molécules présentes partout, avec la même fonction, avec des parties très conservées et qui accumulent les mutations (variations de séquences) permettant d'établir la phylogénie entre des organismes éloignés. En 1987, Woese a montré que les ARNr remplissaient ces conditions. Ces molécules, en particulier l'ARNr 16S se sont vite imposées comme étant de bons chronomètres moléculaires : les gènes ribosomaux ont en effet l'avantage de contenir des séquences de différents niveaux de conservation entre organismes, allant des séquences très conservées à des séquences très variables.

De nombreuses techniques basées sur l'approche moléculaire présentant différents niveaux d'expression et de discrimination ont été développées (figure 1) (Vandamme *et al.*, 1996). Ainsi la combinaison de plusieurs techniques permet de révéler à la fois des diversités génétiques au sein de groupes bactériens considérés jusqu'alors comme homogènes et des relations taxonomiques entre groupes très éloignés. Actuellement, l'espèce, unité de base de la taxonomie bactérienne est définie comme un groupe de souches présentant un taux d'homologie ADN/ADN d'au moins 70%, avec une valeur de ΔT_m n'excédant pas 5°C (Wayne *et al.*, 1987). Les caractéristiques phénotypiques et chimiotaxonomiques devant être en accord avec cette définition.

III - 1 - Les outils de la taxonomie polyphasique

Le terme taxonomie polyphasique a été inventé par Colwell (Colwell, 1970) et est utilisé pour désigner des taxa à tous les niveaux (Murray *et al.*, 1990). Elle intègre toutes les informations génotypiques, phénotypiques et phylogénétiques. L'information génotypique est fournie par les acides nucléiques (ADN et ARN)

présents dans les cellules, tandis que l'information phénotypique est donnée par les protéines et leurs fonctions, par différents marqueurs chimiotaxonomiques et plusieurs autres caractères exprimés (Vandamme *et al.*, 1996).

III - 1 - 1 - Les méthodes génotypiques

Il s'agit de techniques qui ciblent directement les molécules d'ADN et d'ARNr. Elles sont actuellement les méthodes dominantes de la taxonomie moderne. Ceci est la conséquence des progrès technologiques, mais également et surtout du fait que la nouvelle conception de la taxonomie est qu'elle doit refléter les relations codées dans le génome.

A - Détermination du pourcentage Guanine + cytosine (%G+C)

C'est une méthode génotypique classique considérée comme standard dans la description des taxons bactériens. D'une manière générale, le pourcentage observé ne dépasse pas 3% pour une espèce bien définie et pas plus de 10% pour un genre (Stackebrandt et Liesack, 1993). Ce taux varie entre 24% et 76% dans le monde bactérien.

B - L'hybridation ADN/ADN

Le pourcentage d'hybridation ADN/ADN et la baisse de la stabilité thermique de l'hybride sont utilisés pour décrire l'espèce (Wayne *et al.*, 1987). Le taux d'hybridation ADN/ADN ou pourcentage d'attachement de l'ADN est un indicateur direct de la similarité des séquences entre les génomes entiers en comparaison (De Ley *et al.*, 1970 ; Grimont *et al.*, 1980). Il a été démontré que la stabilité thermique décroît de 1% à 2,2% pour 1% de non appariement (Ullmann et Mc Carthy 1973 ; Stackebrandt et Goebel, 1994). Bien que ces estimations aient

été faites expérimentalement sur de courts fragments d'ADN, il est admis que deux organismes qui ont 70% ou plus d'homologie ADN présentent au moins 97% d'identité de séquence (Stackebrandt et Goebel, 1994). Plusieurs techniques d'hybridation ADN/ADN ont été décrites, mais les plus couramment utilisées sont la méthode sur l'hydroxyapatite (Brenner *et al.*, 1969) ; la méthode de détermination par spectrophotométrie du taux de renaturation initiale (De Ley *et al.*, 1970) et la méthode de la nucléase S1 (Crosa *et al.*, 1973 ; Grimont *et al.*, 1980). Plus récemment, de nouvelles techniques miniaturisées plus rapides et nécessitant moins d'ADN ont été décrites (Ezaki *et al.*, 1989 ; Jahnke, 1994) qui devraient remplacer les techniques classiques qui demandent d'importantes quantités d'ADN et beaucoup de temps.

C - Les homologies de séquences d'ARNr

La percée dans l'étude de la phylogénie des procaryotes a commencé dans les années 70 avec les travaux de Woese et collaborateurs (Woese et Fox, 1977 ; Fox *et al.*, 1977 ; Woese, 1991) qui ont mis au point des méthodes rapides d'analyse de séquences et de construction d'arbres phylogénétiques. Leurs résultats ont permis dans un premier temps d'avoir un aperçu de la phylogénie des procaryotes.

Il est maintenant généralement accepté que l'ARNr (5S, 16S et 23S) constitue la meilleure cible pour étudier les relations phylogénétiques grâce à sa présence chez toutes les bactéries, sa fonction constante et la présence de zones très conservées ainsi que des parties à séquences variables (Woese, 1987 ; Schleifer et Ludwig, 1989 ; Stackebrandt et Goebel, 1994). Le développement de nouvelles techniques moléculaires a permis aux microbiologistes de faire l'étude comparative des molécules d'ARNr. Le séquençage croissant de ces molécules a

abouti à la constitution d'une banque de données sur l'ARNr 5S (Wolters et Erdmann, 1988) qui a été la première molécule à être séquençée pour plusieurs bactéries grâce à ces structures primaires et secondaires moins complexes.

L'utilisation d'amorces conservées et de la transcriptase reverse pour séquençer l'ARNr 16S a constitué une avancée importante dans la phylogénie bactérienne en ayant permis l'augmentation spectaculaire du nombre de séquences. Actuellement, toutes ces techniques sont principalement remplacées par le séquençage direct de toute ou partie de l'ADNr 16S ou 23S en utilisant les techniques de PCR et des amorces appropriées. Les résultats obtenus avec d'autres macromolécules conservées comme le facteur d'élongation Tu (Ludwig *et al.*, 1990 ; Cousineau *et al.*, 1992), la sous unité β de l'ATP synthase (Amann *et al.*, 1988 ; Klugbauer *et al.*, 1992) sont conformes à ceux obtenus par l'ARN 16S. Cependant il est clair que plus les éléments conservés sont longs, plus ils portent d'informations et plus les conclusions sont fiables. En effet, au niveau moléculaire, l'identité de séquences indique une origine commune des gènes correspondant et de leurs produits. Le nombre et la nature des différences de séquences entre des gènes ou des molécules contemporaines reflètent leur histoire évolutive. Par conséquent, le nombre de changements peut être utilisé pour mesurer le temps qui s'est écoulé depuis le dernier ancêtre commun.

Avec le développement rapide des techniques de séquençage de l'ARNr 16S et la mise en place d'importantes banques de données, il est devenu évident de bien définir la place de l'analyse des séquences 16S dans la description de l'espèce. Ces dernières années la position phylogénétique de plusieurs espèces a été définie exclusivement sur la base de séquences d'ARNr 16S. Or, il a été démontré que le pouvoir résolutif de cette technique devient limité quand il

s'agit d'étudier des souches ou des espèces très proches dont la différenciation est très récente (Fox *et al.*, 1992 ; Stackebrandt et Goebel, 1994). La question a été donc de savoir si l'analyse des séquences d'ARNr 16S pouvait remplacer l'hybridation ADN/ADN dans la description de l'espèce, ou si elle devait être utilisée comme un critère supplémentaire. Pour répondre à cette interrogation, les taxonomistes bactériens sont aujourd'hui unanimes que le séquençage de l'ARNr 16S est le critère taxonomique le plus précieux de la classification bactérienne, et qu'au niveau de l'espèce, il reste salubre pour décider ou non de l'opportunité de faire de l'hybridation ADN/ADN. Après l'analyse des données disponibles dans les banques, il est actuellement bien établi que deux organismes qui présentent moins de 97% d'homologie de séquences d'ARNr 16S n'associent pas leur ADN à plus de 60% et dans ce cas selon la définition de l'espèce (Wayne *et al.*, 1987) , il n'est pas nécessaire de recourir à l'hybridation ADN/ADN.

D - Le typage génétique

Les méthodes de typage génétique font généralement appel à des techniques qui permettent de subdiviser l'espèce en un nombre distinct de types. Traditionnellement ceci se faisait par le moyen d'analyses phénotypiques comme les tests biochimiques, la sérologie ou encore les tests antibiotiques. Plus récemment, plusieurs techniques de typage direct de l'ADN ont été développées. Il s'agit de techniques universelles reproductibles, simples et bien discriminantes. La première génération de méthodes de typage génétique concernait l'analyse des fragments de restriction de l'ensemble du génome et de l'ADN plasmidique. Elles consistaient tout d'abord en une extraction de l'ADN total suivie d'une digestion avec des enzymes de restriction. Les fragments d'ADN obtenus sont ensuite séparés et visualisés par électrophorèse sur gel

d'agarose. Cependant les profils obtenus sont souvent complexes et difficiles à comparer. Les limites de l'analyse de l'ADN plasmidique de son côté sont évidentes. En effet, les souches bactériennes ne contiennent ou ne gardent pas toujours leurs plasmides.

La sélection d'enzymes de restriction à sites de coupure rares au niveau de l'ADN a permis de réduire le nombre de fragments par profils. Ils sont cependant assez grands pour une électrophorèse classique. Le problème a été résolu avec le développement de l'électrophorèse en champs pulsé PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) qui est actuellement considérée comme la méthode de typage génétique la plus discriminante (Gordillo *et al.*, 1993 ; Maslow *et al.*, 1993 ; Tenover *et al.*, 1995).

Alternativement, les profils complexes obtenus après restriction de l'ADN peuvent être transférés sur membrane et hybridés avec des sondes marquées. L'exemple typique de cette technique est le ribotypage ou typage ribosomique pour laquelle on utilise des sondes d'ARNr (Grimont et Grimont, 1986). Il existe cependant plusieurs variantes de ribotypage avec le même principe de base, la séquence ou la technique de marquage de la sonde pouvant varier. L'ARNr 16S ou 23S ou les deux avec ou sans la région intergénique peuvent également être utilisés (Bingen *et al.*, 1994). De même les séquences d'ADN correspondant au facteur d'élongation TU, la protéine ribosomique S12 ont également été utilisées comme sondes (Goossens *et al.*, 1995)

La PCR a permis le développement de nombreuses méthodes de typage génétique. Les techniques basées sur la PCR ont l'intérêt d'être universelles, simples et rapides. Ainsi différentes méthodes utilisant de courtes séquences arbitraires ont été décrites : des oligonucléotides d'environ 20 bases sont

utilisées pour les AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) (Welsh et Mc Clelland, 1990), celles d'environ 10 bases sont utilisées pour la RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA analysis) (Williams *et al.*, 1990) et des oligonucléotides de 5 bases sont utilisées pour la DAF (DNA-Amplified Fingerprinting)(Caetano-Anolles *et al.*, 1991). Des motifs consensus, complémentaires aux séquences répétées dispersées dans le génome des bactéries (Lupski et Weinstock, 1992 ; Versalovic *et al.*, 1991) ou aux fragments du gène de l'ARNt (Mc Clelland *et al.*, 1992) peuvent également être utilisées comme amorces. La PCR a permis aussi l'amplification des ADNr avec ou sans les régions intergéniques grâce à des amorces universelles donnant des profils simples des différents opérons d'ARNr (Kostman *et al.*, 1992).

Dans la méthode ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis), la PCR est combinée avec les enzymes de restriction. Le produit de la PCR du 16S ou du 23S avec ou sans l'IGS est amplifié avec des amorces universelles situés sur les régions conservées des gènes ARNr, puis digéré par des enzymes de restriction. Cette technique fournit principalement des profils spécifiques (Gurtler *et al.*, 1991 ; Jayaro *et al.*, 1991 ; Vaneechoutte *et al.*, 1992 ; Ralph *et al.*, 1993 ; Laguerre *et al.*, 1994). Une autre combinaison de la PCR et des enzymes de restriction a donné naissance à l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Zabeau et Vos, 1993). Le principe de base de L'AFLP reste l'analyse des fragments de restriction avec une PCR intermédiaire pour sélectionner des fragments particuliers d'ADN parmi un pool de fragments de restriction. Dans cette technique, on utilise un couple d'enzymes de restriction et des adaptateurs qui vont être ligués aux fragments ayant des extrémités homologues. Des amorces homologues aux adaptateurs permettent l'amplification sélective des fragments de restriction.

III - 1 - 2 - Les méthodes phénotypiques

Les méthodes phénotypiques sont celles qui ne sont pas directement basées sur l'ADN ou ARN. Elles font appel principalement aux caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des bactéries en utilisant des techniques standardisées. Dans la majorité des laboratoires de microbiologie, les tests phénotypiques classiques sont utilisés pour l'identification et constituent la base de la description formelle des taxa. Les données génétiques sont utilisées pour le positionnement phylogénétique dans les arbres alors que les données phénotypiques sont nécessaires pour une classification pratique (Wayne *et al.*, 1987). Le développement des systèmes miniaturisés et automatisés tels que les API ou BIOLOG, la généralisation du traitement des données par ordinateur et l'analyse numérique ont rendu plus aisé la classification des microorganismes par l'approche phénotypique. Cependant pour certains groupes de bactéries, le manque de caractéristiques phénotypiques pose souvent des problèmes pour leur description ou leur différenciation. Dans ces cas, les méthodes génétiques ou chimiotaxonomiques sont nécessaires pour identifier de manière sûre les souches. Actuellement les techniques chimiotaxonomiques les plus couramment utilisées par les microbiologistes sont :

- la composition des parois cellulaires (Schleifer et Kandler, 1972).
- les acides gras cellulaires (Jones et Krieg, 1984 ; De Weger *et al.*, 1987 ; Siverio *et al.*, 1993).
- les protéines totales cellulaires (Costas, 1992 ; Vauterin *et al.*, 1993 ; Kersters *et al.*, 1994 ; Pot *et al.*, 1994) ainsi que d'autres marqueurs chimiotaxonomiques.

III - 2 - La taxonomie des rhizobiums

Depuis l'isolement par Beijerinck (1888) et la nomination de *Rhizobium leguminosarum* par Frank (1889), la classification des rhizobiums a subi de nombreux changements avec l'utilisation des données polyphasiques et phylogénétiques. La première classification des rhizobiums réalisée sur la base des groupes d'inoculation croisée comportait un seul genre avec six espèces : *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. lupini*, *R. trifolii*, *R. japonicum* et *R. phaseoli*. En effet, l'interaction rhizobiums-légumineuses est hautement spécifique et une souche donnée n'est capable d'induire la formation de nodules que sur un nombre restreint de légumineuses. Cette classification ne rendait cependant pas compte des souches à large spectre d'hôtes comme la souche NGR 234 capable de noduler plus d'une soixantaine de légumineuses ainsi que la non-légumineuse *Parasponia*. Par ailleurs, certaines espèces de légumineuses sont nodulées par différentes espèces de rhizobiums.

Sur la base de la vitesse de croissance in vitro, les rhizobiums ont été ensuite reclassés dans deux genres : le genre *Rhizobium* correspondant aux souches à croissance rapide et le nouveau genre *Bradyrhizobium* pour les souches à croissance lente (Jordan, 1982). Cette modification a ouvert l'ère moderne de la classification des rhizobiums avec un nombre croissant de changements qui se poursuivent encore aujourd'hui. L'introduction de la taxonomie numérique et des techniques moléculaires comme les hybridations ADN/ADN, l'électrophorèse des protéines totales, d'autres méthodes génétiques et surtout du séquençage, ont permis la description de nouveaux genres et de nouvelles espèces. La plus importante base de données pour le développement actuel de la classification des rhizobiums et de toutes les bactéries en général est constituée par les séquences

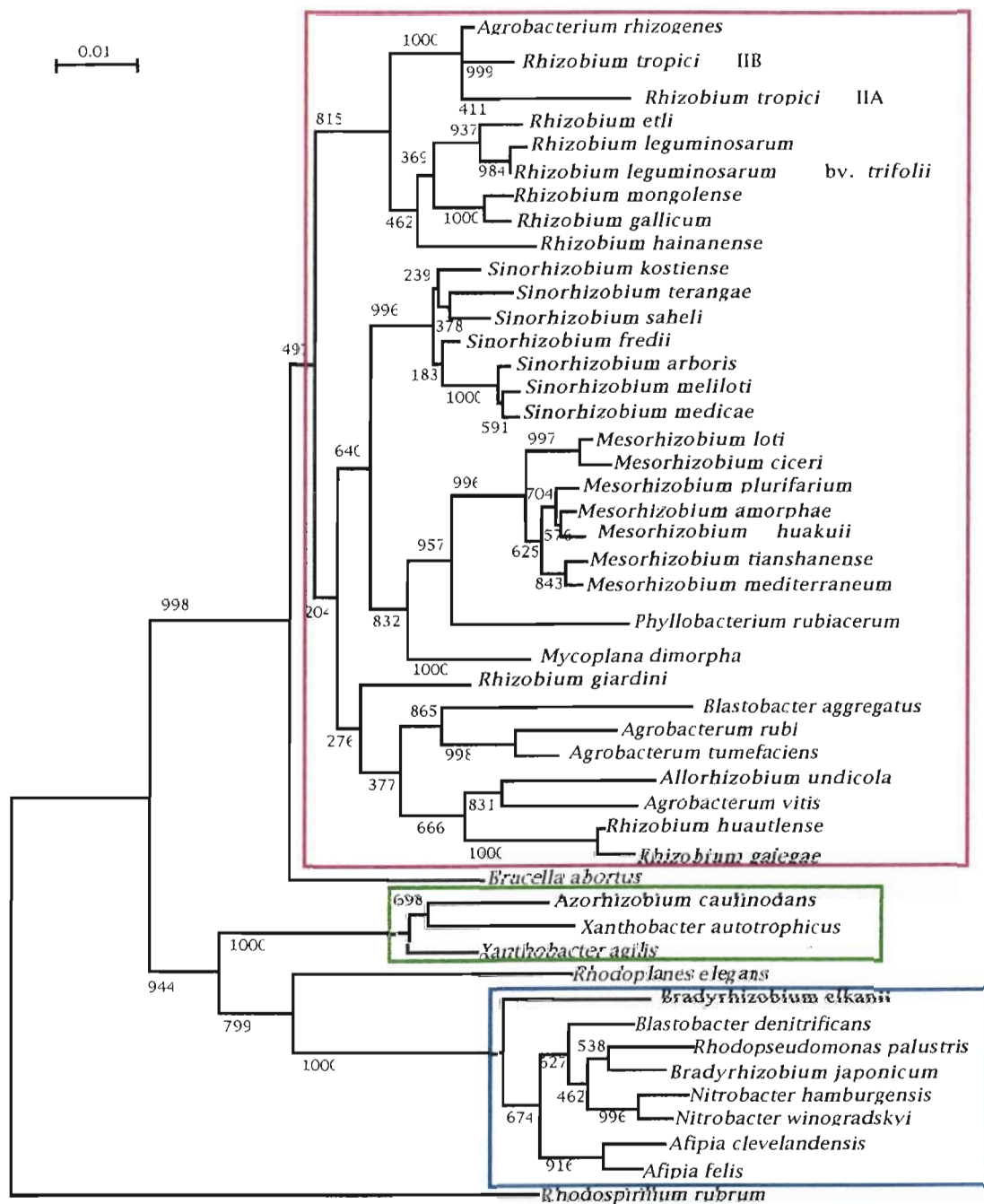


Figure 2.- Arbre phylogénétique des rhizobia (espèces indiquées en gras) basé sur la comparaison des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S, obtenu par la méthode du neighbor-joining. Les valeurs bootstrap sont indiquées aux points d'embranchement. L'échelle représente le pourcentage de substitutions.

du gène codant pour l'ARNr 16S. Les données 16S corroborent la division des rhizobiums en plusieurs genres (Young *et al.*, 1991 ; Willems et Collins, 1993 ; Yanagi et Yamasato, 1993). En effet, ces données montrent la répartition des symbiotes des légumineuses en compagnie de non-symbiotes dans trois principales branches phylogénétiques de la sous-classe alpha des protéobactéries (figure 2). Ainsi, les genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* sont très éloignés l'un de l'autre et ont chacun des parentés avec des bactéries non-symbiotiques (Young *et al.*, 1991 ; Sawada *et al.*, 1993 ; Willems et Collins, 1993 ; Yanagi et Yamasato, 1993).

Le genre *Bradyrhizobium* est plus proche de *Rhodopseudomonas palustris*, *Afipia* et *Blastobacter denitrificans* (Willems et Collins, 1993 ; Young *et al.*, 1991), alors que les plus proches parents de *Rhizobium* sont : *Agrobacterium*, *Brucella*, *Rochalimea* et *Bartonella* (Yanagi et Yamasato, 1993 ; Sawada *et al.*, 1993 ; Willems et Collins, 1993). Le genre *Azorhizobium* de son côté est taxonomiquement éloigné de *Rhizobium* et de *Bradyrhizobium* et, par contre très proche de *Xanthobacter* et *Aquabacter* (Dreyfus *et al.*, 1988 ; Rainey et Wiegel, 1996). Actuellement, les rhizobiums sont répartis en six genres et vingt-huit espèces (tableau 1), mais cette classification, loin d'être définitive, s'affine sans cesse et s'enrichit régulièrement de nouveaux taxa au gré de nouvelles techniques et surtout de l'isolement de nouvelles souches. En effet, on estime seulement à 15% la proportion de légumineuses qui ont été étudiées pour leur aptitude à noduler. Les bouleversements apparus dans la taxonomie du monde bactérien et la description de nouvelles interactions symbiotiques ont affecté la classification des rhizobiums, qui a subi de ce fait de nombreux remaniements ces dernières années. Pour éviter toute modification hâtive de la classification des rhizobiums, l'international *Committee of Systematic Bacteriology* a publié des recommandations sur les critères nécessaires et suffisants, pour classer les

Tableau 1. Classification des bactéries fixatrices d'azote symbiotiques des légumineuses.

Espèces	Plantes hôtes	Références
Rhizobium		Frank, 1889
<i>R. leguminosarum</i>		Frank, 1889, Jordan, 1984
biovar viciae	<i>Pisum sativum</i> , <i>Vicia</i> , <i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i>	Frank, 1889, Jordan, 1984
biovar trifolii	<i>Trifolium pratense</i>	Frank, 1889, Jordan, 1984
biovar phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Frank, 1889, Jordan, 1984
<i>R. tropici</i>		
Type II A	<i>P. vulgaris</i> L., <i>Leucaena</i>	Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991
Type II B	<i>P. vulgaris</i> L., <i>Leucaena</i>	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>		Amarger <i>et al.</i> , 1997
biovar gallicum	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Amarger <i>et al.</i> , 1997
biovar phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Amarger <i>et al.</i> , 1997
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i>	Van Berkum <i>et al.</i> , 1998
<i>R. galegae</i>		Lindström, 1989
biovar orientalis	<i>Galega orientalis</i>	
biovar officinalis	<i>Galega officinalis</i>	
<i>R. giardinii</i>		Amarger <i>et al.</i> , 1997
biovar giardinii	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Amarger <i>et al.</i> , 1997
biovar phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Amarger <i>et al.</i> , 1997
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	Wang <i>et al.</i> , 1998
Mesorhizobium		
<i>M. loti</i>	<i>Lotus corniculatus</i>	Jarvis <i>et al.</i> , 1982
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i> , <i>Acacia</i>	Chen <i>et al.</i> , 1991
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1994
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i> & autres plantes tropicales	Chen <i>et al.</i> , 1995
<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1995
<i>M. plurifarum</i>	<i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1998a
<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	Wang <i>et al.</i> , 1999
Sinorhizobium		Chen <i>et al.</i> , 1988
<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> , <i>Trigonella</i>	Dangeard, 1926 ; Jordan, 1984
<i>S. fredii</i>		Scholla et Elkan, 1984
chemovar fredii	<i>Glycine max</i>	Scholla et Elkan, 1984
chemovar siensis	<i>Glycine max</i>	Scholla et Elkan, 1984
<i>S. saheli</i>	<i>Sesbania</i> spp.	de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
biovar acaciae	<i>Acacia</i> spp.	Boivin et Giraud, 1999
biovar sesbaniae	<i>Sesbania</i> spp.	Boivin et Giraud, 1999
<i>S. terengae</i>		de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
biovar acaciae	<i>Acacia</i> spp.	Lortet <i>et al.</i> , 1996
biovar sesbaniae	<i>Sesbania</i> spp.	Lortet <i>et al.</i> , 1996
<i>S. medicae</i>	<i>Medicago</i>	Rome <i>et al.</i> , 1996
<i>S. kostiense</i>	<i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i>	Nick <i>et al.</i> , 1999
<i>S. arboris</i>	<i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i>	Nick <i>et al.</i> , 1999
Azorhizobium		Dreyfus <i>et al.</i> , 1988
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus <i>et al.</i> , 1988
<i>Azorhizobium</i> sp.	<i>Sesbania rostrata</i>	Rinaudo <i>et al.</i> , 1991
Bradyrhizobium		Jordan, 1982
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i> , <i>Glycine soja</i>	Jordan, 1984
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>	Kuykendall <i>et al.</i> , 1992
<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine max</i> , <i>Glycine soja</i>	Xu <i>et al.</i> , 1995
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Vigna</i> , <i>Lupinus</i> , <i>Mimosa</i> <i>Acacia</i> <i>Aeschynomene</i>	Jordan, 1982 Dupuy <i>et al.</i> , 1994 Alazard, 1985 ; Young <i>et al.</i> , 1991
Allorhizobium		de Lajudie <i>et al.</i> , 1998b
<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1998b

rhizobiums en genres et espèces (tableau 2). Ces critères, reflètent des données phénotypiques, génotypiques et phylogénétiques constituent des guides pour la validation de nouveaux taxons chez les rhizobiums (Graham *et al.*, 1991).

A - Le genre *Azorhizobium*.

Il comporte une seule espèce *Azorhizobium caulinodans* (Dreyfus *et al.*, 1988) constituée par des souches induisant la formation de nodules à la fois sur les tiges et les racines de *Sesbania rostrata*. Ces souches ont la particularité de fixer l'azote en culture pure et d'utiliser l'azote fixé comme seule source pour leur croissance. L'étude de la diversité des souches nodulant les tiges et les racines de *Sesbania rostrata* a révélé l'existence d'une seconde espèce génomique (Rinaudo *et al.*, 1991). Cette espèce présente un faible taux d'homologie ADN/ADN (44 à 53%) avec la souche type ORS 571 de *A. caulinodans*.

B - Le genre *Bradyrhizobium*.

Décrit par (Jordan 1982), le genre *Bradyrhizobium* regroupe les rhizobiums à croissance lente, et a longtemps compté qu'une seule espèce, *B. japonicum*. Mais depuis, plusieurs études génétiques (homologies ADN/ADN, séquençage de l'ARNr 16S, RFLP, ARDRA), biochimiques (composition en acides gras, en exopolysaccharides), ou phénotypiques (SDS-PAGE) ont montré l'hétérogénéité du groupe *Bradyrhizobium* (Hollis *et al.*, 1981 ; Minamisawa, 1989, 1990 ; Young *et al.*, 1991 ; Kuykendall *et al.*, 1992). Certains de ces travaux ont conduit à la description de nouvelles espèces de *Bradyrhizobium* : *B. elkanii* (Kuykendall *et al.*, 1992) et *B. liaoningense* (Xu *et al.*, 1995). Cependant le statut taxonomique des *Bradyrhizobium* reste toujours confus. En effet, la souche type

Tableau 2. Critères de définition de nouveaux taxons de rhizobiums (Graham *et al.*, 1991).

Etudes au niveau génomique

%(G+C)

- *Rhizobium* 59-64%
- *Bradyrhizobium* 61-65%
- *Azorhizobium* 66-68%

Homologies ADN/ADN ($\geq 70\%$ avec $\Delta T_m < 5^\circ C$ au sein d'une espèce)

Taille du génome

RFLP sur ADN chromosomique ou plasmidique

Hybridation avec sonde spécifique

Etudes basées sur l'ARN ribosomal :

- Hybridations 16S ARNr : ADN total
- Séquençage 16S ARNr

Etudes des composants cellulaires

Profils électrophorétiques des protéines totales solubles en SDS-PAGE

Mobilité électrophorétique des enzymes du métabolisme

Etudes d'autres composants cellulaires (Exopolysaccharide, Acides gras,)

Etudes phénotypiques

Caractéristiques morphologiques et culturelles

(types de colonies, croissance, utilisation de différentes sources de carbone)

Performances symbiotiques

Méthodes sérologiques

Sensibilité aux bactériophages

de *B. japonicum* est plus proche de *Rhodopseudomonas palustris*, *Blastobacter denitrificans*, *Afipia* et *Nitrobacter* que de *B. elkanii* (Barrera *et al.*, 1997 ; Molouba *et al.*, 1999), alors que plusieurs études ont montré l'absence de consensus entre les données de la taxonomie numérique et les données phylogénétiques chez le genre *Bradyrhizobium* (Young *et al.*, 1991 ; Ladha et So, 1994 ; So *et al.*, 1994 ; Van Rossum *et al.*, 1995).

Ces dernières années de nombreuses souches de *Bradyrhizobium* ont été isolées de différents genres de plantes (Moreira *et al.*, 1993 ; Dupuy *et al.*, 1994 ; Gao *et al.*, 1994 ; Chen *et al.*, 1995 ; Van Rossum *et al.*, 1995 ; Barrera *et al.*, 1997 ; Molouba *et al.*, 1999). Des études génétiques et phénotypiques ont montré la grande diversité de ces souches, mais également leur appartenance phylogénétique à la branche *Bradyrhizobium-Rhopseudomonas*. Plusieurs de ces souches de *Bradyrhizobium* forment des clusters différents de *B. japonicum*, *B. elkanii* et *B. liaoningense* et sont actuellement désignées sous le nom de *Bradyrhizobium sp.* suivi du nom de la plante d'isolement (Young *et al.*, 1991 ; Moreira *et al.*, 1993 ; Dupuy *et al.*, 1994 ; So *et al.*, 1994 ; Barrera *et al.*, 1997 ; Molouba *et al.*, 1999). Parmi ces *Bradyrhizobium sp.*, il est important de noter les *Bradyrhizobium sp.* d'*Aeschynomene* (Young *et al.*, 1991 ; Molouba *et al.*, 1999) qui, outre leur caractère diazotrophe, ont la propriété de synthétiser de la bactériochlorophylle *a* (Bchl_a), pigment proche de la chlorophylle des végétaux, ainsi que des caroténoïdes responsables de leur coloration (Eaglesham *et al.*, 1990 ; Lorquin *et al.*, 1997c). Ces *Bradyrhizobium* photosynthétiques sont taxonomiquement extrêmement proches de *Blastobacter denitrificans*, espèce qui a été très récemment décrite comme capable de noduler *Aeschynomene indica*, comme les *Bradyrhizobium* photosynthétiques (Van Berkum, 2000).

C - Le genre *Rhizobium*.

Le genre *Rhizobium* (Jordan, 1982) regroupait les rhizobiums à croissance rapide autres que les *Azorhizobium*. Mais sur la base de cette classification, le genre *Rhizobium* constituait un groupe polyphylétique avec certaines espèces plus proches d'*Agrobacterium* que des autres espèces de *Rhizobium* (Sawada *et al.*, 1993 ; de Lajudie *et al.*, 1994). Cette diversité génétique mise en évidence par des études basées sur l'approche polyphasique de la taxonomie (Wayne *et al.*, 1987) a conduit à la révision du genre *Rhizobium* et au reclassement de certaines espèces dans de nouveaux genres (de Lajudie *et al.*, 1994 ; Jarvis *et al.*, 1997). Actuellement, le genre *Rhizobium* comporte 9 espèces : *R. leguminosarum* (Frank, 1889), *R. galegae* (Lindstrom *et al.*, 1989) *R. tropici* (Martinez-Romero *et al.*, 1991), *R. etli* (Segovia *et al.*, 1993, Hernandez-Lucas *et al.*, 1995), *R. hainanense* (Chen *et al.*, 1997), *R. gallicum* et *R. giardini* (Amarger *et al.*, 1997), *R. huautlense* (Wang *et al.*, 1998), *R. mongolense* (Van Berkum *et al.*, 1998). Cependant les relations phylogénétiques entre *Rhizobium* et *Agrobacterium* méritent d'être définies vue la très forte similarité entre certaines espèces de *Rhizobium* et d'*Agrobacterium*. C'est notamment le cas de *R. galegae* et *R. tropici* qui sont phylogénétiquement très proches respectivement d'*Agrobacterium vitis* et *Agrobacterium rhizogenes* (Yanagi et Yamasato, 1993 ; Willems et Collins, 1993 ; Sawada *et al.*, 1993 ; de Lajudie *et al.*, 1994).

D - Le genre *Sinorhizobium*.

Le genre *Sinorhizobium* avec deux espèces, *S. xinjiangense* et *S. fredii* a été proposé par Chen *et al.*, (1988) pour les souches à croissance rapides nodulant le soja. Cependant cette description faite uniquement sur la base d'analyses numériques, a été réfutée par Jarvis *et al.*, (1992) qui ont démontré la proximité

phylogénétique de *S. fredii* et de *R. meliloti*. *S. fredii* a donc été reclassé dans le genre *Rhizobium*, et la validité taxonomique de *S. xinjiangensis* remise en cause. En 1994, de Lajudie *et al.*, ont montré que les isolats de différentes espèces d'*Acacia* et de *Sesbania* constituaient deux espèces génomiques rattachées à la branche phylogénétique *R. fredii*-*R. meliloti*. Ainsi, sur la base des séquences de l'ARNr 16S et des hybridations ADN/ADN, cette branche phylogénétique a été individualisée par la création d'un nouveau genre. Répondant aux règles de nomenclature et de taxonomie, le nom *Sinorhizobium* a été retenu. Les espèces *R. fredii* et *R. meliloti* ont été reclassées dans le genre *Sinorhizobium* qui renferme également *S. saheli* et *S. teranga* nodulant les espèces du genre *Sesbania* et *Acacia* (de Lajudie *et al.*, 1994). Ces dernières années, trois nouvelles espèces de *Sinorhizobium* ont été décrites : *S. medicae* (Rome *et al.*, 1996) associé au genre *Medicago*, *S. arboris* et *S. kostiense* (Nick *et al.*, 1999) associés à *Prosopis chilensis* et *Acacia senegal* au Soudan et au Kenya.

E - Le genre *Mesorhizobium*.

Rhizobium loti (Jarvis *et al.*, 1982) a depuis longtemps été reconnue comme étant différente des autres espèces de *Rhizobium* sur la base de tests phénotypiques, biochimiques et génétiques (Murphy et Masterson, 1970 ; Vincent et Humphrey, 1970 ; Peterson *et al.*, 1971 ; Jarvis *et al.*, 1977 ; Pankhursts et Biggs, 1980 ; Roberts *et al.*, 1980 ; Crow *et al.*, 1981 ; Jordan, 1984). Cependant, toutes ces méthodes ne donnaient pas d'indications sur les relations phylogénétiques entre *R. loti* et les autres espèces de *Rhizobium*. Les premières données phylogénétiques entre *R. loti*, les autres espèces de *Rhizobium*, de *Sinorhizobium* et d'*Agrobacterium* ont été obtenues en analysant la région intergénique des ARN ribosomiaux (Jarvis *et al.*, 1986).

Les résultats de cette étude montrent que *R. leguminosarum*, *R. galegae*, *S. meliloti*, *S. fredii*, *Agrobacterium tumefaciens* (biovar 1) et *Agrobacterium rhizogenes* (biovar 2) étaient plus proches entre elles qu'elles ne l'étaient de *R. loti*. L'analyse des séquences des gènes 16S des différentes espèces de *Rhizobium* (Yanagi et Yamasato, 1993 ; Willems et Collins, 1993 ; Young et Haukka, 1996) a confirmé l'existence de plusieurs branches phylogénétiques divergentes. La similarité entre les séquences 16S de *R. loti* et les autres espèces de *Rhizobium* et d'*Agrobacterium* est de 93,5 % suggérant la classification de *R. loti* dans un nouveau genre. Par la suite d'autres espèces de *Rhizobium* proches de *R. loti* ont été décrites : *R. huakuii* (Chen et al., 1991) ; *R. ciceri* (Nour et al., 1994) ; *R. mediterraneum* (Nour et al., 1995) ; *R. tianshanense* (Chen et al., 1995). De plus de Lajudie et al., 1994, ont décrit le "Cluster U" qui renferme des souches d'*Acacia*, de *Lotus* et des souches du Brésil comme étant très proche de *R. loti* mais avec une très grande hétérogénéité génétique. Sur la base des séquences 16S rDNA, les espèces du groupe *R. loti* constituent un groupe monophylétique taxonomiquement éloigné des autres espèces de *Rhizobium* (*R. leguminosarum*, *R. tropici*, *R. galegae*) que Jarvis et al., (1997) ont proposé de reclasser comme un nouveau genre : le genre *Mesorhizobium*. Le genre *Mesorhizobium* renferme actuellement sept espèces : *M. loti*, *M. huakuii*, *M. ciceri*, *M. mediterraneum*, *M. tianshanense*, *M. amorphae* et *M. plurifarum* (de Lajudie et al., 1998a) pour le "cluster U".

F - Le genre *Allorhizobium*.

Le genre *Allorhizobium* contient une seule espèce, *Allorhizobium undicola* (de Lajudie et al., 1998b). Il regroupe uniquement des souches à croissance rapides qui forment des nodules sur les racines adventives de *Neptunia natans*.

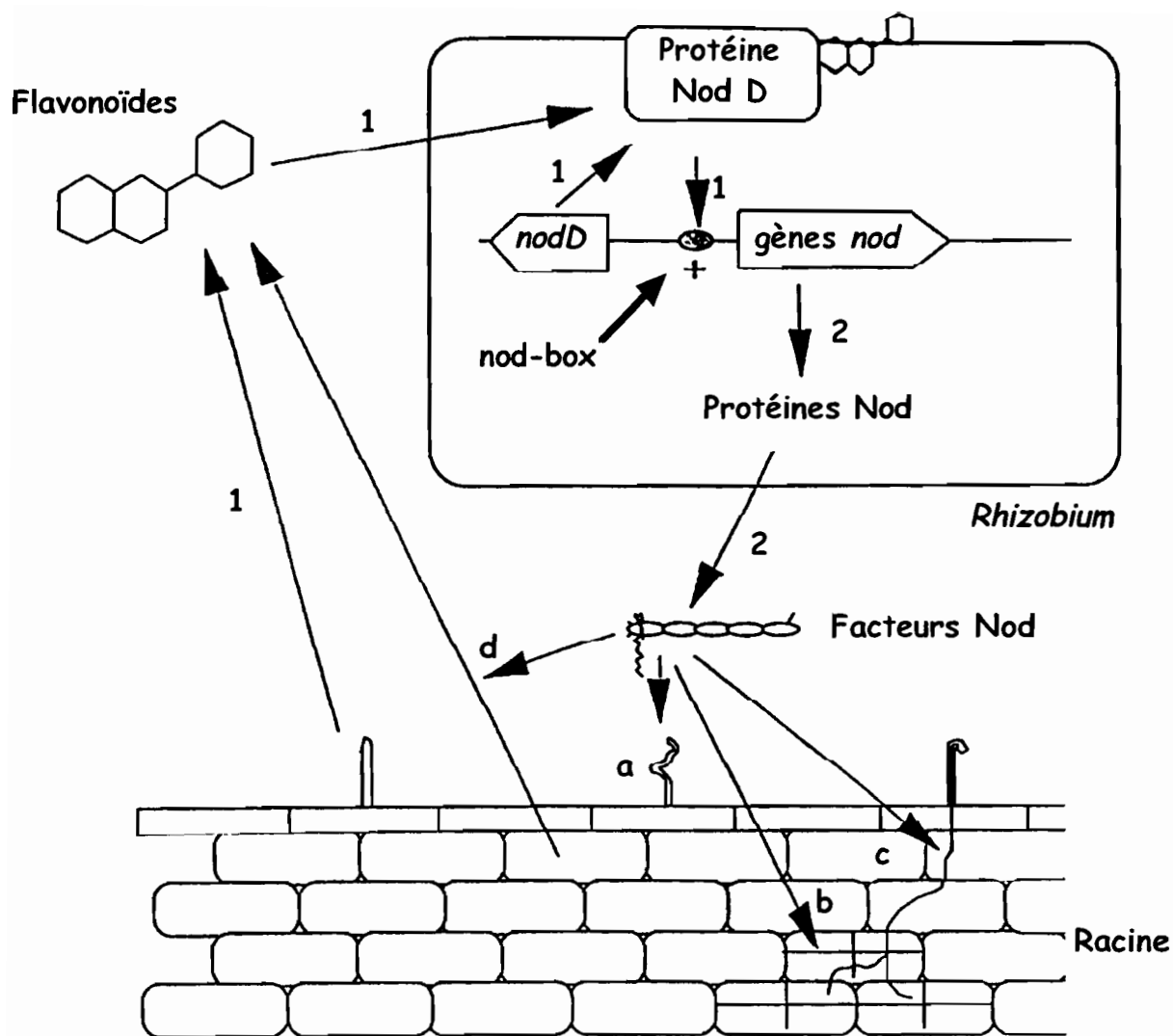


Figure 3. Représentation schématique des interactions précoces entre la bactérie et la racine de la plante-hôte (d'après Franssen *et al.*, 1992 ; Heidstra and Bisseling, 1996).

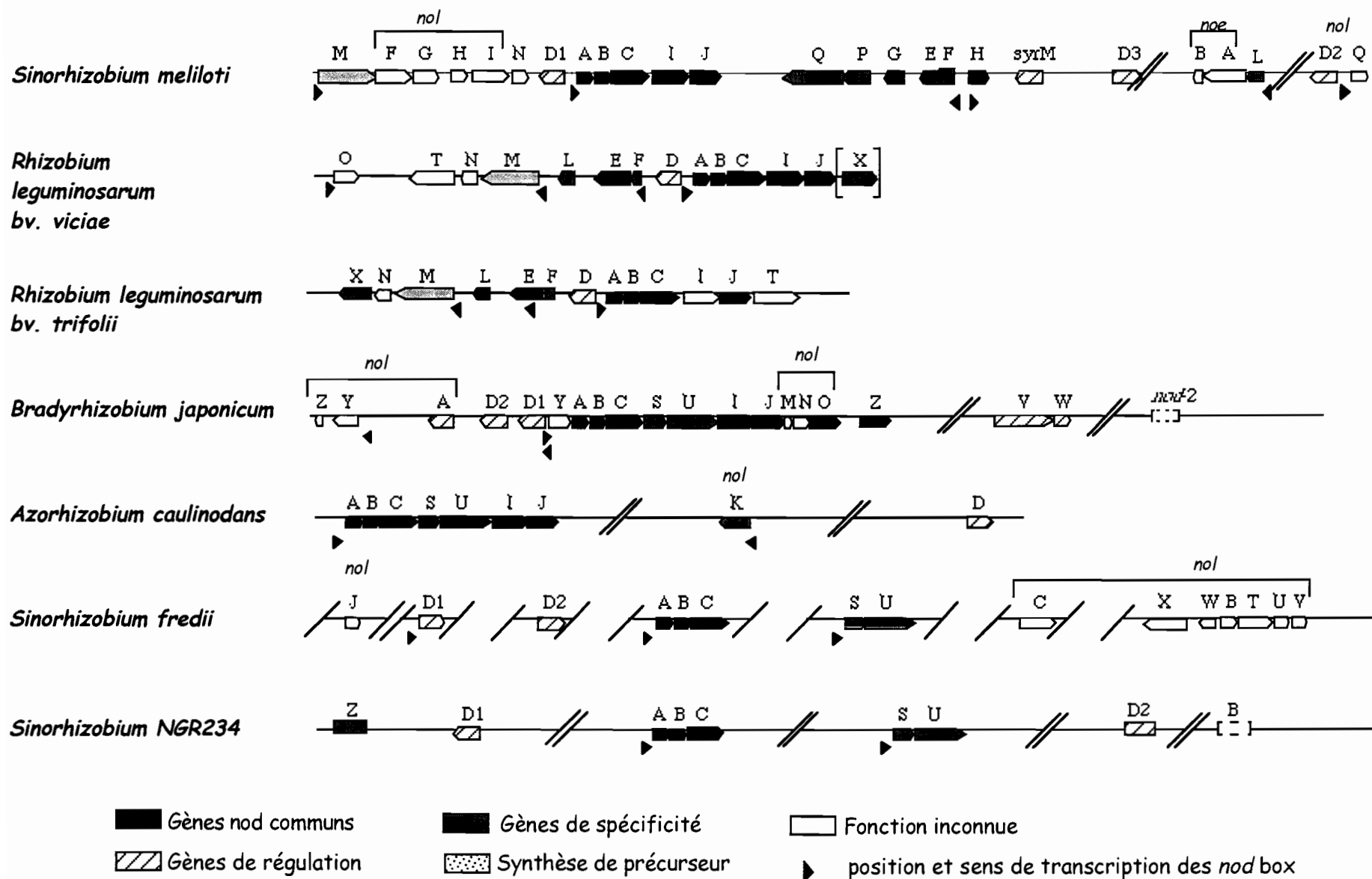
1, la protéine régulatrice NodD, au contact des flavonoïdes sécrétés par la plante, devient un activateur de la transcription des gènes *nod*. 2, les produits des gènes *nod* sont impliqués dans la synthèse des facteurs Nod, capables de déclencher chez la plante les réactions conduisant à la formation du nodule. a, déformation des poils absorbants ; b, division des cellules corticales ; c, certaines étapes de l'infection ; d, néosynthèse de flavonoïdes inducteurs.

Les analyses phylogénétiques ont montré que la souche représentative (LMG 11875) appartenait à la branche phylogénétique contenant *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1, *Agrobacterium rubi*, les souches d'*Agrobacterium* de *Ficus*, *Agrobacterium vitis* et *Rhizobium galegae*. Les pourcentages de similarité des membres de cette branche avec la souche représentative varient entre 94,5 et 95,2% avec une valeur maximale de 96,3% pour *Agrobacterium vitis*. L'ensemble des résultats montre que les isolats de *Neptunia natans* constituent un groupe homogène phénotypiquement et génotypiquement distinct des autres espèces de *Rhizobium* et d'*Agrobacterium*, justifiant ainsi leur classification dans un nouveau genre.

IV - LES MECANISMES DE LA SYMBIOSE

Les fixateurs symbiotiques désignés collectivement sous le terme rhizobiums, possèdent l'information génétique pour initier en coordination avec la plante, la formation d'une structure spécialisée pour la fixation de l'azote, la nodosité. Les bases de la symbiose reposent sur l'échange de signaux chimiques entre la plante et les bactéries (Fisher et Long, 1992). L'étape initiale correspond à la production de composés phénoliques par la plante qui activent l'expression des gènes de nodulation ou gènes *nod* chez le rhizobium (Long, 1996). Ceci résulte en la synthèse par le rhizobium de molécules appelées facteurs de nodulation ou facteurs Nod qui sont des chitolipooligosaccharides qui induisent la différenciation des cellules végétales (Dénarié *et al.*, 1992 ; Hirsh, 1992), (figure 3).

Figure 4. Carte des gènes de nodulation de quelques espèces de rhizobia
(d'après Van Rhijn et Vanderleyden, 1995)



IV - 1 - Les gènes de nodulation

L'établissement de la symbiose et de la fixation de l'azote nécessite l'expression coordonnée et séquentielle d'un groupe de gènes spécifiques d'origines bactérienne et végétale. Chez la plupart des espèces de *Rhizobium*, la majorité des gènes de nodulation (gènes *nod*) sont localisés sur des plasmides de poids moléculaire élevé appelés mégaplasmines, plasmides symbiotiques ou pSym. En revanche, l'information pour la symbiose et la fixation de l'azote est présente sur le chromosome dans le cas de *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium* (Martinez *et al.*, 1990 ; Van Rhijn et Vanderleyden, 1995). L'analyse génétique des rhizobiums a permis d'identifier les gènes de nodulation qui contrôlent la spécificité d'hôte, l'infection et la nodulation. Ces gènes jouent un rôle central dans l'échange des signaux moléculaires entre les deux partenaires. Ils interviennent dans la synthèse et la sécrétion des facteurs Nod. Les gènes de nodulation peuvent être classés en trois catégories : les gènes *nod* communs, les gènes *nod* spécifiques et les gènes *nod* régulateurs (Long, 1989 ; Dénarié *et al.*, 1992 ; Schultz *et al.*, 1994 ; Fellay *et al.*, 1995a, 1995b ; Van Rhijn et Vanderleyden, 1995). Devant la multitude de gènes *nod* décrits chez les différents genres de rhizobiums, la nomenclature s'est élargie aux terminologies *nol* et *noe*.

A - Les gènes *nod* communs.

Les gènes *nod* communs *nodABC* présents chez tous les rhizobiums (figure 4) (Martinez *et al.*, 1990 ; Van Rhijn et Vanderleyden, 1995) sont structurellement et fonctionnellement équivalents chez les différentes espèces de rhizobiums. Une mutation de l'un des gènes *nodABC* abolit toute réaction symbiotique sur la plante-hôte (Kondorosi *et al.*, 1984 ; Hirsh, 1992). Les mutants

nodABC d'une espèce donnée peuvent être complétés par les gènes *nodABC* d'une autre espèce (Martinez *et al.*, 1990).

Les gènes *nodIJ* situés en aval des gènes *nodABC*, appartiennent sans doute au même opéron des gènes *nod* communs (Schultz *et al.*, 1994). Une mutation de l'un des gènes provoque un délai de nodulation chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* et bv. *trifolii* et chez *Azorhizobium caulinodans* (Evans et Downie, 1986 ; Spaink *et al.*, 1995b). Les gènes *nodABC* codent pour des enzymes qui interviennent dans la construction du squelette de base des facteurs de nodulation. La protéine NodA est une N-acyltransférase (Röhrig *et al.*, 1994 ; Atkinson *et al.*, 1994), alors que la protéine NodB est une chitooligosaccharide déacétylase (John *et al.*, 1993). La protéine NodC a été démontrée comme étant une N-acétylglucosaminyltransférase intervenant dans la synthèse de la chitine (Atkinson et Long, 1992 ; Debellé *et al.*, 1992 ; Geremia *et al.*, 1994). Les deux autres protéines Nod, NodI et NodJ interviennent dans la sécrétion ou le transport des facteurs Nod (Vazquez *et al.*, 1993 ; Cardenas *et al.*, 1995).

B - Les gènes *nod* spécifiques.

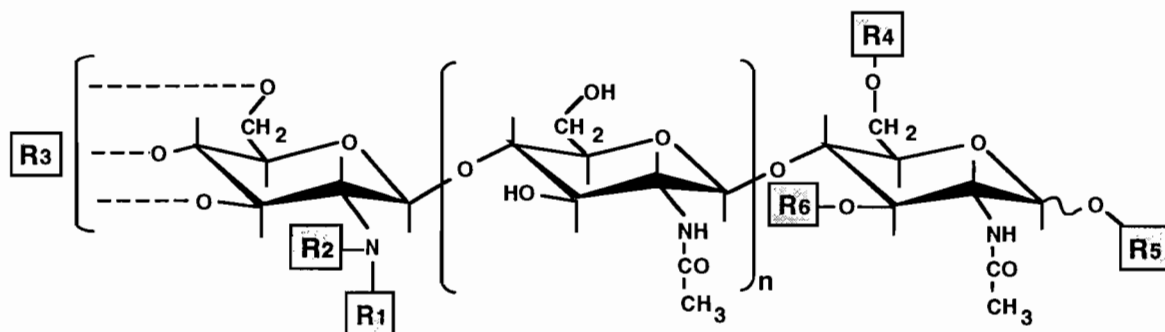
Les gènes de spécificité d'hôte *nodEF*, *nodH* et *nodPQ* sont indispensables pour la nodulation d'une espèce donnée (Hirsh, 1992 ; Dénarié *et al.*, 1996 ; Long, 1996). Les gènes *nod* spécifiques tels que *nodH*, *nodPQ* et *nodFE* sont présents chez certaines espèces et non chez d'autres. Une mutation de l'un de ces gènes provoque une altération du spectre d'hôte, et il n'y a pas de complémentarité interspécifique possible. De même, l'introduction de l'un de ces gènes dans une espèce différente modifie son spectre d'hôte. Les gènes *nod* spécifiques sont impliqués dans la substitution de la molécule de base des facteurs Nod, les rendant ainsi spécifiques de leur hôte.

C - Les gènes *nod* régulateurs.

Le gène *nodD* dont le produit est le principal élément de régulation des autres gènes *nod* (Schlaman *et al.*, 1992a) est présent chez tous les rhizobiums (Martinez *et al.*, 1990 ; Long, 1992). Le nombre de copies fonctionnelles est variable d'une espèce à l'autre, avec une copie chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* et bv. *trifolii* (Downie *et al.*, 1985) et chez *Azorhizobium caulinodans* (Goethals *et al.*, 1990) alors que chez *Sinorhizobium meliloti* on compte trois copies. La mutation de l'un des allèles *nodD* conduit à un faible retard de la nodulation (Göttfert *et al.*, 1986), par contre si aucune copie n'est fonctionnelle, on observe une perte totale de l'aptitude à noduler. En outre *Sinorhizobium meliloti* possède un quatrième gène homologue à *nodD*, le gène *SyrM* pour Symbiotic Regulation (Mulligan et Long, 1989 ; Barnett et Long, 1990).

Les différentes protéines NodD ainsi que *SyrM* font partie de la famille des régulateurs transcriptionnels du type LysR. L'interaction des protéines NodD avec les inducteurs qui sont des composés phénoliques de la famille des flavonoïdes synthétisés par les légumineuses est fonction du spectre d'hôte du rhizobium considéré (Spaink *et al.*, 1987a). Les protéines NodD se lient à l'ADN dans la région 5' des opérons *nod* au niveau d'une séquence de 47 pb appelée "*nod box*" (Rostas *et al.*, 1986). Chez *Sinorhizobium meliloti*, deux gènes *nolR* et *SyrM* codent pour des protéines régulatrices. *NolR* est un répresseur de l'expression de *nodD1* et *nodD2* (Kondorosi *et al.*, 1989). Le gène *SyrM* contrôle positivement l'expression de *nodD3* qui, lui-même contrôle positivement *SyrM*. *SyrM* contrôle également la biosynthèse des exopolysaccharides.

Tableau 3. Structure chimique des facteurs Nod majoritairement produits par différentes espèces de rhizobia. (d'après Dénarié *et al.*, 1996 ; Perret *et al.*, 2000).



Espèces/souches	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₆	n	Références
<i>S. meliloti</i> RCR2011	H	C16:1, C16:2, C16:3, C18-C26 (w-1) OH	Ac, H	S	H	1, 2, 3	Lerouge <i>et al.</i> , 1990 Roche <i>et al.</i> , 1991a Schultze <i>et al.</i> , 1992 Demont <i>et al.</i> , 1993
<i>R. leg. bv. viciae</i> RBL5560	H	C18:1, C18:4	Ac, H	H	H	2, 3	Spaink <i>et al.</i> , 1991, 1995a
<i>R. leg. bv. viciae</i> TOM	H	C18:1, C18:4	Ac, H	Ac	H	2, 3	Firmin <i>et al.</i> , 1993
<i>R. leg. bv. trifolii</i> ANU843	H	C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C20:3	Ac, H	H	H	2, 3	Spaink <i>et al.</i> , 1995a Orgambide <i>et al.</i> , 1995
<i>R. leg. bv. trifolii</i> LPR5045	H	C18:0, C18:1, C20:3, C20:4	Ac, H	H	H	1, 2, 3	van der Drift <i>et al.</i> , 1996
<i>M. loti</i> NZP2037	Me	C18:0, C18:1	Cb, H	AcFuc	H	1, 2	Lopez-Lara <i>et al.</i> , 1995a
<i>M. loti</i> NZP2213	H	C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C20:0, C20:1, C22:1	Cb, H	Fuc, AcFuc	H	1, 2	Olsthoorn <i>et al.</i> , 1998
<i>R. etli</i> CFN42	Me	C18:1	Cb, H	AcFuc	H	2, 3	Cardenas <i>et al.</i> , 1995
<i>R. etli</i> CE3	Me	C18:0, C18:1	Cb, H	AcFuc	H	2, 3	Poupot <i>et al.</i> , 1995b
<i>R. tropici</i> CFN299	Me	C18:1	H	S, H	H	2, 3	Poupot <i>et al.</i> , 1993 Folch-Mallol <i>et al.</i> , 1996
<i>R. sp</i> GRH2	Me, H	C18:1	H	S, H	H	1, 2, 3	Lopez-Lara <i>et al.</i> , 1995b
<i>S. teranga</i> ORS1073	Me	C16:0, C18:0, C18:1	Cb	S, H	H	2, 3	Lorquin <i>et al.</i> , 1997a
<i>R. sp</i> ORS1001	Me	C16:0, C18:0, C18:1	Cb	S, H	H	2, 3	Lorquin <i>et al.</i> , 1997a
<i>B. sp</i>	Me, H	C18:1	Cb	MeFuc, SMeFuc	H	3	Ferro <i>et al.</i> , 2000
<i>S. sp.</i> NGR234	Me	C16:0, C18:0, C18:1	Cb, H	MeFuc, AcMeFuc, SMeFuc	H	2, 3	Price <i>et al.</i> , 1992 Jabbouri <i>et al.</i> , 1995
<i>S. fredii</i> USDA257	H	C18:1	H	Fuc, MeFuc	H	1, 2, 3	Bec-Ferté <i>et al.</i> , 1994
<i>S. fredii</i> USDA191	H	C18:0, C18:1, C16:1	H	Fuc, MeFuc	H	1, 2, 3	Bec-Ferté <i>et al.</i> , 1996
<i>B. japonicum</i> USDA110	H	C16:0, C16:1, C18:1	H	MeFuc	H	2, 3	Sanjuan <i>et al.</i> , 1992 Carlson <i>et al.</i> , 1993
<i>B. elkanii</i> USDA61	Me, H	C18:1	Ac, Cb, H	Fuc, MeFuc	H	1, 2, 3	Carlson <i>et al.</i> , 1993
<i>A. caulinodans</i> ORS571	Me	C16:0, C18:1	Cb, H	Fuc, H	Ara, H	1, 2, 3	Mergaert <i>et al.</i> , 1993, 1997a
<i>S. teranga</i> ORS604	Me	C16:0, C18:1	Cb	Fuc, H	Ara, H	2, 3	Lorquin <i>et al.</i> , 1997b
<i>S. saheli</i> ORS611	Me	C16:0, C18:1	Cb	Fuc, H	Ara, H	2, 3	Lorquin <i>et al.</i> , 1997b
<i>R. galegae</i>	Ac	C18:1, C18:2, C18:3, C20:2, C20:3	Cb, H	H	H	1, 2	Yang <i>et al.</i> , 1999
<i>M. huakuii</i>	H	C18:4	H	S, H	H	1, 2	Yang <i>et al.</i> , 1999
<i>B. aspalati</i>	Me	C18:1	Cb	H	H	3, 4, 5	Boone <i>et al.</i> , 1999

Abbréviations : Ac : acétyl ; Ara : arabinose ; Cb : carbamoyl ; Fuc : fucose ; S : sulfate ; Me : méthyl ; Acfuc : 4-O-acétyl fucose ; Mefuc : 2-O-méthyl fucose ; AcMefuc : 4-O-acétyl-2-O-méthyl fucose ; SMeFuc : 3-O-sulfate-2-O-méthyl fucose. R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ : substituants ; n : nombre de résidus glucosamines. S. : *Sinorhizobium* ; R. : *Rhizobium* ; B. : *Bradyrhizobium* ; A. : *Azorhizobium* ; M. : *Mesorhizobium*. R₅ = H pour toutes les espèces sauf pour *B. elkanii* où R₅ = H, glycérol et pour *R. tropici* où R₅ = H, mannose.

IV - 2 - Les facteurs de nodulation ou facteurs nod.

Malgré la grande diversité taxonomique des rhizobiums, les facteurs Nod isolés de diverses espèces bactériennes appartiennent à la même famille chimique : ce sont des lipochitooligosaccharides N-acétylés à leur extrémité non réductrice. Ils possèdent un squelette de base constitué de trois à cinq résidus de glucosamine. Une chaîne d'acide gras est fixée sur le groupe aminé de la glucosamine terminale non réductrice, les autres résidus glucosaminyl sont N-acétylés. Selon les espèces, le squelette de base est décoré par des groupes chimiques variés (fucose, carbamate, méthyl, arabinose) présents sur les glucosamines situés aux deux extrémités (tableau 3). Les enzymes Nod intervenant dans la constitution du squelette de base sont codées par les gènes *nodABC*, tandis que les enzymes Nod intervenant dans la synthèse ou le transfert des groupes chimiques additionnels sont codées par les gènes *nod* spécifiques (Freiberg *et al.*, 1997). L'étroite relation entre la structure des facteurs Nod et la spécificité d'hôte a été démontrée par plusieurs travaux (Roche *et al.*, 1991a; Dénarié *et al.*, 1996 ; Lortet *et al.*, 1996 ; Lorquin *et al.*, 1997a).

Tableau 4. Les différentes espèces de *Crotalaria* repertoriées au Sénégal (Berhaut, 1976) et leur classification d'après (Polhill, 1982).

Espèces	Sections	Sous-sections
<i>C. atrorubens</i> G. Hochst. <i>C. confusa</i> Hepper <i>C. ebenoides</i> (G. & Perr.) Walp. <i>C. macrocalyx</i> Benth. <i>C. ononoïdes</i> Benth. <i>C. perrottetii</i> DC.	<i>Chrysocalycinae</i>	<i>Chrysocalycinae</i>
<i>C. cylindrocarpa</i> DC. <i>C. goreensis</i> G. & Perr.. <i>C. lachnophora</i> A. Rich. <i>C. podocarpa</i> DC.	<i>Chrysocalycinae</i>	<i>Stipulosae</i>
<i>C. glauca</i> Wild. <i>C. glaucoïdes</i> Bak.	<i>Chrysocalycinae</i>	<i>Glaucæ</i>
<i>C. barkae</i> Chweinf.	<i>Chrysocalycinae</i>	<i>Incanae</i>
<i>C. comosa</i> Baker. <i>C. deightonii</i> Hepper <i>C. lathyroides</i> G. & Perr. <i>C. ochroleuca</i> G. Don <i>C. onobrychis</i> A. Rich. <i>C. pallida</i> Ait. <i>C. zanzibarica</i> Benth.	<i>Hedriocarpæ</i>	<i>Macrostachyæ</i>
<i>C. arenaria</i> Benth. <i>C. calycina</i> Schrank <i>C. juncea</i> Linn. <i>C. occidentalis</i> Hepper	<i>Calycinae</i>	
<i>C. leprieurii</i> G. & Perr. <i>C. microcarpa</i> Hochst. <i>C. sphaerocarpa</i> Perr.	<i>Geniculatae</i>	
<i>C. retusa</i> Linn.	<i>Crotalaria</i>	<i>Crotalaria</i>
<i>C. senegalensis</i> (Pers.) Bacle <i>C. spinosa</i> Hochst.	<i>Crotalaria</i>	<i>Longirostres</i>
<i>C. cephalotes</i> Steud. <i>C. hyssopifolia</i> Klotzsch <i>C. pseudotenuirama</i> Torre	<i>Dispermae</i>	

V - LES CROTALAIRES

V - 1 - Généralités

Les légumineuses du genre *Crotalaria* qui comptent près de 600 espèces appartiennent à la sous-famille des *Papilionoideae* et à la tribu des *Crotalarieae* qu'elles partagent avec les genres *Aspalathus*, *Raphnia* et *Lotononis* (Allen et Allen, 1981 ; Polhill, 1982). Les crotalaires sont des herbacées annuelles ou pérennes et parfois des arbustes. Elles ont des feuilles soit unifoliées (*C. retusa*) ou composées avec 3 folioles, rarement 5 ou 7. Les fleurs sont généralement jaunes à corolle très vive occasionnellement striée en rouge, regroupées en racème terminal ou opposé aux feuilles.

Les représentants de ce vaste genre sont bien répartis dans les régions tropicales et chaudes des deux hémisphères, mais sont plus nombreux à l'Ouest et au Sud de l'Afrique tropicale. Le genre *Crotalaria* est le plus vaste genre de plantes (plus de 500 espèces) communément rencontré dans ce continent où il colonise de vastes espaces, allant des hautes montagnes aux zones semi-désertiques (Polhill, 1982). L'une des particularités des espèces africaines est l'énorme prolifération le long du bassin des fleuves Congo-Zambèze avec un pic au Sud du lac Tanganyika où 75 espèces ont été collectées dans un rayon de 50 kilomètres.

Le genre est aussi bien représenté en Afrique de l'Ouest notamment au Sénégal où 33 espèces ont été répertoriées (Berhaut, 1976). Ces espèces se répartissent dans 6 des 8 sections définies par Polhill (Polhill, 1982) sur la base des caractéristiques morphologiques des fleurs (tableau 4). Elles se rencontrent

dans l'ensemble du pays avec un gradient croissant Nord-Sud concernant la diversité des espèces.

A l'instar de la grande majorité des légumineuses, les crotalaires forment des associations symbiotiques fixatrices d'azote avec les rhizobiums d'où leur utilisation dans les systèmes culturaux pour l'amélioration des sols (Allen et Allen, 1981). Cependant les études portant sur les rhizobiums associés aux crotalaires sont rares et se limitent à des tests d'infection et de spécificité de quelques souches. Ainsi les rhizobiums associés aux crotalaires sont depuis longtemps décrits comme étant des *Bradyrhizobium sp.* non spécifiques (Wilson, 1939, 1944) et appartenant au groupe Cowpea (Carroll, 1934, Conklin, 1936, Burton, 1952). Contrairement au partenaire bactérien, plusieurs espèces de crotalaires sont bien étudiées pour leur toxicité (Allen et Allen, 1981 ; Polhill, 1982), pour leur intérêt agronomique (fixation N₂ et engrais vert), pour les qualités fourragères de certaines espèces et pour de nombreux autres usages.

V - 2 - Biochimie et toxicité des crotalaires

Plusieurs cas d'empoisonnements ou de maladies du bétail suite à l'ingestion d'espèces de crotalaires, ont été observés en Afrique et aux Etats-Unis (Watt et Brandwijk, 1962 ; Verdcourt et Trump, 1969). La maladie liée à l'ingestion de crotalaires est le crotalisme. Les animaux sont plus exposés en saison sèche quand le fourrage devient très rare. La forme léthale du crotalisme affecte le système nerveux, les poumons, le foie avec une occlusion des veines hépatiques (Polhill, 1982). La toxicité des crotalaires a été mise en évidence chez divers animaux domestiques ou d'élevage : *C. grahamiana* et *C. pallida* sur les chevaux (Arzt et Mount, 1999), *C. retusa*, *C. spectabilis* et *C. goreensis* sur la volaille (Norton et O'Rourke, 1979 ; Alfonso et al., 1993), *C. juncea* et *C.*

ochroleuca sur la rat (Mkiwa *et al.*, 1994 ; Prakash *et al.*, 1995) et *C. saltiana* sur les chèvres (Barri *et al.*, 1984).

La toxicité des crotalaires est expliquée par la présence d'alcaloïdes de type pyrrolizidine et d'acides aminés toxiques tels que l'acide acétyldiaminopropionique (ADAP), l'acide oxalyldiaminopropionique (ODAP), l'acide oxalyldiaminobutyrique (ODAB) ou la γ -glutamyl tyrosine (Allen et Allen, 1991 ; Polhill, 1982). De la monocrotaline ($C_{16}H_{23}NO_6$) et d'autres alcaloïdes de type pyrrolizidine ont été mis en évidence chez *C. spectabilis* (Neal *et al.*, 1935 ; Kingsbury, 1964), *C. retusa* et d'autres espèces de la sous section *Crotalaria* tel que *C. berteroana*. Si tous les alcaloïdes sont hépatotoxiques, il apparaît que la monocrotaline, la rétrorsine ($C_{18}H_{25}NO_6$) et la rétronécine ($C_8H_{13}NO_2$) sont les plus toxiques. La toxicité est due à la transformation des alcaloïdes insaturés en métabolites réactifs toxiques, probablement des dérivés pyrroliques (Deleve *et al.*, 1996). Chez *C. spectabilis*, la monocrotaline a été isolée à la fois des graines des feuilles et des tiges (Neal *et al.*, 1935).

Près d'une cinquantaine d'alcaloïdes de type pyrrolizidine ont été isolés de 45 espèces de *Crotalaria* (Mears et Mabry, 1971 ; Harborne *et al.*, 1971 ; Kinghorn et Smolenski, 1981) et ils semblent être des marqueurs biochimiques du genre *Crotalaria*, puis que n'ayant jamais été détectés chez d'autres légumineuses à part quelque peu chez *Laburnum* et *Adenocarpus*. Les graines des espèces de la section *Grandiflorae* et de la sous-section *Crotalaria* présentent les plus forts taux d'alcaloïdes, avec la monocrotaline qui semble être une caractéristique de la sous-section *Crotalaria* qui renferme *C. spectabilis* et *C. retusa* qui sont particulièrement toxiques.

Tableau 5. Accumulation d'alcaloïdes et d'acides aminés toxiques dans les graines de crotalaires Africaines (d'après Polhill, 1982).

Sections	Sous-sections	ODAP	ODAB	ADAP	Glu. Tyr.	Conc. Alcaloïdes
<i>Grandiflorae</i>		(+)	-	+	+	Forte
<i>Chrysocalycinae</i>	<i>Incanae</i>	+	+	+	-	
	<i>Stipulosae</i>	-	-	-	+	
<i>Hedriocarpae</i>	<i>Hedriocarpae</i>	-	-	-	+	
	<i>Macrostachyae</i>	(+)/-	-	-	+	
<i>Crotalaria</i>	<i>Crotalaria</i>	-	-	-	+	Forte
	<i>Longirostres</i>	-	-	-	+	

ODAP : Acide Oxalyldiaminopropionique

ODAB : Acide Oxalyldiaminobutyrique

ADAP : Acide Acétyldiaminopropionique

Glu.Tyr. : γ - Glutamyl-Tyrosine

Des travaux portant sur les graines de 85 espèces africaines ont montré, que la répartition des alcaloïdes et des acides aminés toxiques chez les différentes espèces de crotalaires avait une signification taxonomique (Pilbeam et Bell, 1981). Ainsi dans la section des *Grandiflorae* on note une accumulation d'alcaloïdes et d'acides aminés toxiques, alors que dans la section des *Chrysocalycinae* il y a une nette distinction entre la sous-section des *Incanae* et celle des *Stipulosae*. Dans la sous-section des *Incanae*, la plupart des espèces accumulent de l'ODAB, de l'ODAP et de l'ADAP alors que dans la sous-section des *Stipulosae*, on a plutôt une accumulation du γ -glutamyl tyrosine et fortes concentrations d'alcaloïdes. Dans la section des *Heridocarpae*, on a généralement la présence du γ -glutamyl tyrosine et l'absence de l'ODAB, de l'ODAP et de l'ADAP, cependant dans la sous-section des *Macrostachyae* on a une accumulation d'isowillardine (tableau 5).

V - 3 - Utilisations des crotalaires

De nombreuses espèces de crotalaires sont utilisées comme engrais vert dans le monde. Au Sri-Lanka, *C. anagyroides* est utilisée avec succès dans l'amélioration de la fertilité des sols dans les plantations de thé (Sandanam, 1976). Au Brésil, *C. brevidens* est utilisée dans les plantations de café comme plante de couverture, pour éliminer les mauvaises herbes et pour lutter contre l'érosion du sol (Muzilli *et al.*, 1992). En Zambie, *C. zanzibarica* permet d'augmenter le rendement du haricot (Mwambazi, 1998), alors qu'en Côte d'Ivoire *C. juncea* est plantée pour restaurer la fertilité des sols dans les systèmes rizicoles des hauts plateaux (Becker et Johnson, 1999). En Tanzanie et en Uganda, *C. ochroleuca* est utilisée comme engrais vert en association avec le maïs (Kullaya *et al.*, 1995, 1998 ; Fischler *et al.*, 1999).

Les propriétés nématicides de certaines espèces constituent un autre intérêt agronomique des crotalaires. En 1986, Sano et Nakasano ont montré que le développement larvaire de *Meloidogyne incognita* inoculé à *C. spectabilis* était bloqué au troisième stade de développement. Au Brésil, *C. spectabilis* plantée à 17 ou 34 plantes par m² réduit considérablement les populations de *Meloidogyne incognita* (Huang *et al.*, 1981). Toujours au Brésil, Silva *et al.*, (1989a, 1989b et 1989c) ont montré que *C. spectabilis* et *C. juncea* pouvaient arrêter le développement larvaire de *M. javanica* alors que les espèces *C. spectabilis*, *C. juncea*, *C. grantiana*, *C. paulina*, *C. retusa*, *C. mucronata*, *C. lanceolata*, *C. breviflora* et *C. pallida* permettent d'éradiquer les populations de *Rotylenchulus reniformis*, *Pratylenchus brachyurus* et *Pratylenchus zaeae*. En Inde, *C. juncea* permet de protéger les cultures de canne à sucre des dégâts de *Pratylenchus zaeae* (Sundararaj et Mehta, 1990). Aux Etats Unis (Floride), le rendement de l'aubergine et de la courge augmente avec une rotation avec *C. spectabilis* qui élimine les populations de *Meloidogyne arenaria* (McSorley *et al.*, 1994).

Certaines espèces non toxiques ou à très faible taux d'alcaloïdes sont utilisées comme fourrage pour le bétail (Machado *et al.*, 1994). *C. juncea* (Sunn-hemp) dont l'écorce fournit des fibres de très bonne qualité est utilisée dans l'industrie du tabac pour la production de papier fin (Salgado *et al.*, 1984 ; Wutke *et al.*, 1993). Près de 130 000 tonnes sont produites annuellement en Inde et au Brésil (Vietmeyer, 1979). En Inde, les fibres de *C. juncea* sont utilisées pour la fabrication de filets de pêche et de cordages marins. Les alcaloïdes et autres principes actifs font l'objet de plusieurs usages en médecine traditionnelle. Les parties aériennes de *C. podocarpa* sont connues en homéopathie pour leur activité anti-rhumatique et antiphlogestique (Kokwaro, 1976 ; Charrtte, 1987 ; Herberg et Staugard, 1989).

Ces quelques exemples montrent l'extrême diversité d'utilisation des crotalaires

VI - LE GENRE *METHYLOBACTERIUM*

VI - 1 - Les bactéries méthylootrophes

Les bactéries méthylootrophes sont des bactéries aérobies qui utilisent des composés en C₁ plus réduits que l'acide formique et le CO₂ comme source de carbone et d'énergie et qui assimilent le carbone sous la forme formaldéhyde (Whittenbury *et al.*, 1970 ; Whittenbury et Dalton, 1981 ; Anthony, 1982, 1991 ; Lidstrom, 1992 ; Barta et Hanson, 1993). Elles sont divisées en deux groupes : celles qui peuvent utiliser le méthane comme source de carbone et d'énergie appelés méthanotrophes, et celles qui ne peuvent pas dégrader le méthane (Hanson *et al.*, 1993 ; Hanson et Hanson, 1996).

La taxonomie des bactéries méthylootrophes, et chez *Methylobacterium* en particulier, était au début largement basée sur leurs propriétés phénotypiques, biochimiques et physiologiques. Ainsi, en fonction de la voie d'assimilation du carbone, Whittenbury *et al.*, (1970) avaient classé les méthanotrophes en deux types.

- les bactéries du type I utilisent la voie de la Ribulose monophosphate pour l'assimilation du carbone. Ce type comprend les genres *Methylomonas*, *Methylobacter*, et *Methylococcus*.

- le type II comprend les genres *Methylosinus* et *Methylocystus* qui assimilent le carbone par la voie de la sérine (Whittenbury et Dalton, 1981 ; Whittenbury et Krieg, 1984).

Chez les aérobies méthylootrophes (non méthanotrophes), on retrouve également les deux types. Ce groupe présente une plus grande diversité que les

méthanotrophes et renferme aussi bien des gram+ que des gram-, capables de pousser sur des composés à un atome de carbone tels que le méthanol, la méthylamine etc... De plus ce groupe contient des méthylotrophes facultatifs capables d'utiliser hétérotrophiquement des composés à plusieurs carbones (Lidstrom, 1992 ; Barta et Hanson, 1993 ; Green, 1993)

VI - 2 - Taxonomie du genre *Methylobacterium*

Parmi les organismes méthylotrophes facultatifs qui utilisent le cycle de la sérine, on distingue le genre *Methylobacterium*. Il est composé d'une variété de bactéries, toutes pigmentées en rose grâce à la présence de pigments photosynthétiques, méthylotrophes facultatifs capables de croître sur des composés à un carbone, tels que le formaldéhyde, le formate ou encore le méthanol comme seule source de carbone et d'énergie ainsi que sur une grande variété de substrats pluricarbonés. La majeure partie, mais pas toutes sont capables de pousser sur le Nutrient Agar et certaines sur des amines méthylés. Une seule souche a été décrite comme pouvant utiliser le méthane comme seule source de carbone.

La première souche de *Methylobacterium* décrite dans la littérature a été isolée par Bassalik (1913) à partir du lombric, et appelée *Bacillus extorquens*. Bien que très présents dans le sol et l'environnement, les méthylotrophes facultatifs n'ont été isolés et étudiés sérieusement qu'à partir des années 60/70 quand on a commencé à s'intéresser aux voies d'assimilation des composés à un carbone et aux applications commerciales de ces organismes.

Avant 1960, la taxonomie des isolats assignés actuellement au genre *Methylobacterium* était très confuse. En effet bien que gram-, certaines souches

sont gram variable. Cette Variabilité est associée à des propriétés morphologiques également variables contribuant ainsi à la confusion autour de leur classification comme le montre les exemples suivants.

Bacillus extorquens de Bassalik, a été reclassé dans le genre *Vibrio* en tant que *Vibrio extorqens* par Bhat et Barker, (1948). Krasil'nikov, (1959) et Bassalik *et al.*, (1960), l'ont ensuite respectivement transféré dans les genres *Pseudomonas* et *Flavobacterium*, avant qu'il ne reste temporairement classé dans la 8^{ème} édition du Bergey's Manual of Determinative Bacteriology comme *Pseudomonas extorquens incertae sedis* (Doudoroff et Palleroni, 1974). En 1927 dans une étude des bactéries utilisant les amines, Den Dooren de Jong a décrit ses isolats pigmentés en rose et capables d'utiliser la méthylamine comme *Protaminobacter ruber*. Plus tard, De Vries et Derx, (1953) ont trouvé que les souches de *Protaminobacter* étaient très similaires aux souches qu'ils ont isolé des nodules et surfaces de feuilles. Sur la base de leurs propriétés morphologiques, De Vries et Derx, (1953) regroupèrent *Protaminobacter ruber* avec leurs isolats dans le genre *Mycoplana* comme *Mycoplana rubra*. En 1961, Peel et Quayle étudiant les voies d'assimilation des composés à un carbone chez les méthylotrophes, ont noté des similarités entre leurs propres isolats, *Pseudomonas* AM1 et de nombreuses autres bactéries méthylotrophes telles que *Vibrio extorquens*, *Protaminobacter ruber* et *Pseudomonas methanica* isolée par Dworkin et Foster, (1956). Ils ont ainsi remis en cause la classification de ces organismes dans des genres différents.

Dans une première étude taxonomique, Stocks et Mc Cleskey, (1964) ont comparé *Vibrio extorqens*, *Protaminobacter ruber*, *Pseudomonas* AM1 et la souche de *Pseudomonas methanica* de Harrington et Kallio, (1960) avec leurs

propres isolats et en ont conclus que tous ces microorganismes étaient très semblables et qu'ils devraient tous être considérés comme des souches de *Vibrio extorquens*, avec la réserve que le terme *Vibrio* n'était certainement pas approprié pour désigner le genre.

Dans des études ultérieures, Kouno et Ozaki, (1975) ont isolé 59 méthylotrophes facultatifs à partir de divers échantillons de sol et d'eau, tandis que Austin *et al.*, (1978), ont étudié des isolats de surface foliaire de *Lolium perenne*. Dans les deux cas, il a été mis en évidence que la taxonomie de ces organismes était très confuse et méritait d'être éclaircie. Dans la même lancée Austin et Goodfellow, (1979) conclurent que leurs isolats étaient suffisamment différents de *Protaminobacter ruber*, *Pseudomonas rhodos* (Heumann, 1962) et de *Pseudomonas* AM1 pour être placés dans une nouvelle espèce qu'ils ont appelé *Pseudomonas mesophilica*.

La première souche de bactérie méthylotrophe facultatif capable d'utiliser le méthane a été isolé par Patt *et al.*, (1974), qui créèrent un nouveau genre *Methylobacterium* avec une seule espèce *Methylobacterium organophilum*. Cependant, la description du genre n'a été basée que sur une seule souche (*Methylobacterium organophilum* xx) qui a depuis, perdu ses capacités à oxyder le méthane.

Dans une étude taxonomique détaillée, Green et Bousfield, (1982) ont montré que *Methylobacterium organophilum* xx était phénotypiquement très similaire aux autres méthylotrophes facultatifs décrits précédemment et qui sont tous incapables d'utiliser le méthane. Les 149 isolats dont *Methylobacterium organophilum* xx étudiés sur la base de 140 caractéristiques biochimiques, physiologiques et morphologiques se répartissent en deux clusters.

Ces deux clusters présentent entre eux un pourcentage de similarité de 70% et une similarité interne de l'ordre de 80%. La souche de *Methylobacterium organophilum* NCIB 11278 se retrouve dans le grand cluster avec 90% de similarité avec ses plus proches voisins.

Au vue de ces résultats, Green et Bousfield suggérèrent que tous les Méthylotrophes facultatifs constituent un seul taxon distinct et doivent être exclus des genres dans lesquels ils ont été précédemment classés (*Bacillus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Protaminobacter*, *Mycoplasma*). Le genre *Methylobacterium* a été choisi pour ce taxon (Green et Bousfield, 1981). Cependant, vu que la définition de *Methylobacterium* par Patt *et al.*, (1976) excluait les organismes incapables d'utiliser le méthane, le genre a été révisé (Green et Bousfield, 1983) permettant d'inclure tous les méthylotrophes facultatifs, l'assimilation du méthane n'étant plus la caractéristique principale du genre. Après cette révision, trois espèces ont été décrites en plus de *Methylobacterium organophilum* : *Pseudomonas rhodos* (Heumann, 1962) est devenu *Methylobacterium rhodinum* comb. nov. corrig., *Pseudomonas mesophilica* (Austin et Goodfellow, 1979) est devenu *Methylobacterium mesophilicum* comb. nov. et *Pseudomonas radiora* (Ito et Lizuka, 1971) est devenu *Methylobacterium radiotolerans* comb. nov. corrig.

Malgré la forte similarité phénotypique dans chaque cluster, il existait des doutes concernant l'hétérogénéité interne du groupe *Methylobacterium*. Ainsi, Urakami et Komagata, (1981) sur la base d'études électrophorétiques des enzymes, ont pensé qu'il pouvait y avoir quatre groupes de méthylotrophes facultatifs et que d'autres études génétiques ou phylogénétiques devraient être faites avant que les souches ne puissent être classées dans de nouvelles espèces.

Tableau 6. Les différentes espèces de *Methylobacterium*.

Espèces	Références
<i>Methylobacterium rhodinum</i>	Heumann, 1962
<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	Ito and Lizuka, 1971
<i>Methylobacterium organophilum</i>	Patt <i>et al.</i> , 1976
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	Austin and Goodfellow, 1979
<i>Methylobacterium extorquens</i>	Urakami and Komagata, 1984
<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	Green <i>et al.</i> , 1988
<i>Methylobacterium rhodesianum</i>	Green <i>et al.</i> , 1988
<i>Methylobacterium zatmanii</i>	Green <i>et al.</i> , 1988
<i>Methylobacterium aminovorans</i>	Urakami <i>et al.</i> , 1993
<i>Methylobacterium thiocyanatum</i>	Wood <i>et al.</i> , 1999
<i>Methylobacterium dichloromethanicum</i>	Doronina <i>et al.</i> , 2000

Cette idée a été renforcée par les études de Hood *et al.*, (1887 ; 1988) portant sur des souches représentatives des méthylotrophes facultatifs. Ces travaux portant sur les homologies ADN/ADN et la comparaison des profils électrophorétiques des protéines totales solubles, ont révélé l'existence de cinq groupes d'homologie.

Deux de ces groupes correspondent aux espèces *Methylobacterium radiotolerans* et *Methylobacterium extorquens*, alors que les autres ne correspondent à aucune espèce de *Methylobacterium*. En effet, les souches types de *Methylobacterium organophilum*, *Methylobacterium rhodinum* et *Methylobacterium mesophilicum*, les seules autres espèces reconnues, étaient à part les unes des autres et séparées des cinq groupes d'homologie. Sur la base de ces résultats trois nouvelles espèces de *Methylobacterium* ont été proposées (Green *et al.*, 1988) : *Methylobacterium rhodesianum* sp nov. ; *Methylobacterium zatmanii* sp nov. et *Methylobacterium fujisawaense* sp nov. Actuellement le genre *Methylobacterium* compte onze espèces (tableau 6)

VI - 3 - Phylogénie des méthylotrophes

La classification a été pendant longtemps un problème chez les méthylotrophes. En effet, vue la grande variété des microorganismes désignés comme méthylotrophes et les limites des techniques classiques de taxonomie dûes aux capacités nutritionnelles restreintes de la plupart de ces bactéries (Green, 1993), le séquençage de l'ARN 16S a été utilisé pour clarifier les relations taxonomiques (Woese, 1987 ; Tsuji *et al.*, 1990 ; Bratina *et al.*, 1992 ; Brusseau *et al.*, 1994). Les travaux de Tsuji *et al.*, (1990), confirmés par ceux de Bratina *et al.*, (1992), ont démontré qu'il était possible de distinguer les bactéries méthylotrophes par l'analyse des séquences de l'ADNr 16S.

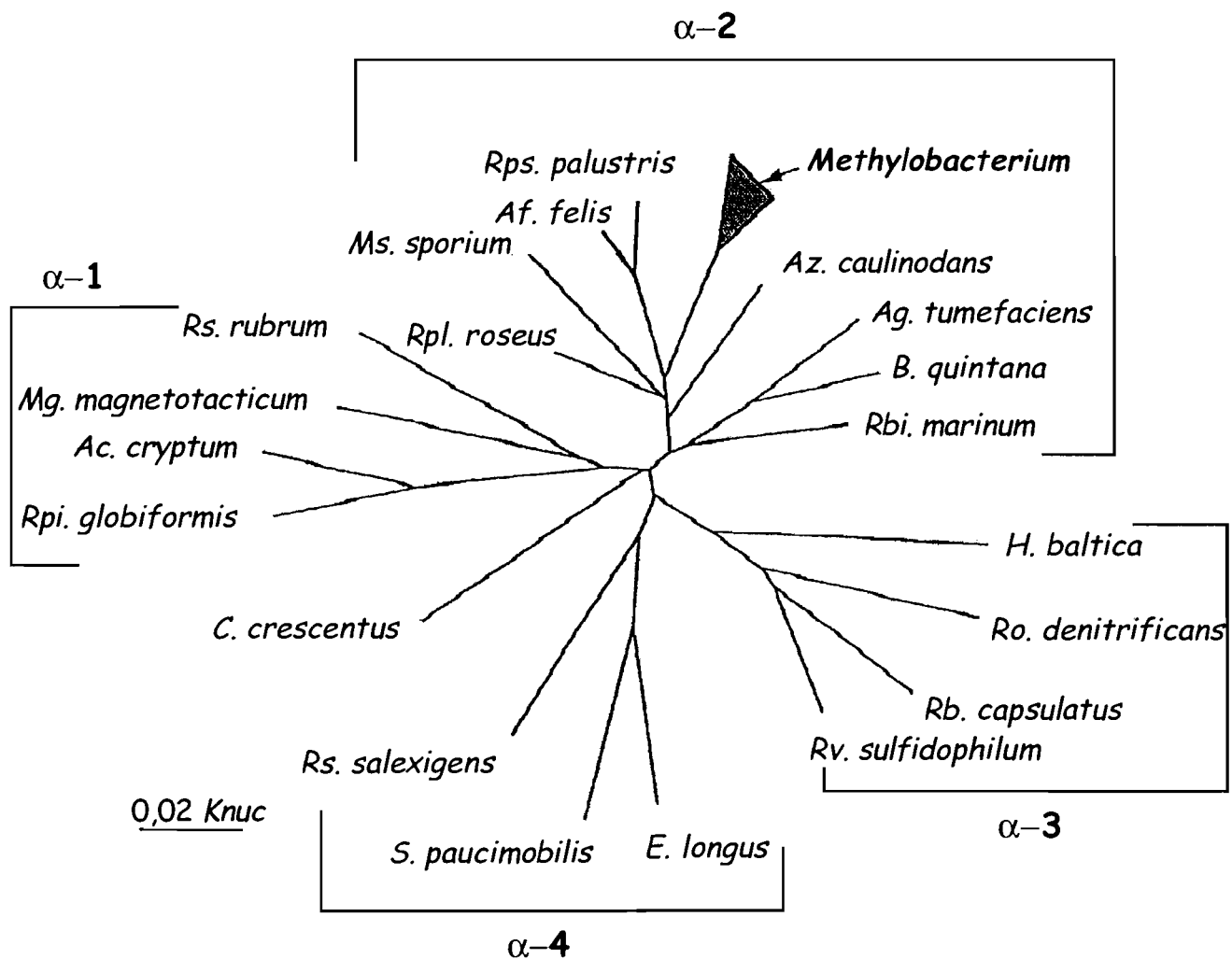


Figure 5. Arbre phylogénétique montrant la position du genre *Methylobacterium* parmi les membres de la sous-classe alpha des protéobactéries (d'après Hiraishi et al., 1995).

Abréviations : *Ac. cryptum*, *Acidophilium cryptum* ; *Af. felis*, *Afipia felis* ; *Ag. tumefaciens*, *Agrobacterium tumefaciens* ; *Az. caulinodans*, *Azorhizobium caulinodans* ; *B. quintana*, *Bartonella quintana* ; *C. crescentus*, *Caulobacter crescentus* ; *E. longus*, *Erythrobacter longus* ; *H. baltica*, *Hirschia baltica* ; *Mg. magnetotacticum*, *Magnetospirillum magnetotacticum* ; *Ms. sporium*, *Methylosinus sporium* ; *Rb. capsulatus*, *Rhodobacter capsulatus* ; *Rbi. marinum*, *Rhodobium marinum* ; *Rpl. roseus*, *Rhodoplanes roseus* ; *Rps. palustris*, *Rhodopseudomonas palustris* ; *Rs. rubrum*, *Rhodospirillum rubrum* ; *Rs. salexigens*, *Rhodospirillum salexigens* ; *Rv. sulfidophilum*, *Rhodovulum sulfidophilum* ; *Ro. denitrificans*, *Roseobacter denitrificans* ; *S. paucimobilis*, *Sphingomonas paucimobilis* ; *Rpi. globiformis*, *Rhodophila globiformis*.

- les méthanotrophes et les méthylotrophes (incapables d'oxyder le méthane tels que *Methylobacterium*) utilisant la voie de la sérine forment des clusters phylogénétiques distincts dans la subdivision α des protéobactéries définie par Woese (1987) lorsqu'on compare leur ARN 16S (figure 5).

- les bactéries méthylotrophes qui utilisent la voie de la ribulose monophosphate forment un groupe phylogénétique cohérent dans la subdivision β des protéobactéries.

- les méthanotrophes (sauf *Methylococcus capsulatus*) qui utilisent la voie de ribulose monophosphate se retrouvent dans la subdivision γ des protéobactéries.

VI - 4 - L'écologie des *Methylobacterium*

Les membres du genre *Methylobacterium* se rencontrent dans différents endroits (Green et Bousfield, 1981) tels que le sol, la poussière, les sédiments lacustres, l'eau, les surfaces et nodules foliaires, l'air, dans les environnements hospitaliers. Ils sont ainsi largement répartis dans la nature partout où l'on rencontre des composés à un carbone en abondance (Anthony, 1982). Ils sont souvent associés aux méthanotrophes probablement parce que ces derniers excrètent le méthanol qu'ils peuvent à leur tour assimiler (Hanson, 1980). De plus le méthanol est le produit de dégradation des pectines, lignines et autres composés contenant des groupes métoxy (Anthony, 1982). Les méthylotrophes facultatifs se rencontrent aussi dans les environnements aquatiques avec un peu d'oxygène dissout (Gräf et Bauer, 1973), endroits dans lesquels ils produisent des masses rougeâtres. A titre d'exemple, *Methylobacterium organophilum* a été isolé des sédiments du lac Mendota aux USA.

Les bords des routes constituent l'endroit où l'on rencontre le plus de méthylotrophes. Des isollements faits dans ces endroits suggèrent une corrélation entre le niveau du trafic automobile et le nombre de méthylotrophes (Green 1991). L'association *Methylobacterium* sp.-plantes a été étudiée par plusieurs auteurs. Austin *et al.*, (1978), ont montré que les méthylotrophes constituaient la majeure partie des organismes isolés des surfaces foliaires de *lollium perenne*. Yoshimura, (1982), a trouvé des organismes similaires en étudiant les bactéries des surfaces foliaires du Pin, et a montré que leur nombre variait considérablement en fonction de la saison et des conditions environnementales.

La présence de méthylotrophes facultatifs dans des nodules de feuilles a été également mise en évidence (Corpe et Basile, 1982) cependant le caractère symbiotique n'a pas été prouvé et aucune espèce de *Methylobacterium* n'a été démontrée comme fixatrice d'azote.

Les *Methylobacterium* sont souvent rencontrés comme contaminants dans des systèmes de distribution d'eau, les chambres froides de stockage de cultures bactériologiques, les produits pharmaceutiques, dans les fermenteurs et dans le milieu hospitalier (Gilardi et Faur, 1984). Dans le domaine hospitalier, ils constituent des pathogènes opportunistes chez les patients sérieusement affectés (immunité affaiblie) tel est le cas de *Methylobacterium zatmanii* (Hornei *et al.*, 1999) et de *Methylobacterium extorquens* (Kaye *et al.*, 1992).

VI - 5 - La physiologie

VI - 5 - 1 - Oxydation du méthanol

Les bactéries méthylotrophes peuvent être classées en fonction de la voie d'assimilation du carbone. L'utilisation d'enzymes appelées méthane

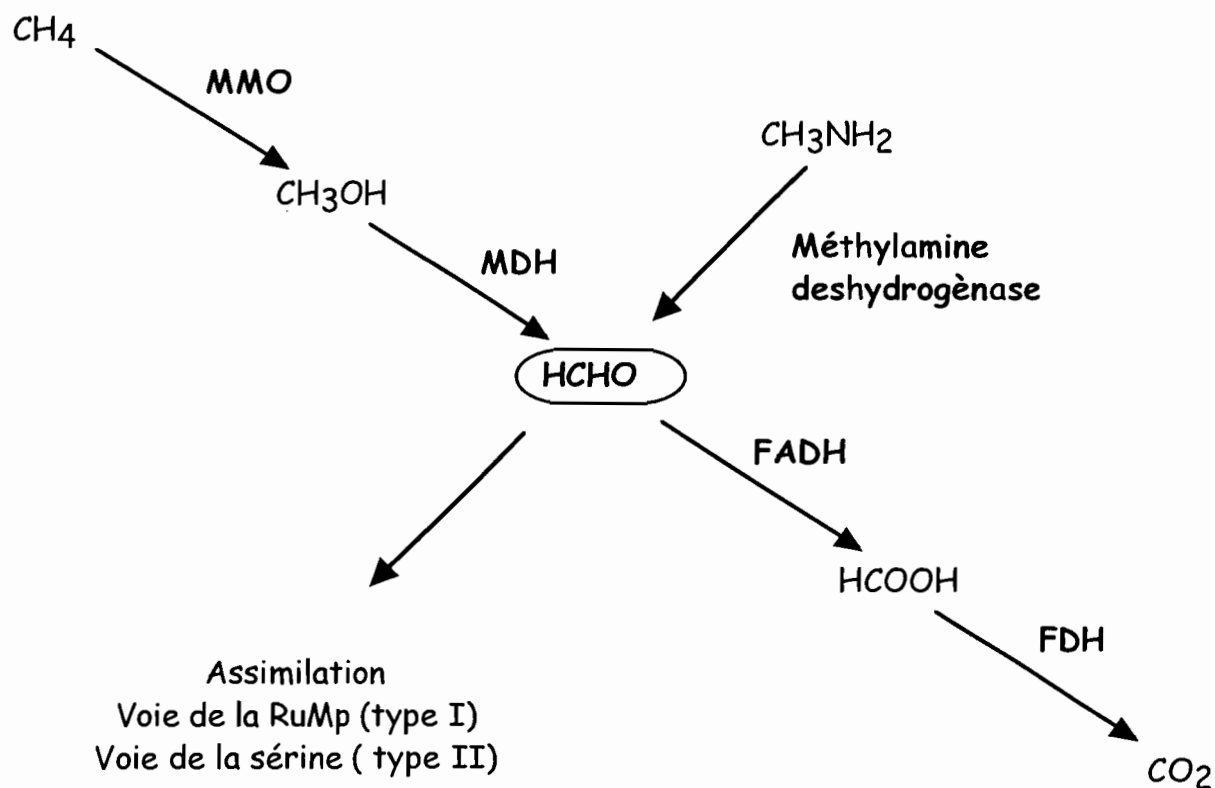


Figure 6. Voies d'oxydation du méthane et du méthanol et d'assimilation du formaldéhyde chez les bactéries méthylophiles (d'après Hanson & Hanson, 1996). MMO, méthane monooxygénase ; MDH, méthanol deshydrogénase ; FADH, formaldéhyde deshydrogénase ; FAD, formate deshydrogénase ; CH_4 , méthane ; CH_3OH , méthanol ; **HCHO**, formaldéhyde ; **HCOOH**, formate ; CH_3NH_2 , méthylamine ; RuMp, ribulose monophosphate.

monooxygénase pour catalyser l'oxydation du méthane en méthanol est la caractéristique principale des méthanotrophes. La Principale étape dans l'assimilation du carbone est l'oxydation du méthanol en formaldéhyde qui joue un rôle central. En effet, une partie du formaldéhyde est oxydée en CO₂ pour fournir de l'énergie et le reste est utilisé par les voies d'assimilation d'où l'importance clé du système enzymatique générant le formaldéhyde (figure 6).

Chez *Methylobacterium* comme chez tous les méthylotrophes l'oxydation du méthanol est réalisée par l'intermédiaire d'une enzyme ; la méthanol deshydrogénase (MDH). Cette enzyme qui oxyde les alcools primaires est liée à un cofacteur Pyrroloquinoline quinone (PQQ) (Anthony, 1986). Elle appartient à la famille des enzymes connues sous le nom de quinoprotéines. Les électrons issus de l'oxydation du méthanol sont transférés par la PQQ à un cytochrome spécifique soluble appelé cytochrome C, puis par l'intermédiaire d'autres transporteurs jusqu'à la terminale oxydase (Anthony, 1986). La MDH qui est constituée de deux sous unités dans une configuration $\alpha_2\beta_2$ (Nunn et Anthony, 1988) est très largement conservée chez les méthylotrophes gram- aussi bien au niveau des séquences d'acides aminés (Machlin et Hanson, 1988) qu'au niveau des protéines (Anthony, 1982).

D'autres MDH sont connues chez les méthylotrophes gram+. Chez une espèce de *Nocardia* méthylotrophe on rencontre une alcool deshydrogénase inhabituelle qui est NAD-dépendante mais qui ne produit pas de NADH (Duine *et al.*, 1984). Les espèces de *Bacillus* méthylotrophes contiennent une MDH liée aussi au NAD et non à la PQQ. Toutes ces enzymes sont complètement différentes de la MDH classique de la majeure partie des méthylotrophes. (Arfman *et al.*, 1989).

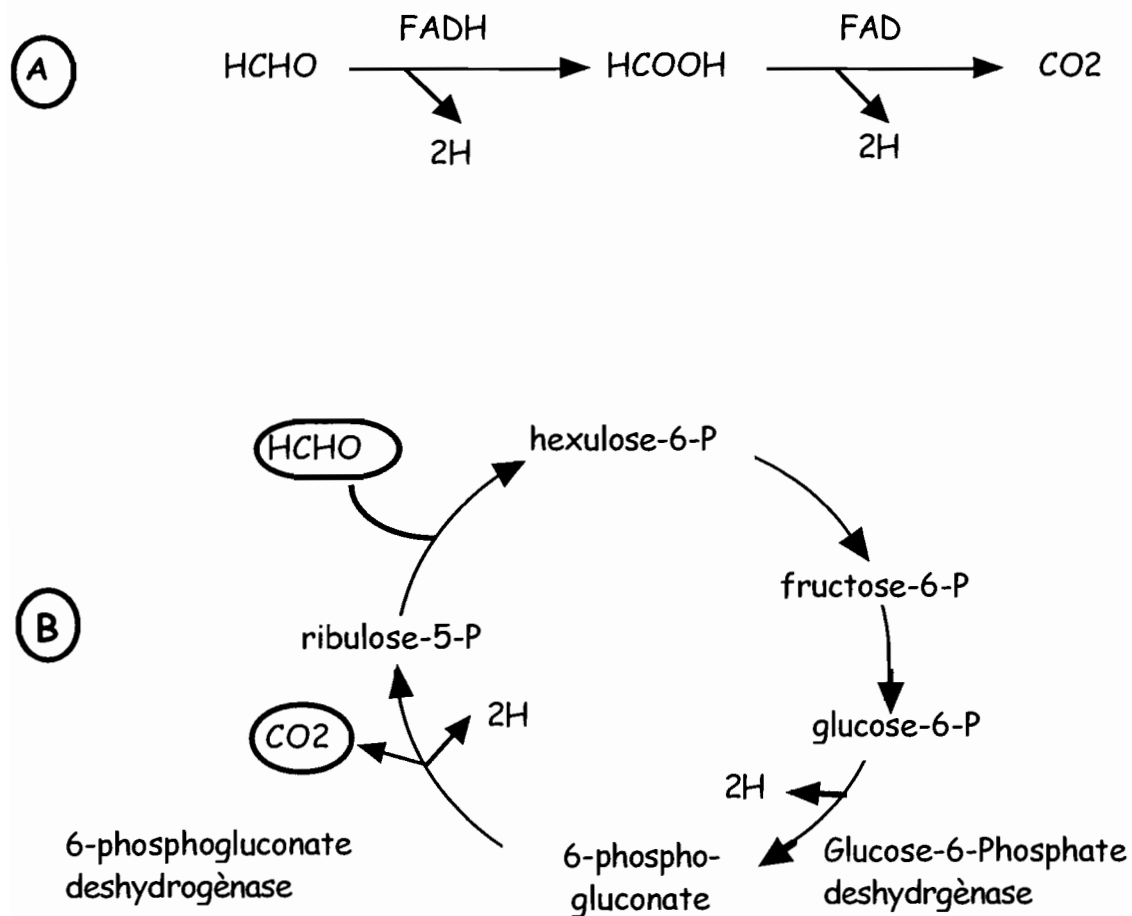


Figure 7. Voies d'oxydation du formaldéhyde chez les bactéries méthylotrophes (d'après Lidstrom, 1991). La voie cyclique fait intervenir les enzymes du cycle de la ribulose monophosphate. **A**, Voie linéaire ; **B**, voie cyclique ; FADH, formaldéhyde deshydrogénase ; FAD, formate deshydrogénase ; HCHO, formaldéhyde ; HCOOH, formate.

VI - 5 - 2 - Oxydation et assimilation du formaldéhyde

Bien que jouant un rôle central dans l'assimilation du carbone chez les méthylotrophes, le formaldéhyde est toxique pour ces organismes. Très peu de cultures ont pu être faites sur formaldéhyde chez les méthylotrophes (Hirt *et al.*, 1978 ; Whittenbury et Dalton, 1981), avec une très faible croissance nécessitant en plus un apport du formaldéhyde sous forme gazeuse. Cette toxicité montre l'importance des systèmes d'oxydation et d'assimilation du formaldéhyde. Il a été mis en évidence deux possibilités pour l'oxydation du formaldéhyde en CO_2 (Anthony, 1982) (figures 7A et 7B).

- une voie linéaire comportant l'action de deux enzymes, formaldéhyde deshydrogénase et formate deshydrogénase qui catalysent respectivement l'oxydation du formaldéhyde en formate puis en CO_2 .

- une voie cyclique, comportant la condensation d'un C_1 avec une molécule à cinq carbones, suivie par l'oxydation du composé en C_6 obtenu. Les enzymes catalysant ces réactions étant les mêmes que celles qui interviennent dans l'assimilation du formaldéhyde par la voie de la ribulose monophosphate, à l'exception d'une seule, la 6-phosphogluconate deshydrogénase.

La voie linéaire se rencontre chez les méthylotrophes qui assimilent le formaldéhyde par la voie de la sérine et chez beaucoup de méthylotrophes facultatifs utilisant la voie de la ribulose monophosphate. Par contre, la voie cyclique est observée chez les méthylotrophes obligatoires utilisant la voie de la ribulose monophosphate (Grundig et Babel, 1987 ; Anthony, 1982). Chez les méthanotrophes obligatoires utilisant le cycle de la ribulose monophosphate on retrouve les activités enzymatiques des deux voies. Mais les faibles activités du

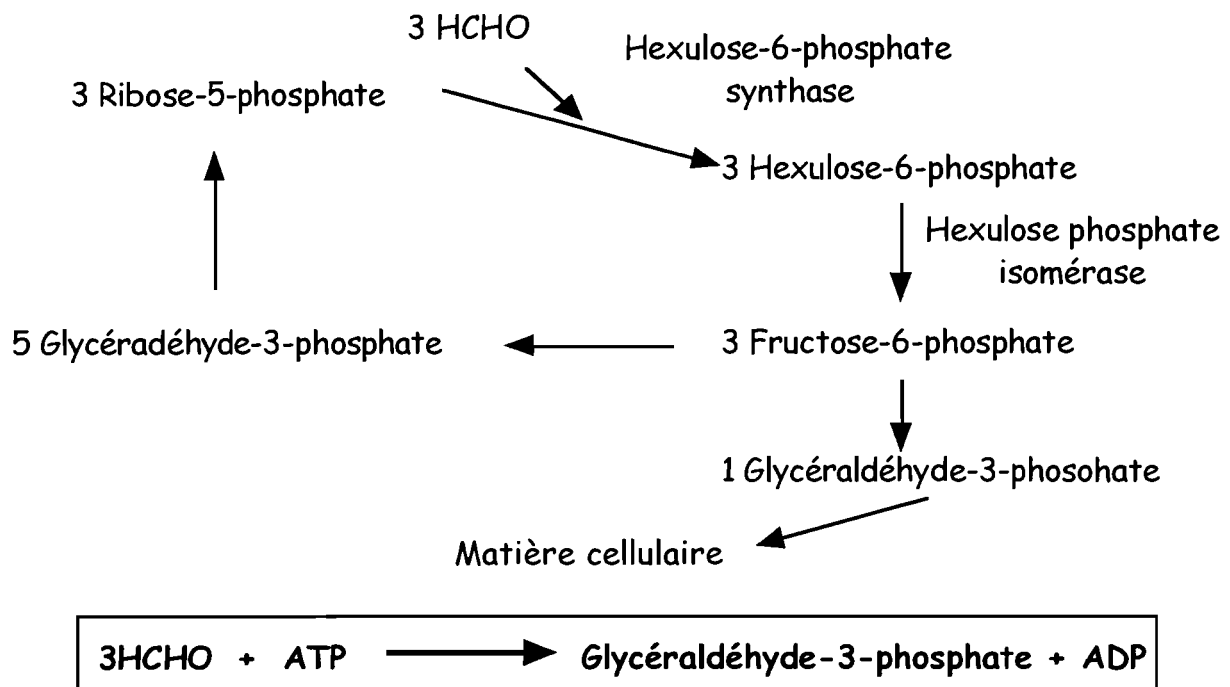


Figure 8A. Assimilation du formaldéhyde par la voie de la ribulose monophosphate (d'après Hanson & Hanson, 1996).

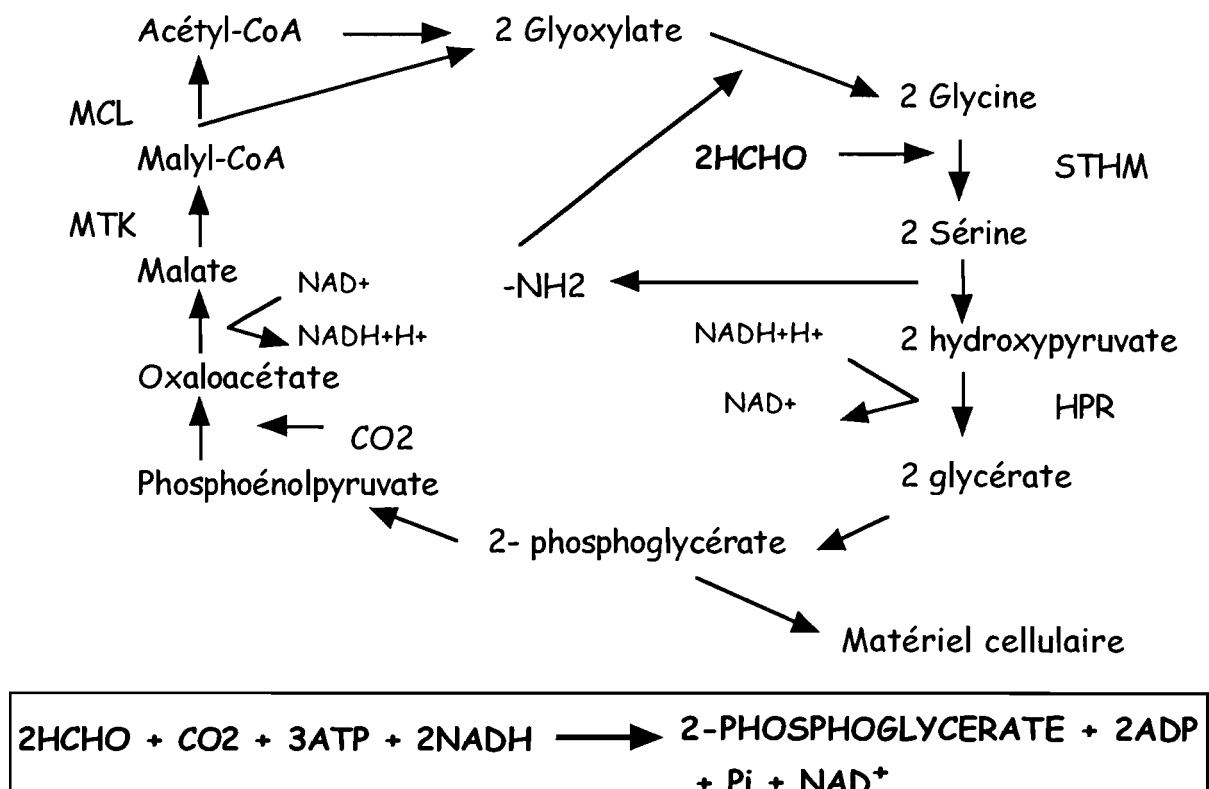


Figure 8B. Assimilation du formaldéhyde par la voie de la sérine (d'après Hanson & Hanson, 1996). STHM, Sérine Hydroxyméthyl Transférerase ; HPR, Hydroxypyruvate Réductase ; MKT, Malate Thiokinase ; MCL, Malyl Coenzyme A Lylase.

glucose 6-phosphate et du 6-phosphogluconate deshydrogénase suggèrent la prédominance in vivo de la voie de linéaire (Zatman, 1981).

Comme pour l'oxydation, l'assimilation du formaldéhyde peut se faire par les deux voies cycliques de la sérine et de la ribulose monophosphate. Les deux cycles comportent une condensation entre un C_1 et un composé pluricarboné, suivie par la régénération de l'accepteur et la production d'un composé en C_3 (figures 8A et 8B).

Le cycle de la sérine commence par une condensation du méthylène tétrahydrofolate et de la glycine pour donner la sérine. Ce composé en C_3 va subir plusieurs transformations pour donner le phosphoenolpyruvate, qui va être carboxylé pour donner le malate. Le malate est ensuite clivé en deux composés en C_2 qui sont à leur tour convertis en glycine complétant ainsi le cycle.

Dans la voie de la RuMp, le formaldéhyde est condensé avec le Ribulose monophosphate par l'enzyme hexulose phosphate synthase pour produire l'hexulose phosphate. Cette molécule en C_6 est isomérisée en fructose 6-phosphate par la phosphohexulose isomérase, suivie d'une série de réactions aboutissant à la régénération de la molécule accèptrice en C_5 . Globalement, la condensation de trois molécules de formaldéhydes se traduit par l'obtention d'un composé en C_3 (Anthony, 1982).

VI - 6 - Génétique et organisation des gènes

L'étude génétique et moléculaire d'un organisme dépend des possibilités de produire et de caractériser des mutants à partir de la souche sauvage pour par la suite pouvoir cloner et transférer des gènes dans des organismes ou cellules de choix. C'est dans ces domaines que l'étude des méthylotrophes et de

Methylobacterium en particulier a pris du retard sur les autres familles de bactéries. En effet jusqu'à récemment peu de choses étaient connues sur la biologie moléculaire des méthylotrophes ceci étant dû au manque de système de transfert de gènes, de transformation efficace ou de conjugaison. L'un des problèmes les plus importants concernant en particulier les méthanotrophes obligatoires du fait de leur incapacité à pousser sur des substrats pluricarbonés. Malgré tous ces problèmes, le développement des techniques chez les méthylotrophes est en progrès.

VI - 6 - 1 - La mutagenèse

Plusieurs approches ont été utilisées pour obtenir des mutants. Parmi ces approches, on note : les mutagenèses chimiques, les rayons UV, rayons gamma, mais dans la plupart des cas, les résultats n'étaient pas satisfaisants car le nombre de mutants obtenus était très faible (Holloway, 1984 ; De Vries, 1986 ; De vries *et al.*, 1990). Plusieurs raisons, telles, la toxicité des mutagènes ou les conditions de mutagenèse inappropriées ont été avancées pour expliquer ce manque de réussite (Williams et Shimmin, 1978 ; Tsygankov et Kazakova, 1987). Cependant des mutants ont été obtenus dans les cas où les auteurs ont réussi à contourner les problèmes liés à la toxicité des agents mutagènes (Tsygankov et Kazakova, 1987 ; klestova *et al.*, 1988).

Récemment, plusieurs études ont porté sur la mutagenèse par transposons. La stratégie ayant l'avantage de permettre de sélectionner les mutants grâce au gène de résistance que porte le transposon. Cependant, si les transposons ont été utilisés avec succès chez plusieurs espèces de bactéries (Simon *et al.*, 1983 ; Hom *et al.*, 1984 ; Anderson et Mills, 1985 ; Singh et Klingmüller, 1986), aucun des transposons couramment utilisé n'a pu l'être chez les méthylotrophes. Le

principal problème étant la faible fréquence de transposition et l'instabilité des insertions (Toukdarian et Lidstrom, 1984b ; Fulton *et al.*, 1984 ; Lehmiche et Lidstrom 1985 ; Whitta *et al.*, 1985 ; Bohanon *et al.*, 1987).

Malgré les difficultés pour obtenir des mutants, des techniques ont été développées pour faciliter l'identification des mutants. Dans le cas Des méthylotrophes facultatifs (*Methylobacterium*), on utilise un substrat suicide, l'alcool allylique pour sélectionner les mutants méthylotrophes⁽⁻⁾ (Nunn et Lidstrom, 1986a). Chez la souche sauvage, l'alcool allylique est oxydé par la MDH pour donner un composé toxique, l'aldéhyde acrylique ou acroléine. Ainsi les mutants MDH⁻ sont sélectionnés sur la base de la survie en présence de l'alcool allylique. De la même manière, le dichlorométhane et le dibromométhane sont utilisés pour sélectionner les mutants MMO⁻ chez les méthanotrophes (Nicolaidis et Sargent, 1987 ; Phelps *et al.*, 1992 ; Mc Pheat *et al.*, 1987).

VI - 6 - 2 - Clonage et systèmes de transfert

Le développement des études génétiques chez les méthylotrophes a longtemps été tributaire du manque de systèmes de transfert de gènes. Les techniques de transfert qui ont été utilisées chez les méthylotrophes sont principalement la transformation (transfert d'ADN dans des cellules) et la conjugaison (Lidstrom et Stirling, 1990). La conjugaison a été le premier moyen par lequel un ADN recombinant a été introduit chez les méthylotrophes (Holloway, 1984 ; De Vries, 1986).

Concernant la transformation, seul l'ADN linéarisé à forte concentration donne des résultats positifs (Williams et Bainbridge, 1971 ; O'Connor *et al.*, 1977). Plusieurs vecteurs de clonage appartenant aux groupes d'incompatibilité

IncP et IncQ ont été développés chez les méthylotrophes (Lidstrom et Stirling, 1990). Chez ces derniers, plusieurs plasmides ont été mis en évidence, mais n'ont pas été exploités comme vecteurs de clonage (Warner *et al.*, 1977 ; Gertenberg *et al.*, 1982 ; Montiero *et al.*, 1982 ; Allen *et al.*, 1984 ; Ueda *et al.*, 1987 ; Galli et Leisinger, 1988 ; Metzler *et al.*, 1988).

Plus récemment, la technique de l'électroporation a été utilisée comme alternative à la conjugaison pour introduire des plasmides chez les méthylotrophes. *Methylobacterium extorquens* NR-2 a été transformé avec réussite avec le plasmide pLA2917 par électroporation. La fréquence de transformation reste cependant inférieure à 8.10^3 transformants par μg d'ADN (Ueda *et al.*, 1991a ; Ueda *et al.*, 1991b) contrairement aux autres bactéries gram- telles que *E. coli* dont la fréquence de transformation est nettement supérieure (Dower *et al.*, 1988 ; Fiedler et Wirth, 1988). Malgré ces difficultés, la fréquence obtenue avec *Methylobacterium* reste suffisante pour permettre de faire des manipulations génétiques.

VI - 6 - 3 - Organisation des gènes de la MDH

Chez les méthylotrophes gram-, les enzymes qui ont été les plus étudiées sont celles intervenant dans l'oxydation du méthane (Mullens et Dalton, 1987), l'oxydation du méthanol (Nunn et Lidstrom, 1986a ; Harms *et al.*, 1987 ; Machlin *et al.*, 1988a ; Anderson et Lidstrom, 1988) et celles intervenant dans le cycles de la sérine (Allen *et al.*, 1984 ; Stone et Goodwin, 1989). Dans ces différents systèmes enzymatiques, les gènes intervenant dans le métabolisme des composés en C_1 semblent regroupés en clusters.

Tableau 7. Ancienne et nouvelle désignation des gènes de l'oxydation du méthanol connus chez les bactéries méthylophiles.

Ancienne	Nouvelle	Fonction	Références
<u>Gènes de la PQQ</u>			
<i>moxC</i>	<i>pqqA</i>	Synthèse de PQQ	Nunn et Lidstrom, 1986a ; Lidstrom, 1992
<i>moxP</i>	<i>pqqA</i>	Synthèse de PQQ	Biville <i>et al.</i> , 1989 ; Lidstrom, 1992
<i>moxV</i>	<i>pqqB</i>	Synthèse de PQQ	Biville <i>et al.</i> , 1989 ; Lidstrom, 1992
<i>moxT</i>	<i>pqqC</i>	Synthèse de PQQ	Biville <i>et al.</i> , 1989 ; Lidstrom, 1992
<i>moxO</i>	<i>pqqG</i>	Synthèse de PQQ	Biville <i>et al.</i> , 1989 ; Lidstrom, 1992
	<i>pqqD</i>	Synthèse de PQQ	Biville <i>et al.</i> , 1989 ; Lidstrom, 1992
<i>moxH</i>	<i>pqqE</i>	Synthèse de PQQ	Nunn et Lidstrom, 1986a ; Lidstrom, 1992
<i>moxU</i>	<i>pqqF</i>	Synthèse de PQQ	Biville <i>et al.</i> , 1989 ; Lidstrom, 1992
<u>Gènes de l'oxydation du méthanol</u>			
<i>moxA/moxA1</i>	<i>mxmA</i>	Insertion du Ca ⁺⁺	Nunn et Lidstrom, 1986a, 1986b
<i>moxK/moxA2</i>	<i>mxmK</i>	Insertion du Ca ⁺⁺	Nunn et Lidstrom, 1986a, 1986b
<i>moxL/moxA3</i>	<i>mxmL</i>	Insertion du Ca ⁺⁺	Nunn et Lidstrom, 1986a, 1986b
<i>moxB</i>	<i>mxmB</i>	Régulation	Morris et Lidstrom, 1992
<i>moxF</i>	<i>mxmF</i>	MHD sous-unité α	Nunn et Lidstrom, 1986a, 1986 b
<i>moxJ</i>	<i>mxmJ</i>	inconnue	Anderson et Lidstrom, 1988
<i>moxG</i>	<i>mxmG</i>	Cytochrome CL	Nunn et Lidstrom, 1986a, 1986b
<i>moxI</i>	<i>mxmI</i>	MDH β sous-unité	Anderson et Lidstrom, 1988, Nunn <i>et al.</i> , 1989
<i>moxR</i>	<i>mxmR</i>	Inconnue	Van Spanning <i>et al.</i> , 1991
<i>moxS</i>	<i>mxmS</i>	Inconnue	Harms <i>et al.</i> , 1993
<i>moxX</i>	<i>mxmX</i>	Régulation	Harms <i>et al.</i> , 1993
<i>moxY</i>	<i>mxmY</i>	Régulation	Harms <i>et al.</i> , 1993
<i>moxZ</i>	<i>mxmZ</i>	Régulation	Harms <i>et al.</i> , 1993
<i>moxW</i>	<i>mxmW</i>	Régulation	Xu <i>et al.</i> , 1993
	<i>mxmE</i>	Inconnue	Spriger <i>et al.</i> , 1998
	<i>mxmH</i>	Inconnue	Spriger <i>et al.</i> , 1998
<i>moxM</i>	<i>mxmM</i>	Régulation	Xu <i>et al.</i> , 1993
<i>moxD</i>	<i>mxmD</i>	Régulation	Xu <i>et al.</i> , 1993 ; Day <i>et al.</i> , 1990
<i>moxN</i>	<i>mxmN</i>	Régulation	Xu <i>et al.</i> , 1993
<i>cou-6</i>	<i>mxmA</i>	Inconnue	Lee <i>et al.</i> , 1991
<i>moxQ</i>	<i>mxmQ</i>	Régulation	Xu <i>et al.</i> , 1993
<i>moxE</i>	<i>mxmE</i>	Régulation	Xu <i>et al.</i> , 1993 ; Day <i>et al.</i> , 1990
<i>moxU</i>	<i>mxmU</i>	Régulation	Xu <i>et al.</i> , 1993
<i>Cou-1</i>	<i>mxmA</i>	Inconnue	Lee <i>et al.</i> , 1991
<i>moxR</i>	<i>mxmR</i>	Inconnue	Laufer et Lidstrom
<i>moxS</i>	<i>mxmS</i>	Inconnue	Laufer et Lidstrom

Le schéma génétique de l'oxydation du méthanol chez *Methylobacterium* est complexe non seulement en termes de nombre de gènes requis, mais de régulation. Chez *Methylobacterium organophilum* xx pas moins de sept régions codant pour des gènes impliqués dans l'oxydation du méthanol et l'assimilation du formaldéhyde ont été identifiés dans le chromosome (Allen et Hanson, 1985 ; Machlin et Hanson, 1988b ; Bastien *et al.*, 1989). Chez *Methylobacterium extorquens*, 26 gènes interviennent dans l'oxydation du méthanol (Bastien *et al.*, 1989 ; Van Spanning *et al.*, 1991 ; Morris *et al.*, 1994, 1995 ; Springer *et al.*, 1995).

Ces gènes se regroupent en quatre loci dans le chromosome de *Methylobacterium extorquens* AM1, *mx_a*, *mx_b*, *mx_c*, et *mx_d* (Lidstrom *et al.*, 1994) (tableau 7). Les gènes de l'oxydation du méthanol ont été identifiés par mutagénèse et par complémentation en utilisant des clones issus de souches sauvages. Les gènes *mx_a* sont fonctionnellement conservés entre *Methylobacterium extorquens* AM1 et *Methylobacterium organophilum* xx puis que les clones issus de l'une des espèces peuvent compléter les mutants de l'autre (Lidstrom, 1992). De plus l'organisation des gènes *mx_a* chez les deux organismes est la même (Lidstrom et Stirling, 1990 ; Lidstrom, 1992). Les gènes d'une autre bactérie méthylo-trophe facultatif, *Paracoccus denitrificans*, ont été également étudiés et présentent des similarités avec les *mx_a* de *Methylobacterium extorquens* AM1 et *Methylobacterium organophilum* xx (Van Spanning *et al.*, 1991).

A - Les gènes *mx*

Les gènes *mx* sont regroupés dans un cluster d'au moins 14 gènes, *mx**FJGIRSACKLDEHB* et le gène *mx**W*.

Les gènes *mx**F* et *mx**I* codent respectivement pour la grande et la petite sous unité de la MDH (Nunn et Lidstrom, 1986a ; Nunn et Lidstrom, 1986b ; Anderson et Lidstrom, 1988 ; Nunn *et al.*, 1989 ; Van Spanning *et al.*, 1991). Les séquences des gènes *mx**F* des trois méthylotrophes *Methylobacterium organophilum* xx, *Methylobacterium extorquens* AM1 et *Parcoccus denitrificans* présentent une très forte conservation de leurs séquences d'acides aminés (Harms *et al.*, 1987 ; Machlin et Hanson 1988 ; Anderson *et al.*, 1990 ; Van Spanning *et al.*, 1991). Les gènes *mx**F* et *mx**I* sont co-transcrits avec le gène *mx**G* qui code pour le cytochrome *C_L* (Anderson et Lidstrom, 1988 ; Van Spanning *et al.*, 1991). Un quatrième gène *mx**J* a été identifié dans ce cluster chez *Parcoccus denitrificans* et *Methylobacterium extorquens* (Anderson *et al.*, 1990 ; Van Spanning *et al.*, 1991). Cependant la fonction de ce gène est pour le moment inconnue même si la mutation sur ce gène *mx**J* altère l'activité de la MDH (Van Spanning *et al.*, 1991). Les gènes *mx* ont également été clonés chez plusieurs méthanotrophes dont *Methylosinus tricosporium* OB3 (AL-Taho *et al.*, 1990), *Methylococcus capsulatus* et *Methylomonas albus* BG8 (Stephens *et al.*, 1988).

Deux gènes nommés *mx**R* et *mx**S* ont été trouvés immédiatement en aval du locus *mx**FJGI* chez *Parcoccus dénitrificans*. Le *mx**R* aurait une fonction dans la formation d'une MDH active (Van Spanning *et al.*, 1991). Cette hypothèse est basée sur le fait que les mutants *mx**R* sont incapables de pousser sur le méthanol, mais produisent toujours la MDH et son accepteur d'électron, le

cytochrome C_{551} (Van Spanning *et al.*, 1991). La fonction du gène *mxs* quant à elle reste à élucider (Harms *et al.*, 1993).

En aval de *mxs* se trouve le locus *mxsACKLD* (Nunn et Lidstrom, 1986b ; Bastien *et al.*, 1989 ; Lidstrom, 1992). La mutation sur ces gènes ne supprime pas la production de MDH, mais se traduit par une altération du spectre d'absorption de la MDH et de son inactivation (Nunn et Lidstrom, 1986b). Des études ultérieures ont montré que ces gènes interviennent dans l'incorporation du calcium dans le complexe MDH-PQQ (Richardson et Anthony, 1992).

En aval du gène *mxs*, se trouve le gène régulateur *mxsB* qui intervient dans la transcription de *mxsF* et de *pqqD* chez *M. extorquens* (Morris et Lidstrom, 1992 ; Ramamoorthi et Lidstrom, 1995) et chez *M. organophilum* (Xu *et al.*, 1993). Ce gène est cependant précédé de deux cadres de lecture (ORF), *mxsE* et *mxsH* dont les fonctions ne sont pas connues (Springer *et al.*, 1998).

Chez *Methylobacterium extorquens*, immédiatement en amont de *mxsF* a été trouvé le gène *mxsW* qui est transcrit de façon inverse et dont la fonction est inconnue car les mutants *mxsW* ont une activité MDH normale (Xu *et al.*, 1993 ; Lidstrom *et al.*, 1994 ; Springer *et al.*, 1998).

B - Les gènes *mxs*, *mxs* et *mxs*

Les locus *mxs* et *mxs* contiennent des gènes régulateurs qui sont indispensables pour l'expression et la transcription de *mxsF* chez *M. extorquens* (Springer *et al.*, 1995). Du point de vue phénotypique, tous les mutations *mxs* et *mxs* ont un taux de protéines Mxsf et de Cytochrome C_L réduits par rapport aux souches sauvages. Ces phénotypes sont plus marqués dans le cas des mutants

mxbM et *mxbD*. Par contre les mutants *mxdR* et *mxdS* ont des taux de *MxaF* et de Cytochrome équivalents aux souches sauvages et leur rôle dans l'oxydation du méthanol reste inconnu (Springer *et al*, 1995). L'action des gènes régulateurs *mxc* se fait de façon hiérarchique, avec les gènes *mxcQ* et *mxcE* qui contrôlent l'expression des gènes *mxbD* et *mxbM* qui à leur tour agissent sur un certain nombre de gènes intervenant dans l'oxydation du méthanol (Springer *et al*, 1997).

C - Les gènes de la PQQ

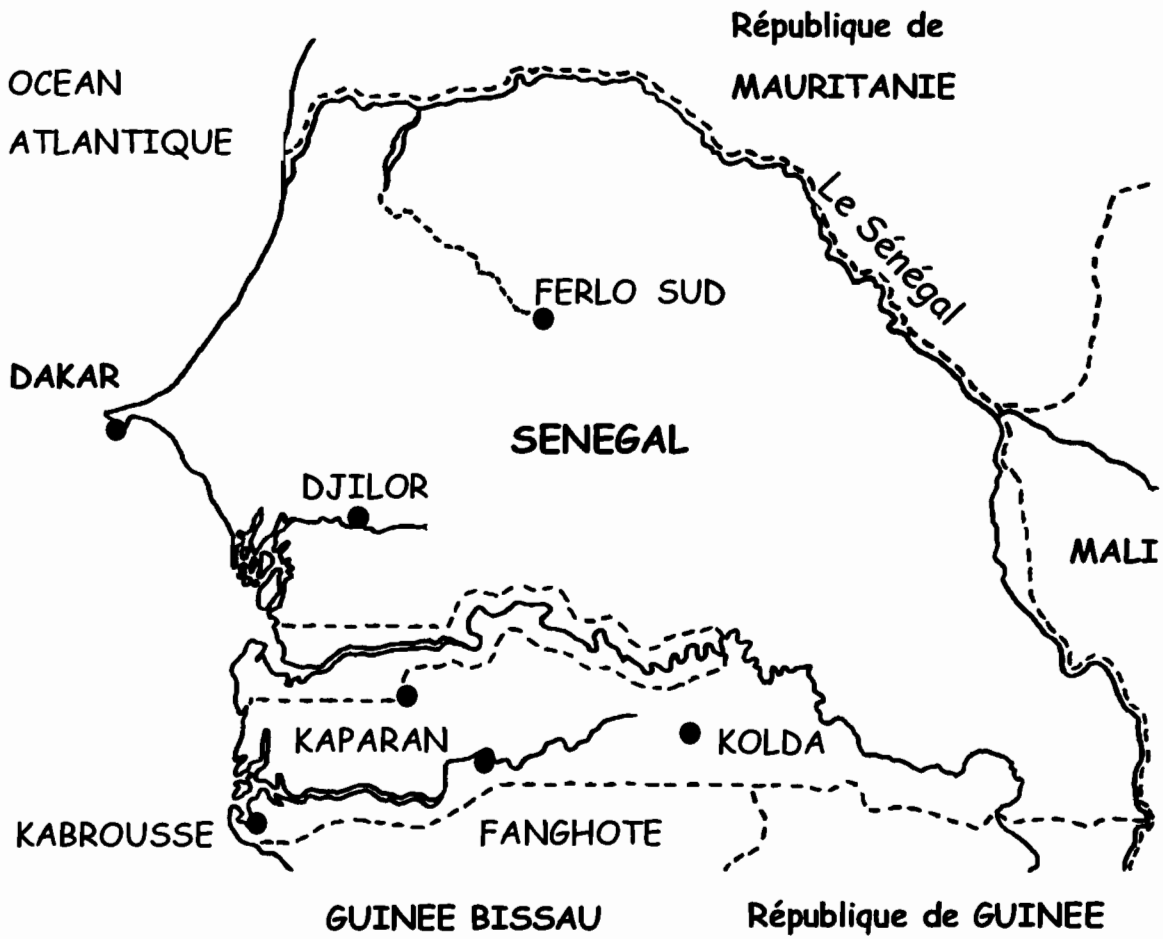
La pyrroloquinoline quinone (PQQ) est le groupement prosthétique de plusieurs deshydrogénases bactériennes telle que la MDH des méthylotrophes. La PQQ est dérivée de deux acides aminés, la tyrosine et l'acide glutamique (Salisbury *et al.*, 1979 ; Duine *et al.*, 1980). L'étude génétique de la biosynthèse de PQQ a été faite chez nombre de méthylotrophes ; *M. extorquens* AM1 (Morris *et al.*, 1994), *M. organophilum* DSM760 et XX (Biville *et al.*, 1989 ; Morris *et al.*, 1994) et chez *Methylobacillus flagellatum* (Gomelsky *et al.*, 1996). Sept gènes répartis en deux clusters ont été identifiés chez *M. extorquens* AM1 : *pqqDGCBA* et *pqqEF* (Morris *et al.*, 1994). Chez *Klebsiella pneumoniae*, six gènes *pqqABCDEFG* ont été identifiés (Meulenbergh *et al.*, 1992), les cinq premiers correspondant respectivement aux gènes *pqqGDCBA* de *M. extorquens* AM1 (Morris *et al.*, 1994). Les mêmes gènes dans le même ordre se rencontrent aussi chez *Acinetobacter calcoaceticus* (Goosen *et al.*, 1989). Toyama *et al.*, (1997) ont proposé une nomenclature unifiée des gènes *pqq* suivant celle de *Klebsiella pneumoniae*.

Parmi les gènes régulateurs *mxbM*, *mxbD*, *mxcQ*, *mxcE* et *mxsB* requis pour la transcription des gènes codant pour les sous-unités de la MDH, seuls *mxbM*, *mxbD* et *mxsB* interviennent dans la transcription et la régulation de *pqqD*, mais

seuls les mutants *mxbM* et *mxbD* affectent significativement la production finale de PQQ (Ramamoorthi et Lidstrom, 1995). On note ainsi interaction entre la régulation des gènes codant pour les sous-unités de la MDH et la régulation de *pqqD* qui est le précurseur de la PQQ.

MATERIEL ET METHODES

Figure 9. Sites de prélèvement des nodules de *Crotalaria*.



I - ISOLEMENT ET CONSERVATION DES SOUCHES

Les souches de rhizobiums utilisées dans cette étude proviennent de nodules frais ou secs récoltés in situ de différentes localités du Sénégal (figure 9). Dans le cas des nodules frais, l'isolement est direct alors que pour les nodules secs, pour éviter les contaminations nous avons d'abord procédé à un piégeage par inoculation de broyats de nodules désinfectés sur des jeunes plants de la même espèce pour obtenir des nodules frais. Les nodules frais sont stérilisés en surface par immersion dans une solution de chlorure mercurique (HgCl_2) à 0,1% pendant 5 min. Ils sont ensuite rincés plusieurs fois à l'eau distillée stérile, puis écrasés dans une goutte d'eau distillée stérile. Les suspensions ainsi obtenues sont étalées sur boîtes de Pétri contenant le milieu de culture YMA (Vincent, 1970). Les colonies apparaissent après plusieurs jours d'incubation à 37°C dans des conditions aérobies. La pureté des colonies est vérifiée par des étalements répétés sur milieu YMA et par contrôle au microscope. La nodulation des isolats sur leur plante-hôte d'origine est contrôlée et ils sont conservés à -80°C dans du milieu YM contenant 20% (v/v) de glycérol.

II - LES MILIEUX DE CULTURE

Nous avons utilisé différents milieux pour les cultures bactériennes ou de plantes. Tous les milieux ont été stérilisés pendant 20 minutes à 120°C.

II - 1 - Cultures bactériennes

A - Milieu YM (Vincent, 1970)

Ce milieu a été utilisé pour la culture des différentes souches de rhizobiums. Il contient par litre : mannitol : 10 g ; glutamate de sodium : 0,5 g ; K_2HPO_4 : 0,5 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,2 g ; NaCl : 0,05 g ; CaCl_2 : 0,04 g ; FeCl_3 :

0,004 g ; extrait de levure : 1 g. Le pH du milieu est ajusté à 6,8. Le milieu gélosé YMA est obtenu en ajoutant 20 g/l d'agar.

B - Milieu LB (Luria Bertani)

Le milieu LB (Sambrook *et al.*, 1989) a été utilisé pour les cultures d'*Escherichia coli*. Sa composition par litre est la suivante : extrait de levure : 5 g ; tryptone : 10 g ; NaCl : 10 g. Le pH est ajusté à 7 et le milieu solide correspondant est obtenu après addition de 20 g/l d'agar.

C - Milieu TY tamponné (Beringer, 1974)

Ce milieu tamponné a été utilisé comme milieu de culture pour l'extraction des protéines totales des souches de rhizobiums. Il contient par litre : tryptone (Oxoid) : 5 g ; extrait de levure (Oxoid) : 0,75 g ; KH_2PO_4 : 0,454 g ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 2,388 g ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (13,4 g/100 ml) : 5 ml ; agar LabM : 20 g. Le pH est ajusté à 6,8 - 7,0.

D - Milieu M72 (Green, 1991)

Le M72 a été utilisé pour la culture des souches de *Methylobacterium* et pour les tests de méthylotrophie.

Il contient par litre : K_2HPO_4 : 1,2 g ; KH_2PO_4 : 0,62 g ; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0,05 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,2 g ; NaCl : 0,1 g ; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 1 mg ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 0,5 g ; oligo-éléments : 1 ml.

La solution d'oligo-éléments est composée par litre de : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 5 mg ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 7 mg ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 10 mg ; H_3BO_3 : 10 mg ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 70 mg ; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 5 mg. Le pH du milieu est ajusté à 7,0. Après la stérilisation, le milieu est refroidi à 45°C avant l'ajout du méthanol filtré (0,2 μm) à la concentration souhaitée.

E - Milieu TYGPN

Le milieu TYGPN a été utilisé pour la construction de la banque d'ADN génomique. La composition par litre est : tryptone : 20 g ; extrait de levure : 10 g ; glycérol 80% : 10 ml ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 6,3 g ; KNO_3 : 10 g. Le pH est ajusté à 7.

II - 2 - Culture des plantes en tubes Gibson

A - Milieu Jensen (Vincent, 1970)

Ce milieu a été utilisé pour la culture des plantes en tube Gibson lors des tests de nodulation pour la détermination du spectre d'hôtes des différentes souches.

Pour 1 litre, il contient : 10 ml de solution P (K_2HPO_4 à 20 g/l ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à 20 g/l) ; 10 ml de solution Q (NaCl à 20 g/l) ; 20 ml de solution R (CaHPO_4 à 50 g/l) ; 10 ml de solution D ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ à 4 g/l) ; 1 ml d'oligo-éléments de Jensen ; agar : 15 g.

La solution d'oligo-éléments de Jensen contient par litre : H_3BO_3 : 2,86 g ; MnSO_4 : 2,03 g ; ZnSO_4 : 0,22 g ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0,08 g ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 0,09 g. Le pH du milieu est ajusté à 6,7.

III - TESTS DE NODULATION

Les graines des différentes espèces utilisées dans cette étude ont été scarifiées et stérilisées en surface avec de l'acide sulfurique concentré. Les temps en minutes de traitement avec H_2SO_4 pour les différentes espèces de plantes sont les suivants : *Crotalaria comosa*, 15 min ; *Crotalaria glaucoïdes*, 20 min ; *Crotalaria goreensis*, 40 min ; *Crotalaria hyssopifolia* et *Crotalaria lathyroides*, 10 min ; *Crotalaria perrottetii*, 30 min ; *Crotalaria podocarpa* et

Crotalaria retusa, 35 min ; *Crotalaria ochroleuca*, 25 min ; *Sesbania rostrata*, 30 min ; *Acacia albida*, 30 min ; *Acacia raddiana*, 60 min et *Indigofera microcarpa*, 25 min.

Après traitement, les graines ont été lavées avec de l'eau distillée jusqu'à ce que toute trace d'acide soit éliminée, puis laissées à imbiber pendant une nuit dans l'eau stérile. Les graines ont ensuite été incubées pour germer dans des boîtes de Pétri stériles contenant de l'eau gélosée (8 g/l d'agar) pendant 24 à 48 heures à 30°C à l'obscurité. Les plantules ont ensuite été transférées dans des tubes contenant du milieu nutritif Jensen en gélose inclinée, pour les essais de nodulation racinaire.

L'inoculation des plantes a été faite 48 heures après la mise en tube avec 1 ml de culture bactérienne en phase exponentielle de croissance. Les plantes ont été cultivées dans des conditions de lumière continue (20 W/m²) à 28°C, la formation des nodules est observée durant 5 à 6 semaines.

IV - MESURE DE L'ACTIVITE REDUCTRICE D'ACETYLENE (ARA)

Les microorganismes fixateurs d'azote, appelés diazotrophes, possèdent en commun un complexe enzymatique, la nitrogénase, qui catalyse la réduction biologique de l'azote atmosphérique. La nitrogénase peut également réduire d'autres substrats tels que l'acétylène (C₂H₂) qui est ainsi réduit en éthylène (C₂H₄). Cette propriété est utilisée pour estimer de façon indirecte la fixation d'azote par la méthode de Hardy *et al.*, (1973). En effet pour un même apport d'énergie, la réduction d'une mole de N₂ correspond à celle de 3 moles de C₂H₂ d'où un coefficient de conversion théorique de 3/1.





La mesure de l'ARA a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse sur un chromatographe Varian Aerograph série 1400 équipé d'une colonne de Sphérosil XOB 075 en acier inoxydable de 120 cm x 0,02 cm. Les températures respectives de la colonne, de l'injecteur et du détecteur sont, 65, 110 et 180°C. Le débit du gaz vecteur (l'azote) est de 40 ml/min, ceux de l'hydrogène et de l'air comprimé sont respectivement 30 ml/min et 300 ml/min.

Les racines portant des nodules ont été coupées et mises dans des flacons fermés hermétiquement. L'acétylène est injecté à raison de 10% du volume des flacons et le tout a été incubé pendant 30 min. Ensuite, des échantillons gazeux de 0,5 ml ont été prélevés de chaque tube et injectés au chromatographe. La quantité d'éthylène produite a été mesurée par le pic enregistré dont la conversion en nanomoles se fait par référence à un étalon standard, constitué d'éthylène dilué au 1/1000. L'ARA est exprimé en nmoles de C₂H₄/heure/plante.

V - PREPARATION DES EXTRAITS PROTEIQUES

Pour l'analyse des protéines totales, le protocole expérimental est adapté des techniques décrites par Laemmli (1970), modifiées par Kiredjian *et al.*, (1986). Le principe est basé sur la séparation des protéines totales d'une souche par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'un composé dénaturant chimique, le Sodium Dodécyl Sulfate (SDS). La séparation des protéines totales d'une souche par électrophorèse sur gel de polyacrylamide donne un électrophorégramme complexe caractéristique de la souche et qui est reproductible si les techniques utilisées sont standardisées. Cette technique de caractérisation est fine et renseigne sur la similarité des souches bactériennes aux niveaux de l'espèce ou de la sous-espèce. Par ailleurs, les résultats sont

généralement corrélés à ceux des hybridations ADN/ADN (Kerstens, 1985 ; Vandamme *et al.*, 1996).

A - Culture et récolte 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. 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 Pétri, puis les boîtes sont incubées pendant 48 à 72 heures à 37°C.

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 10000 rpm après avoir été filtrées sur une gaze de coton. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois dans le même tampon (remise en suspension et centrifugation à 15000 rpm).

B - Extraction des protéines et électrophorèse

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.

Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE), en présence de SDS sur des appareils de type Hoefer SE ou LKB 2001 (gels verticaux). Après la migration (une nuit sous une intensité constante de 6 mA et une tension de 12 Volts), les gels sont trempés pendant une heure dans une solution de fixation (acide trichloracétique 10%), puis colorés pendant une heure sur agitateur linéaire dans une solution de bleu de Coomassie (0,25% Serva blue R ; méthanol 50% v/v et acide acétique 10% v/v). Les gels sont ensuite décolorés dans une solution de méthanol 25% v/v et d'acide acétique 10% v/v, puis photographiés et séchés entre deux feuilles de cellophane.

C - 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*

LMG 1125, 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 protéiques (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).

D - Les solutions

-Tampon phosphate 0,01M pH7

(a) 0,2 M KH_2PO_4 : 27,218 g/l d'eau distillée

(b) 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 71,63 g/l d'eau distillée

Tampon 0,1 M : 195 ml de (a) + 305 ml de (b) + 500 ml d'eau distillée

Diluer ensuite jusqu'à 0,01 M

-Tampon NaPBS

0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 40,5 ml

0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 9,5 ml

NaCl : 8 g ; H_2O qsp 1000 ml ; pH 7,3 ; conserver à 4°C

-Tampon STB

0,75 g Tris ; 5 ml Mercaptoéthanol

5 g Sucrose ; H_2O qsp 100 ml ; pH 6,8 ; conserver à -18°C

VI - EXTRACTION D'ADN

A - Extraction de l'ADN génomique bactérien

Les bactéries sont cultivées pendant 48 à 72 heures sous agitation à 37°C sur milieu YM. Les cultures (5 ml) sont ensuite centrifugées (10 min à 14000 rpm), puis les cellules sont lavées une fois avec du TE (tampon Tris HCl, 10 mM ; EDTA, 1 mM ; pH8). Les cellules sont ensuite lysées par incubation pendant 30 min à 37°C dans 500 µl de TE contenant du lysozyme à 1 mg/ml. Par la suite, 30 µl de SDS 10% et 10 µl de protéinase K à 20 mg/ml sont ajoutés au mélange pour dénaturer les protéines.

Après une nuit d'incubation à 37°C, un mélange 20 µl de SDS 10% et 130 µl de NaCl 5 M est alors ajouté. Une agitation (vortex) permet de précipiter les protéines, et une centrifugation après 30 min d'incubation dans la glace permet de séparer les protéines (culot) de l'ADN (surnageant). Après récupération du surnageant, deux séries de deux lavages (5 min à 5000 rpm) avec un mélange de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25/24/1 ; v/v/v), puis de chloroforme-alcool isoamylique (24/1 ; v/v) permet d'éliminer toutes les traces de protéines et de lipides.

L'ADN est ensuite précipité par addition de 70 µl d'acétate de sodium 3 M à pH 5,2 et de 1 ml d'isopropanol. Après centrifugation, l'ADN est lavé avec de l'éthanol 70%, puis séché avant d'être repris dans 50 µl de Tris 10 mM, pH 8. Cette étape est suivie de la phase de traitement de l'ADN à la RNaseA (2,5 µl à 0,4 mg/ml) pendant deux heures à 37°C. L'ADN est de nouveau précipité, lavé à l'éthanol 70% et conservé à 4°C pour dissolution complète avant d'être finalement stocké à -20°C.

B - Extraction de l'ADN génomique chez les plantes

Après prélèvement de cotylédons âgés de 2 jours après germination (selon le protocole déjà décrit cf III), le matériel végétal est pesé (200 mg) puis broyé dans un tube Eppendorf de 1,5 ml contenant du sable très fin (sable de Fontainebleau) avec 100 μ l de tampon d'extraction (Tris 100 mM à pH8, EDTA 50 mM, NaCl 500 mM). Au cours du broyage (3 à 4 minutes) 400 μ l de tampon d'extraction sont ajoutés afin de récupérer le maximum de matériel. Après incubation à 65°C dans 35 μ l de SDS à 20% et une centrifugation (10 minutes à 14000 rpm), le surnageant est précipité par ajout d'un volume de 640 μ l d'isopropanol et de 60 μ l d'acétate de sodium 3 M pH 3,2.

Le culot est repris ensuite dans 200 μ l de Tris-EDTA pH8, et précipité de nouveau dans de l'éthanol pur et de l'acétate de sodium afin d'enlever les impuretés. L'ADN est récupéré dans 25 μ l d'eau stérile et conservé à -20°C.

C - Extraction d'ADN plasmidique

Toutes les souches d'*E. Coli* transformées ont été cultivées une nuit dans du LB avec l'antibiotique adéquat. Les extractions plasmidiques ont été faites sur microcolonnes en utilisant le kit Wizard Plus SV Minipreps de Promega.

VII - AMPLIFICATION DE L'ADN PAR PCR

A - Principe

Le principe de la méthode d'amplification d'ADN *in vitro* consiste à hybrider un ADN dénaturé à deux amorces oligonucléotidiques qui permettront la copie du brin d'ADN qu'ils encadrent grâce à une ADN polymérase. Chaque couple d'amorces est composé d'un oligomère complémentaire de l'extrémité 3'

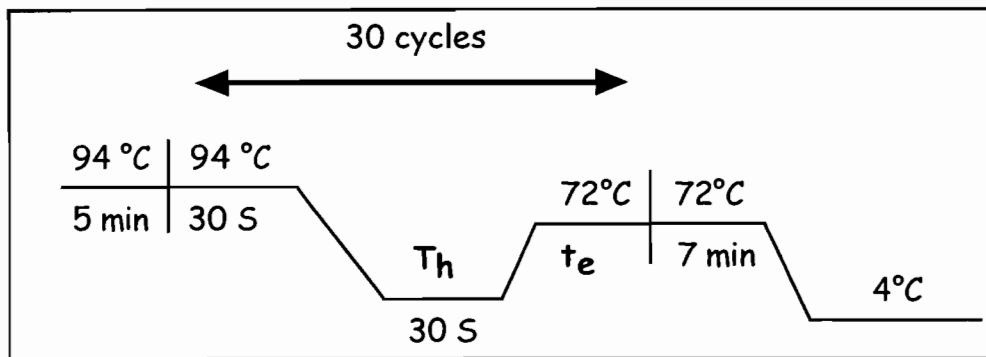


Figure 10A. Programme PCR Classique pour amorces spécifiques. La température d'hybridation (T_h) et la durée de l'élongation (t_e) dépendent respectivement des amorces et de la taille du fragment à amplifier.
 16S : $T_h = 60^\circ\text{C}$; $t_e = 2 \text{ min}$; ITS : $T_h = 57^\circ\text{C}$; $t_e = 1 \text{ min}$; mxaf 1003/mxar1561 : $T_h = 50^\circ\text{C}$; $t_e = 1 \text{ min}$.

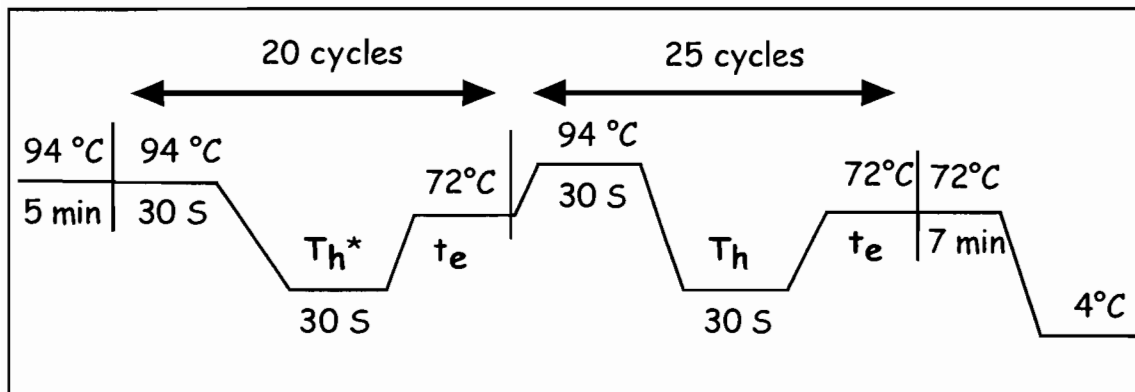


Figure 10B. Programme "Touch-down" PCR. La température d'hybridation dans la première série de cycles (T_h^*) baisse de $0,5^\circ\text{C}$ par cycle.

mxaf916/mxar1360 : $T_h^* = 60-50^\circ\text{C}$; $T_h = 50^\circ\text{C}$; $t_e = 1 \text{ min}$;
 nodAfbrady/nodArbrady : $T_h^* = 63-53^\circ\text{C}$; $T_h = 53^\circ\text{C}$; $t_e = 1 \text{ min}$;
 nodA1f/nodAB1r : $T_h^* = 65-55^\circ\text{C}$; $T_h = 55^\circ\text{C}$; $t_e = 1 \text{ min}$;
 nodAsp322f/nodAsp322r : $T_h^* = 60-50^\circ\text{C}$; $T_h = 50^\circ\text{C}$; $t_e = 1 \text{ min}$.

du monobrin d'ADN à amplifier et d'un autre oligonucléotide complémentaire de l'extrémité 3' du brin antiparallèle. La polymérisation est réalisée en présence de désoxynucléotides triphosphates dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) et d'ADN polymérase (Taq) isolé de *Thermus aquaticus* (Mullis et Faloona, 1987), une bactérie se développant à haute température. La répétition des trois étapes : dénaturation, hybridation et polymérisation, aboutit à une amplification exponentielle de la séquence ciblée.

B - Conditions d'amplification et amorces utilisées

Dans notre étude, les réactions de PCR ont été réalisées avec un thermocycleur Applied Biosystems : **Gene Amp PCR system 2400**, en utilisant des programmes différents en fonction des couples d'amorces utilisés. Le programme classique (dénaturation, hybridation, polymérisation) a été utilisé pour les couples d'amorces spécifiques (figure 10a), et le programme "Touch-down" (Don *et al.*, 1991) dans le cas d'amorces dégénérées. Ce dernier programme est composé de deux séries de cycles. Une première série qui permet de tester toute une gamme de températures pour l'hybridation des amorces, puis une seconde série permet d'amplifier les fragments d'ADN obtenus lors de la première série (figure 10b). Les séquences des amorces utilisées pour l'amplification des gènes 16S rDNA, *mxoF*, *nodA* et de l'ITS sont présentées dans le tableau 8.

Les réactions d'amplification ont été faites dans un volume réactionnel de 25 μ l contenant : 1 ou 2 μ l d'ADN matrice (50 ng), 2,5 μ l de Tampon 10x (Eurogentec), 1,5 μ l de $MgCl_2$ (25 mM), 2 μ l de dNTPs (2,5 mM), 1 μ l de chacune des amorces (20 pmol/ μ l), 0,125 μ l de Taq polymérase (Gibco-BRL) et de l' H_2O pour compléter le volume à 25 μ l.

Tableau 8. Liste des amorces utilisées pour les réactions d'amplification.

Amorces	Séquences 5' - 3'	gène	Références
<u>ADNr 16S</u>			
FGPS6	GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG	16S rRNA	Normand <i>et al.</i> , 1992
FGPS1509	AAGGAGGGGATCCAGCCGCA	16S rRNA	Normand <i>et al.</i> , 1992
<u>Gène nodA</u>			
nodAf brady	GTYCAGTGGAGSSTKCGCTGGG	<i>nodA</i>	cette étude
nodAr brady	TCACARCTCKGGCCCGTTCCG	<i>nodA</i>	cette étude
nodA1 f	TGCRGTGGAARNTRBVYTGGG	<i>nodA</i>	cette étude
nodB1 r	GGNCCGTCRTCRAASGTCARGTA	<i>nodA</i>	cette étude
<u>Gènes de la méthyliotrophie</u>			
mxaf1003	GCGGCACCAACTGGGGCTGGT	<i>mxaf</i>	McDonald <i>et al.</i> , 1995
mxar1561	GGGCAGCATGAAGGGCTCCC	<i>mxaf</i>	McDonald <i>et al.</i> , 1995
mxaf916	GGCGACAACAAGTGGWCSATG	<i>mxaf</i>	cette étude
mxar1360	ARTCCATRCARAYGTGGTT	<i>mxaf</i>	cette étude
<u>ITS</u>			
NNC18S10	AGGAGAAGTCGTAACAAG	ITS1	Wen & Zimmer, 1996
C26A	GTTTCTTTTCCTCCGCT	ITS2	Wen & Zimmer, 1996

Les produits d'amplification ont été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (Sigma, type II) contenant du bromure d'éthidium. La migration des gels a été faite dans des cuves d'électrophorèse (Easy Cast modèle B₂) contenant du tampon TAE (tris-acétate 40 mM, Na₂-EDTA 1 mM, pH 8,5). Un marqueur de taille moléculaire SmartLadder (Eurogentec) ou 100 pb DNA Ladder (Promega) permet de vérifier la taille et la concentration du fragment amplifié.

VIII - DIGESTION DES PRODUITS D'AMPLIFICATION

La digestion enzymatique ou RFLP a été réalisée sur les produits d'amplification de l'ADNr 16S et du gène *nodA*. Les produits de PCR issus de l'amplification ont ainsi été digérés par les enzymes de restrictions reconnaissant des sites de restriction spécifiques de 4 ou 5 bases suivantes : *HaeIII*, *MspI*, *HinfI* et *Sau96I* dont les sites de restriction sont donnés dans le tableau 9.

Enzymes	Sites de restriction
<i>HaeIII</i>	GG/CC
<i>MspI</i>	C/CGG
<i>HinfI</i>	G/ANTC
<i>Sau96I</i>	G/GNCC

Tableau 9. Liste des enzymes de restriction utilisées et leurs sites de reconnaissance. N = A, C, G, ou T.

Les différents produits d'amplification ont été digérés pendant 5 heures dans un volume réactionnel final de 15 µl selon le protocole du fabricant fourni pour chaque enzyme, soit : 7,5 à 10 µl de produit PCR, 1,5 µl de tampon 10X, 1 µl d'enzyme et de l'eau stérile qsp.

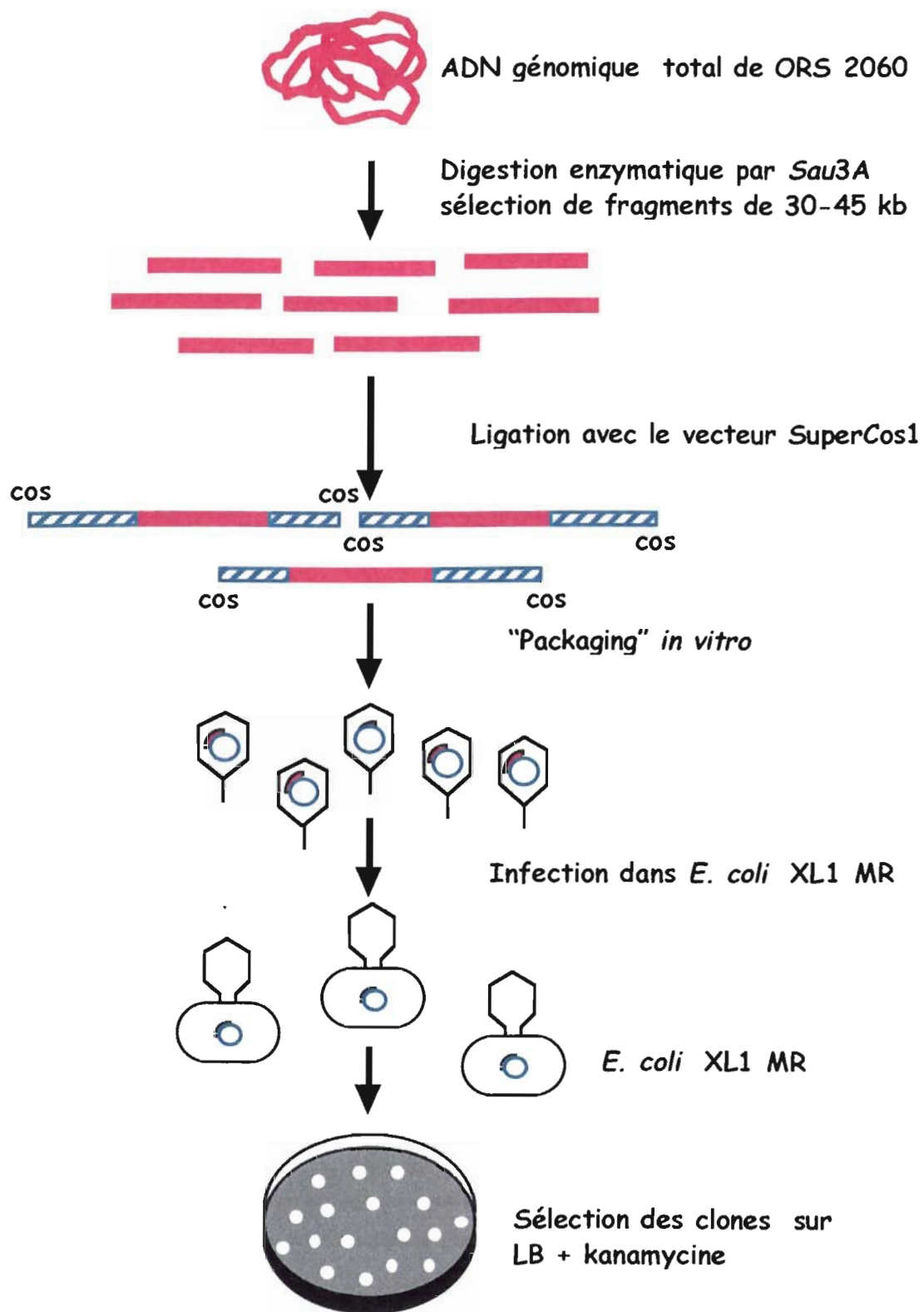


Figure 11. Construction de la banque d'ADN génomique de la souche ORS 2060

Les fragments de restriction obtenus ont été séparés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à bas point de fusion (Nusieve 3% p/v) dans les mêmes conditions que pour l'analyse des produits PCR.

IX - CONSTRUCTION D'UNE BANQUE D'ADN GENOMIQUE TOTAL d'ORS 2060

L'ADN génomique total de la souche ORS 2060 a été extrait selon le protocole décrit dans le paragraphe (VI) en prenant soin de ne pas casser l'ADN. La pureté de l'ADN a été contrôlée par la mesure du spectre d'absorption à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS BECKMAN DU 40. L'ADN est considéré comme pure lorsque le rapport DO_{260nm}/DO_{280nm} est compris entre 1,8 et 2 et le rapport DO_{234nm}/DO_{260} est voisin de 0,5.

A - Obtention des clones de la banque

La figure 11 résume les différentes étapes de la construction de la banque d'ADN génomique. L'ADN génomique de la souche ORS 2060 a été partiellement digéré par l'enzyme de restriction *Sau3A* (Eurogentec), et les fragments de restriction de 30 à 45 kb obtenus ont été clonés aux sites *BamHI* du vecteur SuperCos1 (Stratagene). La digestion partielle de l'ADN, les réactions de déphosphorylation du vecteur de clonage et les réactions de ligation de l'ADN ont été réalisées selon le protocole Stratagene (Instruction Manual, Catalogue 251301).

Les cosmides recombinants (hybrides) contenant un fragment d'ADN de la souche ORS 2060, ont été encapsidés (Packaging) *in vitro* en utilisant le kit Gigapack III Gold Packaging (Stratagene). Les phages résultants de cette encapsidation, ont ensuite été utilisés pour infecter des cellules d'*Escherichia*

coli XL1-MR (Stratagene) selon les recommandations du fournisseur. Les bactéries ainsi transformées ont ensuite été sélectionnées sur milieu LB supplémenté de kanamycine (50 $\mu\text{g/ml}$), résistance portée par le vecteur SuperCos1.

Après une nuit à 37°C, 2016 clones résistant à la kanamycine ont été retenus pour constituer la banque d'ADN génomique de la souche ORS 2060. Chaque clone a été repiqué dans un puits d'une microplaque Nunc contenant 145 μl de milieu TYGPN supplémenté de kanamycine (50 $\mu\text{g/ml}$). Au total, 21 microplaques, soit 2016 clones ont été obtenus. Après une nuit de croissance à 37°C sous faible agitation, 75 μl de glycérol 50% v/v ont été ajoutés dans chaque puits. Chaque clone a été désigné par un numéro indiquant la microplaque et ces coordonnées sur cette dernière, et le tout a été conservé à -80°C.

B - Criblage des clones de la banque

Pour sélectionner parmi les 2016 clones de la banque ceux qui ont inséré un fragment d'ADN contenant les gènes de nodulation (gènes *nod*) ou les gènes de l'oxydation du méthanol (MDH) nous avons choisi la technique PCR. Les amorces utilisées pour faire ce criblage sont *nodAfbrady* et *nodArbrady* pour les gènes de nodulation et *mxaf1003* et *mxar1561* pour la MDH.

Pour chaque microplaque, une empreinte des 96 clones a été faite sur une boîte de LB gélosé contenant de la kanamycine, et les clones obtenus ont été repris avec du Tris 10mM pour les réactions de PCR. Le criblage a été fait par des réactions de PCR successives d'abord par microplaques, puis par colonnes de 8 clones sur les microplaques positives et enfin par clones pour les colonnes positives. Les colonies positives qui serviront pour le clonage des gènes étudiés ont ensuite été mises en collection avec des numéros STM.

X - HYBRIDATION PAR SONDE FROIDE

A - Transfert de l'ADN sur membrane de Nylon

L'ADN plasmidique des clones ayant inséré des fragments d'ADN renfermant les gènes à étudier (*nod* ou *mxaf*) a été digéré par une série d'enzymes de restriction, et les fragments de restriction séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (1%). Les fragments d'ADN ont ensuite été transférés sous vide en milieu alcalin selon le protocole **Hybaid Vacu-Aid** de Hybaid sur une membrane de nylon (Boehringer Mannheim). Après le transfert de l'ADN, la membrane a été trempée pendant 3 minutes dans une solution de 2X SSC, puis l'ADN fixé par irradiation aux UV. Après la fixation de l'ADN, la membrane a été conservée à 4°C pour hybridation ultérieure.

B - Préparation des sondes

Les sondes ont été préparées à partir des produits PCR obtenus avec les couples d'amorces *nodAfbrady/nodArbrady* pour les gènes de nodulation et *mxaf1003/mxar1561* pour le gène *mxaf*. Les produits d'amplification utilisés comme sonde ont été purifiés suivant le protocole **Qiaquick Gel Extraction kit** de Qiagen. Le marquage des sondes a été réalisé selon le protocole **Dig-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II** de Boehringer Mannheim. 10 à 16 µl d'ADN sonde ont été dénaturés (10 minutes à 100°C) puis immédiatement refroidis dans de la glace avant l'ajout de 4 µl de Dig-High Prime. Le tout a été mélangé, centrifugé puis incubé une nuit à 37°C, la réaction de marquage a été arrêtée par 10 minutes de chauffage à 65°C.

C - L'hybridation de la sonde

L'hybridation de la sonde sur la membrane a été réalisée selon le protocole du kit Boehringer Mannheim, dans un four d'hybridation "shake 'n' Stack de

Hybaid. La technique comporte plusieurs étapes : La préhybridation, l'hybridation, les lavages et la détection.

-**La préhybridation** : la membrane est incubée pendant 3 heures à 65°C dans un roller tube contenant 20 ml de solution de préhybridation (solution A), composée de : 18 ml de 5X SSC ; 0,2 ml de N-lauruysarkosyl ; 40 µl de SDS 10% et 2 ml d'agent bloquant.

-**L'hybridation** : la membrane est incubée pendant une nuit à 65°C avec la solution d'hybridation (15 ml de solution A + 5 µl de sonde), la sonde ayant été préalablement dénaturée par ébullition et rapidement refroidie dans de la glace.

-**Les lavages** : après une nuit d'incubation à 65°C, la membrane est d'abord lavée à température ambiante deux fois 5 minutes avec 200 ml de solution 1 (2X SSC ; SDS 0,1%), puis deux lavages de 15 minutes à 65°C dans 100 ml de solution 2 (0,1X SSC ; SDS 0,1%) préchauffée à 65°C au bain marie.

-**La détection** : la membrane est tout d'abord rincée en roller tube deux fois 3 minutes avec 75 ml de washing buffer (1 litre de tampon 1 (acide maléique 0,1 M ; NaCl 0,1 M ; pH 7,5) + 3 ml de tween 20). Elle est ensuite incubée pendant 30 minutes à 25°C dans 30 ml de tampon 2 (90% de tampon 1 + 10% d'agent bloquant), puis une deuxième incubation de 30 minutes à 25°C dans 20 ml de solution d'anticorps (2 µl de l'anticorps Anti-DIG-AP conjugate (Boehringer Mannheim) dans 20 ml de tampon 2). La membrane est de nouveau rincée deux fois 5 minutes dans 200 ml de washing buffer, puis incubée pendant 5 minutes dans 100 ml de tampon 3 (Tris HCl 0,1M ; NaCl 0,1M ; pH 9,5). Elle est ensuite égouttée puis placée sur une pochette en plastique avant de répartir uniformément à sa surface 1 ml de CSPD (Boehringer Mannheim). Après 5 minutes d'attente, l'excès de CSPD est enlevé et la membrane est enveloppée avec du **Saran Wrap** puis incubé pendant 15 minutes à 37°C dans une cassette

photographique. La membrane est enfin exposée avec un film autoradiographique (Chemiluminescent Detection-Film de Boehringer Mannheim) qui est ensuite développé par le révélateur Kodak XL24 puis fixé par la solution fixatrice Kodak AL4.

XI - SOUS-CLONAGE ET SEQUENCAGE DES GENES

Les fragments d'ADN contenant les gènes à étudier c'est - à- dire les produits de digestion ayant hybridé avec les sondes *nodA* ou *mxoF*, ont été récupérés à partir des gels d'électrophorèse sous UV. L'ADN a ensuite été extrait et purifié avec le kit Qiaquick Gel Extraction kit de Qiagen.

A - les plasmides

Les vecteurs de clonage utilisés pour le sous-clonage des *mxoF* et *nod* sont : pUC18, pUC19 et pBSK (pBleuscript SK). Les plasmides pUC18 et pUC19 (2,69 kb) (Norranders *et al.*, 1983 ; Yanisch-Perron *et al.*, 1985) sont identiques à l'exception de leurs multicloning sites (MCS) qui permettent l'insertion de fragments d'ADN qui sont orientés de façons opposées. Ils portent le gène de la β -galactosidase (*lacZ*) et un gène de résistance à l'ampicilline, et peuvent se multiplier dans les cellules hôtes. Le plasmide pBSK (2,96 kb) (Short *et al.*, 1988) porte également le gène de résistance à l'ampicilline, le gène *lacZ* et un MCS d'une vingtaine de sites de restriction.

B - La ligation

Les fragments d'ADN récupérés des gels sont ligués aux vecteurs déjà linéarisés par la même enzyme ou par une enzyme compatible puis déphosphorilés. La réaction de ligation se fait à l'aide de la T4 DNA ligase (Eurogentec) à 16°C pendant une nuit selon les recommandations du fournisseur.

Le produit de la ligation est précipité avec de l'éthanol absolu en présence d'acétate de sodium (2 μ l, 3M ; pH 5,2), le culot est ensuite lavé à l'éthanol 70% puis repris dans 5 μ l d'eau ultra pure.

C - Obtention des cellules compétentes

La souche d'*E. coli* XL1 a été cultivée dans 200 ml de LB jusqu'à une DO_{600nm} comprise entre 0,5 et 0,6. La suspension cellulaire est refroidie dans la glace pendant 30 minutes et centrifugée à 4 °C pendant 15 minutes à 5000 tours /minute. Le culot est lavé à deux reprises avec de l'eau glacée à 4°C pour éliminer les sels, et ensuite repris dans 10 ml de glycérol 10%, et centrifugé à nouveau. Les cellules sont remises en suspension dans 0,4 ml de glycérol 10%, puis réparties dans des tubes Eppendorf à raison de 85 μ l/tube et conservées à -80°C.

D - la transformation

La transformation des cellules compétentes à été réalisée par électroporation de 5 μ l de produit de ligation dans 40 μ l de cellules compétentes *E. coli* XL1. Nous avons utilisé un électroporateur BIO-RAD Gene Pulser II dans les conditions suivantes : voltage, 1,25 kV ; capacitance, 25 μ F ; résistance, 200 ohms, et des cuves d'électroporation dont l'espacement entre les plaques conductrices est de 1 mm. Après électroporation, 0,5 ml de LB est ajouté au mélange de transformation, et les cellules sont incubées pendant 1 heure à 37°C sous agitation. Ce mélange est ensuite étalé sur milieu sélectif (LB contenant de l'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (ou IPTG) 50 μ g/ml, du 5-bromo-4-chloro-3- β -D-galactoside (ou X-Gal) 50 μ g/ml, et de l'ampicilline 50 mg/ml. L'ampicilline permet de sélectionner les souches ayant le plasmide car ce dernier porte la résistance à cet antibiotique, et le X-Gal permet de déterminer les colonies dont le plasmide porte l'insert.

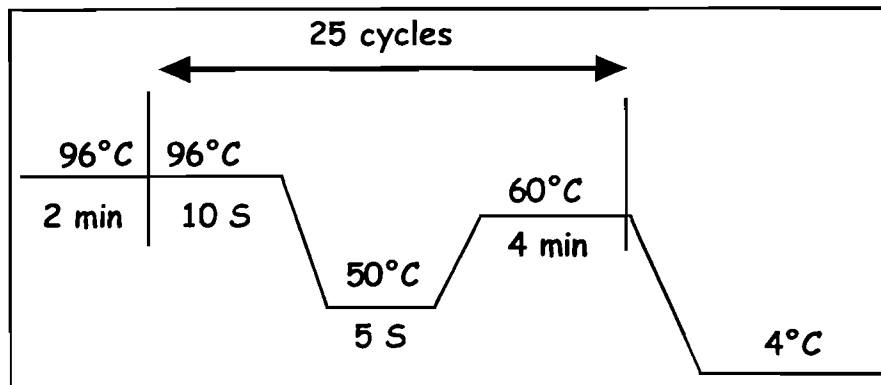


Figure 12. Programme utilisé pour effectuer les réactions de séquence.

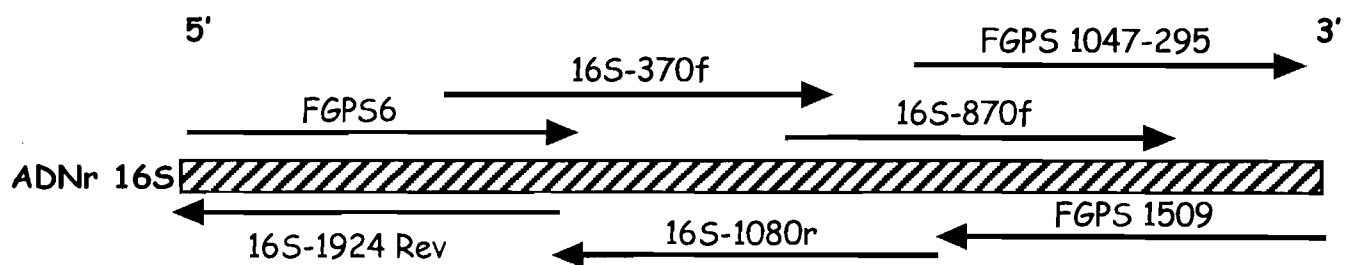


Figure 13 . Position des amorces utilisées pour le séquençage de l'ADNr 16S.

L'ADN plasmidique des cellules transformées (colonies blanches) est extrait par le kit **Qiaquick Gel Extraction kit** de Qiagen pour faire les réactions de séquence.

E - Séquençage

Le séquençage des clones et des produits PCR a été réalisé avec un séquenceur automatique à électrophorèse capillaire **ABI PRISM 310 Genetic Analyzer** de Perkin Elmer. Le kit utilisé pour les réactions de séquence est le **Big Dye Terminator cycle sequencing kit** contenant la polymérase **AmpliTaq FS** (Perkin Elmer). Le mélange de la réaction de séquence comprend : 50 à 250 ng d'ADN à séquencer, 1 μ l d'amorce à 3,2 pmol, 4 μ l de solution de réaction (dNTPs ; ddNTPs ; AmpliTaq DNA polymerase, FS, *rTth* pyrophosphatase ; $MgCl_2$; tampon) et 2 μ l de tampon 5x (Tris base 400 mM, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 10 mM, pH 9). Le volume final est ajusté à 20 μ l avec de l'eau stérile. Le programme de la réaction de séquence est présenté par la figure 12. Les amorces utilisées pour le séquençage des différents gènes sont indiquées dans le tableau 10, alors que la figure 13 montre la position des amorces utilisées pour le séquençage de l'ADNr 16S.

Les produits de la réaction de séquence sont ensuite précipités dans 50 μ l d'éthanol absolu et 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 14000 rpm, le culot lavé avec 250 μ l d'éthanol 70%, puis séché à l'air libre. Il est ensuite repris dans 25 μ l de tampon TSR (Template Suppressing Reagent), bouilli pendant 4 minute, puis refroidi rapidement dans la glace avant d'être placé dans le séquenceur.

F - Analyse et alignement des séquences

Tableau 10. Liste des amorces utilisées pour le séquençage de gènes étudiés.

Amorces	Séquences 5' - 3'
<u>ADNr16S</u>	
FGPS6	GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG
FGPS1509	AAGGAGGGGATCCAGCCGCA
16S-370f	GGCAGCAGTGGGGAATATTG
16S-1080r	GGGACTTAACCCAACATCT
16S-870f	CCTGGGGAGTACGGTCGCAAG
16S-1924 Rev	GGCACGAAGTTAGCCGGGGC
FGPS 1047-295	ATG-TTG-GGT-TAA-GTC
<u>Gène nodA</u>	
nodAf brady	GTYCAGTGG-AGSSTKCGCTGGG
nodAr brady	TCACARCTCKGGCCCGTTCCG
nodA1 f	TGCRGTGGAARNTRBVYTGGG
nodB1 r	GGNCCGTCRTCRAASGTCARGTA
nodboxuniv2	ATCNAAACAAWNRRATTTTAC
nodB76r	GGRTKNGGNCCRTCRTCRAANGT
2060.nodCf	TTCGTATCTGCGCCAACAACCTC
2060. nodIf	CGCGTGCGCTGATCAATAAC
2060.nodAr	AGGTCTCGCGCCGGCCCAACTTC
2060.amnodHr	TCGGGGTTGAATTAACCTTTAC
2060.nodHf	CTGAAGTTCAGTTCTGACAATG
<u>Gènes mxaf</u>	
mxaf1003	GCGGCACCAACTGGGGCTGGT
mxar1561	GGGCAGCATGAAGGGCTCCC
mxaf916	GGCGACAACAAGTGGWCSATG
mxar1360	ARTCCATRCARAYGTGGTT
mxaff1	GCGCGATCGGCTATCCCGTTAC
<u>ITS</u>	
NNC18S10	AGGAGAAGTCGTAACAAG
C26A	GTTTCTTTTCCTCCGCT
<u>Amorces universelles (sur les vecteurs de clonage)</u>	
M13f	GTTTTCCCAGTCACGAC
M13r	CAGGAAACAGCTATGAC
M13r-48	AGCGGATAACAATTTACACA
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	TAATACGACTCACTATAGGGC

Les amorces M13f, M13r, M13r-48, T3 et T7 sont situées sur les vecteurs de clonage, pUC18/19 et pBSK. Les amorces 2060.nodAr, 2060.nodCf, 2060.nodHf, 2060.amnodHr et 2060.nodIf ont été définies pour combler les gaps après assemblage des différents clones.

Toutes les séquences obtenues ont été corrigées à partir des électrophorégrammes à l'aide du logiciel **Sequence Navigator** (Applied Biosystems Inc.). L'assemblage des séquences (Front et reverse) pour obtenir la séquence consensus a été réalisé à l'aide du logiciel **AutoAssembler 2.1** (PE Applied Biosystems). La traduction des séquences en séquences protéiques ainsi que la détermination des phases ouvertes de lectures probables (ORFs) ont été faites avec le logiciel **DNA Strider 1.2** (Ch. Marck and C. E. A.). Les pourcentages d'homologie des séquences obtenues avec les séquences des gènes étudiés disponibles dans **Genbank** ont été déterminés par la procédure **Blast** (Altschul *et al.*, 1990). Pour les analyses phylogénétiques, les séquences ont été alignées à l'aide de **ClustalX** (Thompson *et al.*, 1997) et les arbres phylogénétiques construits selon la méthode **Neighbor Joining** (Saitou et Nei, 1987) et visualisés avec **Njplot** (Perriere, 1996).

XII - CONSTRUCTION D'UN MUTANT MXAF⁻

A - Stratégie : la recombinaison homologue

Un fragment *Bam*HI de 2 kb contenant le gène *mxoA* a été cloné au niveau du site *Bam*HI du vecteur pGEM-7Zf (STM 522). Au niveau du gène *mxoA*, un fragment *Sal*I de 900 pb est remplacé par la cassette pKOK5 contenant le gène rapporteur *lacZ* et le gène de résistance à la kanamycine (STM 579). La construction contenant la cassette est ensuite libérée par digestion *Bam*HI puis insérée dans le vecteur pJQ200mp18 (STM 581) (figure 14). Le plasmide résultant qui contient le gène suicide *SacB*, est transféré par électroporation dans *E. coli* S17.1 (STM 584). Après conjugaison entre *E. coli* S17.1 transformé et ORS 2060, les colonies présélectionnées sur YMA contenant de la kanamycine (50 mg/ml) de l'acide nalidixique (10 mg/ml) et l'*X*-Gal (50 µg/ml), sont

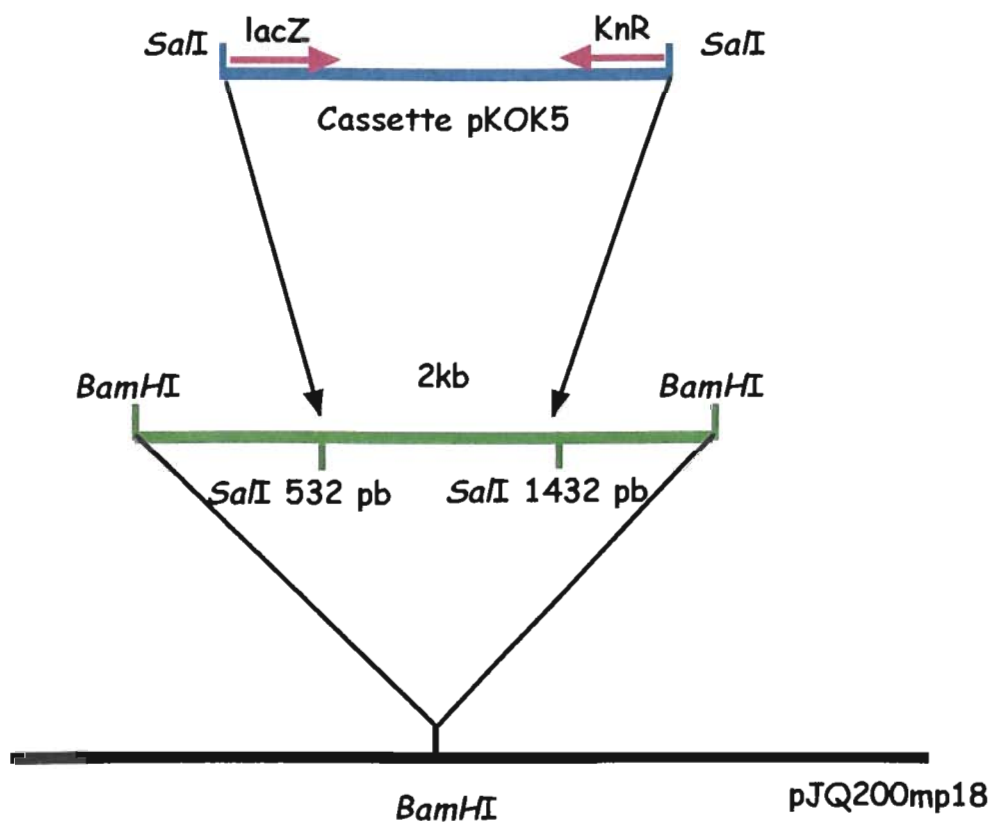


Figure 14. Construction du mutant *mxαF*⁻ de la souche ORS 2060.

repiquées sur YMA supplémenté de sucrose à 5% et 7%. Les colonies résistantes au sucrose sont alors criblées par PCR pour vérifier si l'événement de double crossing-over a bien eu lieu.

B - La conjugaison

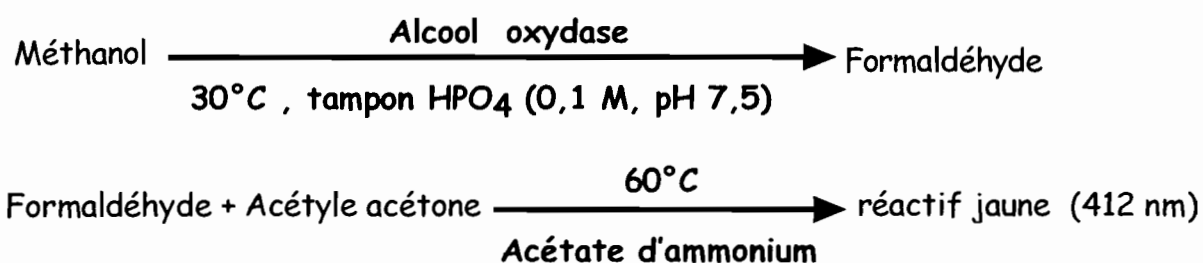
Les cultures de la souche d'*E. coli* S17.1 contenant le plasmide à transférer et celle de la souche ORS 2060 sont d'abord, lavées deux fois avec une solution de NaCl 9‰. Les culots sont ensuite repris dans le même volume d'eau qu'initialement, et la conjugaison réalisée en mélangeant 2,5 ml de suspension d'*E. coli* S17.1 transformé avec 10 ml de la suspension de la souche ORS 2060. Le mélange est centrifugé pendant 5 minutes puis le culot est remis en suspension dans 500 µl de YM. Des gouttes de 150 à 200 µl de suspension bactérienne sont ensuite déposées sur des boîtes de Pétri contenant du YMA, puis les boîtes sont placées à l'étuve à 30°C pendant 3 à 4 jours. Les cellules sont ensuite récupérées et mises en suspension dans 1 ml de YM. Différentes dilutions de cette suspension sont étalées sur milieu YMA supplémenté de kanamycine (50 mg/ml), d'acide nalidixique (10 mg/ml) et d'X-Gal (50 µg/ml).

XIII - TESTS D'UTILISATION DES SUBSTRATS CARBONES

Les cellules sont d'abord cultivé jusqu'en phase exponentielle de croissance dans du milieu M72 supplémenté de pyruvate 10 mM et d'extrait de levure 0,05 g/l. Les cultures sont ensuite diluées dans du M72 pour obtenir une DO de 0,05 avant l'ajout des différents substrats à tester : méthanol (1, 10, 50, 100, 500 mM ; 1 M, 5 M et 10 M), formate 10 mM, formaldéhyde 1 mM, méthylamine 10 mM, éthanol 50 mM, pyruvate et citrate 5 mM, succinate, glutamate, arabinose, glucose, fructose, galactose, saccharose et lactose 10 mM.

La croissance bactérienne a été mesurée par lecture de la densité optique à 620 nm.

Le dosage du méthanol dans le surnageant des cultures a été réalisé par adaptation de méthode de dosage du méthanol, décrite par Wood et Siddiqui (1971).



La principale modification étant le remplacement du KMnO_4 par l'alcool oxydase. Le principe de la méthode est basé sur le dosage du formaldéhyde issu de l'oxydation du méthanol par l'acétyl acétone. Cette réaction donne un réactif jaune qui a une absorbance maximale à 412 nm. La réalisation d'une gamme étalon en utilisant différentes concentrations de méthanol permet de déterminer la concentration de méthanol dans le surnageant des cultures.

Chapitre 1

***DIVERSITE DES BRADYRHIZOBIUMS ASSOCIES AUX PETITES
LEGUMINEUSES SPONTANEEES DU SENEGAL***

I - INTRODUCTION

La classification des bactéries symbiotiques des légumineuses, initialement basée sur les propriétés symbiotiques est en constante évolution. Depuis 1988, quatre nouveaux genres, *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988), *Sinorhizobium* (Chen *et al.*, 1988 ; de Lajudie *et al.*, 1994), *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997) et *Allorhizobium* (de Lajudie *et al.*, 1998b) ont été proposés. Le nombre d'espèces de *Rhizobium*, *Mesorhizobium* et de *Sinorhizobium* ne cesse d'augmenter au fil des années et en fonction des nouveaux isollements de souches.

Au sein du genre *Bradyrhizobium* par contre seules deux espèces, *Bradyrhizobium elkanii* (Kuykendall *et al.*, 1992) et *Bradyrhizobium liaoningense* (Xu *et al.*, 1995) ont été ajoutées à *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1984). Cependant la caractérisation phénotypique et génotypique des souches à croissance lente d'*Acacia albida* (Dupuy *et al.*, 1994), d'*Aeschynomene* (So *et al.*, 1994 ; Molouba *et al.*, 1999), d'*Arachis hypogea* (Van Rossum *et al.*, 1995 ; Urtz et Elkan, 1996), de *Centrosema* et *Desmodium* (Gao *et al.*, 1994) et de *lupinus* (Bottomley *et al.*, 1994) suggère l'existence de nouveaux groupes taxonomiques qui pourraient constituer de nouvelles espèces de *Bradyrhizobium*.

Dans un travail préliminaire, nous avons isolé de nombreuses souches à croissance lente à partir des nodules récoltés sur le terrain sur les racines des petites légumineuses de jachère. Nous avons donc tout d'abord entrepris de caractériser ces souches à croissance lente afin de préciser leur position taxonomique à l'intérieur du genre *Bradyrhizobium*.

Ainsi dans ce premier chapitre, nous décrivons l'isolement et la caractérisation par SDS-PAGE et RFLP de l'ADNr 16S d'une collection de 71 nouveaux isolats à croissance lente provenant de 27 espèces de petites

légumineuses spontanées du Sénégal. Ces espèces appartiennent à 13 genres rencontrés dans 19 localités différentes. Nous avons ajouté à cette étude des souches de référence des espèces de *Bradyrhizobium* connues, *B. japonicum*, *B. elkanii* et *B. liaoningense*. D'autres souches de référence représentant différents groupes de *Bradyrhizobium* sp. obtenus dans d'autres études par les deux techniques que nous avons choisies ont également été incluses dans ce travail. Parallèlement à cette caractérisation, nous avons également étudié les propriétés symbiotiques (spectre d'hôtes et fixation d'azote) d'une trentaine de souches sur cinq espèces de petites légumineuses pour lesquelles nous disposons également d'une collection suffisante de graines.

La technique SDS-PAGE est une méthode reconnue fiable pour le criblage d'un grand nombre de souches pour déterminer les souches les plus proches génétiquement (Kerstens et De Ley, 1975). Elle fournit des informations discriminatives au niveau spécifique et infra spécifiques, mais nécessite cependant une standardisation du protocole d'extraction pour obtenir des profils reproductibles stockés en banque de données. De nombreuses études ont montré la corrélation entre la grande similarité des profils protéiques et les résultats des hybridations ADN/ADN dans différents genres bactériens (Kerstens et De Ley, 1975 ; Izard *et al.* 1981 ; Ferragut *et al.*, 1983 ; Kersters, 1985). Ainsi, les espèces *Sinorhizobium saheli* et *Sinorhizobium teranga* (de Lajudie *et al.*, 1994), *Sinorhizobium kostiense* et *Sinorhizobium arboris* (Nick *et al.*, 1999) ainsi qu'*Allorhizobium undicola* (de Lajudie *et al.*, 1998b) ont tous d'abord été reconnues par SDS-PAGE puis confirmées par la taxonomie polyphasique.

Cependant, s'agissant du genre *Bradyrhizobium*, les travaux sur les *Bradyrhizobium* d'*Acacia albida* (Dupuy *et al.*, 1994) et ceux sur les *Bradyrhizobium* d'*Aeschynomene* (Ladha et So, 1994 ; Molouba *et al.*, 1999) ont

montré que les groupes SDS-PAGE ne reflétaient pas toujours le statut taxonomique des souches. Selon ces résultats, la technique SDS-PAGE ne donne pas toujours des résultats discriminants au niveau du genre, mais reste très utile pour regrouper les souches en clusters ayant le statut potentiel d'espèce. Dans le cas de l'étude des protéines totales de souches à croissance lente (*Bradyrhizobium*), une attention particulière doit être prise dans l'interprétation des clusters obtenus.

Pour ces raisons, nous avons choisi d'associer à cette méthode, une deuxième technique de groupage basée sur l'ARNr 16S, qui donne des informations fiables sur les relations phylogénétiques entre les organismes. L'ARNr 16S est actuellement le marqueur moléculaire le plus utilisé, car son séquençage peut être utilisé pour classer des isolats au niveau de l'espèce et à un niveau supérieur (Graham *et al.*, 1991). Le séquençage du gène de l'ARNr 16S reste cependant une technique lourde pour l'identification en routine d'un très grand nombre de souches. Les variations dans l'ARNr 16S peuvent être estimées par l'analyse des profils de restriction (RFLP) de séquences d'ADNr 16S amplifiées par PCR (Laguerre *et al.*, 1994). La PCR-RFLP sur l'ADNr 16S appelée aussi (Amplified Ribosomal DNA-restriction Analysis) est une méthode rapide d'identification des souches (Vanechoute *et al.*, 1992 ; Laguerre *et al.*, 1994). Les résultats ARDRA sont concordants avec la classification taxonomique basée sur l'homologie ADN/ADN ou sur l'analyse des séquences de l'ARNr 16S (Laguerre *et al.*, 1994).

II - RESULTATS ET DISCUSSION

L'analyse numérique des profils ARDRA montre que l'ensemble des souches forme 7 clusters dont 5 contiennent de nouveaux isolats ceci en considérant un coefficient de similarité de 87%. Parmi eux, quatre clusters correspondent aux clusters A, B, C et D précédemment décrits par Molouba *et al.*, (1999). Les clusters A et D restent inchangés et ne renferment aucun nouvel isolat contrairement aux clusters B et C. Le cluster C renferme 14 nouveaux isolats en plus des 13 isolats du groupe C décrit par Molouba *et al.*, (1999), ainsi que les souches de référence de *Bradyrhizobium elkanii* (LMG 6134^T et 6135) et deux souches de référence de *Bradyrhizobium sp.* (LMG 9959 et ORS 133). 24 nouveaux isolats et 10 souches représentant le cluster B décrit par Molouba *et al.*, (1999), constituent le groupe B. Ce cluster renferme également des souches de référence de *Bradyrhizobium japonicum* (LMG 6138^T et LMG 6136) du groupe d'hybridation I décrit par Hollis *et al.*, (1981), ainsi que des souches de référence de *Bradyrhizobium liaoningense*. Le cluster G contient uniquement des isolats d' *Indigofera senegalensis* issus de différentes localités, alors que le cluster F est constitué de 6 isolats de différentes plantes. En fin, le cluster E est formé par 5 nouveaux isolats accompagnés de la souche *Bradyrhizobium* USDA 110 représentant du groupe d'hybridation Ia (Hollis *et al.*, 1981).

Contrairement à l'étude ARDRA, la répartition des isolats en clusters par la technique d'analyse des profils protéiques SDS-PAGE est moins évidente. Pour un coefficient de similarité de 87%, les nouveaux isolats et les souches de référence de *Bradyrhizobium* se répartissent en 19 clusters. L'analyse basée sur les groupes ARDRA montre que les nouveaux isolats se retrouvent dans tous les clusters SDS-PAGE à l'exception des clusters 9, 12 et 18. Les souches qui constituent le cluster C se répartissent dans les groupes SDS-PAGE 2, 11, 13, 16 et 19, alors que les 7 souches du cluster G forment les groupes SDS-PAGE 10 et

17. Les groupes SDS-PAGE 5, 6, 7, 12 et 14 sont constitués par des souches du cluster B. On remarque par ailleurs qu'un certain nombre de groupes SDS-PAGE sont constitués par des souches appartenant à des clusters ARDRA différents. Ainsi les groupes 1 et 3 sont constitués de souches des clusters B, E et F tandis que les groupes 4 et 8 sont constitués respectivement par des souches des clusters B, E et B, C. Le groupe 15 étant constitué par des souches des clusters B, C et F.

L'analyse des profils SDS-PAGE n'a pas donné une répartition cohérente en relation avec le statut taxonomique. Par contre la technique ARDRA reconnue pour refléter les relations phylogénétiques entre espèces et pour classer les souches en espèces (Laguerre *et al.*, 1994) donne des résultats concordants avec les études phylogénétiques précédents sur les *Bradyrhizobium*. Ainsi parmi les 7 clusters ARDRA constitués par les nouveaux isolats, 4 correspondent aux principaux groupes définis par Molouba *et al.*, (1999). Il s'agit du cluster A pour les *Bradyrhizobium* photosynthétiques d'*Aeschynomene*, le cluster B qui contient la souche type de *Bradyrhizobium japonicum*, le cluster C pour le groupe *Bradyrhizobium elkanii* et le cluster D pour les *Bradyrhizobium sp.* non photosynthétiques d'*Aeschynomene*.

Parmi les 3 nouveaux clusters, le cluster G est proche du cluster C (*Bradyrhizobium elkanii*) alors que les clusters E et F font partie de la branche *Bradyrhizobium japonicum*.

Il n'y a pas de corrélation entre ARDRA et SDS-PAGE, puis que les clusters ARDRA sont constitués par des isolats appartenant à différents groupes SDS-PAGE et vice-versa. Ces résultats sont contraires à ceux généralement obtenus précédemment (de Lajudie *et al.*, 1994, 1998a, 1998b) pour des souches à croissance rapide ou intermédiaire (*Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* et *Allorhizobium*) et montrent que le criblage par SDS-PAGE

chez les souches de *Bradyrhizobium* n'est pas très fiable. En effet, contrairement à l'ARDRA, la technique SDS-PAGE est dépendante des conditions extérieures de culture. Ainsi à cause probablement du long temps d'incubation des souches, les profils protéiques ne sont pas distincts, rendant alors l'analyse numérique non précise (Dupuy *et al.*, 1994). Il est donc nécessaire dans le cas de *Bradyrhizobium* de mettre au point une technique basée sur des critères génétiques pour déterminer les relations entre les différents clusters définis par ARDRA.

Aucune des deux techniques ne permet de faire une relation entre l'origine des souches (Plante d'isolement et site de prélèvement) et les différents clusters à l'exception du cluster G dont toutes les souches sont isolées de la même plante *Indigofera senegalensis*.

Du point de vue symbiotique, les tests de nodulation avec 34 souches ont permis de distinguer deux groupes. Un premier groupe de 20 souches capables de former des nodules sur les 5 espèces de plantes testées et qui fixent l'azote plus ou moins efficacement suivant les espèces de légumineuses. Un deuxième groupe est constitué de 14 souches dont le spectre d'hôtes est variable selon la souche considérée.

III - CONCLUSIONS

L'utilisation combinée des deux techniques SDS-PAGE et ARDRA pour la caractérisation de notre collection a mis en évidence une grande diversité des souches à croissance lente associées aux petites légumineuses rencontrées dans les jachères au Sénégal. Elles constituent plusieurs sous groupes phylogénétiques au sein du genre *Bradyrhizobium* alors que les tests de nodulation montrent un certain degré de spécificité des souches. Il paraît cependant évident que chez *Bradyrhizobium*, les groupes de souches définis sur la base des profils

protéiques doivent être considérés avec précaution car ils ne reflètent pas toujours le statut taxonomique des souches. La mise au point d'une méthode fine et discriminative basée sur des critères génétiques permettrait l'étude des relations entre les souches ou groupes de souches à l'intérieur des clusters définis sur la base de l'ARNr (ARDRA). Ainsi dans le cadre de son travail de thèse, Doignon-Bourcier a poursuivi cette étude et développant des méthodes génotypiques de groupage. Il s'agit de deux techniques génotypiques L'AFLP et l'IGS-RFLP (Doignon-Bourcier *et al.*, 2000). Ces deux méthodes qui ont confirmé la grande diversité des *Bradyrhizobium* de petites légumineuses se sont avérées de bonnes méthodes de caractérisation et de groupement préliminaire des souches de *Bradyrhizobium*. Elles donnent des résultats concordants entre elles mais aussi avec la méthode ARDRA et l'hybridation ADN/ADN (Willems *et al.*, 2001 *in press*).

Diversity of Bradyrhizobia from 27 Tropical Leguminosae Species Native of Senegal

FLORENCE DOIGNON-BOURCIER^{1,2}, ABDOULAYE SY^{1,3}, ANNE WILLEMS², URBAIN TORCK², BERNARD DREYFUS³, MONIQUE GILLIS², and PHILIPPE DE LAJUDIE^{1,2,3}

¹Laboratoire de Microbiologie des Sols, I.R.D., Dakar, Senegal, West Africa

²Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Ghent, Belgium

³Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, I.R.D./INRA/AGRO-M/CIRAD, Montpellier Cedex, France

Received September 7, 1999

Summary

We isolated 71 slow-growing bacterial strains from nodules of 27 native leguminous plants species in Senegal (West-Africa) belonging to the genera *Abrus*, *Alysicarpus*, *Bryaspis*, *Chamaecrista*, *Cassia*, *Crotalaria*, *Desmodium*, *Eriosema*, *Indigofera*, *Moghania*, *Rhynchosia*, *Sesbania*, *Tephrosia*, and *Zornia* playing an ecological role and having agronomic potential in arid regions. The isolates were characterised by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of PCR-amplified 16S rDNA and comparative SDS-PAGE of whole-cell proteins; reference strains of the different known rhizobial species and groups were included as references. We conclude that these nodule isolates are diverse, and form several phylogenetic subgroups inside *Bradyrhizobium*. Nodulation tests performed on 5 plant species demonstrated host specificity among the strains studied.

Key words : *Bradyrhizobium* – Tropical legumes – SDS-PAGE – 16S-ARDRA

Introduction

Rhizobia, a general term referring to nitrogen-fixing bacteria capable of living in symbiosis with legume plants, are taxonomically very diverse; they have been studied intensively the last years and their classification has changed and several new species and genera have been created (YOUNG and HAUKKA, 1996; JARVIS et al., 1997; AMARGER et al., 1997; CHEN et al., 1997; VAN BERKUM et al., 1998; DE LAJUDIE et al., 1998a,b; WANG et al., 1998; 1999).

Among the 19000 described legume species in the world, only a small proportion has been studied for isolation of symbiotic bacteria and until recently, most studies concerned cultivated plants. During the last ten years, several authors reported isolation of rhizobia from previously uninvestigated wild legumes in different parts of the world, namely in Brazil (MOREIRA et al., 1993), Canada (PREVOST et al., 1987) Russia (NOVIKOVA et al., 1994; VAN BERKUM et al., 1998), China (CHEN et al., 1991; 1995; 1997; GAO et al., 1994; WANG et al., 1999), Sudan (ZHANG et al., 1991, NICK et al., 1999, HAUKKA et al., 1996), Senegal (DREYFUS et al., 1988; LORQUIN et al., 1993, DUPUY et al., 1994, DE LAJUDIE et al., 1994; 1998a,b; 1999; MOLOUBA et al., 1999), South Africa

(DAGUTAT and STEYN, 1994), Canary Islands (VINUESA et al., 1998) and several new rhizobial groups were described.

In Senegal, legume plants have ecological, agronomic and economical importance: they constitute 16% of the total plant species and 11% of the genera of the total vegetation (DIEDHIOU, 1994). A number of them are indigenous, annual or perennial, herbaceous or shrub legumes, well adapted to local arid climatic conditions and mineral- (especially nitrogen-) deficient soils; 85% of the legume plants in the arid and semi-arid regions are spontaneous plants potentially important for programs of soil fertility regeneration, sustainable agriculture, forestry and forage. As a result of prospecting in different arid regions of Senegal we found a number of nodulated legume species, belonging to 14 genera, that could be of importance for soil sustainability.

We report here the isolation and the characterization of 71 slow-growing bacterial nodule isolates from 27 plant species sampled in different places in Senegal: several species of the genera *Abrus*, *Alysicarpus*, *Bryaspis*, *Chamaecrista*, *Cassia*, *Crotalaria*, *Desmodium*, *Eriosema*, *Indigofera*, *Moghania*, *Rhynchosia*, *Sesbania*,

Tephrosia, *Zornia*. We performed Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis of the PCR-amplified 16S rRNA gene (ARDRA), comparative Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of whole cell protein patterns and nodulation tests. Reference strains representing the different rhizobial species and groups were included for comparison.

Materials and Methods

Bacterial strains and isolation procedures: The strains studied are listed in Table 1.

Rhizobial strains were isolated either from naturally occurring root nodules collected *in natura* or from nodules obtained after cultivation of plants (either *in vitro* or in pots containing sterilised soil) inoculated with either crushed nodules or soil sample suspensions. Nodules collected *in natura* were either directly used for rhizobial isolation or stored dried in tubes containing CaCl_2 (DATE, 1982). Upon utilisation, nodules were re-hydrated in sterile water and surface sterilised by immersion in HgCl_2 (0.1%) for 5 min. From this stage the nodules were manipulated aseptically. The nodules were rinsed 8 times in sterile water. Big nodules were aseptically cut and samples were directly picked out from the centre of the nodule and streaked onto Yeast extract Mannitol medium agar (YMA) plates (VINCENT, 1970). Smaller nodules were crushed in a drop of sterile water and the suspension was streaked on YMA. Colonies appeared after several days of incubation at 30 °C in aerobic conditions. They were checked for purity by repeated streaking on YMA and by microscopic examination of living cells. Isolates were checked for nodulation on their original host plants, and stored at -80 °C in YM adjusted to 20% (v/v) glycerol.

In other cases, nodules were obtained *in vitro* by cultivating plants in the presence of either crushed nodules sampled *in natura* or soil suspensions when no nodules could be found *in natura*. Soil samples were collected at 5–20 cm depth in the vicinity of spontaneous legumes in various regions. They were stored in plastic bags at 4 °C and used as soon as possible to minimise possible changes of their internal bacterial population (BROCKWELL, 1982). Four seedlings of the plant species present at the sampling site, grown aseptically for 3–5 days in Jensen slant agar tubes (GIBSON, 1963) were inoculated with one ml of a 60 min-magnetic-stirred soil suspension in 0.8% NaCl (10% w/v). Two to three week-old nodules were collected, washed, surface sterilised and treated as above for rhizobium isolation. ORS 515 was isolated from a nodule formed on *Indigofera senegalensis* inoculated with crushed nodules harvested on *Desmodium setigenum in natura* (no seed of *D. setigenum* was available).

Growth and culture conditions: All *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains were maintained on YMA medium (VINCENT, 1970) containing (g/l): mannitol, 10; sodium glutamate, 0.5; K_2HPO_4 , 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; NaCl, 0.05; CaCl_2 , 0.04; FeCl_3 , 0.004; yeast extract (Difco), 1; pH 6.8; agar, 20. *Azorhizobium* strains were maintained on YEB medium containing (in g/l of 0.01 M phosphate buffer, pH 7.2): peptone (Oxoid), 5; yeast extract (Oxoid), 1; beef extract (Oxoid), 5; sucrose, 5 and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.592. All strains were stored at -80 °C on the same medium adjusted to 20% (vol/vol) glycerol; some strains were kept also in lyophilised form.

Plant cultivation and nodulation tests: The seeds were scarified and surface-sterilised with concentrated sulphuric acid. The minutes of treatment with H_2SO_4 for the different plant species were as follows: *Indigofera astragalina* and *Indigofera sene-*

galensis, 15; *Indigofera tinctoria*, 20; *Rhynchosia minima*, 40; *Tephrosia purpurea*, 60. After treatment, the seeds were washed with water until all traces of acid were removed. The seeds were incubated to germinate in sterile Petri dishes on 1% water agar for 24 to 48 hours and then transferred to tubes containing Jensen seedling slant agar (VINCENT, 1970) for root nodulation trials (4–6 plants were routinely tested with each strain). Plants were grown under continuous light (20 W/m²) at 28 °C. Plants were observed for nodule formation during 6 to 8 weeks.

Nitrogen fixation activity: Nitrogen-fixing potential was estimated by visual observation of plant vigour and foliage colour of ca. 30 day old plants, and by measurement of Acetylene reducing activity according to HARDY et al. (1973).

Polyacrylamide gel electrophoresis of total bacterial proteins: All strains were grown at 28 °C for 48 h (fast-growing rhizobia) or 72 h (slow-growing rhizobia) in Roux flasks on TY medium containing (g/l): tryptone (Oxoid), 5; yeast extract (Oxoid), 0.75; KH_2PO_4 , 0.454; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2.388; CaCl_2 , 1; agar (Lab M), 20; pH 6.8–7. Whole-cell protein extracts were prepared from 80 mg cells and SDS-PAGE was performed using small modifications of the procedure of LAEMMLI (1970), as described previously (DE LAJUDIE et al., 1994). The normalised densitometric traces of the protein electrophoretic patterns were grouped by numerical analysis, using the Gel-Compar 4.2 software package (VAUTERIN & VAUTERIN, 1992). The similarity between all pairs of traces was expressed by the Pearson product moment correlation coefficient (*r*) converted for convenience to a percent value (POT et al., 1989; 1994).

16S ARDRA: Strains were grown at 28 °C for 5 days on YMA. Total DNA was purified by a slightly modified technique from PITCHER et al. (1989). Cells were suspended in RS buffer (0.15 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH 8.0). The deproteinisation step was performed with chloroform:iso-amyl alcohol (24:1). After precipitation, purified DNA was washed three times in ethanol, dried, dissolved overnight at 4 °C in TE buffer, and treated (60 min, 37 °C) with RNase (50 µg/ml final concentration). The control of the DNA quality and the calculation of DNA concentration were performed as described by HEYNDRICKX et al. (1996). The oligonucleotides used as primers for PCR amplification of the 16S rRNA genes were purchased from Pharmacia Biotech (Amersham Pharmacia Biotech Benelux, Roosendaal, The Netherlands). The sequences of the forward and reverse primers were 5'-AG AGT TTG ATC ATG GCT CAG-3' and 5'-TAC CTT GTT ACG ACT TCA CCC CA-3' respectively (HEYNDRICKX et al., 1996). PCR amplification was carried out in a 50 µl reaction volume containing template DNA (5 µl, 250 ng), reaction buffer (Eurogentec Bel SA, Seraing, Belgium), 10 mM of each dNTP (Pharmacia Biotech), 20 µM of each of the primers and 1 unit of *Taq* polymerase (Eurogentec Bel SA). A negative control containing 5 µl of Milli-Q water instead of DNA was included in every PCR run. Amplifications were carried out in a Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer, Nieuwerkerk a/d IJssel, The Netherlands) using the following program: initial denaturation for 7 min at 95 °C, 50 cycles of denaturation (45 sec at 95 °C), annealing (30 sec at 57 °C) and extension (2 min at 72 °C), and a final extension (10 min at 72 °C). PCR amplified DNAs were visualised by Hoefer HE 33 Mini Submarine electrophoresis (Amersham Pharmacia Biotech) at 70 V during 30 minutes of 5 µl of the amplified mixture on 2% w/v Biozym DNA Agarose (Biozym, Landgraaf, The Netherlands) in TAE buffer (40 mM Tris-Acetate, 2 mM EDTA, 20 mM Acetic Acid, pH 8.0) containing 0.5 mg/ml of ethidium bromide.

Aliquots of 10 µl of PCR products were digested with restriction endonucleases during 2 hours in a 20 µl final volume as specified by the manufacturer but with an excess of enzyme (5 units per reaction). Five restriction enzymes were selected on

the basis of simulated digests of the 16S rDNA sequences as described by HEYNDRIKX et al. (1996): *Hinf* I (New England Biolabs Inc., Leusden, The Netherlands), *Dde* I (Pharmacia Biotech Benelux), *Mwo* I (Biolabs), *Alu* I (Boehringer Mannheim Biochemica, Bruxelles, Belgium), *Hha* I (New England Biolabs Inc.). Restricted DNA was analysed by horizontal agarose gel electrophoresis as described by HEYNDRIKX et al. (1996) except that we used LSI MP agarose (Life Sciences International, Zellik, Belgium) and a DNA Sub Cell unit (15 × 10 cm tray, 20 wells, Biorad). The scanned gel images were digitised and stored in a computer as described by HEYNDRIKX et al. (1996). Clustering was obtained from the combined profiles using the Gel-Compar 4.2 software package (VAUTERIN & VAUTERIN, 1992). Dice coefficient (Tol 0.3%, Opt 0.50%, Min. area 0.0%) and UPGMA clustering were used.

Results

Collection of nodule bacterial isolates from spontaneous legumes

We performed large prospectives in arid and semi-arid regions of Senegal and focused on 34 spontaneous nodulated legume plant species (annual or perennial), most likely to be important for the protection of the environment, for soil fertility (in fallow lands) or as forage. Among these, we did bacterial isolations from nodules collected on 27 plant species of 13 genera (Table 1) from 19 different places in Senegal. The majority of the isolates were slow-growing bacteria, but a few fast-growing ones were also obtained from *Rhynchosia minima*, *Tephrosia villosa*, *Tephrosia bracteolata*, *Indigofera senegalensis*, *Indigofera hirsuta*, *Indigofera astragalina*, *Indigofera tinctoria*, *Alysicarpus ovalifolius*. A total of 87 bacterial nodule isolates were obtained, among which 71 slow-growing ones were chosen for further studies. Ten strains were obtained by direct isolation from naturally occurring nodules; 61 isolates were obtained from nodules formed on plants in laboratory conditions by using crushed nodules or soil samples. Nodules and soils originated from 21 different places in Senegal. 24 nodule isolates originate from the North region (isohyets 250–500 mm), 17 from the Central region (isohyets 500–900 mm) and 28 from the South region (isohyets 900–1200 mm).

Tephrosia purpurea and *Rhynchosia minima* were only found in the North region. In South Senegal we found several species of *Desmodium* and *Crotalaria*, *Abrus stictosperma*, *Eriosema glomeratum*, *Indigofera microcarpa*, *Alysicarpus glumaceus*, *Alysicarpus rugosus*, *Zornia glochidiata*, *Cassia absus*, *Tephrosia bracteolata* and *Indigofera stenophylla*. *Indigofera tinctoria*, *Indigofera astragalina*, *Indigofera senegalensis* and *Sesbania rostrata* were found in both the North and Central regions, *Indigofera hirsuta*, *Alysicarpus ovalifolius* and *Tephrosia villosa* in both the Central and the South regions.

16S ARDRA

We studied 59 new isolates, including *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii* and *Bradyrhizo-*

bium sp. reference strains representative for ARDRA groups A, B, C and D of our previous report (MOLOUBA et al., 1999). In addition, we included 6 more strains of *B. japonicum*, 2 strains of *B. liaoningense* and several partially characterized *Bradyrhizobium* sp. strains (DUPUY et al., 1994; MOREIRA et al., 1993; 1998; LAGUERRE et al., 1994). 16S ribosomal DNA was PCR-amplified and all strains produced a single band of the expected size of approximately 1500 bp. Amplified DNA was hydrolysed with five endonucleases, and the combined agarose gel electrophoretic patterns were compared numerically using GelCompar version 4.2. The results are shown as a dendrogram in Fig. 1. The results for strain LMG 6134^T (included twice) illustrate the reproducibility of the method. At a mean Dice similarity coefficient (S_D) of 87%, seven main clusters (A to G) could be distinguished, and strains LMG 4265, ORS 30, ORS 1819 occupied separate positions. As four of the clusters corresponded to the previously identified clusters A, B, C and D by MOLOUBA et al. (1999), we named them accordingly.

Cluster C (internal grouping at a S_D of 88%) included 14 new isolates from diverse plants and regions and the 13 strains of the original cluster C of MOLOUBA et al. (1999), including the reference strains of *B. elkanii* (LMG 6134^T and LMG 6135). This cluster included also *Bradyrhizobium* sp. strains LMG 9959 and ORS 133. The strain LMG 4262, so far classified as *B. japonicum*, also grouped in cluster C.

Cluster G (internal grouping at a S_D of 92%) consisted of 8 new isolates from *Indigofera senegalensis* sampled in different places in North Senegal.

In addition to the 10 strains representing ARDRA cluster B of MOLOUBA et al. (1999), the present cluster B (internal grouping at a S_D of 85%) included 24 new isolates, the majority of *B. japonicum* reference strains, among which LMG 6138^T and LMG 6136 belong to DNA-DNA hybridisation group I (HOLLIS et al., 1981) and both strains of *B. liaoningense* included in this study.

Cluster E (internal grouping at a S_D of 82%) consisted of five new isolates and *B. japonicum* strain USDA 110, representative for the DNA hybridisation group Ia (HOLLIS et al., 1981).

Cluster F (internal grouping at a S_D of 85%) consisted of 6 new isolates from diverse plant species originating from Central and South Senegal.

Clusters A and D were unchanged compared to our previous report (MOLOUBA et al., 1999), and no new isolates grouped in them.

SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of total bacterial proteins

The SDS-PAGE whole-cell protein patterns of 64 new rhizobial isolates from Senegal were scanned and analysed numerically together with those of 33 reference strains representing different fast- and slow-growing rhizobial species and 28 other partially characterised strains (MOREIRA et al., 1993; 1998; DUPUY et al., 1994; MOLOUBA et al., 1999), several of which had also been

ORS 1810	LMG 15242	<i>Crotalaria lathyroides</i>	TIVN	Kabrousse (Casamance, SS)	This work	B	3
ORS 1811	LMG 15243	<i>Crotalaria goreensis</i>	TIVN	Kabrousse (Casamance, SS)	This work	B	1
ORS 1812	LMG 15365	<i>Abrus stictosperma</i>	TIVN	Fanghote (Casamance, SS)	This work	C	16
ORS 1813	LMG 15244	<i>Crotalaria hyssopifolia</i>	TIVN	Kabrousse (Casamance, SS)	This work	C	2
ORS 1814	LMG 15245	<i>Crotalaria hyssopifolia</i>	TIVN	Fanghote (Casamance, SS)	This work	C	2
ORS 1815	LMG 15246	<i>Crotalaria hyssopifolia</i>	TIVN	Fanghote (Casamance, SS)	This work	B	3
ORS 1816	LMG 15247	<i>Crotalaria hyssopifolia</i>	TIVN	Fanghote (Casamance, SS)	This work	B	4
ORS 1817	LMG 15366	<i>Eriosema glomeratum</i>	TIVN	Oukout (Casamance, SS)	This work	B	7
ORS 1818	LMG 15248	<i>Indigofera microcarpa</i>	TIVN	Oukout (Casamance, SS)	This work	B	8
ORS 1819	LMG 15249	<i>Crotalaria retusa</i>	TIVN	Kabrousse (Casamance, SS)	This work	F	4
ORS 1820	LMG 15250	<i>Indigofera hirsuta</i>	TIVN	Fanghote (Casamance, SS)	This work	E	4
ORS 1823	LMG 15367	<i>Indigofera hirsuta</i>	TIVN	Wouring (Niokolokoba, SS)	This work	C	2
ORS 1824	LMG 15253	<i>Indigofera hirsuta</i>	TIVN	Wouring (Niokolokoba, SS)	This work	C	2
ORS 1826	LMG 15255	<i>Alysicarpus glumaceus</i>	TIVN	Fanghote (Casamance, SS)	This work	nd	2
ORS 1828	LMG 15368	<i>Alysicarpus ovalifolius</i>	TIVN	Niokolokoba (SS)	This work	B	nd
ORS 1831	LMG 15369	<i>Alysicarpus rugosus</i>	TIVN	Fanghote (Casamance, SS)	This work	B	5
ORS 1832	LMG 15258	<i>Bryaspis lupulina</i>	TIVN	Kagnout (Casamance, SS)	This work	F	3
ORS 1836	LMG 15261	<i>Crotalaria glaucoïdes</i>	TIVN	Kaparan (Casamance, SS)	This work	C	11
ORS 1838	LMG 15263	<i>Sesbania rostrata</i>	NIN	Kaolack (CS)	This work	F	3
ORS 1844	LMG 15266	<i>Chamaecrista</i> sp.	TIVN	Karounate (Casamance, SS)	This work	B	5
ORS 1847	LMG 15268	<i>Zornia glochidiata</i>	TIVN	Fanghote (Casamance, SS)	This work	B	5
ORS 1848	LMG 15373	<i>Indigofera hirsuta</i>	TIVN	Kaparan (Casamance, SS)	This work	C	15
ORS 1849	LMG 15374	<i>Indigofera hirsuta</i>	TIVN	Fanghote (Casamance, SS)	This work	C	2
ORS 1894	LMG 15696	<i>Indigofera hirsuta</i>	NIN	Kolda (Casamance, SS)	This work	F	15
ORS 1896	LMG 15697	<i>Cassia absus</i>	NIN	Kolda (Casamance, SS)	This work	B	15
ORS 1898	LMG 15699	<i>Tephrosia bracteolata</i>	NIN	Kolda (Casamance, SS)	This work	F	1
ORS 1899	LMG 15700	<i>Indigofera stenophylla</i>	NIN	Kolda (Casamance, SS)	This work	F	1
ORS 1903	LMG 15702	<i>Tephrosia villosa</i>	NIN	Kolda (Casamance, SS)	This work	F	3
ORS 1905	LMG 15703	<i>Tephrosia bracteolata</i>	TIVN	Kolda (Casamance, SS)	This work	B	14
• <i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Faidherbia</i>)							
ORS 103	LMG 10665	<i>Faidherbia albida</i>	TIVS	Dakar Bel-Air (CS)	DUPUY et al., 1994	B	nd
ORS 110	LMG 10666	<i>Faidherbia albida</i>	TIVS	Louga (NS)	DUPUY et al., 1994	B	nd
ORS 117	LMG 10673	<i>Faidherbia albida</i>	TIVS	Louga (NS)	DUPUY et al., 1994	nd	19
ORS 121	LMG 10677	<i>Faidherbia albida</i>	TIVS	Louga (NS)	DUPUY et al., 1994	C	nd
ORS 130	LMG 10686	<i>Faidherbia albida</i>	TIVS	Louga (NS)	DUPUY et al., 1994	nd	sep
ORS 133	LMG 10689	<i>Faidherbia albida</i>	TIVS	Louga (NS)	DUPUY et al., 1994	C	nd
ORS 162	LMG 10705	<i>Faidherbia albida</i>	TIPS	Casamance (SS)	DUPUY et al., 1994	C	nd
ORS 163	LMG 10706	<i>Faidherbia albida</i>	TIPS	Oussouye (Casamance, SS)	DUPUY et al., 1994	nd	5
ORS 166	LMG 15183	<i>Faidherbia albida</i>	TIPS	Oussouye (Casamance, SS)	DUPUY et al., 1994	nd	11
ORS 169	LMG 10712	<i>Faidherbia albida</i>	TIPS	Kabrousse (Casamance, SS)	DUPUY et al., 1994	B	nd
ORS 170	LMG 10713	<i>Faidherbia albida</i>	TIPS	Bayotte (Casamance, SS)	DUPUY et al., 1994	nd	18
ORS 174	LMG 10717	<i>Faidherbia albida</i>	TIPS	Badiana (Casamance, SS)	DUPUY et al., 1994	C	7
ORS 175	LMG 10718	<i>Faidherbia albida</i>	TIPS	Djinaki (Casamance, SS)	DUPUY et al., 1994	C	nd
ORS 184	LMG 10723	<i>Faidherbia albida</i>	TIPS	Keur Momar Sarr (Guiers Lake, NS)	DUPUY et al., 1994	nd	8
ORS 187	LMG 10726	<i>Faidherbia albida</i>	TIPS	Dagana (NS)	DUPUY et al., 1994	B	nd
ORS 188	LMG 10727	<i>Faidherbia albida</i>	TIPS	Dagana (NS)	DUPUY et al., 1994	nd	1
• <i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Aeschynomene</i>)							
ORS 294(f)	LMG 12192	<i>Aeschynomene sensitiva</i>	NIN	Fanda Niaguisse (Casamance, SS)	MOLOUBA et al., 1999	A	nd
ORS 296	LMG 12194	<i>Aeschynomene sensitiva</i>	NIN	Fanda Niaguisse (Casamance, SS)	MOLOUBA et al., 1999	D	nd

Bradyrhizobium from 27 Tropical Leguminosae 651

BR 6817	LMG 10010	<i>Pithecellobium</i> sp.	Espirito Santo, Brazil	MOREIRA et al., 1993, 1998	nd	5
BR 8406	LMG 10018	<i>Dalbergia nigra</i> Allem.	Rio de Janeiro, Brazil	MOREIRA et al., 1993, 1998	nd	9
FL 27	LMG 10023	<i>Melanoxylon</i> sp.	Espirito Santo, Brazil	MOREIRA et al., 1993, 1998	nd	16
FL 276	LMG 10025	<i>Abrus</i> sp.	Brazil	MOREIRA et al., 1993	nd	16
FL 281	LMG 10026	<i>Abrus</i> sp.	Rio de Janeiro, Brazil	MOREIRA et al., 1993, 1998	nd	16
INPA 9A	LMG 10029	<i>Derris</i> sp.	Brazil	MOREIRA et al., 1993	B	nd
INPA 36B	LMG 10040	<i>Inga</i> sp.	Brazil	MOREIRA et al., 1993	nd	5
INPA 46B	LMG 10043	<i>Clitoria racemosa</i> G. Don.	Amazonas, Brazil	MOREIRA et al., 1993, 1998	nd	sep
INPA 54B	LMG 10044	<i>Inga</i> sp.	Amazonas, Brazil	MOREIRA et al., 1993, 1998	nd	6
INPA 183B	LMG 10075	<i>Pentaclethra macroloba</i> (Willd.) Ktze.	Amazonas, Brazil	MOREIRA et al., 1993, 1998	nd	9
INPA 191A	LMG 10078	<i>Dimorphandra parviflora</i> Spruce ex Benth	Amazonas, Brazil	MOREIRA et al., 1993, 1998	nd	11
INPA 495B	LMG 10107	<i>Inga acranum</i> Harms	Brazil	MOREIRA et al., 1993	nd	12
INPA 514A	LMG 10112	<i>Machaerium quinata</i>	Amazonas, Brazil	MOREIRA et al., 1998	nd	11
MSDJ 718		<i>Lupinus luteus</i>	France	LAGUERRE et al., 1994	B	nd
• <i>Mesorhizobium plurifarum</i>						
ORS 1030	LMG 11890	<i>Acacia senegal</i>	Senegal	DE LAJUDIE et al., 1998		
ORS 1031	LMG 11891	<i>Acacia senegal</i>	Senegal	DE LAJUDIE et al., 1998		
ORS 1032 ^T	LMG 11892 ^T	<i>Acacia senegal</i>	Senegal	DE LAJUDIE et al., 1998		
• <i>Mesorhizobium loti</i>						
NZP 2230	LMG 6126	<i>Lotus maroccanus</i>	Morocco	JARVIS et al., 1986		
NZP 2213 ^T	LMG 6125 ^T	<i>Lotus corniculatus</i>	New Zealand	JARVIS et al., 1986		
• <i>Mesorhizobium ciceri</i>						
UPM-Ca7 ^T	LMG 17150 ^T	<i>Cicer arietinum</i> L.	Spain	NOUR et al., 1994		
522	LMG 17149	<i>Cicer arietinum</i> L.	Russia	NOUR et al., 1994		
• <i>Mesorhizobium huakuii</i>						
IAM 14158 ^T	LMG 14107 ^T	<i>Astragalus sinicus</i>	Nanjing, China	CHEN et al., 1991		
• <i>Mesorhizobium tianshanense</i>						
A-1BS ^T	LMG 15767 ^T	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	Xinjiang, China	CHEN et al., 1995		
O17A	LMG 15768	<i>Sophora alopecuroides</i>	Xinjiang, China	CHEN et al., 1995		
• <i>Sinorhizobium fredii</i>						
USDA 205 ^T	LMG 6217 ^T	<i>Glycine max</i>	Honan, China	JARVIS et al., 1986		
USDA 191	LMG 8317	Soil	Shanghai, China	JARVIS et al., 1986		
• <i>Sinorhizobium meliloti</i>						
NZP 4009	LMG 6130	<i>Medicago sativa</i>	Australia			
NZP 4027 ^T	LMG 6133 ^T	<i>Medicago sativa</i>	Virginia, U.S.A.			
• <i>Sinorhizobium medicae</i>						
HAMBI 1808	LMG 16579	<i>Medicago radiata</i>	Syria	K. LINDSTRÖM		
HAMBI 1809	LMG 16580	<i>Medicago truncatula</i>	Syria	K. LINDSTRÖM		
• <i>Sinorhizobium terengae</i>						
ORS 51	LMG 6464	<i>Sesbania rostrata</i>	Senegal	DE LAJUDIE et al., 1994		
ORS 1013	LMG 7844 ^{t1}	<i>Acacia senegal</i>	Senegal	DE LAJUDIE et al., 1994		

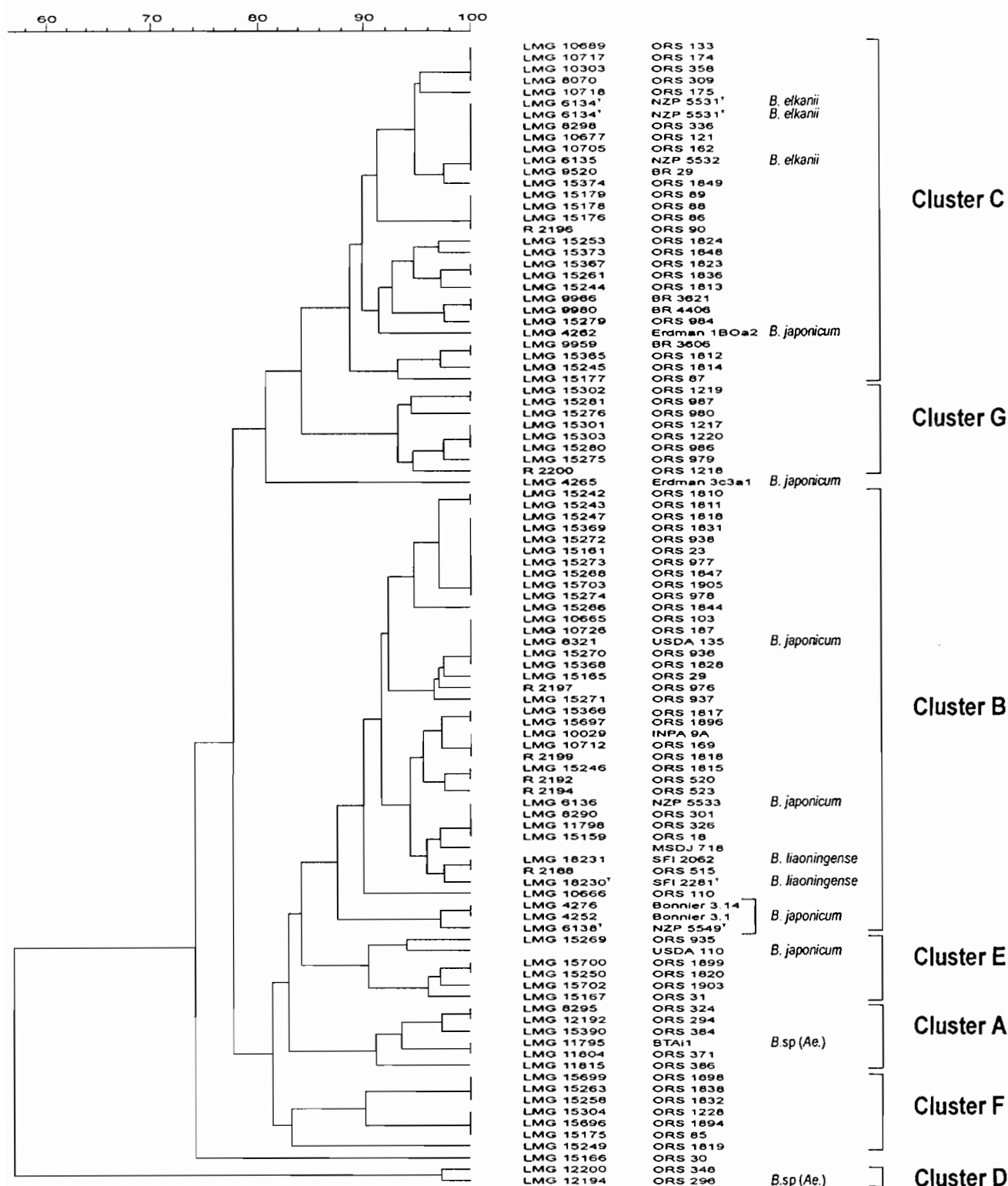


Fig. 1. Dendrogram based on the unweighted pair group method using average linkage (UPGMA) clustering of Dice correlation values (S_D) of normalised and combined ARDRA patterns of Senegalese isolates, some representative strains from Brazil and reference strains of *Bradyrhizobium* obtained with the restriction enzyme combination *Hinf* I, *Dde* I, *Mwo* I, *Alu* I and *Hha* I. B. sp. (Ae.), *Bradyrhizobium* sp. (*Aeschynomene*). The reproducibility is illustrated by the two independent extracts of strain LMG 6134^T.

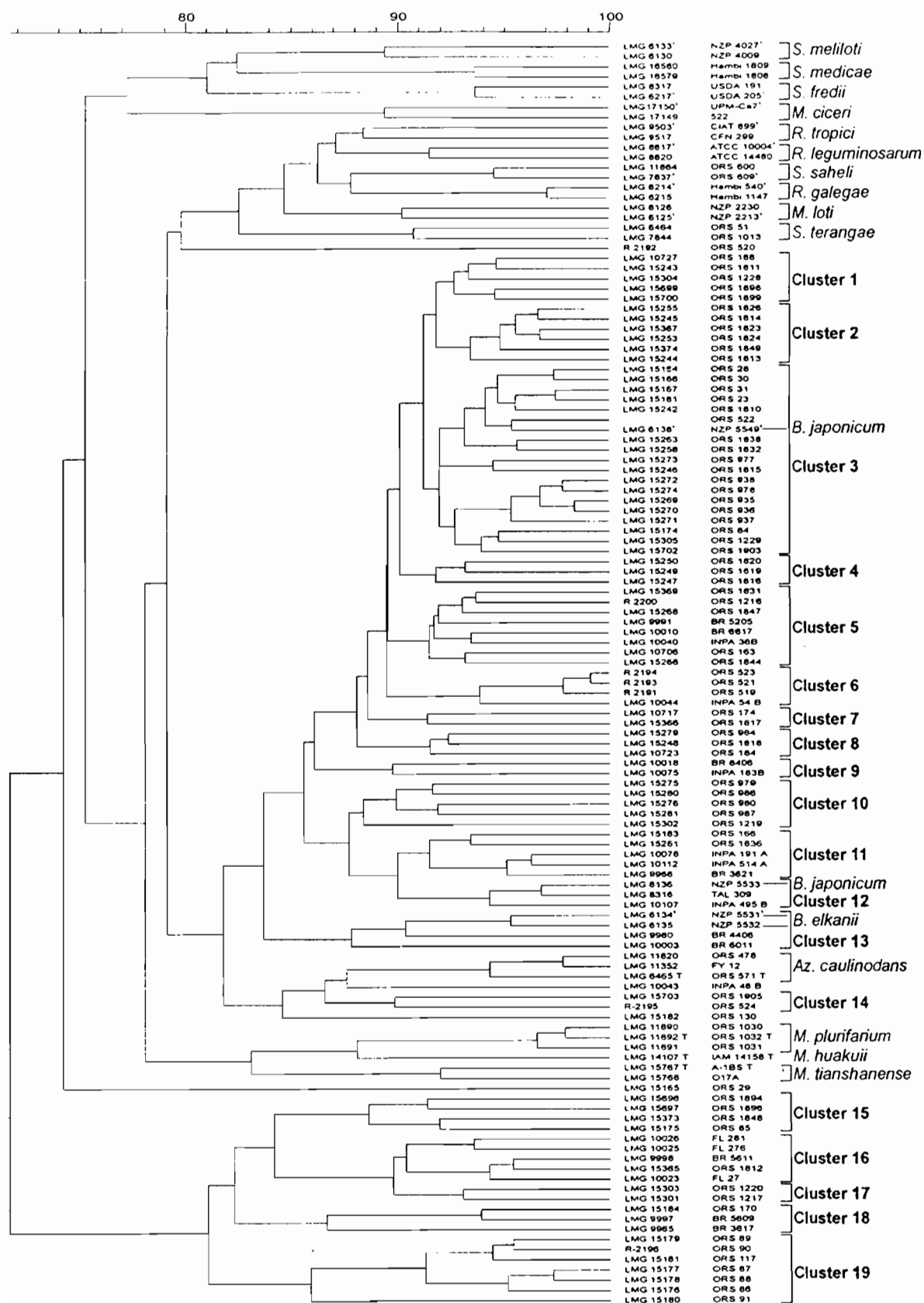


Fig. 2. Dendrogram showing the relationships between the electrophoretic protein patterns from Senegalese, Brazilian and reference strains of *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* and *Azorhizobium*. The mean correlation coefficient (r) was represented as a dendrogram and calculated by the unweighted average pairs grouping method (UPGMA). Positions 15 to 320 of the 400 point traces were used for calculation of similarities between individual pair of traces. The scale represents the r value converted to percentages.

included in the ARDRA study. The results are presented as a similarity dendrogram in Fig. 2.

Delineation of groups was not evident, and we evaluated the SDS-PAGE results by referring to the ARDRA groups previously identified. At a similarity coefficient of 87% the different fast- and moderately fast-growing rhizobial species formed distinct clusters, and as expected, none of the new isolates grouped with any of them. Majority of the slow-growing strains, new isolates and *Bradyrhizobium* reference strains, formed 19 clusters. Four slow-growing strains had separate positions, namely ORS 130, INPA 46B and two new isolates (ORS 520, ORS 29). New isolates were found in all SDS-PAGE groups except in groups 9, 12 and 18.

SDS-PAGE groups 2, 11, 13, 16 and 19, were formed by strains of ARDRA cluster C; several partially characterised *Bradyrhizobium* sp. strains grouped with them: ORS 166 and ORS 117 (DUPUY et al., 1994), BR 6011, INPA 191 A, INPA 514 A, BR 5611, FL 27, FL 276 and FL 281 (MOREIRA et al., 1994; BARRERA et al., 1997).

SDS-PAGE groups 10 and 17 consisted of the 7 strains of ARDRA cluster G.

SDS PAGE groups 5, 6, 7, 12, 14 contained strains from ARDRA cluster B; *Bradyrhizobium* sp. strains BR 5205, BR 6817, INPA 36B, INPA 54B, INPA 495B (MOREIRA et al., 1998) and ORS 163 (DUPUY et al., 1994) also grouped with them; group 12 included *B. japonicum* strain LMG 6136 and *Bradyrhizobium* sp. strain LMG 8316. Surprisingly, strain ORS 1218 (ARDRA cluster G) and strain ORS 174 (ARDRA cluster C) also grouped with them.

Group 9 consisted of two strains having partial 16S rDNA sequence similarity with *B. japonicum* (MOREIRA et al., 1998); Group 18 consisted of three strains reported to have similarities with *B. elkanii* (DUPUY et al., 1994; MOREIRA et al., 1998).

Several SDS-PAGE groups consisted of strains from different ARDRA clusters. Groups 1 and 3 consisted of strains from clusters B, E and F; strain ORS 188 (DUPUY et al., 1994) grouped in 1, and *B. japonicum* type strain was in group 3, together with ORS 30, ORS 1819, two strains having separate positions in our ARDRA study. Group 4 consisted of strains from clusters B and E. Group 8 consisted of strains from clusters B and C. Group 15 consisted of strains from clusters B, C and F.

Host specificity

Nodulation of 34 strains was tested on 5 plant species: *Indigofera astragalina*, *I. senegalensis*, *I. tinctoria*, *Rhynchosia minima* and *Tephrosia purpurea*. Effectiveness of the symbiosis was estimated by Acetylene Reducing Activity (ARA) test. In addition 8 strains (ORS 515, ORS 516, ORS 518, ORS 519, ORS 520, ORS 521, ORS 523, ORS 524) were tested on *I. senegalensis* only and were found effective on this plant. Results are shown in Table 2, and two groups were distinguished among the new nodule isolates. Group I (20 isolates) nodulated the five host plants tested. However, Acetylene Reducing Activity (ARA) tests revealed a specificity for symbiotic nitrogen fixation: all were effective on *I. astragalina* and *T. purpurea*; only 10 strains were effective on *R. minima*; 13

Table 2. Nodulation tests.

Strain	<i>Indigofera astragalina</i>	<i>Tephrosia purpurea</i>	<i>Indigofera tinctoria</i>	<i>Indigofera senegalensis</i>	<i>Rhynchosia minima</i>
Group I					
ORS 88, ORS 89, ORS 91, ORS 977, ORS 1229	e*	e	e	e	e
ORS 87, ORS 978	e	e	e	e	I
ORS 90	e	e	e	I	e
ORS 935, ORS 936, ORS 979	e	e	I*	e	e
ORS 86	e	e	I	I	e
ORS 937, ORS 938, ORS 976	e	e	I	e	I
ORS 23, ORS 28, ORS 30, ORS 84, ORS 85	e	e	e	I	I
Group II					
ORS 26, ORS 1228	e	e	e	O*	I
ORS 18	e	e	e	I	O
ORS 29, ORS 31	e	e	e	O	O
ORS 980	e	O	e	e	O
ORS 986	e	e	O	e	O
ORS 987	e	I	e	e	O
ORS 1218, ORS 1219, ORS 1220	e	e	O	e	O
ORS 1217	I	e.	e	e	O
ORS 1216	I	O	O	e	O
ORS 984	O	I	O	e	O
ORS 515, ORS 516, ORS 518, ORS 519, ORS 520, ORS 521, ORS 523, ORS 524	nt	nt	nt	e	nt

* I – ineffective nodules; e – effective nodules; O – no nodulation; nt – not tested.

strains were effective on *I. tinctoria*; 13 strains were effective on *I. senegalensis*. The host range of strains of group II (14 isolates) was more or less restricted among the five plants tested. With the exception of 3 strains, all were efficient on *I. astragalina*; all, except 4 strains, were efficient on *T. purpurea*; only strains ORS 26 and ORS 1228 could induce nodules on *R. minima* (nodules were ineffective); 8 strains were effective on *I. tinctoria*; 9 strains were effective on *I. senegalensis*.

Discussion

Quite a number of diverse nodule isolates from the tropical region have been characterised and described in literature as belonging to the large group of bradyrhizobia (YOUNG, 1991; MOREIRA et al., 1993; LORQUIN et al., 1993; LADHA and SO, 1994; WONG et al., 1994; DUPUY et al., 1994; VAN ROSSUM et al., 1995; VAN BERKUM et al., 1995; BARRERA et al., 1997; MOLOUBA et al., 1999). Here we describe the isolation and characterisation by 16S ARDRA, SDS-PAGE of total proteins and nodulation tests of a collection of 71 new nodule isolates from 27 small indigenous legumes found in different regions of Senegal. In addition to reference strains of the recognised *Bradyrhizobium* species, we included in our study representative strains for groups previously studied by SDS PAGE and/or ARDRA in our research group (MOREIRA et al., 1993; DUPUY et al., 1994; MOLOUBA et al., 1999), and for some of which either partial (MOREIRA et al., 1998) or total (DUPUY et al., 1994; BARRERA et al., 1997) 16S rDNA sequence data were reported. ARDRA and SDS-PAGE techniques were both performed in parallel. Considering SDS-PAGE results alone, grouping of strains was not evident, because the protein profiles were highly similar. Thus we first analysed the ARDRA results, which helped us to then analyse the SDS-PAGE results.

ARDRA on amplified 16S rDNA has been shown to be a powerful and convenient technique to determine the phylogenetic relationships between species and to assign strains to species (LAGUERRE et al., 1994; NICK, 1998; TEREFWORK et al., 1998). The ARDRA results (figure 1) were consistent with previous phylogenetic reports on bradyrhizobia. We distinguished seven clusters, four of which corresponded to the four main branches described by MOLOUBA et al. (1999), cluster A (consisting of photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. (*Aeschynomene*)), cluster B (including *B. japonicum* type strain), cluster C (including *B. elkanii* type strain), cluster D (consisting of *Bradyrhizobium* sp. (*Aeschynomene*)) and three new clusters, cluster G close to cluster C, clusters E and F on the *B. japonicum* branch. Thus clusters C and G can be regarded as constituting the "*B. elkanii* lineage" and clusters A, B, E, F as the "*B. japonicum* lineage". Cluster D is separate. New isolates grouped in clusters B, C, E, F, G.

Cluster B included 24 new isolates, *B. japonicum* strains LMG 6138^T, LMG 8321, LMG 6136, LMG 4276, LMG 4252, and also both *B. liaoningense* strains LMG 18230^T and LMG 18231. This was not surprising

since 16S rDNA sequences of *B. japonicum* and *B. liaoningense* are very similar (A. Willems, unpublished results). Two other strains received as *B. japonicum* grouped outside this cluster: LMG 4262 clustered with *B. elkanii* in cluster C, and LMG 4265 had a separate position. LMG 4262 was isolated from *Albizia julibrissin* and was classified as *B. japonicum* before *B. elkanii* was described.

Cluster C included 14 new isolates, *B. elkanii* strains LMG 6134^T and LMG 6135 together with strains ORS 133, BR 3621, BR 4406 and BR 29 having a 16S rDNA sequence close to that of *B. elkanii* (DUPUY et al., 1994; BARRERA et al. 1997).

Cluster E consisted of 5 new nodule isolates from small legumes and *B. japonicum* USDA 110, representative for the hybridisation group Ia (HOLLIS et al., 1981), and more recently shown to constitute a 16S rDNA sub-branch distinct from the *B. japonicum* type strain sub-branch representing DNA hybridisation group I (BARRERA et al., 1997). The two other new clusters, clusters G and F (figure 1), exclusively consisted of, respectively, 8 and 6 new nodule isolates.

Diversity of the new isolates inside the ARDRA groups was shown by analysis of total protein profiles by SDS-PAGE. This technique has been extensively used in the past to characterise different groups of rhizobia and bradyrhizobia at the species and intraspecific levels (MOREIRA et al., 1993; DUPUY et al., 1994; DE LAJUDIE et al., 1994; 1998a,b; VAN ROSSUM et al., 1995). In contrast to what we found before in several groups of bacteria studied, Rhizobiaceae (DE LAJUDIE et al., 1994; 1998a,b; 1999) and many others (for a review see VANDAMME et al., 1996), the power of SDS-PAGE of total proteins to delineate groups in the bradyrhizobia is much smaller than in the other studied bacterial groups. Possible reasons for this phenomenon can be: (i) total protein profiles with fewer bands, (ii) the intensity of the bands varies considerably from very weak to rather heavy, (iii) many fuzzy protein bands are found that possibly influence the similarity calculations, (iv) the background is quite high. Consequently the result of the numerical analysis depends on the number of profiles included and the specific quality of each of them. Quite often strains switch from one cluster to another when numerical analyses contain different selections of strains. Moreover, it is possible that the generation times of the various included bradyrhizobia do differ that much that the standardisation to 72 h of growth does not necessarily guarantee comparable start material to extract proteins for all included strains, which can result in less reliable clustering.

When comparing the results of ARDRA with those of SDS-PAGE of proteins, no clear correlation could be found. Because a genomic technique such as ARDRA is less dependent on external growth conditions, it is considered to be quite reproducible, as is indeed illustrated by the fact that in this study we found basically the same groups as described by MOLOUBA et al. (1999). Although for most bacterial groups SDS-PAGE has a finer resolution than ARDRA, we could not localise the SDS-PAGE

clusters within the bigger ARDRA clusters, demonstrating that the *Bradyrhizobium* protein groups should be regarded with reservation. A fine genomic technique is definitely required to further unravel the finer relationships within the ARDRA clusters.

No clear relationship could be evidenced between origin (plant, location) and ARDRA or SDS-PAGE groupings of the isolates, except that all the strains of ARDRA cluster G were isolated from *Indigofera senegalensis* in North Senegal.

By nodulation tests on 5 different plant species, we evidenced some degree of plant specificity for nodulation and symbiotic nitrogen fixation. Interestingly, some relation could be observed between nodulation and SDS-PAGE groups. Except ORS 979 (SDS-PAGE group 10) and ORS 85 (SDS-PAGE group 15) nodulation group I consisted of strains belonging to SDS-PAGE groups 3 and 19. Except ORS 979, all strains of SDS-PAGE groups 10 and 17 (corresponding to ARDRA cluster G) belonged to nodulation group II, together with strains from other SDS-PAGE groups.

In SDS-PAGE, we included strains whose partial and sometimes full length 16S rDNA sequences were published. By full length sequencing DUPUY et al. (1994) and BARRERA et al. (1997) assigned BR 4406, BR 29 and BR 3621 to the *B. elkanii* branch; these results correspond with our ARDRA data because these strains belong in cluster C. However according to MOREIRA et al. (1998) strains BR 4406 and BR 3621 have partial 16S rDNA sequences closer to those of the *B. japonicum* type strain. This emphasises again that the evaluation of partial sequences should be done with care. MOREIRA et al. (1998) also conclude that a combination of SDS-PAGE and partial sequencing can be used for complementary taxonomic purposes; we cannot confirm from our results that SDS-PAGE is complementary to ARDRA, another rRNA-based characterisation technique. Therefore we conclude that a genomic technique with a fine discriminatory power is required to further study the relationships within the rRNA clusters found in the bradyrhizobia.

Acknowledgements

This work was supported by the Commission of the European Communities (STD3 programme, contract TS2 0169 - F; BRIDGE programme, contracts BIOT-CT91-0263 and BIOT-CT91-0294), by French and Belgian Embassies through Programme d'Actions Intégrées franco-belge Tournesol 94085, by CNRS (Dynamique de la Biodiversité et Environnement) and Bureau des Ressources Génétiques (B.R.G.). F.D.-B. was indebted to the Ministère de l'enseignement et de la recherche and to Institut de Recherche pour le Développement (I.R.D.) for a doctoral grant. A. S. was indebted to IRD for a doctoral grant. M. G. is indebted to the Fund for Scientific Research - Flanders (Belgium), for research and personnel grants. A.W. is indebted to the Fund for Scientific Research - Flanders (Belgium) for a position as postdoctoral research fellow.

References

- AMARGER, N., MACHERET, V., LAGUERRE, G.: *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 996-1006 (1997).
- BARRERA, L. L., TRUJILLO, M. E., GOODFELLOW, M., GARCIA, F. J., HERNANDEZ-LUCAS, I., DAVILA, G., VAN BERKUM, P., MARTINEZ-ROMERO, E.: Biodiversity of Bradyrhizobia nodulating *Lupinus* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 1086-1091 (1997).
- BROCKWELL, J.: Plant-infection counts of rhizobia in soils, pp. 41-58. In: Nitrogen fixation in legumes (J. M. VINCENT, eds.), Academic Press Publishers 1982.
- CHEN, W. X., LI, G. S., QI, Y. L., WANG, E. T., YUAN, H. L., LI, J. L.: *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 275-280 (1991).
- CHEN, W. X., WANG, E. T., WANG, S. Y., LI, Y. B., CHEN, X. Q., LI, Y.: Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 153-159 (1995).
- CHEN, W. X., TAN, Z. Y., GAO, J. L., LI, Y., WANG, E. T.: *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 870-873 (1997).
- DAGUTAT, H., STEYN, P. L.: Taxonomy and distribution of rhizobia indigenous to South African soils, p. 683. In: Nitrogen fixation: fundamentals and applications (I. A. TIKHONOVICH, N. A. PROVOROV, V. I. ROMANOV, W. E. NEWTON, eds.), Dordrecht, Boston, Kluwer Academic Publishers, 1994.
- DATE, R. A.: Collection, isolation, characterization and conservation of *Rhizobium*, pp. 95-109. In: Nitrogen fixation in legumes (J. M. VINCENT, ed.), Academic Press Publishers 1982.
- DE LAJUDIE, P., WILLEMS, A., POT, B., DEWETTINCK, D., MAESTROJUAN, G., NEYRA, M., COLLINS, M. D., DREYFUS, B., KERSTERS, K., GILLIS, M.: 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 (1994).
- DE LAJUDIE, P., LAURENT-FULELE, E., WILLEMS, A., TORCK, U., COOPMAN, R., COLLINS, M. D., KERSTERS, K., DREYFUS, B. L., GILLIS, M.: *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 1277-1290 (1998a).
- DE LAJUDIE, P., WILLEMS, A., NICK, G., MOREIRA, F., MOLOUBA, F., HOSTE, B., TORCK, U., NEYRA, M., COLLINS, M. D., LINDSTRÖM, K., DREYFUS, B., GILLIS, M.: Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarium* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 369-382 (1998b).
- DE LAJUDIE, P., WILLEMS, A., NICK, G., MOHAMMED, S. H., TORCK, U., COOPMAN, R., FILALI-MALTOUF, A., KERSTERS, K., DREYFUS, B., LINDSTRÖM, K., GILLIS, M.: *Agrobacterium* bv. 1 strains isolated from nodules of tropical legumes. *Syst. & Appl. Microbiol.* 21, 119-132 (1999).
- DIEDHIOU, I.: Importance des légumineuses dans les systèmes écologiques arides et semi-arides du Sénégal. D.E.A Sciences de l'environnement (Master in Sciences), Université Cheikh Anta Diop-Dakar, Senegal 1994.
- DREYFUS, B., GARCIA, J. L., GILLIS, M.: Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38, 89-98 (1988).
- DUPUY, N., WILLEMS, A., POT, B., DEWETTINCK, D., VANDENBRUAENE, I., MAESTROJUAN, G., DREYFUS, B. L., KERSTERS, K., COLLINS, M. D., GILLIS, M.: Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia alba*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 461-473 (1994).

- GAO, J. L., SUN, J. G., LI, Y., WANG, E. T., CHEN, W. X.: Numerical taxonomy and DNA relatedness of tropical rhizobia isolated from Hainan province, China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 151–158 (1994).
- GIBSON, A. H.: Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. I. The effect of temperature on recently nodulated *Trifolium subterraneum* (L.) plants. *Aust. J. Biol. Sci.* 16, 28–42 (1963).
- HARDY, R. W. F., BURN, R. C., HOLSTEN, R. D.: Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of N_2 fixation. *Soil. Biol. Biochem.* 43, 47–87 (1973).
- HAUKKA, K., LINDSTRÖM, K., YOUNG, J. P. W.: Diversity of partial 16S rRNA sequences among and within strains of African rhizobia isolated from *Acacia* and *Prosopis*. *System. Appl. Microbiol.* 19, 352–359 (1996).
- HEYNDRIKX, M., VAUTERIN, L., VANDAMME, P., KERSTERS, K., DE VOS, P.: Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *J. Microbiol. Method.* 26, 247–259 (1996).
- HOLLIS, A. B., KLOOS, W. E., ELKAN, G. H.: DNA:DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related *Rhizobiaceae*. *J. Gen. Microbiol.* 123, 215–222 (1981).
- JARVIS, B. D. W., GILLIS, M., DE LEY, J.: 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 (1986).
- JARVIS, B. D. W., VAN BERKUM, P., CHEN, W. X., NOUR, S. M., FERNANDEZ, M. P., CLEYET-MAREL, J.-C., GILLIS, M.: Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 895–898 (1997).
- KUYKENDALL, L. M., SAXENA, B., DEVINE, T. E., UDELL, S. E.: Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 38, 501–503 (1992).
- LADHA, J. K., SO, R. B.: Numerical taxonomy of photosynthetic rhizobia nodulating *Aeschynomene* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 62–73 (1994).
- LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*. 227, 680–685 (1970).
- LAGUERRE, G., ALLARD, M. R., REVOY, F., AMARGER, N.: Rapid identification of rhizobia by Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of PCR-Amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 56–63 (1994).
- LINDSTRÖM, K.: *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 365–367 (1989).
- LORQUIN, J., MOLOUBA, F., DUPUY, N., N'DIAYE, S., ALAZARD, D., GILLIS, M., DREYFUS, B. L.: Diversity of photosynthetic *Bradyrhizobium* strains from stem nodules of *Aeschynomene* species, pp. 683–689. In: *New Horizons in Nitrogen Fixation* (R. PALACIOS J. MORA, W. E. NEWTON, eds.), Dordrecht, Boston, Kluwer Academic Publishers 1993.
- MARTINEZ-ROMERO, E., SEGOVIA, L., MERCANTE, F. M., FRANCO, A. A., GRAHAM, P., PARDO, M. A.: *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 417–426 (1991).
- MOLOUBA, F., LORQUIN, J., WILLEMS, A., HOSTE, B., GIRAUD, E., DREYFUS, B., GILLIS, M., DE LAJUDIE, P., MASSON-BOIVIN, C.: Photosynthetic *Bradyrhizobia* from *Aeschynomene* are specific to stem nodulated species and form a separate 16S rDNA RFLP group. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3084–3094 (1999).
- MOREIRA, F. M. S., GILLIS, M., POT, B., KERSTERS, K., FRANCO, A. A.: Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical *Leguminosae* by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *System. Appl. Microbiol.* 16, 135–146 (1993).
- MOREIRA, F. M. S., HAUKKA, K., YOUNG, J. P. W.: Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. *Mol. Ecol.* 7, 889–895 (1998).
- NICK, G.: Polyphasic taxonomy of rhizobia isolated from tropical tree legumes. *Dissertationes Biocentri Viikki Universitatis Helsingiensis*, Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Finland, 1998.
- NICK, G., DE LAJUDIE, P., EARDLY, B., SUOMALAINEN, S., PAULIN, L., ZHANG, X., GILLIS, M., LINDSTRÖM, K.: *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov. isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1359–1368 (1999).
- NOUR, S. M., FERNANDEZ, M. P., NORMAND, P., CLEYET-MAREL, J.-C.: *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 511–522 (1994).
- NOVIKOVA, N. I., PAVLOVA, E. A., VOROBEV, N. I., LIMESCHENKO, E. V.: Numerical taxonomy of *Rhizobium* strains from legumes of the temperate zone. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 734–742 (1994).
- PITCHER, D. G., SAUNDERS, N. A., OWEN, R. J.: Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* 8, 151–156 (1989).
- POT, B., GILLIS, M., HOSTE, B., VAN DE VELDE, A., BEKAERT, F., KERSTERS, K., DE LEY, J.: Intra- and intergeneric relationships of the genus *Oceanospirillum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 23–34 (1989).
- POT, B., VANDAMME, P., KERSTERS, K.: Analysis of electrophoretic whole organism protein fingerprints, pp. 493–521. In: *Modern Microbial Methods. Chemical Methods in Prokaryotic Systematics* (M. GOODFELLOW, A. G. O'DONNELL, eds.), Chichester, England, John Wiley & Sons 1994.
- PREVOST, D., BORDELEAU, L. M., CAUDRY-REZNICK, S., SCHULMAN, H. M., ANTOUN, H.: Characteristics of rhizobia isolated from three legumes indigenous to the high arctic: *Astragalus alpinus*, *Oxytropis maydelliana*, and *Oxytropis arctica*. *Plant and Soil*. 98, 313–324 (1987).
- RINAUDO, G., ORENGA, S., FERNANDEZ, M. P., MEUGNIER, H., BARDIN, R.: 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 (1991).
- ROME, S., FERNANDEZ, M. P., BRUNEL, B., NORMAND, P., CLEYET-MAREL, J.-C.: *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 972–980 (1996).
- TEREFERWORK, Z., NICK, G., SUOMALAINEN, S., PAULIN, L., LINDSTRÖM, K.: Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 349–356 (1998).
- VAN BERKUM, P., BEYENE, D., BAO, G., CAMPBELL, T. A., EARDLY, B. D.: *Rhizobium mongolense* sp. nov., is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* (L.) Ledebour. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 13–22 (1998).
- VAN BERKUM, P., TULLY, R. E., KEISTER, D. L.: Nonpigmented and bacteriochlorophyll-containing *Bradyrhizobia* isolated from *Aeschynomene indica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 623–629 (1995).
- VAN ROSSUM, D., SCHUURMANS, F. P., GILLIS, M., MUYOTCHA, A., VAN VERSEVELD, H. W., STOUTHAMER, A. H., BOOGERD, F. C.: Genetic and phenotypic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulating Peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1599–1609 (1995).

- VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., DE VOS, P., KERSTERS, K., SWINGS, J.: Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60, 407–438 (1996).
- VAUTERIN, L., VAUTERIN, P.: Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. *Eur. Microbiol.* 1, 37–41 (1992).
- VINCENT, J. M.: A manual for the practical study of root-nodule bacteria, pp. 73–97. In: *International Biological Programme Handbook no. 15*. Oxford, Blackwell Scientific Publications Ltd. 1970.
- VINUESA, P., RADEMAKER, J. L. W., de BRUIJN, F. J., WERNER, D.: Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2096–2104 (1998).
- WANG, E. T., VAN BERKUM, P., SUI, X. H., BEYENE, D., CHEN, W. X., MARTINEZ-ROMERO, E.: Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 51–65 (1999).
- WANG, E. T., VAN BERKUM, P., BEYENE, D., SUI, X. H., DORADO, O., CHEN, W. X., MARTINEZ-ROMERO, E.: *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 (1998).
- WONG, F. Y. K., STACKEBRANDT, E., LADHA, J. K., FLEISCHMAN, D. E., DATE, A. R., FUERST, J. A.: Phylogenetic analysis of *Bradyrhizobium japonicum* and photosynthetic stem-nodulating bacteria from *Aeschynomene* species grown in separated geographical regions. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 940–946 (1994).
- XU, L. M., GE, C., CUI, Z., LI, J., FAN, H.: *Bradyrhizobium liaoningensis* sp. nov. isolated from the root nodules of soybean. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 706–711 (1995).
- YOUNG, J. P. W.: Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms, pp. 43–86. In: *Biological Nitrogen Fixation* (G. STACEY, R. H. BURRIS, H. J. EVANS, eds.), New York, Chapman & Hall 1991.
- YOUNG, J. P. W., HAUKKA, K. E.: Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol.* 133, 87–94 (1996).
- ZHANG, X., HARPER, R., KARISTO, M., LINDSTRÖM, K.: Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 104–113 (1991).

Corresponding author:

PHILIPPE DE LAJUDIE, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, I.R.D./INRA/AGRO-M/CIRAD, Campus de Baillarguet, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex, France
Tel.: (33) 04 67 61 58 00 p. 4218; Fax: (33) 04 67 59 38 02;
e-mail: P-De.Lajudie@mpl.ird.fr

Chapitre 2

***CARACTERISATION D'UNE COLLECTION DE SOUCHES ISOLEES
DE CROTALAIRES : DECOUVERTE DE METHYLOBACTERIUM
NODULANS***

I - INTRODUCTION

Dans les zones tropicales, les légumineuses spontanées jouent un rôle important dans le maintien et l'amélioration de la fertilité des sols, mais elles restent cependant insuffisamment exploitées. Parmi elles, on compte les plantes du genre *Crotalaria* (*Papilionoideae*, *Crotalarieae*) qui constituent le plus vaste genre de légumineuses en Afrique avec plus de 500 espèces réparties dans diverses zones climatiques, allant des zones semi-désertiques aux forêts tropicales humides (Polhill, 1982). Les *Crotalaria* sont bien présentes en Afrique de l'Ouest notamment au Sénégal où 33 espèces ont été répertoriées (Berhaut, 1976). Ce sont des légumineuses herbacées pérennes ou annuelles, parfois des arbustes dont plusieurs espèces sont utilisées pour leur intérêt agronomique, pour leurs qualités fourragères et pour de nombreux autres usages.

En effet grâce à leur potentiel fixateur d'azote, de nombreuses espèces de *Crotalaria* peuvent être utilisées comme engrais vert ou comme plantes de couverture (Sandanam, 1976 ; Mwambazi, 1998 ; Becker et Johnson, 1999 ; Fischler *et al.*, 1999). Les propriétés nématocides de certaines espèces constituent également un usage agronomique important des *Crotalaria*. Des espèces comme *C. pallida*, *C. juncea*, *C. retusa*, et *C. spectabilis* permettent d'éradiquer ou de réduire considérablement les populations de nématodes phytoparasites du genre *Meloidogyne*, *Pratylenchus* ou *Rotylenchulus* (Silva *et al.*, 1989a, 1989b ; Sundararaj, 1990). Les *Crotalaria* sont également utilisées comme fourrage, mais de nombreuses espèces sont toxiques pour le bétail, leur ingestion conduisant à une maladie appelée le crotalisme (Watt et Breyer-Brandwijk, 1962 ; Verdcourt et Trump, 1969 ; Polhill, 1982). Cette toxicité est liée à la présence d'alcaloïdes de type pyrrolizidine.

Si les crotalaires ont surtout été étudiées pour leur intérêt agronomique et leurs propriétés toxiques, par contre très peu d'études ont porté sur leurs partenaires symbiotiques. Il était jusqu'à présent admis qu'elles étaient toutes nodulées par des rhizobiums non spécifiques (Wilson, 1939 ; Burton, 1952), et qu'elles appartenaient donc au vaste groupe légumineuses tropicales de type "cowpea".

Ce deuxième chapitre porte sur la caractérisation d'une importante collection de souches de rhizobiums isolées de différentes espèces de *Crotalaria* rencontrées au Sénégal. Ainsi, nous avons analysé les données phénotypiques, génotypiques et phylogénétiques des différents isolats pour évaluer leur diversité, déterminer leur position taxonomique et leurs relations phylogénétiques avec les différents genres et espèces de rhizobiums connus.

II - RESULTATS

II - 1 - Collection de souches

Une collection de 126 souches de rhizobiums de *Crotalaria* a été constituée (tableau 11). Ces souches de rhizobiums ont été isolées soit directement à partir de nodules frais récoltés sur le terrain, soit par piégeage sur huit espèces de *Crotalaria* (*C. comosa*, *C. glaucoïdes*, *C. goreensis*, *C. hyssopifolia*, *C. lathyroides*, *C. perrottetii*, *C. podocarpa* et *C. retusa*) rencontrées dans 8 sites géographiques différents du Sénégal.

En prenant pour critère leur vitesse de croissance sur le milieu de culture YMA, nous avons pu dans un premier temps répartir les souches en deux groupes distincts. Un premier groupe de 81 souches à croissance rapide, dont les colonies apparaissent après 48 heures de culture, et un second groupe de 45 souches à croissance lente pour lesquelles les colonies n'apparaissent qu'après plus de 72 heures de culture.

II - 2 - Spécificité de nodulation

Pour connaître les propriétés symbiotiques des souches de crotalaires, nous avons d'abord étudié le spectre d'hôte d'une vingtaine de souches de la collection. Ainsi 21 souches dont 14 à croissance rapide ont été testées pour leur capacité à former des nodules sur les racines de neuf espèces de crotalaires (*C. comosa*, *C. glaucoïdes*, *C. goreensis*, *C. hyssopifolia*, *C. lathyroides*, *C. ochroleuca*, *C. perrottetii*, *C. podocarpa* et *C. retusa*) ainsi que sur d'autres légumineuses tropicales ligneuses ou herbacées, *Acacia albida*, *Acacia raddiana*, *Indigofera microcarpa* et *Sesbania rostrata*.

Tableau 11. Listes des souches isolées de crotalaires rencontrées dans différentes localités du Sénégal.

Plantes d'isolement	Sites de prélèvement	Souches à croissance rapide				
<i>Crotalaria podocarapa</i>	Bel-Air (Dakar)	ORS 1860	ORS 1917	ORS 1933	ORS 1937	ORS 1938
		ORS 1954	ORS 1955	ORS 1970	ORS 1991	ORS 1992
		ORS 2057	ORS 2058	ORS 2059	ORS 2060	ORS 2066
		ORS 2061	ORS 2062	ORS 2063	ORS 2064	ORS 2065
		ORS 2067	ORS 2068	ORS 2069	ORS 2070	ORS 2071
		ORS 2073	ORS 2102	ORS 2103		
<i>Crotalaria perrottetii</i>	Djilor	ORS 2031	ORS 2033	ORS 2035	ORS 2036	ORS 2037
		ORS 2092	ORS 2093	ORS 2094	ORS 2095	ORS 2096
		ORS 2097				
<i>Crotalaria perrottetii</i>	kolda Ferlo sud Kaparan	ORS 1926	ORS 1939			
		ORS 1923	ORS 1924	ORS 1925		
		ORS 1927	ORS 1928	ORS 2030	ORS 2032	ORS 2038
		ORS 2039	ORS 2040	ORS 2041	ORS 2042	ORS 2043
		ORS 2044	ORS 2098	ORS 2099	ORS 2110	
<i>Crotalaria glaucoides</i>	Bel-Air (Dakar) Kaparan Djilor	ORS 1936				
		ORS 2023	ORS 2024	ORS 2076		
		ORS 2025	ORS 2026	ORS 2027	ORS 2028	ORS 2045
		ORS 2046	ORS 2047	ORS 2048	ORS 2049	ORS 2050
		ORS 2051	ORS 2052	ORS 2053	ORS 2054	ORS 2055
		ORS 2056	ORS 2072	ORS 2100	ORS 2101	

Tableau 11. Suite.

Plantes d'isolement	Sites de prélèvement	Souches à croissance lente				
<i>Crotalaria goreensis</i>	Kaparan	ORS 1801	ORS 1862	ORS 2074	ORS 2075	ORS 2089
		ORS 2090	ORS 2091			
	Kabrousse	ORS 1811				
	Djilor	ORS 2088				
	Kolda	ORS 1935				
<i>Crotalaria lathyroides</i>	Kabrousse	ORS 1810				
	Kaparan	ORS 1869	ORS 2108			
<i>Crotalaria hyssopifolia</i>	Kabrousse	ORS 1813				
	Fanghote	ORS 1814	ORS 1815	ORS 1816		
<i>Crotalaria comosa</i>	Kaparan	ORS 1863	ORS 1864	ORS 1865	ORS 1866	ORS 1867
		ORS 1868	ORS 1929	ORS 2104	ORS 2105	ORS 2106
		ORS 2107	ORS 2109			
<i>Crotalaria retusa</i>	Grand-Yoff (Dakar)	ORS 2021	ORS 2022	ORS 2077	ORS 2078	ORS 2079
		ORS 2080	ORS 2081	ORS 2082	ORS 2083	ORS 2084
		ORS 2085	ORS 2086	ORS 2087		
	Kolda	ORS 1969	ORS 1971			
	Kabrousse	ORS 1819				

Tableau 12. Spécificité de nodulation chez les différentes espèces de *Crotalaria*.

Plantes d'isolement	<i>Crotalaria podocarpa</i>							<i>Crotalaria perrottetii</i>				<i>C. glaucoides</i>		<i>C. goreensis</i>	<i>C. lathy.</i>	<i>C. com.</i>	<i>C. hyssopifolia</i>		
sites de prélèvement	Bel-Air (Dakar)							Ferlo Sud	Kolda	Kap.	Kap.	Bel-Air	Kolda	Kap.	Kab.	Kap.	Fanghote		
Souches	2060	1917	1933	1937	1938	1954	1955	1924	1925	1926	1939	1927	1928	1936	1935	1811	1810	1929	1816 1815 1814
	Souches à croissance rapide												Souches à croissance lente						
Plantes hôtes																			
Groupe I																			
<i>Crotalaria podocarpa</i>	E	E	E	E	E	E	E	E	e	e	E	E	E	E	o	o	o	o	o
<i>Crotalaria glaucoides</i>	E	E	E	E	E	E	E	E	e	e	E	E	E	E	o	o	o	o	o
<i>Crotalaria perrottetii</i>	E	E	E	E	e	E	E	E	e	e	E	E	E	E	o	o	o	o	o
Groupe II																			
<i>Crotalaria goreensis</i>	o	o	o	o	o	I	o	o	o	o	I	o	o	o	e	e	e	e	e
<i>Crotalaria comosa</i>	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	E	e	e	E	e
<i>Crotalaria ochroleuca</i>	o	o	o	I	o	I	I	o	o	o	o	I	I	o	e	e	e	E	e
<i>Crotalaria hyssopifolia</i>	o	o	I	I	I	I	o	I	o	o	o	o	o	I	E	e	E	E	E
<i>Crotalaria lathyroides</i>	I	I	I	I	I	I	o	I	I	I	I	I	I	I	E	E	E	E	e
<i>Crotalaria retusa</i>	o	I	I	o	o	I	I	I	o	I	o	I	I	I	e	E	E	E	e
<i>Acacia albida</i>	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	E	E	E	E	e
<i>I. microcarpa</i>	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	E	E	E	E	e
<i>Sesbania rostrata</i>	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	I	o	I	I	o
<i>Acacia raddiana</i>	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	ps	ps	ps	o

o = pas de nodulation ; I = nodules inefficaces ; e = nodules fixateurs (100 à 350 nmoles /h/plante) ; E = nodules fixateurs (350 à 600 nmoles /h/plante).

Kap. = Kaparan ; Kab. = Kabrousse ; *C. goreensis* = *Crotalaria goreensis* ; *C. lathy.* = *Crotalaria lathyroides* ; *C.com.* = *Crotalaria comosa* ;

I. microcarpa = *Indigofera microcarpa*

On observe au niveau des rhizobiums de *Crotalaria* deux groupes de spécificité de nodulation différents correspondant aux deux groupes de croissance précédemment observés (tableau 12).

- Le premier groupe comprend les souches à croissance rapide qui nodulent et fixent l'azote exclusivement avec les trois espèces *C. podocarpa*, *C. perrottetii* et *C. glaucoides*.

- Le deuxième groupe comprend toutes les souches à croissance lente, qui nodulent efficacement les 6 autres espèces de crotalaires testées : *C. comosa*, *C. goreensis*, *C. hyssopifolia*, *C. lathyroides*, *C. ochroleuca* et *C. retusa*.

Alors que les souches à croissance rapide ne nodulent spécifiquement que les trois espèces de *Crotalaria* (*C. podocarpa*, *C. perrottetii* et *C. glaucoides*), les souches à croissance lente par contre, nodulent aussi bien les 6 autres espèces de *Crotalaria* que d'autres légumineuses tropicales comme *Indigofera microcarpa* ou *Acacia albida* qui appartiennent au groupe "cowpea" à large spectre d'hôtes. Ces souches à croissance lente non spécifiques présentent donc un spectre d'hôte typique des *Bradyrhizobium*. Aucune des souches appartenant aux deux groupes de *Crotalaria* ne nodule efficacement *Acacia raddiana* et *Sesbania rostrata*, deux espèces spécifiquement nodulées par des souches appartenant respectivement aux genres *Mesorhizobium* et *Allorhizobium* pour l'*Acacia* et *Azorhizobium* et *Sinorhizobium* pour *Sesbania* (Dreyfus et al., 1988 ; de Lajudie et al., 1994 ; de Lajudie et al., 1998a ; Boivin et al., 1997).

Un certain nombre de souches à croissance rapide sont capables d'induire la formation de nodules inefficaces sur les crotalaires du groupe II, alors qu'aucune souche à croissance lente n'infecte les crotalaires du groupe I.

Tableau 13. Spécificité de nodulation au sein du genre *Crotalaria*.

Plantes d'isolement	Numéros Souches	Origine géographique	Plantes hôtes		
			groupe I	groupe II	<i>A. albida</i>
Souches à croissance rapide					
<i>C. perrottetii</i>	ORS 1923	Ferlo sud	E	0	0
<i>C. perrottetii</i>	ORS 2098	Kaparan	E	0	0
<i>C. perrottetii</i>	ORS 2094	Djilor	e	0	0
<i>C. perrottetii</i>	ORS 2030	Kaparan	e	0	0
<i>C. perrottetii</i>	ORS 2092	Djilor	e	0	0
<i>C. perrottetii</i>	ORS 2093	Djilor	e	0	0
<i>C. perrottetii</i>	ORS 2095	Djilor	e	0	0
<i>C. perrottetii</i>	ORS 2036	Djilor	e	0	0
<i>C. perrottetii</i>	ORS 2097	Djilor	e	0	0
<i>C. perrottetii</i>	ORS 2110	kaparan	e	0	0
<i>C. perrottetii</i>	ORS 2039	kaparan	e	0	0
<i>C. perrottetii</i>	ORS 2043	kaparan	e	0	0
<i>C. perrottetii</i>	ORS 2044	kaparan	e	0	0
<i>C. perrottetii</i>	ORS 1924	Ferlo sud	E	0	0
<i>C. perrottetii</i>	ORS 1925	Ferlo sud	e	0	0
<i>C. perrottetii</i>	ORS 1926	Kolda	e	0	0
<i>C. perrottetii</i>	ORS 1939	Kolda	E	I	0
<i>C. perrottetii</i>	ORS 1927	Kaparan	E	0	0
<i>C. perrottetii</i>	ORS 1928	Kaparan	E	0	0
<i>C. podocarpa</i>	ORS 1955	Bel-Air	E	0	0
<i>C. podocarpa</i>	ORS 1860	Bel-Air	E	0	0
<i>C. podocarpa</i>	ORS 1917	Bel-Air	E	0	0
<i>C. podocarpa</i>	ORS 1933	Bel-Air	E	0	0
<i>C. podocarpa</i>	ORS 1937	Bel-Air	E	0	0
<i>C. podocarpa</i>	ORS 1938	Bel-Air	E	0	0
<i>C. podocarpa</i>	ORS 1954	Bel-Air	E	I	0
<i>C. podocarpa</i>	ORS 2060	Bel-Air	E	0	0
<i>C. podocarpa</i>	ORS 2057	Bel-Air	E	0	0
<i>C. podocarpa</i>	ORS 2059	Bel-Air	E	0	0
<i>C. podocarpa</i>	ORS 2062	Bel-Air	E	0	0
<i>C. podocarpa</i>	ORS 2102	Bel-Air	E	0	0
<i>C. podocarpa</i>	ORS 2066	Bel-Air	E	0	0
<i>C. podocarpa</i>	ORS 2068	Bel-Air	E	0	0
<i>C. podocarpa</i>	ORS 2070	Bel-Air	E	0	0
<i>C. podocarpa</i>	ORS 2071	Bel-Air	E	0	0
<i>C. podocarpa</i>	ORS 2063	Bel-Air	e	0	0
<i>C. podocarpa</i>	ORS 2064	Bel-Air	e	0	0
<i>C. podocarpa</i>	ORS 2103	Bel-Air	e	0	0
<i>C. glaucoides</i>	ORS 1936	Bel-Air	E	0	0
<i>C. glaucoides</i>	ORS 2072	Djilor	E	0	0
<i>C. glaucoides</i>	ORS 2076	Kaparan	E	0	0
<i>C. glaucoides</i>	ORS 2056	Djilor	E	0	0

Tableau 13. Suite.

Plantes d'isolement	Numéros Souches	Origine géographique	Plantes hôtes		
			groupe I	groupe II	<i>A. albida</i>
<i>C. glaucoïdes</i>	ORS 2023	Kaparan	e	0	0
<i>C. glaucoïdes</i>	ORS 2045	Djilor	e	0	0
<i>C. glaucoïdes</i>	ORS 2100	Djilor	e	0	0
<i>C. glaucoïdes</i>	ORS 2026	Djilor	e	0	0
<i>C. glaucoïdes</i>	ORS 2051	Djilor	e	0	0
<i>C. glaucoïdes</i>	ORS 2024	Kaparan	e	0	0
<i>C. glaucoïdes</i>	ORS 2053	Djilor	e	0	0
Souches à croissance lente					
<i>C. goreensis</i>	ORS 1862	Kaparan	0	E	E
<i>C. goreensis</i>	ORS 2088	Djilor	0	E	E
<i>C. goreensis</i>	ORS 2090	Kaparan	0	E	E
<i>C. goreensis</i>	ORS 2075	kaparan	0	E	E
<i>C. goreensis</i>	ORS 1801	kaparan	0	e	E
<i>C. goreensis</i>	ORS 2074	kaparan	0	e	E
<i>C. goreensis</i>	ORS 2089	kaparan	0	e	E
<i>C. goreensis</i>	ORS 1861	kaparan	0	e	O
<i>C. goreensis</i>	ORS 2091	kaparan	0	e	E
<i>C. goreensis</i>	ORS 1935	Kolda	0	e	E
<i>C. goreensis</i>	ORS 1811	Kabrousse	0	e	E
<i>C. comosa</i>	ORS 1865	kaparan	0	e	E
<i>C. comosa</i>	ORS 2107	Kaparan	0	I	E
<i>C. comosa</i>	ORS 1867	kaparan	0	0	E
<i>C. comosa</i>	ORS 1868	kaparan	0	0	e
<i>C. comosa</i>	ORS 2106	kaparan	0	0	e
<i>C. comosa</i>	ORS 1929	kaparan	0	e	E
<i>C. retusa</i>	ORS 2077	Grand - Yoff	0	E	E
<i>C. retusa</i>	ORS 2080	Grand - Yoff	0	e	E
<i>C. retusa</i>	ORS 2085	Grand - Yoff	0	0	E
<i>C. lathyroides</i>	ORS 2108	kaparan	0	0	E
<i>C. lathyroides</i>	ORS 1810	Kabrousse	0	e	E
<i>C. hyssopifolia</i>	ORS 1816	Fanghote	0	e	e
<i>C. hyssopifolia</i>	ORS 1815	Fanghote	0	e	E
<i>C. hyssopifolia</i>	ORS 1814	Fanghote	0	E	e
<i>A. albida</i>	ORS 141	Diokoul	0	E	E
<i>A. albida</i>	ORS 144	Diokoul	0	e	E
<i>A. albida</i>	ORS 136	Louga	0	e	e
<i>A. albida</i>	ORS 167	katakalousse	0	0	E
<i>A. albida</i>	ORS 188	Dagana	0	0	E
<i>A. albida</i>	ORS 142	Diokoul	0	0	E
<i>A. albida</i>	ORS 143	Diokoul	0	0	e
<i>A. albida</i>	ORS 110	Louga	0	0	e
<i>A. albida</i>	ORS 116	Louga	0	0	e
<i>A. albida</i>	ORS 117	Louga	0	0	I

0 = pas de nodulation ; E = présence de nodules fixateurs (350-600 nmoles/h/plante) ; e = nodules fixateurs (100-350 nmoles/h/plante) ; I = fixation inefficace (<100 nmoles/h/plante)

La répartition des crotalaires en deux groupes de nodulation croisés a pu être confirmée sur un plus grand nombre de souches (84) isolées de ces crotalaires (tableau 13).

II - 3 - Analyse des profils protéiques sur gel de polyacrylamide

Les profils protéiques de 116 souches de *Crotalaria* (42 à croissance lente et 74 à croissance rapide) ont été numérisés et analysés en même temps que ceux de 45 souches de référence (tableau 14) représentant les différentes espèces de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Agrobacterium* existant ainsi que les représentants des groupes de *Bradyrhizobium* sp. décrits par Moreira et al., (1993, 1998) et Dupuy et al., (1994). Le dendrogramme de la figure 15 montre la répartition et la composition des différents groupes électrophorétiques obtenus.

II - 3 - 1 - Les souches à croissance lente

En considérant un coefficient de similarité de 90%, la quasi totalité des souches à croissance lente (35/42) forme un groupe homogène, groupe I. Ce groupe renferme également différentes souches de référence de *Bradyrhizobium* sp. représentants des groupes de *Bradyrhizobium* sp. décrits par Moreira et al., (1993) ; Dupuy et al., (1994) et la souche type de *Bradyrhizobium japonicum* LMG 6138 (Jarvis et al., 1986). Pour un coefficient de similarité de 92% le groupe I se scinde en trois sous-groupes A, B et C.

Le sous-groupe A renferme 6 souches de *Crotalaria* (ORS 1814, ORS 1862, ORS 1881, ORS 2089, ORS 2106 et ORS 2108) et une souche de référence de *Bradyrhizobium* sp. *Prosopis africana* (Moreira et al., 1993). Les 6 souches de ce sous-groupe A sont isolées de quatre espèces différentes, *C. goreensis*, *C. comosa*, *C. lathyroides* et *C. hyssopifolia* récoltées dans trois localités du sud du Sénégal à savoir Kaparan, Kabroussse et Fanghote.

Coefficient de similarité

Souches

Groupes électrophorétiques

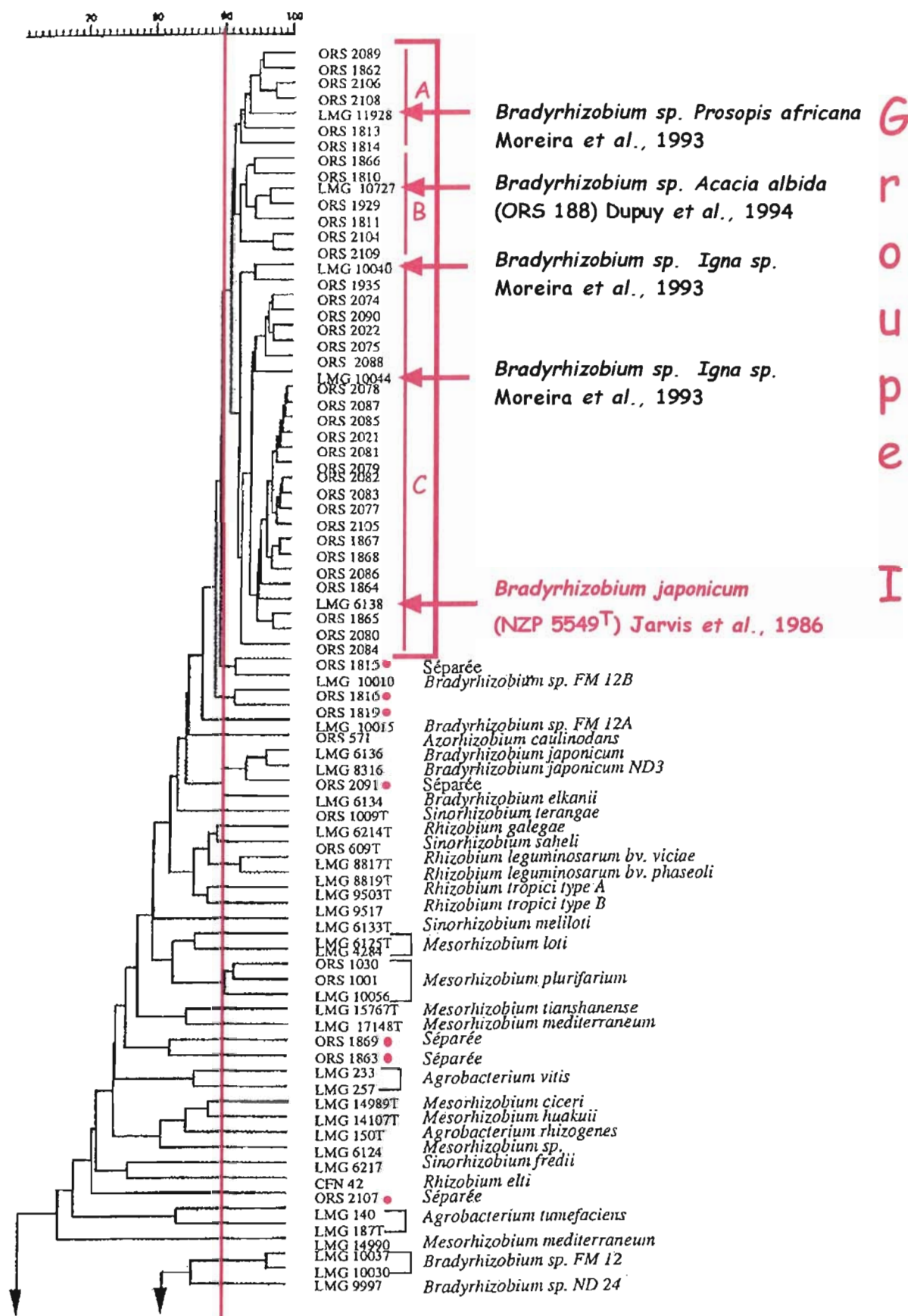


Figure 15

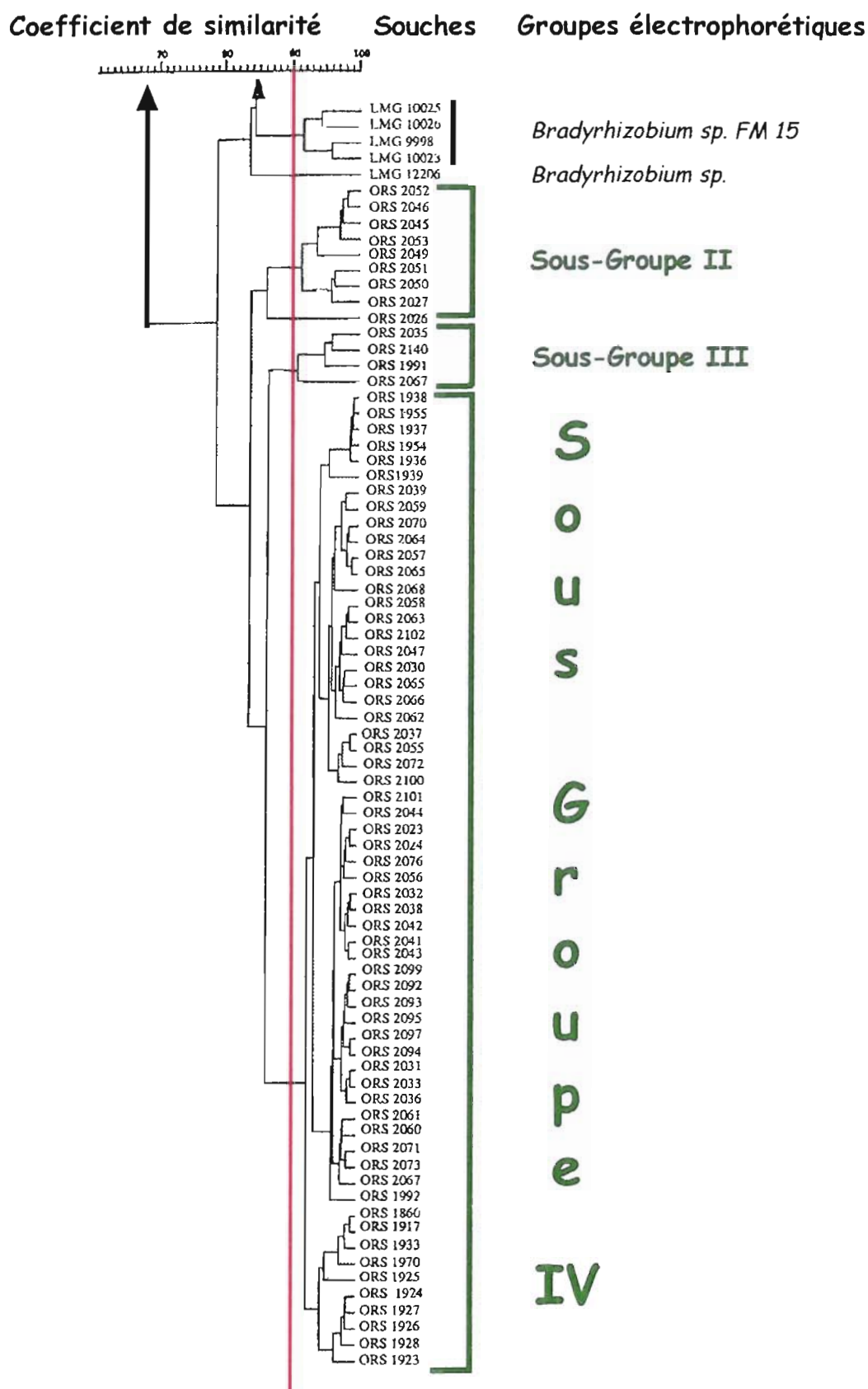


Figure 15. Dendrogramme basé sur la valeur du coefficient de similarité r , construit après l'analyse numérique des profils électrophorétiques des souches de Crotalaires du Sénégal et des souches de référence représentatives des différentes espèces de rhizobiums ou des différents clusters connus.

Tableau 14. Nomenclature et origine des souches de référence

Souches	N° LMG	Plantes d'isolement	Origine
<i>Rhizobium galegae</i>			
HAMBI 540 ^T	LMG 6214 ^T	<i>Galega orientalis</i>	Finland
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Viciae</i>			
ATCC 10004	LMG 8817 ^T	<i>Pisum sativum</i>	USA
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>			
ATCC 14482	LMG 8819 ^T	<i>Phaseolus</i> sp.	
<i>Rhizobium tropici</i> type A			
CIAT 988	LMG 9503 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brésil
<i>Rhizobium tropici</i> type B			
CFN 299	LMG 9517	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brésil
<i>Rhizobium etli</i>			
CFN 42		<i>Phaseolus vulgaris</i>	Mexique
<i>Sinorhizobium teranga</i>			
ORS 1009 ^T	LMG 7834 ^T	<i>Acacia laeta</i>	Sénégal
<i>Sinorhizobium saheli</i>			
ORS 609 ^T	LMG 7837 ^T	<i>Sesbania cannabina</i>	Sénégal
<i>Sinorhizobium meliloti</i>			
NZP 4027 ^T	LMG 6133 ^T	<i>Medicago sativa</i>	Australie
<i>Sinorhizobium fredii</i>			
USDA 205 ^T	LMG 6217 ^T	<i>Glycine max</i>	Chine
<i>Mesorhizobium loti</i>			
NZP 2213	LMG 6125 ^T	<i>Lotus corniculatus</i>	N ^{lle} Zélande
USDA 3127	LMG 4284	<i>Caragana arborescens</i>	Colorado
<i>Mesorhizobium plurifarum</i>			
ORS 1030	LMG 11890	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal
ORS 1001	LMG 7836	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal
INPA 78B	LMG 10056	<i>Leucaena diversifolia</i>	Brésil
<i>Mesorhizobium tianshanense</i>			
A-1BS ^T	LMG 15767 ^T	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	Chine
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>			
UPM Ca-36 ^T	LMG 17148 ^T	<i>Cicer arietinum</i>	Espagne
UPM Ca142	LMG 14990	<i>Cicer arietinum</i>	Espagne
<i>Mesorhizobium ciceri</i>			
UPM Ca 7 ^T	LMG 14989 ^T	<i>Cicer arietinum</i>	Espagne
<i>Mesorhizobium huakii</i>			
IAM 14158 ^T	LMG 14107 ^T	<i>Astragalus sinicus</i>	Chine
<i>Mesorhizobium</i> sp.			
NZP 2014	LMG 6124	<i>Lotus corniculatus</i>	
<i>Azorhizobium caulinodans</i>			
ORS 571 ^T	LMG 6465 ^T	<i>Sesbania rostrata</i>	Sénégal

Tableau 14. Suite.

Souches	N° LMG	Plantes d'isolement	Origine
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>			
NZP 5533	LMG 6136	<i>Glycine max</i>	USA
NZP 5549 ^T	LMG 6138 ^T	<i>Glycine hispida</i>	Japon
TAL 309	LMG 8316	<i>Macroptyloma africanum</i>	Zimbabwe
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>			
NZP 5531 ^T	LMG 6134 ^T	<i>Glycine max</i>	USA
<i>Bradyrhizobium sp.</i>			
Pa 44	LMG 11928	<i>Prosopis africana</i>	Brésil
INPA 36B	LMG 10040	<i>Igna sp.</i>	Brésil
INPA 53B	LMG 10044	<i>Igna sp.</i>	Brésil
BR 6817	LMG 10010	<i>Pithecellobium sp.</i>	Brésil
BR 8402	LMG 10015	<i>Dalbergia nigra</i>	Brésil
INPA 30A	LMG 10037	<i>Samanea saman</i>	Brésil
INPA 10A	LMG 10030	<i>Samanea saman</i>	Brésil
FL 276	LMG 10025	<i>Abrus sp.</i>	Brésil
FL 281	LMG 10026	<i>Abrus sp.</i>	Brésil
BR 5611	LMG 9998	<i>Albizia falcata</i>	Brésil
BR 5609	LMG 9997	<i>Albizia falcata</i>	Brésil
FL 27	LMG 10023	<i>Melanoxylon sp.</i>	Brésil
ORS 188	LMG 10727	<i>Acacia albida</i>	Sénégal
ORS 399	LMG 12206	<i>Aeschynomene indica</i>	Sénégal
<i>Agrobacterium vitis</i>			
NCPPB 1771	LMG 233	<i>Vitis vinifera</i>	Iran
NCPPB 2611	LMG 257	<i>Vitis vinifera</i>	Grèce
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>			
ATCC 11325 ^T	LMG 150 ^T		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>			
B6 ^T	LMG 187 ^T		
<i>Agrobacterium radiobacter</i>			
ATCC 19358 ^T	LMG 140 ^T		

ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Md. ; BR et FL, Souches de CNPB/EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa em Biologia do solo, Seropedica, Rio de Janeiro, Brazil, and the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária ; CIAT, Rhizobium Collection, Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia ; CFN, Centro de Investigacion sobre Fijacion de Nitrogeno, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Cuernavaca, Mexico ; HAMBI, Culture Collection of the Department of Microbiology, University of Helsinki, Finland ; IAM, Institute of Applied Microbiology, The University of Tokyo, Tokyo, Japan ; INPA, National Institute of Amazonia Research, Manaus, Brazil ; LMG, Collection of Bacteria of the Laboratorium voor Microbiologie, University of Ghent, Ghent, Belgium ; NCPPB, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden U.K. ; NZP, Culture Collection of the Department for Scientific and Industrial Research, Biochemistry Division, Palmerston North, New Zealand ; ORS, Collection de l'Institut de Recherche pour le Développement, IRD (ex ORSTOM) Dakar, Sénégal ; TAL, Nitrogen Fixation in Tropical Agricultural Legumes, University of Hawaii, Paia ; UPM, Departamento de Microbiologia, E. T. S. de Ingenieros Agronomos, Universidad Politecnica, Madrid, Spain ; USDA, United States Department of Agriculture, Beltsville, Md.

Six souches, ORS 1810, ORS 1811, ORS 1866, ORS 1929, ORS 2104 et ORS 2109, isolées des trois espèces *C. comosa*, *C. lathyroides* et *C. goreensis* à partir de deux sites Kaparan et Kabrousse, constituent le sous-groupe B. Ce sous-groupe renferme également la souche de référence LMG 10727 de *Bradyrhizobium sp. Acacia albida* (Dupuy *et al.*, 1994).

Le sous-groupe C est composé de 13 souches de *C. retusa* isolées à Grand-Yoff (Dakar), de 5 souches de *C. comosa* originaires de Kaparan et de 5 souches de *C. goreensis* provenant de trois sites différents, Kaparan, Kolda et Djilor. Ces 23 souches de crotalaires partagent le sous-groupe C avec la souche de référence de *Bradyrhizobium sp. Igna sp.* (Moreira *et al.*, 1993) et la souche type de *Bradyrhizobium japonicum* LMG 6138 = NZP 5549 (Jarvis *et al.*, 1986).

Sept des 45 souches à croissance lente occupent des positions plus ou moins séparées dans le dendrogramme. Parmi elles, la souche ORS 1815 se regroupe avec la souche de *Bradyrhizobium sp. FM 12* (Moreira *et al.*, 1993) alors que la souche ORS 2091 se retrouve dans le même cluster que les souches de *Bradyrhizobium japonicum* LMG 6136 et LMG 8316. Les souches ORS 1816 et ORS 1819 se regroupent entre elles et n'intègrent aucune souche de référence, mais restent proches des différents clusters de *Bradyrhizobium*. Les deux souches ORS 1869 et ORS 1863, isolées respectivement de *C. lathyroides* et de *C. comosa* à Kaparan se retrouvent parmi les clusters contenant différentes espèces de *Mesorhizobium*.

II - 3 - 2 - Les souches à croissance rapide

Les 74 souches à croissance rapide dont les profils protéiques ont été analysés, se répartissent en trois sous-groupes électrophorétiques II, III et IV pour un coefficient de similarité de 90%. Ces trois sous-groupes homogènes ne contiennent aucune souche de référence de rhizobiums.

Tableau 15. Récapitulatif des différents types de profils de restriction de l'ADNr 16S obtenus avec les quatre enzymes *HaeIII*, *MspI*, *HinfI* et *Sau96I*.

Souches	Enzymes de restriction			
	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>MspI</i>	<i>Sau96I</i>
<u>Souches à croissance rapide</u>				
ORS 1917	A	B	C	D
ORS 1924	A	B	C	D
ORS 1928	A	B	C	D
ORS 1937	A	B	C	D
ORS 1991	A	B	C	D
ORS 2026	A	B	C	D
ORS 2030	A	B	C	D
ORS 2045	A	B	C	D
ORS 2060	A	B	C	D
ORS 2076	A	B	C	D
ORS 2092	A	B	C	D
<u>Souches à croissance lente</u>				
ORS 1810	A1	B1	C1	D1
ORS 1813	A1	B2	C1	D1
ORS 1816	A1	B3	C2	D1
ORS 1865	A1	B1	C3	D1
ORS 1929	A1	B3	C2	D1
ORS 2080	A1	B3	C2	D1
ORS 2088	A1	B3	C2	D1
ORS 2077	A1	B3	C2	D1
ORS 2105	A1	B3	C2	D1
ORS 2108	A1	B2	C3	D1

Le sous-groupe II contient 8 souches isolées de la même plante, *C. glaucoïdes* et du même site Bel-Air (Dakar).

Deux souches de *C. podocarpa* isolées à Bel-Air, une souche de *C. perrottetii* isolée à Djilor et une souche de *Crotalaria sp.* (ORS 2140) composent le sous-groupe III.

Le sous-groupe IV très homogène (coefficient de similarité = 92%) renferme 61 souches à croissance rapide. Parmi ces 61 souches, on compte 26 souches de *C. podocarpa* isolées à Bel-Air (Dakar), 10 souches de *C. glaucoïdes* et 25 souches de *C. perrottetii*. Les souches de *C. glaucoïdes* proviennent de trois sites différents ; Bel-Air (une souche), Djilor (6 souches) et Kaparan (3 souches). Les 25 souches de *C. perrottetii* sont isolées de Kolda, (2 souches), Kaparan (11 souches), Djilor (9 souches) et du Ferlo Sud (3 souches).

II - 4 - Polymorphisme du gène de l'ARNr 16S

II - 4 - 1 - Amplification du gène de l'ARNr 16S

Les amorces utilisées pour l'amplification du gène de l'ARNr 16S, FGPS 6 (GGA-GAG-TTA-GAT-CTT-GGC-TCA-G) et FGPS 1509 (AAG-GAG-GGG-ATC-CAG-CCG-CA) donnent pour l'ensemble des souches testées (souches à croissance rapide et souches à croissance lente) un fragment de PCR unique de l'ordre de 1500 paires de bases. La taille de ce fragment correspond à la taille attendue pour l'ARNr 16S des bactéries (Weisburg *et al.*, 1991).

II - 4 - 2 - Digestion des produits d'amplification de l'ADNr 16S (ARDRA)

Les produits d'amplification des 21 souches sélectionnées (11 souches à croissance rapide et 10 souches à croissance lente) représentant les différents groupes électrophorétiques définis par SDS-PAGE ont été digérés par les quatre

Figure 16. Séquences du gène de l'ARNr 16S chez les souches ORS 1924 et ORS 2060.

16S ORS 1924

```

1   GAACGCTGGC GGCAGGCTTA ACACATGCAA GTCGAGCGGG CCCTGCGGGG
51  TCAGCGGCAG ACGGGTGAGT AACGCGTGGG AACGTGCCCT TCGGTTCCGA
101 ACAACCTTGG GAAACTAGGG CTAATACCGG ATACGTCCGC AAGGAGAAAG
151 GCTTGACTGC CGAAGGATCG GCCC GCGTCT GATTAGCTGG TTGGTGGGGT
201 AACGGCTCAC CAAGGCGACG ATCAGTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC
251 CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG
301 GAATATTGGA CAATGGGCGC AAGCCTGATC CAGCCATGCC GCGTGAGTGA
351 TGACGGCCTT AGGGTTGTAA AGCTCTTTTC TTCGGGACGA TAATGACGGT
401 ACCGGAGGAA TAAGCCCCGG CTAACTTCGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC
451 GAAGGGGGCT AGCGTTGCTC GGAATCACTG GCGGTAAAGG GCGCGTAGGC
501 GGCTCGCCAA GTCGGGGGTG AAAGCCCGTG GCTCAACCAC GGAATGGCCT
551 TCGATACTGG CGGGCTTGAG ACCGGAAGAG GACAGCGGAA CTGCGAGTGT
601 AGAGGTGAAA TTCGTAGATA TTCGCAAGAA CACCA GTGGC GAAGGCGGCT
651 GTCTGGTCCG GTTCTGACGC TGAGGCGCGA AAGCGTGGGG AGCAAACAGG
701 ATTAGATACC CTGGTAGTCC ACGCTGTAAA CGATGAATGC TAGCCGTTGG
751 GGTGCATGCA CCTCAGTGGC GCCGCTAACG CTTTAAGCAT TCCGCCTGGG
801 GAGTACGGTC GCAAGATTAA AACTCAAAGG AATTGACGGG GGCCCGCACA
851 AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAAGC AACGCGCAGA ACCTTACCAT
901 CCTTGACAT GGCAGGCTAC GTGGAGAGAT TCACGGTTCC CTTCGGGGAC
951 CTGCACACAG GTGCTGCATG GCTGTCGTCA GCTCGTGTCTG TGAGATGTTG
1001 GGTTAAGTCC CGCAACGAGC GCAACCCTCG CCCTTAGTTG CCATCATTGA
1051 GTTGGGCACT CTAGGGGGAC TGCCGGTGAT AAGCCGCGAG GAAGGTGGGG
1101 ATGACGTCAA GTCCTCATGG CCCTTACGGG ATGGGCTACA CACGTGCTAC
1151 AATGGCGGTG ACAATGGGAA GCGAAGGGGC GACCTGGAGC AAATCCCCAA
1201 AAGCCGTCTC AGTTCAGATT GCACTCTGCA ACTCGAGTGC ATGAAGGCGG
1251 AATCGTAGT AATCGTGGAT CAGCACGCCA CGGTGAATAC GTTCCCGGGC
1301 CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCATGGGA GTTGGTCTTA CCCGACGGCG
1351 CTGCGCCAAC CGCGAGGGGG CAGGCGACCA CGGTAGGGTC AGCGACTGGG
1401 GTGAAGTCGT AACAAGGTAG CCGTAGGGGA ACCTGCGGCT GGATC

```

16S ORS 2060

```

1   GAACGCTGGC GGCAGGCTTA ACACATGCAA GTCGAGCGGG CCCTGCGGGG
51  TCAGCGGCAG ACGGGTGAGT AACGCGTGGG AACGTGCCCT TCGGTTCCGA
101 ACAACCTTGG GAAACTAGGG CTAATACCGG ATACGTCCGC AAGGAGAAAG
151 GCTTGACTGC CGAAGGATCG GCCC GCGTCT GATTAGCTGG TTGGTGGGGT
201 AACGGCTCAC CAAGGCGACG ATCAGTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC
251 CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG
301 GAATATTGGA CAATGGGCGC AAGCCTGATC CAGCCATGCC GCGTGAGTGA
351 TGACGGCCTT AGGGTTGTAA AGCTCTTTTC TTCGGGACGA TAATGACGGT
401 ACCGGAGGAA TAAGCCCCGG CTAACTTCGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC
451 GAAGGGGGCT AGCGTTGCTC GGAATCACTG GCGGTAAAGG GCGCGTAGGC
501 GGCTCGCCAA GTCGGGGGTG AAAGCCCGTG GCTCAACCAC GGAATGGCCT
551 TCGATACTGG CGGGCTTGAG ACCGGAAGAG GACAGCGGAA CTGCGAGTGT
601 AGAGGTGAAA TTCGTAGATA TTCGCAAGAA CACCA GTGGC GAAGGCGGCT
651 GTCTGGTCCG GTTCTGACGC TGAGGCGCGA AAGCGTGGGG AGCAAACAGG
701 ATTAGATACC CTGGTAGTCC ACGCTGTAAA CGATGAATGC TAGCCGTTGG
751 GGTGCATGCA CCTCAGTGGC GCCGCTAACG CTTTAAGCAT TCCGCCTGGG
801 GAGTACGGTC GCAAGATTAA AACTCAAAGG AATTGACGGG GGCCCGCACA
851 AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAAGC AACGCGCAGA ACCTTACCAT
901 CCTTGACAT GGCAGGCTAC GTGGAGAGAT TCACGGTTCC CTTCGGGGAC
951 CTGCACACAG GTGCTGCATG GCTGTCGTCA GCTCGTGTCTG TGAGATGTTG
1001 GGTTAAGTCC CGCAACGAGC GCAACCCTCG CCCTTAGTTG CCATCATTGA
1051 GTTGGGCACT CTAGGGGGAC TGCCGGTGAT AAGCCGCGAG GAAGGTGGGG
1101 ATGACGTCAA GTCCTCATGG CCCTTACGGG ATGGGCTACA CACGTGCTAC
1151 AATGGCGGTG ACAATGGGAA GCGAAGGGGC GACCTGGAGC AAATCCCCAA
1201 AAGCCGTCTC AGTTCAGATT GCACTCTGCA ACTCGAGTGC ATGAAGGCGG
1251 AATCGTAGT AATCGTGGAT CAGCACGCCA CGGTGAATAC GTTCCCGGGC
1301 CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCATGGGA GTTGGTCTTA CCCGACGGCG
1351 CTGCGCCAAC CGCGAGGGGG CAGGCGACCA CGGTAGGGTC AGCGACTGGG
1401 GTGAAGTCGT AACAAGGTAG CCGTAGGGGA ACCTG

```

enzymes de restriction *HaeIII*, *HinfI*, *Sau96I* et *MspI*. Le tableau 15 résume le polymorphisme des profils obtenus pour les 21 souches étudiées.

Chez les souches à croissance lente, les enzymes de restriction *HaeIII* et *Sau96I* ne permettent de faire aucune discrimination entre les souches de ce groupe. Par contre, les enzymes de restriction *MspI* et *HinfI* donnent trois types de profils différents, qui permettent d'obtenir cinq combinaisons de profils correspondant à cinq génotypes différents.

Pour les souches à croissance rapide, la digestion des produits d'amplification des 1500 paires de bases de l'ADNr 16S avec les quatre enzymes de restriction donne des profils identiques pour toutes les souches testées. Aucun polymorphisme des fragments de restriction n'a pu être mis en évidence, montrant l'homogénéité génétique de ce groupe de souches.

II - 5 - Séquençage de l'ADNr 16S

L'ADNr 16S a été séquençé chez deux souches représentantes du groupe à croissance rapide (ORS 1924 et ORS 2060) et une souche représentante du groupe à croissance lente (ORS 1929). Les séquences obtenues font 1445 nucléotides pour ORS 1924 et 1435 nucléotides pour ORS 2060 (figure 16), ce qui correspond respectivement à 96,3% et 95,6% du gène de l'ARNr 16S. La comparaison de ces deux séquences montre qu'elles sont identiques pour les 1435 nucléotides qui ont pu être alignés avec le logiciel ClustalX. Ce taux de similarité de 100% confirme les résultats SDS-PAGE et ARDRA précédents et démontre que les souches à croissance rapide appartiennent à la même espèce.

Par contre les séquences d'ADNr 16S de la souche rapide ORS 2060 et de la souche lente ORS 1929 ne présentent que 87,9% de similarité. Ce très fort taux de substitution de nucléotides montre que les groupes auxquels appartiennent ces deux souches constituent deux genres différents.

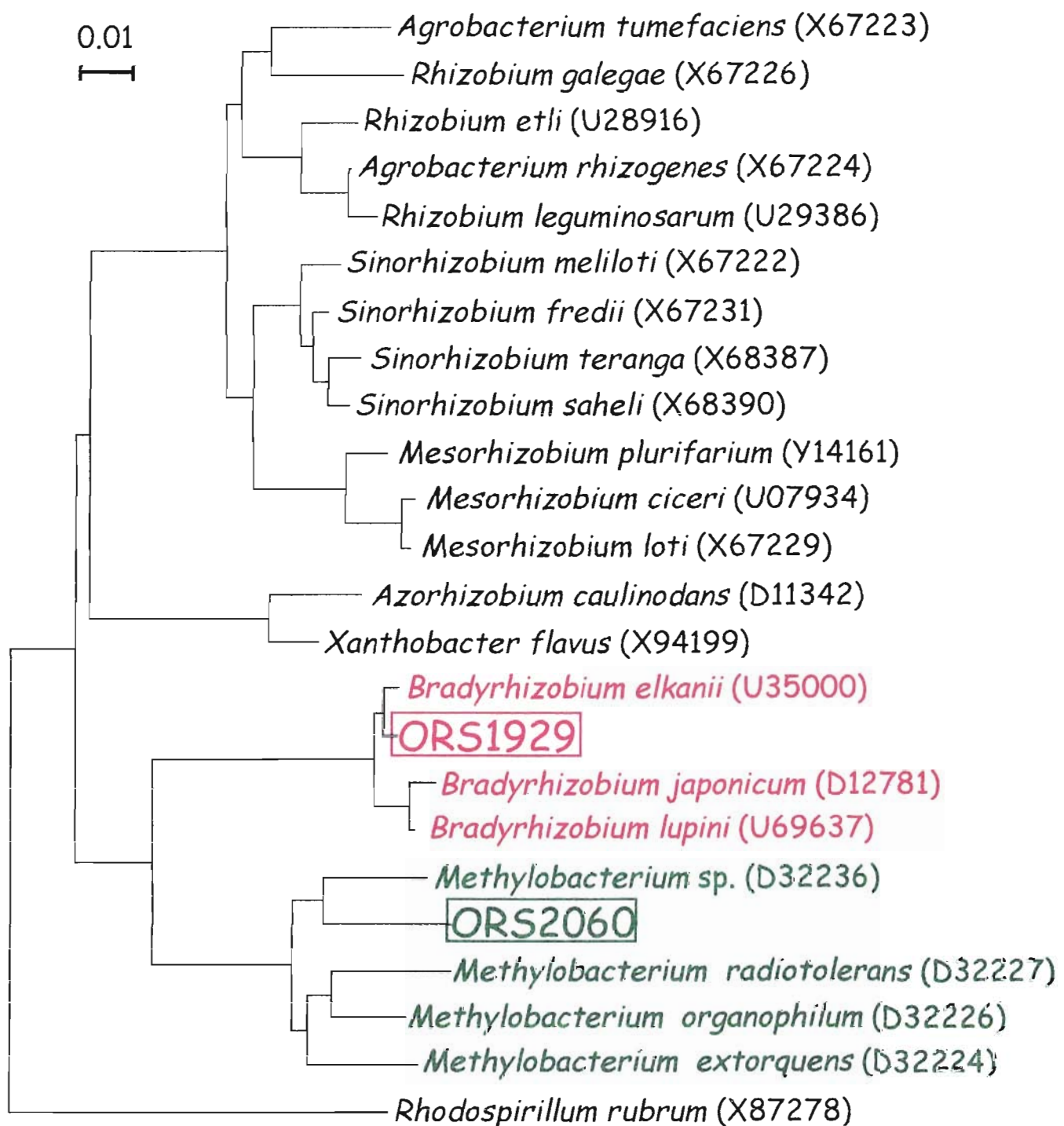


Figure 17. Positionnement des souches de crotalaires ORS 1929 et ORS 2060 sur l'arbre phylogénétique des rhizobia basé sur la comparaison des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S.

II - 6 - Analyse phylogénétique des séquences de l'ADNr 16S

Une analyse phylogénétique a été effectuée à partir des séquences de l'ADNr 16S obtenues avec les souches ORS 2060 et ORS 1929, des séquences 16S des différentes espèces de rhizobiums, et des séquences présentant les plus fortes homologues déterminées par la procédure Blast (Altschul *et al.*, 1990) à partir des séquences disponibles en banques de données. L'arbre phylogénétique obtenu par la méthode Neighbor-joining (figure 17) montre que la souche ORS 1929 appartient au groupe *Bradyrhizobium*, alors que la souche ORS 2060 occupe une position distincte des autres espèces de rhizobiums décrites jusqu'à ce jour. A notre grande surprise, elle s'associe au groupe des *Methylobacterium* dont aucune souche n'avait jusqu'à présent été décrite comme bactérie symbiotique fixatrice d'azote.

Il est à noter que deux souches de rhizobium 4-46 et 4-144 isolées de *Lotononis bainesii* par (Norris, 1988) et qui avaient été étudiées au laboratoire pour leur capacité à produire des pigments photosynthétiques, occupent le même positionnement phylogénétique. Rappelons que le genre *Lotononis* est très proche du genre *Crotalaria* avec lequel il partage la même tribu des *Crotalarieae* au même titre que le genre *Aspalathus*.

Pour déterminer les relations phylogénétiques entre la souche représentative ORS 2060, les souches 4-46 et 4-144 et les espèces *Methylobacterium*, nous avons construit une matrice de distance en utilisant les séquences disponibles des différentes espèces de *Methylobacterium* (*M. extorquens*, *M. rhodesianum*, *M. zatmanii*, *M. rhodinum*, *M. mesophilicum*, *M. fujisawaense*, *M. radiotolerans* et *M. organophilum*) ; ainsi que celles des souches de *Methylobacterium sp.* qui présentent les plus fortes homologues (tableau 16).

En prenant en compte l'ensemble des séquences analysées, le pourcentage de similarité des séquences avec la souche ORS 2060 varie entre 92,51% avec *Methylobacterium* sp. F37 et 97,18% avec la souche 4-46 (CB376) de *Lotononis bainesii*. Ces valeurs sont relativement plus élevées si on compare les huit espèces de *Methylobacterium* entre elles. Elles vont de 94,21% entre *Methylobacterium zatmanii* et *Methylobacterium radiotolerans* à 99,36% entre *Methylobacterium extorquens* et *Methylobacterium rhodesianum*. Les pourcentages de similarité entre ORS 2060 et les différentes espèces de *Methylobacterium* s'étalent entre 93,72% avec *Methylobacterium organophilum* et 94,52% avec *Methylobacterium extorquens*. Les plus proches voisins de la souche ORS 2060 étant la souche de *Lotononis* 4-46, *Methylobacterium* sp. F48 et *Methylobacterium extorquens* avec respectivement 97,18%, 95,16% et 94,52% de similarité de séquences.

L'arbre phylogénétique construit à partir de la matrice de distance est représenté par la figure 18. Les différentes souches et espèces de *Methylobacterium* se répartissent en trois clusters I, II et III. Les espèces connues de *Methylobacterium* se retrouvent dans deux de ces clusters. L'un d'eux (Cluster I) renferme les espèces *M. extorquens*, *M. rhodesianum*, *M. zatmanii*, *M. rhodium* et *M. organophilum* alors que dans le cluster II, on retrouve *M. fujisawaense*, *M. radiotolerans* et *M. mesophilicum*. Le dernier cluster est composé par ORS 2060, la souche de *Lotononis* 4-46 et la souche de *Methylobacterium* sp. F48 isolée de l'air par Hiraishi *et al.* (1995).

En plus des cinq espèces connues de *Methylobacterium*, le cluster I contient les deux souches de *Methylobacterium* sp. très résistantes au chlore GK 101 et GK 118 ainsi que *Methylobacterium* sp. APW. Dans le cluster II également on retrouve six souches de *Methylobacterium* sp. dont les trois souches (F05, F15 et F18) sont résistantes au chlore.

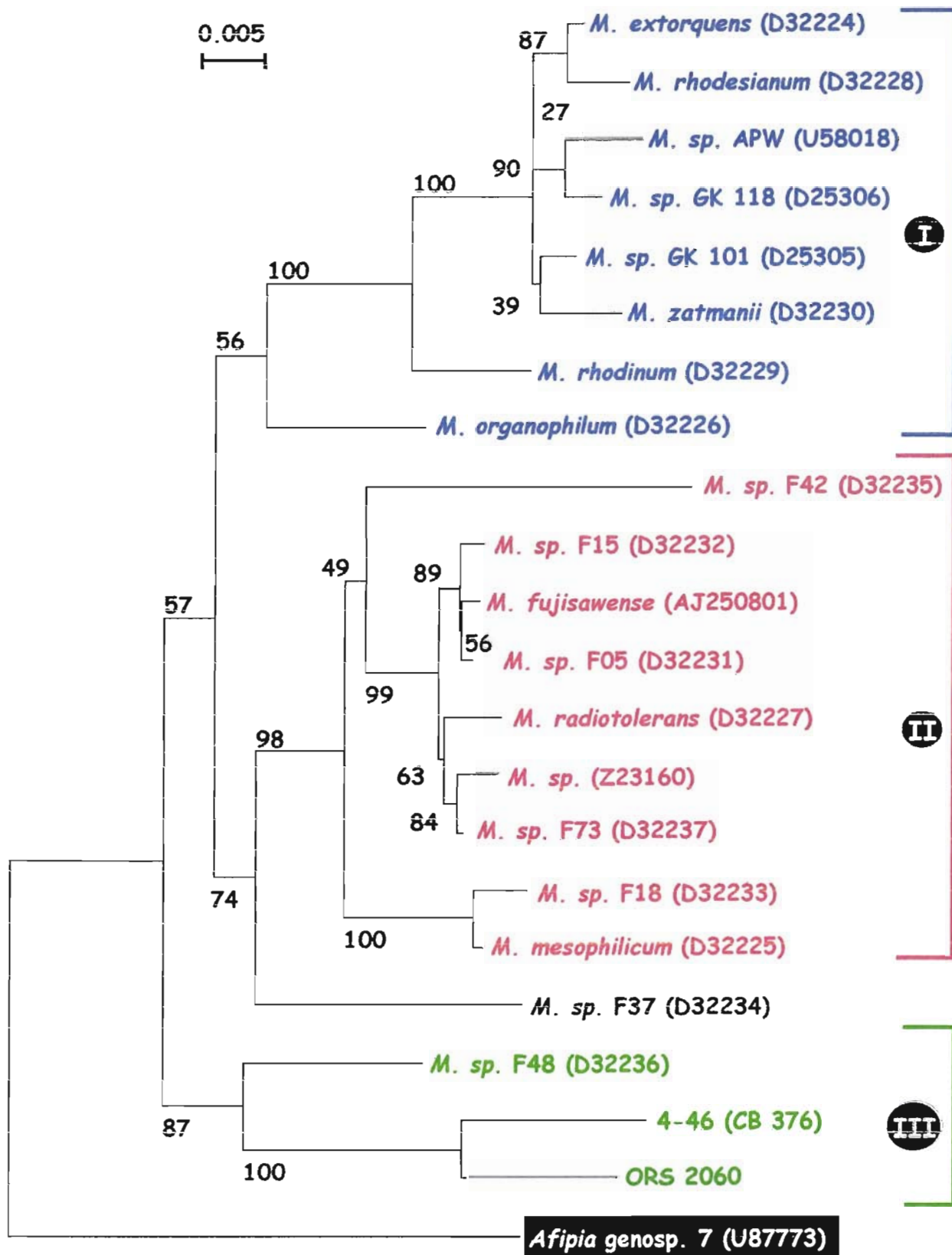


Figure 18. Arbre Phylogénétique basé sur les séquences du gène de l'ADNr 16S de la souche ORS 2060 et des différentes espèces de *Methylobacterium*.

II - 7 - Etude du polymorphisme du gène *nodA*

II - 7 - 1 - Amplification du gène *nodA*

Le gène *nodA* a été choisi dans cette étude car il est commun à l'ensemble des rhizobiums et constitue aussi un bon marqueur moléculaire symbiotique (Boivin et Giraud, 1999). Les amorces utilisées pour l'amplification du gène *nodA* ont été définies à partir de régions conservées déterminées après un alignement des séquences de gènes *nodA* disponibles sur Genbank. Le couple d'amorces dégénérées *nodA*brady (GTY-CAG-TGG-AGS-STK-CGC-TGG-G) et *nodA*rbrady (TCA-CAR-CTC-KGG-CCC-GTT-CCG) donne pour l'ensemble des 21 souches représentatives, un unique produit d'amplification de la taille attendue de l'ordre de 580 pb.

II - 7 - 2 - Digestion des produits d'Amplification du gène *nodA*

Les produits d'amplification obtenus ont été digérés par les quatre enzymes de restriction *HaeIII*, *HinfI*, *Sau96I* et *MspI* pour étudier le polymorphisme au niveau de ce gène. Le tableau 17 résume le polymorphisme des profils obtenus pour les 21 souches étudiées.

Chez les souches à croissance lente, le degré de discrimination est variable suivant l'enzyme de restriction. Ce sont les enzymes *HaeIII* et *Sau96I* qui sont les plus discriminantes puisqu'on obtient 6 types de profils avec chacune d'elles. Les enzymes *HinfI* et *MspI* donnent respectivement 5 et 3 types de profils. Il est à noter que pour chaque souche testée, une combinaison unique peut être trouvée ce qui montre le fort polymorphisme de ce gène parmi les souches de ce groupe.

Tableau 17. Récapitulatif des différents types de profils de restriction du gène *nodA* obtenus avec les quatre enzymes *HaeIII*, *MspI*, *HinfI* et *Sau96I*.

Souches	Enzymes de restriction			
	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>MspI</i>	<i>Sau96I</i>
<u>Souches à croissance rapide</u>				
ORS 1917	A	B	C	D
ORS 1924	A	B	C	D
ORS 1928	A	B	C	D
ORS 1937	A	B	C	D
ORS 1991	A	B	C	D
ORS 2026	A	B	C	D
ORS 2030	A	B	C	D
ORS 2045	A	B	C	D
ORS 2060	A	B	C	D
ORS 2076	A	B	C	D
ORS 2092	A	B	C	D
<u>Souches à croissance lente</u>				
ORS 1810	A1	B1	C1	D1
ORS 1813	A2	B2	C2	D2
ORS 1816	A3	B3	C3	D3
ORS 1865	A4	B3	C1	D4
ORS 1929	A5	B4	C1	D5
ORS 2080	A5	B4	C1	D1
ORS 2088	A6	B5	C1	D1
ORS 2077	A5	B4	C1	D1
ORS 2105	A5	B4	C1	D6
ORS 2108	A2	B2	C1	D2

Pour les souches à croissance rapide, aucun polymorphisme des fragments de restriction n'a pu être mis en évidence quelle que soit l'enzyme utilisée. Cette homogénéité confirme le résultat précédemment observé au niveau de l'analyse de la variabilité de l'ADNr 16S, c'est-à-dire la très forte homogénéité de ce groupe de souches.

II - 8 - Analyse phylogénétique du gène *nodA*

Les gènes *nodA* d'une dizaine de souches de *Crotalaria* représentant les deux groupes de souches à croissance lente et rapide ainsi que les deux souches de *Lotononis* (4-46 et 4-144) ont été séquencés. Les séquences nucléiques des différentes souches ont été alignées suivant le groupe auquel elles appartiennent à l'aide du logiciel ClustalX (Annexes 1, 2 et 3).

Les cinq souches à croissance rapide (ORS 1924, ORS 1928, ORS 1991, ORS 2030 et ORS 2060) montrent une très forte homologie de séquences. Quatre des cinq séquences sont identiques, et la cinquième séquence (ORS 1991), comporte trois substitutions de nucléotides sur les 560 alignés.

Contrairement aux souches à croissance rapide, on note un nombre important de substitutions de nucléotides chez les quatre séquences des souches à croissance lente (ORS 1810, ORS 1816, ORS 1929 et ORS 2077).

En ce qui concerne le gène *nodA* des deux souches de *Lotononis*, celui-ci apparaît identique à 100% pour les deux souches et se rapproche phylogénétiquement des souches à croissance rapide.

Les séquences *nodA* de toutes ces souches, ainsi que celles de plusieurs espèces représentant les différents genres de rhizobiums (*Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* et *Bradyrhizobium*) ont été traduites en acides aminés à l'aide du logiciel DNA Strider 1.2, alignées à l'aide

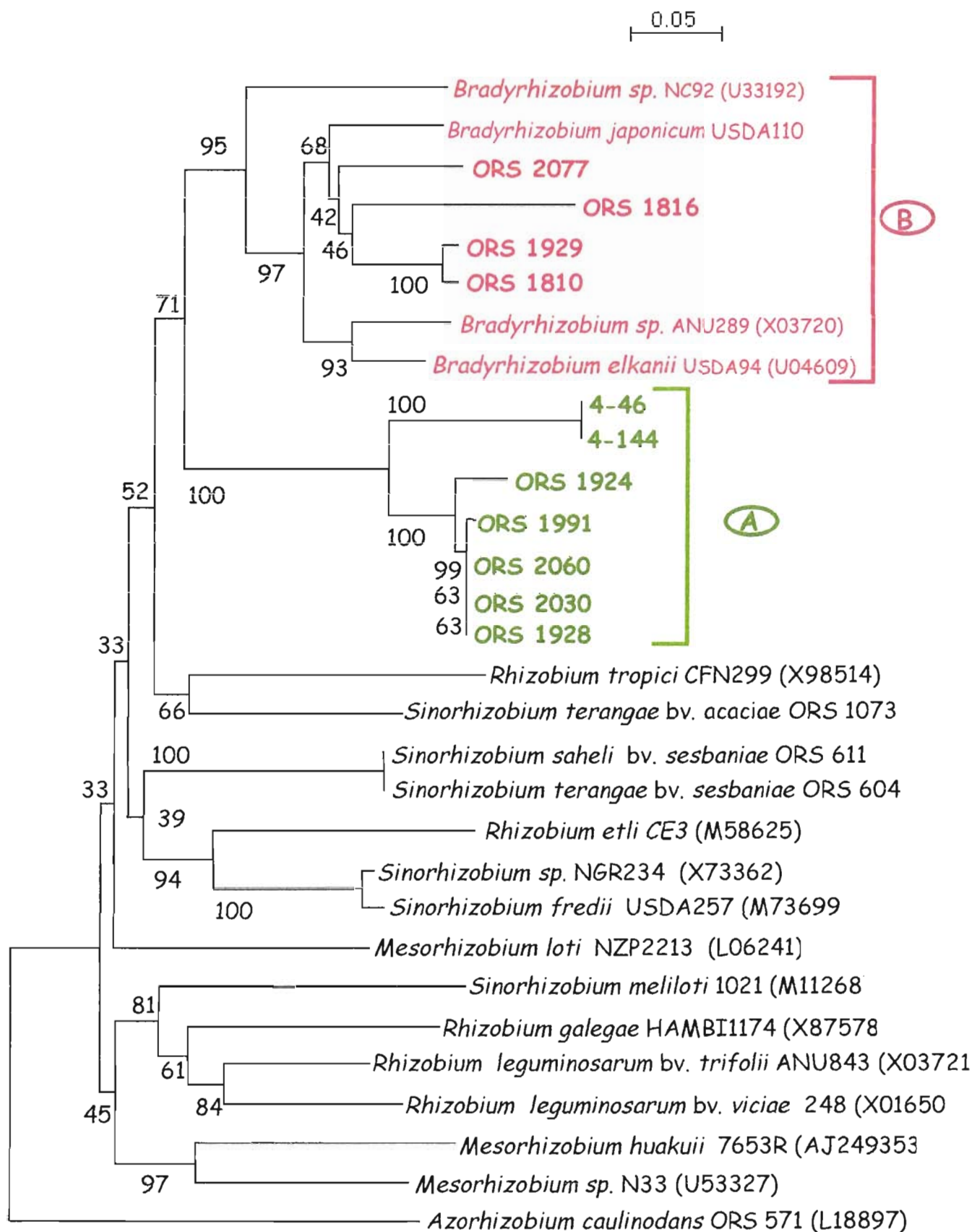


Figure 19. Arbre phylogénétique basé sur les séquences protéiques des gènes *nodA*.

de ClustalX, puis un arbre phylogénétique basé sur cet alignement de séquences protéiques a été construit en utilisant les logiciels ClustalX et Njplot. L'arbre phylogénétique obtenu (figure 19) montre que les souches de *Crotalaria* sont regroupées en deux clusters différents.

L'un des cluster (A) contient la totalité des souches à croissance rapide ainsi que les deux souches de *Lotononis* (4-46 et 4-144) mais aucune souche de rhizobium de référence. La solidité de ce cluster est confirmée par une valeur de bootstrap de 100%. A l'intérieur de ce cluster, les souches 4-46 et 4-144 se regroupent en un sous-cluster monophylétique (bootstrap 100%), de même que les cinq souches à croissance rapide.

Le deuxième cluster (B) (bootstrap 97%), renferme les quatre souches à croissance lente ainsi que *Bradyrhizobium japonicum* (USDA 110), *Bradyrhizobium elkanii* (USDA 94), *Bradyrhizobium* sp. NC92 et *Bradyrhizobium* sp. ANU 289. Dans ce cluster beaucoup moins homogène (Valeurs internes de bootstrap moins élevées), les deux souches ORS 1810 et ORS 1929 se regroupent en un sous-cluster (bootstrap 99,9%).

Il est à noter que ces deux clusters (A) et (B) restent tout de même proches l'un de l'autre et appartiennent à la même branche phylogénétique.

II - 9 - Etude de l'organisation des gènes de nodulation

II - 9 - 1 - Banque d'ADN génomique d' ORS 2060 et sélection des clones nod

Pour étudier l'organisation des gènes de nodulation, nous avons tout d'abord construit une banque d'ADN génomique de la souche modèle ORS 2060 (voir matériel et méthodes). La banque d'ADN génomique ainsi obtenue contient 2016 clones répartis dans 21 microplaques de 96 clones chacune.

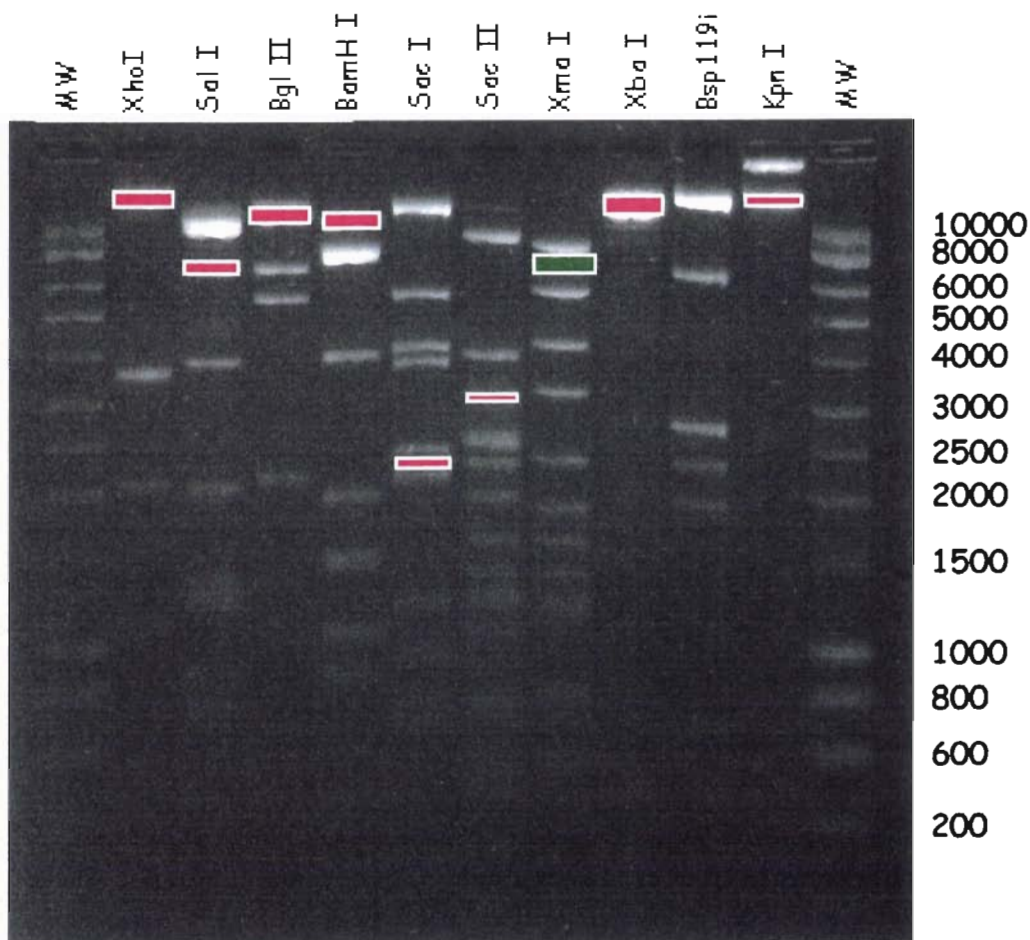


Figure 20A. Hybridation avec une sonde nod des profils de restrictions du clone nod 4-6-6 ou STM 223.

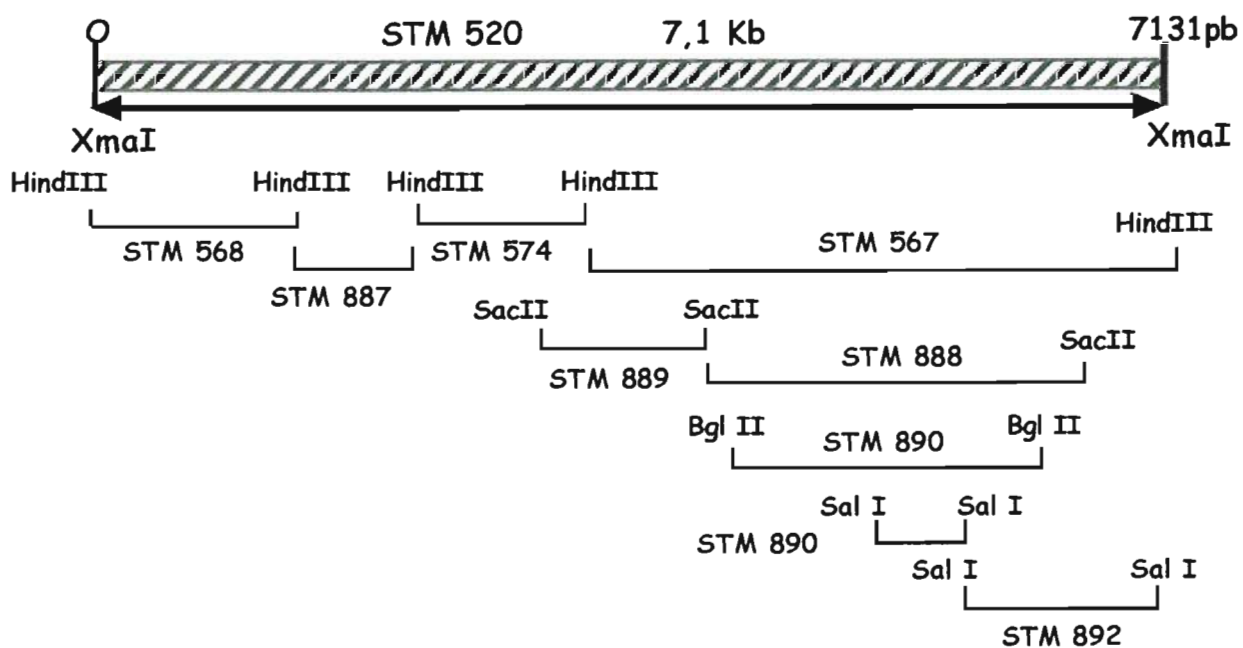


Figure 20B. Clonage des gènes de nodulation de la souche ORS 2060 a partir du clone nod STM 520 (fragment XmaI de 7Kb du clone STM 223 SuperCos cloné dans PUC 18).

Le screening par PCR en utilisant les amorces *nodAfbrady* et *nodArbrady* a permis de sélectionner cinq clones (STM 220, STM 221, STM 222, STM 223 et STM 224) contenant les gènes de nodulation. Le clone STM 223 a été retenu pour la suite de cette étude.

II - 9 - 2 - Sous-Clonage et séquençage des gènes de nodulation

Le clone STM 223 contient un insert d'environ 35 kb, ce qui représente une taille trop importante pour être séquencé au niveau du laboratoire. Afin de restreindre cette région à celle contenant uniquement les gènes *nod* communs et à la région proche environnante, un sous-clonage a été réalisé. Pour cela l'ADN plasmidique du clone STM 223 a été digéré par une série d'enzymes de restriction, transféré sur membrane de nylon puis hybridé avec une sonde *nodA*. L'hybridation (figure 20a) met en évidence des fragments de taille différente s'hybridant avec le gène *nodA*.

Le fragment *XmaI* de 7kb a été choisi pour le séquençage des gènes *nod* après clonage dans PUC18 (STM 520). Afin de séquencer entièrement ce fragment, celui-ci a été à son tour digéré par différentes enzymes et les différents fragments obtenus clonés dans du PUC18 (figure 20b). Les extrémités de ces inserts ont été séquencés à l'aide des amorces universelles M13F et M13R-48. Par ailleurs des primers ont été définis pour compléter le séquençage.

Au total, une séquence de 7131 paires de bases a été obtenue après l'assemblage des séquences de tous les sous-clones (Annexe 4). Cette séquence comporte neuf phases ouvertes de lecture (ORFs) qui d'après leur taux d'homologie correspondent dans l'ordre aux gènes de nodulation *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodU*, *nodI*, *nodJ*, *nodH* et *nodQ* (figure 21). Ces gènes sont tous transcrits dans le même sens à l'exception du gène *nod* régulateur *nodD* qui est transcrit en sens inverse. Les séquences des gènes *nodU* et *nodQ* sont

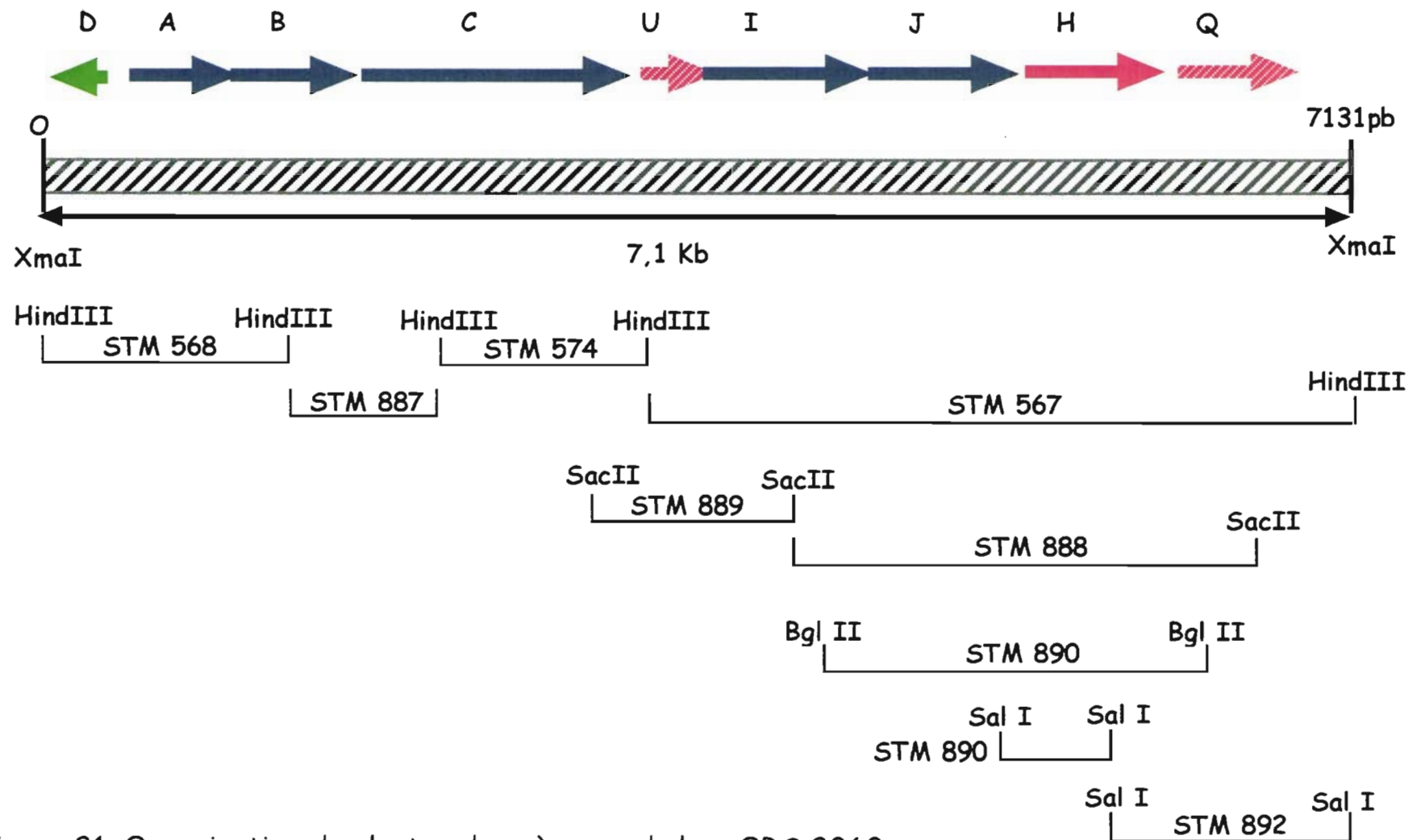
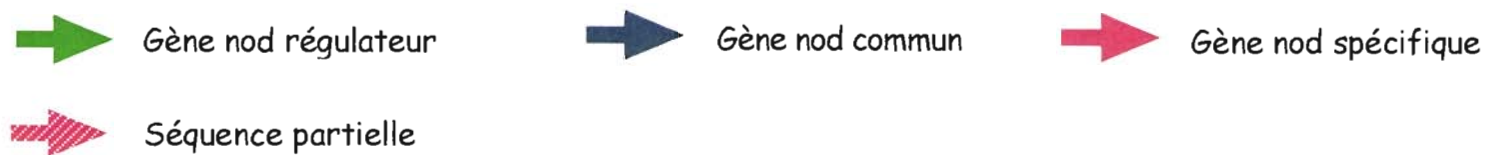


Figure 21. Organisation du cluster des gènes *nod* chez ORS 2060.



partielles tout comme le gène *nodD* dont le fragment *XmaI* ne contient que les 262 premiers nucléotides. L'ensemble des gènes *nodABCUIJHQ* semble constituer un seul opéron avec une distance entre les différentes ORFs qui varie de 26 nucléotides entre *nodB* et *nodC* à 76 nucléotides entre *nodH* et *nodQ*. Elle est de 68 nucléotides entre *nodC* et *nodU* et 67 nucléotides entre *nodJ* et *nodH*. Les gènes *nodU* et *nodI* se chevauchent sur 33 nucléotides de même que le codon stop du gène *nodA* et le codon start du gène *nodB*. Quant au gène *nodJ*, il suit immédiatement en amont du gène *nodI*. A 158 nucléotides en aval de ce cluster de gènes, se trouve le gène régulateur *nodD*.

II - 10 - Analyse phylogénétique des séquences ITS de Crotalaires

Chez les plantes supérieures, la phylogénie a été surtout abordée par l'analyse des séquences du génome chloroplastique (Olmstead et Sweere, 1994) et particulièrement par intermédiaire du gène chloroplastique *rbcL* codant pour la rubisco (ribulose 1,5-biphosphate carboxylase oxygénase). C'est ainsi que particulièrement chez la plupart des légumineuses, de nombreuses corrélations taxonomiques ont pu être établies sur la base de l'analyse de la séquence du gène chloroplastique (Doyle *et al.*, 1997 ; Käss et Wink, 1997).

Actuellement, la phylogénie des plantes utilisant les séquences du génome nucléaire est fondée principalement sur la région Internal Transcribed Spacer (ITS) localisée entre les régions 18S et 26S de l'ADN ribosomal. L'ITS a déjà été utilisé avec succès dans l'analyse de divers groupes de plantes (Baldwin, 1995 ; Sanderson et Liston, 1995) à cause de sa grande variabilité contrairement aux gènes 18S et 26S plus conservés (Hamby et Zimmer, 1992). De nombreuses caractéristiques (Baldwin *et al.*, 1995) ont conduit à promouvoir l'utilisation de cette région dans les reconstitutions phylogénétiques telles que : la petite taille du fragment, une rapide évolution concertée des gènes et l'existence de

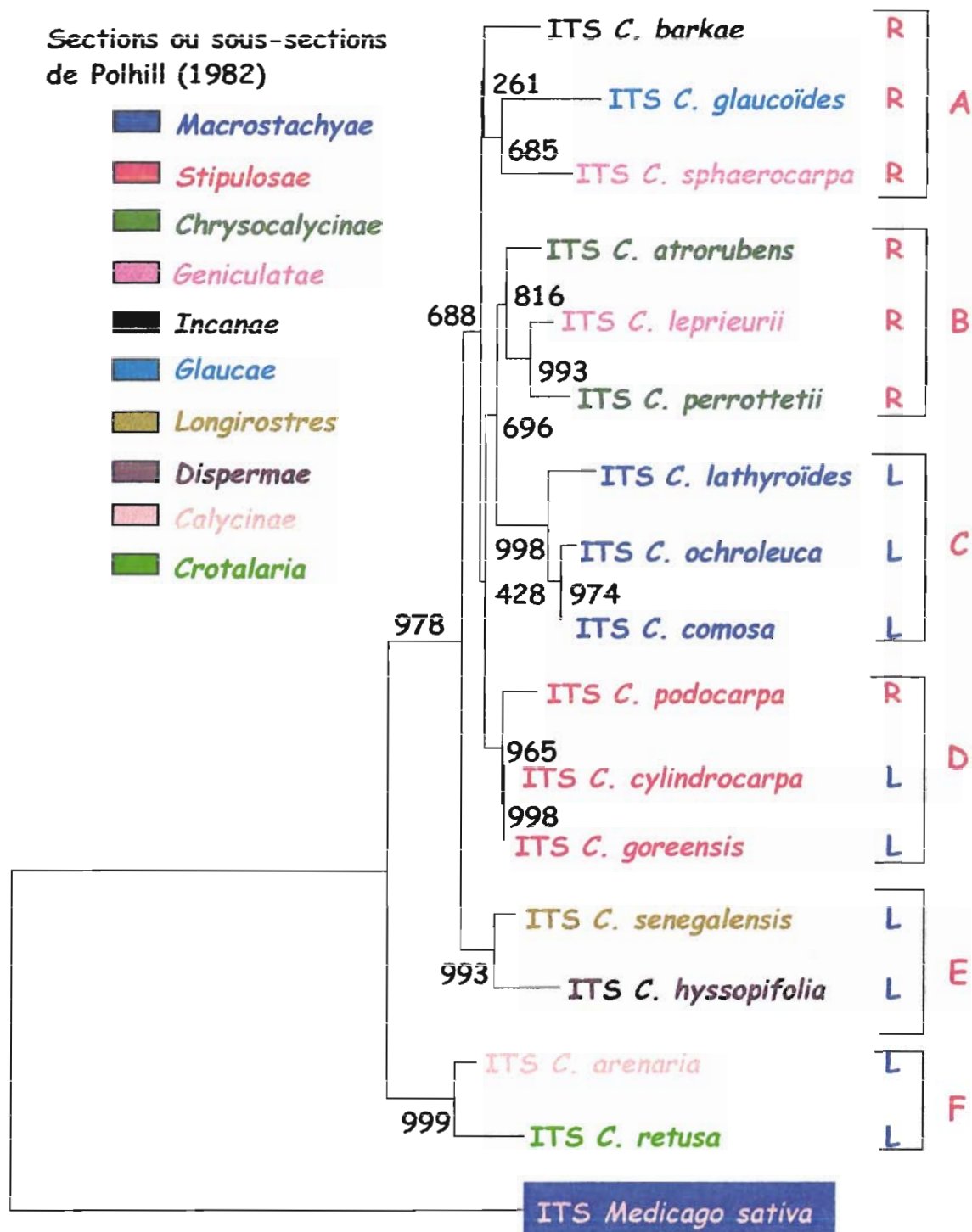


Figure 22. Arbre phylogénétique des séquences ITS de 16 espèces de crotalaires. R et L représentent les groupes de souches auxquels sont associées les espèces ; R pour les souches à croissance rapide et L pour les souches à croissance lente.

séquences flanquantes hautement conservées idéales pour la détermination des amorces.

Afin de déterminer s'il existe une corrélation entre l'analyse phylogénétique effectuée sur la base des séquences ITS et les deux groupes d'inoculation croisés que nous avons définis, nous avons envisagé de séquencer directement le fragment ITS de 16 espèces de crotalaires choisies parmi les 8 sections définies par Polhill (1982) sur la base des critères morphologiques.

Les amorces NNC18S10 et C26A ont permis d'amplifier un fragment unique d'environ 694 pb de la région ITS (Internal Transcribed Spacer). Les fragments amplifiés ont tous été séquencés, et les séquences alignées en utilisant le programme Pileup de G. C. G. (Devereux *et al.*, 1984) voir annexe 5.

L'analyse de cet alignement de séquences a permis de mettre en évidence sur chacune des séquences, trois parties distinctes. On distingue ainsi la région 5,8S de la position 297 à la position 455 pb où aucun polymorphisme n'est observé, et deux autres régions avec des zones variables.

La première région ou ITS1 de la position 40 à la position 296 pb comporte une zone variable entre les positions 90 et 170 pb. Dans la deuxième région ou ITS2 qui va de la position 455 à la position 694 pb, on distingue deux zones variables de 465 à 502 pb et de 570 à 655 pb.

L'arbre phylogénétique construit à partir de ces données par la méthode Neighbor-joining est représenté par la figure 22. La séquence ITS de la légumineuse modèle *Medicago sativa* à été utilisée pour l'enracinement de l'arbre. Les différentes espèces de crotalaires se regroupent en six clusters distincts A, B, C, D, E et F.

Les clusters C et D correspondent respectivement aux sous-sections des *Macrostachyae* et des *Stipulosae*, subdivisions exclusivement basées sur des critères morphologiques proposées par Polhill (1982).

Le cluster B renferme en plus des deux représentants de la sous-section des *Chrysocalycinae* (*C. atrorubens* et *C. perrottetii*), *C. leprieurii* qui appartient à la sous-section des *Geniculatae*.

Le second représentant de la sous-section des *Geniculatae*, *C. sphaerocarpa*, se retrouve dans le cluster A en compagnie des deux espèces *C. glaucoides* et *C. barkae* appartenant à deux sous-sections différentes (*Incanae* et *Glaucæ*). Au même titre que le cluster A, les deux clusters E et F sont composés par des espèces issues de sous-sections différents avec des valeurs élevées de bootstrap.

Les clusters A et B sont uniquement nodulés par des souches à croissance rapide alors que les autres clusters sont uniquement nodulés par des souches à croissance lente à l'exception du cluster D qui est nodulé par les deux types de souches.

III - DISCUSSION

III - 1 - Spécificité de nodulation chez les crotalaires

Dans cette étude, nous avons constitué une collection de souches de *Crotalaria*. Ces isolats comprennent à la fois des souches à croissance rapide et des souches à croissance lente. Les souches à croissance rapide sont exclusivement isolées de *C. podocarpa*, *C. glaucoides* et *C. perrottetii* alors que les souches à croissance lente proviennent des six espèces *C. comosa*, *C. goreensis*, *C. hyssopifolia*, *C. lathyroides*, *C. ochroleuca* et *C. retusa*.

Les tests d'inoculation montrent pour la première fois que les crotalaires sont associées à deux types de rhizobiums. Ils révèlent également l'existence d'une spécificité d'hôte chez les crotalaires contrairement aux études précédentes qui les considéraient comme des légumineuses non spécifiques (Date, 1976 ; Giller et Wilson, 1991 ; Gao *et al.*, 1994). Les souches de *Crotalaria* étudiées jusqu'à présent ont été toutes classées dans le groupe *Bradyrhizobium* (Gao *et al.*, 1994 ; Van Rossum *et al.*, 1995 ; Doignon-Bourcier *et al.*, 1999a). Nos résultats, confirment d'une part, l'association *Crotalaria-Bradyrhizobium* et d'autre part ils mettent en évidence l'existence de souches spécifiques à certaines espèces de *Crotalaria* (*C. podocarpa*, *C. perrottetii* et *C. glaucoïdes*). Ces souches qui sont différentes de tous les rhizobiums connus constituent certainement une nouvelle espèce de rhizobiums.

III - 2 - *Methylobacterium*, un nouveau genre symbiotique

Les techniques d'analyse SDS-PAGE et ARDRA (Doignon-Bourcier *et al.*, 1999b) montrent que les souches à croissance lente appartiennent aux clusters C et D de *Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium elkanii* (Molouba *et al.*, 1999). Par contre les souches à croissance rapide qui présentent une très forte homogénéité (Pas de polymorphisme observé au niveau des gènes *nodA* et 16S) sont distinctes des trois principales branches phylogénétiques contenant toutes les espèces de rhizobiums connues. De façon surprenante, ces symbiotes spécifiques des crotalaires se retrouvent dans le groupe des *Methylobacterium*.

Jusqu'à présent les espèces de rhizobiums décrites appartenaient à trois branches phylogénétiques distinctes de la sous-classe α -2 des protéobactéries. Une première grande branche regroupe les genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* et *Allorhizobium* avec le genre *Agrobacterium*, bactérie pathogène des plantes. La deuxième branche contient les genres *Bradyrhizobium* et *Rhodopseudomonas* alors que la troisième branche comporte les genres

Azorhizobium et *Xanthobacter*. La mise en évidence d'une nouvelle branche de phylogénétique constituée par les bactéries du genre *Methylobacterium* confirme et élargie le statut polyphylétique des rhizobiums (Young et Haukka, 1996).

Les pourcentages de similarité des séquences avec les différentes espèces décrites de *Methylobacterium* varient entre 93,72% (*Methylobacterium organophilum*) et 94,52% (*Methylobacterium extorquens*). Ces valeurs sont comparables aux valeurs trouvées pour les différentes espèces de *Methylobacterium* pour lesquelles elles varient entre 93,8% et 99,6% (Haraishi *et al.*, 1995) ou entre 94,8% et 99,36% dans le cas de nos propres alignement de séquences. Ceci démontre que les souches spécifiques de crotalaires appartiennent phylogénétiquement au genre *Methylobacterium* dont elle constituent une nouvelle espèce pour laquelle nous avons proposé le nom "*Methylobacterium nodulans*".

Les bactéries du genre *Methylobacterium* décrites jusqu'à présent sont en majeure partie isolées de l'eau ou de la microflore foliaire et sont connues dans la littérature comme étant des PPFM (Pink-Pigmented Facultatively Methylophilic Bacteria) (Holland, 1997). Par contre ORS 2060 ainsi que le reste des souches spécifiques de crotalaires, ne sont pas pigmentées, et la souche représentative ORS 2060 ne présente pas de pic d'absorption spécifique de la bactériochlorophylle à 766 nm. L'absence de bactériochlorophylle pourrait être due à leur adaptation à la vie dans le sol et les nodules plutôt que dans l'eau ou la phyllosphère.

Par contre les deux souches de *Lotononhis bainesii*, 4-46 et 4-144 sont photosynthétiques (Fleischman et Kramer, 1998) et présentent un aspect phénotypique similaire aux différentes espèces de *Methylobacterium* connus. En

effet, comme l'ensemble des *Methylobacterium*, ces deux souches ont des colonies pigmentées en rose.

L'association des *Methylobacterium* avec les plantes a été mise en évidence par plusieurs travaux (Austin *et al.*, 1978 ; Yoshimura, 1982 ; Corpe et Basile, 1982). Des PPFM ont été isolés sur plus de cent espèces de plantes, allant des mousses aux angiospermes ainsi qu'aux gymnospermes (Holland, 1997). Selon ce dernier auteur, il n'existe pas de plantes non colonisées par ces PPFM, et cette relation avec les plantes est très ancienne.

D'après Corpe et Rheem, (1989) c'est la méthylotrophie des PPFM qui est responsable du maintien de leur relation avec les plantes. En effet, ils ont montré que la cuticule des feuilles du trèfle blanc contient des quantités substantielles de méthanol, surtout pendant la phase de croissance de la plante, méthanol qui serait issu la dégradation des pectines. En utilisant ce substrat toxique pour les tissus de la plante, les PPFM occupent dans l'environnement foliaire une niche accessible par très peu de microorganismes.

Malgré leur étroite relation avec les plantes, aucune symbiose fixatrice d'azote avec les légumineuses n'avait jusqu'à présent été démontré. Cependant, Basile *et al.*, (1969) et Bridges, (1976) ont montré que les PPFM peuvent stimuler la croissance des plantes et que le facteur stimulant de la croissance était diffusible et ne nécessitait pas un contact avec la plante. En outre il a été démontré que les PPFM interviennent dans le métabolisme des plantes, notamment celui de l'azote, ainsi que dans la germination des graines (Holland, 1997).

III - 3 - Liens phylogénétiques des gènes de nodulation

Contrairement à l'ensemble des PPFM et particulièrement aux espèces de *Methylobacterium* décrites jusqu'à présent, les souches qui font l'objet de

cette étude établissent une véritable symbiose fixatrice d'azote avec les légumineuses du genre *Crotalaria*.

L'étude phylogénétique des séquences du gène de nodulation *nodA* incluant la presque totalité des espèces de rhizobiums montre que les gènes *nodA* des souches à croissance lente se répartissent dans le même cluster que *Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium elkanii* ainsi d'autres souches de *Bradyrhizobium sp.* Ce résultat est en accord avec la phylogénie 16S qui place la souche représentative ORS 1929 dans le groupe des *Bradyrhizobium*. Il est également comparable aux résultats de l'analyse ARDRA (Doignon-Bourcier *et al.*, 1999b) pour laquelle, elles se retrouvent dans les clusters B et C correspondant respectivement à *Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium elkanii* (Molouba *et al.* 1999).

Le deuxième cluster des gènes *nodA* regroupe essentiellement ceux des souches à croissance rapide de crotalaires. Ce cluster inclus aussi les deux souches 4-46 et 4-144 dont la plante hôte, *Lotononis bainesii* appartient à la même tribu que les crotalaires (*Crotalarieae*) (Polhill et Raven, 1978 ; Käss et Wink, 1997). Ces deux souches ont par ailleurs des séquences 16S proches des souches à croissance rapide.

La similarité de séquences entre la protéine NodA de la souche ORS 2060 avec les séquences disponibles en banques varie de 53,06% avec *Azorhizobium caulinodans* à 74,11% avec *Bradyrhizobium elkanii* USDA 94. Cette similarité plus forte avec les protéines NodA des *Bradyrhizobium* ainsi que l'analyse phylogénétique semblent indiquer que ces gènes auraient dérivé des gènes *nodA* des *Bradyrhizobium*.

III -4 - Organisation des gènes de nodulation Chez "*M. nodulans*"

Les gènes *nodA*, *nodB* et *nodC* observés chez tous les rhizobiums ainsi que les gènes *nodI* et *nodJ* sont également tous présents chez ORS 2060 "*Methylobacterium nodulans*". Le séquençage du fragment XmaI de 7kb contenant quelques gènes de nodulation a cependant mis en évidence une organisation un peu particulière des gènes de nodulation chez ORS 2060.

Généralement chez les rhizobiums, en aval du gène *nodC* dans le même opéron, on trouve d'autres gènes de nodulation. Les gènes communément observés sont *nodI* et *nodJ* présents chez plusieurs espèces de rhizobiums et les gènes *nodS* et *nodU* que l'on rencontre chez *Bradyrhizobium japonicum*, *Azorhizobium caulinodans*, *Sinorhizobium fredii* et *Sinorhizobium sp.* NGR 234. Cependant, chez *S. fredii*, *M. loti* et la souche NGR 234, les gènes *nodS* et *nodU* sont dans des opérons différents. Les gènes *nodI* et *nodJ* tout comme les gènes *nodS* et *nodU* sont toujours en couple avec les gènes *nodJ* et *nodU* toujours respectivement en aval de *nodI* et *nodS*. Chez "*Methylobacterium nodulans*" ORS 2060, on observe la même organisation pour les gènes *nodI* et *nodJ*. Par contre les gènes *nodS* est absent en amont du gène *nodU* et d'autre part ce dernier ne paraît pas entier en comparaison avec les autres gènes *nodU*. Seuls les 373 premiers nucléotides du gène sur environ 580 sont présents dans l'orf ce qui pose la question de la fonctionnalité d'un tel gène.

Chez "*Methylobacterium nodulans*" ORS 2060, en aval du gène *nodJ* se trouvent dans le même opéron les gènes *nodH* et *nodQ*. Ces deux gènes font partie des gènes de spécificité d'hôte qu'on ne rencontre que chez certaines espèces. Chez *Sinorhizobium meliloti*, les gènes *nodFEGPQ* et *nodH* sont organisés en deux opérons (Horvath et al., 1986). Les gènes *nodP* et *nodQ* toujours en couple et avec le gène *nodH* ont été également identifiés chez *Rhizobium tropici* et *Rhizobium sp.* BR816 (Van Rhijn et al., 1993, 1996).

Contrairement à ces deux espèces, chez ORS 2060 le gène *nodQ* n'est pas associé au gène *nodP*. Tout comme le gène *nodU*, ce gène est également partiel, seuls les 632 derniers nucléotides sur environ 1900 sont présents dans l'orf. Le gène régulateur *nodD* dont seuls les 262 premiers nucléotides ont été séquencés, est transcrit en sens inverse des autres gènes comme c'est le cas chez tous les rhizobiums.

Comme pour la plupart des gènes bactériens, les orfs des gènes de nodulation chez ORS 2060 commencent par un codon ATG (*nodI*, *nodJ*, *nodH*, *nodQ* et *nodU*) à l'exception des gènes *nodA*, *nodB* et *nodC* qui commencent respectivement par CTG, GTG et TTG. Ce type non usuel de codons start a déjà été décrit les rhizobiums : GTT chez *nodS* de *Mesorhizobium loti*, TTG chez *nodT* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* et *nodD* d' *Azorhizobium caulinodans* (Schlaman *et al.*, 1998). La présence de séquences de Shine et Dalgarno juste en amont des orfs montre que ces gènes sont fonctionnels.

Cette étude de l'organisation des gènes de nodulation chez "*Methylobacterium nodulans*" ORS 2060 a mis en évidence le cas particulier des gènes *nodU* et *nodQ*. Ces deux gènes toujours respectivement couplés aux gènes *nodU* et *nodP* se retrouvent seuls avec des séquences incomplètes chez "*Methylobacterium nodulans*". Le produit du gène *nodU* est une 6-O-carbamoyl transférase alors que l'activité du gène *nodQ* couplée à celle du gène *nodP* fournit une 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) qui sert de substrat au gène *nodH* dont le produit est une sulfotransférase qui catalyse le transfert d'un groupe sulfate aux facteurs Nod non sulfatés ou aux oligomères de chitine.

L'absence des gènes *nodS* et *nodP* associée aux séquences incomplètes des gènes *nodU* et *nodQ* pourrait résulter d'événements de recombinaisons ou de transposition comme cela a souvent été observé dans le cas des gènes *nod* chez certaines espèces de rhizobiums : *Rhizobium etli* (Vazquez *et al.*, 1991) ;

Mesorhizobium loti (Scott et al., 1996) ; *Mesorhizobium* sp. 33 (Cloutier et al., 1996, 1997) ; *Mesorhizobium huakuii* (Zhang et al., 2000). Ceci pourrait être à l'origine de la production de facteurs nod de type particulier responsables de la spécificité de nodulation chez les souches à croissance rapides de crotalaires telles que ORS 2060.

III - 5 - Divergence entre la classification morphologique des crotalaires et la phylogénie basée sur les séquences ITS.

La répartition des espèces de crotalaires sur la base de la phylogénie ITS ne correspond pas exactement à la classification de Polhill, (1982). Cette Classification basée sur des caractéristiques morphologiques, divise les *Crotalarieae* en huit sections avec quatre sous-sections (*Chrysocalycinae*, *Stipulosae*, *Glaucæ*, et *Incanae*) chez les *Chrysocalycinae* et deux sous-sections chez les *Hedriocarpae* (*Hedriocarpae* et *Macrostachyae*) et les *Crotalaria* (*Crotalaria* et *Longirostres*).

Pour certaines sous-sections, il semble y avoir une certaine corrélation entre cette classification et la répartition phylogénétique des crotalaires. A titre d'exemple, les espèces *C. lathyroides*, *C. comosa* et *C. ochroleuca*, qui appartiennent à la même sous-section des *Macrostachyae* se retrouvent placées dans le même cluster C sur la base de l'analyse de leurs ITS.

Il existe cependant des cas où il n'y a aucun lien entre les subdivisions en sous-sections de Polhill et les clusters obtenus après analyse phylogénétique des séquences ITS. C'est le cas des espèces *C. leprieurii* et *C. sphaerocarpa* qui appartiennent à la même sous-section des *Geniculatae* et qui se retrouvent respectivement dans les clusters A et B qui correspondent aux sous-sections des *Incanae* et des *Glaucæ* pour le cluster A et à la sous-section des *Chrysocalycinae* pour le cluster B.

De même la classification en sections, définie par Polhill n'est pas retrouvée au niveau de l'analyse phylogénétique des séquences ITS. Il existe des sous-sections ou des espèces qui appartiennent à la même section qui se retrouvent éloignées phylogénétiquement. Inversement, des sous-sections appartenant à des sections différentes se retrouvent proches au niveau phylogénétique. Ces divergences entre l'analyse phylogénétique et phénotypique ont déjà été évoquées chez le genre *Medicago* (Bena *et al.*, 1998a, 1998b, 1998c)

Contrairement aux difficultés de corréler le regroupement phylogénétique au regroupement phénotypique, nous notons une corrélation entre la phylogénie des séquences ITS et les groupes de nodulation (spécificité d'hôte). En effet, nous pouvons remarquer que les espèces de crotalaires regroupées dans un même cluster appartiennent toutes au même groupe d'inoculation à l'exception du cluster D qui regroupe à la fois des espèces qui s'associent aux deux groupes de souches. Nous n'observons pas cependant une évolution dichotomique des crotalaires vers les deux groupes d'inoculation croisés. Ce qui suggère soit que la spécificité de nodulation est un événement évolutif récent (Martinez-Romero, 1994), soit qu'il y a une évolution différente des gènes ribosomiques qui ont été utilisés ici comme marqueurs moléculaires et des gènes codant pour les récepteurs présomptifs des facteurs Nod (molécules qui sont les déterminants majeurs de la spécificité de la nodulation) et qui n'ont toujours pas été identifiés.

IV - CONCLUSION

Dans ce chapitre, à partir d'une collection de 123 souches de différentes espèces de *Crotalaria* poussant au Sénégal, nous avons mis en évidence l'existence d'un nouveau groupe de bactéries symbiotiques capables de noduler les légumineuses et appartenant au genre *Methylobacterium*. La nouvelle espèce de bactérie symbiotique que nous avons nommée

"Methylobacterium nodulans" forme des nodules fixateurs d'azote sur les racines d'un groupe d'espèces de crotalaires qui présentent une forte spécificité de nodulation.

Afin de vérifier s'il était possible de différencier phylogénétiquement les espèces de crotalaires nodulées par les *Methylobacterium* des autres espèces nodulant avec les *Bradyrhizobium* classiques, nous avons entrepris une étude de phylogénie des espèces de crotalaires en utilisant le séquençage de l'ITS. Les résultats obtenus montrent que les espèces nodulées par les *Methylobacterium* se retrouvent en majorité regroupées dans deux clusters de l'arbre phylogénétique. Ces clusters d'espèces nodulées par les *Methylobacterium* ne correspondent cependant pas à la classification botanique définie par Polhill (1982). Cette dernière reste cependant valable pour les sous-sections des *Macrostachyae* et des *Stipulosae*.

Nos résultats montrent que la symbiose avec les légumineuses n'est donc pas restreinte aux trois branches phylogénétiques reconnues jusqu'à présent et que d'autres bactéries ont la capacité d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec les légumineuses. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que certaines espèces végétales comme les crotalaires, productrices de substances toxiques, auraient ainsi sélectionné des groupes bactériens particuliers qui auraient acquis la capacité de noduler ces légumineuses.

Chapitre 3

***ETUDE DE LA METHYLOTROPHIE CHEZ LES SOUCHES DE
CROTALAIRES : CLONAGE DU GENE MXAF ET ROLE DE LA
METHYLOTROPHIE DANS LA SYMBIOSE***

I - INTRODUCTION

Les bactéries du genre *Methylobacterium* sont des bactéries gram-, capables d'utiliser les composés monocarbonés tels que le méthanol ou la méthylamine comme seule source de carbone et d'énergie.

Ce métabolisme des composés en C₁ fait intervenir une enzyme particulière qui oxyde les alcools primaires, la méthanol deshydrogénase ou MDH. La MDH est un tétramère, constitué de deux grandes sous-unités α , codées par le gène *mxoF* et de deux petites sous-unités β , codées par le gène *mxoI*. Elle est associée à un groupement prosthétique, la Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) (Anthony, 1986) et l'activation du complexe MDH-PQQ se fait par l'intermédiaire du calcium (Ca²⁺) (Richardson et Anthony, 1992).

Des études chez *Methylobacterium extorquens* et *Methylobacterium organophilum* ont montré que l'assimilation des composés en C₁, notamment l'oxydation du méthanol et l'assimilation du formaldéhyde qui en résulte fait intervenir un grand nombre de gènes en plus des gènes *mxoF* et *mxoI*. Ces gènes sont chromosomiques et sont regroupés en quatre loci chez *Methylobacterium extorquens* (Lidstrom et al., 1994). Par ailleurs, chez *Methylobacterium extorquens* et chez *Paracoccus denitrificans*, deux gènes appelés respectivement *mxoF'* et *xoxF* ont été mis en évidence. Ces gènes décrits comme étant homologues au gène *mxoF*, coderaient pour une deshydrogénase de fonction inconnue et qui serait également liée à la pyrroloquinoline quinone (Harms et al., 1987, 1996 ; Chistoserdova et Lidstrom, 1997).

Notre découverte d'une association symbiotique fixatrice d'azote spécifique *Crotalaria*-"*Methylobacterium nodulans*" soulève toute une série de questions auxquelles nous avons essayé de répondre au cours de ce troisième chapitre.

- **"*Methylobacterium nodulans*" et les différentes espèces de rhizobiums sont-ils méthylotrophes ?**

Nous avons ainsi, essayé de déterminer si, comme toutes les espèces de *Methylobacterium*, "*Methylobacterium nodulans*" est capable de dégrader des composés monocarbonés. D'autre part, nous avons cherché à déterminer si la méthylotrophie était une propriété spécifique à "*Méthyllobactérium nodulans*" ou commune à tous les rhizobiums.

Pour répondre à notre interrogation, nous avons d'abord cherché par amplification (PCR) la présence du gène *mxoF* qui code pour la grande sous-unité de la MDH chez "*Methylobacterium nodulans*" et chez les différentes espèces de rhizobiums. Pour cela nous avons utilisé les amorces spécifiques f1003 et r1561 (McDonald *et al.*, 1995) et les amorces dégénérées mxaf916 et mxar1360 définies à partir des zones conservées des séquences du gène *mxoF* disponibles dans Genbank et des gènes homologues décrits chez *Methylobacterium extorquens* (*mxoF'*) et *Paracoccus denitrificans* (*xoxF*).

Le caractère méthylotrophe, c'est-à-dire la capacité à métaboliser des composés en C_1 , a été vérifiée en réalisant des tests de croissance sur des milieux contenant des substrats monocarbonés comme seule source de carbone. Nous avons ainsi testé la croissance de "*Methylobacterium nodulans*" ORS 2060 sur des milieux contenant du méthanol, du formate, du formaldéhyde ou de la méthylamine comme seule source de carbone. D'autre part, nous avons également testé l'aptitude d'une dizaine d'espèces de rhizobiums à utiliser le méthanol comme seule source de carbone et d'énergie.

- **Toutes les espèces de *Methylobacterium* sont-elles symbiotiques ?**

Pour répondre à cette question, les propriétés symbiotiques des différentes espèces de *Methylobacterium* ont été vérifiées par inoculation des

différentes souches représentatives sur des espèces de crotalaires appartenant aux deux groupes d'inoculation que nous avons définis et par des essais d'isolement des gènes de nodulation.

- Le caractère méthylotrophe de "*M. nodulans*" joue-t-il un rôle lors de la symbiose avec les crotalaires ?

Pour déterminer le rôle éventuel de la méthylotrophie dans la symbiose "*Methylobacterium nodulans*"-*Crotalaria*, nous avons cherché à construire des mutants non méthylotrophes par recombinaison homologue afin d'observer l'effet de cette mutation sur la nodulation et la fixation d'azote, en utilisant l'espèce *Crotalaria perrottetii* comme plante hôte.

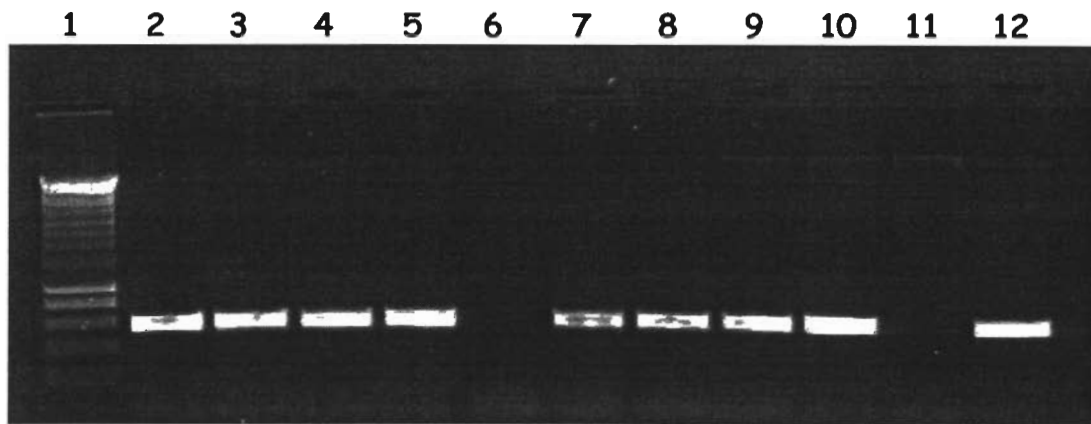


Figure 23. Produit d'amplification du gène *mx*a*F* chez les souches spécifiques de Crotalaires : 1, SmaLadder ; 2, ORS 1917 ; 3, ORS 1924 ; 4, ORS 1928 ; 5, ORS 1937 ; 6, ORS 1991 ; 7, ORS 2026 ; 8, ORS 2030 ; 9, ORS 2045 ; 10, ORS 2060 ; 11, ORS 2092 ; 12, ORS 2076.

II - RESULTATS

II - 1 - Caractérisation du gène *mxoF* chez "*M. nodulans*"

A - Recherche du gène chez les différentes souches de crotalaires

Nous avons utilisé les amorces spécifiques f1003 et r1561 (McDonald *et al.*, 1995) pour rechercher le gène *mxoF* chez 11 souches de crotalaires appartenant au groupe de "*Methylobacterium nodulans*" et 11 souches appartenant au groupe *Bradyrhizobium*. Aucun produit d'amplification n'a été obtenu avec les souches de *Bradyrhizobium*, alors que les souches spécifiques du groupe "*Methylobacterium nodulans*" donnent toutes à l'exception de ORS 1991 et ORS 2092 un produit d'amplification unique de la taille attendue (555pb) (figure 23). La séquence du produit PCR de la souche représentative ORS 2060 (*M. nodulans*) présente une très forte homologie (88%) avec les gènes *mxoF* de *Methylobacterium extorquens* et de *Methylobacterium organophilum*.

B - Clonage et séquençage du gène *mxoF* de "*M. nodulans*" ORS 2060

Le screening par PCR de la banque d'ADN génomique d'ORS 2060 en utilisant les amorces spécifiques f1003 et r1561 (McDonald *et al.*, 1995) a permis de sélectionner quatre clones (STM 216, STM 217, STM 218 et STM 219) contenant le gène *mxoF*. Le clone STM 217 a été retenu pour la suite de l'étude. Ce clone contient un insert d'environ 35 kb. Afin de restreindre cette région à celle contenant le gène *mxoF*, un sous-clonage a été réalisé selon la même procédure que pour les gènes de nodulation cf (paragraphe II-9-2, Chapitre II).

Un fragment PstI d'environ 4kb qui s'hybride avec la sonde *mxoF* (figure 24a) a été choisi pour le séquençage complet du gène *mxoF* après clonage dans

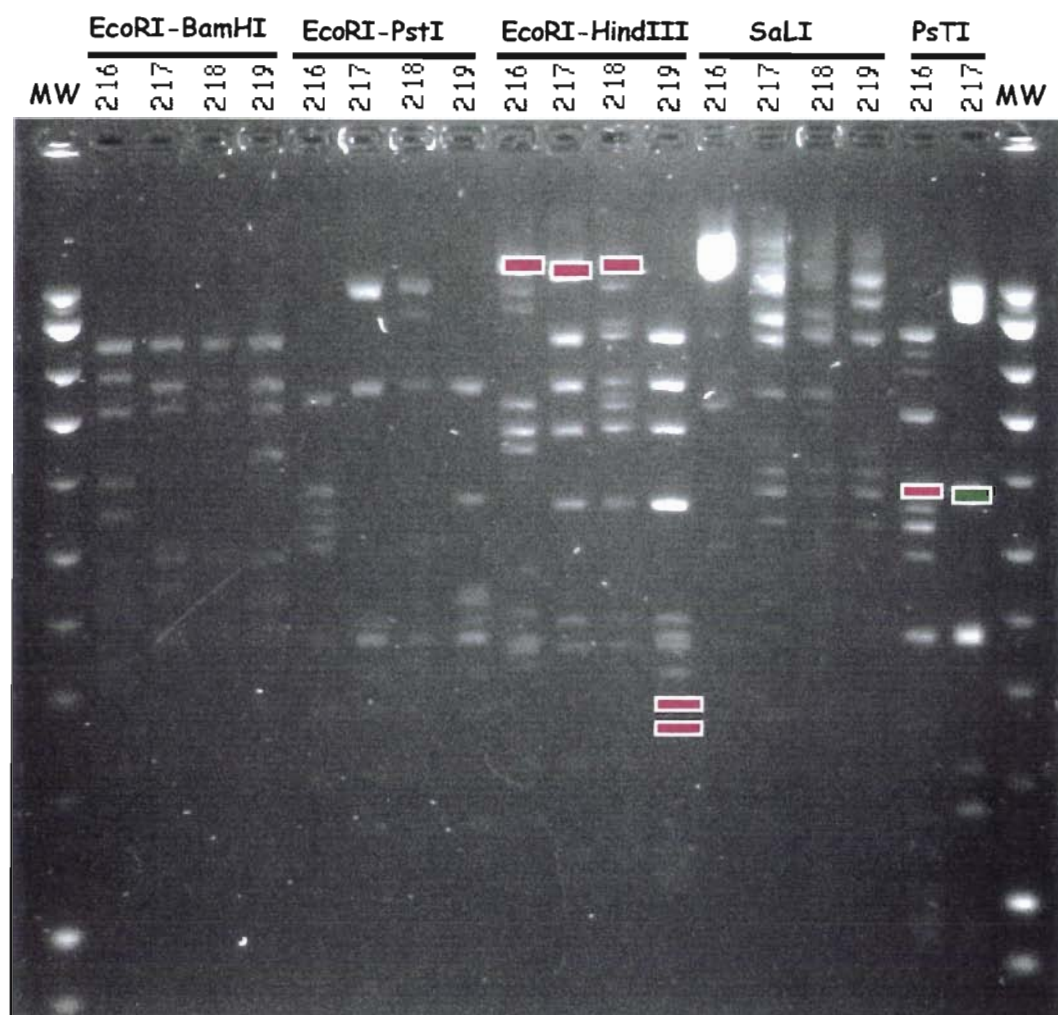


Figure 24A. Hybridation des fragments de restriction des quatre clones isolés de la banque d'ADNg d'ORS 2060 contenant le gène *mxoF*, avec la sonde *mxoF*.

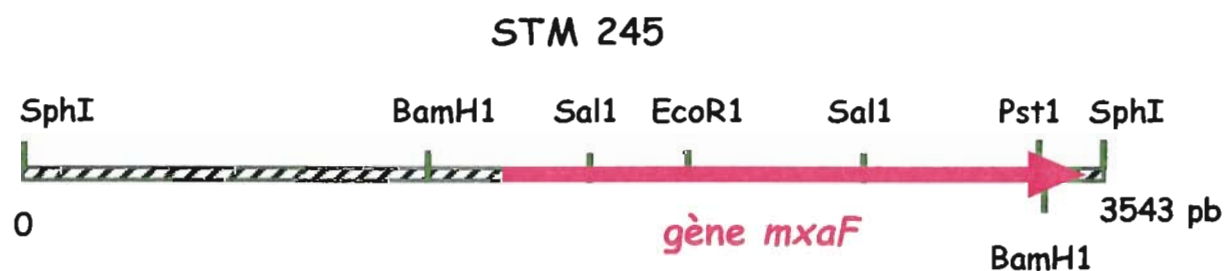


Figure 24B. Sous-Clonage et séquençage du clone STM 245 et mise en évidence d'une ORF correspondant au gène *mxoF*.

pUC18 (STM 245) (figure 24b). Nous avons obtenu au total une séquence de 3543 pb (Annexe 6) après assemblage des séquences des différents sous-clones de STM 245. Cette séquence de STM 245 contient une seule phase ouverte de lecture de 1890 pb, elle a été déposée dans Genbank sous le numéro d'accès AF220764. Elle code pour une protéine de 629 acides aminés, qui présente 88% d'identité avec la protéine MxaF de *Methylobacterium organophilum* (numéro d'accès M22629) et *Methylobacterium extorquens* (numéro d'accès M31108) et 75% d'identité avec celle de *Paracoccus denitrificans* (numéro d'accès M17339). Juste en aval du codon ATG de départ, on retrouve une séquence de Shine-Dalgarno (-12- GGGAGA-5), ce qui suggère que le gène est transcrit.

Les 93 premiers nucléotides de la séquence du gène *mxaf* correspondent à une séquence signal pour la sécrétion de la protéine (Von Heijne, 1985), (figure 25). Ces résultats montrent que "*M. nodulans*" (ORS 2060), comme la majorité des souches spécifiques de crotalaires, contient le gène structural *mxaf* typique des *Methylobacterium* et indispensable à l'oxydation du méthanol.

II - 2 - Identification d'un gène homologue au gène *mxaf* chez les rhizobiums

Nous avons recherché la présence du gène *mxaf* chez plusieurs souches de rhizobiums appartenant à différents genres et espèces (*Sinorhizobium meliloti*, *S. medicae*, *S. fredii*, *S. teranga*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *R. etli*, *R. tropici*, *Mesorhizobium ciceri*, *M. loti*, *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii*, *Allorhizobium undicola* et *Azorhizobium caulinodans*).

Les amorces f1003 et r1561 ne génèrent aucune amplification avec ces souches de rhizobiums. Par contre lorsqu'on utilise les amorces dégénérées *mxaf*916 et *mxar*1360, définies à partir des régions conservées des gènes *mxaf*

Figure 25. Traduction protéique du gène *mxoF* de "*Methylobacterium nodulans*" ORS 2060. Les 31 premiers aminoacides correspondent à une séquence signal pour la sécrétion de la protéine.

1	MLGKIVVRCR	TGVSVAALAA	LLPLAGPSAL	↓ ANDKLVELSK	SDGNWVMPGK
51	NYDSDNYSKL	KQINAENVKN	LKVSQFSTG	LLNGHEGAPL	VVDGTMYVHT
101	SFPNNTFALG	LDDPGKILWQ	DKPKQNPAAR	SVACCDLVNR	GLAYWPGDGK
151	TPSLILKTLL	DGHVVALNAQ	TGETVWKIEN	SDIRVGSTLT	IAPYVVKDKV
201	IIGSSGAELG	VRGYLTAYDV	RTGEQKWRAY	ATGPDSDLLL	AKDFNIHNAH
251	YGQKGLGTST	WEGDAWKIGG	GTNWGWYAYD	PGTNLIYFGT	GNPAPWNETM
301	RPGDNKWTMT	IFARDVDTGE	AKFGYQKTPH	DEWDYAGVNV	MMLSTQKDRS
351	GKERKLLTHP	DRNGIVYTLD	RTNGDLISAH	KIDDTVNVFK	TVDLKSGLPV
401	RDPEYGTRMD	HLAKDICPSA	MGYHNQGHDS	YDPERKLFYM	GINHICMDWE
451	PFMLPYRAGQ	FFVGATLNMV	PGPKGDRQNA	EGLGQIKAYD	AITGKFKWEK
501	MERFAVWGGT	LATAGNVVfy	GTLDGFIKAR	HSDTGELLWK	AKLPSGAIGY
551	PVTYTHKGTQ	YVAIYYGVGG	WPGVGLVFDL	QDPTAGLGAV	GAFKKLANYT
601	QMGGGVTVFS	LDGKGPYDDP	NTGEYVAAN		

et *mxoF*' des α -protéobactéries, toutes les souches de rhizobiums présentent un produit PCR d'environ 440 pb dont la séquence présente une certaine similarité avec le gène *mxoF*. Cependant les séquences de ces produits d'amplification présentent un pourcentage d'identité plus élevé avec les deux gènes homologues du gène *mxoF* à savoir, le gène *mxoF*' de *Methylobacterium extorquens* (72% à 80% d'identité d'acides aminés) et le gène *noxP* de *Paracoccus denitrificans* (73% à 82% d'identité d'acides aminés) (tableau 18).

II - 3 - Analyse phylogénétique des séquences *mxoF* et *mxoF*'

Les séquences *mxoF* et *mxoF*' obtenues respectivement pour "*M. nodulans*" ainsi que pour les différentes espèces de rhizobiums ont été alignées avec les séquences disponibles dans Genbank. L'alignement a été réalisé avec ClustalX à partir de 146 acides aminés. L'arbre phylogénétique obtenu par Neighbor-joining (figure 26) montre deux principaux clusters :

- un cluster A, regroupant les séquences *mxoF*' des différentes espèces de rhizobiums avec les séquences *noxP* et *mxoF*' de *Paracoccus denitrificans* et *Methylobacterium extorquens*. Il est à noter que la distribution des séquences obtenues chez les rhizobiums ne suit pas la phylogénie des espèces.

- un cluster B, regroupant uniquement les séquences *mxoF* des bactéries méthylophiles des sous-classes α et β des protéobactéries et la séquence *mxoF* de "*M. nodulans*" ORS 2060. La figure 27 montre l'arbre phylogénétique obtenu à partir des séquences protéiques complètes et confirme la répartition obtenue avec les séquences partielles.

Tableau 18. Identité des fragments amplifiés à l'aide des amorces mxaf1003 et mxar1360 chez les rhizobiums avec les séquences protéiques des gènes *mxaf* et *mxaf'* de *Methylobacterium extorquens* et du gène *xoxF* de *Paracoccus denitrificans*.

Espèces	Taille	% d'identité		
		<i>MxaF</i>	<i>MxaF'</i>	<i>xoxF</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	442 pb	50%	75%	80%
<i>Allorhizobium undicola</i>	431 pb	47%	76%	76%
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	442 pb	49%	72%	78%
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	443 pb	50%	76%	74%
<i>Bradyrhizobium sp.(ORS 1816)</i>	434 pb	48%	75%	75%
<i>Mesorhizobium loti</i>	442 pb	51%	76%	81%
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	455 pb	45%	74%	77%
<i>Rhizobium etli</i>	446 pb	51%	76%	81%
<i>Rhizobium tropici</i>	438 pb	51%	76%	81%
<i>R. leguminosarum bv viciae</i>	444 pb	51%	77%	82%
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	446 pb	51%	77%	82%
<i>Sinorhizobium fredii</i>	442 pb	50%	80%	79%
<i>Sinorhizobium medicae</i>	443 pb	51%	76%	80%
<i>Sinorhizobium terangae</i>	446 pb	43%	72%	73%

P. den., *Paracoccus denitrificans* ; *M. ex.*, *Methylobacterium extorquens*.

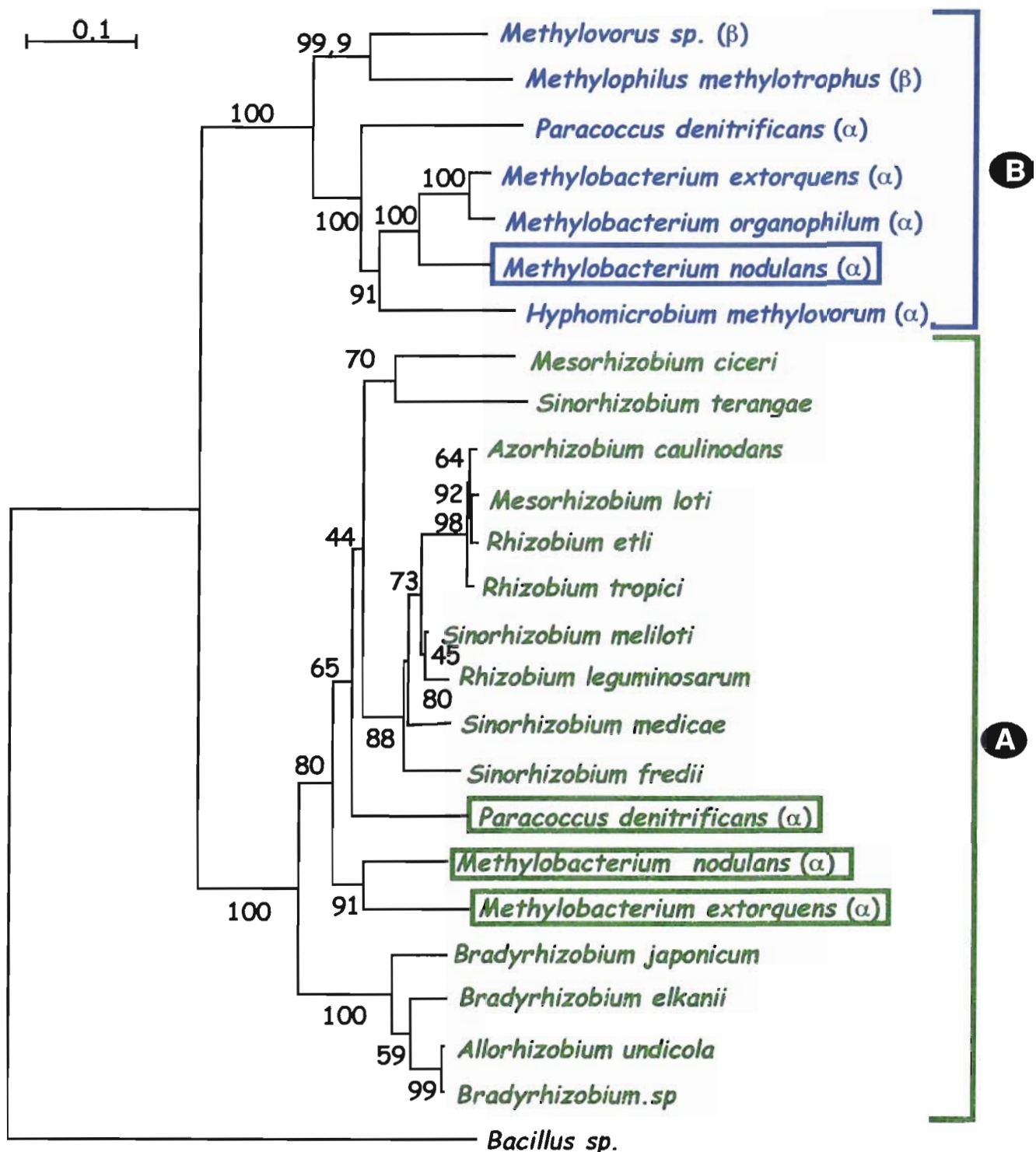


Figure 26. Arbre phylogénétique basé sur les séquences d'environ 146 aminoacides du gène *mxoF* et des gènes homologues identifiés chez les différentes espèces de rhizobiums construit selon la méthode Neighbor-joining. Les valeurs de Bootstrap sont exprimées en % pour 1000 répétitions. Le cluster B regroupe uniquement les gènes *mxoF* alors que le cluster A contient les gènes obtenus chez les rhizobiums ainsi que le gène *xoxF* de *Paracoccus denitrificans* et le gène *mxoF* de *Methylobacterium extorquens*. α, membres des α-protéobactéries ; β, membres des β-protéobactéries.

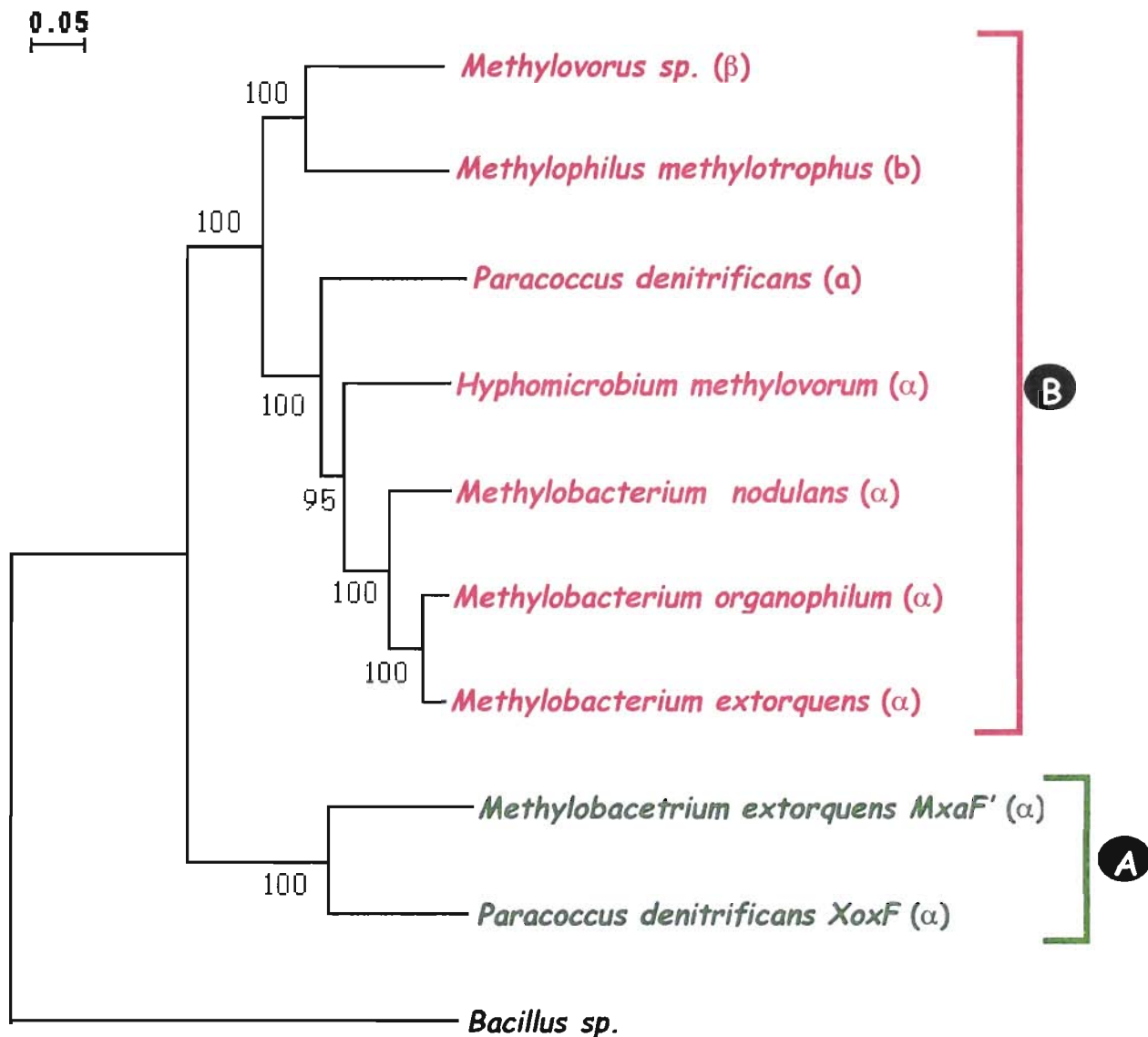


Figure 27. Arbre phylogénétique basé sur les séquences protéiques complètes des gènes *mxaf*, *mxaf'* et *xoxF'* des bactéries methylotrophes construit selon la méthode Neighbor-joining. les valeurs de bootstrap sont exprimées en % pour 1000 répétitions. *Bacillus sp.* a été utilisé pour enraciner l'arbre.

II - 4 - Etude de la méthylotrophie

A - L'oxydation du méthanol

Afin de vérifier les propriétés méthylotrophes (caractère fonctionnel des gènes *mxoF*) des "*Methylobacterium*" isolés de *Crotalaria sp.*, nous avons testé leur aptitude à croître sur le milieu M72 contenant du méthanol 50 mM comme seule source de carbone. La croissance a été comparée avec celle des *Bradyrhizobium sp. (Crotalaria)* et de *Methylobacterium extorquens* (LMG 4250).

Aucune croissance n'a été observée avec les souches de *Bradyrhizobium sp. (Crotalaria)* au bout de 10 jours de culture. Par contre toutes les souches de "*Methylobacterium*" de *Crotalaria sp.* présentent une aptitude à croître dans le milieu de culture supplémenté de méthanol à 50 mM avec des temps de génération variables selon les souches. Le dosage du méthanol dans les cultures d'ORS 2060 et *Bradyrhizobium sp. (Crotalaria)* ORS 1810 (figure 28) confirme bien que le méthanol est utilisé comme source de carbone par ORS 2060.

La souche modèle ORS 2060 (figure 28) et la souche ORS 1917 (9 h de temps de génération) présentent une croissance semblable à celle de *Methylobacterium extorquens* (LMG 4250). Nous avons également observé des taux de croissance similaires sur des substrats pluricarbonés (pyruvate 5 mM et succinate 10 mM). En outre la souche ORS 2060 est capable de pousser jusqu'à une concentration de 1 M de méthanol (figure 29).

Afin de vérifier si la méthylotrophie est un caractère spécifique à "*Methylobacterium nodulans*" ou bien un caractère que l'on pouvait retrouver chez différentes espèces de rhizobiums, nous avons testé l'aptitude de *Sinorhizobium meliloti*, *S. medicae*, *S. fredii*, *S. terangae*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *R. etli*, *R. tropici*, *Mesorhizobium ciceri*, *M. loti*,

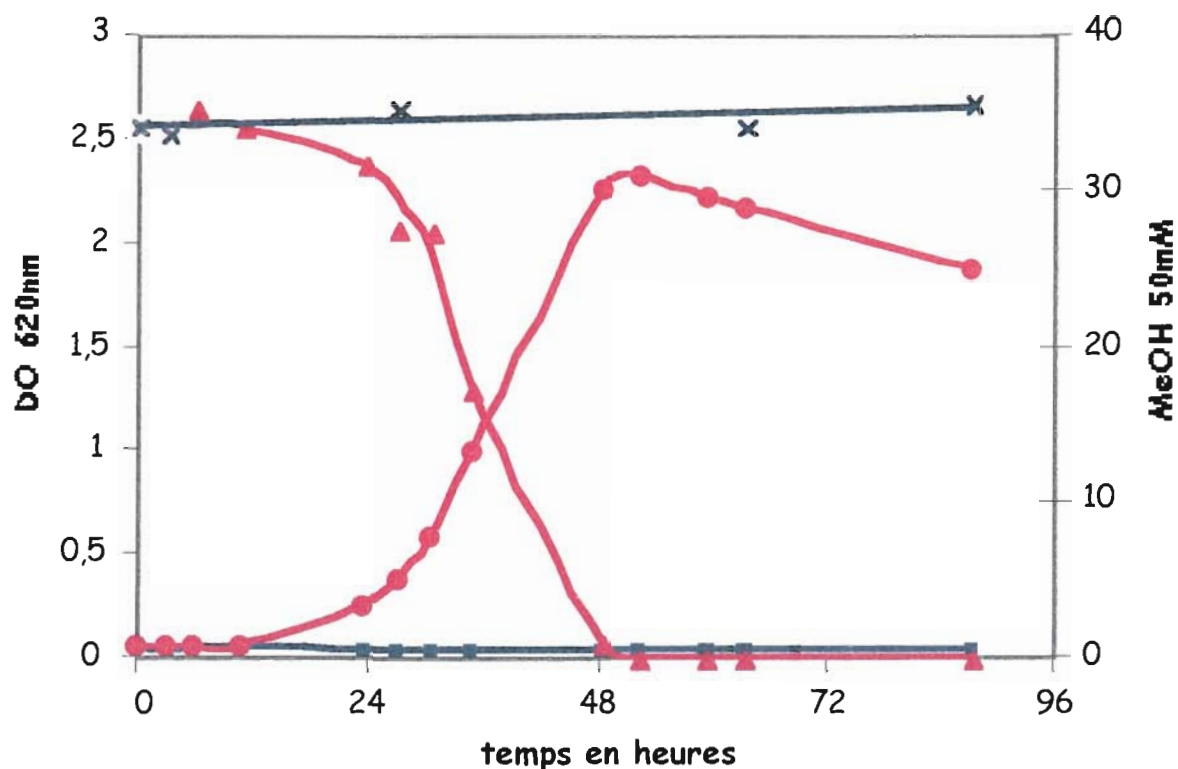


Figure 28. Croissance de "*Methylobacterium nodulans*" ORS 2060 sur du milieu M72 contenant du méthanol 50 mM. *Bradyrhizobium* sp. ORS 1810 isolée de *Crotalaria lathyroides* a été utilisé comme témoin.

- Croissance de ORS 2060
 —×— Dosage du méthanol dans la culture de ORS 1810
- Croissance de ORS 1810
 —▲— Dosage du méthanol dans la culture de ORS 2060

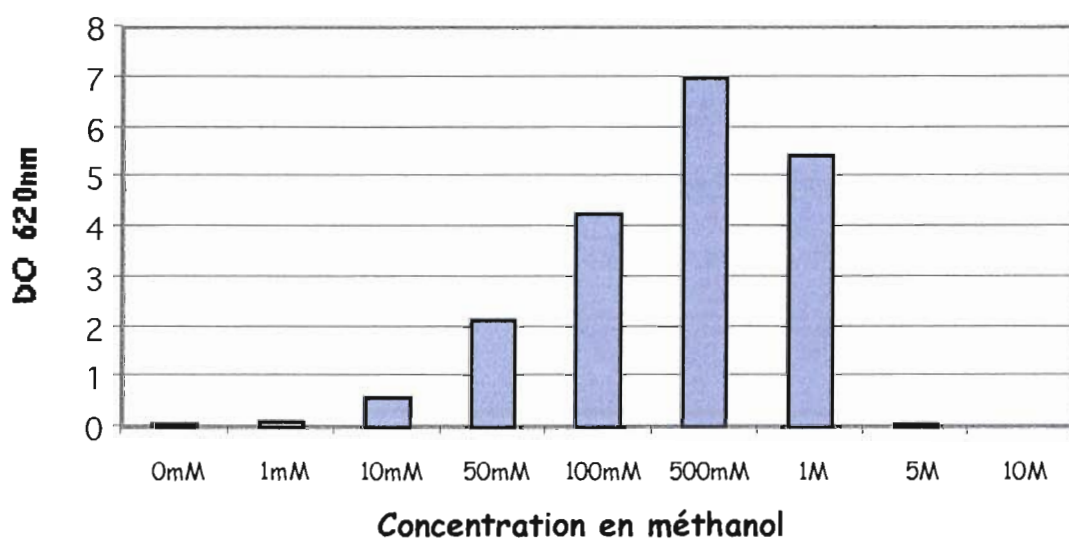


Figure 29. Croissance de "*Methylobacterium nodulans*" ORS 2060 après 72 heures de culture sur le milieu M72 contenant comme seule source de carbone du méthanol à différentes concentrations.

Bradyrhizobium japonicum, *B. elkanii*, *Allorhizobium undicola* et *Azorhizobium caulinodans* à utiliser le méthanol comme seule source de carbone.

Aucune croissance de ces souches de rhizobiums n'a été observée au bout de six jours de culture sur milieu M72 avec du méthanol à 50 mM. Par contre la souche de rhizobium 4-46 isolée de *Lotononis bainesii* et qui sur la base de l'ADNr 16S appartient au groupe *Methylobacterium* est capable de pousser sur le même milieu mais avec un temps de génération plus long (18 heures) que celui de "*Methylobacterium nodulans*" ORS 2060.

B - Utilisation de différents substrats carbonés

Les bactéries méthylotrophes facultatifs comme *Methylobacterium*, sont caractérisées par leur capacité à métaboliser des composés en C_1 ainsi que de nombreux substrats pluricarbonés. Nous avons ainsi testé l'aptitude de "*M. nodulans*" ORS 2060 et de la souche 4-46 à utiliser un certain nombre de substrats aussi bien monocarbonés que pluricarbonés.

- Les substrats monocarbonés

En plus du méthanol 50 mM, les souches ORS 2060 et 4-46 sont capables de pousser sur du formaldéhyde (HCHO) 1 mM, et formate (HCOOH) 10 mM comme substrat monocarboné. Par contre, aucune des deux souches n'a montré une croissance sur méthylamine (CH_3NH_2) 10 mM (tableau 19). Nous avons en outre observé que "*M. nodulans*" ORS 2060 avait des temps de génération 2 à 3 fois inférieurs à ceux de 4-46 lors des cultures sur les composés en C_1 .

- Les substrats pluricarbonés

Sur les substrats à plusieurs carbones, "*M. nodulans*" ORS 2060 semble être beaucoup plus sélectif que la souche 4-46.

Tableau 19. Assimilation des composés carbonés par "*Méthylobacterium nodulans*" et la souche de *Lotononis bainesii* 4-46. +, Croissance ; + (L) Croissance très faible ; -, Pas de croissance.

Substrats carbonés	<i>M. nodulans</i> (ORS 2060)	4-46
<u>Substrats monocarbonés</u>		
Méthanol 50 mM	+	+
Formate 10 mM	+	+ (L)
Formaldéhyde 1 mM	+	+
Méthylamine 10 mM	-	-
<u>Substrats pluri-carbonés</u>		
Ethanol 50 mM	+	+
Pyruvate 5 mM	+	+
Succinate 10 mM	+	+ (L)
Glutamate 10 mM	+	+
Arabinose 10 mM	+ (L)	-
Citrate 5 mM	-	-
Glucose 10 mM	-	+ (L)
Fructose 10 mM	-	+ (L)
Galactose 10 mM	-	+ (L)
Saccharose 10 mM	-	+ (L)
Lactose 10 mM	-	+ (L)

DO 620nm

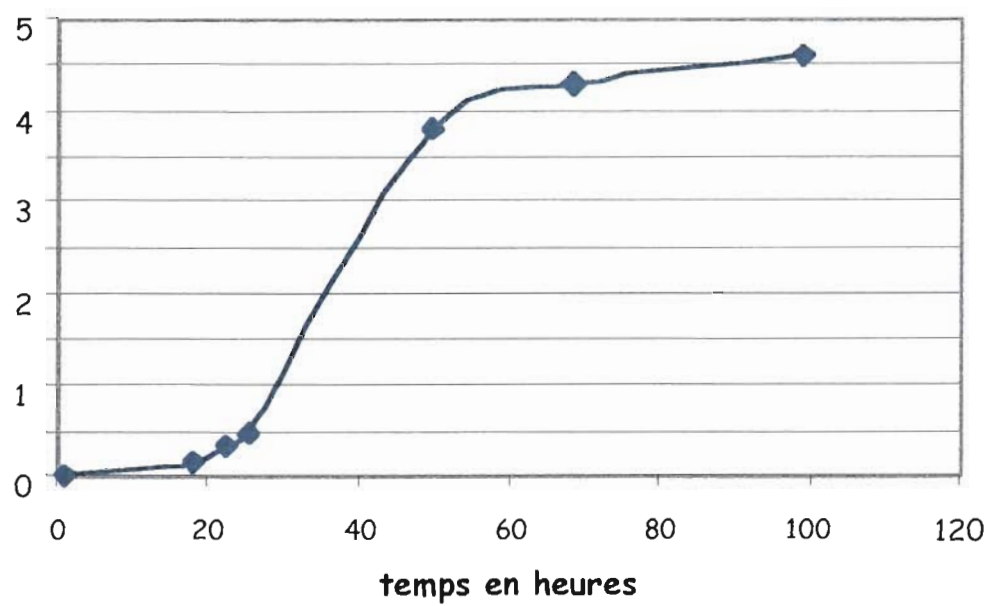


Figure 30. Croissance de "*Methylobacterium nodulans*" ORS 2060 sur milieu M72 contenant comme seule source de carbone de l'éthanol 50 mM.

En effet, si elle est capable de très bien pousser sur certains substrats comme l'éthanol (figure 30 et tableau 19), elle ne présente aucune croissance sur d'autres substrats (citrate, glucose, fructose, galactose, saccharose, lactose). La souche 4-46 quant à elle utilise une plus large gamme de substrats pluricarbonés, mais sa croissance reste très faible.

II - 5 - Etudes des propriétés symbiotiques chez *Methylobacterium*

Bien que de nombreuses études aient mis en évidence l'association PPFM-Plantes, aucun cas de symbiose fixatrice d'azote n'avait été décrit jusqu'à ce jour. La mise en évidence de l'association symbiotique "*M. nodulans*"-*Crotalaria*, nous a donc incité à chercher si le caractère symbiotique pouvait être retrouvé chez différentes espèces de *Methylobacterium*.

A - Tests de nodulation

Les souches représentatives des différentes espèces de *Methylobacterium* (*M. extorquens*, *M. organophilum*, *M. rhodesianum*, *M. rhodinum*, *M. mesophilicum*, *M. zatmanii*, *M. radiotolerans* et *M. sp*) ont été testées pour leur aptitude à induire la formation de nodules sur les espèces de crotalaires appartenant aux deux groupes d'inoculation croisés définis ainsi que sur *Aeschynomene sensitiva* connue pour son association avec les *Bradyrhizobium* photosynthétiques (tableau 20). Aucune souche de *Methylobacterium*, à l'exception de "*M. nodulans*" (ORS 2060) n'a induit la formation de nodules après 5 semaines d'inoculation. Contrairement à "*M. nodulans*", les deux souches de *Lotononis bainesii* 4-46 et 4-144 induisent la formation de nodules sur l'ensemble des crotalaires des deux groupes testées. Cependant, leur association avec *C. perrottetii* utilisée ici comme représentant du groupe des crotalaires spécifiques ne produit que des nodules non fixateurs d'azote.

Tableau 20. Tests de nodulation chez les différentes espèces de *Methylobacterium*.

C., *Crotalaria* ; *A.*, *Aeschynomene* ; *M.*, *Methylobacterium* ; *B.*, *Bradyrhizobium* ;

E, nodules efficients ; I, nodules non efficients ; -, pas de nodules ; nt, non testé

Souches	<i>A. sensitiva</i>	<i>C. goreensis</i>	<i>C. comosa</i>	<i>C. ochroleuca</i>	<i>C. perrottetii</i>
<i>M. extorquens</i> (LMG 4250)	-	-	-	-	-
<i>M. organophilum</i> (LMG 6083)	-	-	-	-	-
<i>M. rhodinum</i> (LMG 2275)	-	-	-	-	-
<i>M. rhodesianum</i> (LMG 6086)	-	-	-	-	-
<i>M. mesophilicum</i> (LMG 5275)	-	-	-	-	-
<i>M. radiotolerans</i> (LMG 2269)	-	-	-	-	-
<i>M. zatmanii</i> (LMG 6087)	-	-	-	-	-
<i>M. sp.</i> (LMG 6378)	-	-	-	-	-
<i>M. sp.</i> (LMG 6085)	-	-	-	-	-
<i>M. sp.</i> (LMG 6380)	-	-	-	-	-
<i>M. nodulans</i> (ORS 2060)	nt	-	-	-	E
<i>M. sp.</i> (<i>C. perrottetii</i>) (ORS 1924)	nt	-	-	-	E
<i>B. sp.</i> (<i>C. comosa</i>) (ORS 1929)	nt	E	E	E	-
4-46 (<i>Lotononis bainesii</i>)	-	E	E	E	I
4-144 (<i>Lotononis bainesii</i>)	-	E	E	E	I

B - Isolement des gènes de nodulation

L'absence de nodulation sur les plantes testées n'étant pas un résultat suffisant pour conclure du caractère non symbiotique des souches de *Methylobacterium*, nous avons cherché par PCR la présence des gènes de nodulation, notamment le gène *nodA* qui est un gène commun à tous les rhizobiums. Pour cela deux couples d'amorces dégénérées correspondant à des régions consensus (*nodAfbrady/nodArbrady* et *nodA1f/nodAB1r*) ont été utilisés. Aucun produit d'amplification n'a été obtenu dans les deux cas pour toutes les souches de *Methylobacterium* testées. Ce résultat en accord avec les tests de nodulation suggère que la fonction symbiotique n'est pas un caractère commun au genre *Methylobacterium* mais plutôt spécifique à "*M. nodulans*".

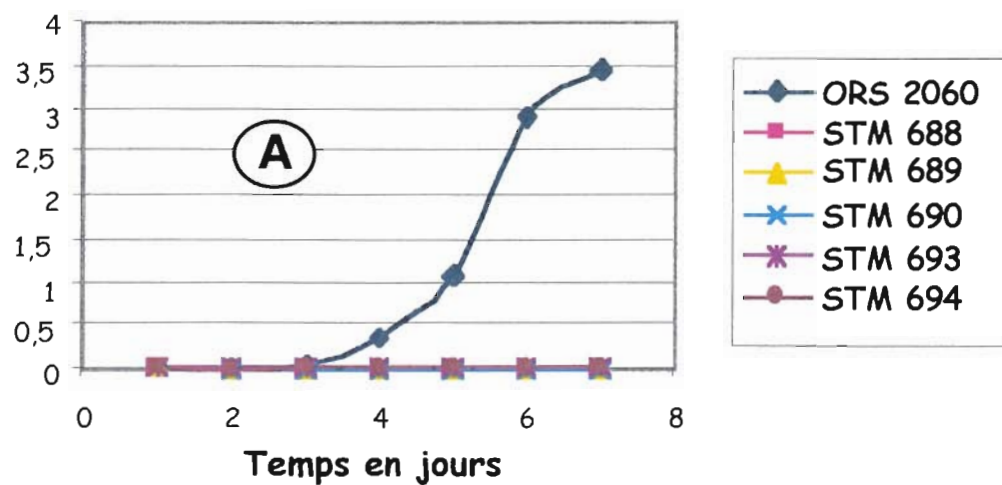
II - 6 - Etude du rôle de la méthylotrophie dans la symbiose.

A - Construction d'un mutant non méthylotrophe

Etant donnée la spécificité de l'association symbiotique "*M. nodulans*"-*Crotalaria*, et le caractère méthylotrophe unique de "*M. nodulans*" par rapport aux autres rhizobiums, nous avons cherché à savoir si cette propriété méthylotrophe jouait un rôle durant l'interaction symbiotique. En effet, certaines espèces de *Crotalaria* sont connues pour produire des alcaloïdes toxiques pour les animaux, les insectes ou les nématodes. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le caractère méthylotrophe de "*M. nodulans*" pourrait intervenir dans la dégradation de ces composés toxiques et ainsi induire la formation de nodules sur ces plantes.

Pour déterminer un rôle éventuel de la méthylotrophie, nous avons essayé d'obtenir des mutants non méthylotrophes. Une première stratégie a consisté à disrupter le gène *mxoF* à l'aide d'une cassette contenant le gène rapporteur *LacZ* et la résistance à la kanamycine. Pour cela, nous avons réalisé une

DO 620nm



DO 620nm

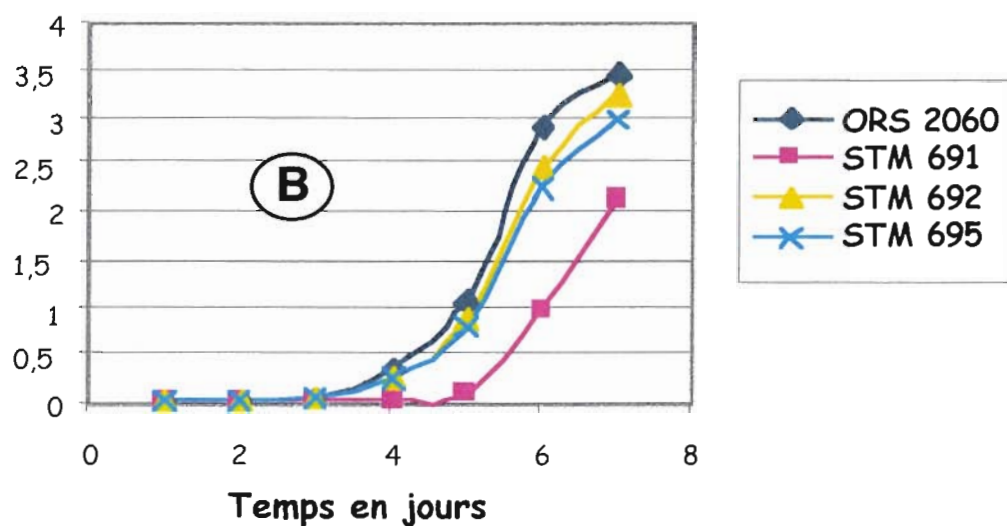


Figure 31. Tests de croissance des différents mutants obtenus sur alcool allylique sur le milieu M72 contenant du méthanol 10 ml/l : A, mutants méthanol⁻ ; B, isolats qui ont conservés leurs propriétés méthylotrophes.

construction dans *E. coli* ou le gène *mxoF* a été interrompu par délétion d'un fragment SalI de 900 pb et insertion de la cassette pKOK5.

Cette construction a été ensuite clonée dans le plasmide pJQ200mp18 portant le gène de résistance à la gentamycine et le gène suicide *SacB*. Le plasmide ainsi obtenu a été introduit par électroporation dans *E. coli* S17.1 (STM 584). Après conjugaison entre STM 584 et ORS 2060, les colonies poussant sur milieu YMA contenant de la kanamycine, de l'acide nalidixique et du X-Gal sont repiquées sur milieu YMA contenant du saccharose et de la kanamycine. Cependant, aucune pression de sélection n'a été induite par l'ajout de saccharose à 5% et 7%, suggérant que le gène suicide *SacB*, utilisé ici pour sélectionner les bactéries ayant subi un événement de double crossing-over, ne peut être utilisé chez ORS 2060.

Aucun recombinant n'ayant malheureusement pu être isolé par cette méthode, nous avons alors suivi une autre stratégie en additionnant de l'alcool allylique au milieu de culture. L'alcool allylique est un substrat qui, oxydé par la MDH, se transforme en un composé toxique pour les cellules, l'aldéhyde acrylique ou acroléine (Nunn et Lidstrom, 1986a, 1986b). Ainsi l'ajout de ce substrat dans le milieu de culture permet de sélectionner les mutants spontanés ne poussant pas sur méthanol. Cette deuxième stratégie nous a permis d'isoler 10 mutants spontanés méthanol- (STM 686 à STM 695). Ces mutants ont été testés sur méthanol, puis inoculés à de jeunes plants de *C. perrottetii* pour suivre la nodulation.

B - Effet de la méthylotrophie sur la symbiose

Après sept jours de culture, aucune croissance sur méthanol n'a été observée pour 7 mutants sur 10 (figure 31a), alors que les isolats STM 691, STM 692 et STM 695 conservent leur aptitude à croître sur le méthanol (figure 31b).

Après cinq semaines de culture, les plantes inoculées avec les mutants spontanés méthylotrophes⁻ présentaient toutes des nodules semblables à ceux obtenus avec la souche sauvage ORS 2060. Aucun effet sur le délai d'apparition des nodules, le nombre de nodules ou l'effectivité de la nodulation n'a été observé pour tous les mutants testés.

III - DISCUSSION

Les espèces de rhizobiums décrites jusqu'à présent appartiennent à trois branches phylogénétiques distinctes de la sous-classe des α -protéobactéries qu'elles partagent avec des bactéries non symbiotiques pathogènes comme *Agrobacterium* pour les plantes et *Afipia* pour l'homme et les animaux. La mise en évidence d'une quatrième branche phylogénétique de rhizobiums constituée par des bactéries du genre *Methylobacterium* confirme et élargit l'origine polyphylétique des rhizobiums (Young et Haukka, 1996).

Cependant, étant donnée la position taxonomique de la souche ORS 2060 dans le groupe des *Methylobacterium*, nous avons cherché à savoir si les souches spécifiques de *Crotalaria* étaient méthylotrophes comme l'ensemble des espèces qui composent le genre *Methylobacterium*. Nous avons ainsi pu mettre en évidence par PCR puis clonage et séquençage, la présence du gène *mxoF* uniquement chez les souches spécifiques de *Crotalaria*. Nous avons ensuite vérifié si ce gène *mxoF* était spécifique à "*M. nodulans*" ou commun à tous les rhizobiums. Nos résultats ont montré que ce gène n'était pas présent chez les rhizobiums. Par contre, nous avons mis en évidence chez l'ensemble des souches de rhizobiums testées, la présence d'un gène proche des gènes *mxoF* ou *xoxF* décrits chez certaines bactéries méthylotrophes comme *M. extorquens* ou *Paracoccus denitrificans*. Ces deux gènes coderaient pour une deshydrogénase de fonction inconnue (Harms *et al.*, 1996).

Outre le positionnement taxonomique et la présence du gène *mxoF*, nous avons également démontré que "*M. nodulans*" ORS 2060 ainsi que les différentes souches spécifiques de *Crotalaria* sont capables de dégrader des composés en C₁ (Méthanol). Ce caractère méthylotrophe est unique à "*M. nodulans*". En effet, aucune des espèces de rhizobiums utilisées dans cette étude n'a montré une aptitude à pousser sur des substrats monocarbonés.

Les bactéries du genre *Methylobacterium* qui sont parfois associées aux plantes notamment au niveau des cultures cellulaires ou des surfaces foliaires (Basile *et al.*, 1969 ; Bridges, 1976 ; Holland, 1997) sont des méthylotrophes facultatifs, rencontrées dans tous les milieux riches en composés monocarbonés, sol, air, eau douce, milieux marins, poussières, mais également dans les piscines, en milieux hospitaliers où elles présentent très souvent une résistance au chlore (Lidstrom, 1992). Le caractère ubiquiste de ces bactéries et la capacité de "*M. nodulans*" à former des nodules sur les racines de *Crotalaria sp.* nous a incité à chercher si l'aptitude à former des nodules sur les racines des légumineuses n'était pas une propriété commune à toutes les espèces de *Methylobacterium*.

En combinant les deux stratégies différentes (amplification du gène *nodA* et tests de nodulation sur différentes espèces de *Crotalaria*) nous n'avons pu mettre en évidence le caractère symbiotique des différentes espèces de *Methylobacterium*. Ces résultats semblent montrer que l'association symbiotique avec les légumineuses est un caractère spécifique à "*M. nodulans*" qui serait ainsi la première espèce de *Methylobacterium* symbiotique des légumineuses.

Le caractère très spécifique et apparemment unique de l'interaction symbiotique "*M. nodulans*"-*Crotalaria*, nous a amené à chercher si la capacité méthylotrophe de "*M. nodulans*" jouait un rôle dans l'interaction. En effet, certaines espèces de *Crotalaria* sont connues pour produire des alcaloïdes toxiques (Polhill, 1982 ; Barri *et al.*, 1984 ; Silva *et al.*, 1989a, 1989b ; Mkiwa *et al.*, 1994 ; Prakash *et al.*, 1995). Le caractère méthylotrophe de *Methylobacterium nodulans* pourrait permettre la détoxification de ces composés. Cela pourrait expliquer sa survie dans la rhizosphère de certaines crotalaires et sa capacité à induire la formation de nodules sur les racines de ces dernières. Notre stratégie était d'une part d'inactiver le gène *mxoF* et de voir

l'effet sur la symbiose, et d'autre part de suivre son expression pendant les différentes étapes de la symbiose.

Pour cela nous avons choisi de disrupter le gène *mxoF* à l'aide du gène rapporteur *LacZ*, cependant cette stratégie n'a pas fonctionné. Nous avons alors utilisé des mutants spontanés obtenus sur alcool allylique pour suivre l'effet de la méthylotrophie sur la symbiose. Les tests de nodulation avec ces mutants spontanés suggèrent que la propriété méthylotrophe n'intervient pas dans l'interaction entre "*M. nodulans*" et *Crotalaria*. Cependant il est important de noter que cette absence d'effet pourrait être liée à la dose d'inoculum (10^8 bactéries) utilisée dans nos tests. En effet, sur le nombre très important de bactéries inoculées, certaines auraient pu survivre et induire une nodulation malgré l'excrétion de substances toxiques par les racines. Des tests de nodulation à des concentrations d'inoculum beaucoup plus faibles se rapprochant plus des conditions naturelles permettraient de mieux répondre à cette question du rôle de la méthylotrophie sur la symbiose.

Par ailleurs, l'utilisation des mutants spontanés ne permet pas de suivre l'expression des gènes de la méthylotrophie pendant l'interaction symbiotique. Pour cette raison, il nous paraît indispensable à l'avenir de trouver une autre stratégie de marquage du gène *mxoF* pour déterminer si la MDH est exprimée pendant la symbiose et d'évaluer son rôle éventuel dans la très spécifique interaction "*M. nodulans*"-*Crotalaria*.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les petites légumineuses tropicales spontanées ont longtemps été considérées comme de simples mauvaises herbes, sans grand intérêt pour l'agriculture des pays du Sud, même si certaines d'entre elles étaient depuis longtemps connues pour leur qualités fourragères. Grâce à leur capacité fixatrice d'azote, ces légumineuses sauvages, caractérisées par une grande diversité en genres et espèces, jouent cependant un rôle majeur dans le maintien de la fertilité des sols, et représentent sans doute un des principaux facteurs d'amélioration du bilan azoté du sol dans les jachères. Ce système traditionnel de culture, autrefois largement répandu en Afrique, étant particulièrement menacé par la surexploitation des terres agricoles due à la pression démographique, il nous est apparu intéressant de faire un bilan de la diversité des rhizobium tropicaux nodulant ces petites légumineuses spontanées.

Dans le premier chapitre de cette thèse, nous avons donc commencé par isoler une large collection de souches de rhizobium à croissance lente (*Bradyrhizobium*) associées aux petites légumineuses de jachère du Sénégal, et les avons caractérisées taxonomiquement. Nous avons pour cela utilisé deux méthodes de caractérisation (SDS-PAGE et ARDRA) afin de déterminer la position taxonomique de ces souches.

Les principaux résultats de cette étude montrent :

- Une grande diversité des souches isolées des petites légumineuses, qui forment cependant plusieurs groupes phylogénétiques au sein du genre *Bradyrhizobium*. En effet, parmi les sept clusters définis par la méthode ARDRA, les nouveaux isolats se retrouvent dans cinq groupes phylogénétiques distincts à l'intérieur du genre *Bradyrhizobium* et quatre de ces groupes correspondent aux groupes de *Bradyrhizobium* déjà décrits par Molouba *et al.* (1999)

- Une absence de concordance entre les groupes obtenus avec les deux méthodes utilisées et un manque de relations entre la plante d'isolement des souches, leur origine géographique et leur classification par SDS-PAGE.

Nous avons ainsi confirmé, pour les techniques de caractérisation des *Bradyrhizobium*, que la méthode SDS-PAGE, pourtant largement utilisée en taxonomie bactérienne, n'était pas adaptée aux *Bradyrhizobium*, en raison de problèmes de reproductibilité et de la difficulté d'interprétation des profils protéiques. Par contre, la technique ARDRA donne des résultats cohérents qui permettent globalement de distinguer les groupes de *Bradyrhizobium* déjà définis tel que *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii*, et les *Bradyrhizobium* photosynthétiques.

Ce travail a été poursuivi par l'utilisation de plusieurs techniques génomiques, qui permettent d'analyser de façon reproductible et rapide un grand nombre de souches (Doignon-Bourcier *et al.* 2000). Ainsi les groupements obtenus par AFLP et PCR-RFLP de l'IGS sont cohérents et reflètent les relations entre souches en permettant de prédire les espèces.

Outre leur pouvoir discriminatif élevé, ces méthodes donnent des résultats concordants avec l'hybridation ADN/ADN qui reste le critère déterminant de la classification en espèces (Willems *et al.*, 2001 *in press*). Cependant la mise en œuvre de la technique AFLP est assez lourde et laborieuse, les techniques de PCR-RFLP semblent être les mieux adaptées pour la classification initiale de nouvelles souches de *Bradyrhizobium*. Elles permettent de déterminer la diversité génétique des souches étudiées et de choisir ensuite les souches représentatives des différents groupes pour définir leur position taxonomique, par comparaison des séquences totales de l'ADNr 16S ou par des hybridations ADN/ADN dans le cas des souches très proches.

Les *Bradyrhizobium* présentent généralement la particularité d'avoir un large spectre d'hôte qui leur permet de fixer efficacement l'azote dans les nodules de différentes espèces de légumineuses tropicales. On a longtemps cru que les légumineuses tropicales dans leur ensemble n'étaient pas spécifiques. Cependant certaines légumineuses tropicales montrent une très forte spécificité avec les souches de *Bradyrhizobium* en n'acceptant que leurs propres souches ou des souches de *Bradyrhizobium* isolées d'un nombre restreint de plantes (Trinick, 1982). Parmi ces légumineuses, on compte les *Centrosema* sp. (Bowen, 1959), *Lotononis bainesii* (Norris, 1958), *Aspalathus linearis* (Staphorst et Strijdom, 1975), *Desmodium* sp. (Diatloff, 1968 ; Diatloff et Luck, 1972), et *Aeschynomene* sp. (Molouba et al., 1999).

Parallèlement à ce premier travail de caractérisation globale des rhizobium tropicaux, nous avons effectué des tests de nodulation sur de nombreuses espèces des petites légumineuses spontanées. Alors que la quasi totalité des petites légumineuses tropicales sont connues pour être nodulées par des *Bradyrhizobium* à large spectre d'hôte, nous avons découvert de façon tout à fait surprenante, que certaines espèces végétales appartenant au genre *Crotalaria*, présentaient une grande spécificité de nodulation et ne formaient pas de nodules avec les *Bradyrhizobium* classiques, mais exclusivement avec des souches à croissance rapide. Dans le deuxième chapitre de cette thèse, nous nous sommes donc particulièrement intéressés au genre *Crotalaria*. Ce genre (33 espèces) constitue avec les genres *Indigofera* (44 espèces) et *Tephrosia* (20 espèces) les légumineuses spontanées les plus communément rencontrées dans les jachères au Sénégal.

Dans ce travail, nous avons ainsi étudié la diversité et les propriétés symbiotiques d'une collection de rhizobiums associés aux espèces du genre *Crotalaria*. Jusqu'à présent les crotalaires étaient considérées comme des

légumineuses non spécifiques, qui forment une association symbiotique avec les *Bradyrhizobium* du groupe "cowpea" (Wilson, 1939, 1944, Allen et Allen, 1981).

Nous avons mis en évidence une très forte spécificité de nodulation chez certaines espèces de crotalaires (*C. podocarpa*, *C. perrottetii* et *C. glaucoides*). Les bactéries associées à ces espèces constituent un groupe très homogène distinct des autres espèces de rhizobiums connues. La caractérisation génotypique et phylogénétique a montré que ces souches appartiennent au genre *Methylobacterium* et constituent une nouvelle espèce que nous avons nommé : "*Methylobacterium nodulans*". Le genre *Methylobacterium* est constitué de bactéries pigmentées en rose, méthylotrophes facultatifs, jusqu'à présent jamais rencontré en association symbiotique avec les légumineuses. Ces bactéries ont la particularité de pouvoir assimiler des composés en C_1 comme seule source de carbone et d'énergie. Les membres du genre *Methylobacterium* sont largement répartis dans la nature, partout où les composés à un carbone sont abondants. Ils vivent également en association avec les plantes, sur les surfaces foliaires et comme contaminant des cultures cellulaires (Corpe et Basile, 1982 ; Holland et Polacco, 1994 ; Holland, 1997).

C'est la première fois qu'une symbiose fixatrice d'azote entre une légumineuse et une bactérie du genre *Methylobacterium* est découverte. Il est cependant possible que d'autres légumineuses que celles appartenant à la tribu des *Crotalarieae* soient également nodulées par des *Methylobacterium*. C'est pourquoi, il serait intéressant à l'avenir de rechercher si, parmi les souches isolées de différentes légumineuses et déjà en collection, il n'existe pas d'autres *Methylobacterium* symbiotiques.

Nous avons également montré que le caractère symbiotique c'est-à-dire la présence des gènes de nodulation, la capacité à induire la formation de nodules et à fixer l'azote n'est pas une propriété commune à toutes espèces de

Methylobacterium. "*M. nodulans*" est donc la première espèce de *Methylobacterium* symbiotique connue à ce jour. Cependant la mise en évidence récente d'un groupe de souches isolées d'*Aspalathus* en Afrique du sud et d'une souche d'*Aeschynomene* (C. Boivin, communication personnelle) qui selon leur ADNr 16S appartiennent au genre *Methylobacterium*, laisse paraître la probable diversité des *Methylobacterium* symbiotiques. Ces derniers pourraient en effet constituer différentes espèces malgré la similarité de leur ADNr 16S. Il faut noter qu'il n'existe pas de définition de l'espèce uniquement basée sur les séquences d'ADNr 16S, car Fox et al., (1992) ont montré que des espèces qui ont divergé récemment ne peuvent pas toujours être séparées par leur séquences d'ADN 16S. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour vérifier l'hypothèse de l'existence de différentes espèces de *Methylobacterium* symbiotiques. Pour cette raison, nous envisageons de faire des études d'hybridation ADN/ADN incluant "*M. nodulans*", les souches de *M. sp.* (Lotononis, 4-144 et 4-46), mais aussi les souches d'*Aspalathus* et la souche d'*Aeschynomene*.

Il serait également intéressant de rechercher les gènes de nodulation chez les différentes espèces de *Methylobacterium* de collection par d'autres techniques comme l'hybridation ou la complémentation dont les résultats sont plus fiables que ceux de la méthode PCR. En effet, l'utilisation de ces techniques a permis la mise en évidence des gènes *nif* (la nitrogénase) chez certaines bactéries méthylotrophes. Cependant il s'agit essentiellement de bactéries méthanotrophes de type II ou de type X appartenant aux genres *Methylosinus*, *Methylocystis* et *Methylococcus* (Whittenbury et al., 1970 ; Toukadarian et Lidstrom, 1984a, 1984b ; Oakley et Murrell, 1988 ; Hanson et Hanson, 1996 ; Hanson et al., 1991 ; Green, 1992 ; Bowman et al., 1993).

La découverte de cette nouvelle association symbiotique *Crotalaria-Methylobacterium* a conduit à des interrogations relatives 1) à la co-évolution entre les crotalaires et les *Methylobacterium*, 2) à la présence du caractère méthylotrophe chez des rhizobium de crotalaires mais aussi chez les autres espèces de rhizobiums, 3) au rôle de la méthylotrophie dans cette nouvelle symbiose.

- *Crotalaria-Methylobacterium* : une Co-évolution ou une adaptation?

Le fait que "*Methylobacterium nodulans*" ne soit associé spécifiquement qu'à certaines espèces de crotalaires reste à expliquer. Nous avons donc recherché si la forte spécificité de cette interaction n'était pas le résultat d'une co-évolution entre les deux partenaires. Chez le partenaire plante, nous avons donc pour cela comparé les clusters phylogénétiques définis par l'analyse de la région ITS des crotalaires avec les deux groupes d'inoculation croisé que nous avons définis. Chez le partenaire bactérien, nous avons également étudié la phylogénie des gènes de nodulation en particulier le gène *nodA* chez les deux groupes de souches isolées des différentes espèces de crotalaires.

A partir de l'analyse phylogénétique des crotalaires, nous avons pu mettre en évidence que les espèces regroupées au niveau d'un même cluster, appartiennent au même groupe d'inoculation, à l'exception d'un groupe qui paraît intermédiaire. D'autre part, chez les bactéries, l'analyse phylogénétique du gène *nodA* a mis en évidence deux clusters correspondant exactement aux deux groupes d'inoculation croisée à savoir le groupe *Bradyrhizobium* et le groupe *Methylobacterium*. Cette analyse phylogénétique du gène *nodA* confirme l'origine monophylétique des gènes *nod* communs. L'absence de gènes *nod* chez les *Methylobacterium* non symbiotiques et les relations phylogénétiques proches entre la protéine NodA des *Bradyrhizobium* et celle de "*M. nodulans*" suggère

que cette dernière espèce aurait acquis ces capacités symbiotiques par un transfert latéral de gènes.

Les crotalaires sont connues pour la production d'alcaloïdes toxiques pour le bétail et pour les insectes. L'association *Methylobacterium-Crotalaria* pourrait s'expliquer par le fait que les *Methylobacterium*, grâce à leur activité méthylotrophe, sont capables de détoxifier les produits exsudés par les racines des crotalaires et de les utiliser comme substrats carbonés. La rhizosphère des crotalaires constituerait ainsi pour les *Methylobacterium* un avantage dans la compétition pour la nodulation. L'extraction et l'analyse des exsudats racinaires des espèces de crotalaires spécifiques sont donc à envisager pour étudier leur nature et voir leur effet sur la croissance des souches de *Methylobacterium* et de *Bradyrhizobium*.

Par ailleurs, l'étude des gènes de nodulation de "*Methylobacterium nodulans*" révèle la présence de gènes tronqués (*nodU* et *nodQ*) ou l'absence de certains gènes (*nodS*, *nodP*), ce qui est généralement dû à des remaniements génétiques comme cela a été observé chez certaines espèces de rhizobiums. Cette réorganisation génétique pourrait affecter la coordination de l'expression des gènes de nodulation, entraînant ainsi la production de facteurs de nodulation atypiques qui seraient à l'origine de la spécificité *Methylobacterium-Crotalaria*. Au vu des résultats, il serait intéressant d'étudier la fonctionnalité des gènes partiels *nodU* et *nodQ* et de vérifier s'il n'existe pas des copies entières de ces deux gènes dans le génome d'ORS 2060. Par ailleurs il serait nécessaire d'une part de surproduire les facteurs Nod d'ORS 2060 pour étudier leur structure, et d'autre part de compléter l'analyse des séquences des gènes de nodulation aux régions environnantes. Enfin, la détermination du caractère plasmidique ou chromosomique des gènes de nodulation chez "*Methylobacterium nodulans*" est à envisager.

"*Methylobacterium nodulans*" : un rhizobium méthylotrophe facultatif ?

Dans le troisième chapitre de cette thèse, nous avons étudié les propriétés méthylotrophes de "*Methylobacterium nodulans*" et de différentes espèces de rhizobiums. Pour cela nous avons d'une part recherché les gènes de la méthylotrophie, et d'autre part testé leur aptitude à utiliser les composés monocarbonés comme source de carbone.

Nous avons mis en évidence chez "*M. nodulans*", la présence du gène *mxoF* qui code pour la grande sous-unité de la méthanol deshydrogénase, enzyme qui intervient dans l'oxydation du méthanol en formaldéhyde chez les bactéries méthylotrophes. Le clonage et le séquençage de ce gène à partir d'une banque d'ADN génomique nous a permis de montrer que ce gène constitue une orf de 1890 pb codant pour une protéine de 629 acides aminés qui présente 88% d'homologie avec les protéines *MxoF* de *Methylobacterium organophilum* et de *Methylobacterium extorquens*. L'analyse phylogénétique montre que le gène *mxoF* de "*M. nodulans*" appartient au même cluster que celui des bactéries méthylotrophes des sous-classes α et β des protéobactéries. Nous avons également vérifié l'état fonctionnel du gène *mxoF* c'est-à-dire le véritable caractère méthylotrophe de "*M. nodulans*" par des tests de croissance sur des substrats monocarbonés. Il ressort des résultats obtenus que "*M. nodulans*" comme l'ensemble des *Methylobacterium* est méthylotrophe facultatif. En effet elle est capable d'utiliser aussi bien des composés pluricarbonés (pyruvate, succinate, glutamate, arabinose) que des composés à un seul carbone comme le méthanol, le formate ou le formaldéhyde, comme seule source de carbone.

De nombreux travaux ont montré que l'oxydation du méthanol chez *Methylobacterium* est complexe non seulement en termes de nombre de gènes requis, mais aussi de régulation. Les gènes intervenant dans l'oxydation du méthanol et l'assimilation du formaldéhyde sont regroupés en quatre loci sur le

chromosome de *M. extorquens*, et dans pas moins de sept régions chromosomiques chez *M. organophilum* (Allen et Hanson, 1985, Bastien *et al.*, 1989 ; Machlin et Hanson, 1988 ; Van Spanning *et al.*, 1991 ; Lidstrom *et al.*, 1994 ; Morris *et al.*, 1994, 1995 ; Springer *et al.*, 1995). Dans notre étude, nous avons pu isoler le gène qui code pour la grande sous-unité de la MDH chez "*M. nodulans*", mais pour comprendre le schéma génétique de l'oxydation du méthanol chez cette nouvelle espèce, il est indispensable de poursuivre le séquençage pour isoler tous les gènes impliqués dans la méthylotrophie et de comparer leur organisation et leur régulation aux modèles *M. extorquens* et *M. organophilum*, les deux espèces les plus étudiées.

Dans l'étude de la méthylotrophie, nous avons également inclus plusieurs souches représentant différentes espèces de rhizobiums. Les résultats montrent que les différentes espèces de rhizobiums utilisées dans cette étude ne sont pas méthylotrophes. En effet, elles n'ont pas de gène *mxoF* et sont incapables d'utiliser le méthanol comme seule source de carbone prouvant ainsi que la méthylotrophie n'est pas un caractère commun à tous les rhizobiums mais plutôt spécifique à "*M. nodulans*". Cependant chez l'ensemble des espèces de rhizobiums testées nous avons mis en évidence un gène proche des gènes *mxoF* et *xoxF* décrits chez *M. extorquens* et *Paracoccus denitrificans* et qui coderaient pour une deshydrogénase de fonction inconnue. Le caractère méthylotrophe de "*M. nodulans*", propriété unique chez les rhizobiums pose la question du rôle de la méthylotrophie dans la symbiose *Crotalaria*-"*M. nodulans*". L'inoculation de mutants spontanés non méthylotrophes, qui restent capables de former des nodules fixateurs d'azote sur des jeunes plants de *Crotalaria perrottetii*, semble montrer que la méthylotrophie ne joue pas un rôle important dans l'infection et le développement du nodule dans la symbiose *Crotalaria*-"*M. nodulans*". Cependant, la méthylotrophie pourrait jouer un rôle majeur pour la survie de "*M. nodulans*" dans la rhizosphère des crotalaires. Nous n'avons pas

vérifié cette hypothèse qui aurait demandé d'effectuer des expériences de compétition entre souches méthylotrophes et non méthylotrophes (mutants spontanés). D'autre part, les mutants spontanés n'ont pas permis de suivre l'expression du gène *mxoF* pendant la symbiose. Nous envisageons à l'avenir d'obtenir, par insertion d'un gène rapporteur, des mutants isogéniques qui permettent de mieux définir le rôle de la méthylotrophie dans l'interaction "*M. nodulans*"-*Crotalaria*, en utilisant des vecteurs déjà utilisés dans la mutagenèse des *Methylobacterium* non symbiotiques (Holloway, 1984).

***Methylobacterium*-légumineuse, un potentiel pour la dépollution ?**

Les bactéries méthylotrophes sont connues pour leur capacité à métaboliser divers composés à groupements toxiques et par conséquent jouent un rôle important dans la dégradation des polluants, tels que les hydrocarbures, les pesticides tels que le bromure de méthyle dont les rejets détruisent la couche d'ozone, les composés halogénés, ou encore les composés chlorés qui polluent les nappes d'eau souterraines (Lidstrom et Stirling, 1990 ; Hancock *et al.*, 1998 ; Fogel *et al.*, 1986 ; Kohler-Straub *et al.*, 1986 ; Scholtz *et al.*, 1988). Les *Methylobacterium* se retrouvent en grand nombre dans les sols et les eaux pollués par le trafic automobile, et en particulier aux abords des grands axes routiers. Ils sont en effet capables de dégrader les multiples composés toxiques rejetés par les pots d'échappement des automobiles (Green, 1991).

La découverte de la symbiose *Crotalaria*-*Methylobacterium* ouvre ainsi des perspectives dans l'utilisation des légumineuses à des fins écologiques. Ainsi, l'utilisation de l'association *Methylobacterium*-*Crotalaria*, ou dans le futur d'une autre association *Methylobacterium*-légumineuse tempérée, pour dépolluer les abords des autoroutes ou les milieux urbains est ainsi envisageable. Pour cela, il serait très intéressant tout d'abord de tester au niveau du laboratoire les véritables capacités de dépollution biologique de "*M. nodulans*" afin de

déterminer la nature des composés dégradés, mais également pour sélectionner les souches les plus efficaces à cet effet.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Alazard, D. 1985. Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. Appl. Environ. Microbiol. 50. 732-734.
2. Alfonso, H. A., Angeles Figueiredo, M. D. I., Sanchez, L. M., and Gomez, B. C. 1993. Intoxication due to *Crotalaria retusa* and *C. spectabilis* in chickens and gees. Veterinary & Human Toxicology. 35. 539.
3. Allen, L. N., Olstein, A., Haber, C., and Hanson, R. S. 1984. Genetic and biochemical studies of representative type II methylotrophic bacteria. 236-243. In Microbial growth on C₁ compounds. R. L. Crawford, and Hanson R. S. (Eds). Am. Soc. Microbiol. Press, Washington.
4. Allen, N. L., and Hanson, R. S. 1985. Construction of a broad-host-range cosmid cloning vectors : identification of genes necessary for growth of *Methylobacterium organophilum* xx on methanol. J. Bacteriol. 161. 955-962.
5. Allen, O. N., and Allen, E. K. 1981. The leguminosae, a source book of characteristic, uses and nodulation. the university of Wisconsin Press, Madison, P. 812.
6. Al-taho, N. M., Cornish, A., and Warner, P. J. 1990. Molecular cloning of methanol dehydrogenase structural genes from *Methylosinus trichosporium* OB3b. Curr. Microbiol. 20. 153-157.
7. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215. 403-410.
1. Amann, R., Ludwig, W., and Schleifer, K. H. 1988. β -subunit of ATP-synthase : a useful marker for studying the phylogenetic relationship of bacteria. J. Gen. Microbiol. 134. 2815-2821.
9. Amarger, N., Macheret, V., and Laguerre, G. 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. Int. J. Syst. Bact. 47. 996-1006.
10. Anderson, D. J., and Lidstrom, M. E. 1988. The *moxFG* region encodes four polypeptides in the methanol-oxidizing bacterium *Methylobacterium* sp AM1. J. Bacteriol. 170. 2254-2262.
11. Anderson, D. J., Morris, C. J., Nunn, D. N., Anthony, C., and Lidstrom, M. E. 1990. Nucleotide sequence of the *Methylobacterium extorquens* AM1 *moxF* and *moxJ* genes involved in methanol oxidation. Gene. 90. 173-176.
12. Anderson, D. M., and Mills, D. 1985. The use of transposon mutagenesis in the isolation of nutritional and virulence mutants in two pathovars of *Pseudomonas syringae*. Phytopathology. 75. 104-108.
13. Anthony, C. 1982. the biochemistry of Methylotrophs. Academic Press. London.
14. Anthony, C. 1986. Bacterial oxydation of methane and Methanol. Adv. Microbiol. Physiol. 27. 113-210.

15. Anthony, C. 1991. Assimilation of carbon in methylotrophs. In Biology of methylotrophs. I. A. Goldberg, and Rokem, J. S. (eds). Butherworth-Heinemann, Stoneham, Mass.
16. Arfman, N., Watling, E. M., Clement, W., Van Ousterwijk, R. J., De Vries, G. E., Harder, W., Attwood, M. M., and Dijkhuizen, L. 1989. Methanol metabolism in thermotolerant methylotrophic *Bacillus* strains involving a novel catabolic NAD-dependent methanol dehydrogenase as a key enzyme. Arch. Microbiol. 152. 283-288.
17. Arzt, J., and Mount, M. E. 1999. Hepatotoxicity associated with pyrrolizidine alkaloid (*Crotalaria ssp*) ingestion in horse on Easter Island. Vet. Hum. Toxicology. 41. 96-99.
18. Atkinson, E. M., and Long, S.R. 1992. Homology of *Rhizobium meliloti* NodC to polysaccharide polymerizing enzymes. MPMI 5. 439-442.
19. Atkinson, E. M., Palcic, M. M., Hindsgaul, O., and Long, S. R. 1994. Biosynthesis of *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide Nod factors : NodA is required for and N-acetyltransferase activity. PNAS 91. 8418-8422.
20. Austin, B., and Googfellow, M. 1979. *Pseudomonas mesophilica*, a new species of pink bacteria isolated from leaf surfaces. Int. J. Syst. Bacteriol. 29. 373-378.
21. Austin, B., Googfellow, M., and Dickinson, C. H. 1978. Numerical taxonomy of phylloplane bacteria isolated from *Lolium perenne*. J. Gen. Microbiol. 104. 139-155.
22. Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., Campbell, C. S., and Donoghue, M. J. 1995. The ITS region of the nuclear ribosomal DNA : A valuable source of evidence on angiosperms phylogeny. Ann. Mo. Bot. Gard. 82. 247-277.
23. Barnett, M. J., and Long, S. R. 1990. DNA sequence and translational product of a new nodulation-regulatory locus : SyrM has sequence similarity to NodD protein. J. Bacteriol. 172. 3695-3700.
24. Barrera, L. L., Trujillo, M. E., Goodfellow, M., Garcia, F. J., Hernandez-Lucas, I., Davila, G., Van Berkum, P., and Martinez-Romero, E. 1997. Biodiversity of *Bradyrhizobia* nodulating *Lupinus spp*. Int. J. Syst. Bact. 47. 1086-1091.
25. Barri, M. E., Adam, S. E., and Omer, O. H. 1984. effects of *Crotalaria saltiana* on nubian goats. Vet. Hum. Toxicology. 26. 476-780.
26. Barta, T. M., and Hanson, R. S. 1993. Genetics of methane and methanol oxidizing in Gram-negative methylotrophic bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. 64. 109-120.
27. Basile, D. V., Slade, L. L., and Corpe, W. A. 1969. An association between a bacterium and liverwort, *Scapania nemorosa*. Bull. Torrey Bot. Club. 96. 711-714.

28. Bassalik, C., Janota-Bassalik, L., and Brisou, J. 1960. Etude sur *Flavobacterium extorquens* (ex. *Pseudomonas extorquens*). Ann. Inst. Pasteur. 98. 165-168.
29. Bassalik, K. 1913. Über die verarbeitung der oxalsäure durch *Bacillus extorquens* n. sp. jahrb. Botan. 53. 255-302.
30. Bastien, C., Machlin, S., Zhang, Y., Donaldson, K., and Hanson, R. S. 1989. Organization of genes required for the oxidation of methanol to formaldehyde in three type II methylotrophs. Appl. environ. Microbiol. 55. 3124-3130.
31. Bec-Ferte, M. P., Krishnan, H. B., Prome, D., Savagnac, A., Pueppke, S. G., and Prome, J. C. 1994. Structures of nodulation factors from the nitrogen fixing soybean symbiont *Rhizobium fredii* USDA257. Biochemistry. 33. 11782-11788.
32. Bec-Ferte, M. P., Krishnan, H. B., Savagnac, A., Pueppke, S. G., and Prome, J. C. 1996. *Rhizobium fredii* synthesizes an array of lipooligosaccharides, including a novel compound with glucose inserted into the backbone of the molecule. FEBS Letters. 393. 273-279.
33. Becker, M., and Johnson, D. E. 1999. The role of legume fallows in intensified upland rice-based systems of West Africa. Nutrient Cycling in Agroecosystems. 53. 71-81.
34. Beijerinck, M. 1888. Die Bacterien der papilionaceenknöllchen. Botanische Zeitung. 46. 797-804.
35. Bena, G., Jubier, M. F., Olivieri, I., and Lejeune, B. 1998a. Ribosomal external and internal transcribed spacers : Combined use in the phylogenetic analysis of *Medicago* (Leguminosae). J. Mol. Evol. 46. 299-306.
36. Bena, G., Lejeune, B., Prosperi, J. M., and Olivieri, I. 1998b. Molecular phylogenetic approach for studying life-history evolution : the ambiguous example of the genus *Medicago* L. Proc. R. Soc. Lond. [Biol]. 265. 1141-1151.
37. Bena, G., Prosperi, J. M., Lejeune, B., and Olivieri, I. 1998c. Evolution of annual species of the genus *Medicago* : A molecular phylogenetic approach. Mol. Phylogenet. Evol. 9. 552-559.
38. Benson, D. R., and Silvester, W. B. 1993. Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. Microbiol. Reviews. 57. 293-319.
39. Berhaut, J. 1976. Flore illustrée du Sénégal. Dicotylédones. Tome V. Légumineuses, Papilionacées. 658pp.
40. Beringer, J. E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. 84. 188-198.
41. Bhat, J. V., and Barker, H. A. 1948. Studies on a new oxalate decomposing bacterium, *Vibrio oxalaticus*. J. Bacteriol. 55. 359-368.

42. Bingen, E. H., Denamur, E., and Elion, J. 1994. Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. *Clin. Microbiol. Rev.* 7. 311-327.
43. Biville, F., Turlin, E., and Gasser, F. 1989. Cloning and genetic analysis of six pyrroloquinoline quinone biosynthesis genes in *Methylobacterium organophilum* DSM 760. *J. Gen. Microbiol.* 135. 2917-2929.
44. Bohanon, M. J., Bastien, C. A., Yoshida, R., and Hanson, R. S. 1987. Isolation of auxotrophic mutants of *Methylophilus methylotrophus* by modified - marker exchange. *Appl. Environ. Microbiol.* 54. 271-273.
45. Boivin, C., and Giraud, E. 1999. Molecular symbiotic characterization of rhizobia - Toward a polyphasic approach using Nod factors and nod genes ? 295-299. Highlights of nitrogen fixation research. Martinez, and Hernandez. Kluwer.
46. Boivin, C., Ndoye, I., Lortet, G., Ndiaye, A., De Lajudie, P., and Dreyfus, B. 1997. 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. Environ. Microbiol.* 63. 1040-1047.
47. Boone, C. M., Olsthoon, M. M. A., Dakora, F. D., Spaink, H. P., and Thomas-Oates, J. E. 1999. Structural characterization of lipo-chitin oligosaccharides isolated from *Bradyrhizobium aspalati*, microsymbionts of commercially important south African legumes. *Carbohydrate Research.* 317. 155-163.
48. Bottomley, P. J., Cheng, H. H., and Strain, S. R. 1994. Genetic structure and symbiotic characteristics of a *Bradyrhizobium* population recovered from a pasture soil. *Appl. environ. Microbiol.* 60. 1754-1761.
49. Bowen, G. B. 1959. Specificity and nitrogen fixation in *Rhizobium* symbiosis of *Centrosema pubescens* Benth. *J. Agric. Sci.* 16. 267-281.
50. Bowman, J. P., Sly, L. I., Nichols, P. D., and Hayward, A. C. 1993. Revised taxonomy of the methanotrophs : description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus*, and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the group I methanotrophs. *Int. J. Bacteriol.* 43. 735-753.
51. Bratina, B. J., Brusseau, G. A., and Hanson, R. S. 1992. Use of 16S rRNA analysis to investigate phylogeny of methylotrophic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42. 645-648.
52. Brenner, D. J., Fanning, G. R., Rake, A. V., and Johnson, K. E. 1969. Batch procedure for thermal elution of DNA from hydroxyapatite. *Analytical Biochemistry.* 28. 447-459.

53. Bridges, J. 1976. An analysis of selected environmental factors which influence growth and development of the liverwort *Scapania nemorosa* (L.) DUM with an emphasis on its in vitro relationship to the bacterium *Pseudomonas extorquens* (Bassalik). Columbia University Library.
54. Brusseau, G. A., Bulygina, E., and Hanson, R. S. 1994. Phylogenetic analysis and development of probes for differentiating methylotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 60. 626-636.
55. Burton, J. C. 1952. Host specificities among certain plants in the cowpea cross-inoculation group. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 16. 356-358.
56. Caetano-Anolles, G., Bassam, B. J., and Gresshoff, P. M. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology.* 9. 553-557.
57. Cardenas, L. D., J., Quinto, C., Lopez-Lara, I. M., Lugtenberg, B. J. J., Spaink, H.P., Rademaker, G. J., Haverkamp, J. and Thomas-Oates, J. E. 1995. Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant mol. Biol.* 29. 453-464.
58. 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 I and II strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Biol. Chemistry.* 268. 18372-18381.
59. Carroll, W. R. 1934. A study of *Rhizobium* species in relation to nodule formation on the root of Florida legumes. *Soil Sci.* 37. 117-137.
60. Charritte, G. 1987. Homeopatische arzneimittelhehre fur die praxis, HippoKrates, P115. Stuttgart.
61. Chen, W. X., Li, G. S., Qi, Y. L., Wang, E. T., Yuan, H. L., and Li, J. L. 1991. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41. 275-280.
62. Chen, W. X., Tan, Z. Y., Gao, J. L., Li, Y., and Wang, E. T. 1997. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47. 870-873.
63. Chen, W. X., Yan, G. H., and Li, J. L. 1988. Numerical taxonomic study of fast growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int J. Syst. Bacteriol.* 38. 392-397.
64. Chen, W., Wang, E., Wang, S., Li, Y., Chen, X., and Li, Y. 1995. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov. a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, people's republic of China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45. 153-159.

65. Chistoserdova, L., and Lidstrom, M. E. 1997. Molecular and mutational analysis of a DNA region separating two methylotrophy gene clusters in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiology*. 143. 1729-1736.
66. Cloutier, J., Laberge, S., and Antoun, H. 1997. Sequence and mutational analysis of the 6.7-kb region containing *nodAFEG* genes of *Rhizobium* sp. strain N33 : Evidence of DNA rearrangements. *MPMI*. 10. 401-406.
67. Cloutier, J., Laberge, S., Castonguay, Y., and Antoun, H. 1996. Characterization and mutational analysis of *nodHPQ* genes of *Rhizobium* sp. strain N33. *MPMI* 9. 720-728.
68. Colwell, R. R. 1970. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio* : numerical taxonomy of *vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J. Bacteriol.* 104. 410-433.
69. Conklin, M. E. 1936. Study of root nodule organisms of certain wild legumes. *Soil Sci.* 41. 167-185.
70. Corby, H. D. L. 1974. The incidence of Rhizobial nodulation among legumes dominant in the Flora zambesiaca area of Africa. *kirkia*. 13. 365-375.
71. Corpe, W. A., and Basile, D. V. 1982. Methanol utilizing bacteria associated with green plants. *Dev. Industrial Microbiol.* 23. 483-493.
72. Corpe, W. A., and Rheen, S. 1989. Ecology of methylotrophic bacteria on living leaf surfaces. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62. 243-250.
73. Costas, M. 1992. Classification, identification, and typing of bacteria by the analysis of their one-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis protein patterns. *Adv. Electrophor.* 5. 351-408.
74. Cousineau, B., Cerpa, C., Lefebvre, J., and Cedergren, R. 1992. The sequence of the gene encoding elongation factor Tu from *Chlamydia trachomatis* compared with those of other organisms. *Gene*. 120. 33-41.
75. Crosa, J. H., Brenner, D. J., and Falkow, S. 1973. Use of a single-strand specific nuclease for analysis of bacterial and plasmid deoxyribonucleic acid homo-and heteroduplexes. *J. Bacteriol.* 115. 904-911.
76. Crow, V. L., Jarvis, B. D. W., and Greenwood, R. M. 1981. Deoxyribonucleic acid homologies among acid producing strains of *Rhizobium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31. 152-172.
77. Date, R., A. 1976. Inoculation of tropical pasture legumes. Exploiting the legume -*Rhizobium* symbiosis in tropical Agriculture Conference. Hahului, Maui, Hawai. pp293-331.
78. Day, D. J., Nunn, D. N., and Anthony, C. 1990. Characterization of a novel soluble c-type cytochrome in *moxD* mutant of *Methylobacterium extorquens* AM1. *J. Gen. Microbiol.* 136. 181-188.
79. De Faria, S. M., Lewis, G. P., Sprent, J. I., and Sutherland, J. M. 1989. Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytol.* 111. 607-619.

80. De Lajudie, P., Laurent Fulele, E., Willems, A., Torck, U., Coopman, R., Collins, M. D., Kersters, K., Dreyfus, B., and Gillis, M. 1998b. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48. 1277-1290.
81. De Lajudie, P., Willems, A., Nick, G., Moreira, F., Molouba, F., Hoste, B., Torck, U., Neyra, M., Collins, M. T., Lindstrom, K., Dreyfus, B., and Gillis, M. 1998a. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48. 369-382.
82. De Lajudie, P., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Maestrojuan, G., Neyra, M., Collins, M. T., Dreyfus, B., Kersters, K., and Gillis, M. 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.
83. De Ley, J., Cattoir, H., and Reynaerts, A. 1970. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* 12. 133-142.
84. De Vries, G. 1986. molecular biology of bacterial methanol oxidation. *FEMS Microbiol. Rev.* 39. 235-258.
85. De Vries, G. E., Kues, U., and Stahl, U. 1990. Physiology and genetics of methylotrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 75. 57-102.
86. De Vries, J. T., and Derx, H. G. 1953. On the occurrence of *Mycoplana rubra* and its identity with *Protaminobacter ruber*. *Ann. bogoriensis.* 1. 53-60.
87. De Weger, L. A., Jann, B., and Lugtenberg. 1987. Lipopolysaccharides of *Pseudomonas* spp. that stimulate plant growth : composition and use for strain identification. *J. Bacteriol.* 169. 1441-1446.
88. Debelle, F., Rosenberg, C., and Dénarié, J. 1992. The *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, and *Azorhizobium* NodC proteins are homologous to yeast chitin synthases. *MPMI.* 5. 443-446.
89. Deleve, L. D., Wang, X., Kuhlenkamp, J. F., and Kaplowitz, N. 1996. toxicity of azathioprine and monocrotaline in murine sinusoidal endothelial cells and hepatocytes : the role of glutathion and relevance to hepatic venoocclusive disease. *Hepatology.* 23. 589-599.
90. Demont, N., Debelle, F., Aurelle, H., Denarie, J., and Prome, J. C. 1993. Role of the *Rhizobium meliloti* *nodF* and *nodE* genes in the biosynthesis of lipo-oligosaccharidic nodulation factors. *J. Biological Chemistry.* 268. 20134-20142.
91. Den Dooren de Jong, L. E. 1927. Ueber protaminophage Bakterien;. *Zentralbl. Bakteriologie (Abteilung II).* 71. 193-232.
92. Dénarié, J., Debelle, F., and Prome, J. C. 1996. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors : Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 65. 503-535.

93. Dénarié, J., Debelle, F., Rosenberg, C. 1992. Signaling and host range variation in nodulation. *Ann. Rev. Microbiol.* 46. 497-531.
94. Devereux, J., Haeberli, P., and Smithies, O. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acid Res.* 12. 387-395.
95. Ditaloff, A. 1968. Nodulation and nitrogen fixation in some *Desmodium* species. *Queensl. J. Agric. Sci.* 25. 165-167.
96. Ditaloff, A., and Luck, P. E. 1972. The effects of the interactions between seed inoculation, pelleting and fertilizer on growth and nodulation of *Desmodium* and *Glycine* on two soils in S. E. Queensland. *Trop. Grassl.* 6. 33-38.
97. Doignon-Bourcier, F. 1999. Eudes taxonomiques de *Bradyrhizobium* symbiotiques de petites légumineuses du Sénégal. Thèse Doctorat Université Claude Bernard Lyon 1. Lyon. 213pp.
98. Doignon-Bourcier, F., Sy, A., Willems, A., Torck, U., Dreyfus, B., Gillis, M., and De Lajudie, P. 1999. Diversity of *Bradyrhizobia* from 27 tropical *Leguminosae* species native of Senegal. *System. Appl. Microbiol.* 22. 647-661.
99. Doignon-Bourcier, F., Willems, A., Coopman, R., Laguerre, G., Gillis, M., and De Lajudie, P. 2000. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating small Senegales legumes by 16S-23S rRNA intergenic gene spacers and amplified fragment length polymorphism fingerprint analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 66. 3987-3997.
100. Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K., and Mattick, J. S. 1991. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research.* 19. 4008.
101. Doronina, N. V., Trotsenko, Y. A., Tourova, T. P., Kuznetsov, B. B., and Leisinger, T. 2000. *Methylopila helvetica* sp. nov. and *Methylobacterium dichloromethanicum* sp. nov. novel aerobic facultatively methylotrophic bacteria utilizing dichloromethane. *Syst. appl. Microbiol.* 23. 210-218.
102. Doudoroff, M., and Palleroni, N., J. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins Co. Baltimore.
103. Dower, W. J., Miller, J. F., and Ragsdale, C. W. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16. 6127-6145.
104. Downie, J. A. K., D. D., Johnston, A. W. B. and Rossen, L. 1985. Identification of genes and gene production involved in the nodulation of peas by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Gen. Genet.* 198. 255-262.
105. Doyle, J. J., Doyle, J. L., Ballenger, J. A., Dickson, E. E., Kajita, T., and Ohashi, H. 1997. A phylogeny of the chloroplast gene *rbcl* in the *Leguminosae*: Taxonomic correlations and insights into the evolution of modulation. *Amer. J. Bot.* 84. 541-554.

106. Dreyfus, B., Garcia, J. L., and Gillis, M. 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. Int. J. Syst. Bacteriol. 38. 89-98.
107. Duine, J. A., Frank, J., and Berkhout, M. P. J. 1984. NAD-dependent, PQQ-containing methanol dehydrogenase : a bacterial dehydrogenase in multienzyme complex. FEBS lett. 168. 217-224.
108. Duine, J. A., Frank, J., and Verwiel, P. E. J. 1980. structure and activity of the prosthetic group of methanol dehydrogenase. Eur. J. Biochem. 108. 187-192.
109. Dupuy, N., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Vandenbruaene, I., Maestrojuan, G., Dreyfus, B., Kersters, K., Collins, M. D., and Gillis, M. 1994. Phenotypic and genotypic characterization of *Bradyrhizobia* nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. Int. J. Syst. Bacteriol. 44. 461-473.
110. Dworkin, M., and Foster, J. W. 1956. Studies of *Pseudomonas methanica* (Söhngen) nov. comb. J. Bacteriol. 72. 646-659.
111. Eaglesham, A. R. J., Ellis, J. M., Evans, W. R., Fleischman, D. E., Hungria, M., and Hardy, R. W. F. 1990. The first photosynthetic N₂-fixing *Rhizobium* : characteristics. Nitrogen Fixation Achievements and Objectives.. Gresshof, P. M, Roth, L. E., Stacey, G. and Newton, W. L. (eds). Chapman and Hall, New York.
112. Elmerich, C., Zimmer, W., and Vielle, C. 1992. Associative nitrogen-fixing bacteria. 221-257. Biological nitrogen fixation. Stacey, G., Burris, R. H., and Evans, H. J. (eds) Chapman & Hall.
113. Evans, I. J., and Downie, J. A. 1986. the NodI product of *Rhizobium leguminosarum* related to ATP-binding transport proteins : nucleotide sequence of the *nodI* and *NodJ* genes. Gene. 43. 95-101.
114. Everitt, B. S. 1993. Cluster analysis. John Wiley and sons Inc., NY. USA. 170.
115. Ezaki, T., Hashimoto, Y., and Yabuuchi, E. 1989. Fluorometric deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. Int. J. Syst. Bacteriol. 39. 224-229.
116. Fellay, R., Perret, X., Viprey, V., Broughton, W. J., and Brenner, S. 1995b. Organization of host inducible transcripts on the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. Molecular Microbiology. 16. 657-667.
117. Fellay, R., Rochepeau, P., Relic, B., and Broughton, W. J. 1995a. Signals to and emanating from *Rhizobium* largely control symbiotic specificity. 199-220. Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Singh, U. S., Singh, R. P., and Kohmoto, K. (eds). Elsevier.

118. Ferragut, C., Izard, D., Gavini, F., Kersters, K., De Ley, J., and Leclerc, H. 1983. *Klebsiella trevisanii* : a new species from watered soil. Int. J. Syst. Bacteriol. 33. 133-142.
119. Ferro, M., Lorquin, J., Ba, S., Sanon, K., Promé, J. C., and Boivin, C. 2000. *Bradyrhizobium* sp. strains that nodulate the leguminous tree *Acacia albida* produce fucosylated and partially sulfated nod factors. Appl. Environ. Microbiol. 66. 5078-5082.
120. Fiedler, S., and Wirth, R. 1988. Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. Anal. Biochem. 170. 38-44.
121. Firmin, J. L., Wilson, K. E., Carlson, R. W., Davies, A. E., and Downie, J. A. 1993. Resistance to nodulation of afghanistant peas is overcome by nodX, which mediates and O-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipopoligosaccharide nodulation factor. Molecular Microbiology. 10. 351-360.
122. Fischler, M., Wortmann, C. S., and Feil, B. 1999. *Crotalaria* (*C. ochroleuca* G. Don) as a green manure in maize-bean cropping systems in Uganda. Field Crops Research. 61. 97-107.
123. Fisher, R. F., and Long, S. R. 1992. *Rhizobium* plant signal exchange. Nature. 357. 655-660.
124. Fleischman, D., and Kramer, D. 1998. Photosynthetic *Rhizobia*. Biochimica et Biophysica acta. 1364. 17-36.
125. Fogel, M. M., Taddeo, A. R., and Fogel, S. 1986. Biodegradation of chlorinated ethenes by methane-utilizing mixed culture. Appl. environ. Microbiol. 51. 720-724.
126. Folch-Mollol J. L., Marroqui, S., Sousa, C., Manyani, H., Lopez-Lara, I. M., Van der Drift, K. M. G., Haverkamp, J., Quinto, C., Gil-Serrano, A., Thomas-Oates, J. E., Spaink, H. P., and Megias, M. 1996. Characterization of *Rhizobium tropici* CIAT 899 nodulation factors ; the role of *nodH* and *nodPQ* genes in their sulfatation. MPMI 9. 151-163.
127. Fox, G. E., Pechman, K. J., and Woese, C. R. 1977. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid : molecular approach to prokaryotic systematics. Int. J. Syst. Bacteriol. 27. 44-57.
128. Fox, G. E., Wisotzkey, J. D., and Jurtshuk, P. 1992. How close is close : 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. Int. J. Syst. Bacteriol. 42. 166-170.
129. Frank, B. 1889. Über die pilzsymbiose der leguminosen. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft. 7. 332-346.
130. Franssen, H. J., Vijn, I., Yang, W. C., and Bisseling, T. 1992. Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. MPMI. 19. 89-107.
131. Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W. J., Rosenthal, A., and Perret, X. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. Nature. 387. 394-401.

132. Fulton, G. L., Nunn, D., and Lidstrom, M. E. 1984. Molecular cloning of a malyl coenzyme A lyase gene from *Pseudomonas* sp. strain AM1, a facultative methylotroph. *J. Bacteriol.* 160. 718-723.
133. Galli, R., and Leisinger, T. 1988. Plasmid analysis and cloning of the dichloromethane-utilization genes of *Methylobacterium* sp. DM4. *J. Gen. Microbiol.* 134. 943-974.
134. Gao, J. L., Sun, J. G., Li, Y., Wang, E. T., and Chen, W. X. 1994. Numerical taxonomy and DNA relatedness of tropical rhizobia isolated from Hainan province, China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44. 151-158.
135. Geremia, R. A., Mergaert, P., Geelen, D., Van Montagu, M., and Holsters, M. 1994. The nodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyl transferase. *Proc. PNAS.* 91. 2669-2673.
136. Gertenberg, C., Frieich, B., and Schlegel, H. G. 1982. Physical evidence for plasmids in autotrophic, especially hydrogen oxidizing bacteria. *Arch. Microbiol.* 133. 90-96.
137. Gilardi, G. L., and Faur, Y. C. 1984. *Pseudomonas mesophilica* and an unnamed taxon. Clinical isolates of pink-pigmented oxidative bacteria . *J. Clin. Microbiol.* 20. 626-629.
138. Giller, K. E., and Wilson, K., J. 1991. Nitrogen Fixation in tropical cropping systems. Wallingford, Uk. 164-196.
139. Goethals, K., Van Den Eede, G., Van Montagu, M., and Holsters, M. 1990. Identification and characterization of a functional *nodD* gene in *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *J. Bacteriol.* 172. 2658-2666.
140. Gomelsky, M., Biville, F., Gasser, F., and Tsyzankov, Y. D. 1996. Identification and characterization of the *pqqDGC* gene cluster involved in pyrroloquinoline quinone production in an obligate methylotroph *Methylobacillus flagelletum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 141. 169-176.
141. Goosen, N., Horsman, H., Huinen, R., de Groot, A., and Van de Putte, P. 1989. *Acinetobacter calcoaceticus* genes involved in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline-quinone : nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 171. 447-455.
142. Goossens, H., Giesendorf, B. A. J., Vandamme, P., Vlaes, L., Van den Boor, C., Koeken, A., Quint, W. G. V., Blomme, W., Hanicq, P., koster, D. S., Hofstra, H., Butzler, J. P., and Van der Plas, J. 1995. Investigation of an outbreak of *campylobacter upsaliensis* in day care centers in Brussels : analysis of relationships among isolates by phenotypic and genotypic typing methods . *J. Infect. Dis.* 172. 1298-1305.
143. Gordillo, M. E., Singh, K. V., baker, C. J., and Murray, B. E. 1993. Typing of group B *Streptococci* : comparision of pulsed-field gel electrophoresis and conventional electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 31. 1430-1434.

144. Göttfert, M. H., B., kondorosi, E. ; Putnoky, P., Rodriguez-Quinones, F. and kondorosi, A. 1986. At least two nodD genes are necessary for efficient nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. J. Mol. Biol. 191. 411-420.
145. Gräff, W., and Bauer, L. 1973. Red bacterial growth (*Corinebacterium rubrum*) n. spec. in tap water systems. Zentralbl. Bakteriol. (Abteilung II). 73. 74-96.
146. Graham, P. H., Sadowsky, M. J., Keyser, H. H., Barnett, Y. M., Bradley, R. S., Cooper, J. E., DeLey, D. J., Jarvis, B. D. W., Roslycky, E. B., Strijdom, B. W., and Young, J. P. W. 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.
147. Green, P. N. 1991. the genus *Methylobacterium*. 2342-2349. The procaryotes. Albert Balows, H. G. T., Martin Dworkin, Wim Harder, and Karl-Heinz Schleifer (eds.). Springer-verlag.
148. Green, P. N. 1992. Gram-Negative Methylophilic rods and cocci. 67-85. Identification methods in applied and environmental microbiology. Board, R. G., Dorothy, J., Skinner, F. A. (eds). Blackwell scientific publications, Oxford.
149. Green, P. N. 1993. Overview of the current state of methylophilic taxonomy. 253-265. Microbial growth in C1 compounds. Murell, J. C., and Kelly, P.D. (Eds). Intercept Ltd, Andover, U.K.
150. Green, P. N., and Bousfield, I. J. 1981. The taxonomy of pink-pigmented facultatively methylophilic bacteria. 285-293. Microbial growth on C1 compounds. Dalton, H. E.(eds). Heyden & son, London.
151. Green, P. N., and Bousfield, I. J. 1982. A taxonomic study of some Gram-negative facultatively methylophilic bacteria. J. Gen. Microbiol. 128. 623-638.
152. Green, P. N., and Bousfield, I. J. 1983. Emendation of *Methylobacterium* Patt, Cole and Hanson 1976, *Methylobacterium rhodinum* (Heumann, 1962) comb. nov. corrig. ; *Methylobacterium radiotolerans* (Ito and Lizuka, 1971), comb. nov. corrig., and *Methylobacterium mesophilicum* (Austin and Goofellow, 1979) comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 33. 875-877.
153. Green, P. N., Bousfield, I. J., and Hood, D. 1988. Three new *Methylobacterium* species : *M. rhodesianum* sp. nov., *M. zatmanii* sp. nov., and *M. fujisawaense*, sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 38. 124-127.
154. Grimont, F., and Grimont, P. A. D. 1986. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Ann. Insti. Pasteur. 137. 165-175.
155. Grimont, P. A. D., Popoff, M. Y., Grimont, F., Coynault, C., and Lemelin, M. 1980. Reproducibility and correlation study of three deoxyribonucleic acid hybridization procedures. Current Microbiology. 4. 325-330.

156. Grundig, M. W., and Babel, W. 1987. The linear oxydation of formaldehyde to CO₂ as the proper energy generating sequence for the assimilation of methanol in *Acetobacter methanolicus* MB58. Arch. Microbiol. 149. 149-155.
157. Gurtler, V., Wilson, V. A., and Mayall, B. C. 1991. Classification of medically important clostridia using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rDNA. J. Gen. Microbiol. 137. 2673-3679.
158. Hamby, R. K., and Zimmer, E. A. 1992. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. 50-91. Molecular Systematics of plants. Soltis, P. S., Soltis, D. E., and Doyle, J. J. (eds). Chapman, New York.
159. Hancock, T. L. C., Costello, A. M., Lidstrom, M. E., and Oremland, R. S. 1998. Strain IMB-1, a novel bacterium for the removal of methyl bromide in fimigated agricultural soils. Appl. Environ. Microbiol. 64. 2899-2905.
160. Häne, B. G. K., Jäger, K., and Drexler, H. G. 1993. The Pearson product-moment correlation coefficient is better suited for identification of DNA fingerprint profiles than band matching algorithms. Electrophoresis. 14. 967-972.
161. Hanson, R. S. 1980. Ecology and diversity of methylo trophic organisms. Adv. Appl. Microbiol. 6. 3-39.
162. Hanson, R. S., and Hanson, T. E. 1996. Methanotrophic Bacteria. Microbiol. Reviews. 439-471.
163. Hanson, R. S., Bratina, B. J., and Brusseau, G. A. 1993. Phylogeny and ecology of methylo trophic bacteria. 205-302. Microbial growth on C1 compounds. Murell, J. C., and Kelly D. P. (Eds). Intercept Ltd, Andover, U. K.
164. Hanson, R. S., Netrusov, A. I., and Tsuji, K. 1991. The obligate methanotrophic bacteria *Methylococcus*, *Methylo monas*, *Methylosinus*, and related bacteria. 2350-2365. The prokaryotes. A. Balows, Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. H. (ed). Springer-Verlag, New York.
165. Harborne, J. B., Boulter, D., and Turner, B. L. 1971. Chemotaxonomy of the leguminosae. Academic press, 612pp. New York.
166. Hardy, R. W. F., and Havelka, U. D. 1975. Nitrogen fixation rechearch : a key world food. Science. 188. 633-643.
167. Hardy, R. W. F., Burn, R. C., and Holsten, R. D. 1973. Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of N₂ fixation. Soil. Biol. Biochem. 43. 47-87.
168. Harms, N., de Vries, G. E., Maurer, K., Hoogendijk, J., and Stouthamer, A. H. 1987. isolation and nucleic sequence of the methanol dehydrogenase structural gene from *Parcoccus denitrificans*. J. Bacteriol. 169. 3969-3975.

169. Harms, N., Ras, J., Koning, S., Reijnders, W. N. M., and Stouthamer, A. H., Van spanning, R. J. M. 1996. Genetics of C1 metabolism regulation in *Paracoccus denitrificans*. 126-132. Microbial growth on C1 compounds. Lidstrom, M. E., and Tabita, F. R. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
170. Harms, N., Reijnders, W. N. M., Anazawa, H., Palen, C. J. N. M. v. d., Van Spanning, R. J. M., Oltmann, L. F., and Stouthamer, A. H. 1993. Identification of two -component regulatory system controlling methanol dehydrogenase synthesis in *Paracoccus denitrificans*. Mol. Microbiol. 8. 450-470.
171. Harrington, A. A., and Kallio, R. E. 1960. Oxidation of methanol and formaldehyde by *Pseudomonas methanica*. Can. J. Microbiol. 6. 1-7.
172. Heidstra, R., and Bisseling, T. 1996. Nod factor-induced host responses and mechanism of Nod factors perception. New Phytol. 133. 25-43.
173. Herberg, I., and Staugard, F. 1989. Traditional medicine in Botswana. Ipelegeng Publishers. P 120-307. Gaborone.
174. Hernandez-Lucas, I., Segovia, L., Martinez-Romero, E., and Pueppke, S. G. 1995. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. Appl. Environ. Microbiol. 61. 2775-2779.
175. Heumann, W. 1962. Die Methodik der Kreuzung sternbildender Bakterien. Biol. Zentralbl. 81. 341-354.
176. Hiraishi, A., Furuhashi, K., Matsumoto, A., Koike, K. A., Fukuyama, M., and Tabushi, K. 1995. Phenotypic and genetic diversity of chlorine-Resistant *Methylobacterium* strains isolated from various environments. Appl. Environ. Microbiol. 61. 2099-2107.
177. Hirsh, A. M. 1992. Developmental biology of legume nodulation. New Phytol. 122. 211-237.
178. Hirt, W., Papoutsakis, E. T., Krug, E., Lim, H. C., and Tsao, G. T. 1978. Formaldehyde incorporation by a new methylotroph (L3). Appl. Environ. Microbiol. 36. 56-62.
179. Holland, M. A. 1997. *Methylobacterium* and plants. Recent Res. Devel. in Plant Physiol. 1. 207-213.
180. Holland, M. A., and Polacco, J. C. 1994. PPFMs and other covert contaminants : is there more to plant physiology than just plant? Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 45. 197-209.
181. Hollis, A. B., Kloos, W. E., and Elkan, G. H. 1981. DNA:DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related *Rhizobiaceae*. J. Gen. Microbiol. 123. 215-222.
182. Holloway, B. 1984. Genetics of methylotrophs. 87-106. Methylotrophs : Microbiology, Biochemistry and genetics. Hou, C. T.(ed). CRC Press, Boca Raton.

183. Hom, S. S. M., Uratsu, S. L., and Hoang, F. 1984. Transposon Tn5-induced mutagenesis of *Rhizobium japonicum* yielding a wide variety of mutants. J. Bacteriol. 159. 335-340.
184. Hood, D. W., Dow, C. S., and Green, P. N. 1987. DNA:DNA hybridization studies on the pink pigmented facultative methylophs. J. Gen. Microbiol. 133. 709-720.
185. Hood, D. W., Dow, C. S., and Green, P. N. 1988. Electrophoretic comparison of total soluble proteins in the pink-pigmented facultative methylophs. J. Gen. Microbiol. 134. 2375-2383.
186. Hornei, B., Lüneberg, E., Schmidt-Rotte, H., Maab, M., Weber, K., Heits, F., Frosch, M., and Solbach, W. 1999. Systemic infection of an immunocompromised patient with *Methylobacterium zatmanii*. J. Clin. Microbiol. 37. 248-250.
187. Horvath, B., Kondorosi, E., John, M., Schmidt, J., Torok, I., Gyorgypal, Z., Barabas, I., Wieneke, U., Schell, J., and Kondorosi, A. 1986. organization, structure and symbiotic function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes determining host specificity for alfalfa. Cell. 46. 335-343.
188. Huang, C. S., Tenente, R. C. V., Silva, F. C. C., and Lara, J. A. R. 1981. Effect of *Crotalaria spectabilis* and two nematicides, on numbers of *Meloidogyne incognita* and *Helicotylenchus*. Nematologica. 27. 1-5.
189. Ito, H., and Lizuka, H. 1971. Part. III. Taxonomic studies on a radio-resistant *Pseudomonas*. Agric. Biol. Chem. 35. 1566-1571.
190. Izard, D., Ferragut, C., Gavini, F., Kersters, K., De Ley, J., and leclerc, H. 1981. *klebsiella terrigena* : a new species from soil and water. Int. J. Syst. Bacteriol. 31. 116-127.
191. Jabbouri, S., Fellay, R., Talmont, F., Kamalaprija, P., Burger, U., Relic, B., Prome, J. C., and Broughton, W. J. 1995. Involvement of *nodS* in N-methylation and *nodU* in 6-O-carbamoylation of *Rhizobium* sp. NGR234 nod factors. J. Biol. Chemistry. 270. 22968-22973.
192. Jahnke, K. D. 1994. A modified method of quantitative colorometric DNA-DNA hybridization on membrane filters for bacterial identification. J. Microbiol. Methods. 20. 273-7288.
193. Jarvis, B. D. W., Gillis, M., and DeLey, J. 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.
194. Jarvis, B. D. W., MacLean, T. S., Robinson, I. G. C., and Fanning, G. R. 1977. phenic similarity and DNA base sequence homology of root nodule bacteria from New Zealand native legumes and *Rhizobium* strains from agricultural plants. N.Z.J. Agric. Res. 20. 235-248.

195. Jarvis, B. D. W., Pankhurst, C. E., and Patel, J. J. 1982. *Rhizobium loti* a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32. 378-380.
196. Jarvis, B. D. W., VanBerkum, P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernandez, M. P., Cleyet-Marel, J. C., and Gillis, M. 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47. 895-898.
197. Jayaro, B. M., Doré, J. J. E., Baumbach, J., G.A, Matthews, K. R., and Olive, S. P. 1991. Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism anlysis of 16S ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.* 29. 2774-2778.
198. John, M., Rohrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U., and Schell, J. 1993. *Rhizobium NodB* protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. *PNAS.* 90. 625-629.
199. Jones, D., and Krieg, N. R. 1984. Serology and chemotaxonomy. 15-18. *Bergey's manual of systematic bactriology*. Krieg, N. R., and Holt, J. G (ed). The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
200. Jordan, D. C. 1982. Transfer 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.
201. Jordan, D. C. 1984. Family III. *Rhizobiaceae* Conn. 1938, 321AL. 234-236. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg, N. R., and Holt, J. G (ed). The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
202. Kass, E., and Wink, M. 1997. Phylogenetic relationships in the *papilionoideae* (family *Leguminosae*) based on nucleotide sequences of cpDNA (rbcl) and ncDNA (ITS 1 and 2). *Mol. Phylogenetics and Evolution.* 8. 65-88.
203. Kayle, K. M., Macone, A., and Kazanjian, P. H. 1992. Catheter infection caused by *Methylobacterium* in immunocompromised hosts : report of three cases and review of the litterature. *Clinical Infection Diseases.* 14. 1010-1014.
204. Kersters, K. 1985. Numerical methods in the classification of bacteria by protein electrophoresis. *Society for General Microbiology.* 337-367.
205. Kersters, K., and De Ley, J. 1975. identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. *J. Gen. Microbiol.* 87. 333-342.
206. Kersters, K., Pot, B., Dewettinck, D., Torck, U., vancanneyt, M., Vauterin, L., and Vandamme, P. 1994. Identification and typing of bacteria by protein electrophoresis. 51-66. *Bacterial diversity and systematics*. Priest, F. F., Ramos-Cormenzana, A., and Tyndall, B. (ed). Plenum Press, New York.

207. Kinghorn, A. D., and Smolenski, S. J. 1981. Alkaloids of *papilionoideae*. 585-598. Advances in legume systematics. Polhill, R. M., and Raven, P. H. Royal Botanic Gardens , Kew. 585-598.
208. Kingsbury, J. M. 1964. Poisonous plants of the United States and Canada. Prentice -hall, New York.
209. Kiredjian, M., Holmes, B., Kersters, K., Guilvout, J., and De Ley, J. 1986. *Alcaligenes piechaudii*, a new species from human clinical specimens and the environment. Int. J. Syst. Bacteriol. 36. 282-287.
210. Klestova, L. V., Chibisova, E. S., and Tsygankov, Y. D. 1988. Mutants of the obligate methylophs *Methylobacillus flagellatum* KT. Arch. Microbiol. 149. 441-446.
211. Klugbauer, N., Ludwig, W., Bauerlein, E., and Schleifer, K. H. 1992. Subunit β of adenosine triphosphate synthase of *Pectinatus frisingensis* and *Lactobacillus casei*. Syst. Appl. Microbiol. 15. 323-330.
212. Kohler-Straub, D., Harmans, S., Galli, R., Suter, F., and Leisinger, T. 1986. Evidence for identical dichloromethane dehalogenases in different methylophic bacteria. J. Gen. Microbiol. 132. 2837-2843.
213. Kokwaro, J. O. 1976. Medicinal plants of east Africa. P 144-146. East African literature Bureau. Nairobi.
214. Kondorosi, A., Kondorosi, E., Gyorgypal, Z., Banfalvi, Z., Gyuris, J., Putnoky, P., Grosskopf, E., John, M., Ha, D. T. C., Lados, M., Horvath, B., Slaska-Kiss, K., and Schell, J. 1989. Molecular genetic basis of *Rhizobium* legume interactions. Genome. 31. 350-353.
215. Kondorosi, E., Banfalvi, Z., and Kondorosi, A. 1984. Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti* : identification of nodulation genes. Mol. Gen. Genet. 193. 445-452.
216. Kostman, J. R., Edlind, T. D., Lipuma, J. L., and Stull, T. L. 1992. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping . J. Clin. Microbiol. 30. 2084-2087.
217. Kouno, K., and Ozaki, A. 1975. Distribution and identification of methanol-utilizing bacteria. 11-21. Microbial growth on C1 compounds. O. C. (ed.). Society of Fermentation Technology, Osaka, Japan.
218. Krasil'nikov, N. A. 1959. Diagnostick der Bacterium und Actinomyceten. Gustav Fisher, Jena, DDR (Russian original, 1949).
219. Krieg, N. R., and Holt, J. G. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins. Baltimore.
220. Kullaya, I. K., Kilasara, M., and Aune, J. B. 1995. Towards improving soil productivity by sunnhemp (*Crotalaria ochroleuca*) in the highlands of Kilimanjaro in Northern tanzania . Norwegian Journal of Agriculture sciences. Supplement 21. 99-106.

221. Kullaya, I. K., Kilasara, M., and Aune, J. B. 1998. The potential of marejea (*Crotalaria ochroleuca*) as green manure in maize production in the Kilimanjaro region of Tanzania. *Soil use & Management*. 14. 117-118.
222. Kuykendall, L. D., Saxena, B., Devine, T. E., and Udell, S. E. 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 38. 501-505.
223. Ladha, J. K., and So, R. B. 1994. Numerical taxonomy of photosynthetic Rhizobia nodulating *Aeschynomene* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44. 62-73.
224. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227. 680-685.
225. Laguerre, G., Allard, M. R., Revoy, F., and Amarger, N. 1994. Rapid identification of *Rhizobia* by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60. 56-63.
226. Laufer, K., and Lidstrom, M. E. 1992. Regulation and expression of bacterial quinoproteins. pp193-222. *In* Principles and Applications of quinoproteins. Davidson, V. L., (ed). Marcel Dekker. New York.
227. Lehmicke, L., and Lidstrom, M. E. 1985. Genetics of autotrophy and hydrogen oxidation in *Xanthobacter* H4-14, a methanol autotroph. *J. Bacteriol.* 162. 1244-1249.
228. Lerouge, P., Roche, P., Fauchert, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J. C., and Dénarié, J. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*. 344. 781-784.
229. Lidstrom, M. E. 1992. The genetics and molecular biology of methanol-utilizing bacteria. 183-206. *Methane and Methanol utiliziers*. Murrel, J. C., and Dalton, H. (eds). Plenum Press, New York.
230. Lidstrom, M., E., and Stirling, D., I. 1990. Methylytrophs : genetics and commercial Applications. *Annu. Rev. Microbiol.* 44. 27-58.
231. Lidstrom, M., E., Anthony, C., Biville, F., Gasser, F., Goodwin, P., Hanson, R. S., and Harms, N. 1994. New unified nomenclature for genes involved in the oxidation of methanol in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol.* 117. 103-106.
232. Lindstrom, K. 1989. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39. 365-367.
233. Long, S. R. 1989. *Rhizobium-legume : life together in the underground*. *Cell*. 56. 203-214.
234. Long, S. R. 1992. Genetic analysis of *Rhizobium* nodulation. 763-834. *Biological nitrogen fixation*. G. Stacey, Burris, R. H., and Evans, H. J. (eds). Chapman and Hall, New York.

235. Long, S. R. 1996. *Rhizobium* symbiosis : Nod factors in perspective. Plant Cell. 8. 1885-1898.
236. Lopez-Lara, I. M., van den Berg, J. D. J., Thomas-Oates, J. E., Glushka, J., Lugtenberg, B. J. J., and Spaink, H. 1995a. Structural identification of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals of *Rhizobium loti*. Mol. Microbiol. 15. 627-638.
237. Lopez-lara, I. M., Van Der Drift, K. M. G. M., Van Brussel, A. A. N., Haverkamp, J., Lugtenberg, B. J. J., Thomasoates, J. E., and Spaink, H. P. 1995b. Induction of nodule primordia on *Phaseolus* and *Acacia* by lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from broad host range *Rhizobium* strain GRH2. MPMI 29. 465-477.
238. Lorquin, J., Lortet, G., Ferro, M., Méar, N., Dreyfus, B., Promé, J. C., and Boivin, C. 1997b. Nod factors from *Sinorhizobium saheli* and *S. teranga* bv. *sesbaniae* are both arabinosylated and fucosylated, a structural feature specific to *Sesbania rostrata* symbionts. MPMI 10. 879-890.
239. Lorquin, J., Lortet, G., Ferro, M., Mear, N., Promé, J. C., and Boivin, C. 1997a. *Sinorhizobium teranga* bv. *acaciae* ORS1073 and *Rhizobium* sp. strain ORS1001, two distantly related *Acacia*-nodulating strains, produce similar Nod factors that are O carbamoylated, N methylated, and mainly sulfated. J. Bacteriol. 179. 3079-3083.
240. Lorquin, J., Molouba, F., and Dreyfus, B. L. 1997c. Identification of the carotenoid pigment canthaxanthin from photosynthetic *Bradyrhizobium* strains. App. Environ. Microbiol. 63. 1151-1154.
241. Lortet, G., Mear, N., Lorquin, J., Dreyfus, B., Delajudie, P., Rosenberg, C., and Boivin, C. 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*. MPMI 9. 736-747.
242. Ludwig, W., Weizenegger, M., Betzl, D., Leidel, E., Lenz, T., Ludvigsen, A., Möllenhoff, D., Wenzig, P., and Schleifer, K. H. 1990. Complete nucleotide sequences of seven eubacterial genes coding for the elongation factor TU : fonctional, structural and phylogenetic evaluations. Arch. Microbiol. 153. 241-247.
243. Lupski, J. R., and Weinstock, G. E. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. J. bacteriol. 174. 4525-4529.
244. Machado, R., Sanchez, L. M., Alfonso, H. A., and Nunez, C. A. 1994. Agronomic performance and indices of toxicity in cultivars of *Crotalaria* ssp. Avances en Investigación Agropecuaria. 3. 38-34.
245. Machlin, S. M., and Hanson, R. S. 1988. Nucleotide sequence and transcriptional start site of the *Methylobacterium organophilum* xx methanol dehydrogenase structural gene. J. Bacteriol. 170. 4739-4747.

246. Machlin, S. M., Tam, P. E., Bastien, C. A., and Hanson, R. S. 1988. Genetic and physical analyses of *Methylobacterium organophilum* xx genes encoding methanol oxidation. J. Bacteriol. 170. 141-148.
247. Martinez Romero, E. 1994. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. Plant and Soil. 161. 11-20.
248. Martinez, E., Romero, D., and Palacios, R. 1990. The *Rhizobium* genome. Plant Sciences. 9. 59-93.
249. Martinez-Romero, E., Segovia, L., Martins Mercante, F., Franco, A. A., Graham, P., and Pardo, M. A. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. Int. J. Syst. Bacteriol. 41. 417-426.
250. Maslow, J. N., Mulligan, M. E., and Arbeit, R. D. 1993. Molecular epidemiology : application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. Clin. Infect. Dis. 17. 153-164.
251. Mc Clelland, M., Petersen, C., and Welsh, J. 1992. Length polymorphism in tRNA intergenes spacers detected by using the polymerase chain reaction can distinguish streptococcal strains and species. J. Clin. Microbiol. 30. 1499-1504.
252. Mc Donald, I. R., Kenna, E. M., and Murrell, J. C. 1995. Detection of methanotrophic bacteria in environmental samples with the PCR. App. Environ. Microbiol. 61. 116-121.
253. Mc Pheat, W. L., Mann, H. N., and Dalton, H. 1987. Isolation of mutants of the obligate methanotroph *Methylomonas albus* defective in growth on methane. Arch. Microbiol. 148. 40-43.
254. Mc Sorley, R., Dickson, D. W., Brito, J. A. d., Hewlett, T. E., and Frederick, J. J. 1994. Effect of tropical rotation crops on *Meloidogyne arenaria* population densities and vegetable yields in microplots. J. Nematology. 26. 175-181.
255. Mears, J. A., and Mabry, T. J. 1971. Alkaloids in the leguminosae. 73-178. Chemotaxonomy of the leguminosae. Harborn, J. B., Boulter, D., and Turner, B. L. (ed). Academic press, London & New York.
256. Mergaert, P., Ferro, M., DHaeze, W., VanMontagu, M., Holsters, M., and Prome, J. C. 1997. Nod factors of *Azorhizobium caulinodans* strain ORS571 can be glycosylated with an arabinosyl group, a fucosyl group, or both. MPMI 10. 683-687.
257. Mergaert, P., Van Montagu, M., Promé, J. C., and Holsters, M. 1993. Three unusual modifications, a D-arabinosyl, an N-methyl, and a carbamoyl group, are present on the Nod factors of *Azorhizobium caulinodans* strain ORS571. PNAS. 90. 1551-1555.
258. Metzler, T., Marquardt, R., Prave, P., and Winnaker, E.-L. 1988. Characterization of a promoter from *Methylomonas clara*. Mol. Gen. Genet. 211. 210-214.

259. Meulenbergh, J. J. M., Sellink, E., Riegman, N. H., and Postma, P. W. 1992. Nucleotide sequence and structure of the *Klebsiella pneumoniae* *pqg* operon. *Mol. Gen. Genet.* 232. 284-294.
260. Minamisawa, K. 1989. Comparision of extracellular polysaccharide composition, ribotoxine production, and hydrogenase phenotype of strains of *Bradyrhizonium japonicum*. *Plant cell Physiol.* 30. 877-884.
261. Minamisawa, K. 1990. Division of rhizobitoxine-producing and hydrogen-uptake positive strains of *Bradyrhizobium japonicum* by *nifDKE* sequence divergence. *Plant cell Physiol.* 31. 81-89.
262. Mkiwa, F. E., Lwoga, A. B., Mosha, R. D., and Matovelo, J. A. 1994. Antinutritional effects of *Crotalaria ochroleuca* (marejea) in animal feed supplements. *Vet. Hum. Toxicology.* 36. 96-100.
263. 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 lenght polymorphism group. *App. Environ. Microbiol.* 65. 3084-3094.
264. Montiero, M. J., Tupas, M. A., Moffett, B. F., and Brainbridge, B. w. 1982. Isolation and characterization of a high molecular weight plasmid from the obligate methanol-utilizing bacterium *Methylomonas* (*Methanomonas*) *methylovora*. *FEMS Microbiol. Lett.* 15. 235-237.
265. Moreira, F. M. S., Gillis, M., Pot, B., Kersters, K., and Franco, A. A. 1993. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *System. Appl. Microbiol.* 16. 135-146.
266. Moreira, F. M. S., Haukka, K., and Young, J. P. W. 1998. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. *Mol. Ecol.* 7. 889-895.
267. Morris, C. J., and Lidstrom, M. E. 1992. Cloning of a methanol-inducible *moxF* promoter and its analysis in *moxB* mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 rif. *J. Bacteriol.* 174. 4444-4449.
268. Morris, C. J., Biville, F., Turlin, E., Lee, E., Ellermann, K., Fan, W.-H., Ramamoorthi, R., Springer, A. L., and Lidstrom, M. E. 1994. Isolation, phenotypic characterization and complementation analysis of mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 unable to synthesize Pyrroloquinoline quinone and sequences of *pqqD*, *pqqG*, and *pqqC*. *J. Bacteriol.* 177. 1746-1755.
269. Morris, C. J., Springer, A. L., Kim, Y. M., Perkins, K. E., and Lidstrom, M. E. 1995. The identification and nucleotide sequence of *mxmA*, *mxnC*, *mxnK*, *mxnL*, and *mxnD* genes from *Methylobacterium extorquens* AM1. *J. Bacteriol.* 177. 6825-6831.

270. Mullens, I., A., and Dalton, H. 1987. Cloning the gamma-subunit methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus*. *Biol. Technology*. 5. 490-493.
271. Mulligan, J. T., and Long, S. R. 1989. A Family of activator genes regulates expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Genetics*. 122. 7-18.
272. Mullis, K. B., and Faloona, F. A. 1987. Specific synthetis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155. 335-350.
273. Murray, R. G. E., Brenner, D. J., Colwell, R. R., De Vos, P., Goodfellow, M., Grimont, P. A. D., Pfennig, N., Stackebrandt, E., and Zavarzin, G. A. 1990. Report of the ad hoc commitee on approaches to taxonomy within the *Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40. 213-215.
274. Muzilli, O., Lugao, S. M. B., Fidalski, J., Soares, D., Ribeiro, M. F. S., and Fagundes, A. C. 1992. Green manuring for improving soils under coffee in the region of Arenito Caiua. Preliminary results for season 1989/90. Instituto Agronomico do Parana (IAPAR), Londrina, Brazil. 16. 101-114.
275. Mwambazi, T. N., Mwakalombe, B., Aune, J. B., and Berland, T. A. 1998. Turnoverof green manure and effect on bean yield in Northen Zambia. *Advance in geocology*. 31. 1247-1254.
276. Neal, W. M., Rusoff, L. L., and Ahmann, C. F. 1935. The isolation and some properties of and alkaloid from *Crotalaria spectabilis* Roth. *J. Am. Chem. Soc.* 57. 2560-2561.
277. Neffaty, M. 1994. caractérisation phénologique et comportement germinatif des espèces pastorales les plus prometteuses pour la réhabilitation des parcours dégradés en Tunisie steppique : conséquences pour les semis de parcours. thèse de Doctorat. Université de gand, Belgique.
278. Newton, W. E. 1998. Nitrogénases : fonction et évolution. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 13. 238-241.
279. Nick, G., De Lajudie, P., Eardly, B. D., Suomalainen, S., Paulin, L., Zhang, X., Gillis, M., and Lindstrom, K. 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.
280. Nicolaidis, A. A., and Sargent, A. W. 1987. Isolation of methane monooxygenase-deficient mutants from *Methylosinus trichosporium* OB3b using dichloromethane. *FEMS Microbiol. Lett.* 41. 47-52.
281. Normand, P., Cournoyer, B., Simonet, P., and Nazaret, S. 1992. Analysis of a ribosomal RNA operon in the actinomycete *Frankia*. *Gene*. 111. 119-124.
282. Norrander, J., Kempe, T., and Messing, J. 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene*. 26. 101.
283. Norris, D. O. 1958. A red strain of *Rhizobium* from *Lotononis bainesii* Baker. *Aust. J. Agric. Res.* 9. 629-632.

284. Norton, J. H., and O'Rourke, P. K. 1979. Toxicity of *Crotalaria goreensis* for chickens. Aust. Vet. J. 55. 173-174.
285. Nour, S. M., Cleyet-Marel, J. C., Normand, P., and Fernandez, M. P. 1995. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 45. 640-648.
286. Nour, S. M., Fernandez, M. P., Normand, P., and Cleyet-Marel, J. C. 1994. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). Int. J. Syst. Bacteriol. 44. 511-522.
287. Nunn, D. N., and Anthony, C. 1988. The second subunit of methanol dehydrogenase of *Methylobacterium extorquens* AM1. Biochem. J. 260. 857-862.
288. Nunn, D. N., and Lidstrom, M. E. 1986a. Isolation and complementation analysis of 10 methanol oxidation mutant classes and identification of the methanol dehydrogenase structural gene of *Methylobacterium* sp strain AM1. J. Bacteriol. 166. 581-590.
289. Nunn, D. N., and Lidstrom, M. E. 1986b. Phenotypic characterization of 10 methanol oxidation mutants classes in *Methylobacterium extorquens* sp. strain AM1. J. Bacteriol. 166. 591-597.
290. Nunn, D. N., Day, D., and Anthony, C. 1989. The second subunit of methanol dehydrogenase of *Methylobacterium extorquens* AM1. Biochem. J. 260. 857-862.
291. Oakley, C., and Murrell, J. 1988. *nifH* genes in the obligate methane oxidizing bacteria. FEMS Microbiol. lett. 49. 53-58.
292. O'Connor, M. L., Wopat, A., and Hanson, R. S. 1977. Genetic transformation in *Methylobacterium organophilum*. J. Gen. Bacteriol. 98. 265-272.
293. Olmstead, R. G., and Sweere, J. A. 1994. Combining data in phylogenetic systematics : an empirical approach using three molecular data sets in the *Solanaceae*. Syst. Biol. 43. 467-481.
294. Olsen, G. J., Woese, C. R., and Overbeek, R. 1994. The winds of (evolutionary) changes : Breathing new life into Microbiology. J. Bacteriol. 176. 1-6.
295. Olsthoorn, M. M. A., LopezLara, I. M., Petersen, B. O., Bock, K., Haverkamp, J., Spalink, H. P., and Thomas Oates, J. E. 1998. Novel branched nod factor structure results from alpha-(1->3) fucosyl transferase activity : The major lipo-chitin oligosaccharides from *Mesorhizobium loti* strain NZP2213 bear an alpha-(1->3) fucosyl substituent on a nonterminal backbone residue. Biochemistry. 37. 9024-9032.
296. Orgambide, G. G., Lee, J., Hollingsworth, R. I., and Dazzo, F. B. 1995. Structurally diverse chitoooligosaccharide Nod factors accumulate primarily in

- hr/>
- membranes of wild type *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Biochemistry*. **34**. 3832-3840.
297. Pankhurst, C. E., and Biggs, D. R. 1980. Sensitivity of *Rhizobium* to selected isoflavonoids. *Can. J. Microbiol.* **26**. 542-545.
298. Patt, T. E., Cole, G. E., and Hanson, R. S. 1976. *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**. 226-229.
299. Patt, T. E., Cole, G. E., Bland, J., and Hanson, R. S. 1974. Isolation and characterization of bacteria that grow on methane and organic compounds as sole sources of carbon and energy. *J. Bacteriol.* **120**. 955-964.
300. Peel, D., Quayle, J. R. 1961. Microbial growth on C1 compounds. 1. isolation and characterization of *Pseudomonas* AM1. *Biochem. J.* **81**. 465-469.
301. Perriere, G. T. J. 1996. On-line tools for sequence retrieval and multivariate statistics in molecular biology. *Comp. appli. Biosci.* **12**. 63-69.
302. Peterson, P. L., Greenwood, R. M., Belling, G. B., and Bathhurst, N. O. 1971. The electrophoretic movement of soluble proteins and the production of unusual amino acids in *Rhizobium* isolates as taxonomic criteria. *Plant Soil*. **1971** (Spec. Vol.). 111-114.
303. Phelps, P. A., Agarwal, S. K., Speitel, G. E. J., and Giorgiou, G. 1992. *Methylosinus trichosporium* OB3b mutants having constitutive expression of soluble methane monooxygenase in the presence of high levels of copper. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**. 3701-3708.
304. Pilbeam, D. J., and Bell, E. A. 1981. The distribution of monocrotaline in *Crotalaria* seeds : the use of pyrrolizidine alkaloids as indicators of taxonomic relationships. *Phytochemistry* (in Press).
305. Polhill, R. M. 1982. *Crotalaria* in Africa and Madagascar. Balkema. Rotterdam.
306. Polhill, R. M., and Raven, P. H. 1978. Advances in legume systematics. International legume conference. Royal botanic gardens Kew. Pp 1049 .
307. Pot, B., Vandamme, P., and Kersters, K. 1994. Analysis of electrophoretic whole-organism protein fingerprints. 493-521. Modern microbial methods. Chemical methods in prokaryotic systematics. Goodfellow, M., and O'Donnell, A. G. (ed). John Wiley & sons Ltd, Chichester, England.
308. Poupot, R., Martinez-Romero, E., and Prome, J. C. 1993. Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or nonsulfated chitopentasaccharides containing an N-methyl-N-acylglucosaminyl terminus. *Biochemistry*. **32**. 10430-10435.
309. Poupot, R., Martinez-Romero, E., Gautier, N., and Prome, J. C. 1995. Wild type *Rhizobium etli*, a bean symbiont, produces acetyl-flucosylated, N-methylated, and carbamoylated nodulation factors. *The Journal of Biological Chemistry*. **270**. 6050-6055.

310. Prakash, A. O., Dehadrai, S., and Jonathan, S. 1995. Toxicological studies on the ethanolic extract of *Crotalaria juncea* seeds in rats. *J. Ethnopharmacol.* 45. 167-176.
311. Price, N. P. J., Relic, B., Talmont, F., Lewin, A., Prome, D., Pueppke, S. G., Maillet, F., Denarie, J., Prome, J. C., and Broughton, W. J. 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.
312. Rainey, F. A., and Wiegel, J. 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. Bact.* 46. 607-610.
313. Ralph, D., Mc Clelland, M., Welsh, J., Baranton, G., and Perolat, P. 1993. *Leptospira* species categorized by arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR) and by mapped restriction polymorphisms in PCR amplified rRNA genes. *J. Bacteriol.* 175. 973-981.
314. Ramamoorthi, R., and Lidstrom, M. E. 1995. Transcriptional analysis of *pqqD* and study of the regulation of pyrroloquinoline quinone biosynthesis of *Methylobacterium extorquens* AM1. *J. Bacteriol.* 177. 206-211.
315. Richardson, I. W., and Anthony, C. 1992. Characterization of mutant forms of the quinoprotein methanol dehydrogenase lacking an essential calcium ion. *Biochem. J.* 287. 709-715.
316. Rinaudo, G., Orenge, S., Fernandez, M. P., Meugnier, H., and Bardin, R. 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.
317. Roberts, G. P., Leps, W. T., Silver, L. E., and Brill, W. J. 1980. Use of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 39. 414-422.
318. Roche, P., Debelle, F., Maillet, F., Lerouge, P., Faucher, C., Truchet, G., Denarie, J., and Prome, J. C. 1991a. Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell.* 67. 1131-1143.
319. Rohrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U., Kondorosi, E., Barlier, I., Schell, J., and John, M. 1994. Biosynthesis of lipooligosaccharide nodulation factors: *Rhizobium* NodA protein is involved in N-acylation of the chitooligosaccharide backbone. *PNAS* 91. 3122-3126.
320. Rome, S., Fernandez, M. P., Brunel, B., Normand, P., and Cleyet-Marel, J. C. 1996. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46. 972-980.

321. Rostas, K. K., E., Horvath, B., Simoncsits, A., kondorosi, A. 1986. Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83. 1757-1761.
322. Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4. 484-486.
323. Salgado, A. L. B., Azzini, L., Feitosa, C. T., Petineli, A., and Veiga, A. A. 1984. Application of NPK fertilizer and lime in the production of green herbage and seed in *Crotalaria*. Bragantia. 43. 271-278.
324. Salisbury, S. A., Forrest, H. S., Cruse, W. B. T., and Kennard, O. 1979. A novel coenzyme from bacterial primary alcohol dehydrogenase. Nature. 280. 843-844.
325. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning : A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
326. Sandanam, S., Jayasooriya, S. G., and Somaratne, A. 1976. Effect of soil reconditioning on organic matter and nutrient status of tea soils and yield of planted tea. Journal of plantation. 4. 60-67.
327. Sanderson, M. J., and Liston, A. 1995. Molecular phylogenetic systematics of *galegeae*, with special reference to *Astragalus*. 331--350. Advances in Legume Systematics. Crisp, M., and Doyle, J. J. (Eds). Roy. Bot. Gard. Kew. 331-50
328. Sanjuan, J., Carlson, R. W., Spaink, H. P., Bhat, 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*. PNAS 89. 8789-8793.
329. Sano, Z., and Nakasano, K. 1986. Histological responses of three leguminous enemy plants to the penetration and developement of *Meloidogyne incognita*. Jpn. J. Nematol. 16. 48-55.
330. Sawada, H., Ieki, H., Oyaizu, H., and Matsumoto, S. 1993. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. Int. J. Syst. Bacteriol. 43. 694-702.
331. Schlaman, H. R. M., Okker, R. J. H., and Lugtenberg, B. J. J. 1992. Regulation of nodulation gene expression by NodD in rhizobia. J. Bacteriol. 174. 5177-5182.
332. Schlaman, H. R. M., Philips, D. A., and Kondorosi, E. 1998. Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. 361-386. The *Rhizobiaceae*. molecular biology of model plant-associated bacteria. Spaink, H. P., Kondorosi, A., and Hooykaas, J. J. P. (eds). Kluwer Academic Publishers, Lodon.
333. Schleifer, K. H., and Kandler, O. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol. Rev. 36. 407-477.

334. Schleifer, K. H., and Ludwig, W. 1989. Phylogenetic relationships of bacteria . 103-117. The hierarchy of life. B. Fernholm, Bremar, K., and Jörnvall, H. Elsevier Science Publishers B.V, Amsterdam.
335. Scholla, M. H., Elkan, G. H. 1984. *Rhizobium fredii* sp. nov. a fast growing species that effectively nodulates soybeans. Int. J. Syst. Bacteriol. 34. 484-486.
336. Scholtz, R., Wackett, L. P., Egli, C., Cook, A. M., and Leisinger, T. 1988. Dichloromethane dehalogenase with improved catalytic activity isolated from a fast growing dichloromethane-utilizing bacterium. J. Bacteriol. 170. 5698-5704.
337. Schultze, M., Kondorosi, E., Ratet, P., Buire, M., and Kondorosi, A. 1994. Cell and molecular biology of *Rhizobium* plant interactions. International review of cytology. 156. 1-75.
338. Schultze, M., Quiclet-Sire, B., Kondorosi, E., Virelizier, H., Glushka, J. N., Endre, G., Gero, S. D., and Kondorosi, A. 1992. *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipooligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. PNAS 89. 192-196.
339. Scott, D. B., Young, C. A., Collins-Emerson, J. M., Terzaghi, E. A., Rockman, E. S., Lewis, P. E., and Pankhurst, C. E. 1996. Novel and complex chromosomal arrangement of *Rhizobium loti* nodulation genes. MPMI. 9. 187-197.
340. Segovia, L., Young, P. W., and Martinez-Romero, E. 1993. Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 43. 374-377.
341. Serpantié, G., and Floret, C. 1994. Un mode de gestion des ressources en Afrique tropicale : la jachère longue. regards différenciés sur une pratique en crise. C. R. Acad. agric. Fr. 80. 75-83.
342. Short, J. M., Fernandez, J. M., Sorge, J. A., and Huse, W. D. 1988. λ ZAP : A bacteriophage λ expression vector with in vitro excision properties. Nucleic Acids Res. 16. 7583.
343. Silva, G. S. D., Ferraz, S., and Santos, J. M. D. 1989a. Attraction, penetration and developement of *Meloidogyne javanica* larvae in *Crotalaria* roots. Nematologica Braziliara. 13. 151-163.
344. Silva, G. S. D., Ferraz, S., and Santos, J. M. D. 1989b. Resistance of *Crotalaria* species to *Pratylenchus brachyurus* and *P. zae*. Nematologica Braziliara. 13. 81-86.
345. Silva, G. S. D., Ferraz, S., and Santos, J. M. D. 1989c. Resitance of *Crotalaria* species to *Rotylenchulus reniformis*. Nematologica Braziliara. 13. 87-92.
346. Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. 1993. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering : transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. Bio/Technology. 1. 784-790.

347. Singh, M., and Klingmüller, W. 1986. Transposon mutagenesis in *Azospirillum brasilense* : isolation of auxotrophic and Nif-mutants and molecular cloning of the mutagenized nif DNA. *Mol. Gen. Genet.* **202**. 136-142.
348. Siverio, F., Cambra, M., Gorris, M. T., Corzo, J., and Lopez, M. M. 1993. Lipopolysaccharides as determinants of serological variability in *Pseudomonas corrugata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**. 1805-1812.
349. So, R. B., Ladha, J. K., and Young, J. P. W. 1994. Photosynthetic symbionts of *Aeschynomene* spp. form a cluster with bradyrhizobia on the basis of fatty acid and rRNA analyses. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**. 392-403.
350. Spaink, H. P., Bloemberg, G. V., van Brussel, A. A. N., Lugtenberg, B. J. J., van der Drift, K. M. G. M., Haverkamp, J., and Thomas-Oates, J. E. 1995b. Host specificity of *Rhizobium leguminosarum* is determined by the hydrophobicity of highly unsaturated fatty acyl moieties of the nodulation factors. *MPMI* **8**. 155-164.
351. Spaink, H. P., Sheeley, D. M., Van Brussel, A. A. N., Glushka, J., York, W. S., Tak, T., Geiger, O., Kennedy, E. P., Reinhold, V. N., and Lugtenberg, B. J. J. 1991. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipooligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature*. **354**. 6 p.
352. Spaink, H. P., Wijffelman, C. A., Pees, E., Okker, R. J. H., and Lugtenberg, B. J. J. 1987. *Rhizobium* nodulation gene nodD as a determinant of host specificity. *Nature*. **328**. 337-340.
353. Spaink, H. P., Wijfjes, A. H. M., and Lugtenberg, B. J. J. 1995a. *Rhizobium nodI* and *nodJ* proteins play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligosaccharides. *J. Bacteriol.* **177**. 6276-6281.
354. Sprent, J. J., and Raven, J. A. 1992. Evolution of nitrogen-fixing symbiosis. *Biological nitrogen fixation*. G. Stacey, R. H. Burris, and H. J. Evans. (eds). Chapman & Hall, New York.
355. Springer, A. L., Auman, A. J., and Lidstrom, M. E. 1998. Sequence and characterization of *mxkB*, a response regulator involved in regulation of methanol oxidation, and of *mxkW*, a methanol-regulated gene in *Methylobacterium extorquens* AM1. *FEMS Microbiol. Lett.* **160**. 119-124.
356. Springer, A. L., Chou, H.-H., Fan, W.-H., Lee, E., and Lidstrom, M. E. 1995. Methanol oxidation mutants in *Methylobacterium extorquens* AM1 : identification of new genetic complementation groups. *Microbiology*. **141**. 2985-2993.
357. Springer, A. L., Morris, C. J., and Lidstrom, M. E. 1997. Molecular analysis of *mxbD* and *mxbM*, a putative sensor-regulator pair required for oxidation of methanol in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiology*. **143**. 1737-1744.

358. Stackebrandt, E., and Goebel, B. M. 1994. Taxonomic note : A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44. 846-849.
359. Stackebrandt, E., and Liesack, W. 1993. Nucleic acids and classification. 151-194. *Handbook of new bacterial systematics*. Goodfellow, M., and O'Donnell, A.G. (Eds). Academic Press Ltd, London.
360. Stackebrandt, E., Murray, R. G. E., and Trüper, H. G. 1988. *Porteobacteria* classis Nov., a name for the phylogenetic taxon that includes "the purple bacteria and their relatives". *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38. 321-325.
361. Staphorst, J. L., and Strijdom, B. W. 1975. Specificity in the *Rhizobium* symbiosis of *Aspalathus linearis* (Burn. Fil.) R. Dahgr. ssp. *Linearis*. *Phytophylactica*. 7. 95-96.
362. Stephens, R. L., Haygood, M. G., and Lidstrom, M. E. 1988. Identification of putative methanol dehydrogenase (*moxF*) structural genes in methylotrophs and cloning *moxF* genes from *Methylococcus capsulatus* (Bath) and *Methylomonas albus* BG8. *J. Bacteriol.* 170. 2063-2069.
363. Stocks, P. K., and Mc Cleskey, C. S. 1964. Identity of the pink-pigmented methanol-oxidizing bacteria as *Vibrio extorquens*. *J. Bacteriol.* 88. 1065-1070.
364. Stone, S., and Goodwin, P. M. 1989. Characterization and complementation of mutants of *Methylobacterium* AM1 which are defective in C1 assimilation. *J. Gen. Microbiol.* 135. 227-237.
365. Sundararaj, P., and Mehta, U. K. 1990. Host status of some economic crops to *Pratylenchus zeae* and their influence on subsequent sugarcane crops. *Indian Journal of Nematology*. 20. 165-169.
366. Sy, A. 1995. Etude de trente quatre légumineuses herbacées du Sénégal : germination des graines et caractérisation de leurs microorganismes symbiotiques. DEA. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. Département Biologie Végétale univérité de Dakar. Pp 52.
367. Sy, A., Danthu, P., and Grouzis, M. 1997. Réhabilitation des terres dégradées au nord et au sud du Sahara. Utilisation des légumineuses pérennes et des microorganismes associés pour l'établissement de formations pluristrates. projet CEE STD3-TS3/DG XII. rapport final. 104-113.
368. Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., and Swaminathan, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsefield gel electrophoresis: criteria for bacterial typing. *J. Clin. Microbiol.* 33. 2233-2239.
369. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. 1997. The clustal X windows interface : flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids res.* 25. 4876-4882.

370. Toukdarian, A. E., and Lidstrom, M. E. 1984a. DNA hybridization analysis of the *nif* region of *Methylosinus* sp. 6. J. Bacteriol. 157. 925-930.
371. Toukdarian, A. E., and Lidstrom, M. E. 1984b. Molecular construction of *nif* mutants of the obligate methanotroph, *Methylosinus* sp. strain 6. J. Bacteriol. 157. 979-983.
372. Toyama, H., Chistoserdova, L., and Lidstrom, M. E. 1997. sequence analysis of *pqq* genes required for biosynthesis of pyrroloquinoline quinone in *Methylobacterium extorquens* AM1 and the purification of a biosynthetic intermediate. Microbiology. 143. 595-602.
373. Trinick, M. J. 1982. Biology. 76-146. Nitrogen fixation. 76-146. Broughton, W. J. (ed). Oxford University Press, Oxford.
374. Tsuji, K., Tsien, R. S., Hanson, R. S., De Palma, S. R., Scholtz, R., and La Roche, S. 1990. 16S ribosomal RNA sequence analysis for determination of phylogenetic relationships among methylotrophs. J. Gen. Microbiol. 136. 1-10.
375. Tsygankov, Y. D., and Kazakova, S. M. 1987. Development of gene transfer systems in *Methylbacillus flagellatum* KT : isolation of auxotrophic mutans. Arch. Microbiol. 149. 112-119.
376. Ueda, S., Kitamota, N., Tamura, Y., Sakakibara, Y., and Shimizu, S. 1987. Isolation and characterization of a methylotrophic bacterium. J. Ferment. Technol. 65. 924-926.
377. Ueda, S., Matsumoto, S., Shimizu, S., and Yamane, T. 1991a. Transformation of a methylotrophic bacterium, *Methylobacterium extorquens*, with a broad host range plasmid by electroporation. Appl. Environ. Microbiol. 57. 924-926.
378. Ueda, S., Matsumoto, S., Shimizu, S., and Yamane, T. 1991b. Transformation of a methylotrophic bacterium, *Methylobacterium extorquens*, with a broad host range plasmid by electroporation. Annals NY Acad. Sci. 646. 99-105.
379. Ullmann, J. S., and Mc Carthy, B. J. 1973. The relationship between mismatched base pairs and the thermal stability of the DNA duplexes. Biochim. Biophys. Acta. 294. 416-424.
380. Urakami, T., and Komagata, K. 1981. Electrophoretic comparison of enzymes in Gram-negative methanol-utilizing bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. 27. 381-403.
381. Urtz, B. E., and Elkan, G. H. 1996. Genetic diversity among *Bradyrhizobium* isolates that effectively nodulate peanut (*Arachis hypogaea*). Can. J. Microbiol. 42. 1121-1130.
382. Van Berkum, P., Beyene, D., Bao, G. P., Campbell, T. A., and Eardly, B. D. 1998. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. Int. J. Syst. Bact. 48. 13-22.

383. Van Berkum, P., Fuhrmann, J. J., and Eardly, B. D. 2000. A critical examination of 16S rRNA gene sequence divergence for the reconstruction of bacterial evolutionary histories : the *Rhizobiaceae*. 7th North American Conference on symbiotic nitrogen Fixation. Université Laval, Quebec, Canada.
384. Van der Drift, K. G. M., Spaink, H. P., Bloemberg, G. V., Van Brussel, A. A. N., Lugtenberg, B. J. J., Haverkamp, J., and Thomas-Oates, J. E. 1996. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* produces lipo-chitin oligosaccharides with *nodE*-dependent highly unsaturated fatty acyl moieties. J. Biol. Chem. 271. 22563-22569.
385. Van Rhijn, P., and VanDerLeyden, J. 1995. The *Rhizobium* plant symbiosis. Microbiol. Reviews. 59. 124-142.
386. Van Rhijn, P., Feys, B., Verreth, C., and Van DerLeyden, J. 1993. Multiple copies of *nodD* in *Rhizobium tropici* CIAT899 and BR816. J. Bacteriol. 175. 438-447.
387. Van Rhijn, P., Luyten, E., Vlassak, K., and VanDerLeyden, J. 1996. Isolation and characterization of a pSym locus of *Rhizobium* sp. BR816 that extends nodulation ability of narrow host range *Phaseolus vulgaris* symbionts to *Leucaena leucocephala*. MPMI. 9. 74-77.
388. Van Rossum, D., Schuurmans, F. P., Gillis, M., Muyotcha, A., Van Verseveld, H. W., Stouthamer, A. H., and Boogerd, F. C. 1995. Genetic and phenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots. Appl. Environ. Microbiol. 61. 1599-1609.
389. Van Spanning, R. J. M., Wansell, C. W., De Boer, T., Hazelaar, M. J., Anazawa, H., Harms, N., Oltmann, L. F., and Stouthamer, A. H. 1991. Isolation and characterization of *moxJ*, *moxG*, *moxI*, and *moxR* genes of *Paracoccus denitrificans* : inactivation of *moxJ*, *moxG*, and *moxR* genes and the resultant effect on methylo-trophic growth. J. Bacteriol. 173. 6948-6961.
390. Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., and Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Reviews. 60. 407-438.
391. Vanechoutte, M., Rossau, M., de Vos, P., Gillis, M., Janssens, D., Paepa, M., de Rouck, A., Fiers, T., Clayes, G., and Kersters, K. 1992. Rapid identification of bacteria of the *Comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). FEMS Microbiol. Lett. 93. 227-234.
392. Vauterin, L., and Vauterin, P. 1992. Computer aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. European Microbiology. 37-41.
393. Vauterin, L., Swing, J., and Kersters, K. 1993. Protein electrophoresis and classification. 251-280. Handbook of new bacterial systematics. Goodfellow, M., and O'Donnell, A. G. (ed). Academic Press Ltd., London

394. Vazquez, M. S., O. and Quinto, C. 1993. the NodI and NodJ proteins from *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains are similar to capsular polysaccharide secretion proteins from Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 8. 369-377.
395. Vazquez, M., Davalos, A., De LasPenas, A., Sanchez, F., and Quinto, C. 1991. Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains. *J. Bacteriol.* 173. 1250-1258.
396. Verdcourt, B., and Trump, E. C. 1969. Common poisonous plants of east Africa. Collins, London.
397. Versalovic, J., Koeuth, T., and Lupski, J. R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19. 6823-6831.
398. Vietmeyer, N. D. 1979. Tropical legumes : Resources for the future. National Academy of Sciences. New York.
399. Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. International Biological Programme Handbook n° 15. Blackwell Scientific Publications, LTD. Oxford.
400. Vincent, J. M., and Humphrey. 1970. Taxonomically significant group antigens in *Rhizobium*. *J. Gen. Microbiol.* 63. 379-382.
401. Von Heijne, G. 1985. Signal sequences the limits of variation. *J. Mol. Microbiol.* 184. 99-105.
402. Wang, E. T., Van Berkum, P., Beyene, D., Sui, X. H., Dorado, O., Chen, W. X., and Martinez-Romero, E. 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.
403. Wang, E. T., Van, Berkum, P., Beyene, D., Chen, W. X., and Martinez-Romero, E. 1999. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49. 51-65.
404. Warner, P., Higgins, I., and Drozd, J. 1977. Examination of obligate and facultative methylootrophs for plasmid DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 1. 339-342.
405. Watt, J. M., Breyer-Brandwijk, M. G. 1962. The medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa. 2 ed. Edinburgh : Livingstone. pp 1457.
406. Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P., and Truper, H. G. 1987. Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37. 463-464.
407. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173. 697-703.

408. Welsh, J., and Mc Clelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. **18**. 7213-7218.
409. Wen, J., and Zimmer, E. A. 1996. Phylogeny and biogeography of *Panax* L. (The Ginseng genus Araliaceae) : Inference from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Mol. Phylogen. Evol.* **6**. 167-177.
410. Whitta, S., Sinclair, M., and Holloway, B. 1985. Transposon mutagenesis, in *Methylobacterium AM1 (Pseudomonas AM1)*. *J. Gen. Microbiol.* **131**. 1547-1551.
411. Whittenbury, R., and Dalton, H. 1981. The methylotrophic bacteria. 894-902. *The Prokaryotes, a Handbook of Habitats, Isolation and Identification of bacteria*. Starr, M. P., Stolp, H., Truper, G. H., Balows, A., and Schlegel H. G. (eds). Springer-Verlag, Berlin.
412. Whittenbury, R., and Krieg, R. N. 1984. *Methylococcaceae* fam. nov. 256-262. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Krieg, R. N., and Holt, J. G. (ed.). The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
413. Whittenbury, R., Phillips, K. C., and Wilkinson, J. G. 1970. Enrichment, isolation and some properties of methane utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **61**. 205-218.
414. Willems, A., and Collins, M. D. 1993. Phylogenetic analysis of Rhizobia and Agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**. 305-313.
415. Willems, A., Doignon-Bourcier, F., Goris, J., Coopman, R., de Lajudie, P., and Gillis, M. 2001. DNA-DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol. In press*.
416. Williams, E., and Brainbridge, B. W. 1971. Genetic transformation in *Methylococcus capsulatus*. *J. Appl. Bacteriol.* **34**. 137-141.
417. Williams, E., and Shimmin, M. A. 1978. Radiation-induced filamentation in obligate methylotrophs. *FEMS Microbiol. Lett.* **4**. 137-141.
418. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. **18**. 6531-6535.
419. Wilson, J. K. 1939. Leguminous plants and their associated organisms. *The leguminosae, a source book of characteristic, uses and nodulation*. the university of Wisconsin Press, Madison, P. 812.
420. Wilson, J. K. 1944. The nodulation performance of isolates from soybean with species of *Crotalaria* and certain other plants. *The leguminosae, a source book of characteristic, uses and nodulation*. the university of Wisconsin Press, Madison, P. 812.

421. Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Reviews*. 51. 221-271.
422. Woese, C. R. 1991. Prokaryote systematics : the evolution of a science. 3-18. *The Prokaryotes*. Balows, A., Trüpe, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K. H. (eds). Springer, New York.
423. Woese, C. R., and Fox, G. E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain : the primary kingdoms. *PNAS* 74. 5088-5090.
424. Wolters, J., and Erdmann, A. 1988. compilation of 5S rRNA and 5S rRNA gene sequenses. *Nucleic Acids Res.* 16 (Suppl.). r1-r85.
425. Wood, P. J., and Siddiqui, I. R. 1971. Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity. *Anal. Biochem.* 39. 418-428.
426. Xu, H. H., Viebahn, M., and Hanson, R. S. 1993. Identification of methanol-regulated promoter sequences from the facultative methylotrophic bacterium *Methylobacterium organophilum* xx. *J. Gen. Microbiol.* 139. 743-752.
427. Xu, L. M., Ge, C., Cui, Z., Li, J., and Fan, H. 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45. 706-711.
428. Yanagi, M., and Yamasato, K. 1993. Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol. Letters.* 107. 115-120.
429. Yang, G. P., DeBelle, F., Savagnac, A., Ferro, M., Schiltz, O., Maillet, F., Prome, D., Treilhou, M., Vialas, C., Lindstrom, K., Denarie, J., and Prome, J. C. 1999. Structure of the *Mesorhizobium huakuii* and *Rhizobium galegae* Nod factors : a cluster of phylogenetically related legumes are nodulated by rhizobia producing Nod factors with alpha, beta-unsaturated N-acyl substitutions. *Mol. Microbiol.* 34. 227-237.
430. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains : nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 33. 103.
431. Yoshimura, F. 1982. Phylloplane bacteria in pine forest. *Can. J. Bacteriol.* 28. 580-592.
432. Young, J. P. W. 1991. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G., Burris, R. H., and Evans, H. J. (eds). Chapman & Hall, New York.
433. Young, J. P. W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen fixing organisms. 43-86. *Biological nitrogen fixation*. G. Stacey, R. H. Burris, and H. J. Evans (eds). Chapman & Hall, New York.
434. Young, J. P. W., and Haukka, K. E. 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol.* 133. 87-94.

435. Young, J. P. W., and Johnston, A. W. B. 1989. The evolution of specificity in the legume *Rhizobium* symbiosis. *Tree*. **4**. 341-349.
436. Young, J. P. W., Downer, H. L., and Eardly, B. D. 1991. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* **173**. 2271-2277.
437. Zabeau, M., and de Vos, P. 1993. Selective restriction fragment amplification a general method for DNA fingerprinting. European Patent office, Publication O 534 858 A1.
438. Zatman, L. J. 1981. A search for patterns in methylotrophic pathway. Microbial growth in C1 compounds. R. L. Crawford, and Hanson R. S. (eds). Am. Soc. Microbiol. Press, Washington.
439. Zhang, X. X., Turner, S. L., Guo, X. W., Yang, H. J., Debelle, F., Yang, G. P., Dénarié, J., Young, P. W., and Li, F.D. 2000. The common nodulation genes of *Atragalus sinicus Rhizobia* are conserved despite chromosomal diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**. 2988-2995

ANNEXES

Annexe 1. Alignement des séquences des gènes *nodA* des souches à croissance rapide de crotalaires.

```

NODA1928      -AGGTGCGCTGGGAAAATGAGCTGGAACCTGCCGACCATGCCGAACCTGCCGAGTTCCTG
NODA1991      GAGGTGCGCTGGGAAAATGAGCTGGAACCTGCCGACAATGCCGAACCTGCCGAGTTCCTG
NODA2030      -AGGTGCGCTGGGAAAATGAGCTGGAACCTGCCGACCATGCCGAACCTGCCGAGTTCCTG
NODA2060      -----GAGCTGGAACCTGCCGACCATGCCGAACCTGCCGAGTTCCTG
NODA1924      -----GCTGGAACCTGCCGACCATGCCGAACCTGCCGAGTTCCTG
                *****

NODA1928      CGAAAGGCCTACAACCCGAGTGGGACGTTTAATGCAAGGCCATTGCAAGGCGGTGCAAGT
NODA1991      CGAAAGGCCTACAACCCGAGTGGGACGTTTAATGCAAGGCCATTGCAAGGCGGTGCAAGT
NODA2030      CGAAAGGCCTACAACCCGAGTGGGACGTTTAATGCAAGGCCATTGCAAGGCGGTGCAAGT
NODA2060      CGAAAGGCCTACAACCCGAGTGGGACGTTTAATGCAAGGCCATTGCAAGGCGGTGCAAGT
NODA1924      CGAAAGGCCTACAACCCGAGTGGGACGTTTAATGCAAGGCCATTGCAAGGCGGTGCAAGT
                *****

NODA1928      TGGGCCGGCGCGAGACCTGAGGTCCGTGCAATCGGTTACGACTCGCGCGGCGTAGCGGCT
NODA1991      TGGGCCGGCGCGAGACCTGAGGTCCGTGCAATCGGTTACGACTCGCGCGGCGTAGCGGCT
NODA2030      TGGGCCGGCGCGAGACCTGAGGTCCGTGCAATCGGTTACGACTCGCGCGGCGTAGCGGCT
NODA2060      TGGGCCGGCGCGAGACCTGAGGTCCGTGCAATCGGTTACGACTCGCGCGGCGTAGCGGCT
NODA1924      TGGGCCGGCGCGAGACCTGAGGTCCGTGCAATCGGTTACGACTCGCGCGGCGTAGCGGCT
                *****

NODA1928      CATATAGCCGCACTGCGCCGCTTCATCAAGGTTGGGGCGGTGCGATCTACTCGTCGCCGAA
NODA1991      CATATAGCCGCACTGCGTCGCTTCATCAAGGTTGGGGCGGTGCGATCTACTCGTCGCCGAA
NODA2030      CATATAGCCGCACTGCGCCGCTTCATCAAGGTTGGGGCGGTGCGATCTACTCGTCGCCGAA
NODA2060      CATATAGCCGCACTGCGCCGCTTCATCAAGGTTGGGGCGGTGCGATCTACTCGTCGCCGAA
NODA1924      CATATAGCCGCACTGCGCCGCTTCATCAAGGTTGGGGCGGTGCGATCTACTCGTCGCCGAA
                *****

NODA1928      CTAGGATTGTACGCGGTACGTCCGACCTTGAGGGACTGCGAATCAGTCATTCAATGCTC
NODA1991      CTAGGATTGTACGCGGTACGTCCGACCTTGAGGGACTGCGAATCAGTCATTCAATGCTC
NODA2030      CTAGGATTGTACGCGGTACGTCCGACCTTGAGGGACTGCGAATCAGTCATTCAATGCTC
NODA2060      CTAGGATTGTACGCGGTACGTCCGACCTTGAGGGACTGCGAATCAGTCATTCAATGCTC
NODA1924      CTAGGATTGTACGCGGTACGTCCGACCTTGAGGGACTGCGAATCAGTCATTCAATGCTC
                *****

NODA1928      GTGATGTATCCAGCCCTGAAGGAGCTCGGCGTTCATTTCGGCTTCGGCACGGTTTCGGCAC
NODA1991      GTGATGTATCCAGCCCTGAAGGAGCTCGGCGTTCATTTCGGCTTCGGCACGGTTTCGGCAC
NODA2030      GTGATGTATCCAGCCCTGAAGGAGCTCGGCGTTCATTTCGGCTTCGGCACGGTTTCGGCAC
NODA2060      GTGATGTATCCAGCCCTGAAGGAGCTCGGCGTTCATTTCGGCTTCGGCACGGTTTCGGCAC
NODA1924      GTGATGTATCCAGCCCTGAAGGAGCTCGGCGTTCATTTCGGCTTCGGCACGGTTTCGGCAC
                *****

NODA1928      GCGCTGCAGAAACATCTTACAAGGCTGCTCGGTAAGGCCGGTCTAGCGACCATCGTGTCC
NODA1991      GCGCTGCAGAAACATCTTACAAGGCTGCTCGGTAAGGCCGGTCTAGCGACCATCGTGTCC
NODA2030      GCGCTGCAGAAACATCTTACAAGGCTGCTCGGTAAGGCCGGTCTAGCGACCATCGTGTCC
NODA2060      GCGCTGCAGAAACATCTTACAAGGCTGCTCGGTAAGGCCGGTCTAGCGACCATCGTGTCC
NODA1924      GCGCTGCAGAAACATCTTACAAGGCTGCTCGGTAAGGCCGGTCTAGCGACCATCGTGTCC
                *****

NODA1928      GGGGTTTCGCGTTCGGTCCACCCTCAGAGATATGCGTCTCGACATGCCGCCCACGCGGGTC
NODA1991      GGGGTTTCGCGTTCGGTCCACCCTCAGAGATATGCGTCTCGACATGCCGCCCACGCGGGTC
NODA2030      GGGGTTTCGCGTTCGGTCCACCCTCAGAGATATGCGTCTCGACATGCCGCCCACGCGGGTC
NODA2060      GGGGTTTCGCGTTCGGTCCACCCTCAGAGATATGCGTCTCGACATGCCGCCCACGCGGGTC
NODA1924      GGGGTTTCGCGTTCGGTCCACCCTCAGAGATATGCGTCTCGACATGCCGCCCACGCGGGTC
                *****

```

```
NODA1928      GAGGACCTACTGATCCTAGTTTTCCCGATTGGAAGGCCAATGAGCGATTGGCCGGCTGGT
NODA1991      GAGGACCTACTGATCCTAGTTTTCCCGATTGGAAGGCCAATGAGCGATTGGCCGGCTGGT
NODA2030      GAGGACCTACTGATCCTAGTTTTCCCGATTGGAAGGCCAATGAGCGATTGGCCGGCTGGT
NODA2060      GAGGACCTACTGATCCTAGTTTTCCCGATTGGAAGGCCAATGAGCGATTGGCCGGCTGGT
NODA1924      GAGGACCTACTGATCCTAGTTTTCCCGATTGGAAGGCCAATGAGCGATTGGCCGGCTGGT
*****

NODA1928      ACGATAATTGATCGGAACGGCCGT---
NODA1991      ACGATAATTGATCGGAACGGCCGC---
NODA2030      ACGATAATTGATCGGAACGGGCCCGAT
NODA2060      ACGATAAA-----
NODA1924      ACGATAA-----
*****
```

Annexe 2. Alignement des séquences des gènes *nodA* des souches à croissance lente de crotalaires.

```

NODA1810      -----GAGGGTGCGCTGGGAAAGCGAACTGGGGCTTACCGACCATGCCGAGCTTCT
NODA1816      TGTCCAATGGAGGGTGCGCTGGGAAAGCGAACTGGGGCTTACCGAGCACGCCGAGCTTCG
NODA2077      -----AGGGTGCGCTGGGAAAGCGAATTGCAGCTCACCGATCATGCCGAAGCTTCG
NODA1929      TGTCCAGTGGAGCGTGCGCTGGGAAAGCGAACTGGGGCTTACCGATCATGCCGAGCTTCT
                *****
NODA1810      CTGAGTTCTTCCGCAAGAGTTACGGCCCCGACGGGTGCGTTCAATGCGCAGCCTTTTCAG
NODA1816      CTGAGTTCTTCCGCAAGAGTTACGGCCCCGACAGGTGCGTTCAATGCGCAGCCGTTTCAG
NODA2077      CCGAGTTCTTCCGCAAGAGTTACGGCCCCGACGGGTGCGTTCAATGCGCAGCCCTTTGAA
NODA1929      CTGAGTTCTTCCGCAAGAGTTACGGCCCCGACGGGTGCGTTCAATGCGCAGCCTTTTCAG
                * *****
NODA1810      GGGAGCCGAAGTTGGGCGGCGCAAGACCCGAGGTCCGCGTAATTGGTCGCGACGCGCGC
NODA1816      GGGAGCCGAAGTTGGGCGGCGCAAGACCCGAGGTTCGTGTAGTTGGTTACGACGCGCGC
NODA2077      GCCAACCGAAGTTGGGCGGGGCCAGGCCTGAGGTCCGCATTATCGGTTATGACGCGCGC
NODA1929      GGGAGCCGAAGTTGGGCGGCGCAAGACCCGAGTCCGCGTAATTGGTCACGACGCGCGC
                *  * *****
NODA1810      GGGGTAGCGGCTCACGTCGGGCTACTACGTCGCTTCATCAAAGTTGGTGGAGTCGATCTC
NODA1816      GGGATAGCAGCACACGTCGGGCTACTACGACGCTTCATCAAAGTTGGTGGAGCCGATCTC
NODA2077      GGCGTAGCTGCTCATGTCGGGCTATTACGCCGCTTCATCAAAGATTGGTGGGTCGATCTA
NODA1929      GGGGTAGCGGCTCACCTCGGGCTACTACGTCGCTTCATCAAAGTTGGTGGAGTCGATCTC
                **  **** * * * *****
NODA1810      CTCGTGGCCGAAGTGGGGTTGTATGCGGTGCGCCCGGATCTCGAAGGACTTGAATCAGC
NODA1816      CTTGTGGCCGAAGTGGGATTGTATGCGGTCCGCCCGATCTCGAGGGGCTCGGAATAAGC
NODA2077      CTCGTTGCCGAAGTGGGCTTGTATGCGGTGCGCCCGGATCTCGAAGGCTTGAATCAGC
NODA1929      CTCGTGGCCGAAGTGGGGTTGTATGCGGTGCGCCCGGATCTCGAAGGACTTGAATCAGC
                ** * *****
NODA1810      CATGCCATGCGGGTGATGTATCCCATACTGCAGGATCTTGGCGTTCCATTTGGCTTTGGC
NODA1816      CACGCAATGCGCGTCATGTATCCAACTACTGCACGAGCTGGGCGTTCCGTTTGGCTTTGGC
NODA2077      CACGCAATGCGCGTGACGTATCCGATACTGCATGAGCTTGGGGTTCCATTCGGTTTTGGT
NODA1929      CATGCCATGCGGGTGATGTATCCCATACTGCAGGACCTTGGCGTTCCATTTGGCTTTGGC
                ** * *****
NODA1810      ACGGTTTCGGTCGGCGCTTGAGAAACATATGACGCGACTGGTCGAGAGGCAGGGGCTCGCC
NODA1816      ACGGTTTCGACGGCGCTCGAGAAACATATGACGCGACTGGTCCAAAGGCAGGGGCTCGCC
NODA2077      ACGGTTTCGGCTCGCGCTTGCGAAACATATGACGCGACTGGTCGAAAGGCAGGGGCTCGCC
NODA1929      ACGGTTTCGGTCGGCGCTTGAGAAACATATGACGCGACTGGTCGAGAGGCAGGGGCTCGCC
                ***** * *****
NODA1810      ACCCTGATGCATGGCATTTCGCGTCCGCTCCACGCAGCCGGATGTCTATCCAAATTTATCG
NODA1816      ACTCTTATGAATGGCATCCGCGTGCTCTCCACGCTGCCTGACGTCTATCCCAATTTGTCTG
NODA2077      ACCCTGATGTCGGGCATTTCGCGTCCGCTCCACGCATCCGGATGTCTATCCCACTTGTCTG
NODA1929      ACCCTGATGCATGGCATTTCGCGTCCGCTCCACGCAGCCGGATGTCTATCCAAATTTATCG
                ** * *****
NODA1810      CCGACCCGCATCGAAGACGTGGTCGTGGTGGTGTTCCTCCGTTGGAAGCTCGATCAGCGAA
NODA1816      CCGACCCGCATGGAAGACGTGATCGTGGTGGTGTTCCTCAGTTGGTCGCTCGATCACCAG
NODA2077      CCCATCCGCATCGAAGATGTGATCGTGGTGGTGTTCCTCCGTTAGGACGCGCAATAAGCGAG
NODA1929      CCGACCCGCATCGAAGACGTGGTCGTGGTGGTGTTCCTCCGTCGGAAGCTCGATCAGCGAA
                ** * *****
NODA1810      TGGCCGGCCGGGACTGTCATCGATCGGAACGGGCCC-----
NODA1816      TGGCCGGCCGGGACGGTGATTGATCGGAACGGGCCC-----
NODA2077      TGGCCGGCCGGGAACGCTCATCGATCGGAACGGGCCGAT-----
NODA1929      TGGCCGGCCGGGACTGTCATCGATCGGAACGGGCCCAGCTTGTGAA
                *****

```

Annexe 3. Alignement des séquences des gènes *nodA* des souches de *Lotononis bainesii*.

NOD1FB1R446	GGAAGTGGGTGGGAAAGTGAGTTGGATCTCGCTGACCACGCTGAACTCGCTGAATTCTT
NOD1FB1R4144	---AGTGGGTGGGAAAGTGAGTTGGATCTCGCTGACCACGCTGAACTCGCTGAATTCTT

NOD1FB1R446	GCGGAACGCCTACAACCCGAGCGGCGCGTATAATGCCAGGCCATTTGAAGGCGGTTCGCAG
NOD1FB1R4144	GCGGAACGCCTACAACCCGAGCGGCGCGTATAATGCCAGGCCATTTGAAGGCGGTTCGCAG

NOD1FB1R446	TTGGGCCGGTGCTAGACCAGAACTTCGTGCTATCGGCTACGACTCGAAGGGCGTTCGCAGC
NOD1FB1R4144	TTGGGCCGGTGCTAGACCAGAACTTCGTGCTATCGGCTACGACTCGAAGGGCGTTCGCAGC

NOD1FB1R446	CCACATAGCCGCACTACGCCGCTTCATCAAAATTGGGATGGTTGATTTACTCGTCGTCGA
NOD1FB1R4144	CCACATAGCCGCACTACGCCGCTTCATCAAAATTGGGATGGTTGATTTACTCGTCGTCGA

NOD1FB1R446	ACTGGGATTGTATGCAGTACGTTTGGATCTCGAGGGATTGCGAGTTAGTTATTCGATGCT
NOD1FB1R4144	ACTGGGATTGTATGCAGTACGTTTGGATCTCGAGGGATTGCGAGTTAGTTATTCGATGCT

NOD1FB1R446	CGAGCTGTATCCAGCTTTGAAAAACCTCGGTGTCCCTTTCGGGTTTGGCACAGTCCGGCC
NOD1FB1R4144	CGAGCTGTATCCAGCTTTGAAAAACCTCGGTGTCCCTTTCGGGTTTGGCACAGTCCGGCC

NOD1FB1R446	TGCGCTTCAGAAACACCTCACCAGGCTGCTCGGTAAGGCCGGTTTGGCGGCCACTGTGTC
NOD1FB1R4144	TGCGCTTCAGAAACACCTCACCAGGCTGCTCGGTAAGGCCGGTTTGGCGGCCACTGTGTC

NOD1FB1R446	CGGGGTTTCGCGTCCGTTCCACTCTCCGAGACATGAGCCTCGACATGCCACCGACGAGAGT
NOD1FB1R4144	CGGGGTTTCGCGTCCGTTCCACTCTCCGAGACATGAGCCTCGACATGCCACCGACGAGAGT

NOD1FB1R446	CGAGGACCTTCTGATCCTAATTTTCCCCATTCAACTGCCGGTCAGTCATTGGCCGCCAGG
NOD1FB1R4144	CGAGGACCTTCTGATCCTAATTTTCCCCATTCAACTGCCGGTCAGTCATTGGCCGCCAGG

NOD1FB1R446	TACACTAATTGATCGCAATGGACCAGAACTATGAAAGAAATTTAATTGTATATCCGAGTT
NOD1FB1R4144	TACACTAATTGATCGCAATGGACCAGAACTATGAAAGAAATTTAATTGTATATCCGAGTT

NOD1FB1R446	GTCCACCCGATGGGGTTCGAAGCGGAGACCGTTCCAGTGTATACCTGACCTTTGACGAAC
NOD1FB1R4144	GTCCACCCGATGGGGTTCGAAGCGGAGACCGTTCCAGTGTATACCTGACCT-----

NOD1FB1R446	GGCCCA
NOD1FB1R4144	-----

Annexe 4. Séquence nucléotidique du fragment XmaI de 7 kb contenant les gènes de nodulation.

```

1   CCCGGGAGAT AATTGCGAGC TGTACGTGCA ACAGAGCCTC CCGAACGGGG GCGGCGAGTT CTTCTGCACG
71  CGATGTTGGA ATAAGTTTGC GGCCCCTCAT AATAAATAGC TCATCACGGA AATAGGCGCG CAAACGCGCG
141 ACGGCCGCGC TCATGGCGGG TTGGCTCAGG TTGATGCTGC ATGCCGCGCG GGTGAGGTTT CGCTCTTTCA
211 TCAAAGCGTC GAGCGCGATG AGGAGATTGA GATCGAGGCC CTTGAAGCGC ATGTGCCAC CTATCCATCG
281 TTTGGATATG CTGCATCAAA ACAATCGATT TTACAAATGT CGCGGGCATA TAGCACATAA CGTGATGCCG
351 ATCTAGTTAG GTACGTCATC ATACCATGAG ATTCCCTTCC GACCTTTGCC CCAGCTCCGG AACAGGAGAG
421 CTGTCCGCGC GCTCGCAGGT GCGGTGGAGG CTGTGCTGGG AAAATGAGCT GGAACGCGC GACCATGCCG
491 AACTCGCCGA GTTCTGCGA AAGGCCACACA ACCCGAGTGG GACGTTTAAT GCAAGGCCAT TCGAAGGCGG
561 TCGAAGTTGG GCCGGCGCGA GACCTGAGGT CCGTGCAATC GGTTACGACT CGCGCGGCGT AGCGGCTCAT
631 ATAGCCGCAC TGCGTCGCTT CATCAAGGTT GGGGCGGTCG ATCTACTCGT CGCCGAACCTA GGATTGTACG
701 CGGTACGTCC GGACCTTGAG GGAATGCGAA TCAGTCATTC AATGCTCGTG ATGTATCCAG CCCTGAAGGA
771 GCTCGGCGTT CCATTCGGCT TCGGCACGGT TCGGCACGCG CTGCAGAAAC ATCTTACAAG GCTGCTCGGT
841 AAGGCCGGTC TAGCGACCAT CGTGTCGGG GTTCGCGTGC GGTCCACCCT CAGAGATATG CGTCTCGACA
911 TGCCGCCAC ACGGGTCGAG GACCTACTGA TCCTAGTTTT CCCGATTGGA AGGCCAATGA GCGATTGGCC
981 GGCTGGTACG ATAATTGATC GGAACGGGCC AGAGCTGTGA GACGCTCAA CTACTATCA GAACGCGCA
1051 GCGAGTGCGC TGACGGTAGA GGGCATCACA GCGTCTATTT GACCTTTGAT GACGGTCCGA ATCCACGTTG
1121 CACACCGGAT ATCCTTGATG TGCTGGCTGA ACACCGGGTG CCGGCGACGT TCTGCGTCAT TGGCGCGTAC
1191 GCAGCAAATG AGCCTGAAC AATCCAAAGA ATGATCGCAG AAGGGCACGA AGTCGCAAAT CACACGATGA
1261 CTCATCCGGA CCTATCCAGA AGCGAATCCG GTGAAATACA AAGGGAAATA CTATGGGCGA ACAGGGTCAT
1331 CAGGATGACA TGTCCCAAG CTTTGTTGCG GCACATGCGC GCGCCGTACG GCTCGTGGAC AGAAGAAGTG
1401 CTTACTACTG CAGCGAGGGC TGGACTAGCG GCCCTGCACT GGTCAGTAGA CCCGCGGGAC TGGTCTCGGC
1471 CTGGGGTAGA CGCGATTGTG GATGCAGTGC TGAGCTCTGT CCGTCCGGGT GCAATCGTGC TCTTGACGA
1541 CGGATGTCCT CCCAGCGAGT TGGCACCCTG CACTCACGCC GGTCTGCGAG ACCAAACCGT CGTTGCGCTT
1611 GCCCGCCTGA TTCCGGAATT GCATAGCCGC GGGTTTACAA TTCGCTCGCT TCCTCAACAT CACTGACCAG
1681 GCAGACAACC TATGGACGTG CTGCCCACAG CCAGCGCTAC CGCTGTTTCA TTGTATGCGG TACTCTCGA
1751 CTTTTTATAA AGGCATGCAG GTGTTTTATG CTCTGCCGAC AAACGTTTCA TCATCGGAGT CGGACAATCT
1821 GATCGACTCG GACGTTCTGC CGAGCGTAGA TGTCATCGTT CCCTGCTTTA ACGAGGACCC GTGCACGCTC
1891 TCTGCGTGCC TGGCTTCAAT TGCAAAGCAG GAATACGGCG GAAAACGCG GGTCTATGTG GTTGATGACG
1961 GTTCGGGAAA CCGCGATGCG GTAACGCCTG TACACGATTC CTACGCCAC GATCCGAGAT TTAACCTCAT
2031 TCTTCTCCGT AACAATATTG GAAAGCGCAA AGCACAGATC GCTGCGATAC GCCGTTTCAT AGGAGATTG
2101 GTGCTCAACA TCGACTCTGA TACGATAGCT GCCTCCGACG TGGTACGAA GCTTGCGTTG AAGATCGAGA
2171 ATCCATCAGT CGCGCGGCG ATGGGTGACC TGACAGCCAG TAATCGGAG GATACTTGGT TGACAGGTT
2241 GATCGATATG GAATACTGGC TAGCTTGTA CAGAGGAGCG CGGCGCGAAG CTCGTTTCGG TGCCGTTATG
2311 TGCTGCTGCG GCCCTTGTC TATGTACCGC AGGTCCGCGC TCCTTTTGTT GCTAGATCAG TACGAGACGC
2381 AAGTCTTTTC AGGTAAGCCA AGTGAATTCG GTGAGGATCG CCATCTCACG ATTCTAATGC TGAAAGCAGG
2451 CTTTCGAACC GAGTACGTCC CGGACGCCAT TGCGGCAACG GTCGTCCCGG ATAGGCTCGG TTCGTATCTG
2521 CGCCAACAAC TCCGCTGGGC ACGGAGCACT TACCGAGACA CGTTGCTCGC ACTGCGCCTG CTGCTGGCC
2591 TCGATCCCTT CCTCACCTA GACGTAGTCG GACAGAATCT CGGATCTCTA TTTCTCGCCC TTTCGTTAGT
2661 AACGGGGCTC GCGCAGCTCG CATTGACAGC TACAGTGCCG TGGTGGACAG GCTTAGTGAT CGCATCCATG
2731 ACCACAATTC GCTGCAGCGT GGCAGCGCTT CGTACTCGCC AGTTTCGATT TCTTGATTG TCTCTTACA
2801 CGCCCATCAA CGCTTTTCTG TTAATTCCTT TGAAAACCTA TGCATTGTGT ACATTGAGCA ATAGCAGTTG
2871 GCTGTCGCGC GAGTCTGCCA CTCTTGACA AAACAGGGAT GGAAAACAGA TCGCCATCCG AAACCTGGTC
2941 ATTGGATCGA ATACTACAGA GCTTTCGGGG ATTGTGGCGC TGCTTCGTAG GCTGGATCTC ACGCGAGATT
3011 CCTTGATGTT CGGTAAGCCT CCGCTGAGGG CCGCGGCCAC GGAGGCGAGC GTGCATTACG GCCGCCGAGA
3081 TCGCCAAACA GCAGAGCGTC GAGGTGACGC GCAGGGCGAT TGTTAGACT CGCGCCCTCT CATCTAGCA
3151 TCCGCCCTCC CGCTTGTTCA TAACGGGAAC TATACGTGGA TGTATTATGC GCGTATAAGG CATCATGCTG
3221 ACAGATGCTC TGGCGATTGC TTATATCGAG AACGGACGGC GCATTGTTTC GGCCGGGCAC AAGAAGCGGA
3291 GTCACAAGCT TCGGTATCCA ATTCTAGACG ATCTCGATGC AATTGTCGTC GCTTCGGGGG CGCACGATCT
3361 GGATGCGCCC CACGACGTTG ATCAGTTCTG GATCAGACGAC TTGGATGGGG AGGTGCGGTC TCTGCTCGAG
3431 ATCGTCACTG CCGTACCCGC TATCGCGCTC ATAGAGCCGC AGTGTGCCA ACACGAGCC GAGAGCCTTA
3501 TCATTTCTGC CGGCGGCTCC GCGGTGATGC TTCACGGAAG GGCTTTCTTG GCTCCATGTC TACAGCAGCA
3571 ATCGATCTTA CCAGCGTAAG GAAGTCATAC GGCGACAAGA TCGTTATCGA CGGGTTGTCG TTAATGTTG
3641 CGCCGGGAGA GTGCTTCGGC TTAATGAGGAC CGAACGGTGC AGGCAAGAGC ACGATCGCGC GTATGCTCCT
3711 CGGCATAGCA CCGCTTGACG CGGGCAAGAT CAAGGTGCTC GGCGAGCCAG TGCCGGCACG CATTCGCTTG
3781 GCACGCGCGC GCATCGGCGT GGTCCCTCAG TTCGACAACC TTGACCTTGA GTTACCGTA CGCGAGAGCC
3851 TGTTGGTGTT CGGGCGCTAC TTCAGCATGA GCGCTCGCGA TGTCGAAGCG GTCACGCCGT CACTCCTTGA
3921 GTTCGCCCGC CTCGAGGACA AGGCGAATGC ACGCATCGCT GACTTGTCG GCGGCATGAA GCGGCGCCTG
3991 ACGCTGGCGC GTGCGCTGAT CAATAACCCT CAGCTGCTGG TGATGGATGA GCCGACCACC GGCTCGATC
4061 CGCACGCGCG CCACCTGATC TGGGAACGCC TGCGCTCGCT GTTGCCCGC GGCAAAACGA TCCTTTTGAC
4131 GACCCACTTC ATGGAAGAGG CTGAGCGGTT GTGCGACCGA GTGTGTGTGC TTGAGGAAGG ACGCAAGATC

```

4201 GCCGAAGGCC GGCCTCACGC GCTGATCCAG GAGAAGATTG GCTGCCACGT GATCGAGATC TACGGCGGCA
 4271 ATCCGCATGA GCTGCGTACG CTGATCAGGC CGTACGCGCA GCACATCGAG GTGAGCGGCG AGACGCTTTT
 4341 TTGCTATGCG CCAGATCCAG AGCAGGTGCG GGTGCAGCTG CTTGGGCGCA CGGGGCTACG CCTTCTGCAG
 4411 CGTCCCCCGA ATCTTGAGGA TGTTTTTTTG CGGCTGACCG GGCGCGAGAT GGAGAAATGA ATGATAGGCG
 4481 AAGGTTATGC AGCGGCTCTG CCCTCCAACG CGTGGAACGT GCTCGCGGTA TGGCGCCGCA ACTGTCAGGC
 4551 GTGGAAGAAA GTCGCGCTTG CATCGGTTCT CGGGAATCTC GCCGATCCCA TGATCTATCT GTTTGGTCTC
 4621 GGCTTTGGCA TCGGGGTAAT GTTAGGTCAA GTTGAAGGCA CTCCATACAT CGCGTTTCTA GCGGCTGGGA
 4691 TGGTCGCGAC AAGCGCGATG ACCTCCGCGA CTTTCGAAAC GATTTATGCG GCTTTCGCTC GCATGCACGC
 4761 TCAGCGGACC TGGGAAGCAA TCCTGTGCAC GCAACTCACG CTCGGCGACA TCCTTCTCGG TGAATTAGCG
 4831 TGGGCAGCCA CAAGGGCCTT TCTGGCCGGG ACCGGAATTA CGATTGTTGC GGCCATGCTG GGCTATGCAG
 4901 CTTGGCCATC CTTCTCTAT GCGCTGCCGG CAATCGCCCT CACTGGTCTT GCGTTTGCAA GCCTAGCGAT
 4971 GGTCTGCACA GCGCTGGCGC CCAGTTACGA CTATTTCGTT TTTTACCAGA CTCTCTTCCT AACACCCATG
 5041 CTGTTCTTGT GCGGTGCGGT GTTTCGCGC GCTCAACTGC CAATCGCCTT TCAACACATA GCGACCGTCT
 5111 TGCCACTAGC ACATTCCGTC GATCTCGTTC GTGCAGCGAT GCTTGGCCGT CCGGCTGACA GCGTCGGCCT
 5181 GCATATCGGC ATACTTTGCG TATACGCAGT ATTGCCGTTT TTTTGTGCGA CTGCGCTGCT TGGTCGGCGC
 5251 CTCCTACGT GATCCCACCA CGTAAGAGTT AATTCAACCC CGAACCGTCG CGGCCAATCT TATCTGGAGG
 5321 CAGACTCAAT GAGCCGTCTA ACACCCCCGC CTGAGCCATT TGTAATCCTA GCAATGCCGA GAACGGGCAC
 5391 GCACTATCTG GAAGAATTGC TGAACGAGCA TCCGAACGTC TTGAGCAACG GTGAGCTGCT AAACCCGTAT
 5461 GATATGAATT GGCCCGATAA GGACCGCCTG CTCCGTAGCG ATTGCGAGCT CCTTGAGCTT GCCTACCTGC
 5531 GCTATCCTAC GCGGAGCACC AAGGCTAAAG TGACGCACGT TGGCTGCAAG ATCAACGAAC CTCAGTTTCG
 5601 CGACCGTCTT GGCTTATTTG GCGAGCTGGC CAATTGGCCG CGCCTCAAAG TCATCCTGGC ACGTCGCAGA
 5671 AACACATTGG AATCGCTTCG GTCGTTGGTG CAGGCAAGGC AGTCTGGCCA GTGGCTGAAG TTCAGTTCTG
 5741 ACAATGACGC AACTCCGCCG CCGCGTGTCA ATTTATCAAT CGCTGATTGC GAGGTCTACT TCAAGGCCGC
 5811 CGATGGTTTT CATGACCGGG TCGCGCGCTC CTTTGCCTCG ACTGACATGG TTGTGATCGA GTACGAGAGT
 5881 CTTATTCTTG ATCCCAACGC GTGTTTGGA TTGATTTGGA ATTTCTGGG AGTTCCAGCG CTTTACGCTC
 5951 CTGGTCGCGC GATCCTTCAG CGTCAGGAAT CGCGATCGCT GGACCAAACC GTGCAGAAAT TTCATGAGTT
 6021 GCGACACCAT TTCGCGGGTA GACCTTATGT ACGATTCTTC AAAGTGGGTG ATTTGTGATG GAACCACCGC
 6091 CGATTTACAC CATGACGGAC CTGTTCTGAT TGATGCGGTC GTGAACCGAA CTAAGACCGA CACATGATCC
 6161 CTGCCGACCA CCTCGCTCTG CCGAGCACCA TCATCCGTCC GAACCTCGCC ACATCGCGTG CCGGCTGAT
 6231 GCGGCAGCGG GCCTGCATCG TATGGCTGAC CGGGCTGTCT GGGGCGGGCA AGTCCACCCT GGCCAACTCG
 6301 GTCGAGACCC GCCTCGCGGC GGAGGACCGC CACGCCTACA TCCTCGATGG CGACAACCTG CGCAGCGGCC
 6371 TCAACCGAGA TCTCGGCTTC TCGGATGCCG ATCGCATCGA GAACATGCGC CGCACCCTCG AGGTGGCGCG
 6441 GCTGATGGCG GATGCGGGG TGATCGTGAT CGTTTCGCTG ATCTCGCCCT TCCGGCGCGA GCGTGCGCAG
 6511 GCGCGGAAAG CGGCTGGGG GGTGCCCTTC ATCGAGGTTT ACGTGGACGC GCCGCTGGCG GAGTGCGAGC
 6581 GGCGGGATCC CAAGGGGCTG TACCGGCGGG CGCGCCGCGG GGAGATCGCC CATTTACCGG GGATCGACTC
 6651 GCCCTACGAG GCGCCCGACG CGCCGGACCT GCGCCTGGAT ACGAGCGTGC TCACGCCCCA GCAGGCGGCC
 6721 GAGCGCCTCA TCGGCTACCT TCAGGAGCAT GTCCTCGGAC GATCATACTC GTCACTTAAG CCCTAGTTGT
 6791 TTGGTAGCAA CTTGAGCGTT ATTCGATCAG ATGGAAACAT ACCCAGCGCA GGCGATGAAG TTGGCGCACT
 6861 CGGCTGATGT GACGGCATCC ACCAGCCGGC CGATAGCAGC CCAGAGGCCC TCAAGATGGC ATAGCACTCG
 6931 ATGCCGCGCT CTTTCAGCAT TGCCACGATG GCCAGCAGCT CGACGGGCGA GCGGCCGAAC CGGTCGAGCC
 7001 GGAACACTGC CAGCGTGTCA CCGGGCCGCG CGTGGTCGAG CAAGTGCCAA CCAGGATACC CCGTGATGTT
 7071 CCGCCTCCGC CTGCTCGCCG GGCCGCTCGC CGCGCTGATC CTGCTGCCGC CCGCCGCCCG GG

ITS.C.hyssopifolia	AG.AG.GTGT	TCGGCTCCTC	GGTCCCCCTC	GTGTCGGGAG	G.....CGCC
ITS.C.perotteti	AG.AG.GCGT	TCGGCTCCTC	GGTCCCCCTC	GTGTCGGGAG	G.....CGCC
ITS.C.leuprieurii	AG.AG.GCGT	TCGGCTCCTC	GGTCCCCCTC	GTGTCGGGAG	G.....CGCC
ITS.C.atrorubens	AG.AG.GTGT	TCGGCTCCTC	GGTCCCCCTC	GTGTCGGGAG	G.....CGCC
ITS.C.sphaerocarpa	AG.AG.GTGC	TTGGCTCCTC	TGTCCCCCTC	CTGTCGGGAG	G.....CGTC
ITS.C.barkae	AGAAG.GTGT	TCGGCTCCTT	GGTCACCTC	GTGTCGGGAG	G.....CGTC
ITS.C.glaucoides	...GAGGTGC	TCGGCTCCTC	GGTCCACCTC	CTATCGGGAG	G.....CGTC
ITS.M.sativa	TGAGGTGTTT	TACACCTCGG	CTTACCTCTT	GGTTCAGAGG	
151					200
ITS.C.arenaria	ACACCTTGTTG	TGGCAT	CCTCTCGTTT	GAATAACAAA	AACCCGGCGC
ITS.C.retusa	ACACCTTGTTG	TGGTAT	CCTCTCGTTT	GAATAACAAA	AACCCGGCGC
ITS.C.comosa	GGACCTTGTTG	CGGTCGGTCT	CCTCCCGGTT	GAATAACAAA	AACCCGGCGC
ITS.C.lathyroides	GGACCTTGTTG	CGGTCGGTCT	CCTCCCGGTT	GAATAACAAA	AACCCGGCGC
ITS.C.ochroleuca	GGACCTTGTTG	CGGTCGGTCT	CCTCCCGGTT	GAATAACAAA	AACCCGGCGC
ITS.C.cylindrocarpa	GCACCTTGTTG	CGGTCT	CCTCCCGGTT	GAATAACAAA	AACCCGGCGC
ITS.C.goreensis	GCACCTTGTTG	CGGTCT	CCTCCCGGTT	GAATAACAAA	AACCCGGCGC
ITS.C.podocarpa	GCACCTTGTTG	CGGTCT	CCTCCCGGTT	GAATAACAAA	AACCCGGCGC
ITS.C.senagalensis	ACACCTTGTTG	CGGTAT	CCTCCCGGTT	GAATAACAAA	AACCCGGCGC
ITS.C.hyssopifolia	ACACCTTGTTG	CGGCAT	CCTCCCGGTT	GAATAACAAA	AACCCGGCGC
ITS.C.perotteti	GGACCTTGTTG	CGGTCT	CCTCCCGGCT	GAATAACAAA	AACCCGGCGC
ITS.C.leuprieurii	GGACCTTGTTG	CGGTCT	CCCCCGGCT	GAATAACAAA	AACCCGGCGC
ITS.C.atrorubens	GGACCTTGTTG	CGGTCT	CCTCCCGGCT	GAATAACAAA	AACCCGGCGC
ITS.C.sphaerocarpa	GCACCTTGTTG	TGGTCT	CCTCCCGGTT	GAATAACAAA	ACCCGGCGC
ITS.C.barkae	GCACCTTGTTG	CGGTCT	CCTCCTGGTT	GAATAACAAA	AACCCGGCGT
ITS.C.glaucoides	GCGCCTTGTTG	CGATCT	CCTCCCGGTT	GAATAACAAA	ACCCGGCGC
ITS.M.sativa	.AAGACGACG	AAGTGCGTCC	TCCTTTGTGC	CAAACTCAA	ACCCGGCGC
201					250
ITS.C.arenaria	TGAATGCGCC	AAGGAGATCA	AAATCGTTTA	GTGCA...CC	CCCGTGGGCT
ITS.C.retusa	TCAATGCGCC	AAGGAGAACG	AAATCGTTTA	GTGCA...CC	CCCGCGGGCT
ITS.C.comosa	CGAACGCGCC	AAGGAAATCG	AAATCGTTTA	GTGCG...CC	CCCGTCGGCT
ITS.C.lathyroides	TGAATGCGCC	AAGGAAATCG	AAATTGTTTA	GTGCG...CC	CCCGTCGGCT
ITS.C.ochroleuca	CGAACGCGCC	AAGGAAATCG	AAATCGTTTA	GTGCG...CC	CCCGTCGGCT
ITS.C.cylindrocarpa	CGAACGCGCC	AAGGAAATCG	AAATCGTTTA	GTGCA.CCCC	CCCGTCGGCT
ITS.C.goreensis	CGAACGCGCC	AAGGAAATCG	AAATCGTTTA	GTGCACCCCC	CCCGTCGGCT
ITS.C.podocarpa	CGAACGCGCC	AAGGAAATCG	AAATCGTTTA	GTGCA.CCCC	CCCGTCGGCT
ITS.C.senagalensis	TGAACGCGCC	AAGGAAATCA	AAATCGTTTA	GTGCA...CC	CCCGTGGGCT
ITS.C.hyssopifolia	CGAACGCGCC	AAGGAAATCG	AAATCGTTTA	GTGCA...CC	CCTGTGGGCT
ITS.C.perotteti	CGAACGCGCC	AAGGAAATCG	AAATCGTTTA	GTGCG...CC	CCCGTCGGCT
ITS.C.leuprieurii	CGAACGCGCC	AAGGAAATCG	AAATCGTTTA	GTGCG...CC	CCCGTCGGCT
ITS.C.atrorubens	CGAACGCGCC	AAGGAAATCG	AAATCGTTTA	GTGCG...CC	CCCGTCGGCT
ITS.C.sphaerocarpa	CTAACGCGCC	AAGGAAATCG	AAATTGTTTA	GTGCA...CC	CCCGGCGGCT
ITS.C.barkae	CGAACGCGCC	AAGGAAATCG	AAATCGTTTA	GTGCA...CC	CCCGTCGGCT
ITS.C.glaucoides	CGAACGCGCC	AAGGAAATTG	AAATCGTTTA	GTGCA...CC	CCCGGCGGCT
ITS.M.sativa	TGAATGCGTC	AAGGAATTTA	AATTTTGCTC	TGAGCACACC	TGCATGGCAC
251					300
ITS.C.arenaria	CGGAGACGGT	GCTTGTGCGG	GCGGTGATGC	GACACGCGTA	TCCGAAGGAC
ITS.C.retusa	CGGAGACGGT	GCTTGTGCGG	GCGGTGAAGC	GACACGTGTA	TTCGAAGGAC
ITS.C.comosa	CGGAGACGGT	GCTCGTGCGG	GCGGTGATGC	GACACGCGTA	TCCGAAAGAC
ITS.C.lathyroides	CGGAGACGGT	GCTCGTGCGG	GCGGTGATGC	GACACGCGTA	TCCGAGAGAC
ITS.C.ochroleuca	CGGAGACGGT	GCTCGTGCGG	GCGGTGATGC	GACACGCATA	TCCGAAAGAC
ITS.C.cylindrocarpa	CGGAGACGGT	GCTCGTGCGG	G.GGTGATGC	GACGCGCGTA	TCCGAAAGAC

ITS.C.goreensis	CGGAGACGGT	GCTCGTGCGG	G.GGTGATGC	GACGCGCGTA	TCCGAAAAGAC
ITS.C.podocarpa	CGGAGACGGT	GCTCGTGC.G	G.GGTGATGC	GACGAGCGTA	TCCGAAAAGAC
ITS.C.senagalensis	CGGA.AC	GCTCGAGCGG	GCGGTGAGGC	TACACGCGTA	TCCGAAGGAC
ITS.C.hyssopifolia	CCGAGGCGGT	GCTCGTGCGG	GCGGTGACGC	TACACGCGTA	TCCGAAGGAC
ITS.C.perotteti	CGAAGATGGT	GCTCGTGCGG	GCGGCGATGC	GACACGTGTA	TCCGAAAAGAC
ITS.C.leuprieurii	CGGAGACGGT	GCTCGTGCGG	GCGGCGATGC	GACACGCGTA	ACCGAAAAGAC
ITS.C.atrorubens	CGGAGACGGT	GCTCGTGCGG	GCGGTGATGC	GACACGCGTA	TCCGAAAAGAC
ITS.C.sphaerocarpa	CGGAGACGGT	GCTCGTGCGG	GCGGTGATGC	GACACGCGTA	TCCGAAAAGAC
ITS.C.barkae	CGGAGACGGT	GCTTGTGCGG	GCGGTGATGC	GACACGCGTA	TCCGAAAAGAC
ITS.C.glaucoides	CGGAGACGGT	GCTCGTGCGG	GCGGTGATGC	GACACGTGTA	TCCAAAAGAC
ITS.M.sativa	CGGAGACGGT	TTTCGTGCGT	GTTGTGTTTT	GACACATGAT	ATAGAATGAC

301

ITS.C.arenaria	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA
ITS.C.retusa	TCTCGGCAAC	GGATATCTTG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA
ITS.C.comosa	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA
ITS.C.lathyroides	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA
ITS.C.ochroleuca	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA
ITS.C.cylindrocarpa	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA
ITS.C.goreensis	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA
ITS.C.podocarpa	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA
ITS.C.senagalensis	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA
ITS.C.hyssopifolia	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA
ITS.C.perotteti	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA
ITS.C.leuprieurii	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA
ITS.C.atrorubens	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA
ITS.C.sphaerocarpa	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA
ITS.C.barkae	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA
ITS.C.glaucoides	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA
ITS.M.sativa	TCTCGGCAAC	GGATATCTAG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA

350

351

ITS.C.arenaria	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA
ITS.C.retusa	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA
ITS.C.comosa	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA
ITS.C.lathyroides	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA
ITS.C.ochroleuca	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA
ITS.C.cylindrocarpa	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA
ITS.C.goreensis	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA
ITS.C.podocarpa	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA
ITS.C.senagalensis	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA
ITS.C.hyssopifolia	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA
ITS.C.perotteti	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA
ITS.C.leuprieurii	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA
ITS.C.atrorubens	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA
ITS.C.sphaerocarpa	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA
ITS.C.barkae	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA
ITS.C.glaucoides	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTCTTTGA
ITS.M.sativa	TGCGATACTT	GGTGTGAATT	GCAGAATCCC	GTGAACCATC	GAGTTTTTGA

400

401

ITS.C.arenaria	ACGCAAGTTG	CGCCCGAAGC	CATTAGGCTG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG
ITS.C.retusa	ACGCAAGTTG	CGCCCGAAGC	CATTAGGCTG	AGGGCATGCC	TGCCTGGGTG

450

ITS.C.comosa	ACGCAAGTTG	CGCCCGAAGC	CATTAGGCTG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG
ITS.C.lathyroides	ACGCAAGTTG	CGCCCGAAGC	CATTAGGCTG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG
ITS.C.ochroleuca	ACGCAAGTTG	CGCCCGAAGC	CATTAGGCTG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG
ITS.C.cylindrocarpa	ACGCAAGTTG	CGCCCGAAGC	CATTAGGCTG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG
ITS.C.goreensis	ACGCAAGTTG	CGCCCGAAGC	CATTAGGCTG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG
ITS.C.podocarpa	ACGCAAGTTG	CGCCCGAAGC	CATTAGGCTG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG
ITS.C.senagalensis	ACGCAAGTTG	CGCCCGAAGC	CATTAGGCTG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG
ITS.C.hyssopifolia	ACGCAAGTTG	CGCCCGAAGC	CATTAGGCTG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG
ITS.C.perotteti	ACGCAAGTTG	CGCCCGAAGC	CATTAGGCCG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG
ITS.C.leuprieurii	ACGCAAGTTG	CGCCCGAAGC	CATTAGGCCG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG
ITS.C.atrorubens	ACGCAAGTTG	CGCCCGAAGC	CATTAGGCCG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG
ITS.C.sphaerocarpa	ACGCAAGTTG	CGCCCGAAGC	CATTAGGCCG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG
ITS.C.barkae	ACGCAAGTTG	CGCCCGAAGC	CATTAGGCCG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG
ITS.C.glaucoides	ACGCAAGTTG	CGCCCGAAGC	CATTAGGCCG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG
ITS.M.sativa	ACGCAAGTTG	CGCCCGATGC	CATTAGGTTG	AGGGCACGTC	TGCCTGGGTG

451

500

ITS.C.arenaria	TCGCCCATCG	TTGCCC.CAG	TGCCTTGGCC	TCATGCTAGG	CACCGAG...
ITS.C.retusa	TCGCCCATCG	TTGCCA.CAG	TTCCTTGGCC	TCATGCTAGG	CACCGAG...
ITS.C.comosa	TCGCCCATCG	TTGCCC.CAT	TGCTTTGGCC	TCGTGCTAGG	CACCGAG...
ITS.C.lathyroides	TCGCCCATCG	TTGCCC.CAT	TGCTTTGGCC	TCGTGATAGG	CACCGAG...
ITS.C.ochroleuca	TCGCCCATCG	TTGCCC.CGT	TGCTTTGGCC	TCGTGCTAGG	CACCGAG...
ITS.C.cylindrocarpa	TCGCCCATCG	TTGCCC.CAG	TGCCTTGGCC	TCGTGCTAGG	CACCGAG...
ITS.C.goreensis	TCGCCCATCG	TTGCCC.CAG	TGCCTTGGCC	TCGTGCTAGG	CACCGAG...
ITS.C.podocarpa	TCGCCCATCG	TAGCCC.CAG	TGCCTTGGCC	TTGTGCTAGG	CACCGAG...
ITS.C.senagalensis	TCGCCCATCG	TTGCCC.CAG	TGCCTTGGCC	TCGTGCTAGG	CACCGAG...
ITS.C.hyssopifolia	TCGCCCATCG	TTGCCC.CAG	TGCCTTGGCC	TCGTGCTAGG	CGCCGAG...
ITS.C.perotteti	TCGCCCATCG	TTGCCCTCAT	TGCCTTGGCC	TTGTGCTAGG	CACCGAG...
ITS.C.leuprieurii	TCGCCCATCG	TTGCCCTCAT	TGCCTTGGCC	TCGTGCCAGG	CACCGAG...
ITS.C.atrorubens	TCGCCCATCG	CTGCCCTCAG	TGCCTTGGCC	TCGTGCTAGG	CACCGAG...
ITS.C.sphaerocarpa	TCGCCCATCG	TTGCCC.CAG	TGCCTTGGCC	TCGTGCTAGG	CACCGAG...
ITS.C.barkae	TCGCCCATCG	TTGCCC.CAG	TGCCTTGGCC	TCGTGCTAGG	GACCGAG...
ITS.C.glaucoides	TCACCCATCG	TTGCC..TAG	TGACTTGGCC	TCGTGCTAGG	CATCGAG...
ITS.M.sativa	TCACATATCG	AATCCCCTTG	CCAATTTCCCT	ATTTATTAGG	TATTGCGTGC

501

550

ITS.C.arenaria	.CTGGGCGAA	TGCTGGCTTC	CCGTGAGCAA	AGCCTCACGG	TTGGTTTAAA
ITS.C.retusa	.CTGGGCGAA	TGCTGGCTTC	CCGTGAGCAA	AGCCTCACGG	TTGGTTGAAA
ITS.C.comosa	.CTGGGCGAA	TGCTGGCTTC	CCGCGAGCAA	CGCCTCACGG	TTGGTTGAAA
ITS.C.lathyroides	.CTGGGCGAA	TGCTGGCTTC	CCGCGAGCAA	CGCCTCACGG	TTGGTCGAAA
ITS.C.ochroleuca	.CTGGGCGAA	TGCTGGCTTC	CCGCGAGCAA	CGCCTCACGG	TTGGTTGAAA
ITS.C.cylindrocarpa	.CTGGGCGAA	TGCTGGCTTC	CCGCGAGCAA	CGCCTCACGG	TTGGTTGAAA
ITS.C.goreensis	.CTGGGCGAA	TGCTGGCTTC	CCGCGAGCAA	CGCCTCACGG	TTGGTTGAAA
ITS.C.podocarpa	.CTGGGCGAA	TGCTGGCTTC	CCGCGAGCAA	CGCCTCACGG	TTGGTTGAAA
ITS.C.senagalensis	.CTGGGCGAA	TGGTGGCTTC	CCGCGAGCAA	CGCCTCACGG	TTGGTTGAAA
ITS.C.hyssopifolia	.CTGGGCGAA	TGGTGGCTTC	CCGTGAGCAA	CGCCTCGCGG	TTGGTTGAAA
ITS.C.perotteti	.CTGGGCGAA	TGCTGGCTTC	CCGCGAGCAA	TGCCTCACGG	TTGGTTGAAA
ITS.C.leuprieurii	.CTGGGCGAA	TGTTGGCTTC	CCGCGAGCAA	CGCCTCACGG	TTGGTTGAAA
ITS.C.atrorubens	.CTGGGCGAA	TGCTGGCTTC	CCGCGAGCAA	CGCCTCACGG	TTGGTTGAAA
ITS.C.sphaerocarpa	.CTGGGCGAA	TGCTGGCTTC	CCGCGAGCAA	CGCCTCACGG	TTGGCTGAAA
ITS.C.barkae	.CTGGGCGAA	TGCTGGCTTC	CCGCGAGCAA	TGCCTCACGG	TTGGTTGAAA
ITS.C.glaucoides	.CTGGGCGAA	TGCTGGCTTC	CCGCGAGCAA	CGCCTCACGG	TTGGTTGAAA
ITS.M.sativa	AGGGTGAATA	TGTTGGCTTC	CCGTGAGCTC	TGTCTCGTGG	TTGGTTGAAA

Annexe 5 : Alignement multiple des séquences ITS obtenu chez 16 individus de la tribu des *Crotalariae*.

	1				50
ITS.C.arenaria	-----	-----GTA	GGTGAACCTG	CGGAAGGACA	TTGTCTGAAGC
ITS.C.retusa	-----	-----	-----	-----GATCA	TTGTCTGAAGC
ITS.C.comosa	-----	-----	AGGTGAACCTG	CGGAAGGACA	TTGTCTGAAGC
ITS.C.lathyroides	-----	-----	-----GAACCTG	CGGAAGGACA	TTGTCTGAAGC
ITS.C.ochroleuca	-----	-----GT	AGGTGACCTG	CGGAAGGACA	TTGTCTGAAGC
ITS.C.cylindrocarpa	-----	-----A	GGTGAACCTGC	GGAAGGA.CA	TTGTCTGAAGC
ITS.C.goreensis	-----	-----	---GAACCTGC	GGAAGGATCA	TTGTCTGAAGC
ITS.C.podocarpa	-----	-----	-----	-----GATCA	TTGTCTGAAGC
ITS.C.senagalensis	-----	-----	-----AACCTG	CGGAAGGACA	TTGTCTGAAGC
ITS.C.hyssopifolia	-----	-----	-----	---AAAGGACA	TTGTCTGAAGC
ITS.C.perotteti	-----	-----A	GGTGGAACCTG	CGGAAGGACA	TTGTCTGAAGC
ITS.C.leuprieurii	-----	-----	-----	---GGAAGGACA	TTGTCTGAAGC
ITS.C.atrorubens	-----	-----	-----GAACCTG	CGGAAGGACA	TTGTCTGAAGC
ITS.C.sphaerocarpa	TCGTAACAAG	GTTCCTCGTAG	GTGAACCTGC	GGAAGGATCA	TTGTCTGAAGC
ITS.C.barkae	-----	-----	-----	-----GATCA	TTGTCTGAAGC
ITS.C.glaucoides	-----	-----C	GTGAACCTGC	GGAAGGATCA	TTGTCTGAAGC
ITS.M.sativa	-----AAG	GTTCCTCGTAG	GTGAACCTGC	GGAAGGATCA	TTGTCTGATGC
	51				100
ITS.C.arenaria	CTCGCAAGCA	GTGCGACCCG	TGGATTTGTT	TGACATGTGA	GGGGATGGCT
ITS.C.retusa	CTTGCAAGCA	GTGCGACCCG	TGGATTTGTT	TGACATGTGA	.GGGATGGCT
ITS.C.comosa	CTCACAAGCA	GTGCGACCCG	CGAATTTGTT	TGACGTGTGA	.GGGATGGCT
ITS.C.lathyroides	CTCACAAGCA	GTGCGACCCG	CGAATTTGTT	TGACGTGTGA	.GGGATGGCT
ITS.C.ochroleuca	CTCACAAGCA	GTGCGACCCG	CGAATTTGTT	TGACGTGTGA	.GGGATGGCT
ITS.C.cylindrocarpa	CTCACAAGCA	GTGCGACCCG	CGAATTTGTT	TGACGTGTGA	.GGGATGGCT
ITS.C.goreensis	CTCACAAGCA	GTGCGACCCG	CGAATTTGTT	TGACGTGTGA	.GGGATGGCT
ITS.C.podocarpa	CTCACAAGCA	GTGCGACCCG	CGAATTTGTT	TGACGTGTGA	.GGGATGGCT
ITS.C.senagalensis	CTCACAAGCA	GTGCGACCCG	CGAATTTGTT	TGACGTGTGA	.GGGATGGCT
ITS.C.hyssopifolia	CTCACAAGCA	GTGCGACCCG	CGAATTTGTT	TGACGTGTGA	.GGGATGGCC
ITS.C.perotteti	CTCACAAGCA	GTGCAACCCG	CGAATTTGTT	TGACGTGTGA	.GGGGTGGCT
ITS.C.leuprieurii	CTCACAAGCA	GTGCAACCCG	CGAATTTGTT	TGACGTGTGA	.GGGATGGCT
ITS.C.atrorubens	CTCACAAGCA	GTGCGACCCG	CGAATATGTT	TCACGTGTGA	.GGGATGGCT
ITS.C.sphaerocarpa	CTCGCAAGCA	GTGCGACTCG	CGAATTTGTT	TTACGAGTGA	.GGGATGGCT
ITS.C.barkae	CTCGCAAGCA	GTGCGACCCG	CGAATTTGTT	TGACGTGTGA	.GGGATGGCT
ITS.C.glaucoides	CTCACAAGCA	GTGCGACCCG	CGAATTTGTT	TGACGTGTGA	.GGGATGGCT
ITS.M.sativa	CTTACATGCA	GTCCAACACG	TGAATCAGTT	TGA.ATACAT	ATGGTTGGCT
	101				150
ITS.C.arenaria	AGAGGCGTTC	TCGTCTCTCG	TCCCCCCTC	GTGTCGGGAG	G....CGCC
ITS.C.retusa	TGAGGTGTTT	TCGTCTCTCG	T..CCCCCTC	GTGTCGGGAG	G....TGCC
ITS.C.comosa	AGAGGTGT..	TCGGCTCCTC	GGTCCCCCTC	GTGTCGGGAG	G....CGCC
ITS.C.lathyroides	AGAGGTGT..	TCGGCTCCTC	GGTCCCCCTC	GTGTCGGGAG	G....CGTC
ITS.C.ochroleuca	AGAGGTGT..	TCGGCTCCTC	GGTCCCCCTC	GTGTCGGGAG	GGGCGCCGCC
ITS.C.cylindrocarpa	CGAGGTGTTG	TCGGCTCCTC	GGTCCCCCTC	GTGTCGGGAG	G....CGCC
ITS.C.goreensis	AGAGGTGTTG	TCGGCTCCTC	GGTCCCCCTC	GTGTCGGGAG	G....CGCC
ITS.C.podocarpa	AGAGGTGTTG	TCGGCTCCTC	GGTCCCCCTT	GTGTCGGGAG	G....TGCC
ITS.C.senagalensis	AG.AG.GTGT	TCGGCTCCTC	GGTCCCCCTC	GTGTCGGGAG	G....CGCC

	551				600
ITS.C.arenaria	ATTGAGTCCG	TGGTGGGTGG	CACCGTGGCG	GAT	GGTGGTTGAG
ITS.C.retusa	ATTGAGTCCA	TGGTGGGTGG	CACCGTGGCG	GAT	GGTGGTTGAG
ITS.C.comosa	ACTGAGTCCG	TGGTGGAGGG	CGGCGCCGTG	AC.GGATGGT	GGTTGTTGAG
ITS.C.lathyroides	ACTGAGTCCG	TGGTGGAGGG	CGGCGCCATG	AC.GGATGGT	GGTTGTTGAG
ITS.C.ochroleuca	ATTGAGTCCG	TGGTGGAGGG	CGGCGCCGTG	ACGGGATGGT	GGTTGTTGAG
ITS.C.cylindrocarpa	ACAGAGTCCG	TGGTGGAGGG	CGCCGTGACG	GAT	GGTGGTTGAG
ITS.C.goreensis	ACAGAGTCCG	TGGTGGAGGG	CGCCGTGACG	GAT	GGTGGTTGAG
ITS.C.podocarpa	ACAGAGTCCG	TGGTGGAGGG	AGCCGTGACG	GAT	GGTGGTTGAG
ITS.C.senagalensis	ACTGAGTCCG	TGGTGGGTGG	CGCCGTGACG	GAT	GGTGGTTGAG
ITS.C.hyssopifolia	ACTGAGTCCG	TGGTGGGTGG	CGCCGTGGCG	GAT	GGTGGTTGAG
ITS.C.perotteti	ACTGAGTTTG	TGGTGGAGGG	CGCCGTGACG	GAT	GGTGGTTGAG
ITS.C.leuprieurii	ACTGAGTCCG	TGGTGGAGGG	CGCCGTGACG	GAT	GGTGGTTGAG
ITS.C.atrorubens	AGTGAGTCCG	TGGTGGAGGG	CGCCGTGACG	GAT	GGTGGTTGAG
ITS.C.sphaerocarpa	ACTGAGTCCG	TGGTGGAGGG	CGTCGTGACG	GAT	GGTGGTTGAG
ITS.C.barkae	ACTGAGTCCG	TGGTGGAGGG	CGCCGTGACG	GAT	GGTGGTTGAG
ITS.C.glaucoides	ACTGAGTCCG	TGGTGTAGGG	AGTCGTGACG	GAT	GGTGGT..GA
ITS.M.sativa	ATTGAGACCT	TGGTAGGGTG	TGCCATGATA	GATGGTGGAT	GTGTGACCCA
	601				650
ITS.C.arenaria	T.AAGTGAAA	GCTTGAGACC	CATCGTGGTT	GTCACCCCTCA	CCGGCATTTCG
ITS.C.retusa	T.AAGTTAAA	GCTTGAGACC	CATCGTGGTT	GTCACCCACA	CCGGCATTTCG
ITS.C.comosa	TTAAAAGAAA	GCTCGAGACC	CATCGTGGGT	GTCATGCGCA	CCGGCATTTCG
ITS.C.lathyroides	TTAAAAGAAA	GCTCGAGACC	CATCGTGGGT	GTCATGCGCA	CCGGCATTTCG
ITS.C.ochroleuca	TTAAAAGAAA	GCTCGAGACC	CATCGTGGGT	GTCATGCGCA	CCGGCATTTCG
ITS.C.cylindrocarpa	T.AAAACAAA	GCTCGAGACC	CATCGTGGGT	GTCACCCGCA	CCGGCATTTCG
ITS.C.goreensis	T.AAAACAAA	GCTCGAGACC	CATCGTGGGT	GTCACCCGCA	CCGGCATTTCG
ITS.C.podocarpa	T.AAAAGAAA	GCTCGAGACC	CATCGTGGGT	GTCACAGGCA	CCGGCATTTCG
ITS.C.senagalensis	..CAAAGAAA	GCTCGGGACC	CATCGTGGTT	GTCACCCGCA	CCGGCATTTCG
ITS.C.hyssopifolia	..CAAGGAAA	GCTCGGGTCC	CATCGTGGTT	GTCACCCGCA	CCGGCATTTCG
ITS.C.perotteti	TTAAAAGAAA	GCTCGAGACC	CATCGTGGGT	GTCACCCGCA	CCGGCATTTCG
ITS.C.leuprieurii	TTAAAAGAAA	GCTCGAGACC	CATCGTGGGT	GTCACCCGCA	CCGGCATTTCG
ITS.C.atrorubens	TTAAAAGAAT	GCTCGAGACC	CATCGTGGGT	GTCACCCGCA	CCGGCATTTCG
ITS.C.sphaerocarpa	TAAAAG.AAA	GCTCGAGACC	CATCGTTGGT	GTCACCCGAA	CCGGCATTTCG
ITS.C.barkae	TATAAGAAAA	GCTTGAGACC	CATCGTGGGT	GTCACCCGCA	CCGGCATTTCG
ITS.C.glaucoides	GTAAAAGAAA	GCTCGAGATC	CATCGTTGGT	GTCACCCGCA	CCGGCATTTCG
ITS.M.sativa	CGAGACCAAA	TCATGTGCAG	CTCTATTGAA	CGTGGACTCT	TTTACCCACA
	651				700
ITS.C.arenaria	GAC.TCTATG	ATCCATGAGC	GTCTGTTGGT	CGCCCATGAC	GGGACCTCAG
ITS.C.retusa	GACTTCTATC	ATCCATGAGC	GCCTATTGGT	CGCCCATGAC	GGGACCTCAG
ITS.C.comosa	GAC.TCTGTG	ATCCATGAGC	GTCTCTTGGT	CGCCCAAGAC	GGGACCTCAG
ITS.C.lathyroides	GAC.TCTATG	ATCCATGAGC	GTCTCTTGGT	CGCCCAAGAC	GGGACCTCAG
ITS.C.ochroleuca	GAC.TCTGTG	ATCCATGAGC	GTCTCTTGGT	CGCCCAAGAC	GGGACCTCAG
ITS.C.cylindrocarpa	GAC.TCTATG	ATCCATGAGC	GTCTGTTGGT	CGCCCAAGAC	GGGACCTCAG
ITS.C.goreensis	GAC.TCTATG	ATCCATGAGC	GTCTGTTGGC	CGCCCAAGAC	GGGACCTCAG
ITS.C.podocarpa	GAC.TCTATG	ATCCATGAGC	GTCTGTTGGT	CGCCCAAGAC	GGGACCTCAG
ITS.C.senagalensis	GAC.TCTATG	ATCCATGAGC	GTTTGTGGT	CGCCCAAGAC	GGGACCTCAG
ITS.C.hyssopifolia	GAC.TCTACG	ATCCATGAGC	GTCTGTTGGT	CGCCCAAGAC	GGGACCTCAG
ITS.C.perotteti	GAC.TCTATG	ATCCATGAGC	GTCTCTTGGT	CGCCCAAGAC	GGGACCTCAG
ITS.C.leuprieurii	GAC.TCTATG	ATCCATGAGC	GTCTCTTGGT	CGCCCAAGAC	GGGACCTCAG
ITS.C.atrorubens	GAC.TCTATG	ATCCATGAGC	GTCTCTTGGT	CGCCCAAGAC	GGGACCTCAG

ITS.C.sphaerocarpa	GAC.TCTATG	ATCCATGTGC	GTCTGTTGGT	CGCCCAAGAC	GGGACCTCAG
ITS.C.barkae	GAC.TCTATG	ATCCATGAGC	GTCTGTTGGT	CGCCCAAGAA	GTGACCTCAG
ITS.C.glaucoides	GAC.TCTATG	ATCCATT---	-----	-----	-----
ITS.M.sativa	TGTGTTTAT	AACGCTCGTG	ATGAGACCTC	AGGTCAGGCG	GGGCTACCCG
	701				750
ITS.C.arenaria	GTCAGGCGAG	GCTACCCGCT	GAGTTTAAAGC	-----	-----
ITS.C.retusa	GTCAGGCGAG	GCTACCCGCT	G-----	-----	-----
ITS.C.comosa	GTCAGGCGGG	GCT-----	-----	-----	-----
ITS.C.lathyroides	GTCAGGCGGG	GCTCAC----	-----	-----	-----
ITS.C.ochroleuca	GTCAGGCGGG	GCTACCCGCT	GAGTTTAAAGC	-----	-----
ITS.C.cylindrocarpa	GTCAGGCGGG	GCTCACCCGC	TGAGTTTAA~	-----	-----
ITS.C.goreensis	GTCAGGCGGG	GCT.ACCCGC	TGAGTTT---	-----	-----
ITS.C.podocarpa	GTCCAGGTCC	AGGCGGGGCT	-----	-----	-----
ITS.C.senagalensis	GTCAGGCGAG	GCTCACCCGC	TGAGTTTAA~	-----	-----
ITS.C.hyssopifolia	GTCAGGCGAG	G-----	-----	-----	-----
ITS.C.perotteti	GTCAGGCGGG	GCTCACCCGC	TGATTTAAACA	-----	-----
ITS.C.leuprieurii	GTCCAGG---	-----	-----	-----	-----
ITS.C.atrorubens	GTCAGGCGGG	GCTAC-----	-----	-----	-----
ITS.C.sphaerocarpa	GTCAGGCGGG	GCTA-----	-----	-----	-----
ITS.C.barkae	GTCAGGCGGG	GCTACC----	-----	-----	-----
ITS.C.glaucoides	-----	-----	-----	-----	-----
ITS.M.sativa	CTGAATTTAA	GCATATCAAT	AAGCGGAGGA	AAAGAAACTA	ACAAGGATTC

Annexe 6. Séquence nucléotidique du clone STM 245 contenant le gène *mxaF*, (position 1583 à 3472).

```

1  gcatgcgctg atcgacaaaag tcttgcatta ccttttgccga cgcgctggaa cacattcggg cgccgatgcc
71  ttgcgggcga gtcacgtccg cgggctcacg atcgcagcac cgaccaccga cagcctcttc tcgcaagacg
141  ccatcggcgc ggcgcttgcg cctgtgtttg agcttgggct gccaatcgct ctttaccagc tgccgcaggt
211  gactgggaac acgatgacac cggaaactgt tgcgtgggct ggcgagcgct ttccgaatct gctcctgttc
281  aaggacagca ggcgcaggga tgaagtggct gctgtcaggc cgaatgcccg caggagtgcg gctcctgcgc
351  ggcgcgaggg gcgactatgc tcaatggagc aaagcacatg gtggcgtgta tgacggcttc ctgctcagca
421  gtgccaacgc cttcccggcc cagctcgcga cagtgcgcga acatctccag cacgggcgca ttgcagaagc
491  tgaacggtgc tcggcggcca tttcggcagc ggttgccgac gcttttgcgg ccgtcgtcga ggtgcggcag
561  ggcaatgcat tcacgaacgc gaacaaggct cttgctcata tcatggccta tggcgtgac ggcctcgaag
631  caccgcgcgc gaggtcttat gccggcggtc atcttccgca ctcgaccctg aaaacggtta tggagtccct
701  gaccgcgaat gggctcctac ccggacgcgg ttaccttgag aaccgtgggt gaggtgaac accggtctca
771  atcgcaacaa ggtctattca cgcaagcatg gaacgagacc gacagaggac aagaggttga ggatgttgct
841  tctgagaagc aactttggga acaccgtcac tgggaaagcc ggccaaacaa gccgtcgtcg tgccggcggc
911  tgaaggcgcc ataagccgtt tagcgcggcg gcagatcctt ggcggtcagc cgcaagcga tcccgcctcg
981  caggactgtaa aagaccgcgc tcaggatctc gcgagggcgc cagacgggcg gtcggccttg acccgccaga
1051  aggtcgttgc tcgacagacc tcggaagctc cgtgcgcata cagctggcca accttgcaaa agtccaagcg
1121  ctgcccttcg agaattgtcg cagcgacagc cggaaactgt cctatcggca cgttgccctc atagagcacc
1191  gcaacgaact cggcgccgac tctgtccgcg aaccgctgca aatgcttggg gtgtttgttc tctaaccggt
1261  cagtactttc gacgcaaggg cagcatttgc ggtctgttcg ccagcgtcga gacgctgac cggatcctat
1331  gaaggtgcgc gtgcgataaa ttgccaaatt atcccagcat gaaattgaaa ttgtcctaca gacaccact
1401  gccaggtgac gtatgaacga gagcatcttg agcataata agtgattttt aaatcttatg aagcacatat
1471  aataaaaaatc attaggaata tacacaaaca tcacggttcc aatgcttctc gatgcgtgaa cagaaactgc
1541  tccgcggctg tgtgggcggg gatatgcaga tgaggagcgc acatgctggg taagattgtg gttcgttgct
1611  ggacgggggt gtcagtggct gccctggcgg cgtcgtcgcg gctcgcggc ccttcggcgc tcgcaacga
1681  caagctcgtc gagctgtcga agagcgacgg aaactgggtg atgcccgga agaactacga ctccgacaac
1751  tacagcaagc tgaagcagat caacgccgag aacgtcaaga acctgaaggt gtcgtggcag ttctcgaccg
1821  gactgctgaa cggccacgaa ggcgcgccgc tcgtcgtcga cggcacgatg tacgtgcaca cctcgttccc
1891  gaacaacacc ttgcgctcgc gcctggacga tccgggcaag atcctgtggc aggacaagcc caagcagaac
1961  ccggcgccgc gtcggtggc ctgctgcgac ctgcgcaacc gcggcctcgc ctattggccg ggcgacggca
2031  agaccccgtc cctgatectc aagacgctgc tcgacggcca cgtcgtggcc ctcaacgccc agacgggca
2101  gaccgtctgg aagatcgaga attccgatat ccgggtcggc tcgacgctca ccatcgcccc ctatgtgttc
2171  aaggacaagg tgatcatcgg ctcttcgggc gccgaactcg gcgtgcgcgg ctatctcacc gcctacgacg
2241  tccgcacggg cgagcagaag tggcgcgcct acgccacggg tccggattcc gacctgtgcg tggcaaggga
2311  cttcaacatc cacaacgccc attacggcca gaaggggctc ggcaccctga cctgggaggg cgacgcctgg
2381  aagatcgccg gcggcaccaa ttggtctggg tacgcctatg accccggcac caacctgatc ttttcggca
2451  ccggcaaccc ggcgccctgg aacgagacca tgcgtccggg cgacaacaag tggacgatga ccatcttcgc
2521  ccgcgacgtc gataccggcg aggccaaagt cggctaccag aagacgccgc acgacgagtg ggattacgcg
2591  ggcgtcaacg tgatgatgct ctgacccag aaggaccgga gcggcaagga gcgcaagctg ctgacgcac
2661  cggaccgcaa cggcatcgtc tacaccctcg accgcacca cggcgacctg atctccgccc acaagatcga
2731  cgacaccgtc aacgtcttca agaccgtcga cctcaagtgc ggcctgccgg tgcgcgatcc ggaatacggc
2801  acccggtatg accatctcgc caaggacatc tgtccctccg cgatgggcta tcacaaccag ggccacgatt
2871  cctatgatcc ggagcgcaag ctcttctaca tgggcatcaa ccacatctgc atggattggg agcccttcat
2941  gctgccctac cgcgcggggc agttcttcgt cggcgcgacg ctcaacatgt atccgggccc gaagggcgac
3011  cgccagaacg ccgagggcct cggccagatc aaggcctacg acgccatcac cggcaagttc aaatgggaga
3081  agatggagcg tttcgcggtc tggggcgga cgtcgcgcac cgccggcaac gtggtcttct acggaacct
3151  ggacggcttc atcaaggcgc gccactccga cacgggtgaa ctgctctgga aggcgaagct gccctcgggc
3221  gcgatcggct atcccgttac ctacaccac aagggcacc agtacgtggc gatctactac ggcgtcggcg
3291  gttggccggg cgtcggcctc gtcttcgacc tgcaggatcc gaccgcggc ctcggcgcgg tcgggcctt
3361  caagaagctc gccaaactaca ccagatggg cgggtggcgtg accgtgttct cctcgcagcg caagggctcc
3431  tacgacgacc cgaataccgg cgagtacgtg cgggccaact gactagccag ggccgggccc tcatcgcccc
3501  ggcccgtccc cttgggcctg attgtcacgg attgagagca tgc

```

RESUME

Grâce à leur capacité à fixer l'azote, les petites légumineuses tropicales spontanées jouent un rôle majeur dans le maintien de la fertilité des sols des jachères africaines. Après avoir constitué une collection de rhizobiums à croissance lente, isolés des légumineuses de jachères, nous avons d'abord montré la grande diversité de ces souches en utilisant les techniques SDS-PAGE et ARDRA. Elles forment plusieurs groupes phylogénétiques différents au sein du genre *Bradyrhizobium*.

Nous avons découvert que plusieurs espèces de *Crotalaria* (*C. podocarpa*, *C. glaucoides* et *C. perrottetii*) présentaient une spécificité de nodulation, ne formant des nodules qu'avec des souches à croissance rapide. Leur caractérisation génotypique et phylogénétique montre qu'elles appartiennent au genre *Methylobacterium* et constituent une nouvelle espèce que nous avons nommée "*Methylobacterium nodulans*". L'étude des gènes de nodulation a montré que "*M. nodulans*" est la première espèce de *Methylobacterium* symbiotique connue à ce jour. Elle contient un gène *nodA* proche de celui des *Bradyrhizobium*, suggérant ainsi un transfert latéral de gènes.

La mise en évidence du gène *mxoF* qui code pour la grande sous-unité de la Méthanol deshydrogénase qui intervient dans l'oxydation du méthanol et l'étude de sa fonctionnalité, démontrent que "*M. nodulans*" est méthylotrophe facultatif, caractère unique chez les rhizobiums. L'utilisation de mutants spontanés semble montrer que cette propriété ne jouerait pas un rôle dans l'infection et le développement du nodule dans la symbiose. La découverte des *Methylobacterium* ouvre d'importantes perspectives dans l'utilisation des légumineuses à des fins écologiques notamment dans la dépollution biologique.

TITLE. Characterization of *Methylobacterium nodulans*, a new bacterium nodulating the legume *crotalaria*.

ABSTRACT

Through their nitrogen fixing ability, tropical spontaneous legumes, too often considered as weeds, play an important role in maintaining soil fertility and nitrogen balance in African fallow lands. Isolation and characterization of a large collection of slow-growing rhizobia by SDS-PAGE and ARDRA methods showed a great diversity among these strains, which form several phylogenetic groups within the *Bradyrhizobium* genus. However, we evidenced that SDS-PAGE was not a method to be used for characterization of *Bradyrhizobium*.

Nodulation tests on numerous species of small legumes revealed that some plant species belonging to the genus *Crotalaria* (*C. podocarpa*, *C. glaucoides* and *C. perrottetii*) are highly specific and are exclusively nodulated by fast growing strains. Genotypic and phylogenetic studies showed that these specific *Crotalaria* rhizobia belong to the genus *Methylobacterium* and constitute a new species for which we propose the name "*Methylobacterium nodulans*". "*M. nodulans*" is the first symbiotic *Methylobacterium* species known so far. The close phylogenetic relationship between "*M. nodulans*" and *Bradyrhizobium nodA* gene suggests a lateral gene transfer.

Isolation of a functional *mxoF* gene encoding the α - sub-unit of MDH, the enzyme which catalyses methanol oxidation, demonstrates that "*M. nodulans*" is a facultative methylotrophic bacterium, a unique feature among rhizobia. By using spontaneous mutants, it seems however that methylotrophy does not play an important role in nodule infection and development. Nevertheless, because of the ability of *Methylobacterium* to metabolize various pollutants, the *Methylobacterium*-legumes symbiosis might play an important ecological role, notably in road sides and urban environments depollution.

DISCIPLINE. Ecologie Microbienne

MOTS-CLES. Légumineuses spontanées, *Crotalaria*, Spécificité, *Methylobacterium*

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE DE RATTACHEMENT

Institut de Recherche et Développement

Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM)

UMR 113, Campus International de Baillarguet,

TA10J, 34398 Montpellier Cedex, France