

50376

1993

169

50376

1993

de 169

THESE de DOCTORAT de l'UNIVERSITE
Sciences et Technologies de Lille

RETOUR

MICROBIOLOGIE

Présentée par

Nicolas DUPUY

pour obtenir le titre de DOCTEUR de l'UNIVERSITE
de Lille

Sujet de la thèse :

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA
SYMBIOSE FIXATRICE D'AZOTE ENTRE
ACACIA ALBIDA ET BRADYRHIZOBIUM SP.**



Soutenance le 16 Juin 1993 devant la commission d'examen

M. R. Tailliez, Professeur à l'Université de Lille I, Président
Mme M. Gillis, Professeur à l'Université de Gand (Belgique), Rapporteur
M. G. Truchet, Directeur de Recherche au CNRS, Rapporteur
M. B. Dreyfus, Directeur de Recherche à l'ORSTOM, Examineur
M. J. C. Derieux, Professeur à l'Université de Lille I, Examineur
M. R. Blondeau, Professeur à l'Université de Lille I, Examineur

Résumé

Quatre vingt quatre isolats nodulant *Acacia albida* ont été obtenus à partir de sols recueillis à différentes profondeurs depuis la surface jusqu'au niveau de la nappe d'eau. Ces prélèvements ont été effectués dans les régions sahéliennes et soudano-guinéennes du Sénégal. La densité des populations bactériennes est sensiblement plus élevée au voisinage de la nappe qu'en surface, atteignant $1,3 \times 10^3$ /g de sol à 34 m dans la zone sahélienne. Dans la zone soudano-guinéenne, la densité qui atteint 10^4 bradyrhizobia par g de sol en profondeur, est comparable à celle des sols cultivés tempérés.

La position taxonomique des isolats de surface et de profondeur et les relations qui existent entre eux ont été déterminées par SDS-PAGE. La plupart de ces isolats appartiennent à 11 groupes électrophorétiques contenant des souches de référence de *Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium* sp. Plusieurs isolats constituent de nouveaux groupes dans le genre *Bradyrhizobium*. Ils ont aussi été caractérisés en utilisant les galeries Biolog, une nouvelle technique phénotypique miniaturisée. Enfin des hybridations ADN:ARNr avec l'ARNr spécifique de *Bradyrhizobium japonicum* NZP 5549^T ont confirmé que la plupart des isolats appartiennent à la branche ARNr de *Bradyrhizobium* et de *Rhodopseudomonas*. Les caractéristiques d'un isolat sont indépendantes de la profondeur à laquelle il a été recueilli.

L'étude de l'infection et de l'ontogénèse des nodules d'*Acacia albida* a montré plusieurs caractères intéressants. L'inoculation a pour effet l'induction de poils absorbants et de mitoses corticales précédant l'infection. Le mode d'infection intercellulaire conduit à la formation de cordon dans les cellules corticales externes. Le méristème est induit au niveau des cellules corticales internes. L'invasion des cellules méristématiques et la différenciation disto-proximale observées sont caractéristiques des nodules de type indéterminé. Toutefois à maturation, les nodules d'*Acacia albida* sont de type déterminé avec un tissu central unique entouré de tissus périphériques.

Abstract

Eighty-four *Acacia albida* nodulating isolates were recovered at different depths from the surface down to the water table level in sahelian and sudano-guinean areas in Senegal. Populations density of bacteria was substantially greater near the water table than near the surface, reaching 1.3×10^3 /g of soil at 34 m deep in sahelian area. In the sudano-guinean area, the density reaches 10^4 rhizobia per g of soil at several depths and were comparable to that of temperate soils.

The taxonomic position of the isolates from surface and deep soil and the relationships between them were characterized using SDS-PAGE. Most isolates were subgrouped into 11 electrophoretic clusters containing reference strains of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium* sp. Several isolates constitute new clusters in the *Bradyrhizobium* genus. Isolates were also characterized by using Biolog test, a new miniaturized phenotypical technique. DNA:rRNA hybridizations with specific rRNA from *Bradyrhizobium japonicum* NZP 5549^T have confirmed that most of the isolates belong in the *Bradyrhizobium-Rhodospseudomonas* rRNA complex. There was no evident relationship between the characteristics of an isolate and the depth at which it was collected.

The study of the *Acacia albida* infection and nodule development have shown several interesting characteristics. The inoculation involves roots hairs induction and cortical mitosis before infection. The intercellular infection process leads to the formation of a thread in the external cortical cells. The nodule meristem is induced in internal cortical cells. Formation of the nodule involves invasion of meristematic cells and disto-proximal differentiation, i.e. two steps occurring in the formation of indeterminate nodules. However, the mature nodule exhibited the histological characteristics of a determinate nodule.

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été effectuée au laboratoire de Microbiologie du centre de Recherches ORSTOM-ISRA de Dakar (Sénégal) dirigé par Bernard Dreyfus, Directeur de Recherche. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour son accueil, son soutien, son intérêt à mes travaux de recherches et sa sympathie. Je remercie les chercheurs, techniciens et personnels, locaux ou expatriés, constituant l'équipe du laboratoire de Dakar à laquelle je me suis senti totalement intégré.

Je remercie Monsieur R. Tailliez, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois, qui m'a permis d'effectuer cette Thèse dans le cadre de la formation universitaire de troisième cycle "Sciences de la Vie et de la Santé". Je suis par ailleurs sensible à l'honneur qu'il me fait de présider la commission d'examen et à celui que me font Messieurs J. C. Derieux et R. Blondeau de juger ce travail.

Mes remerciements chaleureux à Monsieur Karel Kersters et Madame Moniek Gillis, Professeurs au laboratoire de Microbiologie de l'Université de Gand (Belgique), et à tous ceux qui au sein de leur groupe m'ont initié aux techniques de taxonomie et ont participé à la réalisation de ce travail.

Je remercie Georges Truchet, Directeur de Recherche, responsable du groupe de Cytologie dans le laboratoire CNRS-INRA de Castanet Tolosan dirigé par P. Boistard. J'exprime toute ma sympathie à Françoise de Billy et Jacques Vasse, que j'ai parfois sollicités et qui m'ont donné de précieux conseils.

Toute ma sympathie va également à l'équipe du département de Biologie Animale de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar où j'ai été initié aux techniques de Cytologie.

J'adresse toute ma considération à Monsieur E. Duhoux, Directeur du laboratoire CIRAD Forêt de Nogent sur Marne, qui, grâce à son accueil, m'a permis d'apporter les corrections à ce mémoire.

Ces trois années passées au Sénégal n'ont pas seulement été enrichissantes sur le plan professionnel mais l'ont aussi été sur le plan humain. Merci à tous mes amis du Sénégal.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE

Avant propos	15
I. <i>Acacia albida</i>	19
1. Taxonomie	19
2. Caractères morphologiques, botaniques et anatomiques.....	19
3. Caractéristiques d'<i>Acacia albida</i>	20
3.1. Aire de répartition	20
3.2. Ecologie.....	20
3.3. Particularité et utilisation de l'espèce.....	23
II. Les micro-organismes associés aux légumineuses	27
1. Les techniques de classification des micro-organismes.....	27
2. Classification des bactéries fixatrices d'azote.....	29
III. L'établissement de la symbiose <i>Rhizobium</i>-légumineuse	35
1. Diversité des modes d'infection et du développement des nodules.....	36
1.1. Les modes d'infection.....	36
1.1.1. Evènements préliminaires à l'infection.....	36
1.1.2. Infection par les poils absorbants.....	37
1.1.3. Infection intercellulaire par "Crack entry"	37
1.1.4. Infection intercellulaire	39
1.2. Le développement des nodules.....	39
1.3. Organisation du nodule mature.....	40
2. Mécanismes moléculaires de la nodulation.....	41
2.1. Etude génétique du partenaire bactérien	42
2.1.1. Les gènes de nodulation ou gènes <i>nod</i> et <i>nol</i>	42
2.1.1.1. Les gènes <i>nod</i> communs	43
2.1.1.2. Les gènes <i>nod</i> spécifiques	43
2.1.1.3. Les gènes régulateurs.....	43
2.1.2. Les signaux symbiotiques bactériens	44
2.2. Etude génétique du partenaire végétal	45

CHAPITRE I

ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES ^{SOUCHES} ISOLATS NODULANT *ACACIA ALBIDA*

INTRODUCTION.....	48
MATERIEL ET METHODES	48
1. Sites géographiques d'étude.....	48
2. Méthode d'échantillonnage	49
3. Culture aseptique d' <i>Acacia albida</i>	52
3.1. Stérilisation et germination des graines	52
3.2. Culture d' <i>Acacia albida</i> en tube	52
4. Dénombrement des bradyrhizobia nodulant <i>Acacia albida</i>	53
4.1. Préparation des dilutions du sol à dénombrer.....	53
4.2. Inoculation d' <i>Acacia albida</i>	53
4.3. Calcul du nombre de bradyrhizobia capables de noduler <i>Acacia albida</i>	54
5. Piégeage des bradyrhizobia en gaines.....	54
6. Isolement et culture des bradyrhizobia.....	54
6.1. Milieu de culture	54
6.2. Isolement des souches.....	55
7. Mesure de l'activité réductrice d'acétylène	55
7.1. Principe et conditions expérimentales	55
7.2. Protocole expérimental.....	56
8. Mise en collection des souches.....	56

RESULTATS.....	57
I. La nodulation chez <i>Acacia albida</i>	57
II. Distribution des populations de <i>Bradyrhizobium</i> se développant sous le couvert d' <i>Acacia albida</i> dans les zones sahélienne et soudano-guinéenne.....	58
III. Corrélation entre la présence d' <i>Acacia albida</i> et la densité des populations de <i>Bradyrhizobium</i> dans les sols.....	59
IV. Isolement bradyrhizobia	60
V. Activité réductrice de l'azote atmosphérique des isolats de <i>Bradyrhizobium</i>	62
VI. Analyse des échantillons de sol prélevés à partir du forage de Louga	62
DISCUSSION	65
ANNEXE.....	68

CHAPITRE II

ETUDE TAXONOMIQUE DES ISOLATS NODULANT ACACIA ALBIDA

INTRODUCTION.....	70
MATERIEL ET METHODES	71
1. Electrophorèse SDS-PAGE et analyse numérique des profils protéiques.....	71
1.1. Electrophorèse SDS-PAGE d'extraits protéiques bactériens.....	71
1.2. Analyse des profils protéiques.....	72

2. Galeries Biolog (Biolog Inc., Hayward, Californie) ...	73
3. Hybridations ADN : ARNr.....	75
4. Souches de référence et souches types.....	75
RESULTATS.....	78
I. Electrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE).....	78
II. Système Biolog.....	86
III. Comparaison des techniques SDS-PAGE et Biolog.....	89
IV. Hybridations ADN:ARNr	92
DISCUSSION.....	93
ANNEXE.....	98

CHAPITRE III

ETUDE DE L'INFECTION ET DU DEVELOPPEMENT DES NODULES DE RACINES D' ACACIA ALBIDA

INTRODUCTION.....	100
MATERIEL ET METHODES	101
1. Fixation du matériel	102
2. Traitements du matériel fixé.....	102
2.1. Coupes au vibratome.....	102
2.2. Coupes au microtome.....	102
2.2.1. Déshydratation	102
2.2.2. Imprégnation dans la résine d'inclusion.....	103

2.2.3. Inclusion et polymérisation.....	103
2.2.4. Microtomie.....	103
2.2.4.1. Coupes semi-fines.....	103
2.2.4.2. Coupes ultra-fines.....	103
RESULTATS.....	105
I. Site de nodulation.....	105
II. Initiation et développement du cordon d'infection.....	106
III. Cytologie des ébauches nodulaires.....	107
IV. Histologie du nodule.....	108
V. Etude ultrastructurale de la différenciation du tissu central	
109	
V.1. La région méristématique.....	109
V.2. Libération bactérienne.....	109
V.3. Différenciation des symbiosomes.....	110
VI. Le nodule mature.....	110
PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES.....	112
DISCUSSION.....	126

CONCLUSION GENERALE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LISTE DES TABLEAUX, FIGURES ET PLANCHES

INTRODUCTION GENERALE

Tableau 1. Liste non exhaustive des arbres et arbustes symbiotiques	15
Tableau 2. Classification des acacias de zones sèches selon leur aptitude à s'associer aux bactéries des genres <i>Rhizobium</i> et <i>Bradyrhizobium</i>	17
Tableau 3. Classification des bactéries de la famille des <i>Rhizobiaceae</i>	31
Figure 1. Planche botanique d' <i>Acacia albida</i>	21
Figure 2. Aire de répartition d' <i>Acacia albida</i>	22
Figure 3. <i>Acacia albida</i> en saison sèche.....	23
Figure 4. <i>Acacia albida</i> en saison des pluies.....	24
Figure 5. Parc à <i>Acacia albida</i> ou parc à Kads.....	24
Figure 6. <i>Acacia albida</i> émondé.....	25
Figure 7. Semis de riz au pied d'un <i>Acacia albida</i>	26
Figure 8. Pouvoirs discriminatifs des différentes techniques de taxonomie	28
Figure 9. Arbre phylogénétique construit à partir des résultats d'hybridations ADN:ARNr.....	32
Figure 10a. Arbre phylogénétique construit après séquençage partiel de l'ARNr de bactéries de la sous-classe alpha des protéobactéries	33
Figure 10b. Arbre phylogénétique montrant la position de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , <i>Blastobacter denitrificans</i> et <i>Afipia</i> sp. à l'intérieur du sous-groupe alpha des protéobactéries	34
Figure 11. Organisation génétique des gènes <i>nod</i> chez <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	42
Figure 12. Schéma simplifié montrant les échanges de signaux entre la luzerne et <i>Rhizobium meliloti</i> et qui conduisent à l'établissement de la symbiose.....	44
Figure 13. Structure des facteurs NodRM-IV (S) et NodRm-IV (Ac, S) de <i>Rhizobium meliloti</i>	45

CHAPITRE I

Tableau 1. Distribution des populations de <i>Bradyrhizobium</i> dans quatre profils de sol sous le couvert d' <i>Acacia albida</i> de la surface jusqu'à la nappe d'eau	58
---	----

Tableau 2. Corrélation entre le développement d' <i>Acacia albida</i> sur la distribution des <i>Bradyrhizobium</i> dans les sols	59
Tableau 3. Nomenclature et origine des bradyrhizobia nodulant <i>Acacia albida</i>	60
Tableau 4. Effectivité des isolats de <i>Bradyrhizobium</i> obtenus à partir de 2 forages réalisés à Louga et à Diokoul et à partir de sols de surface des régions sahéliennes	63
Tableau 5. Effectivité des isolats de <i>Bradyrhizobium</i> obtenus à partir de 2 forages réalisés à Djinaki et à Kabrousse et à partir de sols de surface des régions soudano-guinéennes.....	63
Tableau 6. Propriétés physico-chimiques, granulométriques et organiques des sols de Louga.	64
Figure 1. Position géographique des sites de forages	50
Figure 2. Forage sous <i>Acacia albida</i> dans la région de Louga.....	51
Figure 3. Echantillon de sol prélevé à la tarière.....	51
Figure 4. Schéma d'un tube Gibson	53
Figure 5. Nodule d' <i>Acacia albida</i> de type coralloïde.....	57

CHAPITRE II

Tableau 1. Liste et disposition des 96 substrats sur la galerie Biolog.....	73
Tableau 2. Liste des souches de référence, des souches types et des souches représentatives des différentes espèces de <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Rhizobium</i> , et <i>Azorhizobium caulinodans</i>	75
Tableau 3. Résultats des tests Biolog et caractères discriminants entre les 5 clusters déterminés	88
Tableau 4. Comparaison du pouvoir de différenciation des techniques SDS-PAGE et BIOLOG et origine géographique des isolats d' <i>Acacia albida</i> dans les différents groupes	89 à 91
Tableau 5. Propriétés des hybrides ADN:ARNr déterminés en utilisant des sondes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> NZP 5549 ^T marquées au ¹⁴ C ou au ³ H.....	92
Figure 1a. Galerie Biolog 5 jours après incubation montrant la précipitation du formazan de couleur pourpre au fond des puits	74
Figure 1b. Galerie Biolog après remise en suspension du formazan	74

- Figure 2.** Dendrogramme basé sur la valeur du coefficient de similarité r et construit après l'analyse numérique des profils électrophorétiques des souches d'*Acacia albida*, de souches de référence et/ou types et de souches représentatives de différents sous clusters connus80 et 81
- Figure 3.** Profils électrophorétiques des souches étudiées. La séquence des souches a été donnée par les résultats de l'analyse numérique..82 à 85
- Figure 4.** Résultats des tests Biolog représentés sous forme de dendrogramme basé sur la valeur du coefficient de similarité r87

CHAPITRE III

Planche 1 (Figures 1 à 4).....	113
Planche 2 (Figures 5 à 8).....	114
Planche 3 (Figures 9 à 11).....	115
Planche 4 (Figures 12 à 15).....	116
Planche 5 (Figures 16 à 19).....	117
Planche 6 (Figure 20).....	118
Planche 7 (Figures 21 à 24).....	119
Planche 8 (Figures 25 à 27).....	120
Planche 9 (Figures 28 à 31).....	121
Planche 10 (Figures 32 à 33).....	122
Planche 11 (Figure 34).....	123
Planche 12 (Figures 35 à 36).....	124
Planche 13 (Figures 37 à 40).....	125

INTRODUCTION GENERALE

Avant propos

Depuis plusieurs décennies, la surexploitation des espèces ligneuses sahéniennes a renforcé les effets catastrophiques de la sécheresse dans les zones tropicales semi-arides. Les conséquences de cette sécheresse sont graves et dues au fait que, dans ces régions, la végétation arborée joue un triple rôle : elle demeure un des éléments du maintien de la stabilisation et de la régénération des sols ; elle contribue à l'alimentation de base des troupeaux ; elle fournit du bois à usage domestique et des produits de cueillette. Pour compenser les effets néfastes de la surexploitation, de nombreux programmes de développement forestier, dits de reforestation, sont entrepris. L'utilisation d'espèces arborescentes pionnières, c'est à dire adaptées à la sécheresse et pouvant s'installer sur des sols érodés et dégradés, est une condition nécessaire à la réussite des projets forestiers.

Les arbres et arbustes capables de s'associer à des micro-organismes symbiotiques fixateurs d'azote et de se développer dans des sols très pauvres sont des espèces pionnières particulièrement appropriées à la réussite des programmes de reforestation. Il existe 3 groupes de micro-organismes symbiotiques capables de fixer l'azote en association symbiotique avec des plantes : les bactéries Gram négatif de la famille des *Rhizobiaceae*, avec les genres *Rhizobium*, *Azorhizobium* et *Bradyrhizobium*, les actinomycètes du genre *Frankia*, et les cyanobactéries ou algues bleues des genres *Anabaena* et *Nostoc*. Une liste, non exhaustive, des arbres et arbustes hôtes pour ces micro-organismes, est donnée dans le tableau 1.

Tableau 1. Liste non exhaustive d'arbres et arbustes symbiotiques (D'après Wheeler, 1991).

Familles Sous-familles	Genres
Légumineuses nodulées par des <i>Rhizobiaceae</i>	
<i>Caesalpinoideae</i>	<i>Sclerolobium</i> , <i>Dimorphandra</i> , <i>Chamaecrista</i> .
<i>Mimosoideae</i>	<i>Acacia</i> , <i>Inga</i> , <i>Mimosa</i> , <i>Leucaena</i> .
<i>Papilionoideae</i> (Nodules de tige)	<i>Dalbergia</i> , <i>Robinia</i> , <i>Erythrina</i> (<i>Aeschynomene</i> , <i>Sesbania</i>)
Non légumineuses nodulées par des <i>Rhizobiaceae</i>	
<i>Ulmaceae</i>	<i>Parasponia</i>

Tableau 1. Suite.

Familles Sous-familles	Genres
Plantes actinorhiziennes nodulées par des <i>Actinomycetales</i>	
<i>Coriariaceae</i>	<i>Coriaria</i> .
<i>Rosaceae</i>	<i>Cercocarpus, Chamaebatia,</i> <i>Cowania, Dryas, Rubus.</i>
<i>Daniscaceae</i>	<i>Dastica.</i>
<i>Myricaceae</i>	<i>Myrica, Comptonia.</i>
<i>Benulaceae</i>	<i>Alnus.</i>
<i>Elaeagnaceae</i>	<i>Elaeagnus, Hippophae,</i> <i>Shepherdia.</i>
<i>Rhamnaceae</i>	<i>Ceanothus, Colletia, Discaria,</i> <i>Kentrothamnus, Retamnilla,</i> <i>Talguenea, Trevoa.</i>
<i>Casuarinaceae</i>	<i>Allocasuarina, Casuarina,</i> <i>Gymnostoma.</i>
Cycades nodulés par des <i>Cyanobacteriaceae</i>	
	<i>Bowenia, Ceratozamia,</i> <i>Cycas, Dioon, Encephalartos,</i> <i>Macrozamia, Microcycas,</i> <i>Stangeria, Zamia.</i>

Les micro-organismes ^{symbiotiques} fixateurs d'azote induisent la formation de nodules situés, le plus souvent, sur les racines. Les nodules sont le siège de la fixation de l'azote atmosphérique et assurent la nutrition azotée de la plante. La grande majorité des arbres et arbustes symbiotiques appartiennent aux plantes de la famille des légumineuses, hôtes des *Rhizobiaceae* et aux plantes actinorhiziennes, hôtes de *Frankia*. Quelques espèces d'arbres et arbustes sont connues pour leur action fertilisante du sol ; c'est le cas d'*Acacia auriculiformis*, d'*Acacia mearnsii*, de *Leucaena leucocephala* et de *Casuarina equisetifolia* (Dommergues, 1987). L'enrichissement du sol se fait par l'intermédiaire des feuilles mortes, tombées au sol mais aussi, des racines et des nodules qui, après décomposition, libèrent l'azote sous des formes directement assimilables par les plantes. Ainsi des essences ligneuses permettent non seulement de stabiliser et de coloniser le sol, le protégeant ainsi des érosions éoliennes et pluviales, mais aussi, pour certaines d'entre elles, d'améliorer ou de restaurer la fertilité des sols appauvris et érodés en les enrichissant en azote (Nair *et al.*, 1984). C'est le cas, par exemple, de *Casuarina equisetifolia*, ou filao, genre particulièrement approprié à des programmes de reforestation et de régénération du sol au Sénégal. Cet arbre est utilisé comme brise-vent pour fixer les dunes et pour protéger les cultures

de l'envahissement par le sable. Il a été montré que, pour un peuplement de 3000 arbres par hectare, la quantité d'azote fixé par l'association symbiotique *Frankia-filao* est comprise entre 50 et 200 Kg/Ha et par an (Dommergues *et al.*, 1985). Les filaos peuvent donc contribuer à régénérer les sols dégradés en reconstituant leur stock en matière organique. Cette fertilisation peut favoriser, en outre, l'installation de cultures intercalaires en assurant l'accumulation d'éléments nutritifs (Dommergues *et al.*, 1985).

Parmi les arbres largement répandus au Sahel, les espèces du genre *Acacia* sont également bien adaptées aux milieux dégradés et aux conditions climatiques difficiles. Economiquement important, ce genre représente donc une essence idéale pour les programmes de reboisement. L'étude de la symbiose acacia-rhizobia que nous avons réalisé s'intègre bien dans un programme de recherches fondamentales et appliquées sur les conditions contrôlant la fixation symbiotique de l'azote dans les zones arides et semi-arides.

Le genre *Acacia* est composé d'environ 1200 espèces réparties dans les différentes zones tropicales du monde. Les acacias, longtemps épargnés par les populations, sont maintenant menacés et tendent à disparaître dans des régions entières du Sahel. Ces arbres constituent pourtant une ressource en bois et en fourrage importante et fournissent différents produits tels que des fruits, des gommés et des produits médicinaux.

Dreyfus et Dommergues (1981) ont classé plusieurs acacias africains et exotiques en trois groupes selon leur aptitude à s'associer avec *Bradyrhizobium* (Groupe 1), *Rhizobium* (Groupe 2) ou les deux genres à la fois (Groupe 3) (Tableau 2). Les espèces *A. senegal*, *A. raddiana*, *A. seyal* et *A. albida* sont les plus répandues au Sahel.

Tableau 2. Classification des acacias de zones sèches selon leur aptitude à s'associer aux bactéries des genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* (D'après Dreyfus et Dommergues, 1981).

Groupes de compatibilité	Espèces nodulées
Groupe 1 : Nodulation effective avec <i>Bradyrhizobium</i>	<i>Acacia albida</i> <i>Acacia holosericea</i> <i>Acacia linaroïdes</i> <i>Acacia mearnsii</i> <i>Acacia decurrens</i> <i>Acacia mangium</i>
Groupe 2 : Nodulation effective avec <i>Rhizobium</i>	<i>Acacia senegal</i> <i>Acacia raddiana</i> <i>Acacia nilotica</i> <i>Acacia farnesiana</i>
Groupe 3 : Nodulation effective avec <i>Rhizobium</i> et <i>Bradyrhizobium</i>	<i>Acacia seyal</i> <i>Acacia bivenosa</i>

Jusqu'à présent, la nodulation des acacias n'a été étudiée qu'à partir de jeunes plants inoculés en laboratoire ou en pépinière. L'effet de la fixation biologique de l'azote sur la croissance et le développement des acacias cultivés en tubes ou en gaines permet une augmentation très significative et spectaculaire de la croissance de la plante. Dans les plantations, on observe aussi une nodulation des jeunes acacias de moins d'un an. Le développement des jeunes plants est ainsi indépendant des maigres réserves en azote minéral des sols sahéliens.

En revanche, on connaît très mal l'aptitude à noduler des acacias adultes. Des prospections récentes sur le terrain et l'observation de systèmes racinaires entiers ont montré toutefois que les espèces *Acacia raddiana* et *Acacia senegal* peuvent noduler à l'état adulte et que les nodules sont capables de fixer l'azote (Dupuy *et al.*, 1991). En revanche, chez *Acacia albida*, aucun nodule n'avait, jusqu'à présent, été observé sur un arbre adulte. De plus, la difficulté de pouvoir observer le système racinaire très profond, rendait difficile l'étude de la nodulation. Chez cette espèce, la racine pivotante peut descendre à plus de cinq mètres de profondeur pendant la première année alors que la partie aérienne n'atteint que vingt centimètres. A l'état adulte, un système racinaire très profond permet à l'arbre de puiser dans la nappe phréatique à plus de quarante mètres de profondeur (CTFT, 1988).

L'objectif de notre travail a donc consisté, dans un premier temps, à rechercher la présence de nodules sur des *Acacia albida* adultes et à isoler des souches de rhizobia spécifiques présentes dans les sols. Des prélèvements de sol en surface et en profondeur ont été effectués dans différentes régions du Sénégal. Des forages ont permis le prélèvement d'échantillons de sols à partir desquels plusieurs souches ont été isolées et caractérisées. Une étude écologique de la répartition des populations de micro-organismes symbiotiques spécifiques en fonction de la profondeur a également été menée sur les arbres adultes poussant en zone sahélienne et soudanienne.

Une étude taxonomique a permis de comparer les souches en fonction de la profondeur et de l'origine d'isolement. Cette étude fait l'objet de la seconde partie de notre travail. La technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide des protéines cellulaires totales (SDS-PAGE) a d'abord été choisie pour faire apparaître des variations entre les souches, pour les regrouper et enfin pour comparer leur profil avec celui de souches de référence. Les souches types des groupes définis électrophorétiquement ont ensuite été utilisées pour des hybridations ADN:ARNr afin de déterminer leurs relations phylogénétiques. La description phénotypique étant nécessaire pour créer de nouveaux groupes taxonomiques, un nouveau système d'identification et de classification rapide (Biolog) a été testé sur nos souches.

Enfin, l'étude histologique et ultrastructurale de l'infection et du développement des nodules racinaires d'*Acacia albida* fait l'objet du troisième chapitre du mémoire.

Dans les trois paragraphes qui suivent, nous présentons *A.albida* et nous faisons la synthèse des connaissances sur les micro-organismes associés aux légumineuses. Nous rappelons enfin les données récentes sur l'établissement de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse.

I. *Acacia albida*

1. Taxonomie

L'espèce *Acacia albida* Del. fut nommée pour la première fois en 1813 par Delille à la suite de la détermination botanique d'un échantillon récolté en Egypte. Elle fut classée dans la famille des *Leguminoeseae*, la sous-famille des *Mimosoideae* et dans la tribu des *Acacieae*. Cependant sa classification dans la tribu des *Acacieae* a été très controversée et a donné lieu à de nombreuses études taxonomiques basées sur des caractères botaniques. En 1934, Chevalier a proposé de l'exclure du genre *Acacia* et de créer un nouveau genre monospécifique *Faidherbia* (Monographie CTFT, 1988). Cependant, compte tenu des nombreux caractères communs aux autres acacias africains, certains auteurs ont continué de la nommer *Acacia albida* (Flore d'Hutchinson et Dalziel, 1958). Nous utiliserons la dénomination *Acacia albida* Del. tout au long de ce mémoire.

2. Caractères morphologiques, botaniques et anatomiques

Acacia albida peut atteindre à l'âge adulte 15 à 20 mètres de hauteur pour un diamètre de 1 m. Cependant, nous avons observé un spécimen de 3 m de diamètre à Kabrousse à la frontière Sénégal-Guinéenne. Le fût est droit et court, et mesure environ 3 à 5 m. La couverture végétale des sujets adultes est souvent hémisphérique. L'écorce de couleur brune à gris mat est fissurée longitudinalement et plus ou moins liègeuse avec l'âge. Ce sont les rameaux épineux et blanchâtres, formés de courts segments en lignes brisées, et qui paraissent blanc-argenté au moment des pluies hivernales, qui ont donné son nom à l'espèce.

Les feuilles sont composées, alternes et bipennées (2 à 12 paires de pennes par rachis) (Figure 1). Chaque penne est composé d'un rachis de 2,5 à 5,5 cm

de long et de 6 à 23 paires de folioles glabres à pubescentes. Des épines sont insérées par paire à la base des feuilles.

Les inflorescences sont groupées en épis et sont composées de fleurs sessiles ou faiblement pédonculées de couleur blanche puis jaune. *Acacia albida* est une essence monoïque. Le fruit, comme pour toutes les plantes de la famille des légumineuses est une gousse. Souvent appelé "pelure de pomme" (apple ring en anglais) en raison de son enroulement en spirale au cours de sa lignification, la gousse de couleur orange à brun rouge fait 7 à 9 mm d'épaisseur, de 6 à 35 cm de longueur et de 1,6 à 6 cm de largeur. Elle présente un polymorphisme important. Les graines sont au nombre de 10 à 20 par gousse. A maturité, elles sont longues de 10 mm et larges de 6 mm. Elles sont protégées par une cuticule très résistante et de couleur brun foncé.

3. Caractéristiques d'*Acacia albida*

3.1. Aire de répartition

Acacia albida est un arbre présent essentiellement sur le continent africain. Il est réparti dans toute l'Afrique soudano-sahélienne correspondant aux zones sèches de l'Afrique tropicale (Figure 2). On le trouve en particulier des côtes du Sénégal à la Mer Rouge et à l'Océan Indien. Vers le sud, il est réparti de l'Afrique orientale à l'Angola. Son origine est mal connue et a donné lieu à plusieurs hypothèses. Au Sénégal, cet arbre (Kad en Ouolof, Sas en Sérère, Bu bilik en Diola) est très répandu, plus particulièrement à l'ouest et au centre (bassin arachidier) du pays.

3.2. Ecologie

Acacia albida forme de beaux peuplements sur les sols sablonneux, silico-argileux et sur les sols ferrugineux tropicaux. Selon les régions et les conditions d'alimentation en eau, sa densité varie de 10 à 30 et peut atteindre 50 arbres à l'hectare. Il tolère des températures allant de 6 à 40°C. Son optimum écologique se trouve entre les isohyètes 500 et 800 mm de précipitations annuelles moyennes aussi bien en Afrique occidentale qu'en Afrique orientale et méridionale. Il se développe sous des climats variés, sahélien (<1000 mm) ou soudano-guinéen (>1000 mm), présentant tous deux une saison sèche bien marquée. Il peut supporter de longues périodes de sécheresse mais, en zone sahélienne, sa présence est strictement liée à celle d'une nappe d'eau plus ou moins profonde. *Acacia albida* est, par conséquent, une espèce phréatophyte. Grâce à son enracinement pivotant profond pouvant atteindre 20 m en quelques années, il ne dépend plus des pluies souvent rares et aléatoires. Paradoxalement, en Casamance, au sud du Sénégal, on le trouve

également dans les terrains inondés des rizières. Il développe alors un système racinaire relativement superficiel.

Figure 1. Planche botanique d'*Acacia albida* (d'après Monographie CTFT, 1988).

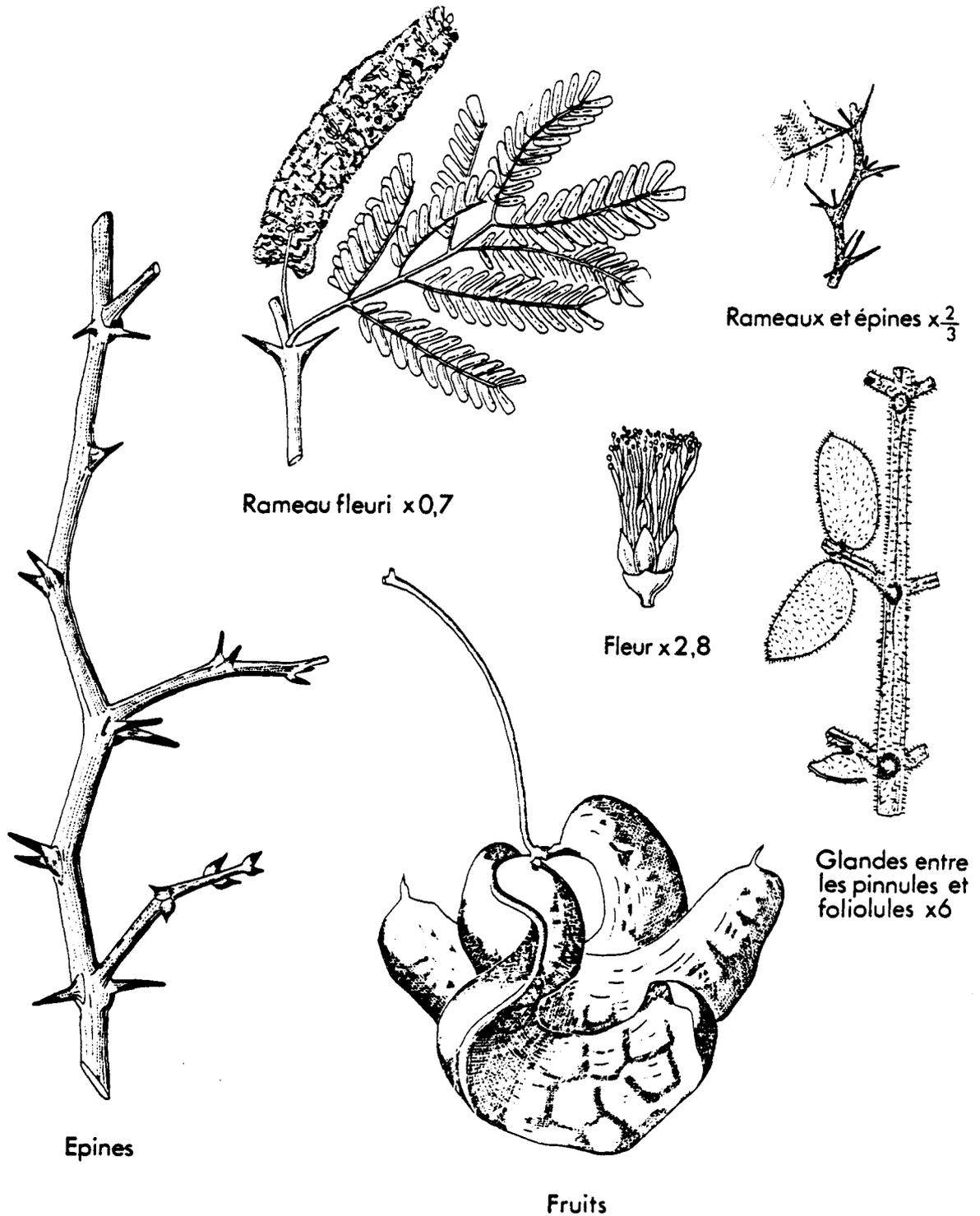
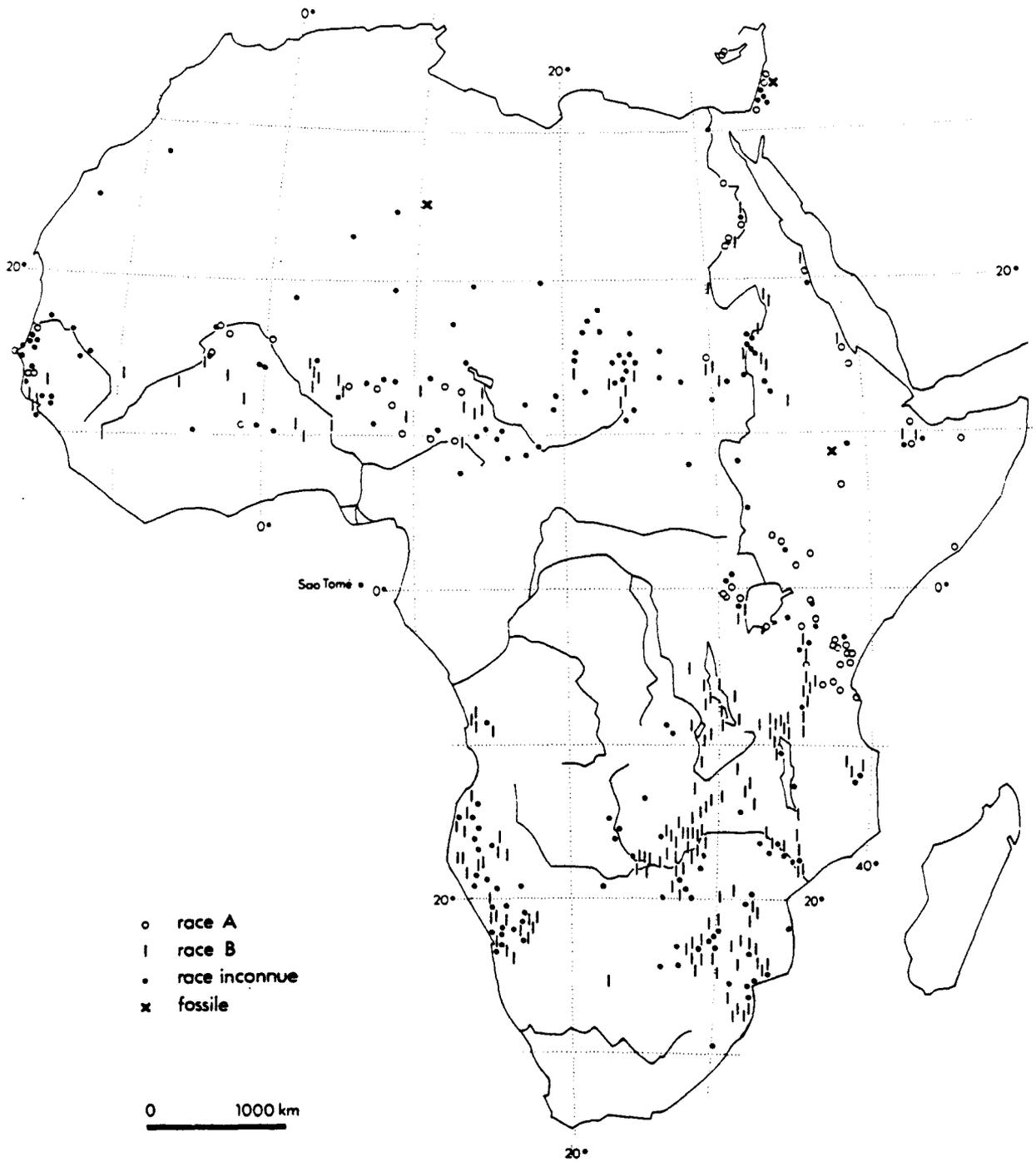


Figure 2. Aire de répartition d'*Acacia albida* (d'après Vassal *et al.*, 1977).

3.3. Particularité et utilisation de l'espèce

Contrairement aux autres arbres sahéliens, *Acacia albida* présente la particularité unique de porter ses feuilles en saison sèche et de les perdre au début de la saison des pluies (Figures 3 et 4). Ce phénomène reste inexplicable à ce jour. Dans l'Afrique soudano-sahélienne, ce rythme de feuillaison inversé a favorisé son utilisation traditionnelle par les pasteurs et les paysans. Ses propriétés multiples lui valent le surnom d'arbre "miracle". Ses feuilles fournissent un excellent fourrage aérien aux troupeaux pendant la saison sèche, et les cultures de saison des pluies, ou cultures hivernales, bénéficient d'un sol enrichi en éléments nutritifs par la chute des feuilles. Son effet protecteur, contre le vent, ses effets sur l'humidité et la température améliorent le microclimat sous son couvert. Son bois est communément utilisé dans toute la zone soudano-sahélienne pour la fabrication d'objets divers. Sur le terrain, empiriquement les paysans sahéliens ont, depuis longtemps, utilisés les propriétés agro-sylvo-pastorales d'*Acacia albida*. Au Sénégal, dans le bassin arachidier, il est cultivé depuis des siècles par les paysans Sérères qui traditionnellement, favorisent sa multiplication, le plus souvent à partir de drageons, en constituant de véritables "parcs à Kads" (Figure 5).



Figure 3. *Acacia albida* en saison sèche (Mlomp-Sénégal, Avril 1991).



Figure 4. *Acacia albida* en saison des pluies (Kabrousse-Sénégal, Août 1990).



Figure 5. Parc à *Acacia albida* ou parc à Kads (Diokoul-Sénégal, Juillet 1990).

Incontestablement, la présence d'*Acacia albida* favorise les cultures annuelles qui lui sont associées. Ses folioles tombant à terre en fin de saison sèche sont enfouies au moment de la préparation des champs et constituent un apport appréciable de matière organique. Sans le savoir, le paysan sahélien travaillant sous *Acacia albida* utilise depuis des siècles un engrais vert. Malheureusement, le "parc à Kads" est actuellement en forte régression non seulement pour des raisons climatiques mais aussi anthropiques. A titre d'exemple, entre 1965 et 1985, les effectifs d'*Acacia albida* ont diminué de 34% à Sob, un village en pays Serère (Lericollais, 1988). Les raisons de la dégradation et de la non-régénération sont nombreuses. La dure sécheresse de ces dernières années a entraîné une forte mortalité des populations de Kads. D'autre part, la disparition progressive du système de jachère a amené, durant la saison sèche, une surexploitation du feuillage de l'arbre utilisé comme fourrage laissant des arbres très affaiblis. Ces arbres totalement émondés (Figure 6) ne jouent plus leur rôle d'enrichissement du sol et ne produisent plus de gousses, très appréciées par les animaux domestiques. D'autre part, les nouvelles techniques agricoles vulgarisées ont contribué à éliminer les jeunes plants ou les drageons notamment au cours des opérations de labour à la charrue attelée.

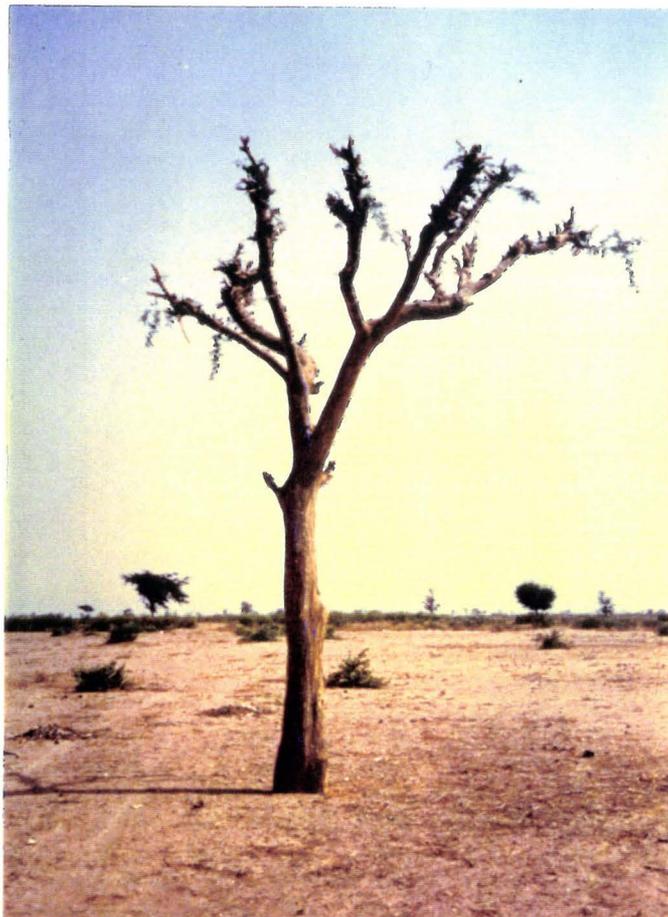


Figure 6. *Acacia albida* émondé (Région de Mbour-Sénégal, Mars 1990).

Nous avons aussi observé qu'*Acacia albida* était utilisé traditionnellement par les paysans Diolas dans un biotope totalement différent, les rizières de Casamance. Il n'est pas rare d'observer les pépinières de riz sous son couvert (Figure 7) et les femmes font plusieurs kilomètres pour prélever sous l'arbre le sol riche en matière organique afin de le mélanger à la terre moins fertile de leurs cultures maraîchères ou de leurs rizières.

L'intérêt économique de cette *Mimosoideae* est important et les effets sur les récoltes peuvent être spectaculaires. La production de mil dans un champ ne recevant aucun amendement peut être de 152% supérieure au voisinage des pieds de l'*Acacia albida* qu'en dehors de son couvert. Considéré comme le plus important arbre fourrager du Sahel, il peut produire de 10 à 25 Kg de feuilles et jeunes pousses par sujet et par an, et de 120 à 140 Kg de gousses.



Figure 7. Semis de riz au pied d'un *Acacia albida* (Casamance-Sénégal, Juillet 1990).

II. Les micro-organismes associés aux légumineuses

1. Les techniques de classification des micro-organismes

Au cours des 15 dernières années plusieurs techniques ont été développées permettant l'étude comparative ou l'étude taxonomique polyphasique de la cellule bactérienne. Une étude taxonomique polyphasique est une étude basée sur l'emploi de multiples techniques dont chacune a été choisie pour son pouvoir discriminant.

L'information d'un génome bactérien s'exprime d'abord au niveau de la structure des protéines. La composition chimique de composants cellulaires (parois cellulaires, lipides...etc) et les caractères phénotypiques sont, respectivement, les deuxième et troisième niveaux d'expression.

Chaque niveau d'expression ainsi que le génome bactérien peuvent être étudiés par une ou plusieurs techniques appropriées. L'ADN total peut être caractérisé par sa composition basique (% G+C), la taille du génome, le pourcentage d'hybridation, le profil obtenu par électrophorèse des fragments d'ADN coupé par des endonucléases de restriction (RFLP). Le génome peut aussi être caractérisé partiellement par RFLP combiné à l'hybridation avec des sondes d'ADN, par RFLP des plasmides (Givaudan et Bally, 1991), RFLP de quelques séquences spécifiques amplifiées (Vanechoutte *et al.*, 1993) et par amplification en utilisant des "primers" correspondant à des séquences répétitives (de Bruijn, 1992). Les molécules d'ARNr 23S, 16S ou 5S ont été particulièrement étudiées à cause de leur pouvoir discriminant permettant de séparer des genres, des familles, des classes et sous-classes (Woese, 1987 ; de Ley, 1991 ; de Wachter *et al.*, 1985). Ces molécules sont étudiées par les méthodes de séquençage (Woese *et al.*, 1984) et d'hybridations ADN:ARNr (de Ley, 1991). De nos jours, leur caractérisation est devenue indispensable à l'étude des relations entre micro-organismes (Graham *et al.*, 1991). En particulier, des sondes d'ADN, construites à partir des séquences d'ARNr, sont utilisées fréquemment pour la classification et l'identification des bactéries (Haun et Göbel, 1987 ; Giovannoni *et al.*, 1988).

Les techniques de séquençage des acides aminés, l'électrophorèse comparative des protéines cellulaires totales, la comparaison des zymogrammes, l'immunoélectrophorèse, sont parmi les techniques appropriées pour l'étude du premier niveau d'expression de l'information génétique. Au deuxième niveau, on compare aussi l'information contenue dans les exopolysaccharides, les lipopolysaccharides, les acides gras (Vauterin *et al.*, 1992), les quinones (Collins et Jones, 1981), les polyamines (Busse et Auling, 1988) ou autres marqueurs chimiotaxonomiques de ce niveau d'expression. Le

dernier niveau d'expression, regroupant les caractères phénotypiques, peut être étudié par une analyse dans laquelle les caractères morphologiques, phénotypiques, enzymatiques et nutritionnels sont inclus. Il existe actuellement des systèmes miniaturisés commercialisés qui contribuent à l'étude de ce niveau d'expression.

Quelques techniques utilisées en taxonomie sont classées, suivant leur pouvoir discriminatif, sur la figure 8. Les ARN ribosomiaux sont les molécules les plus intéressantes pour étudier les relations intergénériques et supragénériques. Aux niveaux intragénérique et intraspécifique, l'analyse phénotypique, les profils protéiques, l'analyse des acides gras et les hybridations ADN:ADN sont les techniques les plus appropriées. Enfin, la technique de RFLP permet de discriminer, au niveau infraspécifique, deux souches appartenant à la même espèce.

Figure 8. Pouvoirs discriminatifs des différentes techniques de taxonomie (Gillis, 1992).

Technique	Niveau taxonomique				
	Superfamille	Famille	Genre	Espèce	Souche
- RFLP					██████████
- Sérologie				██████████	██████████
- Typage phagique				██████████	██████████
- Profils protéiques				██████████	██████████
- Zymogramme				██████████	██████████
- Analyse phénotypique		██████████	██████████	██████████	██████████
- Hybridations ADN:ADN			██████████	██████████	██████████
- Analyse des acides gras			██████████	██████████	██████████
- Analyse d'autres marqueurs chimiques		██████████	██████████	██████████	██████████
- Sondes d'ADN	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████
- Hybridations ADN:ARNr	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████
- Séquençage ARNr	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████

2. Classification des bactéries fixatrices d'azote

La fixation d'azote est un caractère répandu chez les procaryotes. L'azote atmosphérique peut être réduit par des micro-organismes procaryotes libres comme les genres *Clostridium*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, et *Pseudomonas*, ou par des micro-organismes symbiotiques appartenant aux genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* et *Frankia*. Tous ces micro-organismes possèdent en commun un complexe enzymatique réducteur appelé nitrogénase. La propriété de fixer l'azote ne représente pas un caractère taxonomique en soit puisqu'elle caractérise différents organismes qui n'ont pas toujours de relations phylogénétiques étroites. La majorité des genres et espèces fixateurs d'azote connus appartiennent aux eubactéries ; on en trouve également chez les archaeobactéries, comme les genres *Methanobacterium* et *Methanococcus* (Young, 1991 ; Winker et Woese, 1991). Les eubactéries sont subdivisées en plusieurs classes phylogénétiques parmi lesquels la classe des protéobactéries (Stackebrandt *et al.*, 1988). Les bactéries fixatrices d'azote sont réparties dans au moins cinq superfamilles (I à V) de la classe des protéobactéries (Stackebrandt *et al.*, 1988 ; de Ley, 1991). La majorité de celles fixant l'azote en association avec des plantes ou présentes dans la rhizosphère appartiennent à la superfamille IV qui correspond à la sous-classe alpha définie par Stackebrandt *et al.* (1988). On y retrouve les *Rhizobiaceae* et la majeure partie d'un grand groupe de bactéries photosynthétiques, les *Rhodospirillaceae*.

Ethymologiquement, *Rhizobium* signifie "qui vit dans les racines". Ce genre, créé en 1889 par Frank, identifie des bactéries aptes à induire la formation de nodules sur les racines des légumineuses, dans lesquels elles vivent comme des endosymbiontes. Au cours des vingt dernières années, la classification des rhizobia a beaucoup évolué. Dans la huitième édition du *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, seul un genre, *Rhizobium*, est décrit et six espèces, *R. meliloti*, *R. phaseoli*, *R. trifolii*, *R. leguminosarum*, *R. japonicum* et *R. lupini* sont identifiées sur la base du spectre d'hôte (Jordan et Allen, 1974). Toutefois, des différences notamment au niveau de la vitesse de croissance (rapide ou lente) et du type de flagellation (péritriche et polaire ou subpolaire, respectivement) ont conduit à la caractérisation d'un groupe II contenant *R. japonicum* et *R. lupini*.

En 1982, sur la base d'études génomiques (% G+C, hybridations ADN:ADN et ADN:ARNr...etc), Jordan divisa les bactéries nodulant les racines de légumineuses en deux genres distincts : *Rhizobium*, regroupant les souches à croissance rapide et *Bradyrhizobium*, regroupant celles à croissance lente (Jordan, 1982). Depuis l'utilisation de techniques appropriées à l'étude des relations intragénériques, une redéfinition des espèces de *Rhizobium* a eu

des relations intragénériques, une redéfinition des espèces de *Rhizobium* a eu lieu. Ainsi, dans l'édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology de 1984, le groupe des *Rhizobiaceae* avait déjà subi d'importantes modifications (Jordan et Allen, 1974 ; Jordan, 1984). *Rhizobium phaseoli* et *Rhizobium trifolii* ont été regroupées en une seule espèce *Rhizobium leguminosarum* avec trois biovars *viciae*, *phaseoli*, et *trifolii*. Une nouvelle espèce, *R. loti*, a été définie pour les souches bactériennes à croissance rapide et à flagellation polaire ou subpolaire, nodulant le lotier (*Lotus* sp.). A la même époque, Scholla et Elkan (1984) ont créé une nouvelle espèce de *Rhizobium*, *R. fredii*, pour les bactéries à croissance rapide nodulant le soja. Cette espèce contenait 2 biovars. En 1988, Chen *et al.* ont décrit un nouveau genre appelé *Sinorhizobium* avec deux espèces, *S. fredii*, correspondant aux deux biovars de *R. fredii* et une nouvelle espèce, *S. xinjiangensis*. Durant les quatre dernières années, quatre nouvelles espèces de *Rhizobium* ont été créées et le genre *Sinorhizobium* a été supprimé. En 1989, Lindström *et al.* ont proposé une nouvelle espèce de *Rhizobium*, *R. galegae*, nodulant *Galega orientalis* et *G. officinalis*. Chen *et al.* (1991) ont introduit l'espèce *Rhizobium huakuii* pour les souches isolées des nodules d'*Astragalus sinicus*. Après une étude polyphasique, une nouvelle espèce, *Rhizobium tropici*, a été proposée pour les souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* (type II) nodulant *Phaseolus vulgaris* L. et *Leucaena* sp. (Martinez-Romero *et al.*, 1991). Enfin, très récemment, Segovia *et al.*, (1992) ont reclassé les souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* (type I) en une nouvelle espèce, *R. etli*.

Depuis sa caractérisation, en 1982, le genre *Bradyrhizobium* n'avait qu'une seule espèce reconnue, *B. japonicum* nodulant le soja (*Glycine max*) et le siratro (*Macropodium atropurpureum*). Sur la base d'hybridations ADN:ADN, *Bradyrhizobium japonicum* a été séparé en trois groupes d'homologie ADN (groupes I, Ia et II) (Hollis *et al.*, 1981 ; Kuykendall *et al.*, 1988). Les différents groupes peuvent aussi être différenciés par leur composition en acides gras et par leurs résistances à plusieurs antibiotiques (Kuykendall *et al.*, 1988). La souche de référence de *B. japonicum* appartient au groupe I. Le groupe II est le plus hétérogène et très récemment, l'espèce *Bradyrhizobium elkanii* a été proposée pour les souches appartenant à ce groupe (Kuykendall *et al.*, 1992). Les relations taxonomiques entre des bradyrhizobia qui nodulent plusieurs espèces de *Lotus*, *Vigna*, *Mimosa*, *Acacia*...etc, et *Bradyrhizobium japonicum* ne sont pas encore connues. De ce fait ces souches non classées sont dénommées *Bradyrhizobium* sp., avec le nom de la plante hôte entre parenthèses.

Des études taxonomiques récentes ont permis de décrire d'autres genres et espèces dans la famille des *Rhizobiaceae*. En 1988, Dreyfus *et al.* ont noté une bactérie capable de noduler les

tiges et les racines de *Sesbania rostrata*. L'étude des ARNr a en effet montré que ce micro-organisme formait un genre séparé des genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* dans la superfamille IV (Figure 9). Compte tenu de sa capacité à fixer l'azote en culture pure, ce genre bactérien a été nommé *Azorhizobium* avec une seule espèce définie, *Azorhizobium caulinodans*. En outre, des études récentes dans le genre *Azorhizobium* ont montré l'existence d'une espèce génomique distincte d'*A. caulinodans* qui n'a pas encore été nommée (Rinaudo *et al.*, 1991). La classification actuelle des bactéries de la famille des *Rhizobiaceae* est résumée dans le tableau 3.

Tableau 3. Classification des bactéries de la famille des *Rhizobiaceae*.

Genres	Espèces	Biovar (bv.)	Plantes hôtes
<i>Rhizobium</i> (croissance rapide)	<i>leguminosarum</i>	bv. viciae	<i>Pisum</i> , <i>Vicia</i> , <i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i>
		bv. trifolii	<i>Trifolium</i>
		bv. phaseoli	<i>Phaseolus</i>
	<i>meliloti</i>		<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> , <i>Trigonella</i>
	<i>loti</i>		<i>Lotus</i>
	<i>fredii</i>		<i>Glycine max</i>
	<i>galegae</i>		<i>Galega orientalis</i>
<i>Bradyrhizobium</i> (croissance lente)	<i>huakuii</i>		<i>Astragalus sinicus</i>
	<i>tropici</i>		<i>Phaseolus vulgaris</i> L., <i>Leucaena</i> sp.
	<i>etli</i>		<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
<i>Bradyrhizobium</i> (croissance lente)	<i>japonicum</i>		<i>Glycine max</i>
	sp. (groupe des cowpea)		<i>Vigna</i> sp., <i>Lupinus</i> sp., <i>Acacia</i> sp., <i>Mimosa</i> sp., <i>Aeschynomene</i> sp.
	<i>elkanii</i>		<i>Glycine max</i>
<i>Azorhizobium</i>	<i>caulinodans</i>		<i>Sesbania rostrata</i>

Des critères pour la description de nouveaux genres et espèces ont été proposés afin d'éviter toute modification hâtive de la classification des *Rhizobiaceae* (Graham *et al.*, 1991). En fonction de ces recommandations, il apparaît que la définition de l'espèce *R. huakuii* dont les relations intragénériques n'ont pas été déterminées reste prématurée. Jarvis *et al.* (1992) ont conclu récemment sur la base de résultats phylogénétiques (séquençage

ont conclu récemment sur la base de résultats phylogénétiques (séquençage partiel de l'ADN codant pour l'ARN 16S) que *Sinorhizobium fredii* et *S. xinjiangensis* étaient génotypiquement très proches l'un de l'autre et de *Rhizobium meliloti*. Les deux espèces de *Sinorhizobium* ont donc été reclassées dans *Rhizobium*.

Les figures 9 et 10 (a et b) représentent les résultats des études des ARN ribosomiaux dans la famille des *Rhizobiaceae* et dans quelques genres bactériens, taxonomiquement voisins, par les techniques d'hybridation ADN:ARNr et de séquençage partiel de l'ARN 16S (de Ley, 1991 ; Young *et al.*, 1991 ; Willems et Collins, 1992). *Rhizobium* et *Agrobacterium* se trouvent dans la même branche ARN que *Brucella* tandis que *Bradyrhizobium* fait partie d'une autre branche contenant *Rhodopseudomonas*, *Beijerinckia*, *Azorhizobium caulinodans*, *Blastobacter denitrificans* et différentes espèces d'*Afipia*. Phylogénétiquement, *Rhodopseudomonas palustris*, *Blastobacter denitrificans* et *Afipia* sont les plus proches de *Bradyrhizobium* et l'étude de leurs ARNr montrent qu'ils ont des relations intragénériques. Ces relations ainsi que celles dans *Bradyrhizobium* doivent être étudiées par des techniques avec un pouvoir discriminant approprié afin d'aboutir à des conclusions définitives.

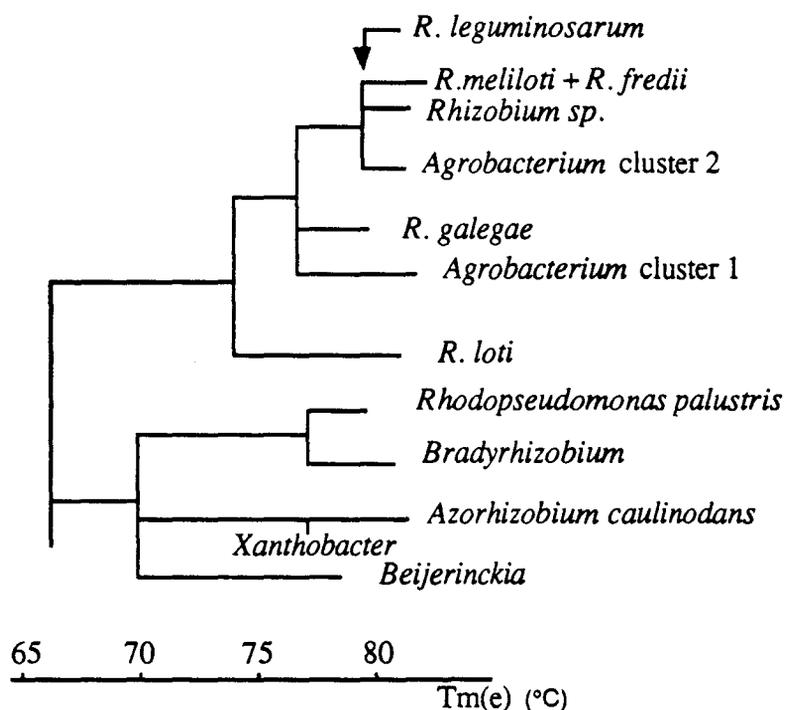


Figure 9. Arbre phylogénétique construit à partir des résultats d'hybridations ADN:ARNr (d'après de Ley, 1991).

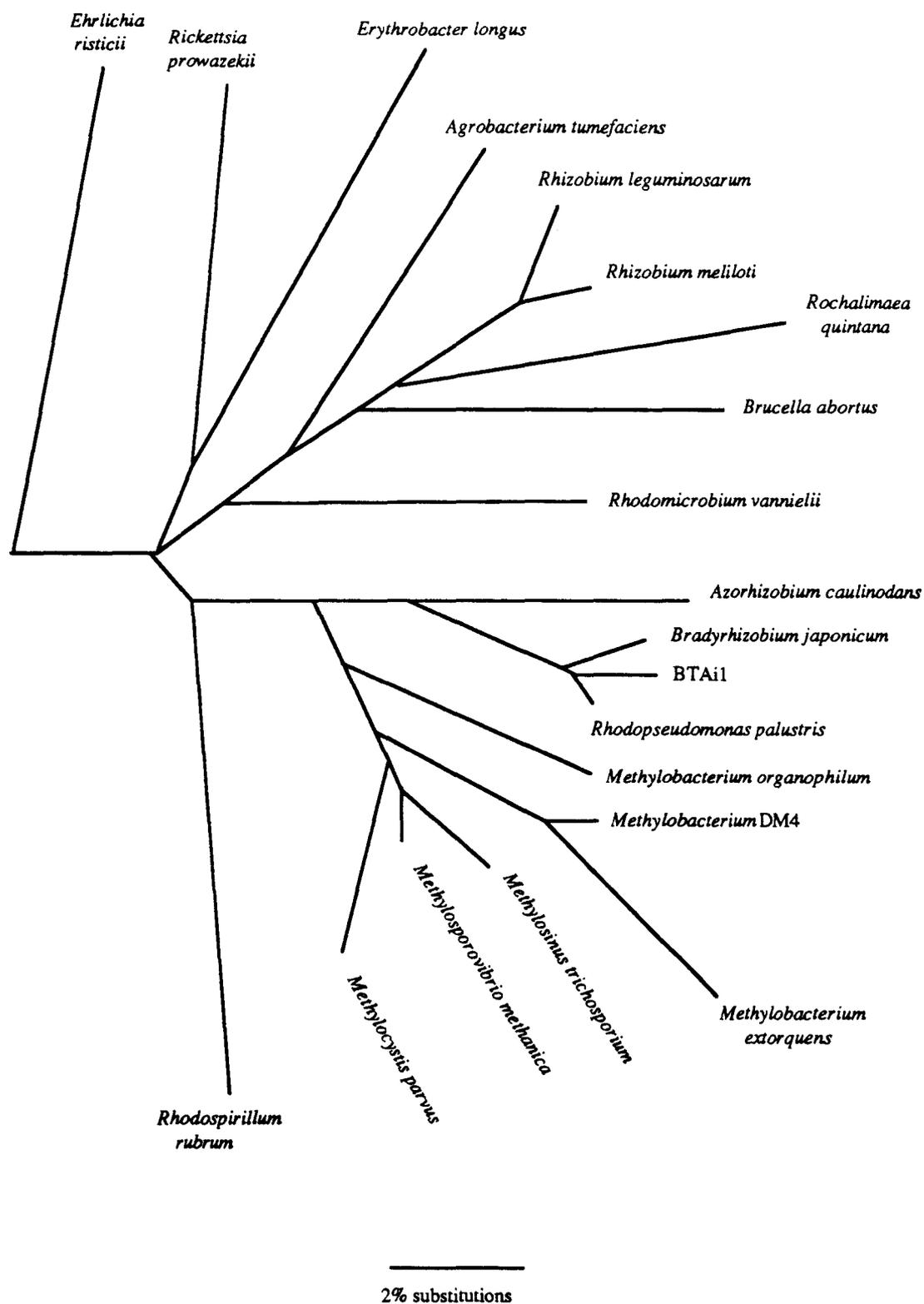


Figure 10a. Arbre phylogénétique construit après séquençage partiel de l'ARNr de bactéries de la sous-classe alpha des protéobactéries (d'après Young *et al.*, 1991).

n'appartiennent pas à des espèces connues (Zhang *et al.*, 1991). De même au Sénégal, de Lajudie *et al.* (1991 ; en préparation) ont montré une grande hétérogénéité dans les souches isolées de différentes espèces de *Sesbania* et d'*Acacia*, avec au moins trois groupes distincts de ceux déjà décrits. Des conclusions analogues ont été apportées à l'étude de quelques 200 souches isolées de différentes espèces de légumineuses des forêts tropicales humides du Brésil (Moreira *et al.*, 1993). D'après leur profil protéique, une grande hétérogénéité a été trouvée aussi bien dans les souches à croissance rapide que celles, majoritaires, à croissance lente. De nouveaux groupes, différents des espèces connues, ont été identifiés parmi les souches à croissance rapide tandis que la plupart des souches à croissance lente se regroupait dans un grand cluster hétérogène ne contenant que des bradyrhizobia parmi lesquels les deux espèces décrites.

Les résultats mentionnés montrent que la systématique des genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium* évolue avec l'isolement de nouvelles souches et reste sujette à modification dans les années à venir.

III. L'établissement de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse

La nodulation des espèces de la grande famille des légumineuses, regroupant les *Papilionoideae*, *Mimosoideae* et les *Cesalpinoideae*, est un phénomène fréquent (de Faria *et al.*, 1989). Au moins 90% des espèces des *Mimosoideae* et 97% de celles des *Papilionoideae* sont nodulées ; en revanche, 23% seulement des espèces examinées dans la sous-famille des *Cesalpinoideae* forment une symbiose avec les rhizobia.

La formation des nodules sur les racines mais aussi sur les tiges des légumineuses a été bien étudiée (Vincent, 1980 ; Newcomb, 1981 ; Sprent, 1989). Jusqu'à présent les nombreuses études du mode d'infection et du développement du nodule ont en grande partie été effectuées chez les légumineuses tempérées annuelles comme la luzerne (*Medicago*), le pois (*Pisum*) ou le trèfle (*Trifolium*) (Dart, 1977 ; Newcomb, 1976 et 1981). Les études relatives à l'organogénèse des nodules de légumineuses tropicales ont été moins nombreuses. Le développement des nodules chez le soja (*Glycine max*) a pourtant fait l'objet d'études cytologiques ultrastructurales approfondies (Newcomb *et al.*, 1979 ; Turgeon et Bauer, 1982 et 1985). L'étude de l'infection et du développement des nodules racinaires de plusieurs légumineuses tropicales et subtropicales a également été réalisée, en particulier chez *Arachis hypogea* (Allen et Allen, 1940 ; Chandler, 1978), *Stylosanthes* spp. (Rango Rao, 1977 ; Chandler *et al.*, 1982), *Neptunia plena* (James *et al.*, 1992), *Sesbania rostrata* (Ndoye *et al.*, en préparation) et *Aeschynomene*

indica (Arora, 1954 ; Yatazawa *et al.*, 1984). L'ontogénèse des nodules a aussi été étudiée chez quelques légumineuses ligneuses comme *Aotus ericoides* (Lawrie, 1983), *Mimosa scabrella* (de Faria *et al.*, 1988) et *Leucaena leucocephala* (Chen et Rolfe, 1988). En outre, des études similaires ont été menées sur quelques légumineuses tropicales à nodules aériens comme par exemple *Sesbania rostrata* (Tsien *et al.*, 1983 ; Duhoux, 1984), *Neptunia oleracea* (Schaede, 1940) et de nombreuses espèces d'*Aeschynomene* dont les plus étudiées ont été *A. indica* et *A. afraspera* (Arora, 1954 ; Yatazawa et Yoshida, 1979 ; Vaughn et Elmore, 1985 ; Alazard et Duhoux, 1990). Ces études ont permis de décrire des modes d'infection distincts (Sprent et de Faria, 1988 ; Kijne, 1990) et ont montré une grande diversité de l'ontogénèse des nodules (Rolfe et Gresshoff, 1988 ; Nap et Bisseling, 1990).

Des études génétiques très récentes ont en outre permis de mieux comprendre les interactions biochimiques et génétiques complexes aboutissant à l'établissement de la symbiose (voir les revues de Caetano-Anollés et Gresshoff, 1991 ; Dénarié et Roche, 1992).

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

1.1. Les modes d'infection

Les bactéries symbiotiques peuvent pénétrer dans la plante hôte par 3 voies distinctes d'infection : (i) par l'intermédiaire des poils absorbants, (ii) entre les cellules de l'épiderme le plus souvent au niveau de déchirures provoquées par l'émergence des racines latérales, (iii) entre les cellules intactes de l'épiderme par digestion de la paroi cellulaire (Sprent et de Faria, 1988). Le déterminisme du mode d'infection est contrôlé génétiquement par la plante hôte et non par les micro-organismes symbiotiques (Young et Johnston, 1989).

1.1.1. Evènements préliminaires à l'infection

L'étape d'infection des racines de légumineuses est précédée par une série d'évènements préliminaires qui, pour certains, déterminent l'établissement de la symbiose. Les microsymbiontes présents dans les sols se multiplient dans la rhizosphère en catabolisant les métabolites exsudés par les racines. Chez le pois ou la vesce, l'augmentation du nombre de rhizobia pourrait être corrélée à la libération d'importantes quantités d'un acide aminé, l'homosérine (van Egeraat, 1975). Toutefois, l'aptitude à cataboliser l'homosérine ne semble pas nécessaire pour l'infection et la nodulation (Economou *et al.*, 1988). Elle pourrait, par contre, jouer un rôle important dans la compétition entre souches de rhizobia au voisinage d'une même plante hôte ou entre les rhizobia

et les autres micro-organismes de la rhizosphère.

D'autres composés, présents dans les exsudats racinaires, notamment des acides aminés, des sucres et des acides carboxyliques peuvent jouer le rôle de chimioattractants (Caetano-Anollés *et al.*, 1988). Bactéries mobiles, les rhizobia sont en effet attirés vers les racines des légumineuses par un chimiotactisme positif (Gaworzewska et Carlile, 1982). Le chimiotactisme et la mobilité semblent être impliqués dans la compétitivité entre souches dans la rhizosphère. Ils ne sont pas essentiels pour le processus d'infection et de nodulation (Caetano-Anollés *et al.*, 1988).

L'attachement des rhizobia aux poils absorbants racinaires constitue une autre étape symbiotique précoce. Des lectines végétales interviendraient dans l'attachement ou l'adsorption spécifique des micro-organismes sur les poils absorbants de leur hôte (Dazzo *et al.*, 1984 ; Diaz *et al.*, 1989 ; Smit *et al.*, 1989).

1.1.2. Infection par les poils absorbants

Le mode d'infection *via* les poils absorbants de la racine hôte est le plus répandu (Dart, 1977 ; Bauer, 1981 ; Verma et Long, 1983). Il est observé chez la grande majorité des légumineuses tempérées mais aussi chez certaines légumineuses tropicales comme *Glycine max* (Turgeon et Bauer, 1982 ; Pueppke, 1983) et *Vigna unguiculata* (Pueppke, 1983). Chez la luzerne, le phénotype Hac correspond à un poil absorbant présentant une déformation apicale d'au moins 360° au centre de laquelle un point réfringent intensément coloré par le bleu de méthylène correspond au site de pénétration des bactéries dans le poil absorbant (Vasse et Truchet, 1984 ; Truchet *et al.*, 1984 et 1985). Un cordon d'infection, structure tubulaire d'origine végétale à l'intérieur duquel se trouvent les bactéries, se développe ensuite dans la lumière du poil et progresse jusqu'à la base du poil absorbant et au cortex végétal où il se dichotomise. Simultanément à l'infection, un petit nombre de cellules du cortex interne se différencient et forment le primordium nodulaire. Au terme de sa progression, le cordon d'infection atteint et envahit le primordium nodulaire. Il faut noter que chez le soja, les cordons d'infection peuvent aussi prendre naissance à partir de poches formées par l'accolement de poils absorbants recourbés aux cellules épidermiques adjacentes et dans lesquelles sont contenues les bactéries (Turgeon et Bauer, 1985).

1.1.3. Infection intercellulaire par "Crack entry"

Un mode d'infection, caractérisé par l'absence de cordon infectieux a été observé et décrit chez plusieurs légumineuses tropicales et subtropicales. L'infection bactérienne s'effectue directement par pénétration intercellulaire

au niveau de l'assise de cellules épidermiques racinaires ou caulinaires de la plante hôte. Ce mécanisme d'infection qui se déroule souvent au niveau d'une zone de faiblesse, est appelé "crack entry". C'est le cas d'*Arachis hypogaea*, de *Stylosanthes* spp., de *Neptunia plena* et de *Sesbania rostrata* pour lesquels l'infection est localisée au niveau des sites d'émergence des racines latérales (Chandler, 1978 ; Chandler *et al.*, 1982 ; James *et al.*, 1992 ; Ndoye *et al.*, en préparation) mais aussi de différentes espèces d'*Aeschynomene* (*A. indica* et *A. afraspera*) chez lesquelles la nodulation peut être racinaire ou aérienne. Dans ce dernier cas, les nodules se développent au niveau de primordiums racinaires préexistants localisés sur la tige (Arora, 1954 ; Yatazawa et Yoshida, 1979 ; Alazard et Duhoux, 1990). Une infection de type intercellulaire a également été observée chez une non légumineuse, *Parasponia rigida* (Lancelle et Torrey, 1984 et 1985). La propagation de l'infection intercellulaire dans le cortex jusqu'à la zone méristématique induite à distance peut s'effectuer suivant deux mécanismes. Chez *Arachis hypogea* et *Aeschynomene indica*, la pénétration intercellulaire conduit, après multiplication active des bactéries, à la formation de zones intercellulaires d'infection (Arora, 1954 ; Chandler, 1978). Les micro-organismes symbiotiques envahissent les premières cellules corticales voisines par digestion locale ou invagination des parois cellulaires. L'infection se propage alors par divisions successives des cellules corticales envahies qui vont finalement former un tissu nodulaire caractérisé par l'absence de cellules non envahies. Chez *Stylosanthes* et *Aeschynomene afraspera*, les premières cellules corticales envahies ne se divisent pas mais se désorganisent après dissolution progressive de leur paroi (Chandler *et al.*, 1982 ; Alazard et Duhoux, 1990). Ces cellules envahies, désorganisées, vont constituer des zones intercellulaires d'infection contenant de nombreuses bactéries en division. Les micro-organismes progressent ainsi, par désorganisations successives des cellules hôte, du cortex jusqu'aux cellules corticales plus internes et plus résistantes qu'ils envahissent par invagination des parois cellulaires. Le mode d'infection intercellulaire a été décrit chez plusieurs légumineuses à nodules racinaires et/ou aériens comme *Sesbania rostrata*, *Neptunia oleracea* et *Neptunia plena* (Schaeede, 1940 ; Tsien *et al.*, 1983 ; Duhoux, 1984 ; James *et al.*, 1992, Ndoye *et al.*, en préparation). Ces trois légumineuses se distinguent cependant de celles décrites ci-dessus par l'absence de divisions successives des cellules envahies. Le développement de cordons d'infection, identiques à ceux observés chez les légumineuses tempérées, à partir de poches ou d'espaces intercellulaires, permet la propagation de l'infection.

1.1.4. Infection intercellulaire

Un troisième mode d'infection a été décrit chez *Mimosa scabrella* (de Faria *et al.*, 1988 ; Sprent et de Faria, 1988). Les bactéries traversent la couche mucilagineuse recouvrant la surface de la racine avant de pénétrer dans la paroi primaire d'une cellule épidermique. Elles progressent alors directement entre deux cellules épidermiques voisines probablement par dégradation et/ou digestion des parois cellulaires. Les micro-organismes atteignent les cellules du cortex en se déplaçant à travers la paroi primaire des cellules et les espaces intercellulaires où elles se multiplient. La multiplication des bactéries dans ces régions peut s'accompagner d'une pénétration dans les cellules adjacentes par invagination ou déformation de la paroi cellulaire. Une fois à l'intérieur des cellules, les bactéries sont confinées dans du matériel pariétal dans lequel elles se multiplient. Des structures ressemblant à des cordons d'infection, émises à partir de ces sacs d'origine pariétal, infectent alors les cellules voisines en traversant les cellules. L'invasion par ces cordons néo-formés entraîne la dégénérescence de la cellule hôte comme dans le cas de *Stylosanthes* et *Aeschynomene afraspera* (Chandler *et al.*, 1982 ; Alazard et Duhoux, 1990). L'infection se propage enfin dans les cellules en division du cortex interne par l'intermédiaire de cordons d'infection.

1.2. Le développement des nodules

L'induction à distance de divisions cellulaires dans le cortex racinaire par dédifférenciation des cellules corticales et, l'individualisation d'un primordium nodulaire puis du méristème nodulaire originel, sont des réactions communes à toutes les légumineuses (Libbenga et Harkes, 1973 ; Turgeon et Bauer, 1982 ; Dudley *et al.*, 1987 ; Truchet *et al.*, 1991). Les nodules qui se développent à partir des méristèmes sont des structures différenciées dont les caractéristiques sont spécifiques de la plante hôte (Dart, 1977 ; Rolfe et Gresshoff, 1988). En effet, comme pour les modes d'infection, les caractéristiques structurales des nodules fixateurs d'azote sont contrôlées génétiquement par la plante.

Il existe une grande variété de nodules qui diffèrent entre eux par leur anatomie, leur morphologie ou encore leur type de développement. Deux types principaux de nodule sont décrits. Les légumineuses tempérées comme le pois (*Pisum*), le trèfle (*Trifolium*), ou la luzerne (*Medicago*) forment des nodules dont l'activité méristématique est continue pendant l'ontogénèse, leurs conférant une forme généralement allongée (Truchet et Coulomb, 1973 ; Newcomb, 1981). Ces nodules sont dits de type indéterminé. Le primordium nodulaire prend naissance et s'individualise à partir des cellules du cortex interne situées en face d'un des pôles de protoxylème (Libbenga et Harkes, 1973 ; Dudley, 1987).

Le deuxième type de nodule, de forme sphérique et à activité méristématique limitée dans le temps, est dit déterminé. Il est observé chez plusieurs légumineuses tropicales comme le soja (*Glycine max*), l'arachide (*Arachis hypogea*), *Stylosanthes* spp. ou *Aeschynomene afraspera* (Chandler, 1978 ; Newcomb *et al.*, 1979 ; Chandler *et al.*, 1982 ; Alazard et Duhoux, 1990). Chez ces plantes, le méristème prend naissance à partir des cellules du cortex externe. Le développement d'un nodule de type déterminé est essentiellement dû à l'augmentation du volume des cellules qui le constituent.

La libération des bactéries à partir des filaments d'infection est une étape importante du développement nodulaire. Chez de nombreuses légumineuses tempérées et chez le soja, les bactéries sont libérées des filaments d'infection intracellulaires par un processus d'endocytose (Robertson *et al.*, 1978 ; Newcomb, 1981). La libération s'effectue en effet à un niveau où la gaine cellulosique du cordon d'infection fait localement défaut. Seule la membrane, appelée plasmalemme, sépare les bactéries du cytoplasme hôte favorisant ainsi leur endocytose. Au terme de leur libération, les bactéries sont séquestrées à l'intérieur d'une membrane (membrane péribactéroïdienne) dérivant du plasmalemme de la cellule hôte (Newcomb, 1981).

Chez quelques légumineuses tropicales comme *Sesbania rostrata*, *Neptunia oleracea* et *Neptunia plena*, la libération bactérienne s'effectue également à partir de cordons d'infection se développant à partir des poches ou d'espaces intercellulaires d'infection mais aucun processus d'endocytose n'a été observé (Schaede, 1940 ; Tsien *et al.*, 1983 ; Duhoux, 1984 ; James *et al.*, 1992 ; Ndoye *et al.*, en préparation). Chez la majorité des légumineuses tropicales, un autre mécanisme d'infection a été décrit. Les cellules corticales sont envahies par invagination ou dégradation locale de la paroi des cellules hôtes. C'est le cas pour *Arachis hypogea*, *Stylosanthes* spp., *Aeschynomene afraspera* ou *Ae. indica* (Arora, 1954 ; Chandler, 1978 ; Yatazawa et Yoshida, 1979 ; Chandler *et al.*, 1982 ; Vaughn et Elmore, 1985 ; Alazard et Duhoux, 1990).

1.3. Organisation du nodule mature

L'ontogénèse des nodules déterminés et indéterminés se poursuit par la différenciation des deux partenaires comme par exemple l'augmentation de taille des cellules végétales (Truchet *et al.*, 1980) et les modifications morphologiques et ultrasstructurales des bactéries libérées (Vasse *et al.*, 1990). Au terme de la différenciation, les bactéries, alors appelées bactéroïdes, sont capables de réduire symbiotiquement l'azote atmosphérique en ammoniac. Dans les nodules matures, deux principaux types de tissus peuvent être distingués, un tissu central et des tissus périphériques. Les tissus périphériques sont composés d'un cortex externe, d'un endoderme souvent sclérifié et d'un

cortex interne ou parenchyme nodulaire dans lequel cheminent des traces vasculaires connectées à celles de la racine. Cette structure est commune à tous les nodules quel que soit leur type. En revanche, le tissu central est caractéristique du type nodulaire. Le tissu central des nodules indéterminés comporte 5 zones cytologiquement distinctes (Vasse *et al.*, 1990). Une zone méristématique apicale (zone I) dont le fonctionnement permet l'élongation du nodule et donne naissance aux différents tissus nodulaires. Une zone d'infection et de libération bactérienne (zone II), ou zone de préfixation, dans laquelle les cellules augmentent de volume et à l'intérieur desquelles les bactéries prolifèrent. Environ 50% des cellules constituant cette zone demeurent non envahies. Une interzone II-III qui est constituée de cellules riches en amyloplast. Une zone symbiotique (zone III) subdivisée en zone III de fixation et en zone III inefficace. La zone III de fixation, dite zone rouge, montrent des cellules infectées remplies de bactéries différenciées en bactéroïdes capables de réduire l'azote atmosphérique en ammoniac. Enfin dans les nodules âgés, une dernière zone appelée zone de dégénérescence (zone IV) est caractérisée par la nécrose des cellules végétales et des bactéroïdes. Dans les nodules déterminés, il n'existe pas d'activité méristématique continue ce qui conduit au développement de nodules de forme arrondie. Ainsi l'histologie de ces nodules diffère de celle des nodules indéterminés. Le tissu central est constitué de cellules non envahies et de cellules envahies qui se différencient de manière simultanée et sont capables de fixer l'azote atmosphérique à un certain moment de leur maturation.

2. Mécanismes moléculaires de la nodulation

Au cours des dix dernières années, de nombreux laboratoires se sont intéressés aux mécanismes d'association entre les légumineuses et les rhizobia. Outre les raisons agronomiques évidentes, cet intérêt s'explique par le fait que les associations symbiotiques représentent des modèles de choix pour l'étude de mécanismes biologiques fondamentaux comme ceux relatifs à la reconnaissance entre un eucaryote et un procaryote, ou bien à l'organogénèse végétale. Pour analyser ces mécanismes, l'identification des gènes bactériens et des gènes de plantes, impliqués dans le processus d'infection et de nodulation s'est avérée nécessaire. Le but est en effet de connaître les fonctions des protéines codées par ces gènes et de comprendre la cascade d'évènements biochimiques aboutissant à la formation du nodule.

2.1. Etude génétique du partenaire bactérien

Un grand nombre de gènes bactériens (gènes *nod* et *nol*, *nif*, *fix*, *exo*, *ndv*...etc) sont impliqués dans l'établissement et le fonctionnement de la symbiose, depuis l'étape de reconnaissance des deux partenaires jusqu'à la fixation d'azote. L'étude génétique des bactéries du genre *Rhizobium* (*R. leguminosarum*, *R. fredii*, et surtout *R. meliloti*) ont montré que ces gènes sont pour la majorité, localisés sur des plasmides de grande taille (plasmide symbiotique ou pSym). Dans les genres *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium*, les gènes impliqués dans la symbiose sont essentiellement chromosomiques. Dans ce paragraphe, nous présentons et décrivons uniquement les gènes de nodulation responsables de la synthèse de facteurs extracellulaires.

2.1.1. Les gènes de nodulation ou gènes *nod* et *nol*

Les gènes de nodulation sont dénommés gènes *nod* ou *nol*. Le nombre de gènes *nod* excédant 26, la désignation génotypique *nol* a été récemment introduite pour désigner les gènes de nodulation nouvellement découverts. Les gènes de nodulation peuvent être subdivisés en trois catégories : les gènes communs, les gènes spécifiques et les gènes régulateurs (Figure 11).

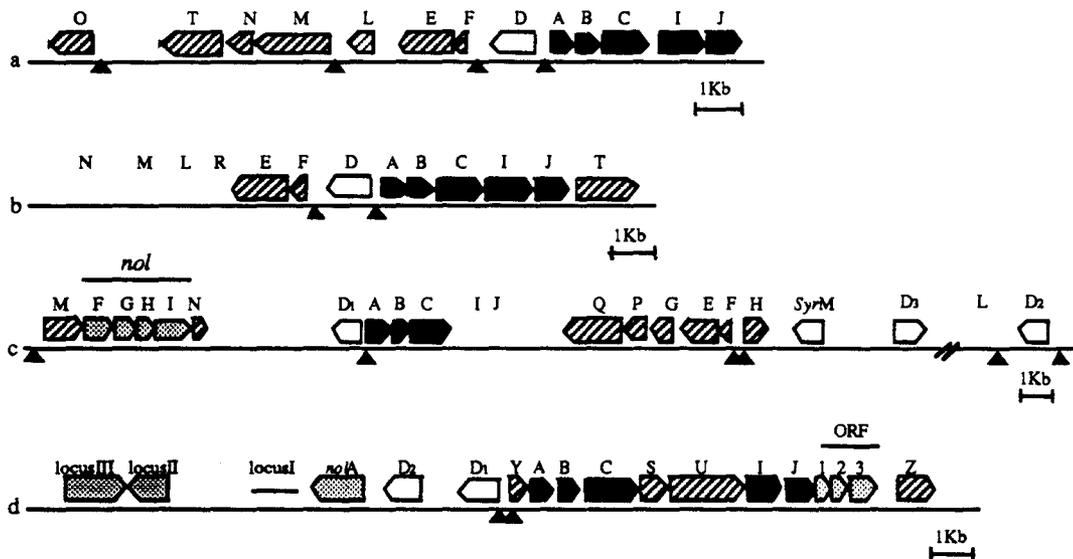


Figure 11. Organisation génétique des gènes *nod* chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (a), *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (b), *Rhizobium meliloti* (c), et *Bradyrhizobium japonicum* (d). Les gènes sont représentés par des flèches ; les gènes *nod* de spécificité sont indiqués avec les flèches hachurées, les gènes *nod* communs avec les flèches noires, et les gènes *nodD* avec les flèches blanches. Les gènes *nol* et les autres loci *nod* sont indiqués avec les flèches en pointillé. Les promoteurs *nod* box sont indiqués par des triangles noirs (d'après Schlaman *et al.*, 1992).

2.1.1.1. Les gènes *nod* communs

Les gènes communs *nod* A, B et C ont été les premiers à être caractérisés et séquencés. Ces gènes sont dits communs car ils sont conservés du point de vue structural et fonctionnel entre les espèces de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium*. Des mutations dans les gènes *nodABC* entraînent la perte de l'aptitude à noduler, ce qui souligne leur rôle primordial au cours de la relation symbiotique (Kondorosi *et al.*, 1984 ; Debellé *et al.*, 1986).

2.1.1.2. Les gènes *nod* spécifiques

Contrairement aux gènes *nod* communs, les gènes *nod* spécifiques ne sont pas conservés structurellement et fonctionnellement. Les gènes *nod* spécifiques, comme les gènes *nodFEG*, *nodPQ*, *nodH* chez *R. meliloti*, sont impliqués dans la spécificité d'hôte (Figure 11 ; Debellé et Sharma, 1986). La mutation d'un de ces gènes peut modifier le spectre d'hôte de la souche. Ainsi par exemple, des mutants de *R. meliloti*, affectés sur le gène *nodH*, n'ont plus le pouvoir de noduler leur hôte homologue, la luzerne (Nod⁻), mais peuvent alors noduler la vesce, un hôte hétérologue (Horvath *et al.*, 1986).

2.1.1.3. Les gènes régulateurs

L'expression des gènes *nod* communs et des gènes *nod* spécifiques est contrôlée par des gènes régulateurs appelés gènes *nodD* (Mulligan and Long, 1989). Les gènes *nodD* sont présents en nombre de copies variables chez les *Rhizobiaceae* (Schlaman *et al.*, 1992). Les protéines NodD activent la transcription des gènes *nod* en se liant à des séquences d'ADN appelées *nod* box et situés en amont des gènes *nod*. Les protéines NodD n'exercent toutefois leur rôle d'activateurs transcriptionnels qu'en présence de flavonoïdes, présents dans les exsudats racinaires des plantes hôtes (Rostas *et al.*, 1986 ; Peters *et al.*, 1986 ; Horvath *et al.*, 1987 ; Long, 1989).

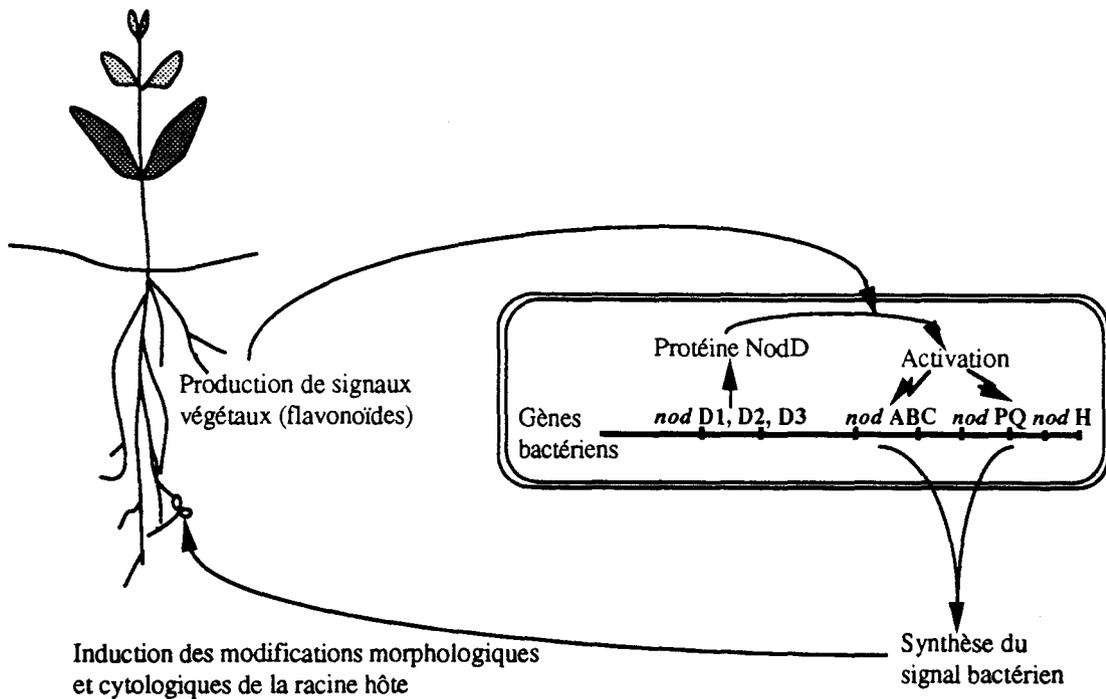


Figure 12. Schéma simplifié montrant les échanges de signaux entre la luzerne et *Rhizobium meliloti* et qui conduisent à l'établissement de la symbiose.

2.1.2. Les signaux symbiotiques bactériens

La transcription des gènes bactériens communs et spécifiques entraîne la synthèse de substances ou facteurs extracellulaires, les facteurs Nod (Figure 12). L'identification, la purification et l'étude structurale du premier facteur extracellulaire, appelé NodRm-1 puis NodRm-IV (S), ont été réalisées chez *Rhizobium meliloti* (Figure 13). Les facteurs Nod sont des lipo-oligosaccharides constitués de tétra- ou de pentamères de résidus N-acétyl D-glucosamine, liés en $\beta,1-4$ et dont le sucre terminal non réducteur est N-acylé (Lerouge *et al.*, 1990 ; Roche *et al.*, 1991^a). Ces molécules de base sont diversement substituées par des enzymes codés par les gènes *nod* spécifiques. Les substitutions déterminent la spécificité du facteur vis à vis des plantes hôtes. Les modifications peuvent porter sur la longueur, le degré de saturation de la chaîne d'acyl, la sulfatation du sucre réducteur, la présence ou l'absence de groupement acétyl (Roche *et al.*, 1991^b, Spaink *et al.*, 1991 ; Figure 13). Ainsi, par exemple, les gènes *nodH* et *nodPQ* déterminent la sulfatation des facteurs Nod de *R. meliloti* (Figure 13 ; Roche *et al.*, 1991^b).

Les facteurs Nod ont une grande activité biologique. Ils induisent la déformation des poils absorbants (Lerouge *et al.*, 1990), la formation de racines courtes et épaisses (phénotype *tsr* ; Spaink *et al.*, 1991), l'induction de divisions cellulaires corticales et d'une véritable organogénèse nodulaire (Truchet *et al.*, 1991) et enfin la formation de structures tubulaires pré-

infectieuses (van Brussel *et al.*, 1992). Notons que les facteurs Nod purifiés sont actifs à des concentrations, de 10^{-9} à 10^{-12} M, très inférieures à celles auxquelles agissent les hormones végétales (Dénarié et Roche, 1992).

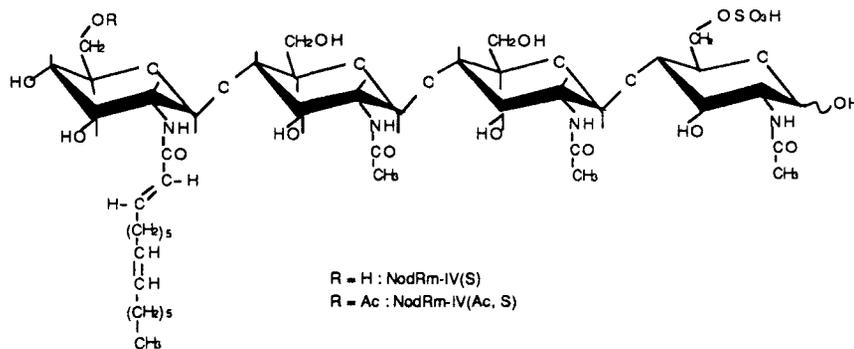


Figure 13. Structure des facteurs NodRm-IV (S) et NodRm-IV (Ac, S) de *Rhizobium meliloti*.

2.2. Etude génétique du partenaire végétal

La formation des nodules est accompagnée de l'expression spécifique de gènes végétaux codant pour des protéines spécifiques appelées nodulines (Legocki et Verma, 1980 ; van Kammen, 1984). Ces gènes sont exprimés différemment durant le développement nodulaire permettant ainsi de distinguer les nodulines précoces des nodulines tardives (Govers *et al.*, 1985). Les gènes codant pour des nodulines précoces s'expriment pendant les étapes initiales, ~~e'est à dire bien avant le début de l'activité fixatrice d'azote~~ tandis que les gènes codant pour des nodulines tardives s'expriment peu de temps avant ou au moment de la fixation d'azote.

Les protéines codées par les gènes nodulines précoces sont principalement impliquées dans les processus d'infection (ENOD5 et ENOD12) et dans l'organogénèse des nodules (ENOD2) (Scheres *et al.*, 1990). La plupart des nodulines précoces sont des protéines riches en proline. L'induction de l'expression des gènes *noduline* précoces est sous le contrôle du partenaire bactérien (ENOD12) mais peut aussi, dans le cas d'ENOD2, être sous celui d'hormones végétales, comme les cytokinines (Scheres *et al.*, 1990 ; Dehio et de Bruijn, 1992). Les signaux Nod semblent également capables d'induire l'expression des gènes nodulines précoces (Nap et Bisseling, 1990).

La plus connue et la plus abondante des nodulines tardives est la leghémoglobine, dont la partie protéique, la globine, représente 25% des protéines solubles présentes dans le nodule. La partie hémique est synthétisée par le microsymbiote. La leghémoglobine est une hémoprotéine affine pour l'oxygène qu'elle transporte aux bactéroïdes (Wittenberg *et al.*, 1974).

D'autres nodulines tardives intervenant dans le métabolisme du carbone et de l'azote ont été identifiées. C'est le cas de l'uricase (Bergmann *et al.*, 1983), de la glutamine synthétase (Lara *et al.*, 1983), de la malate deshydrogénase (Appels et Haaker, 1987), et des nodulines de la membrane péribactéroïdienne (Fortin *et al.*, 1987).

CHAPITRE I

ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE SOUCHES NODULANT *ACACIA ALBIDA*

INTRODUCTION

Les bactéries à croissance lente du genre *Bradyrhizobium* nodulent la plupart des légumineuses tropicales et en particulier celles qui ont une grande importance économique comme l'Arachide (*Arachis hypogea*), le Niébé (*Vigna unguiculata*), ou encore le Pois Bambara (*Voandzeia subterannea*). Il en est de même pour de nombreux arbres (*Pterocarpus erineaceus*, *Erythrophleum guineensis*, *Prosopis africana*, *Dalbergia melanoxylon*...etc), ainsi que différentes espèces du genre *Aeschynomene* (*A. elaphroxylon*, *A. afraspera*, *A. indica*, *A. sensitiva*...etc) (Alazard, 1991 ; Wheeler, 1991). Contrairement à la plupart des acacias comme *Acacia senegal*, *Acacia raddiana*, *Acacia nilotica* qui sont nodulés par les bactéries du genre *Rhizobium*, *Acacia albida* forme des nodules avec des bactéries du genre *Bradyrhizobium* (Dreyfus et Dommergues, 1981).

Au Sénégal, *Acacia albida* pousse dans deux régions écoclimatiques très différentes, la zone sahélienne et la zone soudano-guinéenne qui diffèrent entre elles au niveau des précipitations annuelles, de 100 à 1500 mm, et de la profondeur de la nappe phréatique. L'étude de la nodulation d'*Acacia albida* a été réalisée chez des arbres adultes de ces deux régions.

Nos premiers objectifs ont consisté à observer la nodulation *in situ* sur le système racinaire entier, à examiner la distribution des populations de *Bradyrhizobium* au voisinage des racines et enfin, à isoler et à caractériser les différentes souches nodulantes. Compte tenu de la profondeur souvent importante des racines d'*Acacia albida*, des forages sous le couvert de l'arbre ont été réalisés.

MATERIEL ET METHODES

1. Sites géographiques d'étude

Deux sites ont été choisis dans la zone sahélienne et deux sites dans la zone soudano-guinéenne au Sénégal (le Houérou, 1989). Dans la zone sahélienne, deux forages ont été effectués : le premier à proximité de Louga (ville située à 200 km au nord de Dakar et recevant 300 mm de précipitations annuelles) ; le second dans un champ à Diokoul (village situé entre Thiès et Bambey, avec 500 mm de pluie). Dans la zone soudano-guinéenne, les deux sites de prélèvement ont été choisis en Casamance dans des rizières localisées respectivement à Djinaki (village entre Bignona et la Gambie, 1100 mm de précipitations annuelles) et à Kabrousse (village à la frontière Guinéenne, 1500 mm de pluie). Les quatre sites de prélèvement sont représentés sur la

carte du Sénégal (Figure 1).

2. Méthode d'échantillonnage

Des échantillons de sol ont été recueillis en saison sèche sous le couvert d'arbres adultes de 15 à 20 m de hauteur. Les échantillons de sol ont été collectés à différentes profondeurs avec du matériel léger de forage adapté au prélèvement de sol sablo-argileux (Figures 2 et 3). Le matériel utilisé permet de forer jusqu'à la nappe d'eau et d'atteindre une profondeur de 35 m en une semaine. Des carottes échantillonnées depuis la surface jusqu'au niveau de l'eau sont recueillies tous les 20 cm. Pour éviter toute contamination par des horizons de sols supérieurs, seule la partie interne de la carotte de sol est conservée. Chaque échantillon recueilli dans un sachet stérile est maintenu à 4°C avant d'être ramené au laboratoire pour la numération des bradyrhizobia capables de noduler *Acacia albida*. Précisons que pour chaque zone écoclimatique, des sols de surface ont été échantillonnés. Leur origine figure dans la liste des souches (Tableau 3).

Figure 1. Position géographique des sites de forages.

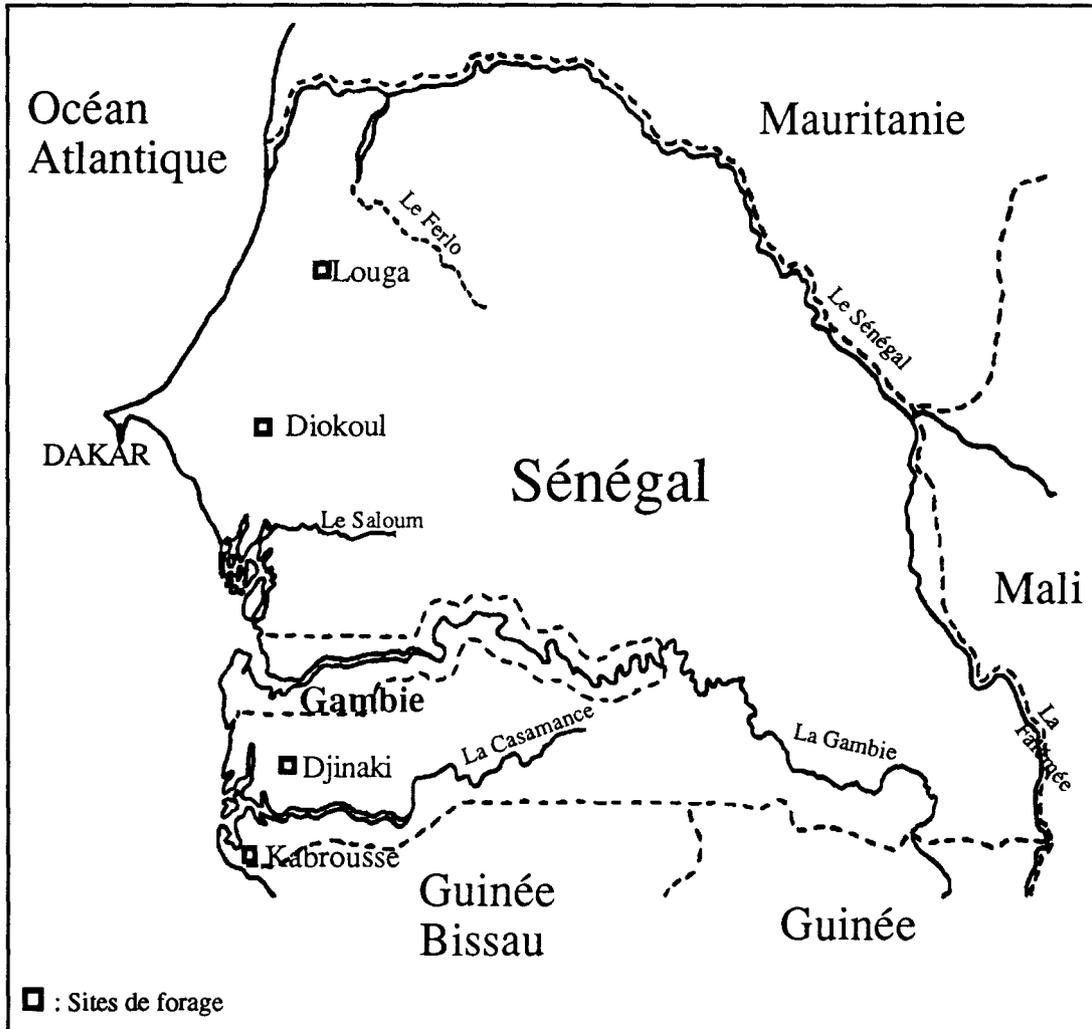




Figure 2. Forage sous *Acacia albida* dans la région de Louga.

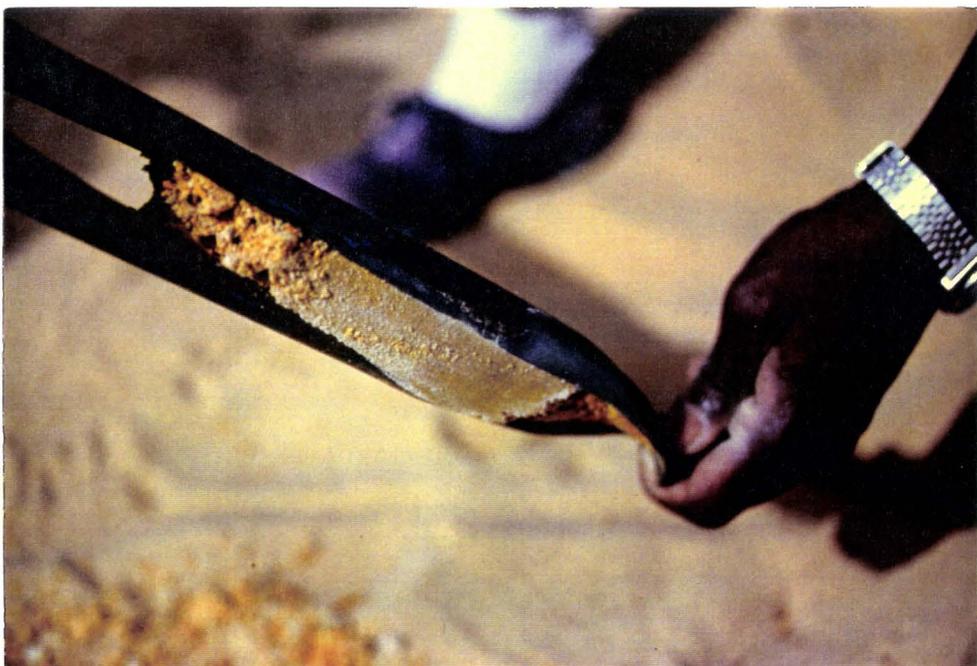


Figure 3. Echantillon de sol prélevé à la tarière.

3. Culture aseptique d'*Acacia albida*

3.1. Stérilisation et germination des graines

Les graines d'*Acacia albida* sont stérilisées superficiellement avec de l'acide sulfurique concentré pendant 1 h. Les graines sont ensuite rincées plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile avant d'être déposées dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée à 0,8% puis mises à germer pendant 48 h à l'obscurité, dans une chambre humide thermostatée à 30°C.

3.2. Culture d'*Acacia albida* en tube

La culture d'*Acacia albida* est réalisée en tubes de culture, de 220 x 22 mm, appelés tubes Gibson (Gibson, 1963 ; Figure 4). Quarante huit heures après germination, les plantules sont introduites dans des tubes à raison d'une plantule par tube. Chaque tube contient 30 ml de milieu nutritif de Jensen gélosé et incliné (Vincent, 1970) et est recouvert de papier d'aluminium. Celui-ci est percé de deux orifices, l'un pour l'arrosage, l'autre pour l'introduction de la radicelle de la plantule (voir figure 4)

**Composition du milieu Jensen (par litre d'eau distillée)
Stérilisation à 120°C / 20 min.**

KH ₂ PO ₄ (solution à 20g/1000ml).....	10,0 ml
MgSO ₄ 7H ₂ O et NaCl (solutions à 20g/1000ml).....	10,0 ml
CaHPO ₄ (solution à 50g/1000ml).....	5,0 ml
FeCl ₃ 6H ₂ O (solution à 4g/1000ml).....	10,0 ml
Oligoéléments de Jensen.....	1,0 ml
pH ajusté à	6,7
Agar.....	20,0 g

Le volume du tube est complété avec de l'eau distillée stérile. La racine de la plantule est introduite stérilement dans le tube, les cotylédons restant à l'air libre. Dans un premier temps, les tubes sont placés dans une enceinte humide pendant 48 h (ce qui permet aux plantules de se libérer facilement de l'enveloppe cotylédonnaire) puis dans une chambre de culture thermostatée à 30°C.

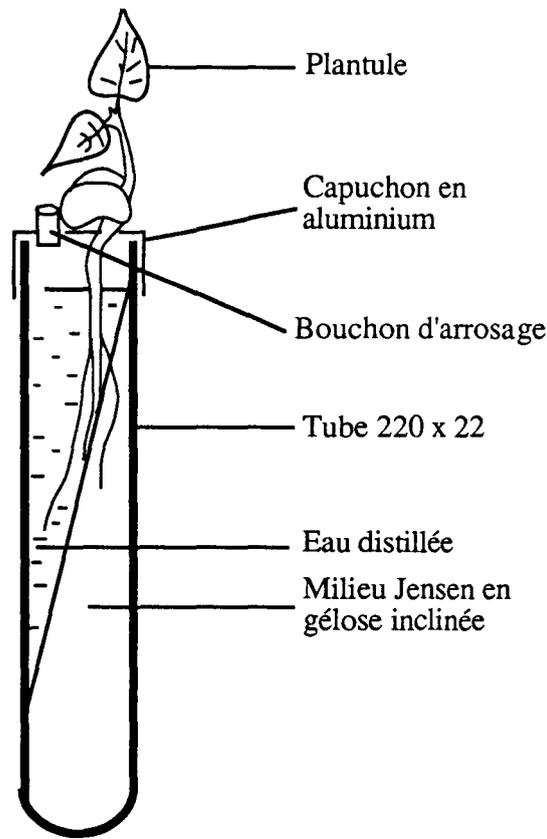


Figure 4. Schéma d'un tube Gibson.

4. Dénombrement des bradyrhizobia nodulant *Acacia albida*

4.1. Préparation des dilutions du sol à dénombrer

Des échantillons de 10 g du sol, choisis à intervalles réguliers sur toute la profondeur du forage, sont mis en suspension sous agitation pendant 1 h dans 90 ml d'une solution saline stérile (solution de NaCl à 0,8%). Des dilutions successives sont ensuite réalisées en prélevant 2 ml de la suspension mère de sol et en les diluant dans 8 ml de solution saline stérile. La dilution est alors de 1/50 du sol. La même opération est répétée à partir du premier tube de dilution. Six dilutions de 5 en 5 sont ainsi réalisées.

4.2. Inoculation d'*Acacia albida*

Cette gamme de dilutions du sol est utilisée pour inoculer *Acacia albida* à raison de 4 plantes par dilution. Cinq jours après avoir transplanté les graines en tubes, les jeunes plants sont inoculés avec 1 ml de chaque dilution de sol et

replacés dans la chambre de culture thermostatée. Quatre plantes non inoculées servent de témoins par série de dilution. Après 4 semaines de culture pendant lesquelles les plantes ne sont pas arrosées, les racines sont examinées et la nodulation éventuellement quantifiée.

4.3. Calcul du nombre de bradyrhizobia capables de noduler *Acacia albida*

La densité des populations de *Bradyrhizobium* nodulant *Acacia albida* dans les échantillons de sol a été estimée par la technique du nombre le plus probable ou technique MPN (Brockwell, 1980).

Chaque tube renfermant une plante portant des nodules est noté 1 (tube positif). Le nombre de plantes nodulées, qui peut varier de 0 à 4 pour chaque dilution, permet de déterminer un nombre dit caractéristique. La concentration en bradyrhizobia par ml de suspension de sol initiale est alors déterminée grâce aux tables de Brockwell. En tenant compte du volume de la suspension initiale, le nombre de bactéries par gramme de sol est alors estimé.

5. Piégeage des bradyrhizobia en gaines

Les échantillons de sols prélevés en surface à proximité d'*Acacia albida* poussant dans différentes régions sont répartis dans des gaines en plastique couramment utilisées en pépinière. Trois graines d'*Acacia albida* prégermées sont plantées dans chaque gaine placée en serre, sous éclairage naturel. L'arrosage est réalisé avec de l'eau déminéralisée stérile, afin d'éviter toute contamination extérieure. Après une semaine, le nombre de plantules est réduit à une par gaine. Les souches bactériennes sont isolées à partir des nodules formés après 2 mois de croissance.

6. Isolement et culture des bradyrhizobia

6.1. Milieu de culture

Le milieu communément utilisé pour la croissance et la conservation des bradyrhizobia est le milieu YM (Vincent, 1970).

Composition du milieu YM (par litre d'eau distillée)
Stérilisation à 120°C / 20 min.

Mannitol	10,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
Glutamate de sodium.....	0,5 g
NaCl	0,05 g
MgSO ₄ 7H ₂ O (solution à 10g/1000ml).....	10,0 ml
CaCl ₂ (solution à 40g/1000ml)	1,0 ml
FeCl ₃ 6H ₂ O (solution à 4g/1000ml).....	1,0 ml
Extrait de levure	1,0 g
pH ajusté à	6,8
Agar.....	20,0 g

6.2. Isolement des souches

Les nodules formés dans les tubes de plus forte dilution (§ III), et ceux présents sur les racines d'*Acacia albida* cultivés en gaine (§ IV) sont récoltés, immédiatement immergés dans une solution d'alcool à 70% pendant 10 min, désinfectés superficiellement dans une solution de chlorure mercurique (HgCl₂) à 0,01% pendant 1 à 2 minutes et rincés abondamment à l'eau distillée stérile. Pour les nodules de taille importante, l'isolement des bactéries est réalisée directement en piquant, avec un fil de platine, l'intérieur du nodule sectionné de façon stérile et en ensemençant le milieu de croissance gélosé YMA contenu dans une boîte de Pétri. Les nodosités de petite taille sont broyées à l'aide d'une baguette de verre flambée à l'alcool et l'ensemencement est réalisé à l'aide d'une anse de platine. Les boîtes de Pétri sont mises à incuber pendant 5 à 7 jours dans une étuve à 28°C à l'obscurité. Des isolats purs sont obtenus après plusieurs repiquages.

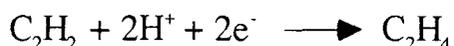
7. Mesure de l'activité réductrice d'acétylène

Tous les isolats ont été testés expérimentalement pour leur aptitude à fixer l'azote atmosphérique en symbiose.

7.1. Principe et conditions expérimentales

L'activité réductrice de la nitrogénase a été mesurée suivant la méthode de Hardy *et al.* (1968, 1973). Cette enzyme, responsable de la réduction de l'azote

atmosphérique en ammoniac, est capable également de réduire l'acétylène en éthylène. Cette propriété est utilisée pour la mesure de l'activité nitrogénasique.



La mesure de l'Activité Réductrice d'Acétylène aussi appelé ARA a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse par ionisation de flamme. Un chromatographe de type Varian Aerograph série 1400 a été 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 de 75°C, 60°C et 120°C. Le gaz vecteur (azote) parcourant la colonne a un débit de 40 ml / min. Les débits de l'air comprimé et de l'hydrogène gazeux sont respectivement 300 ml / min et 25 à 30 ml / min.

7.2. Protocole expérimental

Des cultures liquides des différents isolats à tester sont réalisées sur milieu YM. Quatre *Acacia albida* (provenance Kagnobon) cultivés en tube Gibson sont inoculés avec 100 µl d'une culture fraîche d'une souche de bradyrhizobia contenant approximativement 10⁸ bactéries par ml. Après 6 semaines, les jeunes arbres sont coupés au niveau de l'aluminium, l'eau résiduelle des tubes éliminée et les tubes fermés hermétiquement avec un bouchon à jupe en caoutchouc. L'acétylène est injecté à l'aide d'une seringue dans les tubes à raison de 10% du volume mort soit 5 ml par tube. Après une période d'incubation de 30 min à 25°C, 500 µl de mélange gazeux est injecté dans le chromatographe à phase gazeuse à ionisation de flamme et analysé. Les isolats sont classés en fonction de leur activité réductrice (exprimé en nanomoles d'éthylène produite par h et par plante), en 4 groupes d'efficacité : très efficaces, > 600 ; efficaces, de 350 à 600 ; peu efficaces, de 100 à 350 ; inefficaces, < 100.

8. Mise en collection des souches

Après purification et contrôle, les isolats sont repiqués en tubes à vis sur YM en gélose inclinée, pour une conservation de quelques mois. Pour de longues conservations, les isolats sont stockés au congélateur à -80°C dans des cryotubes contenant 1,8 ml de culture bactérienne sur YM glycérolée à 20% (0,6 ml de glycérol à 60% pour 1,2 ml de culture). La collection est dupliquée au laboratoire de Microbiologie de Gand (collection LMG). Les souches sont disponibles pour tous les laboratoires qui en font la demande.

RESULTATS

I. La nodulation chez *Acacia albida*

Dans la zone soudano-guinéenne à pluviosité importante (rizières de Casamance), la profondeur de la nappe d'eau varie entre 1 et 4 m et les racines d'*Acacia albida* ne dépassent pas cette profondeur. L'observation du système racinaire de surface (10 à 30 cm) montre une abondante nodulation non seulement sur les racines de jeunes arbres mais aussi sur celles d'arbres adultes. Les nodules, attachés aux racines superficielles de l'arbre, présentent une forme coralloïde (Figure 5). Leur taille varie entre 5 à 20 mm de long pour 2 à 5 mm de large. En section, les nodules présentent la coloration rouge caractéristique de la leghémoglobine, pigment essentiel à une activité fixatrice de l'azote atmosphérique.

Par contre, aucun nodule n'a pu être observé sur les différentes racines récoltées dans les sols de surface au nord du Sénégal (zone sahélienne) ni dans les nombreux échantillons de sols recueillis à Louga et Diokoul, malgré des forages permettant d'atteindre la nappe phréatique. De même, les observations faites au cours du fonçage d'un puits de 16 m sous un *Acacia albida* en pleine feuillaison n'ont pas permis d'observer des nodules malgré la présence de nombreuses racines.



Figure 5. Nodule d'*Acacia albida* de type coralloïde.

II. Distribution des populations de *Bradyrhizobium* se développant sous le couvert d'*Acacia albida* dans les zones sahélienne et soudano-guinéenne (Tableau 1)

Le tableau 1 montre que dans les deux régions écoclimatiques, les bradyrhizobia nodulant *Acacia albida* sont présents de la surface jusqu'à la nappe d'eau.

Tableau 1. Distribution des populations de *Bradyrhizobium* dans quatre profils de sol sous le couvert d'*Acacia albida* de la surface jusqu'à la nappe d'eau.

Zone écoclimatique sahélienne (100 à 500 mm de pluies annuelles)				Zone écoclimatique soudano-guinéenne (1000 à 1500 mm de pluies annuelles)			
Louga		Diokoul		Djinaki		Kabrousse	
Niveau sol	Nb. bact./ g de sol ^a	Niveau sol	Nb. bact./ g de sol ^a	Niveau sol	Nb. bact./ g de sol ^a	Niveau sol	Nb. bact./ g de sol ^a
0,1 m	70	0,1 m	< 1	0,1 m	13000	0,1 m	230
0,5 m	1270	0,5 m	20	0,5 m	32000	0,5 m	42000
2,5 m	90	2,5 m	20	1,0 m	28000	1,0 m	2300
5,0 m	160	4,0 m	50	1,5 m	28000	1,5 m ^b	9180
7,5 m	<1	6,0 m	<1	2,0 m	43000		
11,0 m	<1	8,0 m	<1	3,0 m	42400		
14,0 m	<1	10,0 m	<1	4,0 m	1500		
17,5 m	90	11,5 m	30	4,5 m ^b	1500		
21,0 m	<1	14,0 m	80				
24,0 m	40	16,5 m ^b	30				
27,5 m	10						
28,5 m	120						
30,0 m	20						
32,0 m	20						
33,5 m	340						
34,0 m ^b	1320						

^a Nombre de bactéries par g de sol déterminé par MPN.

^b Niveau de la nappe d'eau.

Dans la région de Louga, la densité de bradyrhizobia nodulant *Acacia albida* atteint un maximum au niveau de la nappe phréatique à 34 m de profondeur (1320 bact./g de sol). Une densité inférieure à cette valeur est observée aux autres niveaux, excepté à 0,5 m (1270 bradyrhizobia/g de sol) où des racines latérales étaient présentes. A Diokoul, les populations de *Bradyrhizobium*, négligeables à la surface (< 1 bact./g de sol), sont significativement plus importantes dans le voisinage de la nappe d'eau (30 à 80 bact./g de sol). Pour les deux forages, il a été noté l'absence de bradyrhizobia aux niveaux intermédiaires (de 7,5 à 14 m et 21 m à Louga, et 6 à 10 m à

Diokoul), zones caractérisées par une très faible accumulation de fragments racinaires.

Dans la zone soudano-guinéenne, où la nappe d'eau se trouve à faible profondeur, des densités de populations de bradyrhizobia sont très importantes de la surface jusqu'à la nappe d'eau. Les densités atteintes à Djinaki de 0,5 à 3 m de profondeur (13000 à 43000 bact./g de sol) et à Kabrousse à 0,5 m (42000 bact./g de sol) sont comparables aux densités bactériennes observées dans les sols tempérés où sont cultivés les légumineuses.

Notons enfin qu'une association entre *Acacia albida* et des champignons endomycorhiziens a pu être observée sur des fragments de racines recueillis au cours des différents prélèvements.

III. Corrélation entre la présence d'*Acacia albida* et la densité des populations de *Bradyrhizobium* dans les sols

Huit forages ont été réalisés dans la zone soudano-guinéenne dans la région de Kabrousse choisie en raison de la faible profondeur de la nappe d'eau localisée à 1,2 m au moment de notre étude, c'est à dire en début de saison sèche. Quatre sites écologiques distincts ont été choisis : sous couvert d'*Acacia albida*, hors couvert d'*A. albida*, au pied d'un *A. albida* mort et sous couvert de *Parkia biglobosa* (Tableau 2). Deux forages ont été effectués à quelques mètres de distance sous le même arbre. Les 2 forages hors couvert d'*A. albida* ont été réalisés à 500 m de part et d'autre d'un arbre.

Tableau 2. Corrélation entre le développement d'*Acacia albida* et la distribution des populations de *Bradyrhizobium* dans les sols.

	Nombre de bradyrhizobia nodulant <i>Acacia albida</i>							
	Sous couvert d' <i>A. albida</i>		Hors couvert d' <i>A. albida</i>		Sous couvert d' <i>A. albida</i> mort		Sous couvert de <i>Parkia biglobosa</i>	
	Forage 1	Forage 2	Forage 3	Forage 4	Forage 5	Forage 6	Forage 7	Forage 8
Profondeur								
0,1 - 0,2 m	1481 ^a	850	<1	<1	159	27	382	<1
0,6 - 0,7 m	6300	12	<1	<1	<1	<1	<1	<1
1.1 - 1,2 ^b m	42	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1

^a Les résultats sont exprimés en nombre de bactéries par gramme de sol.

^b Niveau de la nappe d'eau.

Les résultats suggèrent fortement que la prolifération des populations de *Bradyrhizobium* dans les sols est étroitement corrélée à la présence d'*Acacia*

albida. En effet, à partir de 0,2 m de profondeur, seuls les sols sous couvert d'*A. albida* renferment un nombre significatif de bradyrhizobia.

IV. Isolement des bradyrhizobia

Quatre vingt quatre isolats ont été obtenus à partir des nodules d'*Acacia albida*. Cinquante trois d'entre eux ont été piégés au cours des dénombrements des échantillons de sol recueillis par forages. Trente et un ont été isolés à partir des nodules récoltés dans les gaines de piégeage. La liste est donnée dans le tableau 3.

Tableau 3. Nomenclature et origine des bradyrhizobia nodulant *Acacia albida*.

Numéro d'isolats ORS et synonymes	Origine géographique	Expérimentateur ^c
ORS101 (=LMG10664)	Sn ^a ,	B. D.
ORS103 (=LMG10665)	Sn,	B. D.
ORS110 (=LMG10666)	Louga (0.5 m) ^b nord Sn,	N. D.
ORS111 (=LMG10667)	Louga (0.5 m), nord Sn,	N. D.
ORS112 (=LMG10668)	Louga (0.5 m), nord Sn,	N. D.
ORS113 (=LMG10669)	Louga (0.5 m), nord Sn,	N. D.
ORS114 (=LMG10670)	Louga (0.5 m), nord Sn,	N. D.
ORS115 (=LMG10671)	Louga (0.5 m), nord Sn,	N. D.
ORS116 (=LMG10672)	Louga (0.5 m), nord Sn,	N. D.
ORS117 (=LMG10673)	Louga (0.5 m), nord Sn,	N. D.
ORS118 (=LMG10674)	Louga (2.5 m), nord Sn,	N. D.
ORS119 (=LMG10675)	Louga (2.5 m), nord Sn,	N. D.
ORS120 (=LMG10676)	Louga (2.5 m), nord Sn,	N. D.
ORS121 (=LMG10677)	Louga (2.5 m), nord Sn,	N. D.
ORS122 (=LMG10678)	Louga (5.0 m), nord Sn,	N. D.
ORS123 (=LMG10679)	Louga (5.0 m), nord Sn,	N. D.
ORS124 (=LMG10680)	Louga (17.5 m), nord Sn,	N. D.
ORS125 (=LMG10681)	Louga (17.5 m), nord Sn,	N. D.
ORS126 (=LMG10682)	Louga (17.5 m), nord Sn,	N. D.
ORS127 (=LMG10683)	Louga (17.5 m), nord Sn,	N. D.
ORS128 (=LMG10684)	Louga (24.0 m), nord Sn,	N. D.
ORS129 (=LMG10685)	Louga (24.0 m), nord Sn,	N. D.
ORS130 (=LMG10686)	Louga (27.5 m), nord Sn,	N. D.
ORS131 (=LMG10687)	Louga (28.5 m), nord Sn,	N. D.
ORS132 (=LMG10688)	Louga (28.5 m), nord Sn,	N. D.
ORS133 (=LMG10689)	Louga (30.0 m), nord Sn,	N. D.
ORS134 (=LMG10690)	Louga (30.0 m), nord Sn,	N. D.
ORS135 (=LMG10691)	Louga (32.0 m), nord Sn,	N. D.
ORS136 (=LMG10692)	Louga (32.0 m), nord Sn,	N. D.
ORS137 (=LMG10693)	Louga (33.5 m), nord Sn,	N. D.
ORS138 (=LMG10694)	Louga (33.5 m), nord Sn,	N. D.
ORS139 (=LMG10695)	Louga (34.0 m), nord Sn,	N. D.
ORS140 (=LMG10696)	Louga (34.0 m), nord Sn,	N. D.
ORS141 (=LMG10697)	Diokoul (0.5 m), Sn central,	N. D.
ORS142 (=LMG10698)	Diokoul (2.5 m), Sn central,	N. D.
ORS143 (=LMG10699)	Diokoul (4.0 m), Sn central,	N. D.
ORS144 (=LMG10700)	Diokoul (11.5 m), Sn central,	N. D.
ORS145 (=LMG10701)	Diokoul (14.0 m), Sn central,	N. D.

Tableau 3 (suite)

Numéro d'isolats ORS et synonymes	Origine géographique	Expérimentateur
ORS146 (=LMG10702)	Diokoul (14.0 m), Sn central,	N. D.
ORS147 (=LMG11359)	Diokoul (16.5 m), Sn central,	N. D.
ORS148 (=LMG11943)	Djinaki (0.1 m), sud Sn,	L. N.
ORS149 (=LMG11944)	Djinaki (0.5 m), sud Sn,	L. N.
ORS150 (=LMG11945)	Djinaki (1.0 m), sud Sn,	N. D.
ORS151 (=LMG11946)	Djinaki (1.0 m), sud Sn,	N. D.
ORS152 (=LMG11947)	Djinaki (1.5 m), sud Sn,	N. D.
ORS153 (=LMG11948)	Djinaki (1.5 m), sud Sn,	N. D.
ORS154 (=LMG11949)	Djinaki (2.0 m), sud Sn,	N. D.
ORS155 (=LMG11950)	Djinaki (3.0 m), sud Sn,	L. N.
ORS156 (=LMG11951)	Djinaki (4.0 m), sud Sn,	L. N.
ORS158 (=LMG11953)	Djinaki (5.0 m), sud Sn,	L. N.
ORS159 (=LMG11954)	Djinaki (5.0 m), sud Sn,	L. N.
ORS160 (=LMG10703)	Oussouye (Casamance) sud Sn,	N. D.
ORS161 (=LMG10704)	Oussouye (Casamance) sud Sn,	N. D.
ORS162 (=LMG10705)	Oussouye(Casamance) sud Sn,	N. D.
ORS163 (=LMG10706)	Oussouye (Casamance) sud Sn,	N. D.
ORS164 (=LMG10707)	Basse Casamance sud Sn,	N. D.
ORS165 (=LMG10708)	Basse Casamance sud Sn,	N. D.
ORS166 (=LMG10709)	Oussouye (Casamance) sud Sn,	N. D.
ORS167 (=LMG10710)	Katakalousse (Casamance) sud Sn,	N. D.
ORS168 (=LMG10711)	Kabrousse (Casamance) sud Sn,	N. D.
ORS169 (=LMG10712)	Kabrousse (Casamance) sud Sn,	N. D.
ORS170 (=LMG10713)	Bayottes (Casamance) sud Sn,	N. D.
ORS171 (=LMG10714)	Ziguinchor (Casamance) sud Sn,	N. D.
ORS172 (=LMG10715)	Niaguiss (Casamance) sud Sn,	N. D.
ORS173 (=LMG10716)	Bignona (Casamance) sud Sn,	N. D.
ORS174 (=LMG10717)	Badiana (Casamance) sud Sn,	N. D.
ORS175 (=LMG10718)	Nema (Casamance) sud Sn,	N. D.
ORS176 (=LMG11955)	Kabrousse (0.1 m), sud Sn,	N. D.
ORS177 (=LMG11956)	Kabrousse (0.5 m), sud Sn,	N. D.
ORS178 (=LMG11957)	Kabrousse (1.0 m), sud Sn,	L. N.
ORS179 (=LMG11958)	Kabrousse (1.5 m), sud Sn,	L. N.
ORS180 (=LMG10719)	Km 13 après Thiès, centre Sn,	N. D.
ORS181 (=LMG10720)	Km 4 avant Kébémér, nord Sn,	N. D.
ORS182 (=LMG10721)	Km 5 avant Louga, nord Sn,	N. D.
ORS183 (=LMG10722)	Keur Momar Sarr, nord Sn,	N. D.
ORS184 (=LMG10723)	Lac de Guiers, nord Sn,	N. D.
ORS185 (=LMG10724)	Ile Dianemar, nord Sn,	N. D.
ORS186 (=LMG10725)	Km 6 après Dagana, nord Sn,	N. D.
ORS187 (=LMG10726)	Km 6 après Dagana, nord Sn,	N. D.
ORS188 (=LMG10727)	Km 6 après Dagana, nord Sn,	N. D.
ORS189 (=LMG10728)	Km 6 après Dagana, nord Sn,	N. D.
ORS190 (=LMG10729)	Km 1 après Podor (fleuve), nord Sn,	N. D.
ORS191 (=LMG10730)	Km 1 après Podor (fleuve), nord Sn,	N. D.
ORS192 (=LMG10731)	Nhillé Boubacar, nord Sn,	N. D.

^a Sn : Sénégal

^b Profondeur d'échantillonnage

^c B. D. : Bernard Dreyfus ; N. D. : Nicolas Dupuy ; L. N. : Laïla Nassiri

Les isolats énumérés ci-dessus montrent tous une croissance lente sur YMA (apparition de colonies isolées en 5 à 6 jours) caractéristique des bactéries appartenant au genre *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984).

V. Activité réductrice de l'azote atmosphérique des isolats de *Bradyrhizobium*

L'aptitude à fixer l'azote en symbiose des isolats c'est à dire l'effectivité est présentée dans les tableaux 4 et 5.

La majorité des souches isolées sur le site de Louga sont peu effectives (12 isolats) à ineffectives (7 isolats), tandis que 12 des 31 isolats sont classés comme effectifs ou très effectifs (Tableau 4). Deux isolats (ORS130 et ORS136) sur les 3 classés très effectifs proviennent d'échantillons de sol profond (27,5 et 32 m respectivement). A Diokoul, aucun des 6 isolats obtenus des horizons profonds n'est effectif. La plupart des isolats de sols sahéliens de surface sont peu effectifs.

En revanche dans les sites plus humides de Djinaki et Kabrousse (Tableau 5), la plupart des isolats obtenus à partir des forages sont très effectifs ou effectifs. Parmi les isolats des sols soudano-guinéen de surface (n=18), 83% sont effectifs et peu effectifs tandis que 17% d'entre eux sont ineffectifs.

VI. Analyse des échantillons de sol prélevés à partir du forage de Louga

Afin de déterminer si les caractéristiques du sol ont une influence sur la densité des populations de *Bradyrhizobium*, les différents échantillons prélevés à partir du forage de Louga ont été analysés pour leurs propriétés physico-chimiques, granulométriques et organiques (Tableau 6).

Les échantillons de sol prélevés à 34 m à Louga montrent des concentrations en azote total et en carbone organique très faibles (0,05% et 0,17% respectivement) tandis que le taux de phosphore total est beaucoup plus important en profondeur qu'en surface (0,23 contre 0,09%).

Aucune relation entre les caractéristiques du sol et les densités de populations de *Bradyrhizobium* n'a pu être mise en évidence.

Tableau 4. Effectivité des isolats de *Bradyrhizobium* obtenus à partir de 2 forages réalisés à Louga et à Diokoul et à partir de sols de surface des régions sahéliennes.

Origine et profondeur (m) de l'isolat	Effectivité ^a			
	Très effectif	Effectif	Peu effectif	Ineffectif
Louga				
0,5	ORS117.	ORS111, 113, 115.	ORS110, 112.	ORS114, 116.
2,5		ORS118, 119, 121.	ORS120.	
5,0			ORS122.	ORS123.
17,5		ORS125, 126.	ORS124.	ORS127.
24,0		ORS128.		ORS129.
27,5	ORS130.			
28,5			ORS131.	ORS132.
30,0			ORS133, 134.	
32,0	ORS136.			ORS135.
33,5			ORS137, 138.	
34,0			ORS139, 140.	
Diokoul				
0,5		ORS141.		
2,5			ORS142.	
4,0			ORS143.	
11,5			ORS144.	
14,0				ORS145, 146
Sols de surface sahéliens	ORS188.	ORS186, 189.	ORS181, 182, 183, ORS184, 187, 190, ORS191, 192.	ORS180.

^a Les résultats représentent la moyenne de 4 réplifications. Ils sont exprimés en nanomoles de C₂H₄ par h et par plante : très effective, >600 ; effective, 350-600 ; peu effective, 100-350 ; ineffective, <100.

Tableau 5. Effectivité des isolats de *Bradyrhizobium* obtenus à partir des forages réalisés à Djinaki et à Kabrousse et à partir de sols de surface des régions soudano-guinéennes.

Origine et profondeur (m) de l'isolat	Effectivité ^a			
	Très effectif	Effectif	Peu effectif	Ineffectif
Djinaki				
0,1	ORS148.			
0,5	ORS149.			
1,0	ORS150.	ORS151.		
1,5	ORS152.	ORS153.		
2,0		ORS154.		
3,0	ORS155.			
4,0		ORS156, 157.		
4,5		ORS158, 159.		
Kabrousse				
0,1				ORS176.
0,5	ORS177.			
1,0		ORS178.		
1,5	ORS179.			
Sols de surface soudano-guinéen		ORS101,-103,-164, -166,-167,-168,-169, -172,-173,-175.	ORS160,-165,-170, -171,-174.	ORS161,-162, -163.

^a Les résultats représentent la moyenne de 4 réplifications. Ils sont exprimés en nanomoles de C₂H₄ par h et par plante : très effective, >600 ; effective, 350-600 ; peu effective, 100-350 ; ineffective, <100.

Tableau 6. Propriétés physico-chimiques, granulométriques et organiques des sols de Louga.

Niveau (m)	pH		Texture (%)					Matière organique (%)			Oxydes (%)	Fertilité (%)
	eau	KCl	argile	limon fin	limon gros	sable fin	sable gros	Carbone	Azote	C/N	Fe ₂ O ₃ total	P ₂ O ₅ total
0,1	4,9	4,5	1,0	2,4	2,4	51,3	42,8	0,84	0,10	8,4	0,00	0,09
0,5	4,6	4,3	2,8	0,8	1,9	48,7	46,1	0,56	0,09	6,2	0,33	0,08
2,5	4,8	4,6	0,3	0,7	1,4	61,4	36,1	0,24	0,03	8,0	0,18	0,03
5,0	5,1	4,4	3,7	0,3	1,4	50,3	44,1	0,44	0,06	7,3	0,29	0,06
7,5	5,6	4,5	8,4	0,6	1,7	53,3	36,8	0,39	0,05	7,8	0,48	0,10
11,0	6,2	4,7	11,6	2,5	4,8	50,1	30,8	0,26	0,06	4,3	1,48	0,12
14,0	5,1	3,9	11,7	1,8	4,7	52,7	28,9	0,28	0,05	5,6	1,41	0,12
17,5	4,7	4,1	14,4	2,8	8,1	44,9	30,0	0,30	0,06	5,0	1,35	0,12
21,0	4,6	4,3	9,5	2,3	11,6	33,5	43,2	0,32	0,06	5,3	0,88	0,10
24,0	5,5	4,9	9,0	8,5	13,0	30,7	39,3	0,41	0,06	6,8	1,78	0,15
27,5	5,7	4,7	14,1	3,8	11,7	29,2	41,5	0,30	0,05	6,0	1,87	0,12
28,5	5,7	4,8	18,0	4,7	12,4	27,2	36,3	0,24	0,05	4,8	3,03	0,13
30,0	6,6	5,2	16,3	4,5	14,9	24,6	40,1	0,17	0,07	2,4	2,12	0,10
32,0	7,1	5,8	52,2	11,7	7,1	17,4	11,4	0,31	0,07	4,4	6,79	0,23
33,5	6,2	5,1	25,5	5,1	9,3	37,2	22,3	0,22	0,05	4,4	1,44	0,23
34,0	5,9	4,9	24,0	3,9	9,0	38,5	24,1	0,17	0,05	3,4	1,34	0,20

DISCUSSION

Jusqu'à présent, il était généralement admis que la distribution des populations des rhizobia était limitée aux horizons supérieurs du sol, c'est à dire à des profondeurs n'excédant pas 1 à 2 m (Alexander, 1977). Toutefois les études d'écologie microbienne réalisées avaient principalement porté sur les légumineuses annuelles qui présentent un système racinaire se développant faiblement dans le sol. L'étude de légumineuses ligneuses possédant des racines profondes a permis de constater que des micro-organismes rhizosphériques, incluant les bactéries des genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*, sont également capables de proliférer dans les horizons inférieurs du sol (Felker et Clark, 1982 ; Virginia *et al.*, 1986). En particulier, Virginia *et al.* (1986) ont montré que sous le couvert de *Prosopis glandulosa*, dans le désert californien de Sonoran, la densité des rhizobia pouvait atteindre $6,1 \times 10^3$ bactéries par gramme de sol jusqu'à 6 m de profondeur, niveau de la nappe d'eau.

Nos résultats confortent ces conclusions et montrent, sans ambiguïté, que des populations importantes de *Bradyrhizobium* se développent sous le couvert d'*Acacia albida* adulte en zone sahélienne à des profondeurs bien supérieures à 6 m. La densité de bradyrhizobia peut en effet atteindre $1,32 \times 10^3$ / g de sol à 34 m de profondeur à Louga.

A ce jour, très peu de nodules avaient été observés *in situ* sur des racines d'*Acacia albida* adultes. Pourtant, en Casamance, il suffit de dégager le sol sur quelques centimètres sous le couvert d'*Acacia albida* en pleine feuillaison pour observer des nodules de couleur rose. Cette observation montre que, dans la zone soudano-guinéenne, la nodulation est un phénomène courant chez *Acacia albida* qui, à l'état adulte, a toutes les potentialités pour fixer biologiquement l'azote atmosphérique. Dans la zone typiquement sahélienne, qui est l'habitat courant d'*Acacia albida*, aucun nodule n'est observé sur les racines superficielles de l'arbre adulte aussi bien en saison des pluies qu'en saison sèche. Cette observation s'explique par le fait que, pendant la saison des pluies, *Acacia albida* ne porte pas de feuilles et que les bactéries symbiotiques ne peuvent vivre sans les sucres que la plante leur fournit sous la forme de photosynthétats. Pendant la saison sèche, malgré le développement feuillaire, la sécheresse des horizons supérieurs du sol ne permet pas le développement de jeunes racines, sites propices à la nodulation. Dans la zone sahélienne, les populations de *Bradyrhizobium* en surface sont faibles ce qui suggère que les potentialités de l'arbre à fixer l'azote sont faibles dans les sols sahéliens de surface. Nous devons noter cependant que, dans cette zone, les deux forages ont été réalisés au coeur de la saison sèche. Il serait intéressant d'effectuer des forages dans les mêmes sites à la fin de la saison des pluies ou au début de la

saison sèche alors que l'activité physiologique de l'arbre reprend et que le sol en surface présente une humidité résiduelle. En effet, la saison des pluies est favorable à la multiplication des micro-organismes (CTFT, 1988). Nous ne devons donc pas exclure la possibilité d'une augmentation saisonnière de la densité des populations de *Bradyrhizobium* dans les premiers mètres du sol et, par conséquent d'une potentialité accrue à fixer l'azote. Dans les horizons profonds de sol sahélien, nous n'avons pas détecté de nodules dans les carottes de forages, malgré la présence de densités importantes de populations de *Bradyrhizobium*. Il faut cependant souligner que la technique de forage utilisée était peu adaptée à la récolte de nodules *in situ*. Les populations de *Bradyrhizobium* dénombrées à plusieurs mètres sous la surface du sol sont pourtant compatibles avec l'hypothèse selon laquelle des nodules peuvent se former en profondeur si les conditions physico-chimiques et organiques sont favorables. La faible disponibilité en azote et carbone constatée dans les sols profonds à Louga limite probablement l'activité microbiologique. Comme plusieurs observations l'indiquent, la présence des racines d'*Acacia albida* pourrait conduire à la multiplication et la survie des bactéries. En effet, dans la zone sahélienne, les populations de *Bradyrhizobium* les plus importantes ont été trouvées dans les échantillons de sol où de petits fragments racinaires d'*Acacia albida* ont été observés tandis que la densité est inférieure à 1 bact. / g de sol en absence de fragment. De même, dans la zone soudano-guinéenne, le dénombrement de populations, importantes, de *Bradyrhizobium* particulièrement dans les rizières cultivées de Casamance, semble pouvoir s'expliquer par le nombre, important, de racines qui s'étagent de la surface jusqu'à la nappe phréatique toute proche. Il faut par ailleurs constater que dans la même zone écoclimatique, les densités de population sont négligeables (< 1 / g de sol) dans les sols en dehors du couvert d'*Acacia albida*. Ainsi un accroissement significatif du nombre de *Bradyrhizobium* dépendrait de l'activité racinaire d'*Acacia albida* et d'une amélioration des conditions environnementales. Enfin, nous avons noté sur le site de Louga, un taux de phosphore total plus important en profondeur (0,23%) qu'en surface (0,09%). Cette constatation prend son importance du fait que le phosphore est un facteur limitant de la nodulation, sa présence favorisant, le plus souvent, la symbiose chez les légumineuses. Nos observations semblent donc indiquer qu'*Acacia albida* adulte est potentiellement capable de noduler et de fixer l'azote en zone sahélienne. Ces observations demandent toutefois à être vérifiées par exemple en déterrants un arbre pour observer les sites de nodulation ou encore en évaluant la fixation réelle de l'*Acacia albida* en utilisant la méthode d'abondance isotopique ¹⁵N (Schulze *et al.*, 1991 ; Virginia *et al.*, 1989).

Sous le couvert de *Prosopis glandulosa*, deux populations distinctes de bactéries ont été identifiées par Jenkins *et al.* (1987, 1988, 1989) et Waldon *et al.* (1989). Dans les horizons supérieurs du sol, les bactéries du genre *Rhizobium* sont dominantes tandis qu'en profondeur, les *Bradyrhizobium* dominant. Sous le couvert d'*Acacia albida*, tous les isolats recueillis semblent appartenir au genre *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984). Les isolats vivant en surface ou en profondeur au niveau de la nappe d'eau sont exposés à des conditions physico-chimiques très différentes. A la surface des sols sahéliens, la température peut varier de 15 à 50°C et la teneur en eau fluctue de la saison humide à la saison sèche. Par contre, ces conditions sont plus constantes à des profondeurs variant de 10 à 35 m. Comme l'ont observé Waldon *et al.* (1989) pour les isolats nodulant *Prosopis glandulosa* il est possible que les zones de surface et de profondeur puissent sélectionner des espèces de *Bradyrhizobium* montrant des différences physiologiques en liaison avec leur survie dans des conditions différentes. Dans cette étude, nous avons constaté que la profondeur à laquelle une souche a été isolée n'avait aucune incidence sur son activité réductrice d'azote. Cela n'exclut cependant pas que des différences physiologiques ou taxonomiques entre les isolats de surface et ceux de profondeur puissent exister.

La contribution du phénomène de nodulation racinaire, par fixation de l'azote atmosphérique, à l'action améliorante d'*Acacia albida* sur les sols a souvent été négligée. Il est généralement admis que le développement important du système racinaire en profondeur d'*Acacia albida* pourrait favoriser l'enrichissement des horizons superficiels dans le voisinage de cet arbre en puisant les éléments minéraux dans les horizons profonds. Les éléments minéraux ainsi mobilisés, et particulièrement l'azote minéral, seraient ensuite stockés dans la biomasse aérienne et restitués au sol, dans un premier temps, sous forme organique par l'intermédiaire de la litière, avant d'être reminéralisés (Jung, 1969 et 1970 ; CTFT, 1988). Nos résultats suggèrent que l'importance de la fixation de l'azote par *Acacia albida* a pu être sous estimée. Si cette hypothèse était confirmée, elle ouvrirait des voies d'applications importantes en agroforesterie. Sur le plan pratique il serait en effet intéressant d'inoculer de jeunes *Acacia albida* en pépinière avec des souches très effectives isolées des horizons profonds, c'est à dire des souches aptes à coloniser ensuite le système racinaire au fur et à mesure de son développement en profondeur.

ANNEXE

Le travail présenté dans ce chapitre a fait l'objet d'une publication scientifique dont les références et le résumé sont les suivants :

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Aug. 1992, p. 2415-2419
0099-2240/92/082415-05\$02.00/0
Copyright © 1992, American Society for Microbiology

Vol. 58, No. 8

Bradyrhizobium Populations Occur in Deep Soil under the Leguminous Tree *Acacia albida*

NICOLAS C. DUPUY* AND BERNARD L. DREYFUS

Laboratoire de Microbiologie des Sols, Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération, BP 1386, Dakar, Senegal

Received 27 January 1992/Accepted 11 May 1992

Soil cores were drilled under the leguminous tree *Acacia albida* growing in two different ecoclimatic zones of West Africa: the Sahelian area (100 to 500 mm of annual rainfall) and the Sudano-Guinean area (1,000 to 1,500 mm of annual rainfall). Soil samples were collected at different depths from the surface down to the water table level and analyzed for the presence of rhizobia able to nodulate *A. albida*. In both areas, population densities of rhizobia were substantially greater near the water table than near the surface. In the Sahelian area, rhizobia were present as deep as 34 m at a concentration of 1.3×10^3 /g of soil. In the Sudano-Guinean area, population densities at 0.5 to 4.5 m depth were higher than in the Sahelian area and, at several depths, comparable to that of temperate soils supporting legume crops (10^4 rhizobia per g of soil). Surface and deep soil isolates from all four sites were found to be slow-growing rhizobia (*Bradyrhizobium* sp.). The proportion of effective isolates was almost the same within surface and deep soils.

CHAPITRE II

ETUDE TAXONOMIQUE DES ISOLATS NODULANT *ACACIA ALBIDA*

Ce travail a pu être réalisé avec le concours de l'équipe du laboratoire de Microbiologie de l'Université de Gand en Belgique dirigé par le Pr. K. Kersters et le Dr. M. Gillis.

INTRODUCTION

Les isolats nodulant *Acacia albida* que nous avons obtenus ont une origine très diverse. Certains ont été isolés dans la zone sahélienne soit dans les sols sableux de surface, soumis à des variations importantes de température ou d'humidité, soit en profondeur aux conditions de température et d'humidité constantes. D'autres isolats proviennent des sols de rizière de la zone soudano-guinéenne où les sols plus argileux gardent une humidité forte une grande partie de l'année et où la profondeur de la nappe d'eau varie seulement entre 1 et 4 mètres de profondeur. Il était donc intéressant de comparer la position taxonomique de ces isolats en fonction de leur profondeur d'origine et de leur localisation géographique. Pour cela, nous avons utilisé plusieurs approches taxonomiques complémentaires : l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide des protéines totales (SDS-PAGE), le système phénotypique Biolog, et pour certaines souches sélectionnées, les hybridations ADN:ARNr. Rappelons brièvement le principe des trois techniques.

L'électrophorèse des protéines totales est une des techniques les plus utilisées en systématique bactérienne (Kersters et de Ley, 1980 ; Jackman, 1985 ; Kersters, 1985). Cette méthode, très sensible, fournit en effet beaucoup d'informations sur la similarité des souches à l'intérieur d'une espèce ou d'une sous-espèce et a souvent un pouvoir discriminant proche de la méthode d'hybridation ADN/ADN (Kersters, 1985). Les souches bactériennes présentant 90 à 100% d'homologie au niveau ADN ont presque toujours des profils protéiques identiques. Celles montrant moins de 70% d'homologie présentent des profils assez proches (Owen et Jackman, 1982). Les profils électrophorétiques des protéines d'une grande variété de souches de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium*, dont des souches de référence, ont été utilisés dans notre étude.

Le système d'identification bactérien Biolog permet l'identification des bactéries Gram négatif aérobies en déterminant la première oxydation de 95 sources de carbone différentes réparties dans les puits d'une plaque de microtitration appelée galerie Biolog. Lorsque l'un des 95 substrats est oxydé, le transfert d'électrons provoque la réduction d'un indicateur coloré, le violet de tétrazolium, en un produit de couleur pourpre, le formazan. Les puits, dans lesquels il n'y a pas première oxydation du substrat, ne présentent pas de

coloration et sont comparables au puits témoin, sans source de carbone. Ainsi, le système Biolog fournit un profil métabolique caractéristique de chaque souche testée. Outre leur intérêt dans l'identification des bactéries Gram négatif, les galeries Biolog peuvent aussi être utilisées pour des études taxonomiques permettant l'analyse et la comparaison des profils métaboliques de plusieurs groupes de micro-organismes. Le genre *Bradyrhizobium* n'étant pas inclus dans la base de données commercialisée, il nous a fallu modifier et adapter ce système à l'étude des bactéries à croissance lente.

Enfin, dans le but de confirmer que les souches isolées d'*Acacia albida* appartenaient bien au genre *Bradyrhizobium*, certaines d'entre elles, caractéristiques des groupes électrophorétiques obtenus, ont été choisies pour réaliser des hybridations ADN:ARNr. Les résultats d'homologie ADN:ARNr sont en effet indispensables à l'interprétation des résultats phénotypiques. La stabilité thermique de l'hybride ($T_{m(e)}$, voir § 3 dans Matériel et Méthodes) constitue en effet un paramètre phylogénique important dans l'étude des relations inter- et intra-génériques. En général, au sein du même genre, les $T_{m(e)}$ varient de 75-76°C jusqu'à 81,5°C ($T_{m(e)}$ de l'hybridation homologue).

MATERIEL ET METHODES

1. Electrophorèse SDS-PAGE et analyse numérique des profils protéiques

1.1. Electrophorèse SDS-PAGE d'extraits protéiques bactériens

Toutes les souches bactériennes sont cultivées sur le milieu TY tamponné. Une préculture est réalisée sur gélose inclinée pendant 5 jours à 28°C.

La préculture, resuspendue dans 5 ml de tampon phosphate 0,01 M (pH=7,0), est utilisée pour inoculer des fioles de Roux contenant 125 ml de milieu TY gélosé dont le pH reste constant au cours de la croissance. L'incubation se déroule à 28°C pendant 72 h. Les extraits protéiques bactériens sont préparés suivant la méthode décrite par Kiredjan *et al.* (1986). Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) en présence de SDS d'après une méthode dérivée de celle décrite par Laemmli (1970) (Kiredjan *et al.*, 1986).

Composition du milieu TY (par litre d'eau distillée)

Tryptone (Oxoid).....	5,00 g
Yeast Extract (Oxoid).....	0,75 g
CaCl ₂ ·6H ₂ O (solution à 20g/100ml)	5,00 ml
KH ₂ PO ₄	0,454g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O.....	2,388g
pH ajusté à	6,8 - 7,0
Agar (Lab M)	20, 00 g

1.2. Analyse des profils protéiques (Pot *et al.*, 1992)

Les profils électrophorétiques de protéines totales des souches spécifiques d'*Acacia albida* ont été comparés visuellement aux profils des souches de référence. Une comparaison assistée par ordinateur, plus objective, a été rendu nécessaire par le grand nombre de souches étudiées. Des programmes informatiques, permettant la standardisation, la normalisation et le stockage des données ont été utilisés (Kersters, 1985 ; Pot *et al.*, 1989 ; Vauterin et Vauterin, 1992). L'utilisation d'un ordinateur pour le stockage des résultats nécessite une standardisation optimale des conditions expérimentales. La première étape dans l'analyse par ordinateur consiste à mémoriser les bandes de protéines par l'intermédiaire d'un densitomètre (type Ultrosan Laser LKB 2202, programme Gel-Scan) connecté à un ordinateur PC Commodore MS-DOS compatible. La densité de toutes les bandes d'un profil est digitalisée et stockée (Programme GELCOMPAR ; Vauterin et Vauterin, 1992). Les résultats numériques bruts sont ensuite normalisés pour corriger d'éventuelles différences de migration dues, en particulier, à la composition des solutions conductrices ou aux conditions de polymérisation des gels. La normalisation s'effectue par rapport à une souche de référence, *Psychrobacter immobilis* (LMG 1125), dont le profil est constitué de bandes bien séparées, et d'un mélange de marqueurs protéiques de poids moléculaires connus. Les bandes protéiques sont ensuite comparées deux à deux et leur similarité entre elles est calculée grâce au coefficient de corrélation de Pearson (r) converti en pourcentage. Le coefficient de corrélation tient compte de la position et de l'intensité des bandes. Les résultats sont intégrés et présentés sous forme de dendrogramme en utilisant le programme GELCOMPAR.

2. Galeries Biolog (Biolog Inc., Hayward, Californie)

Deux précultures sur milieu TYB sont incubées à 28°C pendant 8 jours. Le milieu TYB est un milieu TY (§ 1. 1.) avec l'agar bactériologique de pureté supérieure (Difco). Le milieu TYB assure une meilleure reproductibilité des résultats (voir Résultats § II.).

Au terme de la deuxième préculture, les bactéries sont récoltées et mises en suspension dans 30 ml d'eau physiologique stérile (0,85% NaCl) pour obtenir une densité optique de 0,260 à 0,300 à 590 nm. La suspension est utilisée pour inoculer les puits de galeries Biolog, à raison de 150 µl par puits (Tableau 1). Les plaques, scellées au parafilm, sont placées à l'étuve pendant 5 jours à 33°C. La lecture est normalement réalisée à l'aide d'un lecteur automatique. Ce mode de lecture n'est toutefois pas possible après 5 jours d'incubation, car le formazan précipite au fond des puits (Figure 1a). Dans ce cas la lecture est faite visuellement avant et après remise en suspension du formazan à l'aide d'un fil de fer stérile (Figure 1b). Les résultats notés + ou -, selon l'apparition ou non d'une coloration pourpre dans les puits, sont analysés numériquement par le programme GELCOMPAR adapté au Biolog (Vauterin et Vauterin, communication personnelle).

GN MicroPlate™

A1 water	A2 α-cyclodextrin	A3 dextrin	A4 glycogen	A5 Tween 40	A6 Tween 80	A7 N-acetyl-D-galactosamine	A8 N-acetyl-D-glucosamine	A9 adonitol	A10 L-arabinose	A11 D-arabitol	A12 cellobiose
B1 D-erythritol	B2 D-fructose	B3 L-fucose	B4 D-galactose	B5 D-gentiobiose	B6 α-D-glucose	B7 D-inositol	B8 α-D-lactose	B9 D-lactulose	B10 D-maltose	B11 D-mannitol	B12 D-mannose
C1 D-melibiose	C2 β-methyl D-glucoside	C3 D-palcose	C4 D-raffinose	C5 L-rhamnose	C6 D-sorbitol	C7 sucrose	C8 D-trehalose	C9 D-turanose	C10 D-xylitol	C11 methyl pyruvate	C12 mono-methyl succinate
D1 acetic acid	D2 cis-aconitic acid	D3 citric acid	D4 formic acid	D5 D-galactonic acid lactone	D6 D-galacturonic acid	D7 D-gluconic acid	D8 D-glucosaminic acid	D9 D-glucuronic acid	D10 α-hydroxybutyric acid	D11 β-hydroxybutyric acid	D12 γ-hydroxybutyric acid
E1 p-hydroxy phenylacetic acid	E2 Itaconic acid	E3 α-keto butyric acid	E4 α-keto glutaric acid	E5 α-keto valeric acid	E6 D,L-lactic acid	E7 malonic acid	E8 propionic acid	E9 quinic acid	E10 D-saccharic acid	E11 sebacic acid	E12 succinic acid
F1 bromo succinic acid	F2 succinamic acid	F3 glucuronamide	F4 alaninamide	F5 D-alanine	F6 L-alanine	F7 L-alanyl-glycine	F8 L-asparagine	F9 L-aspartic acid	F10 L-glutamic acid	F11 glycyl-L-aspartic acid	F12 glycyl-L-glutamic acid
G1 L-histidine	G2 hydroxy L-proline	G3 L-leucine	G4 L-ornithine	G5 L-phenylalanine	G6 L-proline	G7 L-pyroglutamic acid	G8 D-serine	G9 L-serine	G10 L-threonine	G11 D,L-carnine	G12 γ-amino butyric acid
H1 urocanic acid	H2 inosine	H3 uridine	H4 thymidine	H5 phenyl ethylamine	H6 putrescine	H7 2-amino ethanol	H8 2,3-butanediol	H9 glycerol	H10 D,L-α-glycerol phosphate	H11 glucose-1-phosphate	H12 glucose-6-phosphate

Tableau 1. Liste et disposition des 96 substrats sur la galerie Biolog.

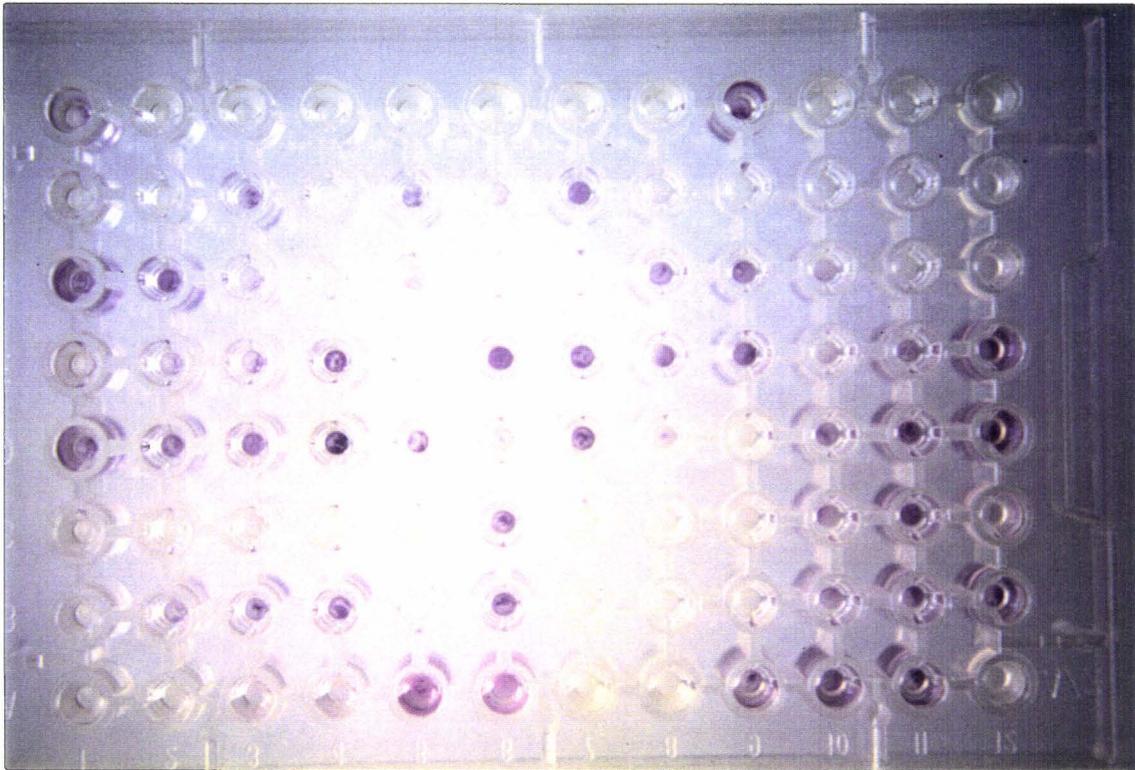


Figure 1a. Galerie Biolog 5 jours après incubation montrant la précipitation du formazan de couleur pourpre au fond des puits.

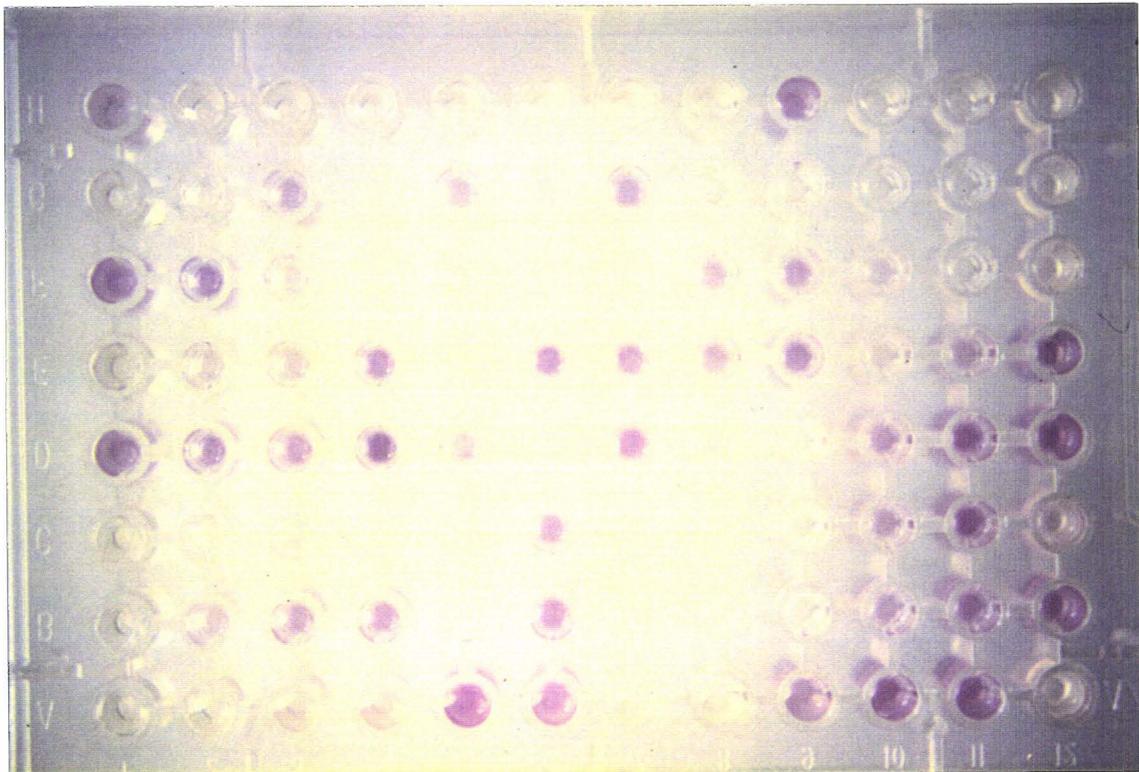


Figure 1b. Galerie Biolog après remise en suspension du formazan.

3. Hybridations ADN:ARNr

Les bactéries sont cultivées sur milieu TY gélosé (Tableau 1) en fioles de Roux pendant 5 jours à 28°C, puis récoltées et lavées dans du tampon phosphate 0,01M. L'ADN total est extrait suivant la méthode décrite par Gillis *et al.* (1990) impliquant les étapes suivantes : lyse des cellules par le SDS, extraction au chloroforme, précipitation dans l'éthanol et purification. Une des sondes d'ARNr (23S) ^{ou 16S} utilisées, marquée au ¹⁴C, correspond à la souche type *Bradyrhizobium japonicum* NZP5549^T (laboratoire de Gand). Une deuxième sonde, marquée au ³H, a été préparée à partir de la même souche comme décrit par Jarvis *et al.* (1986). Le marquage est réalisé en présence de deux précurseurs (³H-2-8-adénine et ³H-5-orotate) à raison de 1 millicurie de chaque radioisotope dans 200 ml d'une culture liquide. Après hybridation ADN:ARNr, on détermine la température (T_{m(e)}), à laquelle 50% de l'hybride formé est dénaturé dans des conditions standardisées (Jarvis *et al.*, 1986).

4. Souches de référence et souches types

La liste des souches de référence, des souches types et des souches représentatives du genre *Bradyrhizobium*, des différentes espèces de *Rhizobium* (excepté *R. huakuii* et *R. etli*) et d'*Azorhizobium caulinodans* sont données au tableau 2. Des souches de *Bradyrhizobium* sp., isolées de diverses légumineuses tropicales au Brésil et représentatives des clusters électrophorétiques mis en évidence par Moreira *et al.* (1993) ont également été incluses.

Tableau 2. Liste des souches de référence, des souches types et des souches représentatives des différentes espèces de *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, et *Azorhizobium caulinodans*.

Souches	Plante hôte d'isolement	Origine géographique
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>		
LMG6138 ^T (=NZP5549 ^T)	<i>Glycine hispida</i>	Japon
LMG6136 (=NZP5533)	<i>Glycine max</i> (L.)	USA
LMG8321 (=USDA135)	<i>Glycine max</i> (L.)	USA
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>		
LMG6134 ^T (=USDA76 ^T)	<i>Glycine max</i> (L.)	
LMG6135 (=USDA31)	<i>Glycine max</i> (L.)	USA
<i>Bradyrhizobium</i> sp.		
USDA300 (=LMG8888)	<i>Acacia decurrens</i>	Brésil
INPA60A (=LMG10045)	<i>Machaerium madeirense</i>	Brésil
NZP2314 (=LMG6129)	<i>Lotus pedunculatus</i>	Australie
NZP2309 (=LMG6128)	<i>Lotus pedunculatus</i>	Australie

Tableau 2 (suite)

Souches	Plante hôte d'isolement	Origine géographique
ORS 326 (= LMG 11798)	<i>Aeschynomene afraspera</i>	Sénégal
ORS 58 (= LMG 10663)	<i>Dalbergia melanoxydon</i>	Sénégal
INPA86A (=LMG10053)	<i>Swartzia</i> sp.	Brésil
BR6817 (=LMG10010)	<i>Pithecellobium</i> sp.	Brésil
FL271 (=LMG10024)	<i>Melanoxydon</i> sp.	Brésil
INPA65B (=LMG10046)	<i>Inga</i> sp.	Brésil
INPA9A (=LMG10029)	<i>Derris</i> sp.	Brésil
INPA254B (=LMG10088)	<i>Tachigalia paniculata</i>	Brésil
INPA14A (=LMG10032)	<i>Clitoria racemosa</i>	Brésil
INPA16A (=LMG10034)	<i>Albizia lebbek</i> (L.)	Brésil
INPA104A (=LMG10057)	<i>Calliandra surinamensis</i>	Brésil
INPA139A (=LMG10064)	<i>Entada polyphylla</i>	Brésil
INPA147A (=LMG10066)	<i>Dimorphandra parviflora</i>	Brésil
BR8402 (=LMG10015)	<i>Dalbergia nigra</i>	Brésil
BR6009 (=LMG10001)	<i>Lonchocarpus costatus</i>	Brésil
BR4407 (=LMG9981)	<i>Enterolobium ellipticum</i>	Brésil
BR3621 (=LMG9966)	<i>Acacia mangium</i>	Brésil
BR8205 (=LMG10014)	<i>Poecilanthus parviflora</i>	Brésil
BR3624 (=LMG9968)	<i>Acacia auriculaeformis</i>	Brésil
BR6204 (=LMG10004)	<i>Samanea saman</i>	Brésil
INPA510B (=LMG10109)	<i>Derris negrensis</i>	Brésil
INPA147B (=LMG10067)	<i>Dimorphandra parviflora</i>	Brésil
INPA145A (=LMG10065)	<i>Dimorphandra parviflora</i>	Brésil
INPA607A (=LMG10122)	<i>Derris negrensis</i>	Brésil
BR8406 (=LMG10018)	<i>Dalbergia nigra</i>	Brésil
BR3606 (=LMG9959)	<i>Acacia mollissima</i>	Brésil
INPA66B (=LMG10048)	<i>Ormosia discolor</i>	Brésil
INPA80B (=LMG10051)	<i>Ormosia discolor</i>	Brésil
INPA173A (=LMG10135)	<i>Tachigalia paniculata</i>	Brésil
BR5202 (=LMG9990)	<i>Erythrina speciosa</i>	Brésil
INPA589A (=LMG10139)	<i>Clathrotropis nitida</i>	Brésil
BR5609 (=LMG9997)	<i>Albizia falcata</i>	Brésil
BR5611 (=LMG9998)	<i>Albizia falcata</i>	Brésil
FL281 (=LMG10026)	<i>Abrus</i> sp.	Brésil
<i>Rhizobium</i> sp.		
BR814 (=LMG9952)	<i>Leucaena leucocephala</i>	Brésil
BR6001 (=LMG10000)	<i>Lonchocarpus</i> sp.	Brésil
BR8803 (=LMG10022)	<i>Gliciridia sepium</i>	Brésil
BR6806 (=LMG10007)	<i>Pithecellobium dulce</i>	Brésil
BR819 (=LMG9954)	<i>Leucaena leucocephala</i>	Brésil
BR5401 (=LMG9993)	<i>Sesbania marginata</i>	Brésil
INPA78B (=LMG10056)	<i>Leucaena diversifolia</i>	Brésil
INPA338A (=LMG10093)	<i>Leucaena diversifolia</i>	Brésil
INPA129A (=LMG10061)	<i>Leucaena pulvurulenta</i>	Brésil
INPA12A (=LMG10031)	<i>Leucaena leucocephala</i>	Brésil
BR8005 (=LMG10012)	<i>Clitoria racemosa</i>	Brésil
BR8006 (=LMG10013)	<i>Clitoria racemosa</i>	Brésil
BR5404 (=LMG9994)	<i>Sesbania marginata</i>	Brésil
<i>Rhizobium tropici</i>		
CIAT899 ^T (LMG9503 ^T)	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	
CFN299 (=LMG9517)	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	

Tableau 2 (suite)

Souches	Plante hôte d'isolement	Origine géographique
<i>Rhizobium galegae</i>		
HAMBI540 ^T (=LMG6214 ^T)	<i>Galegae orientalis</i> Lam.	Finlande
HAMBI1147 (=LMG6215)	<i>Galegae orientalis</i> Lam.	CEI
<i>Rhizobium leguminosarum</i>		
biovar phaseoli		
ATCC14482t1 (=LMG8819t1)	<i>Phaseolus</i> L.	
ATCC14482t2 (=LMG8819t2)	<i>Phaseolus</i> L.	
<i>Rhizobium leguminosarum</i>		
biovar viciae		
ATCC10004 ^T (=LMG8817 ^T)	<i>Pisum sativum</i> L.	
<i>Rhizobium loti</i>		
USDA3127 (=LMG4284)	<i>Caragana arborescens</i>	USA
NZP2213 ^T (=LMG6125 ^T)	<i>Lotus corniculatus</i>	Nouvelle Zélande
NZP2037 (=LMG6123)	<i>Lotus divaricatus</i>	Nouvelle Zélande
<i>Azorhizobium caulinodans</i>		
ORS571 ^T (=LMG6465 ^T)	<i>Sesbania rostrata</i>	Sénégal
LMG9995		
<i>Rhizobium fredii</i>		
USDA191 (=LMG8317)		Chine
USDA205 ^T (=LMG6217 ^T)	<i>Glycine max</i> (L.)	Chine
<i>Rhizobium meliloti</i>		
NZP4009 (=LMG6130)	<i>Medicago sativa</i> L.	Australie
NZP4027 ^T (=LMG6133 ^T)	<i>Medicago sativa</i> L.	Australie

* ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Md. ; BR and FL, souches du CNPBS/EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa em Biologia do solo, Seropedica 23851, Rio de Janeiro, Brésil/Emprasa Brasileira de Pesquisa Agropequaria ; CFN, Centre de Investigación sobre Fijación de Nitrogeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México ; CIAT, Collection de rhizobiums du Centro International de Agricultura Tropical, Cali, Columbia ; HAMBI, Collection du Department of Microbiology, University of Helsinki, Helsinki, Finland ; INPA, National Institute of Amazonian Research, Brésil ; LMG, Collection de bactéries du Laboratorium voor Microbiologie, K.-L. Ledeganckstraat, 35, B-9000 Ghent, Belgium ; NZP, Collection du Department for Scientific and Industrial Research, Biochemistry Division, Palmerston North, New Zealand ; ORS, ORSTOM Collection de l'Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération, BP. 1386, Dakar, Senegal ; USDA, U. S. Department of Agriculture, Beltsville, Md.

RESULTATS

I. Electrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

Les profils des protéines bactériennes des 84 nouveaux isolats spécifiques d'*Acacia albida* ont été scannés, analysés numériquement et comparés aux profils de 27 souches de référence et de 45 souches représentatives des clusters de Moreira *et al.* (1993). Les résultats, donnés sous forme de dendrogramme (Figure 2), ont servi à la construction d'un électrophorégramme dans lequel on retrouve les profils des différentes souches analysées (Figure 3).

Vingt cinq groupes électrophorétiques ou clusters (cl.) ont été individualisés (groupe 1 à 25) en utilisant le même coefficient de similarité ($r = 0,9$) que celui qui permet de séparer les différentes espèces de *Rhizobium*. Douze souches ont une position séparée sur le dendrogramme.

La majorité des nouveaux isolats (71/84) de *Bradyrhizobium* nodulant *Acacia albida* appartiennent à 6 groupes électrophorétiques principaux (cl. 1, 4, 5, 6, 7, 8). Les clusters 5, 7 et 8 contiennent seulement des isolats spécifiques d'*Acacia albida* alors que les clusters 1, 4 et 6 renferment aussi d'autres souches représentatives de *Bradyrhizobium*. Quelques isolats appartiennent à de petits groupes électrophorétiques ne comprenant que deux à trois souches (cl. 9, 11, 18, 21 et 24). Quatre isolats occupent une position séparée sur le dendrogramme (ORS 184, ORS 162, ORS 189 et ORS 185).

Le cluster 1 contient la souche type de *Bradyrhizobium japonicum* NZP 5549^T, des souches représentatives de *Bradyrhizobium* sp. (USDA 300, INPA 60A, NZP 2314, NZP 2309, ORS 326, ORS 58, INPA 86A) et 33 nouvelles souches nodulant *Acacia albida*. Parmi celles-ci, la majorité des souches isolées à Diokoul (6/7), et à Djinaki (10/11), toutes les souches de Kabrousse, 5 des 16 souches de sols de surface isolées sur des sites variés de la zone écoclimatique soudano-guinéenne (Casamance), et 6 des 13 souches isolées à partir de sols de surface de la zone sahéenne (nord du Sénégal).

Les clusters 2 et 3 contiennent seulement des *Bradyrhizobium* de référence isolés au Brésil.

Le cluster 4 contient des souches de références brésiliennes de *Bradyrhizobium* sp., 2 souches isolées à Louga et 4 souches isolées de sols de surface en Casamance.

Le nouveau cluster 5 contient uniquement des souches nodulant *Acacia albida*, une isolée à Diokoul, trois à partir de sols de surface soudano-guinéens et une de sols de surface sahéens.

Deux souches isolées de sols de surface soudano-guinéens et 3 souches brésiliennes représentatives de *Bradyrhizobium* sp. constituent le cl. 6.

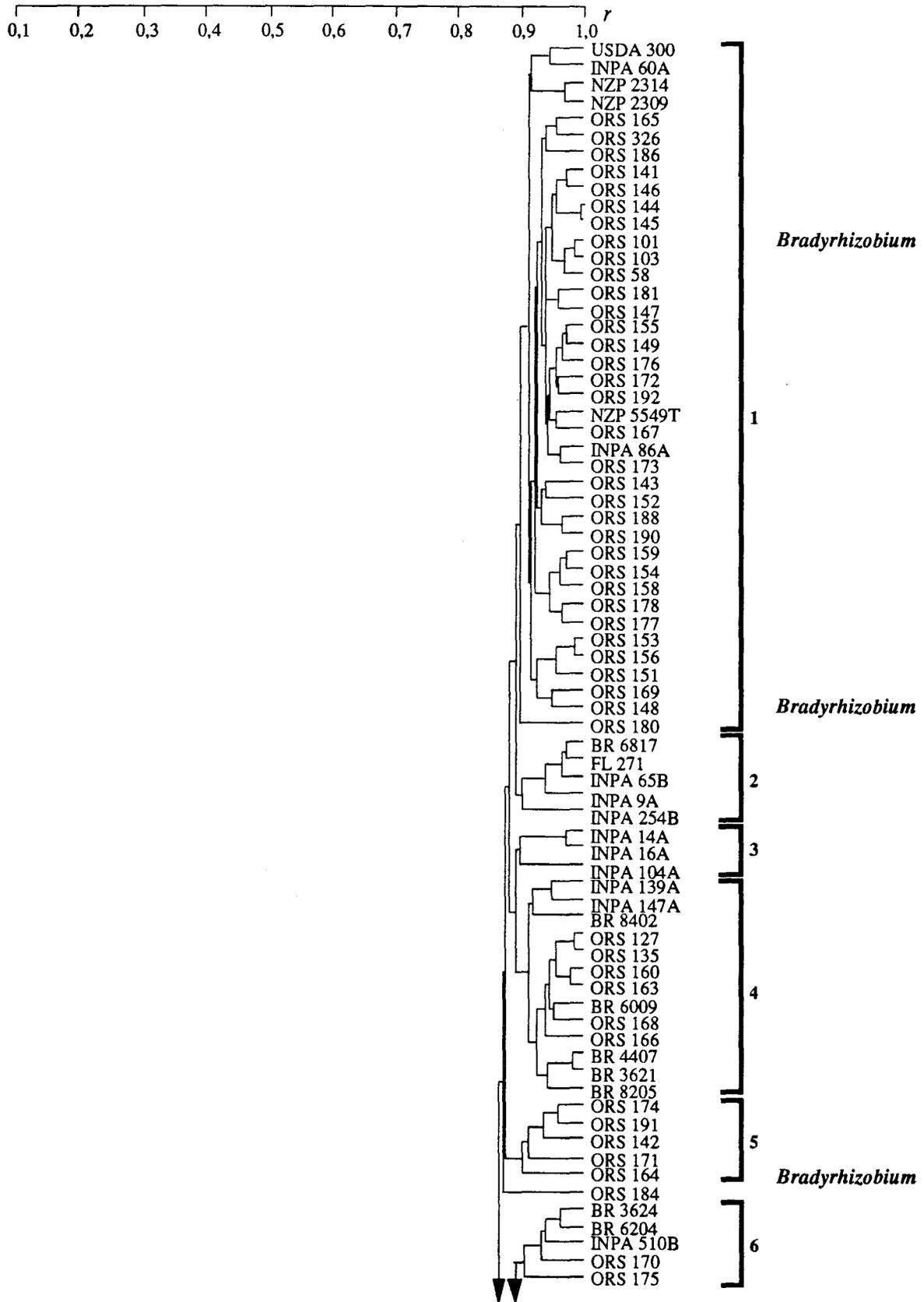
Le cl. 7 contient exclusivement des souches isolées à Louga. Cinq autres souches provenant également de Louga constituent le cl. 8.

La souche ORS 150 et la souche USDA 135 forme le cl. 9. Aucune de nos souches n'appartient au cluster électrophorétique 10 dans lesquels on retrouve, exclusivement, des souches de référence de Moreira *et al.* (1993).

La souche BR 8406, isolée au Brésil de *Dalbergia nigra* est associée dans le cl. 11 avec la souche ORS 187 isolée d'un sol de surface sahélien.

Une très grande similarité inter-cluster ($r = 0,84$) caractérise les clusters 1 à 11. En dessous de ce niveau de similarité, différents clusters ont été identifiés : (i) certains clusters (13, 14, 17, 22 et 23) représentent les espèces connues de *Rhizobium* et d'*Azorhizobium* (Figure 1). Dans cette étude, les différentes souches représentatives de *Rhizobium tropici* (CIAT 899^T et CFN 299) et de *Rhizobium loti* (USDA 3127 et NZP 2213^T) ne forment pas de cluster séparé au coefficient de similarité $r = 0,9$. Les souches de *R. tropici* et *R. loti* sont cependant proches les unes des autres ; (ii) les cl. 15, 19, 20, 21, 24 et 25 contiennent des souches de référence de *Bradyrhizobium* sp. isolées au Brésil ; (iii) le cluster 12 qui contient exclusivement quatre souches de référence de Moreira *et al.* (1993) ; (iv) 2 souches d'*Acacia albida* des sols sahéliens de surface, (ORS 182 et ORS 183) constituent le cl. 18. ORS 161, une souche de Casamance est associée à la souche BR 5202 (cl. 21), isolée d'*Erythrina speciosa*. Deux souches isolées à Louga (ORS 114 et ORS 120) appartiennent au cl. 24 dont la souche BR 5609, isolée d'*Albizia falcata*, est représentative.

Figure 2. Dendrogramme basé sur la valeur du coefficient de similarité r et construit après l'analyse numérique des profils électrophorétiques des souches d'*Acacia albida*, de souches de référence et/ou types et de souches représentatives de différents sous clusters connus.



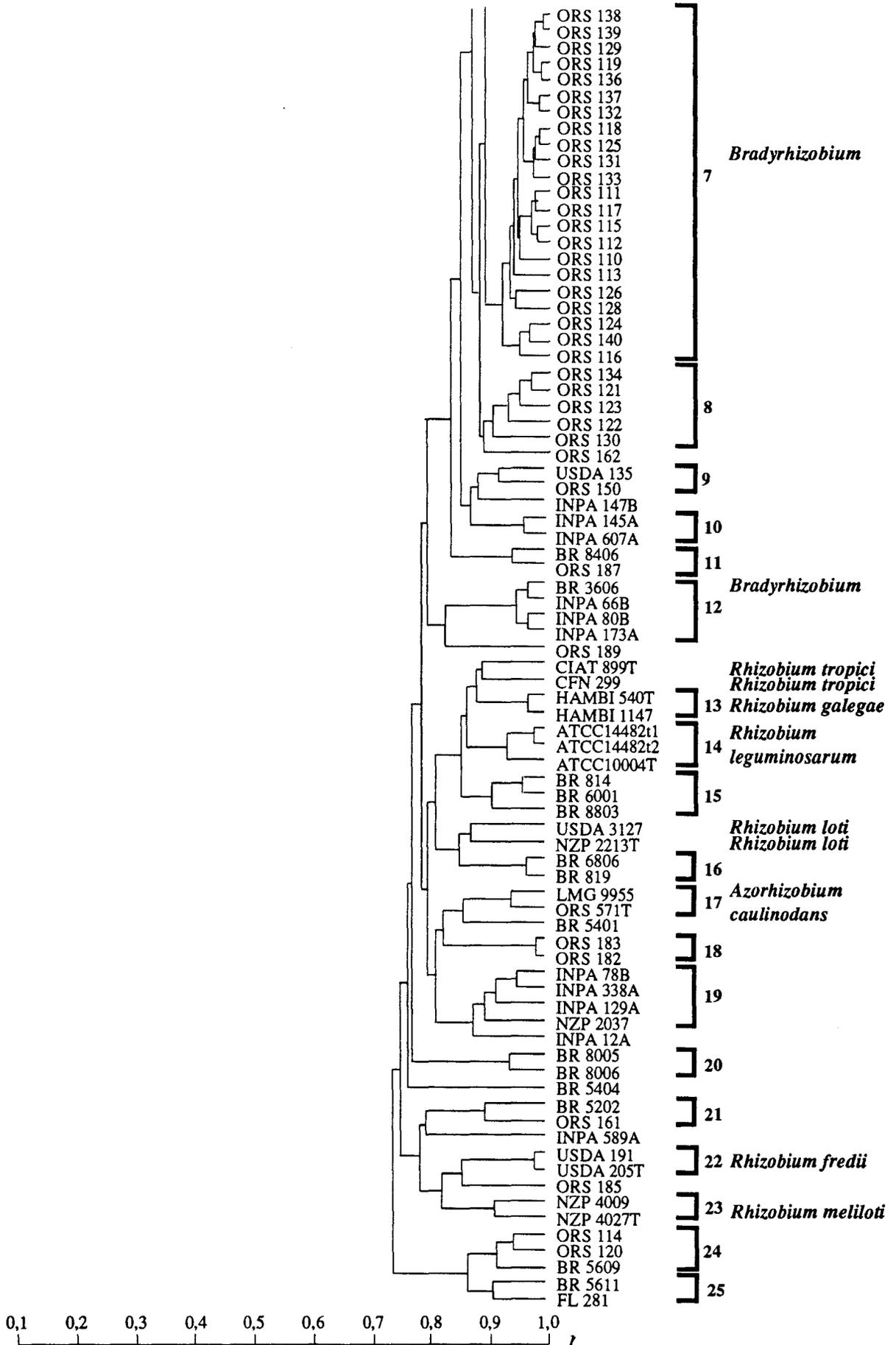
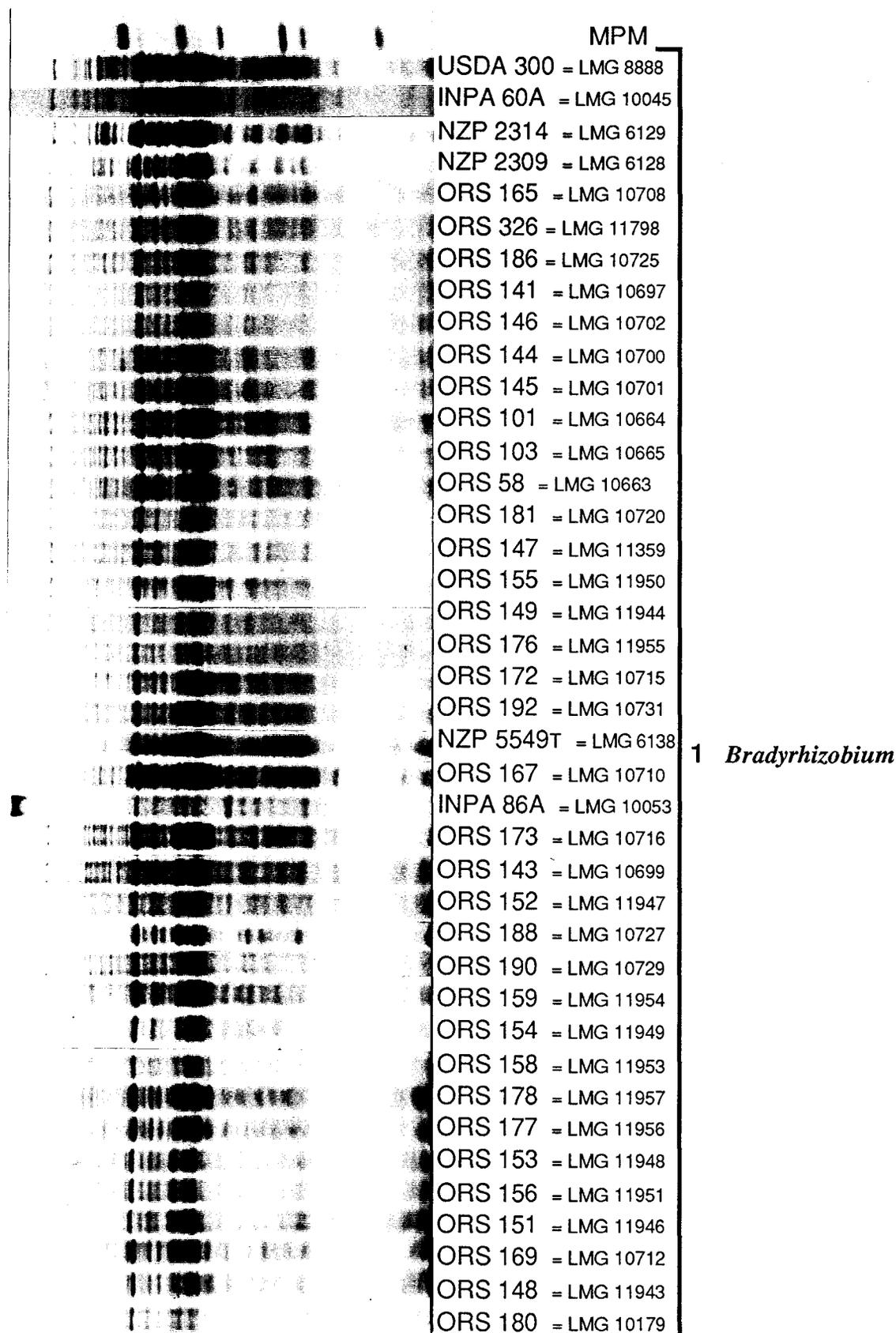


Figure 3. Profils électrophorétiques des souches étudiées. La séquence des souches a été donnée par les résultats de l'analyse numérique (Fig. 1).



	BR 6817 = LMG 10010	2	<i>Bradyrhizobium</i>
	FL 271 = LMG 10024		
	INPA 65B = LMG 10046		
	INPA 9A = LMG 10029		
	INPA 254B = LMG 10088	3	
	INPA 14A = LMG 10032		
	INPA 16A = LMG 10034		
	INPA 104A = LMG 10057	4	
	INPA 139A = LMG 10064		
	INPA 147A = LMG 10066		
	BR 8402 = LMG 10015		
	ORS 127 = LMG 10683		
	ORS 135 = LMG 10691		
	ORS 160 = LMG 10703		
	ORS 163 = LMG 10706		
	BR 6009 = LMG 10001		
	ORS 168 = LMG 10711		
	ORS 166 = LMG 10709	5	
	BR 4407 = LMG 9981		
	BR 3621 = LMG 9966		
	BR 8205 = LMG 10014		
	ORS 174 = LMG 10717		
	ORS 191 = LMG 10730		
	ORS 142 = LMG 10698	6	
	ORS 171 = LMG 10714		
	ORS 164 = LMG 10707		
	ORS 184 = LMG 10723		
	BR 3624 = LMG 9968		
	BR 6204 = LMG 10004		
	INPA 510B = LMG 10109		
	ORS 170 = LMG 10713		
	ORS 175 = LMG 10718		

	ORS 138 = LMG 10694	
	ORS 139 = LMG 10695	
	ORS 129 = LMG 10685	
	ORS 119 = LMG 10675	
	ORS 136 = LMG 10692	
	ORS 137 = LMG 10693	
	ORS 132 = LMG 10688	
	ORS 118 = LMG 10674	
	ORS 125 = LMG 10681	
	ORS 131 = LMG 10687	
	ORS 133 = LMG 10689	7
	ORS 111 = LMG 10667	
	ORS 117 = LMG 10673	
	ORS 115 = LMG 10671	
	ORS 112 = LMG 10668	
	ORS 110 = LMG 10666	
	ORS 113 = LMG 10669	
	ORS 126 = LMG 10682	
	ORS 128 = LMG 10684	
	ORS 124 = LMG 10680	
	ORS 140 = LMG 10696	
	ORS 116 = LMG 10672	
	ORS 134 = LMG 10690	
	ORS 121 = LMG 10677	
	ORS 123 = LMG 10679	
	ORS 122 = LMG 10678	8
	ORS 130 = LMG 10686	
	ORS 162 = LMG 10705	
	USDA 135 = LMG 8321	9
	ORS 150 = LMG 11945	
	INPA 147B = LMG 10067	
	INPA 145A = LMG 10065	10
	INPA 607A = LMG 10122	
	BR 8406 = LMG 10018	11
	ORS 187 = LMG 10726	
	BR 3606 = LMG 9959	
	INPA 66B = LMG 10048	12
	INPA 80B = LMG 10051	
	INPA 173A = LMG 10135	

Bradyrhizobium

	ORS 189 = LMG 10728	
	CIAT 899T = LMG 9503	<i>Rhizobium tropici</i>
	CFN 299 = LMG 9517	<i>Rhizobium tropici</i>
	HAMBI 540T = LMG 6214] 13 <i>Rhizobium galegae</i>
	HAMBI 1147 = LMG 6215	
	ATCC 14482 ₁₁ = LMG 8819 ₁₁] 14 <i>Rhizobium leguminosarum</i>
	ATCC 14482 ₁₂ = LMG 8819 ₁₂	
	ATCC 10004T = LMG 8817	
	BR 814 = LMG 9952] 15
	BR 6001 = LMG 10000	
	BR 8803 = LMG 10022	
	USDA 3127 = LMG 4284	<i>Rhizobium loti</i>
	NZP 2213T = LMG 6125	<i>Rhizobium loti</i>
	BR 6806 = LMG 10007] 16
	BR 819 = LMG 9954	
	LMG 9995] 17 <i>Azorhizobium caulinodans</i>
	ORS 571T = LMG 6465	
	BR 5401 = LMG 9993] 18
	ORS 182 = LMG 10721	
	ORS 183 = LMG 10722	
	INPA 78B = LMG 10056] 19
	INPA 338A = LMG 10093	
	INPA 129A = LMG 10061	
	NZP 2037 = LMG 6123] 20
	INPA 12A = LMG 10031	
	BR 8005 = LMG 10012] 21
	BR 8006 = LMG 10013	
	BR 5404 = LMG 9994] 22 <i>Rhizobium fredii</i>
	BR 5202 = LMG 9990	
	ORS 161 = LMG 10704] 23 <i>Rhizobium meliloti</i>
	INPA 589A = LMG 10139	
	USDA 191 = LMG 8317] 24
	USDA 205T = LMG 6217	
	ORS 185 = LMG 10724] 25
	NZP 4009 = LMG 6130	
	NZP 4027T = LMG 6133	
	ORS 114 = LMG 10670	
	ORS 120 = LMG 10676	
	BR 5609 = LMG 9997	
	BR 5611 = LMG 9998	
	FL 281 = LMG 10026	
	MPM	

II. Système Biolog

Dans un premier temps, nous avons recherché les conditions optimales pour la réalisation des tests Biolog. En utilisant les souches ORS 132 et ORS 134, précultivées sur milieu TYB, les répétitions effectuées avec des concentrations différentes (x et y) de bactéries dans l'inoculum, montrent une similarité de 97% (Figure 4). Pour la souche ORS 167, la similarité entre ORS 167x et ORS 167y est d'environ 87%. Si des répétitions sont effectuées avec les souches ORS 112 et ORS 119 précultivées sur différents milieux TY et TYB (a) ou YMA et TYB (b) ou YMA et YMA (c), les similarités sont généralement plus faibles. Le milieu TYB a été choisi pour réaliser les précultures.

Les profils métaboliques des différentes souches isolées d'*Acacia albida* ont été comparés et analysés par le programme GELCOMPAR. Les souches de référence de *Bradyrhizobium* ont été incluses dans l'analyse : *B. japonicum* : NZP 5549^T, NZP 5533 et USDA 135 et *B. elkanii* : USDA 76^T et USDA 31. Les résultats des tests Biolog sont représentés sous forme de dendrogramme (Figure 4). Les résultats des 95 tests d'oxydation et les caractères discriminatifs entre les clusters formés sont donnés dans le tableau 3.

Avec un coefficient de similarité (r) de 0,82, on distingue trois principaux clusters (cl. I, II et III), 2 plus petits (cl. IV et V) et 2 souches (ORS 148 et ORS 191) avec une position séparée sur le dendrogramme. Le contenu détaillé des clusters phénotypiques est le suivant :

Le cluster I contient la souche de référence de *Bradyrhizobium japonicum* NZP 5533, toutes les souches isolées à Diokoul et à Kabrousse, 7 des 11 souches de Djinaki, 7 souches de sols de surface soudano-guinéens et 4 des 13 souches de sols de surface de la zone écoclimatique sahélienne.

Le principal cluster (cl. II) contient toutes les souches isolées du forage de Louga et 6 souches isolées des sols de surface en Casamance.

Les souches de référence de *Bradyrhizobium japonicum* et de *Bradyrhizobium elkanii* (NZP 5549^T et USDA 135 ; USDA 76^T et USDA 31, respectivement) constituent le cluster III avec 3 souches de Djinaki, 3 souches de sols de surface sahéliens et 1 souche isolée en surface dans la zone soudano-guinéenne.

Les petits clusters IV et V renferment exclusivement des souches isolées en surface.

Figure 4. Résultats des tests Biolog représentés sous forme de dendrogramme basé sur la valeur du coefficient de similarité r .

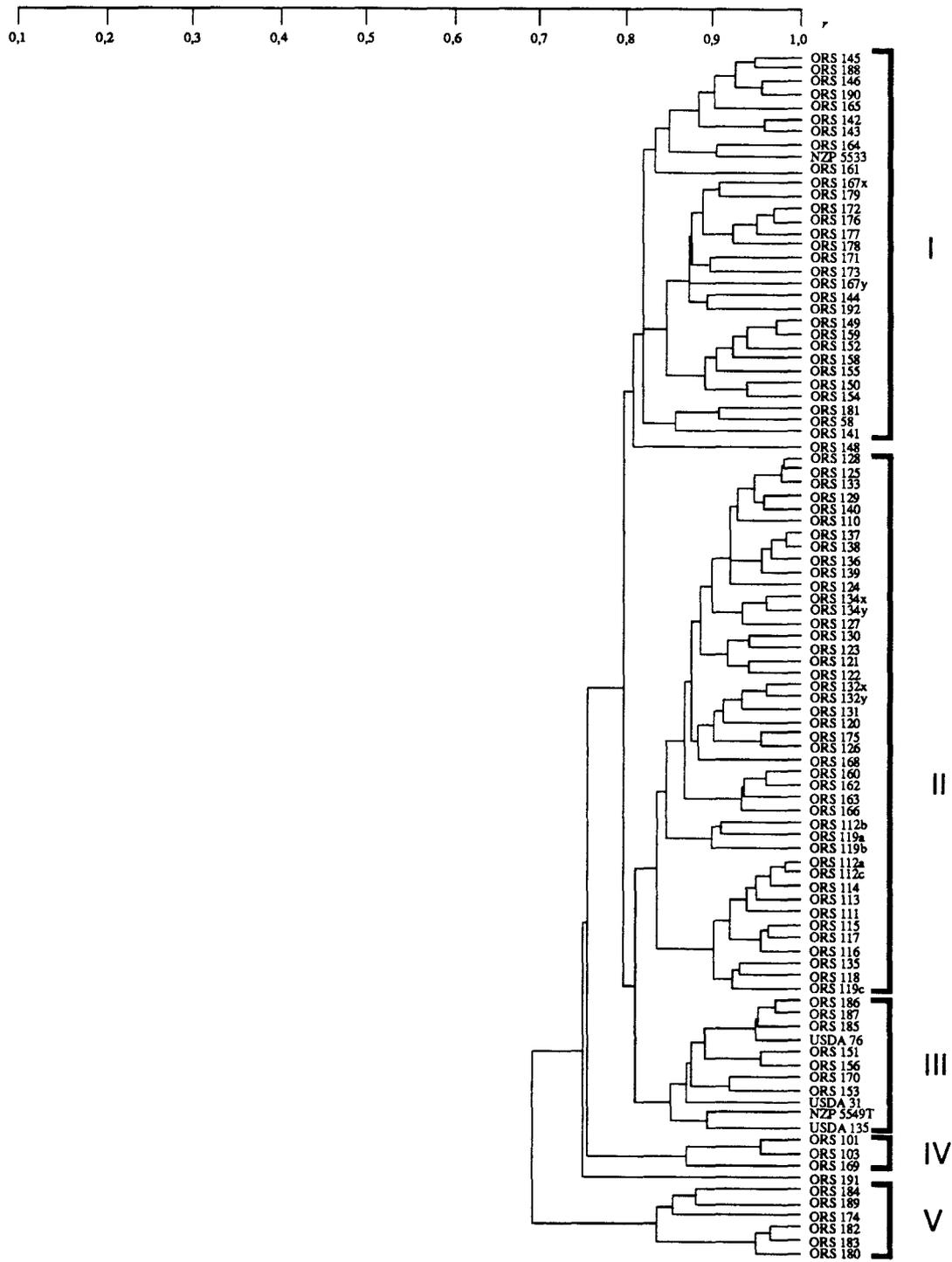


Tableau 3. Résultats des tests Biolog et caractères discriminants entre les 5 clusters déterminés.

Source de carbone	Clusters				
	I	II	III	IV	V
glycogène	-	d	-	-	-
xylitol	-	d	-	d	-
tween 40, tween 80, L-arabinose, acide formique, acide D-gluconique, acide α -hydroxybutyrique, acide sébacique, acide succinique	+	+	+	+	d
D-arabitol, D-galactose, acide cis-aconitique	+	+	d	+	-
adonitol, D-fructose, D-psicose, acide D-galacturonique, acide itaconique	d	d	-	+	-
acide D-glucosaminique	d	d	-	d	-
L-fucose	+	+	+	+	-
DL- α -glycérol phosphate	+	+	+	-	-
α -D-glucose, D-mannose, acide D-galactonique lactone	+	d	-	+	-
maltose	+	d	-	d	-
D-mannitol	+	d	d	+	-
L-rhamnose	d	+	-	+	-
mono-méthyl succinate	+	d	+	d	+
acide acétique	+	d	d	+	d
acide citrique	d	d	+	d	-
acide D-glucuronique, L-proline	d	-	-	+	-
acide p-hydroxy phényl acétique, L-phénylalanine	d	d	+	+	d
acide α -céto valérique, acide L-glutamique, acide glycil-L- glutamique	d	d	d	+	d
acide α -céto butyrique	+	d	+	+	d
acide α -céto glutarique	d	+	d	d	-
acide malonique	d	-	d	+	d
acide propionique, L-leucine	d	+	d	+	d
acide quinique	+	-	-	+	-
acide bromo succinique	+	+	d	+	d
glucuronamide	+	d	-	+	d
alaninamide	d	d	+	d	d
D-alanine	d	d	+	+	d
L-alanyl-glycine	-	d	d	d	-
phényl éthylamine	-	d	d	-	-
L-asparagine, D-sorbitol	d	d	d	+	-
acide L-aspartique, acide urocannique	d	-	d	+	-
acide γ -amino butyrique	-	d	-	+	d
méthyl pyruvate, acide β -hydroxybutyrique, acide γ -hydroxy butyrique, acide DL-lactique, acide succinamique, acide glycil- L-aspartique, acide L-pyroglutamique, glycérol	+	+	+	+	+
α -cyclodextrine, dextrine, N-acétyl-D-galactosamine, N-acétyl- D-glucosamine, cellobiose, i-érythritol, gentiobiose, m-inositol, α -D-lactose, lactulose, D-mélibiose, β -méthyl D-glucoside, D-raffinose, sucrose, D-tréhalose, turanose, hydroxy L-proline, L-ornithine, D-sérine, L-sérine, L-thréonine, DL-camitine, inosine, uridine, thymidine, putrescine, 2-amino éthanol, 2,3-butanediol, glucose-1-phosphate, glucose-6-phosphate	-	-	-	-	-
acide D-saccharique, L-alanine	d	d	d	d	d

+, plus de 90% des souches sont positives ; -, plus de 90% des souches sont négatives ;
d, réponse différente souche à souche, positif ou négatif.

III. Comparaison des techniques SDS-PAGE et Biolog

La position électrophorétique ($r=0,9$) de 84 souches isolées d'*Acacia albida* est comparée à leur position phénotypique ($r=0,82$). Les résultats sont donnés dans le tableau 4. Les souches de référence des groupes électrophorétiques identifiés dans le genre *Bradyrhizobium* et l'origine géographique des différents isolats sont indiquées.

Tableau 4. Comparaison du pouvoir de différenciation des techniques SDS-PAGE et BIOLOG et origine géographique des isolats d'*Acacia albida* dans les différents groupes.

Souches	Origine	Groupe SDS-PAGE	Groupe BIOLOG
ORS 149 (=LMG 11944)	Djinaki (0,5 m)	1	I
ORS 152 (=LMG 11947)	Djinaki (1,5 m)		
ORS 154 (=LMG 11949)	Djinaki (2,0 m)		
ORS 155 (=LMG 11950)	Djinaki (3,0 m)		
ORS 158 (=LMG 11953)	Djinaki (5,0 m)		
ORS 159 (=LMG 11954)	Djinaki (5,0 m)		
ORS 141 (=LMG 10697)	Diokoul (0,5 m)		
ORS 143 (=LMG 10699)	Diokoul (4,0 m)		
ORS 144 (=LMG 10700)	Diokoul (11,5 m)		
ORS 145 (=LMG 10701)	Diokoul (14,0 m)		
ORS 146 (=LMG 10702)	Diokoul (14,0 m)		
ORS 176 (=LMG 11955)	Kabrousse (0,1 m)		
ORS 177 (=LMG 11956)	Kabrousse (0,5 m)		
ORS 178 (=LMG 11957)	Kabrousse (1,0 m)		
ORS 165 (=LMG 10708)	sol soudano-guinéen de surface		
ORS 167 (=LMG 10710)	sol soudano-guinéen de surface		
ORS 172 (=LMG 10715)	sol soudano-guinéen de surface		
ORS 173 (=LMG 10716)	sol soudano-guinéen de surface		
ORS 181 (=LMG 10720)	sol sahélien de surface		
ORS 188 (=LMG 10727)	sol sahélien de surface		
ORS 190 (=LMG 10729)	sol sahélien de surface		
ORS 192 (=LMG 10731)	sol sahélien de surface		
ORS 58 (=LMG 10663)	sol sahélien de surface		
ORS 151 (=LMG 11946)	Djinaki (1,0 m)		III
ORS 153 (=LMG 11948)	Djinaki (1,5 m)		
ORS 156 (=LMG 11951)	Djinaki (4,0 m)		
ORS 186 (=LMG 10725)	sol sahélien de surface		
NZP 5549^T	Japon		IV
ORS 101 (=LMG 10664)	sol sahélien de surface		
ORS 103 (=LMG 10665)	sol sahélien de surface		
ORS 169 (=LMG 10712)	sol soudano-guinéen de surface		V
ORS 180 (=LMG 10719)	sol sahélien de surface		sep
ORS 148 (=LMG 11943)	Djinaki (0,1 m)		

Tableau 4 (suite)

Souches	Origine géographique et synonymes	Groupe SDS-PAGE	Groupe BIOLOG
ORS 127 (=LMG 10683) ORS 135 (=LMG 10691) ORS 160 (=LMG 10703) ORS 163 (=LMG 10706) ORS 166 (=LMG 10709) ORS 168 (=LMG 10711) BR 6009	Louga (17,5 m) Louga (32,0 m) sol soudano-guinéen de surface sol soudano-guinéen de surface sol soudano-guinéen de surface sol soudano-guinéen de surface Brésil	4	II
ORS 142 (=LMG 10698) ORS 164 (=LMG 10707) ORS 171 (=LMG 10714)	Diokoul (2,5 m) sol soudano-guinéen de surface sol soudano-guinéen de surface	5	I
ORS 174 (=LMG 10717)	sol soudano-guinéen de surface		V
ORS 191 (=LMG 10730)	sol sahélien de surface		sep
ORS 170 (=LMG 10713)	sol soudano-guinéen de surface	6	III
ORS 175 (=LMG 10718) BR 3624	sol soudano-guinéen de surface Brésil		II
ORS 110 (=LMG 10666) ORS 111 (=LMG 10667) ORS 112 (=LMG 10668) ORS 113 (=LMG 10669) ORS 115 (=LMG 10671) ORS 116 (=LMG 10672) ORS 117 (=LMG 10673) ORS 118 (=LMG 10674) ORS 119 (=LMG 10675) ORS 124 (=LMG 10680) ORS 125 (=LMG 10681) ORS 126 (=LMG 10682) ORS 128 (=LMG 10684) ORS 129 (=LMG 10685) ORS 131 (=LMG 10687) ORS 132 (=LMG 10688) ORS 133 (=LMG 10689) ORS 136 (=LMG 10692) ORS 137 (=LMG 10693) ORS 138 (=LMG 10694) ORS 139 (=LMG 10695) ORS 140 (=LMG 10696)	Louga (0,5 m) Louga (2,5 m) Louga (2,5 m) Louga (17,5 m) Louga (17,5 m) Louga (17,5 m) Louga (24,0 m) Louga (24,0 m) Louga (28,5 m) Louga (28,5 m) Louga (30,0 m) Louga (32,0 m) Louga (33,5 m) Louga (33,5 m) Louga (34,0 m) Louga (34,0 m)	7	II
ORS 121 (=LMG 10677) ORS 122 (=LMG 10678) ORS 123 (=LMG 10679) ORS 130 (=LMG 10686) ORS 134 (=LMG 10690)	Louga (2,5 m) Louga (5,0 m) Louga (5,0 m) Louga (27,5 m) Louga (30,0 m)	8	II

Tableau 4 (suite)

Souches	Origine géographique et synonymes	Groupe SDS-PAGE	Groupe BIOLOG
ORS 150 (=LMG 11945) USDA 135	Djinaki (1,0 m) USA	9	I III
ORS 187 (=LMG 10726) BR 8406	sol sahélien de surface Brésil	11	III
ORS 182 (=LMG 10721) ORS 183 (=LMG 10722)	sol sahélien de surface sol sahélien de surface	18	V
ORS 161 (=LMG 10704) BR 5202	sol soudano-guinéen de surface Brésil	21	I
ORS 114 (=LMG 10670) ORS 120 (=LMG 10676) BR 5609	Louga (0,5 m) Louga (2,5 m) Brésil	24	II
ORS 162 (=LMG 10705)	sol soudano-guinéen de surface	sep	II
ORS 185 (=LMG 10724)	sol sahélien de surface	sep	III
ORS 184 (=LMG 10723)	sol sahélien de surface	sep	V
ORS 189 (=LMG 10728)	sol sahélien de surface	sep	

Les souches de référence des groupes électrophorétiques identifiés dans le genre *Bradyrhizobium* apparaissent en gras. Les groupes 5, 7 et 8 constituent de nouveaux groupes.

Le cluster phénotypique I contient 23 des 33 isolats d'*Acacia albida* du cl. 1 SDS-PAGE, 3 souches appartiennent au cl. 5 SDS-PAGE, 1 des cl. 9 et 21 SDS-PAGE.

Le cluster phénotypique II contient toutes les souches d'*Acacia albida* des clusters SDS-PAGE 4, 7, 8 et 24, 1 souche (ORS 175) du cluster 6 et une souche (ORS 162) présentant une position séparée sur le dendrogramme SDS-PAGE.

Cinq souches du cl. 1 SDS-PAGE, 1 souche des cl. 6 et 11 et une souche avec un profil électrophorétique séparé (ORS185) constituent le cluster phénotypique III.

Le cluster phénotypique IV contient 3 souches du cl. 1 SDS-PAGE.

Le cluster phénotypique V regroupe 1 souche des clusters 1 et 5 SDS-PAGE, les 2 souches du cl. 18 et 2 souches séparées électrophorétiquement sur le dendrogramme SDS-PAGE.

IV. Hybridations ADN:ARNr

Les résultats d'hybridations de l'ADN de plusieurs souches nodulant *Acacia albida* avec l'ARN 23S ou 16S de la souche type de *Bradyrhizobium japonicum* NZP 5549^T sont donnés dans le tableau 5. Les souches représentatives de plusieurs clusters électrophorétiques ont été incluses à cette étude (cl. 1, 4, 5, 6, 7, 8, 18, 24). Des souches représentatives des clusters ne contenant que des souches brésiliennes n'ont pas été étudiées.

Tableau 5. Propriétés des hybrides ADN:ARNr déterminés en utilisant des sondes de *Bradyrhizobium japonicum* NZP 5549^T marquées au ¹⁴C ou au ³H.

Souche utilisée pour la préparation de l'ADN	N° de cluster SDS PAGE	Tm(e) ^a (°C)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> NZP 5549 ^T (=LMG6138 ^T)	1	80,2
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS103 (=LMG10665)	1	78,9
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS135 (=LMG10691)	4	78,6
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS163 (=LMG10706)	4	75,3
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS174 (=LMG10717)	5	69,5
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS170 (=LMG10713)	6	78,7
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS175 (=LMG10718)	6	79,7
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS133 (=LMG10689)	7	77,4
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS134 (=LMG10690)	8	77,7
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS182 (=LMG10721)	18	66,7
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS183 (=LMG10722)	18	66,8
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS114 (=LMG10670)	24	78,0

^aTm(e). Température à laquelle 50% de l'hybride est dénaturé.

La majorité des souches a une stabilité thermique ou Tm(e) comprise entre 75,3 et 80,2°C, à l'exception de ORS 174 (69,5°C), ORS 182 (66,7°C) et ORS 183 (66,8°C). Comme nous l'avons montré dans l'introduction générale (Figure 9), *Bradyrhizobium* constitue une branche ARNr séparée. Toutes les souches montrant des Tm(e) comprises entre 76°C et 81,5°C avec la sonde de la souche type NZP 5549^T appartiennent à cette branche (Jarvis *et al.*, 1986). Nos résultats montrent donc que toutes les souches incluses, excepté ORS 174, ORS 182 et ORS 183, font génotypiquement partie du genre *Bradyrhizobium*.

DISCUSSION

La diversité taxonomique des bactéries nodulant les légumineuses a fait l'objet de nombreuses études (Jarvis, 1983 ; Prévost *et al.*, 1987 ; Zhang *et al.*, 1991 ; Moreira *et al.*, 1993). Il ressort de ces études que les souches isolées des nodules d'une même légumineuse peuvent montrer une très grande hétérogénéité. Ainsi, par exemple, des isolats à croissance rapide de *Leucaena leucocephala* ont été décrits comme appartenant à 3 groupes d'homologie d'ADN (Jarvis, 1983), 4 groupes phénotypiques (Zhang *et al.*, 1991) et au moins 6 groupes électrophorétiques (Moreira *et al.*, 1993).

A notre connaissance, une étude équivalente de l'hétérogénéité de souches à croissance lente isolées des nodules d'une même légumineuse ligneuse n'avait jamais été effectuée jusqu'à présent. Seule, une étude phénotypique avait été réalisée sur six isolats nodulant *Acacia mangium* (Zhang *et al.*, 1991)

La plupart des isolats nodulant *Acacia albida* se regroupent avec des souches de référence appartenant au genre *Bradyrhizobium*, parmi lesquelles la souche type de *B. japonicum* NZP 5549^T, pour former les onze premiers clusters du dendrogramme (Fig 2). Quelques souches constituent des clusters, de petite taille, proches de clusters formés par différentes espèces de *Rhizobium* et d'*Azorhizobium*.

Une étude antérieure réalisée par Moreira *et al.* (1993) avait montré que 92 souches à croissance lente, isolées de différentes légumineuses tropicales au Brésil, et des souches de références du genre *Bradyrhizobium* constituaient un grand groupe électrophorétique. Ce grand cluster (M12)^a a été subdivisé en 5 sous-clusters appelés A, B, C, D et E (M12A, M12B, M12C, M12D et M12E). Dans la présente étude, nous avons comparé le profil protéique de 84 nouveaux isolats à croissance lente nodulant *Acacia albida* avec les souches représentatives de ces 5 sous-clusters. Par ailleurs, nous avons utilisé un nouveau programme de scannérisation et d'analyse numérique (programme GELCOMPAR) et un coefficient de similarité permettant de différencier les différentes espèces de *Rhizobium* ($r = 0,90$). Ces approches montrent qu'une partie seulement du grand cluster M12 de *Bradyrhizobium* est retrouvée dans les clusters 1 à 11. Les clusters 1 et 2 que nous avons définis, correspondent au sous-cluster M12B de *Bradyrhizobium*. Les souches représentatives du sous-cluster M12A appartiennent au cl. 4, excepté pour la souche BR 8406 contenue dans le cl. 11. Les souches représentatives de l'ancien sous-cluster D (M12D) se retrouvent dans notre cl. 10 tandis que les souches représentatives du sous-cluster M12C constituent le cluster 12 qui est assez proche des onze premiers clusters.

^a Les clusters décrits par Moreira *et al.* sont indiqués par M suivi du numéro de cluster.

Enfin trois des quatre souches représentatives du sous-cluster M12E se regroupent maintenant dans le cl. 6, la souche INPA 147B présentant une position isolée sur notre dendrogramme. Moreira *et al.* (1993) ont montré que 28 des 120 souches à croissance lente isolées au Brésil n'appartenaient pas au cluster M12 mais formaient de nouveaux clusters, comme les clusters M13, M16, M17...etc ou avaient une position séparée sur le dendrogramme. Le petit groupe M13, très proche de M12, correspond, dans notre étude, au cl. 3 inclus dans le grand cluster de *Bradyrhizobium*. La souche ORS 161 constitue avec la souche BR 5202 (M17) le cluster séparé 21. Les souches ORS 114 et ORS 120 isolées à partir du forage de Louga constituent le Cl. 24 de notre étude dont la souche représentative du cluster M16, BR 5609, fait partie. Plusieurs de nos isolats sont les représentants exclusif de clusters nouveaux, comme les Cl. 5, 7, 8 et le petit groupe électrophorétique 18. Trois des 4 nouveaux clusters (Cl. 5, 7 et 8) appartiennent au grand groupe électrophorétique des *Bradyrhizobium*. Nos résultats qui confirment que ce grand groupe peut donc être subdivisé en plusieurs sous-clusters, sont dans leur ensemble en accord avec les récents travaux de Moreira *et al.* (1993). Toutefois l'apparition de trois nouveaux sous-clusters à $r = 0,9$ suggère fortement que le groupe de *Bradyrhizobium* est subdivisé en un nombre plus grand de sous-groupes. Il est intéressant de noter que toutes les souches du Cl. 7 et du Cl. 8 sont originaires de sols prélevés à différentes profondeurs à Louga.

Jenkins *et al.* (1987 et 1989) ont identifié 2 populations distinctes de rhizobia isolés dans les sols de surface et à 4,5 m de profondeur sous le couvert de *Prosopis glandulosa*. En 1989, Waldon *et al.*, ont montré que les isolats à croissance lente de *P. glandulosa* sont physiologiquement distincts suivant leur profondeur d'origine. Au cours de notre étude, aucune relation évidente entre la profondeur d'isolement des souches et leur position sur le dendrogramme n'a été établie. Cette observation suggère que les souches indigènes des sols de surface se développent sous le couvert d'*Acacia albida* migreraient en profondeur en suivant le développement des racines de l'arbre. Notons que toutes les souches isolées à partir des différents forages sont électrophorétiquement groupées. Les clusters 7 et 8, très proches ($r=0,88$), contiennent pratiquement toutes les souches de Louga. Les souches isolées à partir des forages de Diokoul, Djinaki et de Kabrousse présentent une similarité intra-cluster respectivement importante ($r>0,9$ dans le cluster 1). De plus les souches isolées de sols de surface variés dans la zone sahélienne ou soudano-guinéenne sont électrophorétiquement plus hétérogènes que les souches de forage. Ces 2 dernières observations suggèrent une distribution horizontale et non pas verticale des souches nodulant *Acacia albida*. Conformément aux résultats publiés par Zhang *et al.* (1991), il semble qu'il n'existe pas de

relation entre la position taxonomique des souches et leur origine géographique d'isolement.

L'étude des protéines totales sur gel d'électrophorèse n'étant pas suffisante pour décrire de nouveaux groupes (Graham *et al.*, 1991), une caractérisation phénotypique des souches nodulant *Acacia albida* a été réalisée. Les méthodes classiques de classification phénotypique sont très lourdes à mettre en place et les résultats sont quelquefois difficiles à interpréter avec les bactéries à croissance lente. Les systèmes de taxonomie phénotypique (auxanographie) disponibles dans le commerce, comme les galeries API (50CH, 50OA, ou 50AA) ou Biolog, sont aujourd'hui très fiables. Toutefois, le trop faible taux de croissance des *Bradyrhizobium* ne permettait pas l'étude auxanographique par le système API 50. L'utilisation du système Biolog que nous avons adopté à l'étude phénotypique de *Bradyrhizobium* est moins résolutive que la technique SDS-PAGE ; moins de groupes ont été définis et il y a peu de correspondance entre les résultats obtenus par les deux approches. Par ailleurs, le fait que la majorité des substrats donnent une réponse variant de souche à souche (Tableau 3) rend la discrimination parfois délicate. Seules les sources de carbone comme le L-fucose, l'acide quinique et DL- α -glycérol phosphate se sont avérées discriminatives pour distinguer les 5 clusters phénotypiques.

Selon Hollis *et al.* (1981), trois groupes d'homologie ADN:ADN peuvent être distingués chez *Bradyrhizobium japonicum* (I, Ia et II). La souche type *B. japonicum* NZP 5549^T appartient au groupe I. Pour le groupe II, une nouvelle espèce, *Bradyrhizobium elkanii*, a été créée par Kuykendall *et al.* (1992). Cette espèce se distingue de *Bradyrhizobium japonicum* par sa composition en acides gras, sa résistance à différents antibiotiques et par son profil RFLP après hybridation avec diverses sondes de *Bradyrhizobium* (Kuykendall *et al.*, 1992). De manière surprenante, notre étude phénotypique montre que la souche type NZP 5549^T de *Bradyrhizobium japonicum* appartient au même cluster phénotypique (cl. III) que les souches de *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76^T et USDA 31. Une autre souche, NZP 5533, du même groupe d'homologie ADN:ADN que NZP 5549^T, est membre d'un cluster phénotypique (cl. I) différent de celui de NZP 5549^T. Ces deux contradictions peuvent être expliquées par le faible pouvoir discriminant du système Biolog par rapport à la technique SDS-PAGE. Ainsi, par exemple, les souches contenues dans les 5 clusters phénotypiques (I à V) se répartissent sur 11 clusters électrophorétiques différents : cl. 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 18, 21 et 24. De même, deux souches de *B. elkanii* sont membres du cl. 6 (SDS-PAGE) avec trois souches brésiliennes et 2 souches nodulant *Acacia albida* (ORS 170 et ORS 175) (Dupuy *et al.*, en préparation). Des études complémentaires sont cependant nécessaires avant de pouvoir affirmer que *B. elkanii* correspond au

cluster électrophorétique 6.

De même que pour les résultats SDS-PAGE, la diversité phénotypique des souches d'*Acacia albida* n'est pas liée à leur origine d'isolement. La similarité intra-cluster des souches isolées à partir des différents forages observée sur le dendrogramme SDS-PAGE se retrouve au niveau phénotypique. Ceci confirmerait l'hypothèse d'une migration des souches en profondeur parallèlement au développement racinaire.

En préambule à l'étude génomique fine des souches représentatives des groupes électrophorétiques caractérisés dans notre étude, nous avons jugé utile de faire une première caractérisation génomique par hybridation ADN:ARNr. Les résultats des hybridations ADN:ARNr ($T_{m(e)}$ entre 75,3 et 80,2°C avec la sonde de la souche NZP 5549^T) montrent, sans ambiguïté, que les souches appartenant aux clusters électrophorétiques dont la liste suit sont des bradyrhizobia : les cl. 1 (78,9-80,2°C), cl. 4 (75,3-78,6°C), cl. 6 (78,7-79,7°C), cl. 7 (77,4°C), cl. 8 (77,7°C) et le cl. 24 (78°C). Les deux souches constituant le cluster 18, avec des valeurs de $T_{m(e)}$ de 66,7 et 66,8°C, n'appartiennent pas à la branche ARNr de *Bradyrhizobium*. Pourtant ces deux souches nodulent *Acacia albida* et présentent une croissance lente. Il serait intéressant de définir leur position taxonomique exacte. Leurs relations avec d'autres branches ARNr de la super-famille IV dans la classe des protéobactéries n'ont pas encore été déterminées. La souche ORS 174 représentative du cl. 5 a une $T_{m(e)}$ de 69,5°C l'excluant également de la branche ARNr de *Bradyrhizobium*. Ce résultat est étonnant dans la mesure où le cl. 5 présente une grande similarité inter-cluster avec les cl. 1 à 11. Des expériences d'hybridation ADN:ARNr supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ce résultat.

Les données électrophorétiques, phénotypiques et génotypiques que nous avons présentées, montrent clairement que la grande majorité des souches nodulant *Acacia albida* appartiennent phylogénétiquement à la branche de *Bradyrhizobium*. L'hétérogénéité dans le genre *Bradyrhizobium* étant toutefois assez grande, des études génomiques plus approfondies sont nécessaires afin de connaître à quel niveau ces clusters SDS-PAGE constituent des groupes taxonomiques séparés. Des hybridations ADN:ADN et du séquençage de l'ARN 16S seront en particulier nécessaires. Les résultats préliminaires de séquençage que nous possédons indiquent que de nombreuses souches à croissance lente isolées d'*Acacia albida* et de légumineuses brésiliennes constituent une lignée séparée de *Bradyrhizobium japonicum* mais aussi de *Rhodospseudomonas palustris*, *Blastobacter denitrificans* et *Afipia* sp. (Dupuy, Willems, Dewettinck, Maestrojuan, Pot, Dreyfus, Kersters, Collins et Gillis, en préparation).

Une fois définis, les nouveaux groupes génomiques devront être comparés

aux résultats SDS-PAGE et Biolog. L'utilisation d'autres techniques taxonomiques performantes, comme le RFLP, devrait aider à établir une classification plus affinée. Dans l'état actuel des connaissances, il paraît probable que de nouvelles espèces seront identifiées. Toutefois, il est d'ores et déjà clair qu'il sera difficile de nommer des espèces qui présentent des relations intragénériques avec les genres *Rhodopseudomonas*, *Bradyrhizobium* et *Afipia*.

ANNEXE

Les travaux décrits ci-dessus font l'objet d'un article en préparation. Le titre, les auteurs et le résumé de cet article sont les suivants :

Protein gelelectrophoretic, Phenotypic and Genotypic Characterization of Bradyrhizobia Nodulating the Leguminous Tree *Acacia albida*

N. Dupuy¹, A. Willems³, D. Dewettinck², G. Maestrojuan², B. Pot², B. Dreyfus¹, K. Kersters², M.D. Collins³ and M. Gillis².

¹Laboratoire de Microbiologie des Sols, ORSTOM BP 1386 Dakar, Sénégal.

²Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, Belgium.

³AFRC Institute of food research, Department of Microbiology, Early Gate, White Knights road, Reading, RGG-2EF, United Kingdom.

Summary

A collection of bradyrhizobial isolates was recovered both from surface and deep soil horizons in Sahelian and Sudano-Guinean areas under *Acacia albida*. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of proteins (SDS-PAGE) was used to characterize the isolates and to determine their taxonomic position and their relationships. Reference strains of known rhizobia species and genera were included. Most isolates were shown to belong to 8 electrophoretic clusters containing the reference strains of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium* sp. Isolates were also characterized by using Biolog test, a new miniaturized phenotypical technique and the results were compared with those obtained with the SDS-PAGE of total proteins. DNA:rRNA hybridizations with 16 or 23S rRNA from *Bradyrhizobium japonicum* NZP 5549^T have confirmed that most of the gel electrophoretic clusters belong in the *Bradyrhizobium-Rhodopseudomonas* rRNA complex. Sequencing of the 16S rRNA showed that new isolates constitute a separate lineage as far removed from *Bradyrhizobium japonicum* as from *Rhodopseudomonas*, *Blastobacter denitrificans*, *Afipia* and *Rhodopseudomonas*. We did not find any correlation between electrophoretic clusters and the depth at which we have isolated *A. albida* nodulated strains.



CHAPITRE III

**ETUDE DE L'INFECTION ET DU
DEVELOPPEMENT DES NODULES
DE RACINES D'ACACIA *ALBIDA***

Ce travail a été effectué au laboratoire de Biologie Moléculaire des Relations Plantes-Microorganismes CNRS-INRA de Castanet-Tolosan dans le groupe de Cytologie dirigé par M. Georges Truchet, Directeur de Recherche au CNRS.

INTRODUCTION

L'ontogénèse d'un nodule de légumineuse résulte d'une succession d'étapes, parmi lesquelles une étape d'infection, qui se déroule au début du processus organogénétique, et une étape de différenciation dont le déroulement conditionne le type de nodule induit.

Deux modes majeurs d'infection ont été décrits à ce jour. L'infection par les poils absorbants est répandue chez les légumineuses tempérées. Après inoculation, les poils absorbants de la plante se déforment. Une de ces déformations consiste en un recourbement à 360° de l'extrémité apicale du poil absorbant (phénotype Hac = "Hair curling") dans lequel les bactéries sont retenues. Par la suite, un cordon d'infection est ébauché à partir du centre de la crosse. Un cordon est une entité structurale limitée par une paroi d'origine végétale et dont la partie centrale est occupée par les bactéries incluses dans un mucilage. Le cordon croît dans la lumière du poil vers les cellules du cortex végétal au niveau desquelles il essaime par l'émission de branches progressant de manière intercellulaire.

L'infection intercellulaire ("Crack entry") est caractéristique des légumineuses tropicales. Les bactéries s'immiscent alors dans la paroi commune à deux cellules adjacentes et progressent dans le compartiment apoplastique. Les cordons d'infection sont formés ultérieurement, soit directement à partir de l'infection intercellulaire, soit à partir de poches d'infection, dilatations à forte concentration bactérienne qui s'édifient parfois sur le trajet de l'infection primaire.

Il existe deux grands types de développement nodulaire. Les nodules du premier type, dit indéterminé, se développent surtout chez les légumineuses tempérées. Ces nodules montrent une activité méristématique qui se propage pendant plusieurs semaines, leur conférant une forme allongée caractéristique. Dans les nodules de type indéterminé, la différenciation des cellules n'est pas synchrone. De ce fait, des zones histologiques marquant toutes les étapes de différenciation des cellules végétales et bactériennes peuvent être observées dans l'axe disto-proximal d'une coupe longitudinale, tandis que les traces vasculaires et un endoderme se différencient à la périphérie.

Les nodules de type déterminé, le deuxième type, se développent essentiellement chez les légumineuses tropicales. Ils se caractérisent par une activité mitotique limitée dans le temps et la différenciation synchrone des cellules envahies par les bactéries. A maturité, l'histologie de tels nodules se résume à un tissu central unique, composé de cellules envahies et de cellules non envahies et limité sur toute sa surface par des tissus vasculaires et périphériques.

Précisons, qu'en de rares occasions, des caractères de développement spécifiques de chacun des types décrits ci-dessus, peuvent coexister au cours du développement nodulaire. C'est le cas des nodules racinaires de la légumineuse tropicale, *Sesbania rostrata*, où l'on note une infection de type intercellulaire, une différenciation selon un gradient disto-proximal et une phase de maturation conduisant à l'individualisation d'un tissu central unique (Ndoye *et al.*, en préparation).

Très peu d'études ont été entreprises chez les légumineuses pérennes arbustives et ligneuses. L'étude de l'infection et du développement nodulaire chez une légumineuse ligneuse d'origine australienne, *Aotus ericoides*, a été réalisée par Lawrie (1983). L'auteur qui ne peut décrire avec exactitude le mécanisme d'infection précise que les nodules possèdent à la fois des caractères de nodules déterminé et indéterminé. De même, la nodulation d'une légumineuse ligneuse brésilienne, *Mimosa scabrella*, a été étudiée (de Faria *et al.*, 1988). Dans ce cas, les nodules se développent sur les racines latérales et sont de type indéterminé. Ils présentent un méristème apical et un tissu nodulaire central composé de cellules pouvant être envahies ou non envahies.

Enfin, l'infection par les poils absorbants a été décrite chez *Leucaena leucocephala* (Chen et Rolfe, 1988) et chez *Acacia senegal* (Badji, 1991).

Dans ce travail, l'infection et le développement de nodules racinaires d'*Acacia albida* ont été étudiés. La souche de *Bradyrhizobium* sp. ORS 188, choisie pour ses qualités de nodulation et de fixation d'azote, a été utilisée comme inoculum.

MATERIEL ET METHODES

Les différents traitements que doivent subir des échantillons biologiques en vue d'une étude en microscopies photonique et électronique sont décrits ci-après.

1. Fixation du matériel

Le système racinaire entier est disséqué dans une solution fixatrice de glutaraldéhyde à 2,5% tamponnée par du cacodylate de sodium 0,2 M et additionnée de 2,5 mM de chlorure de calcium (pH = 7,2). L'osmolarité du fixateur est d'environ 650 milliosmoles.

Les fragments racinaires, ou les nodules recueillis, sont fixés dans un premier temps sous vide pendant 30 min. puis pendant 1h30 à la pression atmosphérique dans du fixateur renouvelé. Après 3 rinçages de 1 h dans du tampon cacodylate de sodium 0,3 M additionné de 2,5 mM de CaCl_2 (pH = 7,2), les échantillons sont post-fixés pendant une heure par le tétr oxyde d'osmium OsO_4 (2% dans un tampon cacodylate 0,2M).

2. Traitements du matériel fixé

Une fois fixés, les échantillons sont traités en fonction du niveau d'observation souhaité.

2.1. Coupes au vibratome

Des sections de 60 à 80 μm de nodules, ou de fragments de racines préalablement fixés, sont réalisées à l'aide d'un vibratome (microtome à lame vibrante) de type Microcut H 1200. Les échantillons biologiques sont préalablement inclus dans de l'eau gélosée à 4% dans des moules à inclusion avant d'être sectionnés. Cet enrobage confère une rigidité nécessaire à l'étape de microtomie. Les sections recueillies sont ensuite éclaircies par l'hypochlorite de sodium à 6° pendant 30 sec. puis colorées par le bleu de méthylène (0,01% dans l'eau distillée) pendant 45 secondes (Vasse et Truchet, 1984). Après montage entre lame et lamelle dans de l'eau distillée, les sections sont observées au microscope photonique à fond clair.

2.2. Coupes au microtome

2.2.1. Déshydratation

Les échantillons fixés sont rapidement lavés à l'eau distillée puis déshydratés dans des bains successifs d'éthanol de concentration croissante (25%, 50%, 70%, 90%, 1 h pour chaque bain). La déshydratation s'achève par 3 bains d'1 h dans l'éthanol absolu. Deux bains de 15 min. dans l'oxyde de propylène précèdent l'étape d'imprégnation dans la résine d'inclusion. Il faut noter que le bain d'éthanol à 70 % peut constituer un bain d'arrêt.

2.2.2. Imprégnation dans la résine d'inclusion

Les échantillons déshydratés sont imprégnés progressivement dans la résine d'inclusion, l'Epon 812. La résine est préparée en mélangeant 2 volumes d'une solution A, composée de 62 ml de glycidyl éther 100 et de 100 ml de DDSA (Anhydride Dodécényl Succinique) et un volume d'une solution solution B, constituée de 100 ml de glycidyl éther 100 et de 89 ml de MNA (Nadic Méthyl Anhydride). Un durcisseur, le DMP-30 (Tris-Diméthylaminométhyl phénol) est également ajouté au mélange d'inclusion (2%, v/v). Les échantillons sont imprégnés par des mélanges de résine et d'oxyde de propylène, avec un enrichissement progressif en résine d'inclusion. L'imprégnation est achevée après 3 bains d'1 h dans le mélange d'inclusion pur. Les étapes d'imprégnation se déroulent à température ambiante.

2.2.3. Inclusion et polymérisation

Les échantillons imprégnés sont déposés dans une goutte d'Epon au fond d'une gélule en gélatine. Chaque échantillon est orienté sous la loupe binoculaire et le volume de la gélule complété avec le mélange d'inclusion. Les gélules sont enfin placées pendant 48 h dans une étuve à 60°C où s'effectue la polymérisation.

2.2.4. Microtomie

Les gélules polymérisées sont taillées de sorte à ce que l'échantillon inclus soit situé au sommet d'une pyramide. Chaque gélule taillée est positionnée sur le porte objet d'un ultramicrotome de type Ultacut E Reichert Jung.

2.2.4.1. Coupes semi-fines

Des couteaux de verre sont fabriqués à l'aide d'un knifemaker LKB type 7800. Les coupes semi-fines de nodules, d'une épaisseur de 1 à 2 μm , sont déposées sur des lames histologiques propres, séchées sur une plaque chauffante et colorées par la fucshine basique et le bleu de méthylène selon la méthode d'Huber *et al.* (1968). Les sections ont été observées en microscope photonique (microscope Olympus Vanox équipé d'un module automatique de prise de vues PM 10 AD).

2.2.4.2 Coupes ultra-fines

Des sections ultra-fines (800 nm d'épaisseur) réalisées à l'aide d'un couteau de diamant sont recueillies sur des grilles de microscopie électronique recouvertes d'une membrane de formvar (solution commerciale à 0,5% dans le dichloro-éthane). Les coupes ultrafines sont colorées à l'acétate d'uranyle (acétate d'uranyle 5% en mélange v/v avec de l'éthanol pur, 30 sec. à l'abri de

la lumière) et au citrate de plomb (solution aqueuse à 0,4%, 30 min.) (Reynolds, 1963). Une fois sèches, les grilles ont été observées en microscope électronique à transmission (microscope Hitachi EM 600 sous 75 KV).

RESULTATS

Le système racinaire d'*Acacia albida* se compose d'une racine principale et d'un grand nombre de racines secondaires sur lesquelles se développent les nodules (Pl. 1, fig. 1).

Notre étude a consisté à observer des échantillons prélevés pendant les trente premiers jours suivant l'inoculation. A ce terme, les nodules sont morphologiquement identiques et sphériques (Pl. 1, fig. 1). Notons toutefois que plus de deux mois après l'inoculation, il est possible d'observer des nodules de forme multilobée ou coralloïde (Pl. 1, fig. 2). De tels nodules n'ont pas été étudiés.

I. Site de nodulation

L'étude histologique de racines secondaires témoins (non inoculées) ou inoculées depuis 48h a été réalisée (Pl. 1, figs. 3 et 4). Une racine témoin est composée d'une région corticale délimitée, à l'extérieur, par une assise de cellules épidermiques et, à l'intérieur, par le cylindre central de la racine. Le cortex d'une racine non inoculée est constitué de cellules de grande taille, pauvres en cytoplasme et séparées les unes des autres par d'importants espaces intercellulaires. Une large vacuole occupe la majeure partie du volume des cellules et un noyau de petite taille est parfois observé en position périphérique (Pl. 1, fig. 3).

Dans les témoins non inoculés, les racines demeurent glabres. Toutefois, deux jours après l'inoculation, l'observation des racines révèle une induction de poils absorbants en certaines zones piliées de la racine secondaire (phénotype Hai). La section de telles zones montrent que les poils absorbants induits, légèrement ondulés ou déformés, se différencient à partir des cellules épidermiques (Pl. 1, fig. 4). L'observation de nombreuses vacuoles séparées par des travées de cytoplasme et d'un noyau de grande taille avec un nucléole proéminent au sein des cellules épidermiques témoignent de la différenciation cellulaire amorcée. Toutefois, à ce stade de l'interaction, les cellules corticales présentent toujours les caractères des cellules d'une racine non inoculée i. e. une large vacuole et un noyau de petite taille en position périphérique (Pl. 1, fig. 4).

L'observation de sections transversales de régions piliées 72 h après l'inoculation montre plusieurs modifications cytologiques au niveau des cellules corticales. Ces modifications se traduisent par des divisions essentiellement anticlines affectant toutes les assises corticales en une ou deux régions de racine (Pl. 2, fig. 5). Les cellules corticales externes sont

caractérisées par une augmentation de volume, la migration du noyau en position centrale et le morcellement de la grande vacuole qui occupait initialement tout le volume cellulaire (Pl. 2, fig. 5). Les cellules du cortex interne, plus petites, possèdent également un noyau volumineux et de nombreuses petites vacuoles (Pl. 2, fig. 5). Les espaces intercellulaires se réduisent entre les cellules filles dérivant de l'activité mitotique du cortex externe mais demeurent importants entre les cellules corticales originelles. Enfin, il est intéressant de noter que certaines cellules corticales externes présentent une légère protubérance dirigée vers l'extérieur (Pl. 2, fig. 5).

Une coupe réalisée dans une région piliée 4 jours après l'inoculation révèle deux critères cytologiques importants (Pl. 2, fig. 6). Premièrement, il existe deux types de poils absorbants (Pl. 2, fig. 7). Le premier type (PA_1), légèrement ondulé et identique à celui déjà décrit, prend naissance à partir d'une cellule épidermique (Pl. 2, fig. 7). Le deuxième type (PA_2) à la région basale hypertrophiée et à l'extrémité courte lui conférant une forme de carafe, prend naissance à partir d'une cellule de l'assise corticale sous épidermique (Pl. 2, figs. 7 et 8) et dérive probablement de la maturation d'une cellule qui présentait une légère protubérance 72 h après inoculation (Pl. 2, fig. 5). La cellule correspondant au poil absorbant PA_2 montre le même morcellement vacuolaire que les cellules corticales sous-jacentes caractérisées par un enrichissement cytoplasmique et une activité mitotique notable (Pl. 2, fig. 8). Le deuxième critère cytologique notable est la dédifférenciation des cellules corticales internes et la formation d'un massif cellulaire composé de cellules de petite taille, riches en cytoplasme, aux contours très jointifs et présentant une activité mitotique importante. Ces caractères sont ceux de cellules méristématiques (Pl. 2, figs. 6 et 8). Enfin, on constate que des divisions anticlines et périclines affectent les cellules corticales et que les espaces intercellulaires sont réduits ou absents dans tout le cortex (comparer Pl. 2, figs. 5 et 8). Il faut souligner qu'à ce stade de développement, aucune trace d'infection n'est visible dans les tissus racinaires où de telles modifications cytologiques sont observées.

II. Initiation et développement du cordon d'infection

Le premier indice visuel d'un développement nodulaire est observé, 6 jours après l'inoculation, sous la forme d'un renflement dans la région piliée de la racine secondaire (Pl. 3, figs. 9 et 10). Des sections de 80 μm d'épaisseur d'un tel renflement permettent souvent de détecter des structures tubulaires rappelant celles classiques des cordons d'infection au niveau des poils absorbants dont le type, et donc la lignée, peut difficilement être déterminé.

Noté avons toutefois noté, de manière constante, que l'infection se déroulait dans les cellules localisées à la périphérie de segments racinaires dont les cellules se caractérisent par les critères cytologiques déjà décrits (Pl. 2, figs. 5 à 8). Ainsi les modifications observées dans les cellules du cortex à 72 et 96 h en absence d'infection visible (voir plus haut), et qui pourraient être induites à distance, constituent des repères cytologiques intéressants pour la localisation de l'infection.

L'observation de coupes semi-fines et ultra-fines réalisées dans des ébauches nodulaires dix jours après l'inoculation (Planches 4 à 6), permet d'identifier des grandes cellules périphériques, limitées par une paroi épaisse ; ces cellules qui présentent une protubérance tournée vers l'extérieur, surmontent un massif de petites cellules riches en cytoplasme (Pl. 4, figs. 12 à 15). Les résultats faisant état de deux types de poils absorbants (voir plus haut) et la comparaison entre cellules observées à la périphérie d'un renflement racinaire, permettent raisonnablement de conclure que les cellules de petite taille sont d'origine épidermique et que les grandes cellules hypertrophiées sont d'origine corticale (Pl. 4, figs. 12 à 15).

L'observation de sections de plusieurs ébauches de nodules a montré, de manière remarquable, que ce sont les cellules hypertrophiées qui sont infectées (Pl. 4, figs. 12 à 15). L'infection de type intercellulaire prend naissance au point de contact de la protubérance de la cellule hypertrophiée avec une cellule épidermique adjacente (Pl. 4, figs. 12 à 15). Une fois initiés, les cordons se développent et progressent dans la lumière de la cellule au niveau de travées cytoplasmiques ou ponts cytoplasmiques (Pl. 4, figs. 14 et 15). Ultrastructuralement, les cordons d'infection sont délimités par une paroi pecto-cellulosique de structure identique à celle de la paroi de la cellule qu'ils empruntent (Pl. 5, fig. 16). Dans la lumière du cordon d'infection, les bactéries sont incluses dans un mucilage de nature fibrillaire et des granules de poly- β -hydroxybutyrate sont observées dans le cytoplasme bactérien (Pl. 5; fig. 16). Enfin, il semble clair que l'infection se propage de la cellule corticale hypertrophiée vers les cellules méristématiques sous-jacentes, par essaimage intercellulaire de cordons d'infection (Pl. 4, fig. 15).

III. Cytologie des ébauches nodulaires

Les modifications cytologiques qui affectent les cellules corticales s'accroissent au cours du développement nodulaire. Ainsi s'individualise un massif de cellules de petite taille qui dérivent du cortex interne, constituant le méristème du nodule. Ces cellules sont riches en cytoplasme, peu vacuolisées et présentent un noyau central à gros nucléole (Pl. 4, figs. 14 et 15).

L'étude cytologique de jeunes nodules en cours de développement montrent que les cellules du méristème sont atteintes par des cordons d'infection (Pl. 4, fig. 15 ; Pl. 5, figs. 18 et 19 ; Pl. 6, fig. 20). L'infection se propage dans les tissus méristématiques par voie intercellulaire et essaime dans la lumière des cellules en émettant de multiples branches qui, en section, apparaissent sous la forme d'îlots infectieux intracellulaires (Pl. 4, fig. 15 ; Pl. 5, figs. 18 et 19 ; Pl. 6, fig. 20). Il est important de souligner que des cordons d'infection, sont observés dans des cellules en division (Pl. 5, fig. 19).

Simultanément aux évènements décrits ci-dessus, des cellules situées en périphérie du méristème originel, se différencient pour donner naissance aux tissus conducteurs qui s'édifient du cylindre central jusqu'à la périphérie (Pl. 5, fig. 17). De nombreuses cellules, riches en tanins se différencient également dans les tissus plus internes et en périphérie de l'ébauche nodulaire (Pl. 5, fig. 17).

IV. Histologie du nodule

L'activité mitotique du méristème et la différenciation simultanée des cellules qui en sont issues conduisent à la formation d'un jeune nodule qui émerge à la surface de la racine (Pl. 7, fig. 21). Quatorze jours après inoculation, les nodules sont caractérisés histologiquement par une région centrale limitée par des tissus périphériques. La plus grande partie des tissus périphériques est constituée de cellules très vacuolisées, où peuvent s'accumuler des tanins. Ce tissu entoure à la fois la région centrale et le parenchyme nodulaire qui limite des traces vasculaires du nodule observées sous la forme de plusieurs faisceaux (Pl. 7, figs. 22 et 23). Les tissus conducteurs sont interconnectés au système vasculaire de la racine support (Pl. 7, fig. 23).

La région centrale est constituée de cellules envahies et non envahies. Les cellules non envahies de petite taille, et uniformément réparties, sont très vacuolisées et contiennent des amyloplastés (Pl. 7, figs. 22 à 24). Les cellules envahies se répartissent selon un gradient de différenciation depuis les cellules méristématiques de petit volume et localisées à la périphérie jusqu'au centre du nodule où les cellules les plus différenciées sont observées (Pl. 7, fig. 22 à 24). Il existe donc un gradient disto-proximal de différenciation dans les nodules en développement (Pl. 7, fig. 24).

V. Etude ultrastructurale de la différenciation du tissu central

V.1. La région méristématique

Cytologiquement, les cellules distales satisfont aux critères des cellules méristématiques. Elles contiennent un noyau central à gros nucléole et un cytoplasme peu vacuolisé, riche en proplastés. De nombreuses sections transversales de cordons d'infection sont observées dans ces cellules méristématiques (Pl. 8, fig. 25). L'étude ultrastructurale d'un nodule de 14 jours montre que les cordons d'infection progressent entre les cellules méristématiques par voie intercellulaire tout en émettant des digitations intracellulaires (Pl. 8, figs. 25 et 26). Dans le cas d'une pénétration intracellulaire, on remarque que la paroi du cordon d'infection et celle de la cellule végétale hôte sont en continuité et que le plasmalemme de la cellule hôte adopte les profils des cordons d'infection (Pl. 8, fig. 26). A fort grossissement, on note le profil tourmenté des cordons infectieux probablement dû à l'intégration dans leur paroi de nombreuses vésicules d'origine végétale contenant du matériel fibrillaire (Pl. 8, fig. 27). Enfin, on note la présence d'inclusions de poly- β hydroxybutyrate dans le cytoplasme des bactéries noyées dans la matrice du cordon (Pl. 8, fig. 27).

V.2. Libération bactérienne

Les mécanismes conduisant à la libération des bactéries semblent débiter par une désagrégation localisée de la paroi du cordon (Pl. 9, figs. 28 à 31). En effet, le matériel pariétal pecto-cellulosique se désorganise, d'abord en un ou plusieurs points distincts du cordon (Pl. 9, fig. 28), puis sur une plus grande surface (Pl. 9, figs. 30 et 31). Simultanément, on constate une accumulation importante dans le cytoplasme végétal de vésicules électroniquement vides ou chargées d'un matériel fibrillaire (Pl. 9, figs. 29 et 30). Certaines de ces vésicules semblent fusionner à la membrane du cordon délimitant la région où la paroi pecto-cellulosique est en cours de désorganisation (Pl. 9, fig. 29). Au terme de ce processus, la bactérie n'est plus séparée du cytoplasme végétal que par la plasma-membrane (Pl. 9, figs. 30 et 31). La bactérie est libérée du cordon d'infection dans le cytoplasme hôte selon un processus rappelant l'endocytose (Pl. 9, fig. 31). La bactérie nouvellement libérée et séparée du cytoplasme végétal par une membrane d'origine plasmalémme, la membrane pér bactéroïdienne, est appelée bactéroïde. L'unité structurale formée par le bactéroïde, l'espace pér bactéroïdien et la membrane

péribactéroïdienne est appelée symbiosome.

V.3. Différenciation des symbiosomes

Dès leur individualisation, on constate que les membranes limitant les symbiosomes offrent un aspect irrégulier (Pl. 10, figs. 32 et 33). Cet aspect est dû à la fusion de vésicules cytoplasmiques, décrites plus haut, à la membrane péribactéroïdienne (Pl. 10, figs. 32 et 33). Il s'ensuit, dans un premier temps, l'accumulation de matériel fibrillaire dans l'espace péribactéroïdien (Pl. 10, figs. 32 et 33). Plus tard, au cours de la différenciation, on observe une augmentation simultanée du nombre de symbiosomes par cellules et du nombre de bactéroïdes par symbiosome. L'augmentation du nombre de bactéroïdes par symbiosome semble être la conséquence de la division exclusive des bactéroïdes dans chaque symbiosome (Pl. 12, fig. 35). De manière presque simultanée, on constate que la disparition progressive des vésicules dans le cytoplasme végétal est corrélée à la fin de l'allongement du bactéroïde (Pl. 10, fig. 33 ; Pl. 11, fig. 34) et à un aspect plus régulier de la membrane du symbiosome (Pl. 11, fig. 34). Enfin on note la fusion de plusieurs symbiosomes au niveau des zones de contact entre membranes péribactéroïdiennes (Pl. 12, figs. 35 et 36). Ces caractères s'accroissent avec le temps. Dans la région centrale des nodules matures le volume des cellules végétales envahies est alors entièrement occupé par les symbiosomes (Pl. 13, figs. 37 et 38). L'étude ultrastructurale montre alors que le nombre de bactéroïdes par symbiosome est souvent supérieur à 10 et que chaque symbiosome possède des zones de contact avec les symbiosomes adjacents (Pl. 13, figs. 39 et 40). Cette observation laisse à penser qu'au terme de la différenciation du tissu central, la fusion des symbiosomes pourrait conduire à la formation d'un réseau intracytoplasmique unique.

VI. Le nodule mature

Quatre semaines après l'inoculation, le nodule mature présente les caractères du nodule de type déterminé. Ces caractères se résument ainsi : (i) un stade de différenciation comparable pour toutes les cellules envahies, du tissu central (Pl. 13, fig. 37 et 38) ; (ii) un tissu central constituée de larges cellules envahies, de forme arrondie, et de cellules non envahies très vacuolisées riches en amyloplastés (Pl. 13, fig. 37 à 40) ; (iii) la présence de tissus périphériques entourant la région centrale de manière continue. Il est important de noter qu'à ce stade de maturation aucune zone méristématique résiduelle n'est observée et que les infections ne sont plus observées au niveau

PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES

PLANCHE 1

Figure 1. Nodules de forme sphérique sur les racines secondaires, 30 jours après l'inoculation. x 30.

Figure 2. Nodules multilobés ou coralloïdes prélevés, deux mois après l'inoculation. x 10.

Figure 3. Coupe transversale d'une racine secondaire non inoculée. Noter les importants espaces intercellulaires (EI) dans le tissu cortical et la position périphérique du noyau (flèche). L'épiderme (E) et le cylindre central (CC) délimitent le cortex. V = Vacuole. x 450.

Figure 4. Coupe transversale montrant l'induction de poils absorbants épidermiques (larges flèches) en réponse à l'inoculation avec la souche de *Bradyrhizobium* sp. ORS 188. Le noyau (petites flèches) et de nombreuses vacuoles (têtes de flèche) sont observés dans les poils absorbants en développement. x 750.

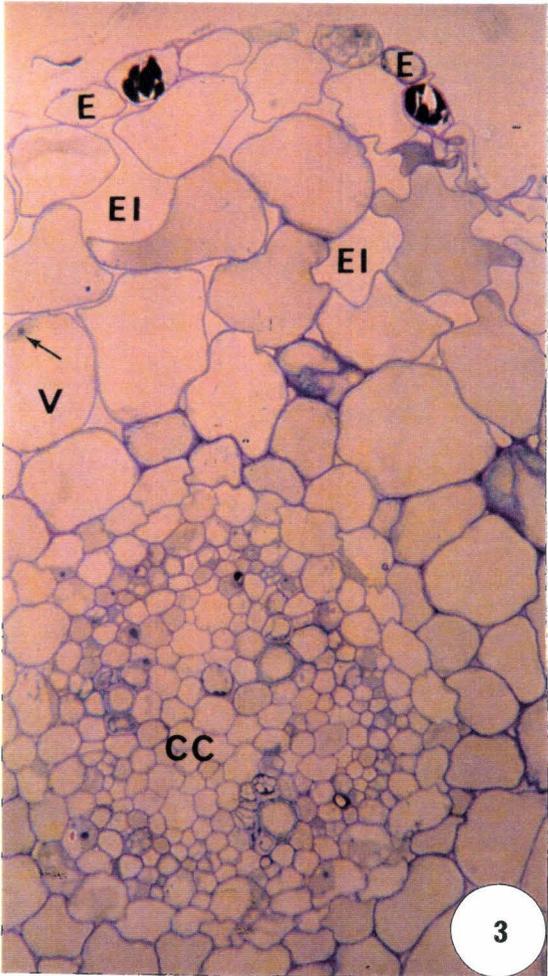
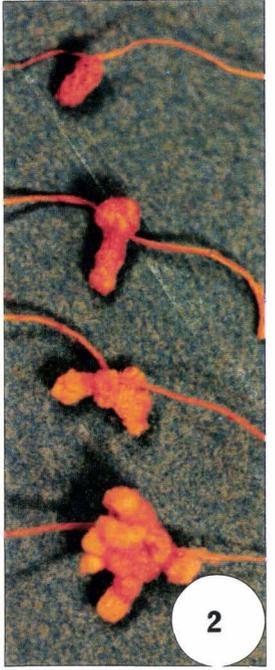


PLANCHE 2

Figure 5. Dédifférenciation des cellules du cortex racinaire 72 h après inoculation. Divisions cellulaires essentiellement anticlines (flèches) dans des assises corticales. Noter le renflement (têtes de flèche) d'une des cellules corticales externes. E = Cellule épidermique. Cex = Cortex externe. Cin = Cortex interne. x 480.

Figure 6. Vue générale montrant la dédifférenciation des cellules corticales dans un segment de racine, 4 jours après inoculation. Cex = Cortex externe. Cin = Cortex interne. Astérisques : Cellules corticales externes montrant une protubérance. x 260.

Figure 7. Poils absorbants dérivant d'une cellule épidermique (PA_1) ou d'une cellule du cortex externe (PA_2) dont la forme en carafe est caractéristique. E = Epiderme. x 320.

Figure 8. Dédifférenciation des cellules corticales et individualisation de foyers mitotiques dans le cortex (même section que fig. 7 observée selon un autre axe). Flèches = Divisions périclines. x 320.

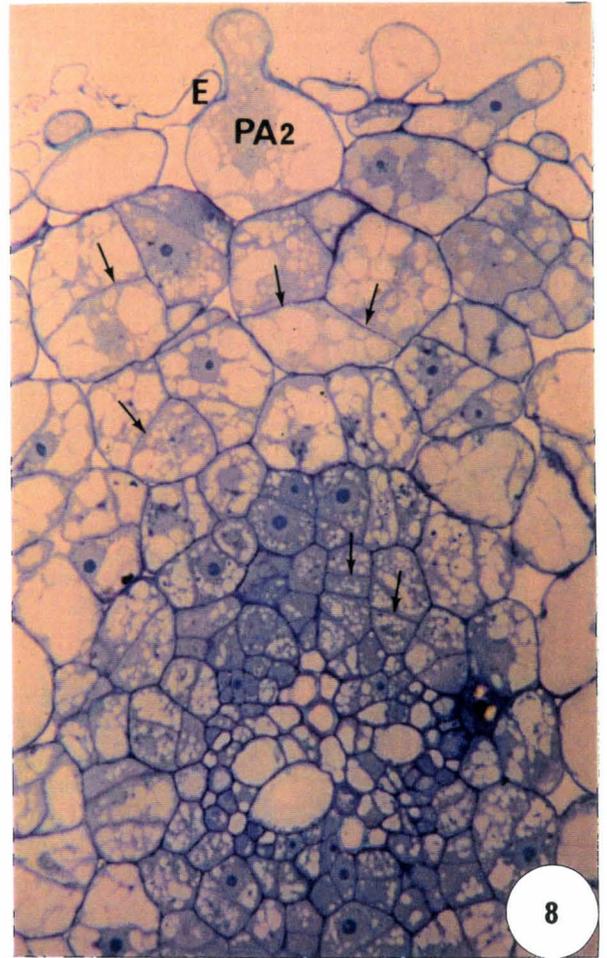
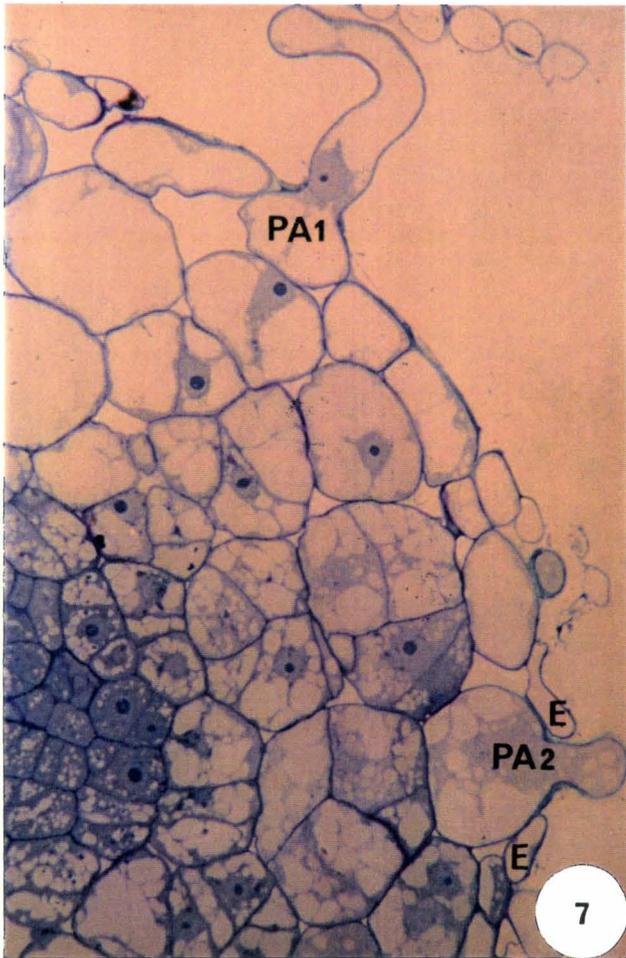
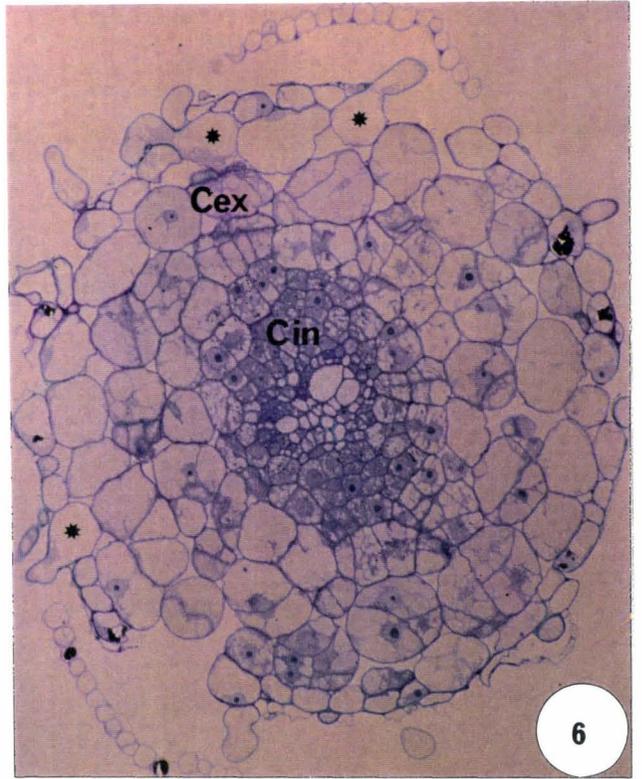
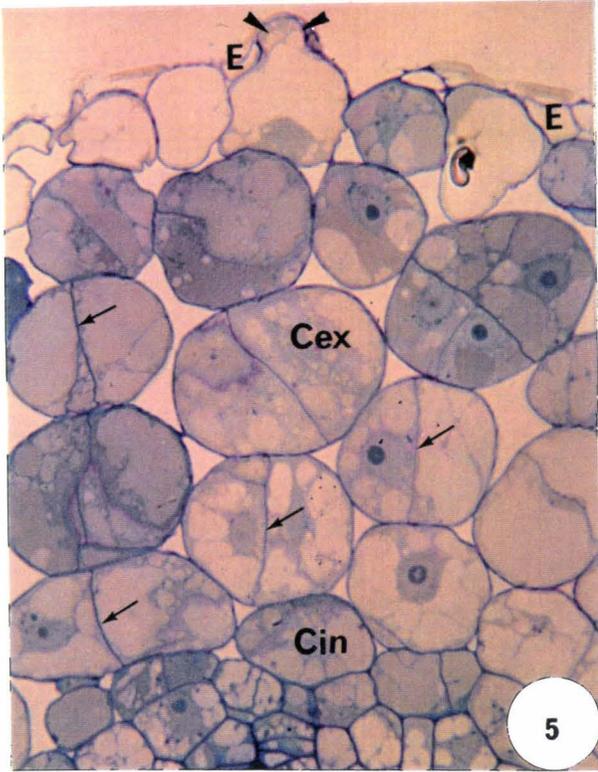


PLANCHE 3

Figure 9. Vue d'une racine secondaire présentant un renflement (R) 6 jours après inoculation. x 30.

Figure 10. Détail d'un renflement racinaire après éclaircissement à l'hypochlorite de sodium et coloration au bleu de méthylène. Noter les nombreux poils absorbants localisés sur le renflement. x 50.

Figure 11. Coupe transversale (80 μ m) dans la région renflée d'une racine secondaire. Vue montrant une structure d'infection (flèches) dans un poil de type non déterminé. Eclaircissement à l'hypochlorite de sodium et coloration au bleu de méthylène. x 500.

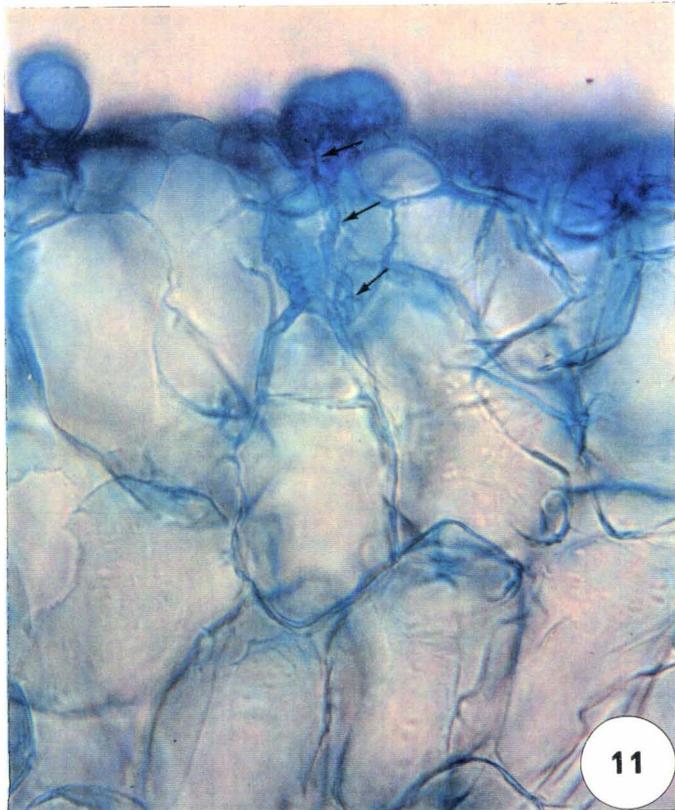
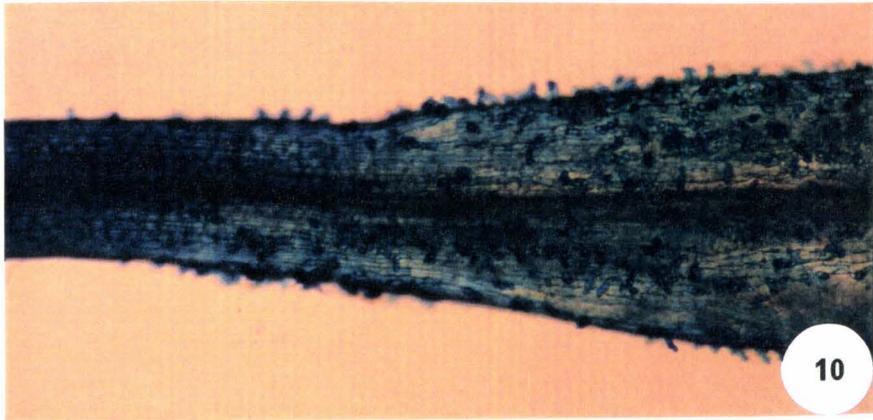
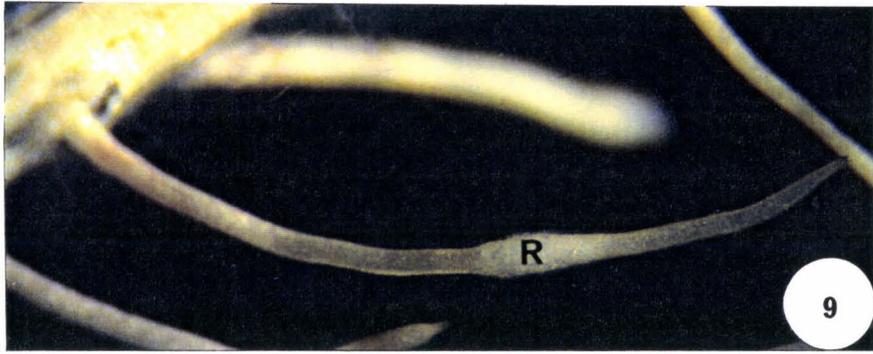


PLANCHE 4

Figures 12-13-14. Coupes transversales séries d'une ébauche nodulaire 10 jours après inoculation. Formation de cordons d'infection (têtes de flèches) au niveau de zones de contact (larges flèches) entre la protubérance d'une cellule corticale hypertrophiée et une cellule épidermique adjacente (E) (figs. 12-14). Des cellules méristématiques riches en cytoplasme sont observées dans la région sous-jacente à la cellule hypertrophiée. Des cellules très vacuolisées (V) contenant des amyloplastés (doubles têtes de flèche) et des cellules à tanins (T) apparaissent dans les tissus plus internes (fig. 14). Fig. 12, x 650 ; Fig. 13, x 650 ; Fig. 14, x 850.

Figure 15. Vue agrandie d'une cellule corticale hypertrophiée montrant des cordons d'infection (larges flèches) initiés au niveau de la protubérance. Noter que les traces d'infection cheminent jusqu'à la base du poil au niveau de tractus cytoplasmiques (têtes de flèches). Les petites flèches montrent les cordons d'infection ayant pénétré les cellules du méristème sous-jacent. x 810.

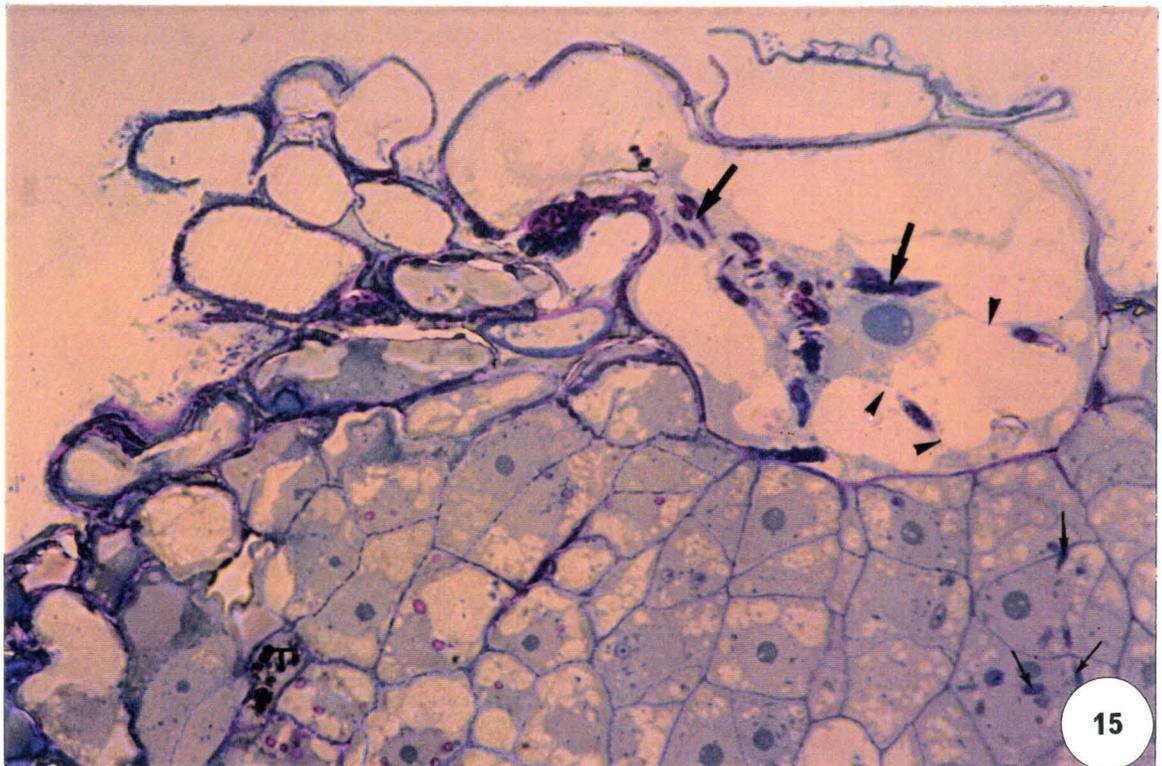
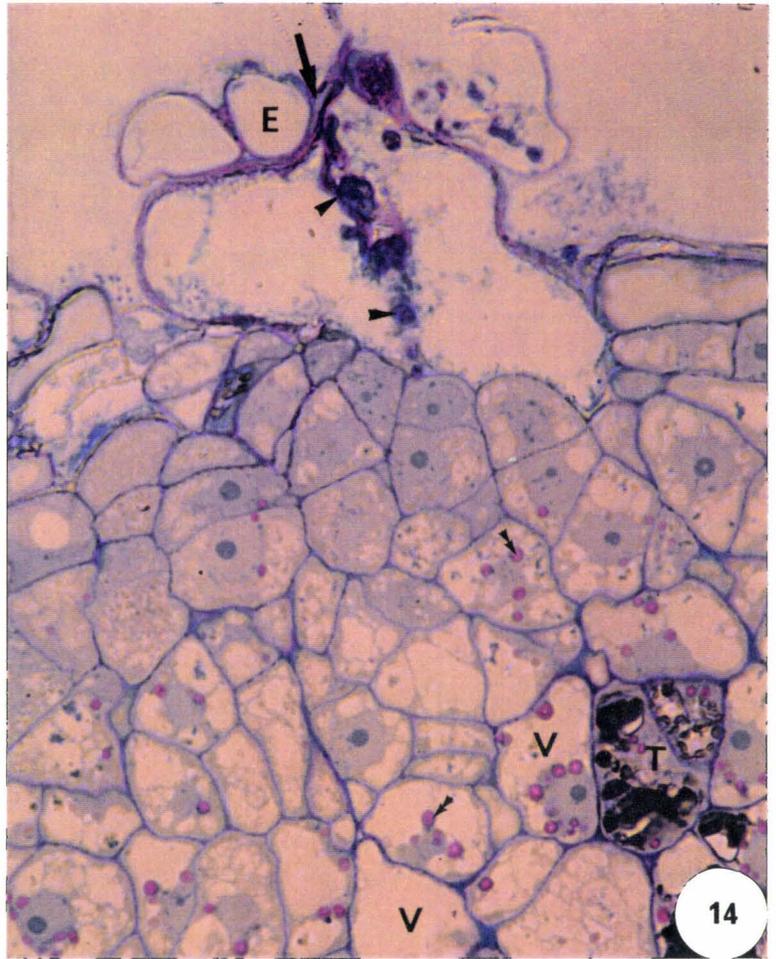
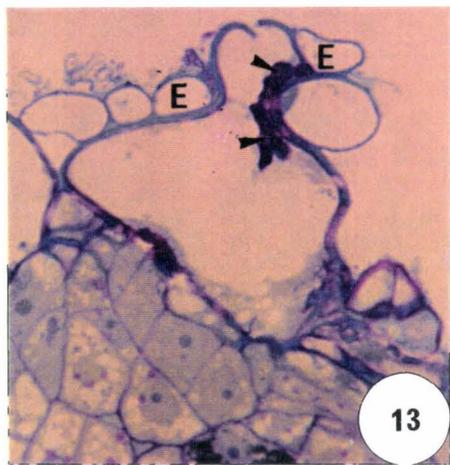
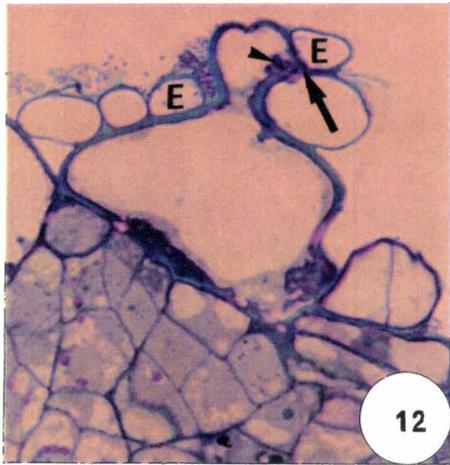


PLANCHE 5

Figure 16. Microscopie électronique à transmission (MET). Base d'une cellule hypertrophiée montrant de nombreuses sections de cordons d'infection (flèches). Les bactéries sont incluses dans une matrice entourée d'une paroi pecto-cellulosique. x 6000.

Figure 17. Vue générale montrant la différenciation des cellules conductrices (flèches) et des cellules à tanins (têtes de flèches). Noter l'alignement des cellules conductrices du cylindre central (CC) jusqu'à la zone méristématique. Astérisques = Cellules corticales infectées. x 300.

Figure 18. Cellule méristématique infectée montrant la présence de cordons d'infection intracellulaires (flèches). Une seule bactérie apparaît dans la lumière du cordon. Noter la variabilité de l'aspect ultrastructural de la paroi des cordons. Nu = Nucléole. x 9000.

Figure 19. Cordons d'infection (petites flèches) dans le cytoplasme d'une cellule méristématique. La chromatine est condensée (larges flèches). x 6500.

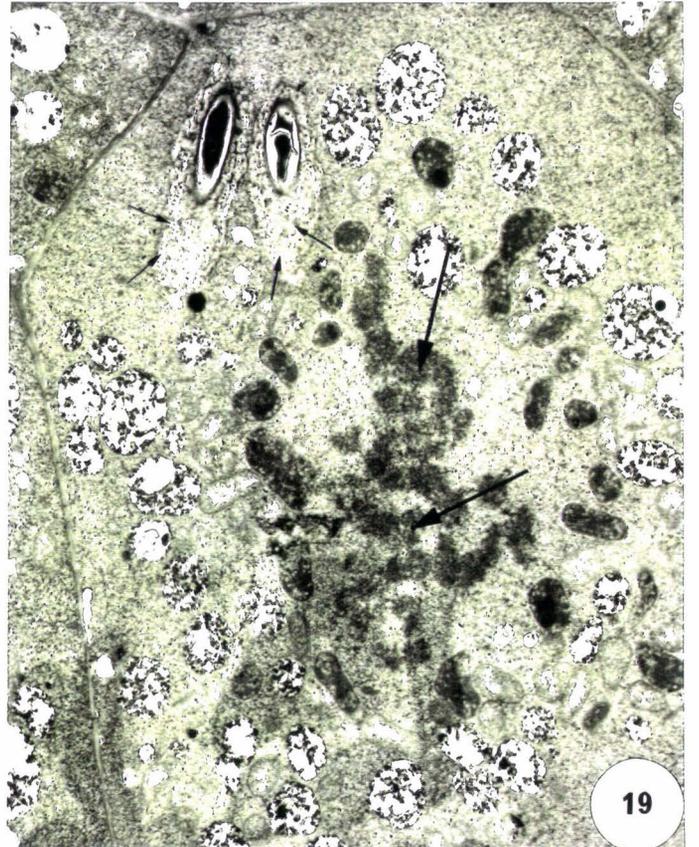
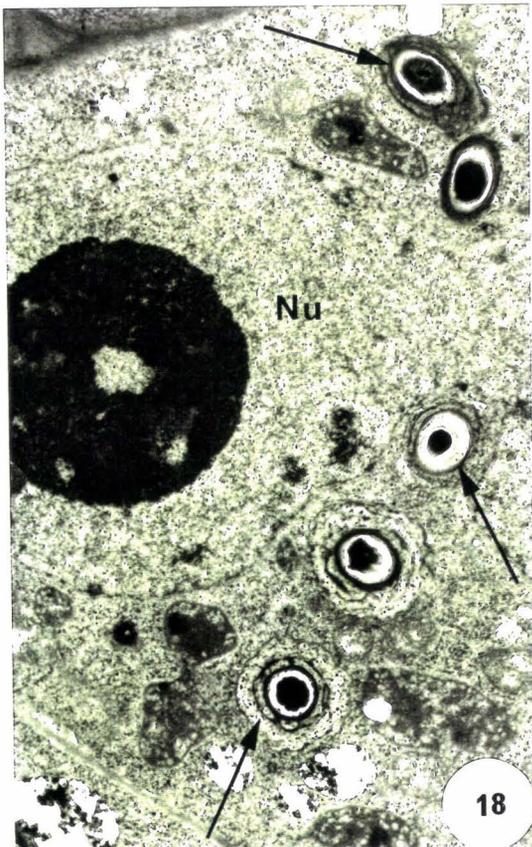
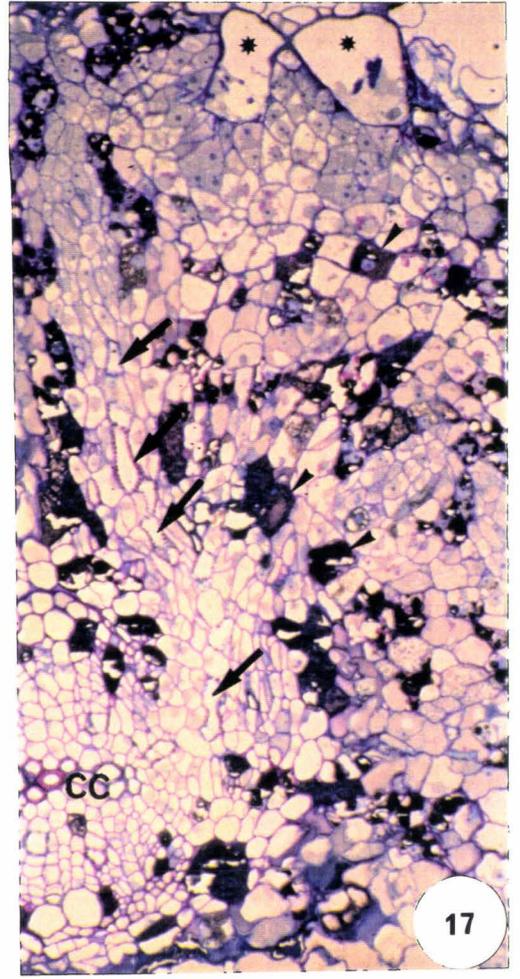
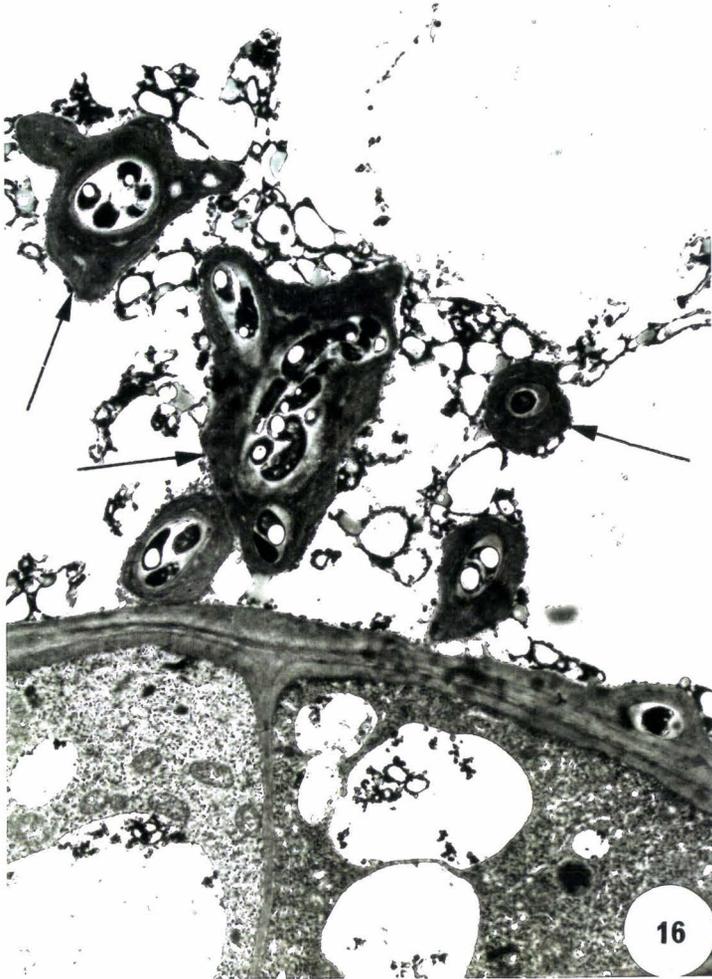


PLANCHE 6

Figure 20. Cellule infectée du méristème nodulaire montrant la digitation intercellulaire d'un cordon d'infection (larges flèches) qui émet des prolongements au sein du cytoplasme végétal. Les parois des cellules hôtes et du cordon d'infection (petites flèches) sont en continuité. V = Vacuole. Nu = Nucléole. x 8000.

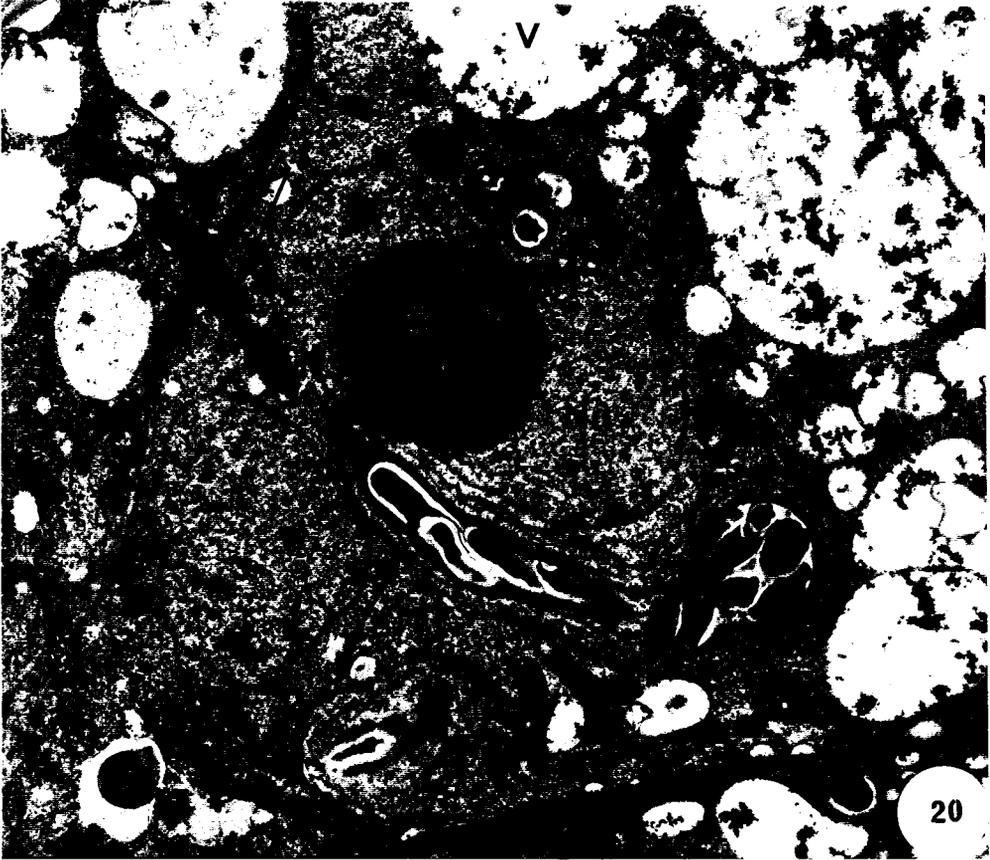


PLANCHE 7

Figure 21. Nodule émergeant à la surface racinaire, 14 jours après inoculation. x 75.

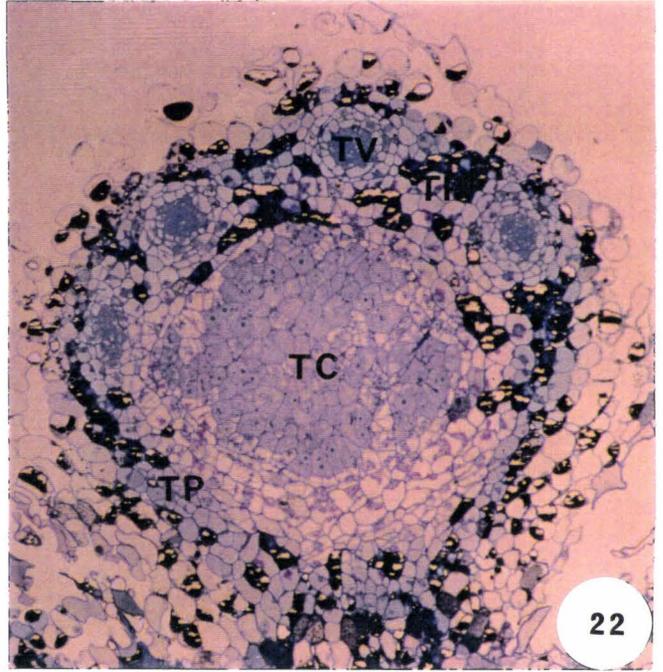
Figure 22. Coupe longitudinale d'un nodule (14 j) montrant le tissu central (TC) et les tissus périphériques (TP). Des traces vasculaires (TV) en section transversale sont observées dans un tissu périphérique riche en tanins (flèches). x 120.

Figure 23. Vue générale d'un nodule bilobé âgé de 14 jours. Les 2 lobes sont séparés par des cellules à tanins et des cellules très vacuolisées. Plusieurs traces vasculaires (TV) entourées de parenchyme sont reliées aux vaisseaux conducteurs racinaires (VCR). x 120.

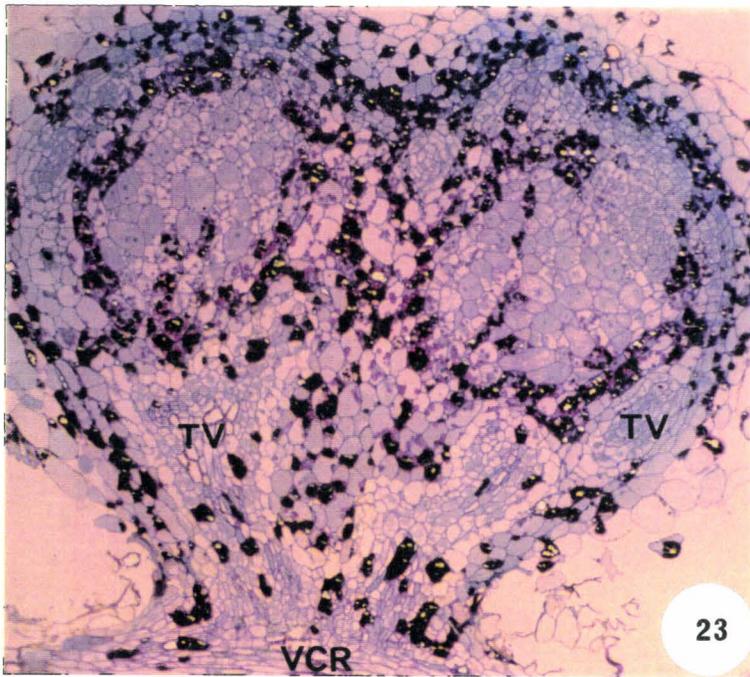
Figure 24. Agrandissement du lobe nodulaire droit de la figure 23. Gradient de différenciation disto-proximale des cellules du tissu central. Les cellules méristématiques distales (petites flèches) sont de plus petite taille que les cellules proximales différenciées (larges flèches). Noter la présence, dans la région proximale, de petites cellules non envahies riches en amyloplastés. x 230.



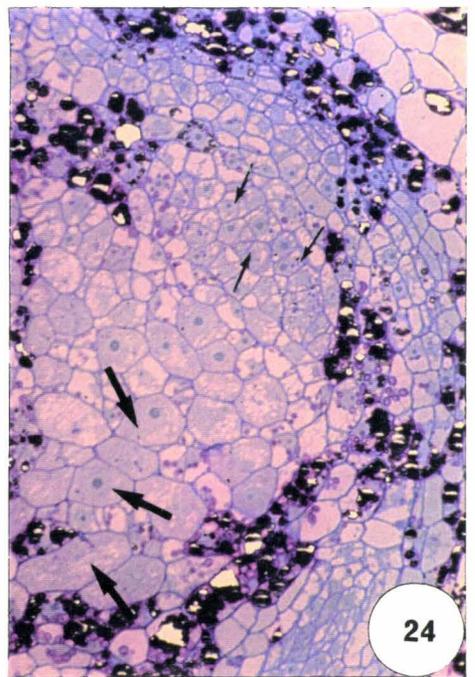
21



22



23



24

PLANCHE 8

Figure 25. Section longitudinale d'un cordon d'infection (larges flèches) au niveau du méristème. Plusieurs sections de cordons d'infection (petites flèches) et de nombreux proplastes (têtes de flèches) sont observés. N = Noyau. V = Vacuoles. x 6200.

Figure 26. Ultrastructure d'une digitation infectieuse intracellulaire montrant la continuité des parois de la cellule hôte (larges flèches) et du cordon d'infection. Les petites flèches localisent le plasmalemme à la périphérie du cordon d'infection. Les bactéries sont observées dans la matrice du cordon (têtes de flèches). x 18000.

Figure 27. Aspect irrégulier des profils de cordons d'infection intracellulaires (larges flèches). La paroi pecto-cellulosique (petites flèches) et le plasmalemme (têtes de flèches) des cordons sont observés. x 24400.

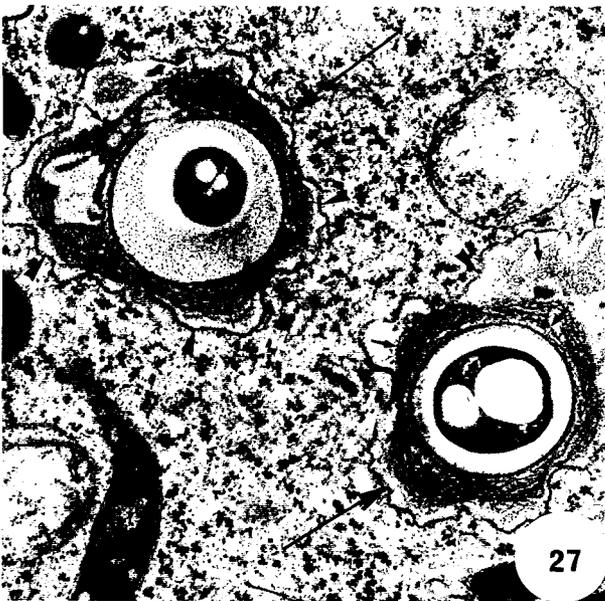


PLANCHE 9

Figure 28. Cordon d'infection présentant deux zones de désorganisation du matériel pariétal (flèches). M = Matrice. x 19400.

Figure 29. Fusion de vésicules à la membrane plasmalemmique limitant un cordon d'infection (flèches). Noter la désorganisation du matériel pariétal tout au long de la section du filament infectieux et la présence de matériel fibrillaire diffus dans les vésicules. x 11500.

Figure 30. Cordon d'infection dont la paroi se désorganise à une de ses extrémités (flèches). De nombreuses vésicules (Ve) chargées en matériel fibrillaire sont observées dans le cytoplasme de la cellule hôte. x 6400.

Figure 31. Agrandissement de la figure 30. Libération par endocytose d'une bactérie (petite flèche). Noter l'absence de paroi pecto-cellulosique au point de libération (large flèche). x 11600.

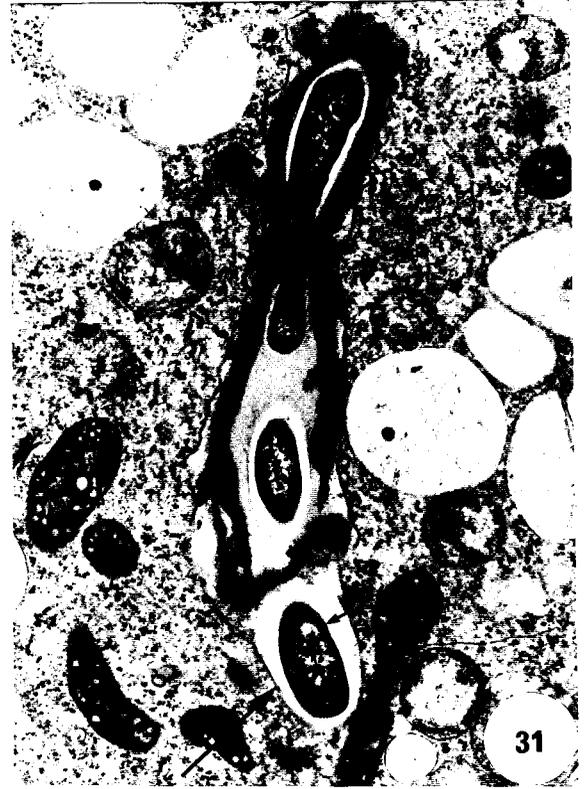
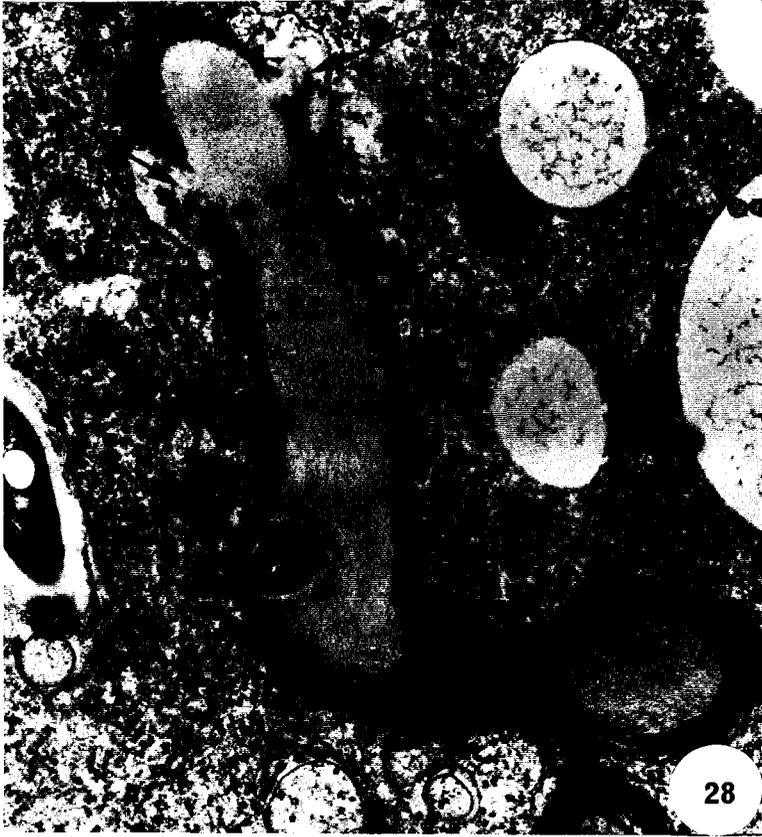


PLANCHE 10

Figure 32. Fusion de vésicules cytoplasmiques à la membrane péribactéroïdienne présentant un profil irrégulier (flèches). Des contacts étroits entre sacs bactéroïdiens sont observés (têtes de flèche). x 11600.

Figure 33. Contacts entre symbiosomes (flèches). x 18400.

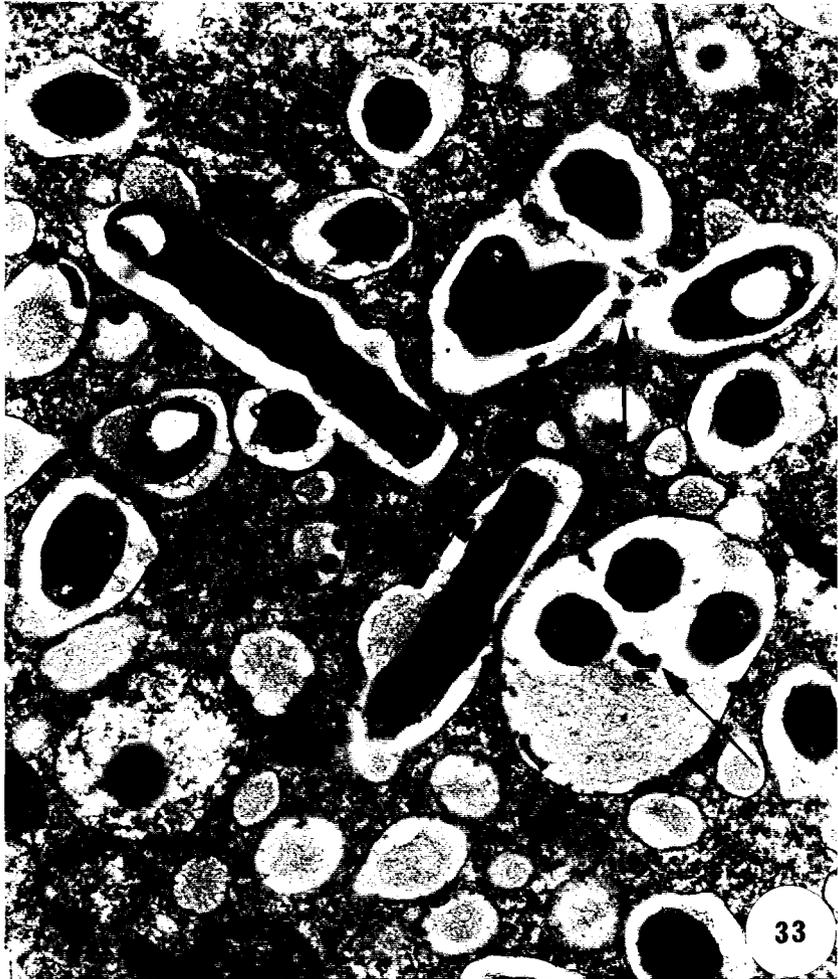
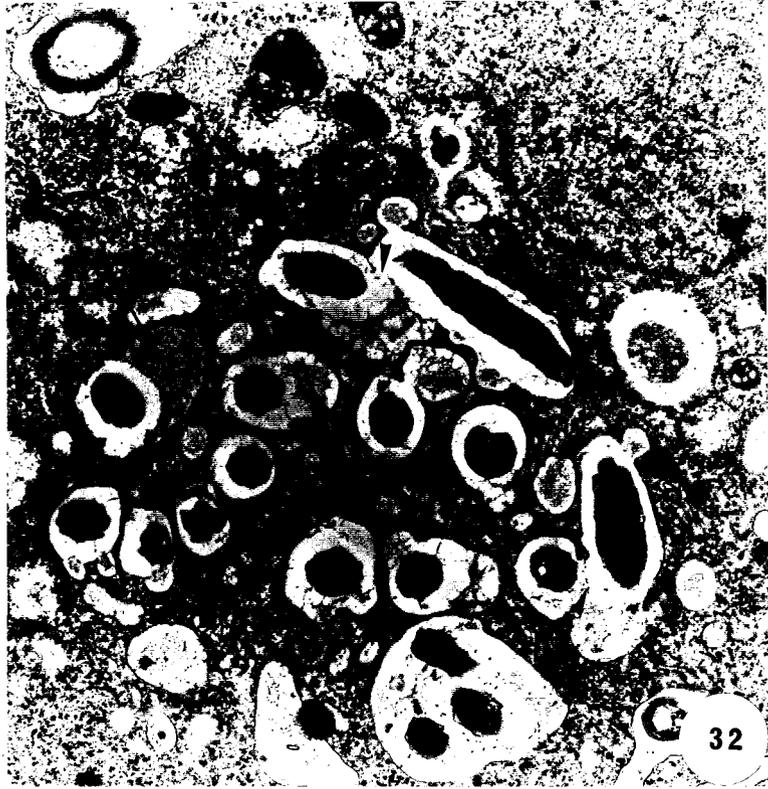


PLANCHE 11

Figure 34. Micrographie d'un symbiosome. Les inclusions de polyhydroxybutyrate (larges flèches) et de polyphosphate (petites flèches) sont visibles dans le cytoplasme du bactéroïde. Noter l'allongement du bactéroïde et le profil régulier de la membrane pér bactéroïdienne. x 28900.



PLANCHE 12

Figure 35. Vue générale d'une cellule envahie montrant l'accroissement du nombre de bactéroïdes par symbiosome. Noter la division exclusive de bactéroïdes dans deux sacs bactéroïdiens (flèches). x 3700.

Figure 36. Cellule différenciée du tissu proximal montrant des bactéroïdes en grand nombre par symbiosomes. Noter la fusion de plusieurs symbiosomes entre eux (flèches). x 6400.

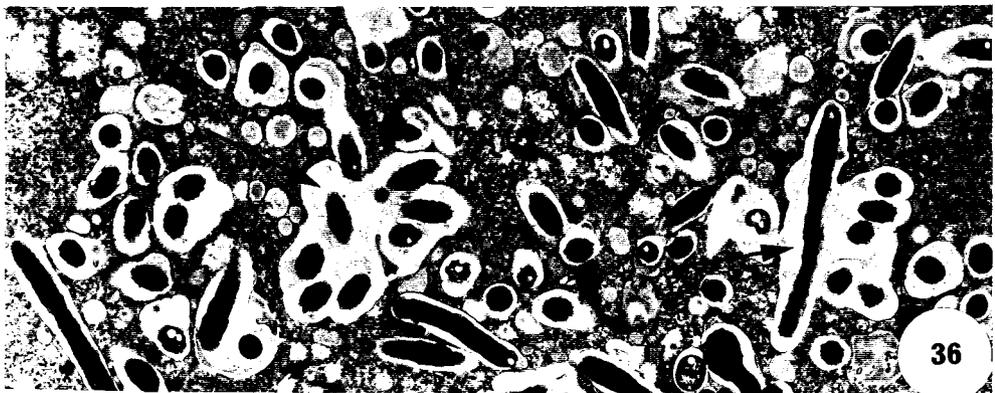
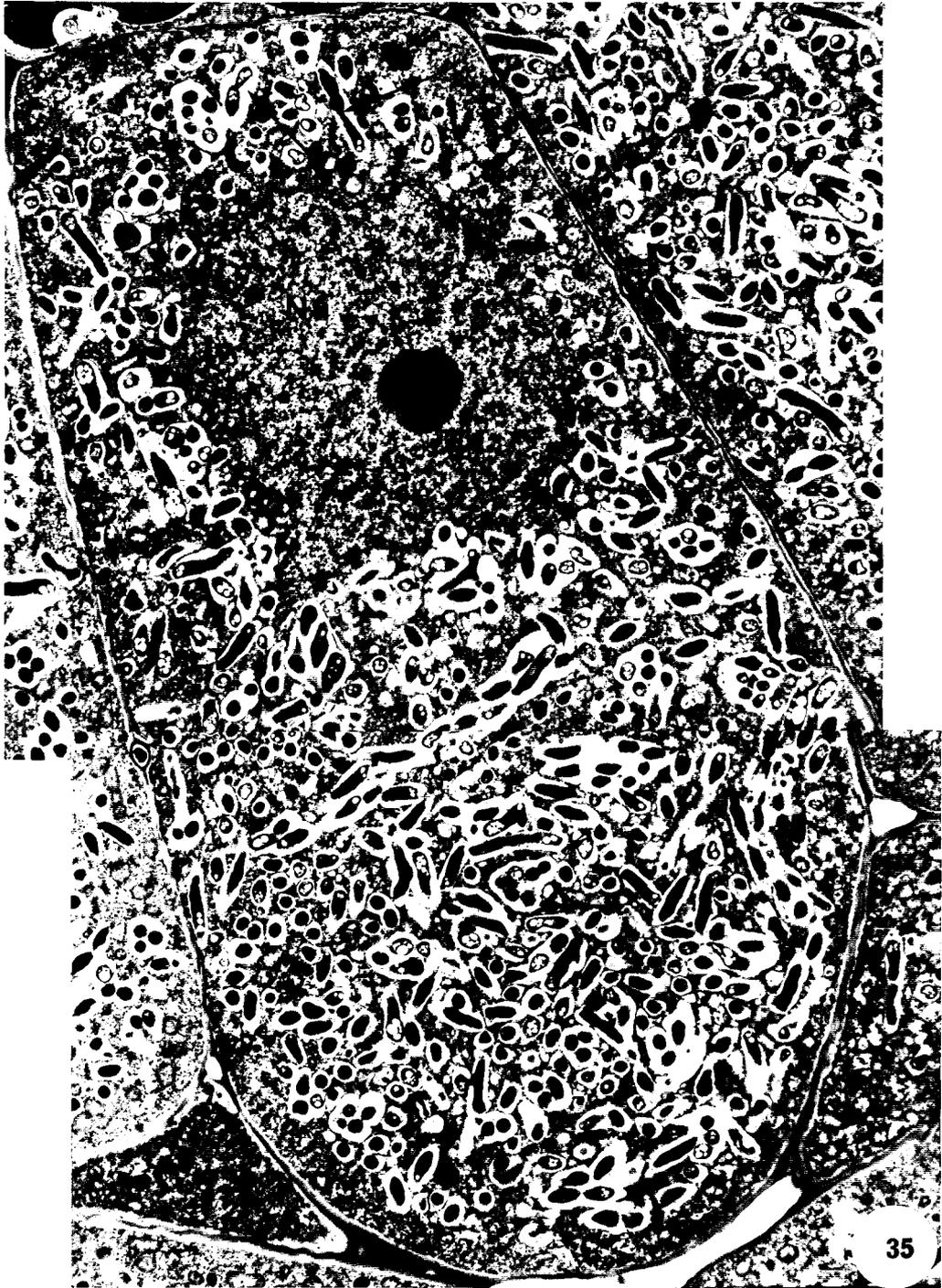


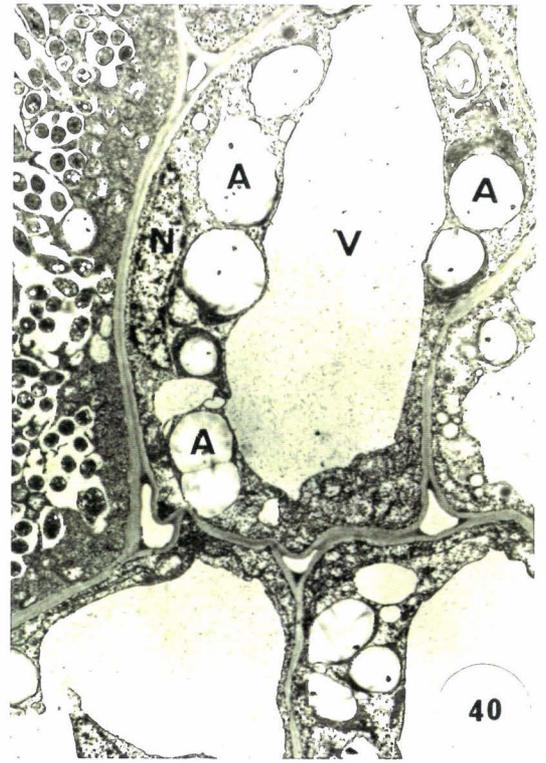
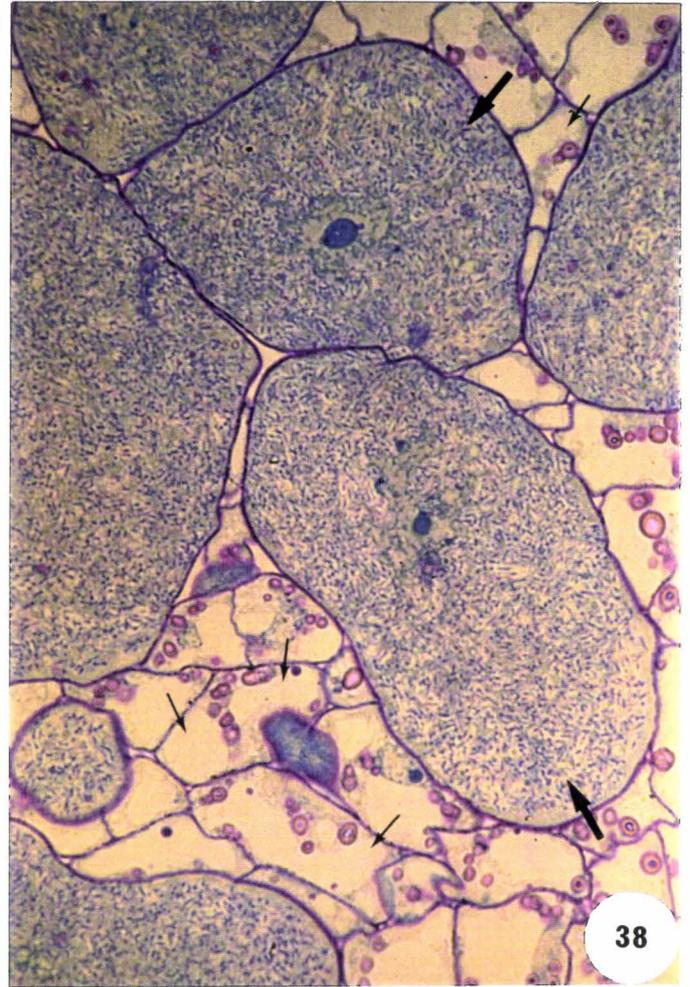
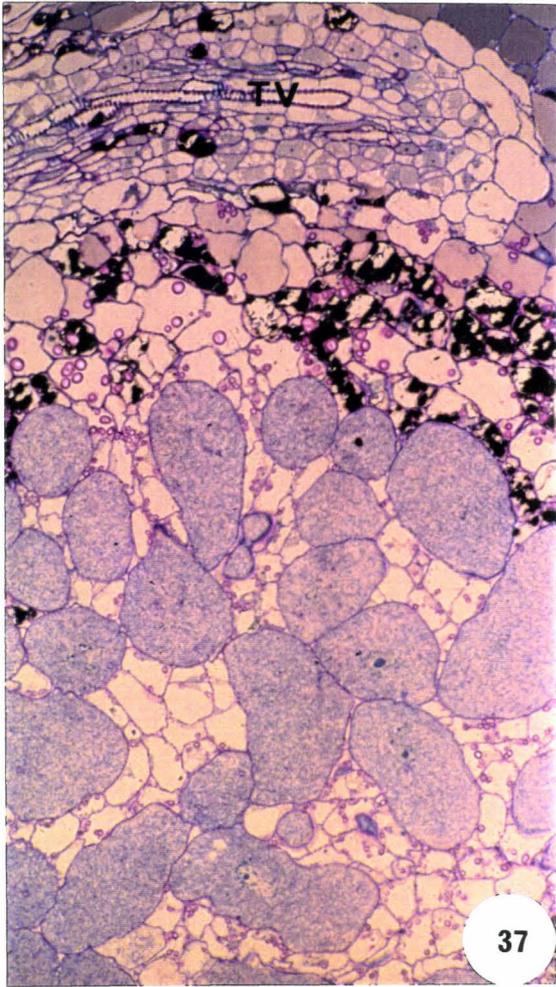
PLANCHE 13

Figure 37. Coupe longitudinale d'un nodule âgé de 30 jours . Les cellules envahies de la région centrale sont toutes dans le même état de différenciation. TV = Trace Vasculaire. x 250.

Figure 38. Vue générale de la région centrale du nodule. Cellules envahies, de forme arrondie (larges flèches), et cellules non envahies de forme irrégulière (petites flèches). x 470.

Figure 39. Détail d'une cellule envahie. Noter le nombre élevé de bactéroïdes par symbiosomes et les nombreux points de contacts entre symbiosomes (flèches). N = Noyau. x 4800.

Figure 40. Détail d'une cellule non envahie. Une large vacuole (V), de nombreux amyloplastés (A) et le noyau (N) accolé à la paroi cellulaire sont visibles. x 3700.



DISCUSSION

Induction du phénotype Hai

L'étude que nous avons faite a permis de décrire les différentes étapes de l'infection et du développement des nodules d'*Acacia albida*. L'apparition de nombreux poils absorbants d'origine épidermique (phénotype Hai, pour "Hair induction") quelques heures après l'inoculation, est la première réaction microscopiquement observable de l'interaction symbiotique *Acacia albida* - *Bradyrhizobium* sp. ORS 188. Le phénotype Hai est un phénomène qui a déjà été décrit en particulier chez la vesce (*Vicia sativa* spp. *nigra*) (Zaat *et al.*, 1987 ; Faucher *et al.*, 1988). En culture liquide, la racine de vesce non inoculée est pauvrement piliée. Cependant, l'inoculation d'une souche homologue de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* se traduit par une augmentation du nombre et de la longueur des poils absorbants épidermiques sur toute la surface de la racine. Chez *Acacia albida*, les poils apparaissent également après l'inoculation par *Bradyrhizobium* sp. ORS 188. Toutefois, contrairement à la vesce, les poils ne sont pas répartis uniformément sur toute la racine mais sont regroupés pour constituer de véritables régions piliées situées entre le point d'émergence et la zone d'élongation de la racine secondaire. A notre connaissance, ce type particulier de piliation n'avait pas encore été observé chez d'autres légumineuses.

Des études ont montré qu'un facteur symbiotique, présent dans le surnageant stérile d'une culture de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* induite par un flavonoïde approprié, provoquait un raccourcissement et un épaississement des racines de vesce (phénotype Tsr, pour Thick and short roots) mais aussi induisait la croissance (Hai) et la déformation (phénotype Had, pour "Hair deformation") des poils absorbants (van Brussel *et al.*, 1986 ; Zaat *et al.*, 1987). Les phénotypes Hai et Had sont aussi observés chez la luzerne se développant en présence du surnageant de culture d'une souche de *Rhizobium meliloti* induite par la lutéoline (Faucher *et al.*, 1988). Les phénotypes Hai et Had sont également spécifiquement induits sur *Vicia sativa* spp. *nigra* par le surnageant de souches de *Rhizobium meliloti* dont certains gènes de spécificité d'hôte comme *nodPQ* et *nodH* ont été mutés (Faucher *et al.*, 1988). Les facteurs symbiotiques, d'origine bactérienne, impliqués dans les réponses biologiques décrites ci-dessus ont été identifiés. La structure de ces facteurs, appelés facteurs Nod, est déterminée par les gènes bactériens de nodulation, les gènes *nod*, en présence de flavonoïdes (Lerouge *et al.*, 1990 ; Roche *et al.*, 1991). Ce sont des molécules de nature lipo-oligosaccharidique constituées de résidus N-acétyl D-glucosamine diversement substitués. Ces

substitutions qui varient selon la souche bactérienne productrice, confèrent aux facteurs Nod une spécificité vis à vis de certaines plantes hôtes.

Les propriétés biologiques des facteurs Nod ont été étudiées dans différents modèles d'association symbiotique. De manière remarquable, tous les facteurs étudiés sont capables d'induire les phénotypes Hai, Had et Tsr (Lerouge *et al.*, 1990 ; Spaink *et al.*, 1991 ; Schültze *et al.*, 1992 ; Mergaert *et al.*, 1993), l'induction à distance de divisions cellulaires (Truchet *et al.*, 1991 ; Mergaert *et al.*, 1993 ; Sanjuan *et al.*, 1992) et dans le cas de la luzerne, la formation de véritables nodules (Truchet *et al.*, 1991). Enfin, des travaux récents ont montré qu'un facteur Nod, NodR1v-IV(Ac,C18:4), produit par *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* symbiote homologue de la vesce, induit le bourgeonnement des cellules du cortex racinaire externe et la formation de structures préinfectieuses (phénotype Pit, "Pre infection thread") chez la vesce (van Brussel *et al.*, 1992).

Il est intéressant de constater que la plupart des phénotypes induits par les facteurs Nod de plusieurs genres bactériens symbiotiques de légumineuses, sont également induits de manière précoce au cours de l'interaction *Acacia albida* - *Bradyrhizobium* sp. : (i) le développement de poils absorbants d'origine épidermique (phénotype Hai) ; (ii) l'induction de divisions au niveau des cellules corticales (phénotype Noi) ; (iii) le développement à partir des cellules corticales externes de digitations dont l'aspect morphologique et le mode de croissance centrifuge sont en tous points comparables à ceux des poils absorbants d'origine épidermique et (iv) enfin, la formation de ponts cytoplasmiques au niveau des cellules corticales de la plante (phénotype Pit). Sur la base de ces résultats, il paraît raisonnable de faire l'hypothèse selon laquelle les phénotypes que nous avons décrits chez *Acacia albida* sont également induits par des facteurs Nod diffusibles produits par la souche homologue. En effet, il a été montré que *Bradyrhizobium* produit également des facteurs Nod, dont la nature, lipo-oligosaccharidique, et les activités biologiques sont semblables à celles décrites chez les genres *Rhizobium* et *Azorhizobium* (Sanjuan *et al.*, 1992). Il serait intéressant d'étendre ces recherches aux souches de *Bradyrhizobium* spécifiques d'*Acacia albida* et de vérifier que les facteurs Nod produits par ces souches peuvent induire les mêmes phénotypes que les bactéries elles-mêmes.

Induction du méristème nodulaire

Nos observations ont montré que, simultanément à l'induction des poils absorbants d'origines épidermique et corticale, toutes les cellules corticales localisées dans l'axe radial d'une cellule corticale digitée sont le site d'une

activité métabolique importante caractérisée par l'augmentation du volume nucléaire, la migration du noyau au centre des cellules du cortex, la formation de ponts cytoplasmiques, et un morcellement vacuolaire. Toutefois, la dédifférenciation complète des cellules corticales en cellules méristématiques originelles n'affecte que les cellules du cortex racinaire interne. Ainsi chez *A. albida* comme chez le pois (Libbenga et Harkes, 1973 ; Truchet, 1978 ; Newcomb *et al.*, 1979) ou la luzerne (Truchet *et al.*, 1980 ; Truchet *et al.*, 1991), et de façon générale chez la plupart des légumineuses tempérées, les cellules du cortex racinaire interne sont les cellules cibles dans l'étape d'induction nodulaire. En revanche, les nodules sont initiés à partir des cellules du cortex externe chez les légumineuses tropicales comme le soja (Newcomb *et al.*, 1979 ; Turgeon et Bauer, 1982), ou l'arachide (Allen et Allen, 1940 ; Chandler, 1978).

Chez *Acacia albida*, l'activité mitotique corticale est initiée en absence de toute infection visible. Il en est de même chez le soja, le pois ou la luzerne, où l'induction du méristème se produit avant la déformation des poils absorbants et la formation des cordons d'infections (Dudley *et al.*, 1987 ; Guinel et Larue, 1991). Ainsi, nos résultats confortent l'hypothèse selon laquelle un facteur diffusible bactérien serait responsable de la dédifférenciation des cellules corticales de la plante hôte et de l'induction du méristème nodulaire originel (Truchet *et al.*, 1980). Cette hypothèse a été récemment confirmée par les travaux montrant que les facteurs Nod de plusieurs espèces de *Rhizobium* pouvaient non seulement induire la division des cellules corticales de la plante hôte (Truchet *et al.*, 1991 ; Spaink *et al.*, 1991, Mergaert *et al.*, 1993) mais aussi, dans le cas de la luzerne, la formation de véritables nodules (Truchet *et al.*, 1991). Ce dernier résultat montre que les facteurs Nod agissent en véritables molécules signal, capables de déclencher un programme de développement nodulaire sur la plante hôte.

En conclusion, il apparaît que la nodulation d'*Acacia albida* par *Bradyrhizobium* sp. découle de la même cascade d'inductions que celle décrite dans d'autres interactions symbiotiques. Il existe, en particulier, une similitude frappante dans le déroulement des étapes précoces observées lors de la nodulation de légumineuses aussi éloignées phylogénétiquement que le sont *Acacia albida* (notre étude) et la luzerne (Truchet *et al.*, 1980 et 1991). Une telle similitude suggère que des mécanismes équivalents contrôlent le déroulement des étapes initiales des développements nodulaires quel que soit le modèle symbiotique étudié. A ce jour, les premiers travaux sur les bases moléculaires de la symbiose ont été réalisés chez la luzerne et chez la vesce (Lerouge *et al.*, 1990 ; Roche *et al.*, 1991^{a et b}, Truchet *et al.*, 1991 ; Spaink *et al.*, 1991). Ces travaux ont mis en évidence le rôle de molécules signal, dont

les facteurs Nod, dans le contrôle des processus organogénétiques nodulaires (Roche *et al.*, 1991, Truchet *et al.*, 1991^b ; Spaink *et al.*, 1991).

Infection corticale

Chez les légumineuses tempérées comme le pois, la vesce ou la luzerne (Truchet, 1976 ; Vasse et Truchet, 1984 ; Kijne, 1990), l'infection se produit au niveau des poils absorbants épidermiques recourbés en forme de crosse de berger ("Shepherd's crook" ; phénotype Hac) (Yao et Vincent, 1969). L'infection est initiée au centre de la courbure au niveau d'un point réfringent où sont concentrées les bactéries. Ce mode d'infection a également été décrit chez les légumineuses tropicales comme *Vigna unguiculata* (Pueppke, 1983), le soja (Bauer, 1981 ; Turgeon et Bauer, 1982 et 1985 ; Calvert *et al.*, 1984) et quelques légumineuses ligneuses tropicales comme *Leucaena leucocephala* et *Acacia senegal* (Chen et Rolfe, 1988 ; Badji, 1991). Turgeon et Bauer (1982) ont montré chez le soja que tout contact pariétal dû à la déformation d'un poil épidermique peut créer une poche où les bactéries sont piégées et à partir de laquelle le cordon d'infection est initié. Les auteurs pensent qu'une poche peut aussi se former aux points de contact entre la paroi d'un poil absorbant en développement et celle d'une cellule épidermique adjacente (Turgeon et Bauer, 1985). Un tel mécanisme rappelle le mode d'infection intercellulaire commun aux légumineuses tropicales (Chandler, 1978 ; Chandler *et al.*, 1982 ; de Faria *et al.*, 1988 ; James *et al.*, 1992 ; Ndoye *et al.*, en préparation).

Chez *Acacia albida*, nous avons décrit deux types de poils absorbants selon leur origine, épidermique ou corticale. L'observation de racines entières n'a pas fourni d'indice laissant penser que l'infection pouvait se dérouler au sommet d'un poil absorbant individuel, comme c'est le cas chez les légumineuses tempérées (voir plus haut). En revanche l'observation de cordons d'infection se développant à partir de poches de séquestration formées aux points de contact entre des cellules localisées à la périphérie racinaire, permet de conclure à un mécanisme intercellulaire d'infection, rappelant celui décrit chez le soja (Turgeon et Bauer, 1985).

De manière intéressante, nous avons observé que des filaments d'infection prennent naissance au niveau de cavité jouxtant la protubérance des cellules corticales dilatées. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une infection sous la forme de cordons d'infection initiés dans une lignée cellulaire de surface autre que l'épiderme et se propageant de manière intracellulaire, est décrite. Ce mode d'infection, tout à fait original, est compatible avec le modèle présenté par van Brussel *et al.* (1992) montrant que des facteurs Nod de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* induisent une différenciation

particulière des cellules corticales externes chez la vesce et la formation de protubérances corticales pouvant être identifiées à des poils absorbants. Dans ce modèle toutefois, l'infection au niveau de telles protubérances avait été supposée mais non démontrée (van Brussel *et al.*, 1992).

Les cordons d'infection initiés au niveau des cellules corticales progressent vers la base du poil absorbant en empruntant les ponts cytoplasmiques. Les ponts cytoplasmiques, ont été décrits par van Brussel *et al.* (1992) dans les assises externes de cellules corticales de racine de vesce. Les auteurs ont montré que les ponts précèdent la formation du cordon d'infection et sont induits par un facteur Nod de *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae. Par ailleurs, ils ont formulé l'hypothèse selon laquelle les ponts pouvaient constituer une voie privilégiée pour la progression du cordon. C'est la raison pour laquelle l'appellation de "pre-infection thread structure" (Pit), structure pré-infectieuse, lui a été donnée. Chez *Acacia albida*, les ponts cytoplasmiques ne sont pas orientés radialement comme chez la vesce ou le pois. Ils rayonnent à travers une large vacuole à partir du centre de la cellule où se trouve le noyau. Le fait que des "structures pré-infectieuses" sont observées dans des cellules corticales, à un stade précédant l'infection est en faveur d'une induction à distance de telles structures. Quoiqu'il en soit, nos observations confortent l'hypothèse de travail de van Brussel *et al.* (1992) en démontrant que les ponts cytoplasmiques représentent bien des voies de migration que l'infection ultérieure pourra éventuellement emprunter.

Après avoir atteint la base du poil hypertrophié, les cordons d'infection pénètrent et progressent dans le méristème nodulaire sous-jacent sous la forme de prolongements intra-cellulaires. Ultrastructuralement, les cordons d'infection dans les nodules d'*Acacia albida* sont identiques à ceux décrits chez d'autres légumineuses (Newcomb *et al.*, 1979 ; Turgeon et Bauer, 1985) : les bactéries sont incluses dans un mucilage dense aux électrons qui est séparé du cytoplasme hôte par une paroi pectocellulosique et le plasmalemma de la cellule hôte.

Développement nodulaire

1. Différenciation des tissus périphériques

Les cellules méristématiques latérales se différencient pour former les tissus périphériques. Comme chez le soja (Newcomb *et al.*, 1979 ; Newcomb, 1981), des divisions cellulaires anticlines donnent naissance soit à des traces vasculaires, soit à un tissu parenchymateux qui entoure les tissus conducteurs. Les cellules riches en tanins constituent le type cellulaire le plus répandu des

tissus périphériques. Des cellules riches en tanins ont été observées en particulier dans les nodules d'*Aeschynomene* sp. où elles entourent le méristème nodulaire (Alazard, 1991). Elles pourraient jouer le rôle de barrière dans la diffusion de l'oxygène. Les nombreuses assises de cellules à tanins permettraient en effet de maintenir une pression en oxygène suffisamment faible pour permettre le fonctionnement de la nitrogénase dans le tissu fixateur central (Nap et Bisseling, 1990).

2. Différenciation du tissu central

2.1. Libération des bactéries

La libération des bactéries dans les cellules du tissu central des nodules d'*Acacia albida* débute par une désorganisation de la paroi des cordons et s'achève par endocytose. Ce mode semble identique à celui décrit chez de nombreuses légumineuses tempérées (Kijne, 1975 ; Newcomb, 1976, Robertson *et al.*, 1978 ; Kijne, 1990) et chez le soja (Basset *et al.*, 1977 ; Newcomb et McIntyre, 1981 ; Roth et Stacey, 1989).

D'après Verma *et al.* (1978), la dégradation de la paroi des cordons d'infection impliquerait la production d'enzymes pecto-cellulolytiques à la fois par les cellules hôtes et par les bactéries prisonnières dans les cordons. Les bactéries, libérées dans le cytoplasme hôte, sont appelées bactéroïdes.

Chez le soja (Basset *et al.*, 1977 ; Newcomb et McIntyre, 1980 ; Roth et Stacey, 1989), de nombreuses vésicules contenant du matériel fibrillaire diffus sont observées au niveau de la paroi du cordon d'infection ou de la membrane pér bactéroïdienne. Deux théories s'opposent quant à l'origine de ces vésicules. Pour Basset *et al.* (1977) et Roth et Stacey (1989), l'endocytose des bactéries dans le cytoplasme hôte serait accompagné par l'endocytose du matériel fibrillaire de la paroi désagrégée. Les vésicules de matériel pecto-cellulosiques ainsi formées seraient ensuite soit incorporées à des vacuoles de digestion, soit fusionnées aux membranes pér bactéroïdiennes. En revanche, pour Newcomb et McIntyre (1981), le matériel fibrillaire, contenu dans les vésicules, serait incorporé à la paroi du cordon d'infection et contribuerait à son élongation. Une observation attentive des micrographies de cellules envahies d'*Acacia albida* montrant la fusion de vésicules chargées de matériel fibrillaire soit à la membrane pér bactéroïdienne soit à l'extrémité d'une digitation infectieuse, laisse penser que les deux mécanismes peuvent coexister. Toutefois, il faut souligner que le nombre de ces vésicules est particulièrement important au moment de la libération bactérienne et de la maturation des symbiosomes. Cette observation suggère que la plante pourrait contrôler la différenciation des bactéroïdes qu'elle maintient dans un espace clos, constamment séparé du

cytoplasme de la cellule hôte. Le fait que les vésicules ne sont plus observées au terme de la différenciation des bactéroïdes est en faveur de l'hypothèse énoncée ci-dessus. Enfin, des travaux récents (Vasse, de Billy et Truchet, sous presse), ont montré que l'abortion des filaments infectieux chez la luzerne, s'accompagnait au niveau ultrastructural de l'incorporation de vésicules cytoplasmiques, chargées d'un matériel fibrillaire, à la paroi du filament. Il s'agit là d'un mécanisme de défense stricte. Ainsi, l'accumulation et l'intégration de vésicules à l'extrémité de certains cordons d'infection pourrait rendre compte de mécanismes de défense équivalents mis en place au sein même des nodules d'*Acacia albida*.

2.2. Multiplication des bactéroïdes

Après la libération des bactéries des cordons d'infection, on constate une augmentation à la fois du nombre de symbiosomes par cellules envahies et du nombre de bactéroïdes par symbiosome. Deux mécanismes peuvent être impliqués dans de telles variations. Dans le premier cas, l'étape de libération se poursuivrait pendant un temps assez long au cours de la différenciation du nodule pour générer un nombre important de symbiosomes renfermant un seul bactéroïde. Par la suite, la division exclusive du bactéroïde s'accompagnerait d'une augmentation du nombre de bradyrhizobia par symbiosome. Dans le deuxième cas, une étape de libération plus restreinte dans le temps aboutirait à un nombre réduit de symbiosomes. Dans ce cas, le scénario pourrait consister d'abord en une division de l'ensemble du symbiosome c'est à dire de l'unité structurale bactéroïde et membrane séquestrante, ce qui aboutirait à un nombre croissant de symbiosomes renfermant un seul bactéroïde, puis à la division exclusive des bactéroïdes conduisant à un nombre croissant de bradyrhizobia par sac bactéroïdien. Notons, qu'en règle générale, la division du symbiosome caractérise la plupart des légumineuses tempérées (Kijne, 1975 ; Vasse *et al.*, 1990) mais aussi de quelques légumineuses tropicales comme *Arachis hypogea* (Chandler, 1978) ou *Stylosanthes* sp. (Chandler *et al.*, 1982). En revanche, la division exclusive du microsymbionte est observée chez les légumineuses tropicales comme le soja (Bergersen et Briggs, 1958). Il est difficile de préciser quel mécanisme prévaut chez *Acacia albida*. Toutefois, l'observation de symbiosomes à un seul bactéroïde capable de se diviser unilatéralement, est en faveur du premier mécanisme. Quoiqu'il en soit, au terme de la différenciation, une réduction importante du nombre de symbiosomes par cellule apparaît clairement. Ce phénomène a pour cause la fusion entre symbiosomes observée tout au long de la différenciation du nodule et particulièrement dans les premiers moments qui suivent la libération. La fusion entre membranes pér bactéroïdiennes est un

phénomène communément observé dans les nodules de type déterminé (Newcomb et McIntyre, 1981). Dans le cas des nodules indéterminés, de tels fusions sont l'indice du début de la sénescence nodulaire (Kijne, 1975).

Enfin, nous n'avons pas relevé d'indice ultrastructural spécifique de la différenciation des bactéroïdes. Comme dans la très grande majorité des cas, celle-ci se traduit par un allongement du bactéroïde qui en section montre un profil très régulier.

2.3. Maturation du tissu central

Pendant les trois premières semaines qui suivent l'inoculation, on note qu'un gradient de différenciation se met en place selon un axe disto-proximal. A l'extrémité distale, on observe les cellules méristématiques, les plus jeunes, n'ayant pas amorcé leur différenciation tandis que les cellules les plus différenciées, largement envahies, sont observées en position proximale. Entre ces deux états cytologiques, des cellules montrant des caractères de différenciation intermédiaires sont observées. Les nodules radiculaires d'*Acacia albida* présentent donc pendant leur développement, les caractéristiques des nodules de type indéterminé. Toutefois, la différenciation progressive des cellules infectées conduit finalement à la mise en place d'un tissu central unique composé de cellules, larges et envahies et d'autres, petites et non infectées, caractéristiques des nodules de type déterminé. Les nodules d'*Acacia albida* offrent donc des caractères de développement caractéristiques des deux types de nodule. Ce type intermédiaire de développement est observé lors de l'ontogénèse des nodules radiculaires de *Sesbania rostrata* (Ndoye *et al.*, en préparation).

Histologiquement, trente jours après inoculation, les nodules d'*Acacia albida* sont identiques à ceux de nombreuses légumineuses tropicales comme *Arachis hypogea* et *Sesbania rostrata* (Chandler, 1978 ; Tsien *et al.*, 1983 ; Duhoux, 1984 ; Ndoye *et al.*, en préparation). Chez *A. albida*, les cellules non envahies montrent de nombreux amyloplastes accolés à la membrane cellulaire. Selon Newcomb *et al.* (1976), les amyloplastes pourraient avoir un rôle de réserve et être métabolisés pendant les périodes de faible activité photosynthétique.

CONCLUSION GENERALE

L'étude de la symbiose entre *Acacia albida* et les bactéries du genre *Bradyrhizobium* nous a permis de mettre en évidence plusieurs propriétés nouvelles parmi les symbioses fixatrices d'azote.

En effet, nous avons découvert pour la première fois que d'importantes populations de *Bradyrhizobium* ($1,32 \times 10^3$ bact./g de sol) vivaient sous *Acacia albida* jusqu'à 34 m de profondeur, au niveau de la nappe phréatique. Jusqu'à présent, seuls Virginia *et al.* (1986) avaient trouvé des rhizobia ($6,1 \times 10^3$ bact./g de sol) à 6 m de profondeur sous le couvert de *Prosopis glandulosa* poussant dans le désert du Sonaran (Californie). Nos résultats, montrant la présence des *Bradyrhizobium* à des profondeurs bien supérieures, constituent donc une donnée particulièrement nouvelle en écologie microbienne.

Toutefois malgré la présence importante des *Bradyrhizobium*, nous n'avons pu mettre en évidence la formation de nodules sur les racines d'*Acacia albida* adultes poussant dans la zone sahélienne. En revanche, nous avons pu observer, en surface, de nombreux nodules racinaires fixateurs d'azote sur des *Acacia albida* adultes poussant dans les rizières de la zone soudano-guinéenne. Ainsi, nous avons montré que l'*Acacia albida* adulte est potentiellement capable de fixer l'azote atmosphérique en symbiose.

En zone sahélienne, seule la méthode utilisant l'abondance naturelle en ^{15}N permettra de confirmer ou d'infirmer l'activité symbiotique des *Acacia albida* adultes. Elle a déjà été utilisée par Virginia *et al.* (1989) dans le cas de *Prosopis glandulosa* et indique qu'une grande partie de l'azote disponible de cette espèce dérive de l'activité symbiotique des nodules localisés à plus de 4 mètres de profondeur. De même, chez *Casuarina equisetifolia*, cette méthode a permis de confirmer le potentiel fixateur d'azote de jeunes *Casuarina* plantés dans des dunes littorales de la zone sahélienne proches de la région de Louga (Mariotti *et al.*, 1992).

A partir des sols recueillis en surface et en profondeur dans les deux régions écoclimatiques, nous avons obtenu 84 isolats que nous avons testé pour leur capacité à noduler et à fixer l'azote sur de jeunes plants d'*Acacia albida* cultivés en tubes. Nos résultats ont montré que dans la zone sahélienne les souches inefficaces représentent plus de la moitié des souches isolées. En particulier, à Diokoul, un seul isolat sur six est effectif. Ces observations montrent que, dans la zone sahélienne, il existe une possibilité réelle d'augmentation de la fixation d'azote par l'inoculation de souches sélectionnées, fixatrices d'azote et compétitives par rapport aux souches locales inefficaces. En Casamance, dans la zone soudanienne, la majorité des souches obtenues à partir des forages sont efficaces et nous avons montré que la présence de ces bradyrhizobia dans les sols de rizières dépend étroitement de

celle de l'*Acacia albida*. Il est probable que les *Bradyrhizobium* utilisent pour leur croissance dans les sols des exsudats produits par les racines de l'arbre et que ces exsudats soient spécifiques de l'*Acacia albida* puisque, sous une autre légumineuse ligneuse, *Parkia biglobosa*, les populations de *Bradyrhizobium* ont une densité très faible. A l'avenir, l'étude des gènes des *Bradyrhizobium* de l'*Acacia albida* impliqués dans le catabolisme devrait sans doute permettre de mieux comprendre l'écologie de la répartition des populations de *Bradyrhizobium* dans les sols.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons comparé taxonomiquement les souches isolées de forages ou de sols de surface à la fois dans les zones sahélienne et soudano-guinéenne.

Notre étude a ainsi mis en évidence que la plupart des souches appartenaient au grand groupe des bactéries du genre *Bradyrhizobium*. Nos résultats diffèrent donc de ceux de Jenkins *et al.* (1987, 1988 et 1989) qui ont montré que sous *Prosopis glandulosa*, il existait deux populations différentes de micro-organismes fixateurs d'azote, les bactéries du genre *Rhizobium* étant localisées en surface alors que les *Bradyrhizobium* sont présents en profondeur au niveau de la nappe d'eau. Toutefois, nous avons confirmé la grande diversité du genre *Bradyrhizobium*, montrée par les travaux de Moreira *et al.* (1993), et nous avons déterminé trois nouveaux groupes principaux qui pourraient constituer plusieurs espèces nouvelles dans le genre *Bradyrhizobium*.

Nous avons utilisé deux méthodes phénotypiques (électrophorèse SDS-PAGE des protéines cellulaires totales et système d'identification Biolog) et une méthode génotypique (hybridations ADN:ARNr). D'après nos résultats, il apparaît désormais possible d'utiliser le système miniaturisé Biolog, cependant moins discriminant que la technique électrophorétique.

D'autre part, nous avons observé que les souches de *Bradyrhizobium* isolées d'un même forage, sont taxonomiquement homogènes alors que les souches isolées de sites variés en surface appartiennent souvent à des groupes différents. Nos résultats montrent donc qu'il y a un effet site important sur la diversité des populations de *Bradyrhizobium*. Ainsi, l'identification de clusters électrophorétiques (Cls. 7 et 8) constitués exclusivement de souches isolées à partir du forage de Louga semble indiquer une migration en profondeur d'un même groupe de souche suivant le développement des racines d'*Acacia albida*. Le suivi *in situ* des souches, par construction de sondes moléculaires fluorescentes spécifiques, devrait permettre, à l'avenir, de vérifier de cette hypothèse. Si cette migration en profondeur était confirmée, l'inoculation des jeunes plantules en pépinière, aurait un grand intérêt pratique.

Dans la troisième partie de notre travail, nous avons étudié l'infection et le développement des nodules d'*Acacia albida*. Notre étude a permis de mettre en évidence des caractéristiques uniques dans l'ontogénèse nodulaire. C'est ainsi que nos observations ont montré un phénotype Hai particulier aboutissant à l'individualisation de segments racinaires piliés très facilement repérables. Nous avons aussi observé que des divisions cellulaires étaient induites à distance dans le cortex externe aboutissant au renflement de la région racinaire piliée. Après l'inoculation, les régions racinaires piliées et renflées correspondent donc aux sites où les nodules vont se former. La mise au point d'un test biologique pour l'induction des régions racinaires piliées (phénotype Hai) devrait permettre l'identification et la purification des signaux bactériens responsables des réponses biologiques décrites chez *Acacia albida*.

Nous avons constaté que le mode d'infection était intercellulaire et identique à celui décrit chez le soja (Turgeon et Bauer, 1985). Cependant, contrairement au soja, il semble que l'infection prenne naissance au point de contact de la protubérance d'une cellule corticale hypertrophiée et d'une cellule épidermique adjacente. L'infection via des cellules corticales n'avait jamais été décrite auparavant et apparaît comme une caractéristique unique d'*Acacia albida*.

Comme dans les nodules radiculaires de *Sesbania rostrata* (Ndoye *et al.*, en préparation), notre étude a aussi permis d'observer un type de développement nodulaire mixte montrant les caractéristiques intermédiaires propres à la fois aux nodules de type indéterminé comme chez les légumineuses tempérées et aux nodules de type déterminé observés chez la majorité des légumineuses tropicales.

Si l'on excepte les travaux sur *Prosopis glandulosa* (Virginia *et al.*, 1986 et 1989 ; Jenkins *et al.*, 1987, 1988 et 1989 ; Waldon *et al.*, 1989), notre étude a donc permis, pour la première fois d'étudier de façon approfondie, au laboratoire et sur le terrain, une symbiose fixatrice d'azote entre un arbre et les bactéries du genre *Bradyrhizobium*. Les propriétés nouvelles que nous avons découvertes font de la symbiose *Acacia albida* - *Bradyrhizobium* un modèle unique parmi les arbres tropicaux des zones sahélienne et soudano-guinéenne et permettent d'envisager à la fois des retombées appliquées pour l'agroforesterie sahélienne et le développement de recherches fondamentales sur les relations plantes - micro-organismes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alazard, D. 1991. La nodulation caulinaire dans le genre *Aeschynomene*. Thèse de Doctorat de l'Université Claude Bernard-Lyon I.

Alazard, D. and E. Duhoux. 1990. Development of stem nodules in a tropical forage legume, *Aeschynomene afraspera*. J. Exp. Bot. **41**:1199-1206.

Alexander, M. 1977. Introduction to Soil Microbiology, p. 21-24. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., New-York.

Allen, O. N. and E. K. Allen. 1940. Response of the peanut plant to inoculation with rhizobia with special reference to morphological development of the nodules. Bot. Gaz. **102**:121-142.

Appels, M. A. et H. Haaker. 1987. Identification of cytoplasmic nodule-associated forms of malate dehydrogenase involved in the symbiosis between *Rhizobium leguminosarum* and *Pisum sativum*. Eur. J. Biochem. **171**:515-522.

Arora, N. 1954. Morphological development of the root and stem nodules of *Aeschynomene indica* L. Phytomorphology **4**:211-216.

Badji, S. 1991. La symbiose *Acacia senegal* (L.) wild-*Rhizobium* sp. : étude des partenaires et optimisation du fonctionnement de la symbiose. Thèse de Doctorat de l'Université d'Aix-Marseille III.

Basset, B., R. N. Goodman, and A. Novacky. 1977. Ultrastructure of soybean nodules. I : release of rhizobia from the infection thread. Can. J. Microbiol. **23**:573-582.

Bauer, W. B. 1981. Infection of legume by rhizobia. Annu. Rev. Plant Physiol. **32**:407-449.

Bergersen, F. J. and M. J. Briggs. 1958. Studies of the bacterial component of soybean root nodules : cytology and organisation in the host tissue. J. Gen. Microbiol. **19**:482-490.

Bergmann, H., E. Preddie, et D. P. S. Verma. 1983. Nodulin-35 : a subunit of specific uricase (uricase II) induced and localized in the uninfected cells of soybean nodules. EMBO J. **2**:2333-2339.

Brockwell, J. 1980. Experiments with crop and pasture legumes. Principle and practice, p. 417-488. *In* F. J. Bergersen (ed.), *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. John Wiley & Sons, Inc., New-York.

de Bruijn, F. J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2180-2187.

van Brussel, A. A. N., R. Bakhuizen, P. C. van Spronsen, H. P. Spaink, T. Tak, B. J. J. Lugtenberg, and J. W. Kijne. 1992. Induction of pre-infection structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* **257**:70-72.

van Brussel, A. A. N., S. A. J. Zaat, H. C. J. Canter Cremers, C. A. Wijffelman, E. Pees, T. Tak, and B. J. J. Lugtenberg. 1986. Role of plant root exudate and sym plasmid-localized nodulation genes in the synthesis by *Rhizobium leguminosarum* of Tsr factor, which causes thick and short roots on common vetch. *J. Bact.* **165**:517-522.

Busse, H. J. and G. Auling. 1988. Polyamine pattern as a chemotaxonomic marker within the *Proteobacteria*. *System. and Appl. Microbiol.* **11**:1-8.

Caetano-Anollés, G. and P. M. Gresshoff. 1991. Plant genetic control of nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**:345-382.

Caetano-Anollés, G., L. G. Wall, A. T. de Micheli, E. M. Macchi, W. D. Bauer, and G. Favelukes. 1988. Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* **86**:1228-1235.

Calvert, H. E., M. K. Pence, M. Pierce, N. S. A. Malik, and W. D. Bauer. 1984. Anatomical analysis of the development and distribution of *Rhizobium* infections in soybean roots. *Can. J. Bot.* **62**:2375-2384.

Chandler, M. R. 1978. Some observations on infection of *Arachis hypogaea* L. by *Rhizobium*. *J. Exp. Bot.* **29**:749-755.

- Chandler, M. R., R. A. Date, and R. J. Roughley.** 1982. Infection and root-nodule development in *Stylosanthes* species by *Rhizobium*. *J. Exp. Bot.* **33**:47-57.
- Chen, W. X., G. S. Li, Y. L. Qi, E. T. Wang, H. L. Yuan, and J. L. Li.** 1991. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:275-280.
- Chen, H. and B. G. Rolfe.** 1988. *Rhizobium* infection of *Leucaena leucocephala* via the formation of infection threads in curled root hairs. *J. Plant Physiol.* **332**:379-382.
- Chen, W. X., G. H. Yan, and J. L. Li.** 1988. Numerical taxonomy 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.
- Chevalier, A.** 1934. Nouvelles observations sur quelques acacias de l'Afrique occidentale. *Revue de Botanique Appliquée* **14**:875-884.
- Collins, M. D. and D. Jones.** 1981. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiol. Rev.* **45**:316.
- C.T.F.T.** 1988. *Faidherbia albida* Monographie, 72p. Centre Technique Forestier Tropical, C.I.R.A.D (Ed.), Nogent sur Marne.
- Dart, P. J.** 1977. Infection and development of leguminous nodules, p. 367-472. *In* R. W. F. Hardy and W. S. Silver (ed.), *A treatise on dinitrogen fixation. Section III, Biology.* Wiley and Sons, New York.
- Dazzo, F. B., G. L. Truchet, J. E. Sherwood, E. M. Hrabak, M. Abe, and S. H. Pankratz.** 1984. Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii* clover symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**:1140-1150.
- Debellé, F., C. Rosenberg, J. Vasse, F. Maillet, F. E. Martinez, J. Dénarié, et G. Truchet.** 1986. Assignment of symbiotic developmental phenotypes to common and specific nodulation (*nod*) genetic *loci* of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **168**:1075-1086.

- Debellé, F. and S. B. Sharma.** 1986. Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* RCR 2011 genes involved in host specificity of nodulation. Nucl. Acids Res. **14**:7453-7472.
- Dehio, C. and F. J. de Bruijn.** 1992. The early nodulin gene SrEnod2 from *Sesbania rostrata* is inducible by cytokinin. Plant J. **2**:117-128.
- Dénarié, J. and P. Roche.** 1992. *Rhizobium* nodulation signals, p. 295-324. In Desh Pal S. Verma (ed.), Molecular signals in plant-microbe communications. CRS Press, Inc., Boca Raton, Floride.
- Diaz, C. L., L. S. Melchers, P. J. J. Hooykaas, B. J. J. Lugtenberg, and J. W. Kijne.** 1989. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Nature **338**:579-591.
- Dommergues, Y. R.** 1987. Comment accroître la fixation symbiotique de l'azote par les arbres en milieu tropical ?, p. 18-32. Dans ORSTOM et IFS (ed.), Les arbres fixateurs d'azote. L'amélioration biologique de la fertilité des sols, Paris.
- Dommergues, Y., B. Dreyfus, H. G. Diem, and E. Duhoux.** 1985. Fixation de l'azote et agriculture tropicale. La Recherche **162**:22-31.
- Dreyfus B. L. and Dommergues Y. R.** 1981. Nodulation of *Acacia* species by fast- and slow-growing tropical strains of *Rhizobium*. Appl. Environ. Microbiol. **41**:97-99.
- Dreyfus, B., J. L. Garcia, and M. Gillis.** 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.
- Dudley, M. E., T. W. Jacobs, and S. R. Long.** 1987. Microscopy studies of cell divisions induced in alfalfa root hairs by *Rhizobium meliloti*. Planta **171**:289-301.
- Duhoux, E.** 1984. Ontogénèse des nodules caulinaires du *Sesbania rostrata* (légumineuses). Can. J. Bot. **62**:982-995.

Dupuy N., D  trez C., Neyra M., de Lajudie P. et Dreyfus B. 1991. Les acacias fixateurs d'azote du Sahel. *La Recherche*. **223**:802-804.

Dupuy, N. C. and B. L. Dreyfus. 1992. *Bradyrhizobium* populations occur in deep soil under the leguminous tree *Acacia albida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2415-2419.

Dupuy, N., A. Willems, D. Dewettinck, G. Maestrojuan, B. Pot, B. Dreyfus, K. Kerters, M. D. Collins, and M. Gillis. Protein gelelectrophoretic, phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. En préparation.

Eardly, B. D., L. A. Mareron, N. H. Smith, D. A. Johnson, M. D. Rumbaugh, and R. K. Selander. 1990. Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:187-194.

Economou, A., F. K. L. Hawkins, and A. W. B. Johnston. 1988. pRL1JI specifies the catabolism of L-homoserine and contains a gene, *rhi*, whose transcription is reduced in the presence of *nod* gene inducer molecules, p. 462. *In* H. Bothe, F. J. de Bruijn, and W. E. Newton (ed.), Nitrogen fixation : hundred years after. Gustav Fischer, Stuttgart.

van Egeraat, A. W. S. M. 1975. The possible role of homoserine in the development of *Rhizobium leguminosarum* in the rhizosphere of pea seedlings. *Plant Soil* **42**:367-379.

de Faria, S. M., G. T. Hay, and J. I. Sprent. 1988. Entry of rhizobia into roots of *Mimosa scabrella* Bentham occurs between epidermal cells. *J. Gen. Microbiol.* **134**:2291-2296.

de Faria, S. M., G. P. Lewis, J. I. Sprent, and J. M. Sutherland. 1989. Occurrence of nodulation in the *Leguminosae*. *New Phytol.* **111**:607-619.

Faucher, C., F. Maillet, J. Vasse, C. Rosenberg, A. A. N. van Brussel, G. Truchet, and J. Dénarié. 1988. *Rhizobium meliloti* range *nodH* gene determines production of an alfalfa-specific extracellular signal. *J. Bacteriol.* **170**:5489-5499.

Felker, P. and P. R. Clark. 1982. Nodulation and nitrogen fixation in 3 m phraetophytically simulated soils columns. *Plant and soil* **61**:297-305.

Fortin, M. G., N. A. Morrison, and D. P. S. Verma. 1987. Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucleic Acids Res.* **15**:813-824.

Gaworzewska, E. T., and M. J. Carlile. 1982. Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and others plants. *J. Gen. Microbiol.* **128**:1179-1188.

Gibson, A. H. 1963. 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.

Gillis, M., D. A. Roth, J. Johnson, and K. Rudolph. 1990. Characterization by nucleic acids, p. 216-231. *In* K. Klement, K. Rodolph, and D. C. Sands (ed.), *Methods in phytobacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest.

Gillis, M. 1992. Classification des bactéries fixatrices d'azote. Dans INRA (ed.), "Fixation symbiotique de l'azote" : de la biologie à l'agronomie. Sous presse.

Giovannoni, S., E. F. Delong, G. J. Olsen, and N. R. Pace. 1988. Phylogenetic group-specific oligonucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bact.* **170**:720-726.

Givaudan A. and R. Bally. 1991. Similarities between large plasmids of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol. Letters.* **78**:245-252.

Govers, F., T. Gloudemans, M. Moerman, A. van Kammen, et T. Bisseling. 1985. Expression of plant genes during the development of pea root nodules. *EMBO J.* **4**:861-867.

Graham, P. H., M. J. Sadowsky, H. H. Keyser, Y. M. Barnet, R. S. Bradley, Cooper J. E., D. J. De Ley, B. D. W. Jarvis, E. B. Roslycky, B. W. Strijdom, and J. P. W. Young. 1991. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:582-587.

- Guinel, F. C. and T. A. Larue.** 1991. Light microscopy study of nodule initiation in *Pisum sativum* L. cv Sparkle and its low nodulating mutant E2 (*sym5*). *Plant Physiol.* **97**:1206-1211.
- Hardy, R. W. R., R. C., Burns, and R. D. Holsten.** 1973. Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of N₂ fixation. *Soil Biol. Biochem.* **5**:47-81.
- Hardy, R. W. R., R. D. Holsten, E. K. Jackson, and W. M. Jarrel.** 1968. The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation : laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* **43**:1185-1207.
- Haun, G. and U. Göbel.** 1987. Oligonucleotide probes for genus-species- and subspecies-specific identification of representatives of the genus *Proteus*. *FEMS Microbiol. Letters.* **43**:187-193.
- Hollis, A. B., W. E. Kloos, and G.H. Elkan.** 1981. DNA:DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related *Rhizobiaceae*. *J. Gen. Microbiol.* **123**:215-222.
- Horvath, B., C. W. B. Bachem, J. Schell, and A. Kondorosi.** 1987. Host-specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a plant-signal, interacting with the *nodD* gene product. *EMBO J.* **6**:841-848.
- Horvath, B., E. Kondorosi, M. John, J. Schmidt, I. Török, Z. Györgypal, I. Barabas, U. Wieneke, J. Schell, and A. Kondorosi.** 1986. Organization structure and symbiotic function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes determining host specificity for alfalfa. *Cell* **46**:335-343.
- le Houérou, H. N.** 1989. The grazing land ecosystems of the african Sahel, p. 1-282. *In* W. D. Billings, F. Golley, O. L. Lange, J. S. Olson, and H. Remmert (eds), *Ecological studies series*, vol. 75. Springer-Verlag, New York.
- Huber, J. D., F. Parker, and G. F. Odland.** 1968. A basin fushin and alkalised methylene blue rapid stain for epoxy embedded tissue. *Stain. Technol.* **43**:83-87.

Hutchinson, J. and J. M. Dalziel. 1958. Flora of West Tropical Africa, p. 499. Second Editions revised by R. W. J. Keay. Vol. 1, Part II. Crown agents for oversea governments and administrations, Londres.

Jackman, P. J. H. 1985. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns, p. 115-128. *In* M. Goodfellow and D. E. Minnikin (ed.), Chemicals methods in bacterial systematics. Academic press, Londre.

James, E. K., J. I. Sprent, J. M. Sutherland, S. G. McInroy, and F. R. Minchin. 1992. The structure of nitrogen fixing root nodules on the aquatic mimosoid legume *Neptunie plena*. *Annals of Botany* **69**:173-180.

Jarvis, B. D. W., H. L. Downer, and J. P. W. Young. 1992. Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**:93-96.

Jarvis, B. D. W., M. Gillis, and J. De Ley. 1986. Intra- and intergeneric similarities between the ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species and some related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**:129-138.

Jarvis, B. D. W., K. F. Scott, J. E. Hughes, M. Djordjevic, B. G. Rolfe, and J. Shine. 1983. Conservation of genetic information between different *Rhizobium* species. *Can. J. Microbiol.* **29**:200-209.

Jenkins, M. B., R. A. Virginia, and W. M. Jarrell. 1989. Ecology of fast-growing and slow-growing mesquite-nodulating rhizobia in Chihuahuan and Sonaran Desert ecosystems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **53**:543-549.

Jenkins, M. B., R. A. Virginia, and W. M. Jarrell. 1988. Depth distribution and seasonal population fluctuations of mesquite-nodulating rhizobia in warm desert ecosystems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **52**:1644-1650.

Jenkins, M. B., R. A. Virginia, and W. M. Jarrell. 1987. Rhizobial ecology of the woody legume mesquite (*Prosopis glandulosa*) in the Sonoran Desert. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:36-40.

Jordan, D. C. 1984. *Rhizobiaceae*, p. 234-245. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins, Co., Baltimore.

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.

Jordan, D. C. and O. N. Allen. 1974. Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938, p. 261-267. In R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (ed.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th. ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Londre.

Jung, G. 1970. Variations saisonnières des caractéristiques microbiologiques d'un sol ferrugineux tropical peu lessivé (Dior), soumis ou non à l'influence d'*Acacia albida* (Del.). *Oecol. Plant.* **V**:113-136.

Jung, G. 1969. Cycles biogéochimiques dans un écosystème de région tropicale sèche : *Acacia albida* (Del.), sol ferrugineux tropical peu lessivé (Dior). *Oecol. Plant.* vol **IV**:195-210.

van Kammen, A. 1984. Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. *Plant Mol. Rep.* **2**:43-45.

Kerstens, K. 1985. Numerical methods in the classification of bacteria by protein electrophoresis, p. 337-368. *Computer-assisted bacterial systematic*. Academic press, Londre.

Kerstens, K. and J. De Ley. 1980. Classification and identification of bacteria by electrophoresis of their proteins, p. 273-297. In M. Goodfellow and R. G. Board (ed.), *Microbiological classification and identification*. Academic press, Londre.

Kijne, J. W. 1990. The *Rhizobium* infection process, p.349-398. In P. M. Gresshoff, L. E. Roth, G. Stacey, and W. E. Newton (ed.), *Nitrogen Fixation : Achievements and Objectives*. Chapman and Hall, New York.

Kijne, J. W. 1975. The fine structure of pea root nodules. 1. Vacuolar changes after endocytotic host cell infection by *Rhizobium leguminosarum*. *Physiol. Plant Pathol.* **5**:75-79.

Kiredjan, M., B. Holmes, K. Kersters, J. Guilvout, and J. de Ley. 1986. *Alcaligenes piechaudii*, a new species from human clinical specimens and the environment. *Int. J. Syst. Bact.* **36**:282-287.

Kondorosi, E., Z. Banfalvi, et A. Kondorosi. 1984. Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti* : identification of nodulation genes. *Mol. Gen. Genet.* **193**:445-452.

Kuykendall, L. D., B. Saxena, T. E. Devine, and S. E. Udell. 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982) and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* **38**:501-505.

Kuykendall, L. D., M. A. Roy, J. J. O'Neill, and T. E. Devine. 1988. Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**:358-361.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**:680-685.

de Lajudie, P., A. Willems, G. Maestrojuan, M. Neyra, D. Collins, B. Dreyfus, M. Gillis, and K. Kersters. Polyphasic taxonomy within the *Rhizobium-Agrobacterium* rRNA cluster and the proposition of three new species in *Rhizobium* i.e. *R. teranga*, *R. saheli*, *R. mimosae*. En préparation.

de Lajudie, P., M. Neyra, N. Dupuy, D. Alazard, et M. Gillis. 1991. Diversité des *Rhizobium*, spécificité de nodulation et aptitude à fixer l'azote chez les acacias sahéliens, p. 257-262. dans John Libbey Eurotext (ed.), *Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides*. Groupe d'Etudes de l'Arbre. Paris. France.

Lancelle, S. A. and J. G. Torrey. 1985. Early development of *Rhizobium*-induced root nodules of *Parasponia rigida*. II. Nodule morphogenesis and symbiotic development. *Can. J. Bot.* **63**:25-35.

Lancelle, S. A. and J. G. Torrey. 1984. Early development of *Rhizobium*-induced root nodules of *Parasponia rigida*. I. Infection and early nodule initiation. *Protoplasma* **123**:26-37.

- Lara, M., J. V. Cullimore, P. J. Lea, B. J. Miflin, A. W. B. Johnston, et J. W. Lamb.** 1983. Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during nodule development in *Phaseolus vulgaris*. *Planta* **157**:254-258.
- Lawrie, A. C.** 1983. Infection and nodule development in *Aotus ericoides* (Vent.) G. Don, a woody native Australian legume. *J. Exp. Bot.* **34**:1168-1180.
- Legocki, R. P. and D. P. S. Verma.** 1980. Identification of "nodule-specific" host proteins (nodulins) involved in the development of *Rhizobium-legume* symbiosis. *Cell* **20**:153-163.
- Lericollais, A.** 1988. La mort des arbres à Sob, en pays Sereer (Sénégal), p. 16-29. Notes de Biogéographie n°3, Etude connaissance et aménagement du milieu. Numéro spécial, L'arbre et l'espace. Université Cheick Anta Diop, Dpt de Géographie, Dakar.
- Lerouge, P., P. Roche, C. Faucher, F. Maillet, G. Truchet, J. C. Promé, et J. Dénarié.** 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**:781-784.
- de Ley, J.** 1991. The proteobacteria : ribosomal RNA cistron similarities and bacterial taxonomy, p. 2109-2140. *In* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.), *The Prokaryotes*, 2th ed. vol. 2. Springer-Verlag, New York.
- Libbenga, K. R. and P. A. A. Harkes.** 1973. Initial proliferation of cortical cells in the formation of root nodules in *Pisum sativum*. *Planta* **114**:17-28.
- Lindström, K.** 1989. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:365-367.
- Long, S. R.** 1989. *Rhizobium-legume* nodulation : life together in the underground. *Cell* **56**:203-214.

- Mariotti, A., B. Sougoufara, and Y. R. Dommergues.** 1992. Estimation de la fixation d'azote atmosphérique par traçage isotopique naturel dans une plantation de *Casuarina equisetifolia* (Forst). *Soil Biol. Biochem.* **24**:647-653.
- Martinez-Romero, E., L. Segovia, F. M. Mercante, A. A. Franco, P. Graham, and M. A. Pardo.** 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:417-426.
- Mergaert, P., M. van Montagu, J. C. Promé, and M. Holsters.** 1993. Three unusual modifications, a D-arabinosyl, an N-methyl, and a carbamoyl group, are present on the Nod factors of *Azorhizobium caulinodans* strain ORS571. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:1551-1555.
- Moreira, F., M. Gillis, B. Pot, K. Kersters, and A. A. Franco.** Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Syst. Appl. Bacteriol.* Sous presse.
- Mulligan, J. T. and S. R. Long.** 1989. A family of activator genes regulates expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Genetics* **122**:7-18.
- Nair, P. K. R., E. C. M. Fernandes, et P. N. Wambugu.** 1984. Multipurpose leguminous trees and scrubs for agroforestry. *Agrofor. Syst.* **2**:145-163.
- Nap, J. P. and Y. Bisseling.** 1990. Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis : the legume root nodule. *Science* **250**:948-954.
- Ndoye, I., J. Vasse, F. de Billy, B. Dreyfus, and G. Truchet.** Infection and root-nodule development in the tropical legume *Sesbania rostrata* by *Azorhizobium caulinodans* strain ORS571. En préparation.
- Newcomb, W.** 1981. Nodule morphogenesis and differentiation. *In* K. L. Giles and A. G. Atherly (ed.), *International Review of Cytology, Biology of the Rhizobiaceae*. Academic Press. Supplement **13**:247-294.

Newcomb, W., and L. McIntyre. 1981. Development of root nodules of mung bean (*Vigna radiata*) : a reinvestigation of endocytosis. *Can. J. Bot.* **59**:2478-2499.

Newcomb, W., D. Sippell, and R. L. Peterson. 1979. The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. *Can. J. Bot.* **57**: 2603-2616.

Newcomb, W. 1976. A correlated light and electron microscopic study of symbiotic growth and differentiation in *Pisum sativum* root nodules. *Can. J. Bot.* **34**:2163-2186.

Owen, R. N. and P. J. H. Jackman. 1982. The similarities between *Pseudomonas paucimobilis* and allied bacteria derived from analysis of deoxyribonucleic acids and electrophoretic protein patterns. *J. Gen. Microbiol.* **128**:2945-2954.

Peters, N. K., J. W. Frost, and S. R. Long. 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* **233**:977-980.

Pot, B., P. Vandamme, K. Kerster. 1992. Analysis of electrophoretic whole organism protein fingerprints, *In* M. Goodfellow and T. O'Donnell (ed.), *Chemicals methods in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Chichester. Soumis pour publication.

Pot, B., M. Gillis, B. Hoste, A. Van De Velde, Bekaert F., Kersters K., and J. De Ley. 1989. Intra- and intergeneric relationships of the genus *Oceanospirillum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:23-34.

Prévost, D., L. M. Bordeleau, S. Caudry-Reznick, H. M. Schulman, and H. Antoun. 1987. Characteristics of rhizobia isolated from three legumes indigenous to the canadian high arctic : *Astragalus alpinus*, *Oxytropis maydeliana* and *Oxytropis arctobia*. *Plant and soil* **98**:313-324.

Pueppke, S. G. 1983. *Rhizobium* infection threads in root hairs of *Glycine max* (L.) Merr., *Glycine soja* Sieb. & Zucc., and *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Can. J. Microbiol.* **29**:69-76.

Ranga Rao, V. 1977. Effect of root temperature on the infection process of *Lotus* and *Stylosanthes*. *J. Exp. Bot.* **28**:241-259.

Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* **17**:208-213.

Rinaudo, G., S. Orenga, M. P. Fernandez, H. Meugnier, and R. Bardin. 1991. DNA homologies among members of the genus *Azorhizobium* and other stem- and root-nodulating bacteria isolated from the tropical legume *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:114-120.

Robertson, J. G., P. Lyttleton, S. Bullivant, and G. Grayston. 1978. Membranes in lupin root nodules. I. The role of golgi bodies in the biogenesis of infection threads and peribacteroid membranes. *J. Cell Sci.* **30**:129-149.

Roche, P., P. Lerouge, P. Ponthus, and J. C. Promé. 1991^a. Structural determination of bacterial nodulation factors involved in the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *J. Biol. Chem.* **226**:10933-10940.

Roche, P., F. Debellé, F. Maillet, P. Lerouge, C. Faucher, G. Truchet, J. Dénarié, et J. C. Promé. 1991^b. Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti* : *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell* **67**:1131-1143.

Rolfe, B. G. and P. M. Gresshoff. 1988. Genetic analysis of legume nodule initiation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**:297-319.

Rostas, K., E. Kondorosi, B. Simoncsits, and A. Kondorosi. 1986. Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:1757-1761.

Roth, L. E. and G. Stacey. 1989. Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules : the symbiosome membrane comes from three sources. *Eur. J. Cell Biol.* **49**:13-23.

Sanjuan, J., R. W. Carlson, H. P. Spaink, U. R. Bhat, W. M. Barbour, J. Glushka, and G. Stacey. 1992. A 2-O-methylfucose moiety is present in the lipo-polysaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:8789-8793.

Schaede, R. 1940. Die knöllchen der adventiven wasser-wurzeln von *Neptunia oleracea* und ihre bakterien-symbiose. *Planta* **31**:1-21.

Scheres, B., C. van de Wiel, A. Zalensky, B. Horvath, H. Spaink, H. van Eck, F. Zwartkruis, A. M. Wolters, T. Gloudemans, A. van Kammen, and T. Bisseling. 1990. The ENOD12 gene product is involved in the infection process during the pea-*Rhizobium* interaction. *Cell* **60**:281-294.

Schlaman, H. R. M., R. J. H. Okker, and B. J. J. Lugtenberg. 1992. Regulation of nodulation gene expression by NodD in rhizobia. *J. Bact.* **174**:5177-5182.

Scholla, M. H. and G. H. Elkan. 1984. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**:484-486.

Schültze, M., B. Quiclet-Sire, E. Kondorosi, H. Virelizier, N. Glushka, G. Endre, D. Gero, and A. Kondorosi. 1992. *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipo-polysaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:192-196.

Schulze E. D., G. Gebauer, H. Ziegler, and O. L. Lange. 1991. Estimates of nitrogen fixation by trees on an aridity gradient in Namibia. *Oecologia* **88**:451-455.

Segovia, L., J. P. Young, and E. Martinez-Romero. 1992. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:374-377.

Smit, G., T. J. J. Logman, M. E. T. I. Boerrigter, J. W. Kijne, B. J. J. Lugtenberg. 1989. Purification and partial characterization of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae* Ca²⁺-dependant adhesin, which mediates the first step in attachment of cells of the family *Rhizobiaceae* to plant root hair tips. *J. Bacteriol.* **171**:4054-4062.

Spaink., H. P., D. M. Sheeley, A. A. N. van Brussel, W. S. York, T. Tak, O. Geiger, E. P. Kennedy, V. N. Reinhold, and B. J. J. Lugtenberg. 1991. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature* **354**:125-130.

Sprent, J. I. 1989. Which steps are essential for the formation of functional legume nodules ? *New Phytol.* **111**:129-153.

Sprent, J. I. and S. M. de Faria. 1988. Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. *Plant and Soil* **110**:157-165.

Stackebrandt E., R. G. E. Murray, and H. G. Trüper. 1988. *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**:321-325.

Truchet, G., P. Roche, P. Lerouge, J. Vasse, S. Camut, F. de Billy, J. C. Promé, et J. Dénarié. 1991. Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* **351**: 670-673.

Truchet, G., F. Debellé, J. Vasse, B. Terzaghi, A. M. Garnerone, C. Rosenberg, C. Batut, F. Maillet, and J. Dénarié. 1985. Identification of a *Rhizobium meliloti* pSym 2011 region controlling the host specificity of root hair curling and nodulation. *J. Bacteriol.* **164**:1200-1210.

Truchet, G., C. Rosenberg, J. Vasse, S. Camus, and J. Dénarié. 1984. Transfer of *Rhizobium meliloti* pSym genes into *Agrobacterium tumefaciens*. Host specific nodulation by atypical infection. *J. Bacteriol.* **157**:134-142.

Truchet, G., M. Michel, and J. Dénarié. 1980. Sequential analysis of the organogenesis of lucerne (*Medicago sativa*) root nodules using symbiotically defective mutants of *Rhizobium meliloti*. *Differentiation* **16**:163-172.

Truchet, G. 1978. Sur l'état diploïde des cellules du méristème des nodules radiculaires des légumineuses. *Ann. Sc. nat., Bot. Biol. vég.* **19**:3-38.

Truchet, G. 1976. Processus séquentiel du développement des nodules symbiotiques de légumineuses. Thèse de Doctorat d'Etat.

Truchet, G. and P. Coulomb. 1973. Mise en évidence et évolution du système phytolysosomal dans les cellules des différentes zones de nodules radiculaires de pois (*Pisum sativum* L.) Ultrastruct. Res. **43**:163-173.

Tsien, H. C., B. L. Dreyfus, and E. L. Schmidt. 1983. Initial stages in the morphogenesis of nitrogen-fixing stem nodules of *Sesbania rostrata*. J. bact. **156**:888-897.

Turgeon, B. G. and W. D. Bauer. 1982. Early events in the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. Time course and cytology of the initial infection process. Can. J. Bot. **60**:152-161.

Turgeon, B. G. and W. D. Bauer. 1985. Ultrastructure of infection thread development during the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. Planta **163**:328-349.

Vasse, J., F. de Billy, and G. Truchet. Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. Plant Journal, sous presse.

Vasse, J., F. de Billy, S. Camut, and G. Truchet. 1990. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. J. Bact. **172**:4295-4306.

Vasse, J. and G. Truchet. 1984. The *Rhizobium* legume symbiosis : observations of root infection by bright-field microscopy after staining with methylene blue. Planta **161**:487-489.

Vaughn, K. C. and C. D. Elmore. 1985. Ultrastructural characterization of nitrogen-fixing stem nodules on *Aeschynomene indica*. Cytobios. **42**:49-62.

Vaneechoutte, M., R. Rossau, P. de Vos, M. Gillis, D. Janssens, N. Paepe, A. de Rouck, T. Fiers, G. Claeys, and K. Kersters. 1992. Rapid identification of bacteria of the *Comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). FEMS Microbiol. Letters **93**:227-234.

Vauterin, L. and P. Vauterin. 1992. Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. European Microbiol. **1**:37-41.

Vauterin, L., P. Yang, B. Hoste, B. Pot, J. Swings, and K. Kerters. 1992. Taxonomy of xanthomonads from cereals and grasses based on SDS-PAGE of proteins, fatty acids and DNA hybridization. *J. gen. Microbiol.* **138**:1467.

Verma, D. P. S. and S. Long. 1983. The molecular biology of Rhizobium-legume symbiosis. *Int. Rev. Cytol.* **14**:211-245.

Verma, D. P. S., V. Kazazian, V. Zogbi, and A. K. Bal. 1978. Isolation and characterization of the membrane envelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. *J. Cell Biol.* **78**:916-936.

Vincent, J. M. 1980. Factors controlling the legume *Rhizobium* symbiosis, p. 103-127. *In* W. E. Newton & W. H. Orme-Johnson (ed.), Nitrogen fixation, vol 2. University Park Press, Baltimore.

Vincent, J. M. 1970. A manual for practical study of root-nodule bacteria, p. 164. International Biological Programme Handbook n°15. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford.

Virginia R. A., W. M. Jarrell, P. W. Rundel, D. H. Kohl, and G. Shearer. 1989. The use of variation in the natural abundance of ¹⁵N to assess symbiotic nitrogen fixation by woody plants, pp. 375-394. *In* P. W. Rundel, J. R. Ehleringer, and K. A. Nagy (ed.), Stable isotopes in ecological research. Ecological Studies Series, vol 68. Springer-Verlag, Heidelberg-New York.

Virginia R. A., M. B. Jenkins, and W. M. Jarrell. 1986. Depth of root symbiont occurrence in soil. *Biol. Fertility Soils* **2**:127-130.

de Wachter, R., E. Huysmans, and A. Vandenberghe. 5S ribosomal rRNA as a tool for studying evolution, p. 115. *In* K. Schleifer and E. Stackebrandt (ed.), Evolution of Prokaryotes. Academic Press, Londres.

Waldon, H. B., M. B. Jenkins, R. A. Virginia, and E. E. Harding. 1989. Characteristics of woodland rhizobial populations from surface- and deep-soil environments of the Sonaran Desert. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:3058-3064.

Wheeler, C. T. 1991. Symbiotic nitrogen fixation, p. 111-135. *In* A. S. Raghavendra (ed.), Physiology of trees. John Wiley & Sons, Inc., New York.

- Willems, A. and M. D. Collins.** 1992. Evidence for a close genealogical relationship between *Afipia* the causal organism of cat scratch disease, *Bradyrhizobium japonicum* and *Blastobacter denitrificans*. FEMS Microbiol. Letters **96**:241-246.
- Winker, S. and C. R. Woese.** 1991. A definition of the domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eucarya* in terms of small subunit ribosomal RNA characteristics. System. and Appl. Microbiol. **14**:305-310.
- Wittenberg, J. B., F. J. Bergersen, C. A. Appleby, et G. L. Turner.** 1974. Facilitated oxygen diffusion. The role of leghemoglobin in nitrogen fixation by bacteroids isolated from soybean root nodules. J. Biol. Chem. **249**:4057-4066.
- Woese, C. R.** 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. **51**:221-271.
- Woese, C. R., E. Stackebrandt, W. G. Weisburg, B. J. Paster, M. T. Madigan, V. J. Fowler, C. M. Hahn, P. Blanz, R. Gupta, K. H. Nealson, and G. E. Fox.** 1984. The phylogeny of purple bacteria : the alpha subdivision. Syst. Appl. Microbiol. **5**:315-326.
- Yao, P. Y. and J. M. Vincent.** 1969. Host-specificity in the root hair "curling factor of *Rhizobium* spp. Aust. J. Biol. Sci. **22**:413-423.
- Yatazawa, M. and S. Yoshida.** 1979. Stem nodules in *Aeschynomene indica* and their capacity of nitrogen fixation. Plant Physiol. **45**:293-295.
- Yatazawa, M., S. Yoshida, and E. Maeda.** 1984. Fine structure of root nodules of *Aeschynomene indica* L. Soil Sci. Plant Nutr. **30**:405-416.
- Young, J. P. W.** 1991. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms, p.43-86. In G. Stacey, R. H. Burris, and H. J. Evans (ed.), Biological nitrogen fixation. Chapman & Hall, Inc. New York.
- Young, J. P. W., H. L. Downer, and B. D. Eardly.** 1991. Phylogeny of the phototrophic rhizobium strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. J. Bact. **173**:2271-2277.
- Young, J. P. W. and A. W. B. Johnston.** 1989. The evolution of specificity in the legume-*Rhizobium* symbiosis. Trends Ecol. Evol. **4**:341-349.

Zaat, S. A. J., A. A. N. van Brussel, T. Tak, E. Pees, and B. J. J. Lugtenberg. 1987. Flavonoids induce *Rhizobium leguminosarum* to produce *nodD ABC* gene-related factors that cause thick, short roots and root hair responses on common vetch. *J. Bact.* **169**:3388-3391.

Zhang, X., R. Harper, M. Karsisto, and K. Lindström. 1991. Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:104-113.

