



HAL
open science

**Adaptation des bactéries symbiotiques de légumineuses
métallicoles : effets des métaux lourds et de la plante
hôte sur la composition des populations de rhizobia
symbiotiques d'*Anthyllis vulneraria* et de *Lotus
corniculatus***

Roba Mohamad

► **To cite this version:**

Roba Mohamad. Adaptation des bactéries symbiotiques de légumineuses métallicoles : effets des métaux lourds et de la plante hôte sur la composition des populations de rhizobia symbiotiques d'*Anthyllis vulneraria* et de *Lotus corniculatus*. Interactions entre organismes. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONTT153 . tel-01684688

HAL Id: tel-01684688

<https://theses.hal.science/tel-01684688>

Submitted on 15 Jan 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'Université de Montpellier

**Préparée au sein de l'école doctorale GAIA
(Biodiversité, Agriculture, Alimentation,
Environnement, Terre, Eau)**

**Et de l'unité de recherche du LSTM (Laboratoire des
Symbioses Tropicales et Méditerranéennes)**

Spécialité : Biologie des Interactions BDI

Présentée par Roba MOHAMAD

**Adaptation des bactéries symbiotiques de
légumineuses métallophiles : effets des
métaux lourds et de la plante hôte sur la
composition des populations de rhizobia
symbiotiques d'*Anthyllis vulneraria* et de
*Lotus corniculatus***

Soutenue le 15 décembre 2016 devant le jury composé de

Mme Tatiana VALLAEYS	Professeur université de Montpellier	Présidente du jury
M. Alain HARTMANN	Directeur de recherche, INRA, Dijon	Rapporteur
Mme Sylvie NAZARET	Directeur de recherche, CNRS, Lyon	Rapporteur
M. Antoine LE QUERE	Chargé de recherche, IRD, Montpellier	Invité
Mme Brigitte BRUNEL	Professeur SupAgro, INRA, Montpellier	Directrice de thèse



THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'Université de Montpellier

**Préparée au sein de l'école doctorale GAIA
(Biodiversité, Agriculture, Alimentation,
Environnement, Terre, Eau)**

**Et de l'unité de recherche du LSTM (Laboratoire des
Symbioses Tropicales et Méditerranéennes)**

Spécialité : Biologie des Interactions BDI

Présentée par Roba MOHAMAD

**Adaptation des bactéries symbiotiques de
légumineuses métallophiles : effets des
métaux lourds et de la plante hôte sur la
composition des populations de rhizobia
symbiotiques d'*Anthyllis vulneraria* et de
*Lotus corniculatus***

Soutenue le 15 décembre 2016 devant le jury composé de

Mme Tatiana VALLAEYS	Professeur université de Montpellier	Présidente du jury
M. Alain HARTMANN	Directeur de recherche, INRA, Dijon	Rapporteur
Mme Sylvie NAZARET	Directeur de recherche, CNRS, Lyon	Rapporteur
M. Antoine LE QUERE	Chargé de recherche, IRD, Montpellier	Invité
Mme Brigitte BRUNEL	Professeur SupAgro, INRA, Montpellier	Directrice de thèse



Dédicaces

*À mon pays, à tous les Syriens, aux blessés, aux victimes et
aux martyrs de cette guerre qui a l'âge de ma présence en
France (cinq ans et neuf mois)*

**« Mes pensées sont toujours vers ton avenir, si je suis là
aujourd'hui, c'est grâce à toi et pour toi (La Syrie) »**

À mon père, À ma mère

À mes frères et ma sœur

À tous ceux qui me sont chers....

Remerciements

Avant tout, je tiens à exprimer mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie chaleureusement M. Le Professeur **Michel Lebrun**, précédent directeur du Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM) pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je remercie du fond du cœur **Robin Duponnois**, l'actuel directeur du LSTM, pour sa bienveillance, sa sympathie et son aide au cours de ces années en m'assurant les meilleures conditions pour finaliser mes travaux de thèse. J'ai résumé en quelques mots ce que je voulais te dire Robin pour ta fonction de directeur de l'unité. MAIS, d'un côté personnel, mes remerciements ne peuvent être complets en quelques lignes. J'ai pensé qu'il serait facile pour moi de te remercier mais au final tout ce que je dis n'est pas à la hauteur de ce que je ressens. Tu as su prendre soin de moi en étant toujours présent pour m'aider et me guider. Si j'ai apprécié mon séjour au LSTM, c'est grâce à toi, à ton humour, à ta gentillesse et plein d'autres choses.... C'était toujours agréable de discuter avec toi. J'ai été extrêmement sensible à tes qualités humaines d'écoute et de compréhension. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi et j'espère que nous aurons toujours l'occasion de travailler ensemble.

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements à ma directrice de thèse **Brigitte Brunel** qui a été pour moi une directrice de thèse attentive et disponible malgré ses nombreuses occupations de professeur à l'école SupAgro de Montpellier. Sa compétence et sa rigueur scientifique m'ont beaucoup appris. Les nombreuses discussions scientifiques que nous avons pu avoir m'ont énormément aidé et appris. Tu m'as permis de prendre des initiatives, d'être responsable et indépendante. Nos discussions ont été toujours riches dans une très bonne ambiance que j'ai beaucoup appréciée rendant ainsi le travail avec toi tellement agréable. J'ai apprécié également ma participation avec toi dans l'organisation des travaux pratiques à SupAgro pendant ces années de thèse. Je te remercie de m'avoir fait confiance tout au long de ce travail. Tu m'as toujours laissé une très grande autonomie tout en étant là pour me conseiller, réorienter mon travail quand il le fallait. Un grand merci pour tout ce que tu as fait pour moi pour pouvoir terminer ce travail en oubliant pas que grâce à toi, mes connaissances en français se sont beaucoup améliorées avec les nombreux messages que nous avons échangés au quotidien et avec tes nombreux conseils dans la construction des phrases « *regarde sur internet comment on construit une phrase avec « alors que » !!!* ».

Je tiens à remercier aussi les professeurs et les chercheurs qui ont participé à mes comités de thèse : **Estelle Jumas-Bilak, Anne willems, Yves Brin, Lionel Moulin, Antoine Lequéré** et **Agnieszka Klonowska**. Un grand merci à vous tous pour vos nombreux conseils et d'avoir partagé vos connaissances avec moi.

Le travail de cette thèse n'aurait jamais pu être finalisé sans l'aide et le soutien de certaines personnes :

Anne Willems, un grand merci pour ton aide précieux dans les analyses de MALDI-TOF et l'hybridation d'ADN-ADN.

Antoine Le Quéré, je te remercie chaleureusement pour ton aide en phylogénie, en biologie moléculaire et dans les corrections des articles. Tu étais à mes côtés surtout après ton retour du Maroc, prêt à m'aider, me conseiller et m'encourager. Travailler avec toi a été un plaisir. Avec toi, je peux discuter facilement, tu es toujours à mon écoute et je t'en suis très reconnaissante.

Géraldine Maynaud, j'ai eu une chance immense de t'avoir à mes côtés dès mon arrivée au LSTM. Je n'oublierai jamais ton aide pendant mon stage et au début de ma thèse. J'ai beaucoup apprécié ta façon de m'expliquer les expériences, tu as été pour moi une très bonne enseignante. Tu m'as appris beaucoup de choses. Même après ton départ du LSTM, tu ne m'as pas jamais abandonnée. Tu étais et tu es toujours disponible et prête à discuter quand j'en ai besoin. Un grand merci pour toi, pour ta patience. Tu as été pour moi, le meilleur exemple d'une thésarde très studieuse, sérieuse mais aussi ayant de nombreuses qualités humaines. Merci de tout mon cœur.

Erika yashiro, un grand merci pour ton aide dans les analyses d'Unifrac. J'ai beaucoup apprécié ta rigueur scientifique et j'espère pouvoir continuer à collaborer et à travailler avec toi.

Marjorie Pervent, je te remercie chaleureusement pour ton assistance dans mes expériences plantes et celles de biologie moléculaire pendant ces deux dernières années. J'ai apprécié ta motivation et ta ponctualité dans le travail et je t'en suis reconnaissante.

Je remercie chaleureusement tous les agents du LSTM pour leur chaleureux accueil. Je tiens à remercier Marc Le Petit, le chef de l'équipe MASCE auquel j'appartiens et je remercie également les membres de l'équipe. Des remerciements particuliers pour les personnes avec lesquelles j'ai partagé de nombreuses agréables discussions scientifiques et bien d'autres choses, autour de la table ou pendant la pause de café : **Eric, Yves, Fabienne, Pierre T, Pierre C, Naïma, Jean-François, Ezékiel, Hervé, Clémence, Antoine G, Marc D, Philippe D, Odile, Julie, Estelle, Anouk, Karine, Laure, Valérie, Hassan** et **Marc T**. Mes remerciements sont aussi adressés à **Cathy Mortier** et **Nathalie Claudé** pour leur aide dans les tâches administratives.

Je tiens à remercier également les anciens collègues du LSTM : **Lionel, Agnieszka, Gilles, Nathalie P** et **Delphine** pour leur aide et leur sympathie. Je tiens à remercier également **Lucette Maure** et **Marc Boursot** pour leur aide dans mes expériences plantes avant qu'ils ne partent en retraite.

Des remerciements un peu plus particuliers à **Christine Le Roux** pour sa sympathie. C'est difficile de trouver quelqu'un comme toi, aussi gentille, aussi sympathique et aussi adorable. Tu étais toujours à mes côtés durant ces années de thèse. Je te remercie infiniment de m'avoir fait découvrir le monde culturel Français. Je me souviendrai toujours des nombreuses spectacles et soirées qu'on a fait ensemble.

Joël Fardoux que j'appelle le soldat indispensable dans le monde de la science pour le fonctionnement du laboratoire. Un grand merci Joël pour l'aide que tu m'as apportée au quotidien, au niveau technique, durant mes années passées dans le laboratoire.

Et si je prends un peu de recul depuis mon arrivée au LSTM et afin de remercier les nombreuses personnes avec qui j'ai partagé des moments inoubliables, je me souviendrai que :

Je suis arrivée au LSTM, accueillie pour un stage de master 2, le 16 janvier 2012. Mon bureau était dans le coin, salle des thésards « salle au fond » (je ne trouvais à peine mes mots en français). Et oui, un an de cours de Français pour entrer en Master 2 en France, ce n'est pas facile !!!!. J'ai adoré mon bureau, mon coin mais aussi les gens que j'avais la chance de rencontrer dans cette salle : **Géraldine, Rémy, Caroline, Imène et Claire**. J'ai été chaleureusement accueillie. Le LSTM est devenu rapidement ma famille, pas la deuxième mais la première en France. Grâce à vous, je me suis adaptée à la vie française que je connaissais seulement en théorie avant mon arrivée au LSTM. Je vous remercie sincèrement pour votre gentillesse et votre amitié. Et je me suis retrouvée bien intégrée en tant que membre du LSTM pour au moins trois ans et demi. Je ne saurais nommer tous les stagiaires avec qui j'ai partagé d'inoubliables moments, mais je tiens à nommer les thésards et quelques stagiaires avec qui j'ai partagé « un bout de chemin » : **Nicolas, Seif, Adrien, Arnaud, Charline, Phoung, Ahsan, Maymouna, Brayon, Inèse Malika, Fatima, Sara, Rébeca, Sheena, Tasnime, Sânaa, Laurent, Amandine, Albin, Nassima, Aline et Myriame**.

Je tiens à remercier chaleureusement mes professeurs en Syrie **Najm Aldeen Alchrabie** et **Yaser Hammad** pour leur aide et leurs conseils. Un grand merci à vous deux.

D'un côté plus personnel, je voudrais remercier ceux qui me sont chers : Merci à tous mes amis pour leur soutien. UN GRAND MERCI **ALI** pour ton aide précieuse dans mes démarches administratives à Damas. Mes remerciements les plus sincères vont à **Mes parents** pour leur soutien malgré l'éloignement, qui m'ont aussi beaucoup épaulé, non seulement pendant la thèse mais depuis toujours. J'espère que je suis à la hauteur de vos attentes. J'aurais toujours besoin de ton amour et ta tendresse, maman, pour rester sur le bon chemin et atteindre mes objectifs. Merci papa pour ton amour, ta patience, ta présence et pour les nombreux voyages que tu as faits à Damas pour moi malgré le danger. Un grand merci à ma sœur **Rana** pour m'avoir supportée et soutenue au cours de ces années. Tu as toujours été présente pour me conseiller. Merci pour ton amour. Je remercie aussi mes frères « **Ayass, Thaer et Aktham** ». **Ayass**, je te remercie de fond de cœur pour ton aide et ton soutien au quotidien. Je ne pourrais absolument pas oublier de remercier mes nouveaux **Mohamad, Ghadeer, Youssuf, Meryam et Layan** pour leur humour, j'espère que je vous verrai un jour à la hauteur des attentes de vos parents mes chéris.

Veuillez m'excuser si j'ai oublié d'autres personnes. Merci à toutes les personnes qui ont contribué de loin comme de prêt à ce travail de thèse

MERCI A TOUS !

Avant-propos

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés entièrement dans le Laboratoire des Symbioses Tropicale et Méditerranéens (LSTM) à Montpellier, France. Grâce à l'obtention d'une bourse de l'université de Damas en Syrie. Cette bourse a été méritée dans le cadre d'un système d'expatriation des diplômés de l'université dans un pays développé pour apprendre les éléments clés dans le domaine de microbiologie et pour acquérir les compétences de savoir-faire afin de pouvoir participer efficacement dans le développement du pays.

L'encadrement scientifique de cette thèse a été assuré par **Brigitte BRUNEL** (Professeur, SupAgro, Montpellier), directrice de thèse et par **Jean-Claude CLEYET-MAREL** (Directeur de recherche, INRA, Montpellier), co-directeur de thèse.

Les travaux de thèse ont été supportés par le programme de l'Agence Nationale de la Recherche Programme « Contaminants, Ecosystèmes et Santé » (CES 2010-14, ANR-2010 CESA 006 01SyMetal).

Adresse de laboratoire d'Accueil

Laboratoire des Symbioses Tropicale et Méditerranéens (LSTM)
Unité Mixte de Recherche (113) CIRAD/IRD/INRA/Université Montpellier 2/Montpellier
SupAgro
Campus International de Baillarguet
TA-A82/J - 34398 Montpellier cedex 5
France

Sommaire

Introduction Générale

I-	Introduction:	3
II-	Contexte du travail et modèle d'étude :	4
III-	Objectif de la thèse :	7
IV-	Plan de la thèse	8

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I-1	La fixation biologique de l'azote :	11
I-1-1-	Intérêt pour l'environnement et l'agriculture :	11
I-1-2-	Les intérêts agronomiques et environnementaux de la fixation symbiotique de l'azote par les légumineuses :	12
I-2	Les interactions légumineuses/rhizobia et leur spécificité :	12
I-2-1-	Les types des nodosités en fonction de la plante hôte :	12
I-2-2-	La stratégie de nodulation et la reconnaissance du rhizobium par la plante:	14
I-2-2-A-	Les flavonoïdes :	14
I-2-2-B-	Les facteurs Nods (FNs) :	15
I-2-2-C-	Les récepteurs kinases :	16
I-2-2-D-	Les systèmes de sécrétion:	18
I-2-2-E-	Les polysaccharides :	24
I-2-3-	Spécificité de la symbiose :	25
I-2-4-	Définition du terme « symbiovar » dans le cas de la symbiose :	27
I-3	Importance écologique d' <i>Anthyllis vulneraria</i> et de <i>Lotus corniculatus</i> :	30
I-3-1-	La diversité des symbiotes associés à <i>Lotus</i> et à <i>Anthyllis</i> et leur compatibilité :	32
I-3-1-A-	La diversité des symbiotes associés au genre <i>Lotus</i> :	32
I-3-1-B-	Les bactéries endophytes : des co-habitants des symbiotes naturels de <i>Lotus</i> spp.	37
I-3-1-C-	La spécificité des symbiotes vis-à-vis de <i>L. corniculatus</i> :	39
I-3-1-D-	La région symbiotique chez <i>M. loti</i> (l'espèce fréquemment associée à <i>L. corniculatus</i>) :	41
I-3-2-	Les symbiotes associés à <i>A. vulneraria</i> et leur compatibilité avec <i>L. corniculatus</i> :	45
I-4	<i>Mesorhizobium</i> : diversité, spécificité et interaction avec l'environnement :	46
I-4-1-	Diversité du genre <i>Mesorhizobium</i> :	46
I-4-2-	La spécificité de <i>Mesorhizobium</i> envers leur plante hôte :	48

I-4-2-A- Les symbiovars dans le genre <i>Mesorhizobium</i> :	48
I-4-2-B- Le phénomène du transfert lateral de l'îlot symbiotique chez <i>Mesorhizobium</i> :	49
I-4-3- Interactions des espèces de <i>Mesorhizobium</i> avec l'environnement :	50
I-5 Impact des métaux lourds sur la diversité des bactéries du sol :	51
I-6 Mécanismes d'adaptation des bactéries aux métaux lourds :	52
I-7 Adaptation des souches de rhizobia aux métaux lourds :	56
I-8 Les différentes stratégies de gestion des sols contaminés :	57
I-8 La symbiose fixatrice d'azote légumineuses/rhizobia dans la stratégie de la phytostabilisation et l'impact des métaux sur la symbiose :	59

Chapitre II : Diversité des souches associées à *Anthyllis vulneraria*

II-1- Introduction	63
II-2- Article soumis dans <i>Applied and Environmental Microbiology</i> : (actuellement en cours de revision).....	65
II-3- Synthèse.....	101

Chapitre III : Définitions de nouvelles espèces du genre *Mesorhizobium*

III-1- Introduction.....	107
III-2- Premier papier taxonomie soumis dans <i>Systematic and Applied Microbiology</i>	108
III-3- Deuxième papier taxonomie à soumettre dans <i>Systematic and Applied Microbiology</i>	134
III-4- Synthèse	170

Chapitre IV : Diversité des souches associées à *Lotus corniculatus*

IV-1- Introduction:	175
IV-2- Article en préparation.....	177
IV-3- Synthèse :	245

Chapitre V : Discussion générale et perspectives

V- Discussion générale et perspectives	251
---	------------

Références bibliographiques

Références bibliographiques :	273
-------------------------------------	------------

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AON	Autorégulation de nodulation
ARNt	Acide RiboNucléique de transfert
As	Arsenic
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
BNF	Biological Nitrogen Fixation
Cd	Cadmium
CDS	Coding DNA Sequence
CHR	Chromate Ion Transporter family
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CSP	Common Symbiosis Pathway
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétraacétique
ENOD40	Early nodulin 40
EPS	ExoPolysaccharide de Surface
FNs	Facteurs Nods
Hg	Mercure
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
ITS	Internal Transcribed Spacer
Kg	Kilogramme
kb	kilo-paire de base
LPS	LipoPolysaccharide de Surface
LysM-RLKs	LysM receptor-like kinase
LysM	Lysin motif
ml	milli-litre
mM	milli-Molaire
NaCl	Chlorure de sodium
N₂	L'azote atmosphérique
NH₄⁺	Ammonium
NIN	Nodule Inception
NO₃⁻	Nitrate
nt	nucléotide
Pb	Plomb
phe-tRNA	Phénylalanine-ARNt synthétase
TSS	Système de sécrétion

μM	micro-Molaire
Vol ou v	Volume
YEM	Milieu de culture Yeast Extract Medium
Zn	Zinc

Listes des publications et de communications scientifiques

Publications

Roba Mohamad, Geraldine Maynaud, Antoine Le Quéré, Céline Vidal, Agnieszka Klonowska, Erika Yashiro, Jean-Claude Cleyet-Marel, Brigitte Brunel : Ancient heavy metal contamination in soil as a driver of tolerant *Anthyllis vulneraria* rhizobial communities. (papier soumis, *Applied and Environmental Microbiology*). **Chapitre II**

Roba Mohamad, Anne Willems, Antoine Le Quéré, Géraldine Maynaud, Marjorie Pervent, Maurine Bonabaud, Emeric Dubois, Jean-Claude Cleyet-Marel, Brigitte Brunel : *Mesorhizobium delmotii* and *Mesorhizobium prunedense* are two new rhizobial species within the symbiovar anthyllidis nodulating the legume *Anthyllis vulneraria* (soumis, *Systematic and Applied Microbiology*). **Chapitre III**

Roba Mohamad, Anne Willems, Antoine Le Quéré, Marjorie Pervent, Géraldine Maynaud, Maurine Bonabaud, Emeric Dubois, Jean-Claude Cleyet-Marel, Brigitte Brunel : *Mesorhizobium faucesventi* and *Mesorhizobium escarrei*: two novel species isolated from *Anthyllis vulneraria* root nodules from Col du Vent site, Languedoc-Roussillon, France (en préparation). **Chapitre III**

Roba Mohamad, Antoine Le Quéré, Marjorie Pervent, Jean-Claude Cleyet-Marel, Brigitte Brunel : Comparison of *Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulneraria* rhizobial genetic structures impacted by heavy metal contents in soils (en préparation). **Chapitre IV**

Communications scientifiques

R. Mohamad, G. Maynaud, J.C. Cleyet Marel et B. Brunel. Analysis of the diversity of symbiotic bacteria of *Anthyllis vulneraria*. Réseau LOCOMET, Lille, France, 2012. *Présentation orale.*

R. Mohamad, G. Maynaud, J.C. Cleyet Marel et B. Brunel. *Lotus corniculatus*-rhizobia : modèle d'étude et intérêt pour la restauration d'anciens sites miniers. Rencontre de l'ANR SyMetal, Montpellier, France, 2013. *Présentation orale.*

R. Mohamad, G. Maynaud, J.C. Cleyet Marel et B. Brunel. Diversité des bactéries symbiotiques d'*Anthyllis vulneraria*. Les journées des doctorants Inra du département SPE, Montpellier, 2013. *Présentation orale.*

R. Mohamad, G. Maynaud, J.C. Cleyet Marel et B. Brunel. Comparaison des souches symbiotiques isolées d'*Anthyllis vulneraria* piégées à partir de sols présentant un gradient de contamination en métaux. 11^{èmes} rencontres Plante- Bactéries, Aussois, France, 2014. *Présentation orale.*

R. Mohamad, G. Maynaud, J.C. Cleyet Marel et B. Brunel. Zinc-Lead mine soils shape genetic diversity and distribution of *Anthyllis vulneraria* rhizobial symbionts. 13^{ème} rencontre BAGECO “Symposium on Bacterial Genetics and Ecology”, Milan, Italie, 2015. *Poster*.

B. Brunel et R. Mohamad. *Lotus corniculatus*-rhizobia : modèle d'étude et intérêt pour la restauration d'anciens sites miniers. Rencontre de l'ANR SyMetal, Montpellier, France, 2015. *Présentation orale*.

R. Mohamad et B. Brunel. *Anthyllis*/rhizobia interaction in soils having different levels of heavy metals. 3^{ème} rencontre de conference Nitrogen “The nitrogen nutrition of plant-Nitrogen2016”, Montpellier, France, 2016. *Poster*.

Tables des figures et des tableaux

Liste des figures de l'introduction générale :

- Figure IG-1** : Photographie du bassin de décantation de la mine des Avinières. *Anthyllis vulneraria* est présente sur le site.....6
- Figure IG-2** : Photo de la mine de Montdardier. *Lotus corniculatus* est présente sur le site 6

Listes des figures du chapitre I : Synthèse bibliographique

- Figure I-1** : Les différents stades de la formation des nodosités de type déterminé (les stades de développement des nodules sont numérotés de 1 à 4) et indéterminé (les stades de développement des nodules sont numérotés de i à iv) (d'après Schumpp and Deakin, 2010). 13
- Figure I-2** : Voies majeures de biosynthèse des flavonoïdes. Des exemples de plusieurs structures et de la diversité des flavonoïdes sont fournis dans la figure (Hassan and Mathesius, 2012). 14
- Figure I-3** : Schéma montrant la diversité de facteurs Nods (FNs) (Downie, 2010). 15
- Figure I-4** : Interaction entre le rhizobium et sa plante hôte (Laranjo et al., 2014) 16
- Figure I-5** : Stratégie de nodulation entre les deux partenaires légumineuse/rhizobium (Masson-Boivin et al., 2009)..... 17
- Figure EI-1** : Une résumé des systèmes de sécrétions chez les bactéries (Tseng et al., 2009). 20
- Figure I-6** : Un modèle proposé montrant le rôle de protéines effectrices dans la symbiose (Nelson and Sadowsky, 2015). 22
- Figure I-7** : Modèle de nodulation par le système de sécrétion de type III chez les rhizobia (d'après Okazaki et al., 2013). 23
- Figure I-8** : Exemple de structures chimiques des expolysaccharides chez des souches de *Rhizobium leguminosarum* (Janczarek, 2011). 24
- Figure I-9** : Schéma d'échange des signaux symbiotiques et la spécificité d'hôte (Long, 1996). 27
- Figure I-10** : Arbre phylogénétique obtenu à l'aide du marqueur moléculaire ITS (Espaceur Interne Transcrit qui une région de l'ADN ribosomique non fonctionnel (en anglais « Internal Transcribed Spacer ») de *Loteae* (Nanni et al., 2004). 31
- Figure I-11** : Nodosités déterminées d'*A. vulneraria* subsp. *carpatica* et *L. corniculatus*. (Photographie de Mohamad R 2015) 32
- Figure I-12** : la structure de FN's (Lipo-chitin oligosaccharides (LCOs)) chez des souches *M. loti*. (Lopez-Lara et al., 1995).....39
- Figure EII-1** : Les caractères généraux des îlots génomiques (Juhas et al., 2009) 42
- Figure I-13** : Exemple d'îlots génomiques codant pour différentes fonctions chez différentes souches bactériennes. (Hentschel and Hacker, 2001). 43
- Figure I-14** : Mécanismes de résistance aux effets toxiques des métaux lourds chez les microorganismes (Pavel et al., 2013). 53
- Figure I-15** : Les stratégies de la phytoremédiation utilisées pour dépolluer un sol contaminé en métaux lourds (Bolan et al., 2014) 58

Liste des figures du chapitre II : Diversité des souches associées à l'*Anthyllis*

- Fig. II-2-1**: Zn (A) and Cd (B) MIC data of the 137 *Anthyllis* rhizobia studied and classified by their sites of origin. 73

Fig. II-2-2: Maximum-likelihood concatenated phylogenetic tree based on 16S rRNA, <i>atpD</i> and <i>recA</i> genes sequences showing the relationships between the <i>A. vulneraria</i> isolates used in this study and reference strains.....	75
Fig. II-2-3 : Ordination analysis of the rhizobial communities. The weighted UniFrac distance matrix from the OTU table that was clustered at a threshold of 100% was used as the input matrix for generating the ordination graph.....	77
Fig. II-2-4: Maximum-likelihood phylogenetic tree based on partial <i>nodA</i> gene sequences (394 nt) showing the relationships between the <i>A. vulneraria</i> isolates obtained in this study and reference strains.....	79
Fig. II-2-S1A: Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences (1165 nt), showing relationships between <i>A. vulneraria</i> isolates and reference strains (supplementary data).....	96
Fig. II-2-S1B: Maximum-likelihood phylogenetic trees of partial <i>recA</i> (A) showing the relationships between the <i>A. vulneraria</i> isolates obtained in this study and reference strains (supplementary data)..	97
Fig. II-2-S1C: Maximum-likelihood phylogenetic trees of partial <i>atpD</i> (B) showing the relationships between the <i>A. vulneraria</i> isolates obtained in this study and reference strains (supplementary data)	98
Fig. II-2-S2: Maximum-likelihood phylogenetic tree based on partial CadA protein sequences (203 amino acids) showing the relationships between the <i>Anthyllis vulneraria</i> isolates obtained in this study and reference strains. (supplementary data).....	99
Fig. II-2-S3: Spearman correlation network of the environmental parameters available for the study sites. (supplementary data).....	100

Liste des figures du chapitre III : Définitions de nouvelles espèces du genre *Mesorhizobium*

Fig. III-2-1: Maximum-likelihood phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of all strains used in this study and the type strains of <i>Mesorhizobium</i> species.....	114
Fig. III-2-2: Maximum-likelihood phylogenetic concatenated tree based on <i>atpD</i> (375 nt), <i>dnaK</i> (258 nt), <i>glnII</i> (504 nt) and <i>recA</i> (357 nt) gene sequences, of all strains used in this study and the type strains of <i>Mesorhizobium</i> species.....	115
Fig. III-2-3: Dendrogram based on the protein mass fingerprint patterns analyzed by Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for studied strains and reference type strains of <i>Mesorhizobium</i>	117
Fig. III-2-4: Maximum-likelihood tree of partial sequences of <i>nodC</i> ((393 nt) showing the relationships between the new type strains and reference strains indicating the different symbiovars (sv.) defined within the genus of <i>Mesorhizobium</i>	118
Fig. III-2-S1: Maximum-likelihood phylogenetic trees of partial gene sequences of <i>recA</i> (291nt) (A), <i>atpD</i> (375 nt) (B), <i>dnaK</i> (252 nt) (C) and <i>glnII</i> (504 nt) (D) of all strains used in this study and the type strains of <i>Mesorhizobium</i> species. (supplementary data).....	132-133
Fig. III-3-1: Maximum-likelihood phylogenetic tree based on 16S rDNA (1216 nt) sequences of all strains used in this study and the type strains of <i>Mesorhizobium</i> species.....	140
Fig. III-3-2: Maximum-likelihood phylogenetic tree based on <i>atpD</i> (375 nt), <i>dnaK</i> (252 nt), <i>glnII</i> (504 nt) and <i>recA</i> (357 nt) gene sequences, of all strains used in this study and the type strains of <i>Mesorhizobium</i> species.....	141
Fig. III-3-3: Dendrogram based on the protein mass fingerprint patterns analyzed by Time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for strains studied and reference type strains of <i>Mesorhizobium</i>	144

Fig. III-3-S1A: Maximum-likelihood phylogenetic trees of partial <i>recA</i> (291 nt) showing the relationships between the <i>A. vulneraria</i> isolates obtained in this study and reference strains.	164
Fig. III-3-S1B: Maximum-likelihood phylogenetic trees of partial <i>atpD</i> (375 nt) showing the relationships between the <i>A. vulneraria</i> isolates obtained in this study and reference strains.	165
Fig. III-3-S1C: Maximum-likelihood phylogenetic trees of partial <i>dnaK</i> (252 nt) showing the relationships between the <i>A. vulneraria</i> isolates obtained in this study and reference strains.	166
Fig. III-3-S1D: Maximum-likelihood phylogenetic trees of partial <i>glnII</i> (474 nt) showing the relationships between the <i>A. vulneraria</i> isolates obtained in this study and reference strains.	167
Fig. III-3-S2: Maximum-likelihood phylogenetic trees of partial <i>nodC</i> (393) showing the relationships between the type strains of novel proposal species (STM4922 ^T and STM5069 ^T) and reference strains.	168
Figure III-4-1 : La diversité taxonomique des souches sensibles isolées d'un site moyennement contaminé et des sites non contaminés.....	171

Liste des figures du chapitre IV : Diversité des souches associées à *Lotus corniculatus*

Fig. IV-2-1: Zn (A) and Cd (B) MIC data of the 170 <i>Anthyllis</i> - and <i>Lotus</i> -rhizobia studied and classified by their sites of origin.....	194
Fig. IV-2-2: Maximum-Likelihood phylogenetic tree based on 16S rRNA (1138 nt) gene sequences, showing the relationships between isolates nodulating <i>Anthyllis vulneraria</i> and <i>Lotus corniculatus</i> and reference strains.....	197
Fig. IV-2-3: Maximum-Likelihood concatenated phylogenetic tree based on 16S rRNA (1086), <i>atpD</i> (378) and <i>recA</i> (255) gene sequences showing the relationships between the <i>Anthyllis vulneraria</i> and <i>Lotus corniculatus</i> isolates used in this study and reference strains.	198
Fig. IV-2-5: Presence (black bars) and absence (grey bars) of the <i>cadA</i> marker as detected by PCR amplification in <i>Mesorhizobium</i> from <i>Anthyllis vulneraria</i> and <i>Lotus corniculatus</i> root nodules from four soils contaminated and moderately contaminated in heavy metals	206
Fig. IV-2-4: Maximum-Likelihood phylogenetic tree based on partial <i>nodA</i> gene sequences (366 nt) showing the relationships between the <i>Anthyllis vulneraria</i> and <i>Lotus corniculatus</i> isolates obtained in this study and reference strains.	209
Fig. IV-2-S1A: Maximum-likelihood phylogenetic trees of partial <i>recA</i> (246 nt) gene sequences showing the relationships between the <i>Anthyllis vulneraria</i> and <i>Lotus corniculatus</i> isolates obtained in this study and reference strains.	242
Fig. IV-2-S1B: Maximum-likelihood phylogenetic trees of partial <i>atpD</i> (378) gene sequences showing the relationships between the <i>Anthyllis vulneraria</i> and <i>Lotus corniculatus</i> isolates obtained in this study and reference strains.	243
Fig. IV-2-S2: Neighbor-joining phylogenetic tree based on partial <i>CadA</i> protein sequences (207 amino acids) showing the relationships between the <i>Anthyllis vulneraria</i> and <i>Lotus corniculatus</i> isolates obtained in this study and reference strains.....	244

Liste de figures du chapitre V : Discussion générale et perspectives

Figure V-1 : Tolérance aux métaux lourds (Zn et Cd) des souches isolées d' <i>A. vulneraria</i> (A) ou d' <i>A. vulneraria</i> et de <i>L. corniculatus</i> (B) à partir de sites présentant un gradient de contamination métallique sites miniers (Avinières 1, St Bresson 1, Eylie, Breinic et Montdardier 1) périphéries de sites miniers (Avinières 2, St Bresson 2 et Montdardier 2) et sites non contaminés (Col du Vent et La Prunarède).	254
--	------------

Figure V-2 : Répartition des souches étudiées associées à <i>A. vulneraria</i> (A) ou <i>A. vulneraria</i> et <i>L. corniculatus</i> (B) isolées des différents sites : Avinières 1, St Bresson 1, Eylie, Breinic et Montdardier 1 correspondent aux sites miniers très contaminés en métaux lourds. Avinières 2, St Bresson 2 et Montdardier 2 correspondent aux sites moyennement contaminés situés à la périphérie des sites miniers. Col du Vent et La Prunarède correspondent à deux sites non contaminés localisés dans la région des Cévennes.....	258
Figure V-3 : Répartition, en fonction des sites, des isolats identifiés sur la base du type de gène <i>nodA</i> des souches isolées soit uniquement d' <i>A. vulneraria</i> (A), soit d' <i>A. vulneraria</i> et de <i>L. corniculatus</i> à partir du même échantillon de sol (B). N1 correspond aux souches ayant les deux gènes <i>nodA</i> du symbiovar anthyllidis, N2 correspond aux souches ayant un gène <i>nodA</i> du symbiovar loti (spectre d'hôtes étroit), N3 correspond aux souches ayant deux gènes <i>nodA</i> du symbiovar loti (large spectre d'hôtes).	262
Figure V-4 : Types de gène <i>nodA</i> des souches isolées selon le site géographique à partir de nodosités d' <i>A. vulneraria</i> (A, cf. chapitre II) ou d' <i>A. vulneraria</i> et de <i>L. corniculatus</i> à partir du même échantillon de sol et dans les mêmes conditions expérimentales (B, cf. chapitre IV).	265
Figure V-5 : Répartition des types <i>nodA</i> des souches de la nouvelle espèce métallicole du genre <i>Mesorhizobium</i> détectée sur la mine de Montdardier en fonction de la plante hôte utilisée pour le piégeage des souches,.....	267
Figure V-6 : Pourcentage des isolats pour lesquels un fragment du gène <i>cadA</i> a été détecté par amplification PCR. Isolats provenant d' <i>A. vulneraria</i> (A) ou d' <i>A. vulneraria</i> et de <i>L. corniculatus</i> (B)..	268

Liste des tableaux du chapitre I : Synthèse bibliographique

Tableau I-1 : Effet du système de sécrétion de type III (T3SS) et du type IV (T4SS) sur la symbiose. (Nelson and Sadowsky, 2015).....	21
Tableau I-2 : Exemple de la capacité de nodulation de symbiotes de l'ordre des rhizobiales en fonction de l'espèce végétale. (Perret et al., 2000).....	26
Tableau I-3 : Exemple des symbiotes connus selon les légumineuses et leurs espèce de rhizobia (d'après Rogel et al., 2011)	29
Tableau I-4 : Le spectre d'hôte des souches de <i>Bradyrhizobium</i> et de <i>Mesorhizobium</i> isolées de <i>Lotus uliginosus</i> , à l'exception de la souche NZP2037 isolée de <i>L. divaricatus</i> utilisé comme un témoin (d'après Batista et al., 2013).....	36
Tableau I-5 : Espèces de <i>Mesorhizobium</i> actuellement décrites, Les souches types avec leurs plantes hôtes et le pays d'isolement.....	46-47

Liste des tableaux du chapitre II : Diversité des bactéries associées à *Anthyllis vulneraria*

Table II-2-S1 : Detailed description and characterization of the 137 Anthyllis rhizobial strains used in this study. (supplementary data)	89-90
Table II-2-S2: accession numbers of representative isolates and references strains for the different gene sequences. (supplementary data).....	91-93
Table II-2-S3: Location, edaphic and climatic characteristics of the sites studied and % of nodulated <i>Anthyllis</i> plants used for rhizobial trapping. (supplementary data)	94
Table II-2-S4: P-values of MIC paired comparisons by non-parametric statistic tests (Kruskal Wallis test with adjusted P-values by False Discovery Rate (FDR) approach). (supplementary data)	95

Listes des tableaux du chapitre III : Définitions de nouvelles espèces du genre *Mesorhizobium*

Table III-2-1: Phenotypic differences among studied strains and reference strains	119
Table III-2-2: % GC and DNA-DNA hybridization values between representative strains of <i>Mesorhizobium</i> isolated from <i>A. vulneraria</i> from Avinières 2 (STM4623 ^T and STM6544), La Prunarède site (STM4891 ^T) and type strains of <i>M. robiniae</i> STM9271 ^T , <i>M. temperatum</i> STM9272 ^T , <i>M. muleiense</i> STM9273 ^T and <i>M. mediterraneum</i> STM104 ^T	120
Table III-2-3: Average Nucleotide Identity (ANI) and DNA-DNA hybridization <i>in silico</i> (DDH) between strains representing the novel clades and the most closely related sequenced members among the genus <i>Mesorhizobium</i>	121
Table III-2-S1: Bacterial strains from <i>A. vulneraria</i> subsp. <i>carpatica</i> used in this study, growth characteristic in YEM medium and heavy metal sensitivity. (supplementary data)	130
Table III-2-S2: Nodulation and nitrogen fixation abilities (means ± standard deviation) on <i>Anthyllis vulneraria</i> subsp. <i>carpatica</i> inoculated with <i>Mesorhizobium</i> types strains. Positive and negative controls. (supplementary data)	131
Table III-3-1: The percentage of GC and DNA-DNA hybridization values between five <i>Mesorhizobium</i> strains isolated from <i>A. vulneraria</i> and reference strains	143
Table III-3-2: Average Nucleotide Identity (ANI) and DNA-DNA Hybridization <i>in silico</i> (DDH) between studies strains and reference strains	145
Table III-3-3: Nodulation abilities on <i>A. vulneraria</i> subsp. <i>carpatica</i> inoculated with <i>Mesorhizobium</i> types strains STM4922 ^T and STM5069 ^T	147
Table III-3-S1 Accessions and characteristics of the studied and reference genomes used for average nucleotide identity (ANI) and <i>in silico</i> DNA-DNA hybridation (DDH) calculations. (supplementary data)	155
Table III-3-S2: Differential phenotypic characteristics among strains studied and reference strains. (supplementary data)	156-162
Table III-3-S3: Antibiotic characterization among strains studied and reference strains. (supplementary data)	163

Liste des tableaux du chapitre IV : Diversité des souches associées à *Lotus corniculatus*

Table IV-2-1: Physico-chemical characteristics of the studied soils and % of nodulated <i>Anthyllis</i> and <i>Lotus</i> plants used for rhizobial trapping. Soil metals were measured after soil extraction with a 0.05 M EDTA solution pH=7 (ratio 1:10 (w/v))	186
Table IV-2-2: Data on <i>Anthyllis</i> and <i>Lotus</i> plants nodulated after rhizobial trapping on the four study sites, and the percentage of successful rhizobial isolation on YEM plates.	187
Table IV-2-3: Metal tolerance and phylogenetic characteristics of the 170 strains isolated from <i>Lotus corniculatus</i> and <i>Anthyllis vulneraria</i> root nodules used in this study.....	189-193
Table IV-2-4: Numbers of isolates from <i>Anthyllis</i> and <i>Lotus</i> nodules (n=170) belonging to each phylogenetic group defined by 16S rRNA, <i>recA</i> , <i>atpD</i> , <i>CadA</i> and <i>nodA</i> typing.	199
Table IV-2-5: Average Nucleotide Identity (ANI in % ± confidence interval) under the diagonal and <i>in silico</i> DNA-DNA Hybridization (DDH in %± confidence interval) above the diagonal and indicated in bold.....	202-204

Table IV-2-6: Nodulation and nitrogen fixation parameters (mean ± standard deviation (n=10 plants) on <i>Lotus corniculatus</i> (indicated in bold) and <i>Anthyllis vulneraria</i> subspecies <i>carpatica</i> inoculated with 14 representative strains, <i>M. metallidurans</i> STM2683 ^T , or supplemented with nitrogen (5 mM) or uninoculated as positive or negative controls.....	211-212
Table IV-2-7: Nodulation and nitrogen fixation parameters ((mean ± standard deviation (n=10 plants)) on <i>Lotus corniculatus</i> and <i>Anthyllis vulneraria</i> subspecies <i>carpatica</i> grown in contaminated soil and inoculated with 14 representative strains, STM2683T or two nitrogen and uninoculated controls	214-215
Table IV-2-S1: Detailed description and characterization of the 170 strains isolated from <i>Lotus corniculatus</i> and <i>Anthyllis vulneraria</i> used in this study. (supplementary data)	230-235
Table IV-2-S2: Accession numbers of representative strains for the different genes used. (supplementary data)	236-239
Table IV-2-S3: P-values of MIC paired comparisons by non-parametric statistic tests (Mann-Whitney U test), for Zn and Cd data between each site (white boxes) and between the two host plants for each of the four sites (dark grey boxes). (supplementary data)	240
Table IV-2-S4: Characteristics and percentage of similarity among amino acid sequences of <i>zntA</i> -like genes found in the genomes sequenced in this study in comparison with the genome of STM2683. (supplementary data)	241

Liste des tableaux du chapitre V : Discussion générale et perspectives

Tableau V-1 : Localisation géographique et caractéristique des sites où ont été prélevés les sols pour le piégeage et l'isolement des bactéries symbiotiques	252
Tableau V-2 : Relation entre le symbiovar des souches isolées et : le site, la présence sur le site de la plante hôte utilisée pour le piégeage	260

Listes des encadré du chapitre I : Synthèse bibliographique

Encadré I : systèmes de sécrétion	19-20
Encadré II : l'îlot génomique.....	42
Encadré II : mécanismes de résistance aux métaux lourds.....	54-55

Introduction générale

I- Introduction:

Le mouvement des éléments traces dans les écosystèmes, les agrosystèmes et les chaînes alimentaires est un phénomène complexe. Des éléments comme As, B, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb, Se et le Zn sont généralement présents dans le sol en faibles concentrations mais celles-ci peuvent augmenter à cause de processus naturels et des activités humaines comme la combustion de combustibles fossiles, l'exploitation minière, les engrais chimiques, les pratiques agricoles (Bañuelos and Ajwa, 1999). Les éléments traces sont fréquemment classifiés selon leur importance vis-à-vis de la croissance des plantes, soit comme éléments essentiels (micronutriments) soit comme éléments toxiques. Le terme « éléments traces » comprend des éléments métalliques, non métalliques et les métalloïdes comme Se, B, Mo et As. Au cours de ma thèse, j'utiliserai le terme de « métaux lourds » pour désigner les éléments traces qui ont une masse volumique supérieure à 5000 kg m⁻³. La contamination environnementale par les métaux lourds est liée aux activités anthropiques. Les teneurs excessives en métaux lourds dans le sol provoquent des perturbations dans les écosystèmes terrestres naturels et détruisent la biodiversité (Wei et al., 2007; Yadav et al., 2009). Dans le cas d'une faible exposition aux métaux lourds, beaucoup d'organismes peuvent rester vivants grâce aux ajustements métaboliques. Mais, quand l'homéostasie cellulaire du métal est perturbée, les communautés des organismes les plus sensibles disparaissent en laissant émerger les espèces les plus adaptées (Mergeay et al., 2003; Guala et al., 2010; Op De Beeck et al., 2015).

Les sites miniers sont des zones fortement contaminées en métaux lourds comme Zn, Pb, Cd, Ni, Cu et/ou du Cr (Reeves et al., 2001; Boularbah et al., 2006). En plus de la forte contamination en métaux lourds, ces déblais miniers sont souvent laissés à l'abandon, avec des substrats pauvres en matières organiques et facilement érodables où la croissance des plantes est significativement réduite. Il est donc important d'élaborer des stratégies efficaces pour limiter le transfert des métaux lourds dans d'autres compartiments de l'environnement en établissant une couverture végétale durable constituée d'espèces adaptées aux milieux chargés en métaux lourds. La faible biodiversité présente sur les sites miniers et la sensibilité des espèces végétales introduites sur le site a conduit à identifier les rares espèces végétales locales qui pourront présenter un intérêt et être utilisées pour la végétalisation des sites fortement contaminés en métaux lourds.

II- Contexte du travail et modèle d'étude :

En France, des sites miniers comme celui des Avinières à Saint Laurent-le-Minier et de Montdardier (Gard) ont constitué des zones importantes d'exploitation des métaux lourds au cours de XIXe siècle et ce jusqu'à la fin du XXe siècle pour la mine des Malines (Gard). Ils ont été délaissés et représentent des cas exemplaires de pollutions très élevées en métaux lourds (Zn, Pb et Cd) en région méditerranéenne (à titre indicatif, les valeurs obtenues sur les sols des Avinières et de Montdardier après l'extraction à l'EDTA sont respectivement de : 40237, 26900 mg.kg⁻¹ pour le Zn, 15551, 8030 mg.kg⁻¹ pour le Pb et 44, 132 mg.kg⁻¹ pour le Cd). Les sites miniers sous climat méditerranéen sont des milieux extrêmes avec de très fortes contraintes édaphiques et climatiques. Après la fermeture des sites industriels, les déblais miniers fortement chargés en métaux ont été abandonnés. Ces déblais peuvent être facilement transférables par ruissellement ou par le vent et transportés dans les milieux environnants, modifiant considérablement les activités biologiques et perturbant remarquablement l'équilibre écologique.

La phytostabilisation est une technique qui vise à mettre en place une couverture végétale durable qui peut servir à contenir la pollution des sites fortement contaminés en utilisant des plantes tolérantes aux métaux lourds mais non accumulatrices des métaux : ces plantes vont permettre d'immobiliser les métaux lourds par leur adsorption et leur accumulation par les racines ou leur précipitation dans la rhizosphère (Wong, 2003). La phytostabilisation améliore la stabilité des sites contaminés soumis à l'érosion et limite la dissémination des polluants dans les terrains alentours et dans les eaux. La mise en place de systèmes végétaux nécessite l'apport de matières organiques dans les substrats miniers. Sur le long terme, l'ajout de matières organiques combinée à la plantation de légumineuses est essentiel afin de pérenniser le couvert végétal, d'améliorer la qualité du sol et de développer des conditions favorables au développement des plantes. La phytostabilisation présente également l'avantage d'être moins coûteuse et plus facile à mettre en place sur les sites miniers que la phytoextraction (basée sur l'utilisation de plantes accumulatrices).

Lotus corniculatus et *Anthyllis vulneraria* sont des légumineuses de la famille des *Fabacées* et elles sont phylogénétiquement proches. Elles forment des nodosités avec des bactéries appartenant au genre *Mesorhizobium*. *A. vulneraria*, espèce bisannuelle, compte plus de 30 sous-espèces identifiées. En effet, *A. vulneraria* possède un important polymorphisme morphologique. La taxonomie d'*Anthyllis* se base sur la morphologie de la plante, mais l'existence de formes intermédiaires rend l'identification difficile, et beaucoup d'individus peuvent être identifiés uniquement par comparaison avec un herbier (Lampinen, 1992). Mahieu et al. (2011) ont montré qu'en symbiose avec une souche bactérienne de *M. metallidurans* adaptée aux conditions métalliques extrêmes, 70 à 80 % de l'azote de la plante était issu de la fixation biologique. *A. vulneraria* présente

un intérêt comme légumineuse facilitatrice de l'installation d'autres espèces végétales tolérantes aux métaux sur d'anciens sites miniers (Frérot et al., 2006). En parallèle, *Lotus* est un genre de la tribu *Loteae* comprenant environ 120-130 espèces annuelles et vivaces. Ces dernières sont très répandues dans le monde grâce à leur capacité adaptative aux différents stress environnementaux (Escaray et al., 2012). L'espèce *L. corniculatus*, peut être un bon candidat pour la restauration écologique des sols présentant des déficiences en nutriments, soumis à une forte salinité, sécheresse ou à une forte contamination (Belesky et al. 1999, Diaz et al., 2005). Cette espèce présente une large diversité génotypique (Steiner et al., 1999), ce qui présuppose l'existence de différences dans les phénotypes et la fécondité au sein des différentes populations de *L. corniculatus* séparées géographiquement. Cela peut jouer un rôle sur la survie des plantules de *Lotus* utilisées dans la restauration environnementale (Smith et al., 2009). La variabilité adaptative et sa tolérance aux contraintes édaphiques des génotypes de *L. corniculatus* font que c'est une espèce d'intérêt pour les programmes de revégétalisation (Escaray et al., 2012). *A. vulneraria* est une légumineuse bisannuelle présente essentiellement dans les milieux ouverts et disparaît après la colonisation des sols par les autres espèces végétales. Le fait que *L. corniculatus* soit une légumineuse vivace, avec une forte capacité adaptative et compétitive, lui confère des avantages supplémentaires par rapport à l'*Anthyllis*, notamment en assurant une entrée d'azote atmosphérique continue dans le couvert végétal. L'étude de la structure génétique et phénotypique des populations de bactéries symbiotiques pouvant s'associer à ces deux légumineuses revêt un grand intérêt et constitue une étape clé pour trouver la meilleure adaptation des deux partenaires (plante/rhizobium) et une bonne stratégie pour l'installation durable de la couverture végétale dans les sites miniers.

Les bactéries capables de s'associer avec des *Fabacées* appartiennent à l'ordre des *Rhizobiales* et à la classe des alphaproteobacteries. Ce sont des bactéries Gram-négatif ayant une importance agronomique et écologique due à leur capacité à fixer l'azote atmosphérique en symbiose avec les Fabacées. Cette capacité permet à la plante de croître en mobilisant l'azote présent dans l'atmosphère. L'utilisation de la symbiose légumineuse/rhizobium est une approche importante dans la remédiation de sites chargés en métaux lourds mais la performance de cette relation symbiotique est impactée par les métaux lourds qui réduisent la colonisation des racines par les rhizobia et leurs activités de fixation de l'azote. Le développement des symbioses tolérantes aux métaux lourds est une nécessité absolue pour accélérer la croissance des légumineuses dans les sols contaminés en métaux lourds et stabiliser les sols des anciens sites miniers (Teng et al., 2015; Egamberdieva et al., 2016).

Les travaux réalisés au laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM) à Montpellier participent à la réhabilitation des sites miniers en France en développant des stratégies pour les revégétaliser en testant différentes stratégies qui sont susceptibles de développer une couverture végétale durable et ainsi d'utiliser l'approche la plus convenable. La stratégie consistant à s'appuyer sur l'utilisation d'espèces végétales locales est à privilégier, ce qui nous a conduits à

rechercher parmi les espèces prédominantes celles qui sont susceptibles de constituer *in situ* le mélange le plus performant pour un couvert végétal stable et permanent (Frérot et al., 2006). Il a ainsi été observé sur l'ancienne mine des Avinières (concession de Saint Laurent le Minier) la présence d'une légumineuse (*A. vulneraria*) (**Figure IG-1**) associée à des bactéries fixatrices d'azote (*Mesorhizobium*) ainsi qu'une autre légumineuse (*L. corniculatus*) sur le site minier de Montdardier (**Figure IG-2**).



Figure IG-1 : Photographie du bassin de décantation de la mine des Avinières (St Laurent-le-minier, Gard). *Anthyllis vulneraria* est présente sur le site. (Photo Cleyet-Marel J.C 2006)

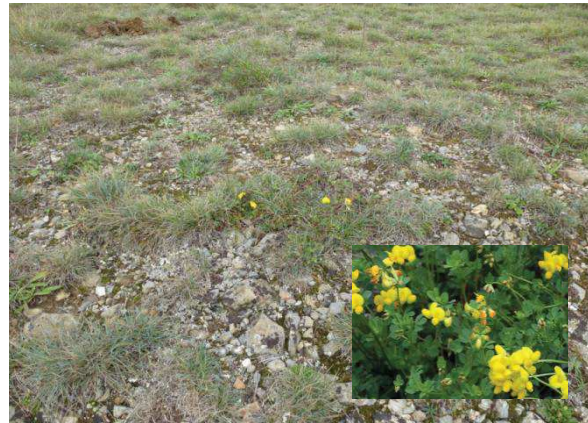


Figure IG-2 : Photo de la mine de Montdardier (10 Km au nord de la mine des Avinières). *Lotus corniculatus* est présente sur le site (Photo Mohamad R 2012)

En 2009, 31 souches résistantes aux Zn et Cd (CMI de Zn=16-32 mM, CMI de Cd=0.3-0.5 mM) isolées d'*A. vulneraria* de la mine des Avinières ont été caractérisées génétiquement et il a été découvert qu'elles appartiennent à une nouvelle espèce du genre *Mesorhizobium* appelée *Mesorhizobium metallidurans* dont la souche type est STM2683^T (Vidal et al., 2009). En 2013, des analyses transcriptomiques basées sur la méthode de RNAseq effectuées sur la souche STM2683^T par (Maynaud et al., 2013) ont permis l'identification de gènes répondant spécifiquement au Zn ou au Cd : il a été démontré que plusieurs gènes codant pour un système d'efflux et de séquestration des métaux sont « up-régulés » et que ces gènes sont impliqués dans les mécanismes de résistance aux métaux lourds. Le genre *Mesorhizobium* comprend, à l'heure actuelle, 41 espèces isolées des sols ayant des conditions environnementales très variées. Seule *M. metallidurans* a été définie comme une espèce résistante aux métaux lourds. A l'intérieur de ce genre, le génome de *Mesorhizobium amorphae* CCNWGS0123 isolée d'un site minier a révélé la présence de gènes impliqués dans la résistance de cette souche au Cu (Hao et al., 2015). Par ailleurs, le génome de la souche *Mesorhizobium* sp STM4661 provenant du site minier Eylié (Pyrénées ariégeoises) possède, comme la souche type STM2683^T, des gènes impliqués dans la résistance de cette souche aux Zn et Cd (Maynaud et al., 2013).

III- Objectif de la thèse :

L'importance écologique des rhizobia et leur capacité à fixer le l'azote moléculaire (N₂) m'ont incité à focaliser mon travail de thèse sur l'étude des bactéries métallocoles et non-métallocoles symbiotiques en interaction avec leurs partenaires végétaux, *A. vulneraria* et *L. corniculatus*, pour mieux comprendre leur adaptation aux conditions environnementales extrêmes et leur relation avec les deux plantes hôtes.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre *M. metallidurans* - *A. vulneraria* initialement observée sur le site minier des Avinières, pour tenter de répondre aux questions suivantes : (i) Existents-ils des souches de *M. metallidurans* sensibles aux métaux lourds ? (ii) Quelle est la distribution de cette espèce dans d'autres sites contaminés et dans les sites non contaminés? Pour cela, nous avons **analysé la diversité génétique et phénotypique des souches bactériennes métallocoles et non-métallocoles isolées des nodosités d'*A. vulneraria* obtenues à partir de sols présentant des teneurs variables en métaux lourds.**

Dans un second temps, en retenant comme plante hôte *Lotus corniculatus*, écotype présent sur l'ancien site minier de Montdardier dans le Gard) nous avons cherché à : (i) identifier les bactéries symbiotiques qui lui sont associées dans des sites fortement chargés en métaux lourds (ii) savoir si les souches bactériennes associées à *Anthyllis vulneraria* métallocole sont performantes à la fois avec *A. vulneraria* et *L. corniculatus* (iii) savoir s'il existes des souches spécifiques pour chacune des 2 espèces végétales *A. vulneraria* et *L. corniculatus* (iv) déterminer la distribution des souches bactériennes selon différents niveaux de contamination des sols en métaux. Pour répondre à ces questions **la diversité génétique et phénotypique des partenaires symbiotiques** associés à *L. corniculatus* a été étudiée et comparée à celle des symbiotes d'*A. vulneraria*. Des approches génétiques et phénotypiques nous ont permis de mettre en évidence le statut taxonomique et les propriétés symbiotiques distinctes ou partagées entre les rhizobia associés à *A. vulneraria* et *L. corniculatus*.

IV- Plan de la thèse

Cette thèse se compose de quatre chapitres :

Le chapitre I présente une **synthèse bibliographique** portant sur (i) la fixation biologique de l'azote par les rhizobia (ii) la diversité des symbiotes associés aux genres *Anthyllis* et *Lotus* et leur spécificité envers ces deux légumineuses (iii) le genre *Mesorhizobium* : Diversité, spécificité et interaction de ces espèces avec l'environnement (iv) les mécanismes d'adaptation des bactéries aux métaux lourds (v) l'impact des métaux lourds sur la diversité des bactéries dans le sol (vi) les différentes stratégies de phytoremédiation pour la restauration des milieux contaminés.

Le chapitre II s'intitule « **Structure génétique de rhizobia associées à *Anthyllis vulneraria* selon un gradient de contamination de sol en Zn et Cd** ». Il comprend l'analyse de la diversité et de la répartition des symbiotes métallophiles d'*A. vulneraria* en comparaison avec des symbiotes non métallophiles provenant de divers sites miniers, de sites faiblement et non contaminés. Les souches ont été distinguées sur la base de la détermination de la concentration minimale inhibitrice du Zn et du Cd et l'analyse génétique de marqueurs moléculaires taxonomiques, symbiotiques (gène *nodA*) et de résistance aux métaux lourds (gène *cadA1*).

Le chapitre III est relatif à la **description de nouvelles espèces du genre *Mesorhizobium* symbiotiques d'*A. vulneraria* à partir de nouveaux groupes bactériens identifiés dans le chapitre II. Les souches retenues sont toutes sensibles aux métaux et ont été** isolées d'un site moyennement contaminé et de deux autres sites non contaminés. Des analyses fondamentales pour la définition d'une espèce bactérienne ont été réalisées : elles reposent sur l'hybridation d'ADN-ADN et l'approche de MALDI-TOF en comparaison avec des souches types d'espèces définies antérieurement.

Le Chapitre IV concerne la **répartition des souches symbiotiques associées à *Lotus corniculatus* dans des sites miniers contaminés en Zn/Cd et dans des sites faiblement contaminés, puis leur comparaison avec celle des souches isolées d'*A. vulneraria*** ». Ce chapitre se focalise, sur l'étude de la résistance aux métaux des rhizobia associées à *L. corniculatus* isolés de sites contaminés en métaux ou faiblement contaminés situés au nord de Montpellier. La composition génétique des populations de rhizobia associées à *L. corniculatus* est également comparée avec la structure génétique des souches bactériennes associées à *A. vulneraria* ou de celles associées à *Anthyllis*. Cette partie comprend aussi une comparaison des propriétés symbiotiques des souches associées à ces deux légumineuses en amplifiant un gène de nodulation chez toutes les souches étudiées et en effectuant un test de nodulation avec une quinzaine de souches pour tester la spécificité des souches vis à vis d'*A. vulneraria* et de *L. corniculatus*.

Le Chapitre V est une **discussion générale** de l'ensemble des résultats de la thèse avec les **perspectives** qui se dégagent de ce travail.

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

I-1 La fixation biologique de l'azote :

I-1-1- Intérêt pour l'environnement et l'agriculture :

L'azote est un élément essentiel pour le développement de la plante. Il représente une composante majeure dans l'architecture moléculaire de la chlorophylle, pigment largement impliqué dans le fonctionnement de la photosynthèse. Il se retrouve également dans d'autres molécules d'intérêt telles que l'ATP et les acides nucléiques. L'azote atmosphérique (N_2) est très abondant dans l'atmosphère sous forme gazeuse (environ 80% de la masse d'atmosphère), mais les formes azotées ne peuvent être assimilées par la plante que sous sa forme réduite (nitrate NO_3^- ou ammonium NH_4^+). Les voies principales à partir desquelles la plante peut acquérir l'azote sont : (i) en absorbant les minéraux azotés du sol, provenant d'engrais ou d'amendements apportés, ou de la minéralisation de la matière organique du sol ou des résidus de culture qui retournent au sol. (ii) en fixant biologiquement l'azote de l'atmosphère en association avec des micro-symbiotes (Vance, 2001; Puri et al., 2015). La production d'engrais azotés nécessite un important apport d'énergie et représente une source importante de pollution pour l'environnement. Par contre, la fixation biologique de l'azote est un processus biologique non polluant et très performant en termes de mobilisation de l'azote atmosphérique (Peoples, 1995; Herridge et al., 2008).

La fixation biologique de l'azote (BNF) est réalisée par un groupe spécifique de procaryotes. Ces organismes utilisent une enzyme appelée nitrogénase pour catalyser la transformation de l'azote atmosphérique (N_2) en azote ammoniacal (NH_4^+), forme azotée assimilable par la plante (Franche et al., 2009). Certains genres bactériens fixent l'azote (N_2) en conditions libres c'est-à-dire non associés à un hôte (appelés en anglais « free-living bacteria ») tels qu'*Azotobacter*, *Rhodospseudomonas* (Kranz and Haselkorn, 1985; Jiménez et al., 2011). D'autres bactéries sont capables de fixer l'azote en établissant une symbiose avec la plante hôte comme les rhizobia associées aux plantes de la famille des légumineuses et de *Parasponia* (Carlsson and Huss-Danell, 2003; Op den Camp et al., 2012), les bactéries du genre *Frankia* avec les plantes des genres *Casuarina*, *Allocasuarina*, *Alnus*, etc (symbiose actinorhizienne) (Benson and Silvester, 1993) et les cyanobactéries avec les plantes des genres *Azolla* and *Gunnera* (Fay, 1992; Nilsson et al., 2000; Bocchi and Malgioglio, 2010). Parmi tous ces exemples, la BNF par les rhizobia a été plus particulièrement étudiée pour les caractéristiques des partenaires impliqués, leurs mécanismes régissant son fonctionnement et son impact sur le développement de la légumineuse associée et sur la fertilité des sols.

I-1-2- Les intérêts agronomiques et environnementaux de la fixation symbiotique de l'azote par les légumineuses :

La fixation symbiotique de l'azote, associant des rhizobia à des légumineuses, permet de diminuer les apports d'azote dans le sol via l'utilisation d'engrais chimiques tout en conservant un niveau de fertilité azoté adéquat pour assurer la productivité de l'agrosystème (Dwivedi et al., 2015). En conséquence, la valorisation de la fixation symbiotique de l'azote est une composante fondamentale dans la conception d'une révolution doublement verte en offrant toute une gamme d'avantages contribuant à l'identification de pratiques culturales respectueuses de l'environnement. En effet, les légumineuses ont de nombreuses propriétés allant de la production de ressources riches en protéines, en lipides, en éléments minéraux et en vitamines jusqu'à l'amélioration de la qualité des sols (teneurs en azote, en matière organique, structure du sol) permettant ainsi d'optimiser durablement la productivité de l'agrosystème mais également sa rentabilité financière (Köpke and Nemecek, 2010; Chianu et al., 2011; Lupwayi et al., 2011; Mahieu et al., 2011).

Les légumineuses établissent une symbiose avec des rhizobia en formant des nodosités au niveau de leurs systèmes racinaires. Les rhizobia sont des bactéries Gram-négatif appartenant en grande majorité à la division des *Alphaproteobacteria* (Willems, 2006; MacLean et al., 2007) ainsi qu'à la division des *Betaproteobacteria* tels que *Burkholderia*, *Cupriavidus* et *Ralstonia* (nommées Beta-rhizobia) (Chen et al., 2003; Balachandar et al., 2007; Gyaneshwar et al., 2011). Les rhizobia des *Alphaproteobacteria* sont taxonomiquement groupées dans des espèces et des symbiovars (Rogel et al., 2011) appartenant à plusieurs genres de rhizobia: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Neorhizobium* et *Pararhizobium* (Jarvis et al., 1997; De Lajudie et al., 1998a; Masson-Boivin et al., 2009; Mousavi et al., 2014; Mousavi et al., 2015). A l'intérieur d'autres genres bactériens d'*Alphaproteobacteria*, des espèces nommées Alpha-rhizobia comme *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Aminobacter*, *Microvirga*, *Shinella* et *Phyllobacterium* sont aussi capables de former une symbiose avec des légumineuses (Willems, 2006; Maynaud et al., 2012; Dwivedi et al., 2015).

I-2 Les interactions légumineuses/rhizobia et leur spécificité :

I-2-1- Les types des nodosités en fonction de la plante hôte :

La nodosité est un nouvel organe formé à l'issue de la symbiose et se compose principalement au stade mature de cellules végétales infectées par les bactéroïdes qui vont fixer l'azote atmosphérique et le transformer sous sa forme ammoniacale pour la transférer à la plante hôte (Schumpp and Deakin, 2010). Selon le positionnement du méristème, on distingue deux types de nodosité : une forme déterminée et une forme indéterminée. La morphologie et la structure de la nodosité sont contrôlées

par la plante hôte, alors que l'efficacité de la BNF est contrôlée essentiellement par le symbiote bactérien qui varie génétiquement et phénotypiquement (Sprent, 2007). Dépendant de la légumineuse, les nodosités déterminées, ou bien indéterminées ont pour différence majeure l'origine de la couche cellulaire qui est impliquée dans la prolifération des cellules dans le cortex de la racine et la perte ou le maintien de l'activité mitotique (Foucher and Kondorosi, 2000). Les nodosités indéterminées trouvent leur origine dans le cortex interne et maintiennent un méristème apical persistant qui aboutit à des nodules de forme allongée ou en forme de bâton sur les racines de certaines légumineuses comme *Medicago sativa* (la luzerne), *Pisum sativum* (le pois). Le développement des nodosités déterminées débute par une division cellulaire dans le cortex externe et la perte rapide de l'activité mitotique donne naissance à des nodosités sphériques sur des légumineuses comme *Glycine max* (soja), *Phaseolus vulgaris* (haricot blanc), *Vigna unguiculata* (le niébé) et *Lotus* spp. (Hirsch, 1992; Goormachtig et al., 1998) cités par (Foucher and Kondorosi, 2000) (**Figure I-1**).

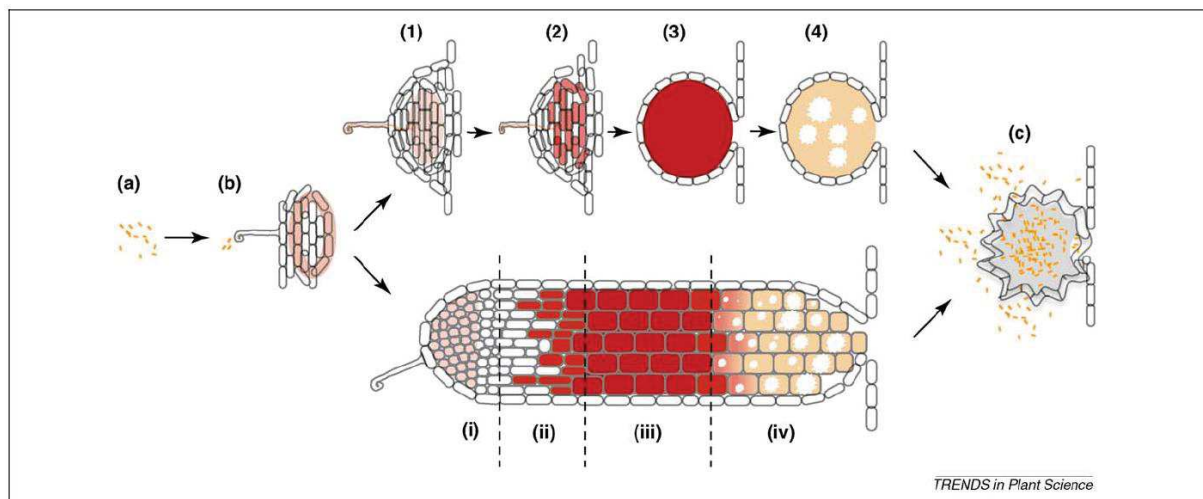


Figure I-1 : Les différents stades de la formation des nodosités de type déterminé (les stades de développement des nodules sont numérotés de 1 à 4) et indéterminé (les stades de développement des nodules sont numérotés de i à iv) (d'après Schumpp and Deakin, 2010).

Le déclenchement de l'organogénèse nodulaire est une conséquence de la reconnaissance mutuelle effectuée par l'intermédiaire des signaux chimiques. **(a)** les rhizobia peuvent être présents en tant que saprophytes se nourrissant de composés organiques libérés des racines des plantes. **(b)** Rapprochement du rhizobium et déformation du poil racinaire pour permettre aux bactéries de pénétrer dans la plante puis provoquer la différenciation des cellules corticales dans les primordia de méristème. Ensuite, les membranes plasmiques des poils racinaires s'invaginent, formant le cordon d'infection, consacré au transport des rhizobia vers le primordia développé (stade 1 et i). Quand, le cordon de l'infection arrive au centre de la future nodosité, il se ramifie et les rhizobia sont libérés et se développent dans une membrane cellulaire au sein de la cellule végétale (symbiosome) et se dispersent dans le cytosol de cellules végétales (le stade de l'infection, 2 et ii). Les rhizobia, ensuite, s'agrandissent et se différencient en bactéroïdes qui fixent l'azote. En parallèle, les cellules infectées de la plante subissent plusieurs cycles d'endo-réduplication (L'endo-reduplication : implique une ou plusieurs séries de synthèse de l'ADN nucléaire sans des divisions chromosomiques ou cellulaires (Traas et al., 1998)) (Mergaert et al., 2006), ce qui entraîne la formation de grandes cellules polyploïdes hébergeant des milliers de symbiosomes (stade 3 et iii). Après une période de fixation active de l'azote pour laquelle la durée dépend du stade de développement de la plante et des conditions environnementales, les nodosités vieillissent (stade 4 et iv). **(c)** une fraction des rhizobia différenciés à l'intérieur de la nodosité est capable de se diviser et revenir à un mode de vie saprophyte lorsqu'ils sont libérés dans la rhizosphère (Paau et al., 1980; Schumpp and Deakin, 2010).

I-2-2- La stratégie de nodulation et la reconnaissance du rhizobium par la plante:

Une des principales caractéristiques qui distinguent les légumineuses d'autres espèces végétales est leur capacité à développer des nodosités fixatrices d'azote sur leurs racines avec des espèces de rhizobia. Ces nodosités se sont formées suite à des échanges de signaux (flavonoïdes, facteurs Nods) entre les racines de la plante et les rhizobia.

I-2-2-A- Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires produits par la plante. Leur structure comprend des flavones, flavonols, flavanols, flavanones, isoflavonoïdes et isoflavans (**Figure I-2**) (Hassan and Mathesius, 2012).

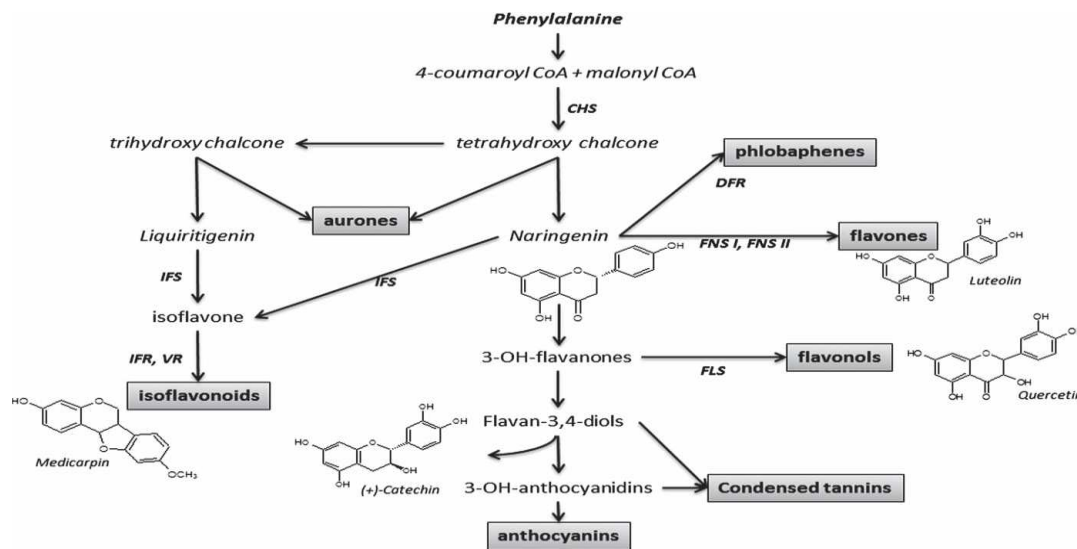


Figure I-2 : Voies majeures de biosynthèse des flavonoïdes. Des exemples de plusieurs structures et de la diversité des flavonoïdes sont fournis dans la figure (Hassan and Mathesius, 2012).

Les fonctions des flavonoïdes sont variées (Ex : inducteurs des gènes *nod*, et chimioattractifs des rhizobia, stimulateurs de la germination des spores mycorrhiziennes, régulateurs du quorum-sensing chez les bactéries). La structure et la quantité de flavonoïdes produites dépendent de l'espèce végétale. Dans le cas de *Trifolium repens*, par exemple, cette légumineuse contient seulement 1 mg de flavones par gramme de masse végétale, avec comme composants principaux des (di) malonates. Les espèces *Trifolium dubium* et *Lotus corniculatus*, contiennent 50-65 mg.g⁻¹ de flavones avec comme composants principaux des (di) glycosides (De Rijke et al., 2004). La plante hôte utilise toutes les fonctions nécessaires pour la construction de l'organe spécifique à la symbiose (Gourion et al., 2015; Granqvist et al., 2015; Toth and Stacey, 2015). Les flavonoïdes influencent la compétitivité des souches de rhizobia et leur activité symbiotique, comme dans le cas de *R. leguminosarum* où les

flavonoïdes sont des inducteurs du promoteur *nodA* qui rendent les souches plus compétitives (Maj et al., 2010).

I-2-2-B- Les facteurs Nods (FNs) :

Ces sont des molécules de signalisation composées de lipochitolysaccharides sécrétés par le rhizobium pour induire la formation des nodosités sur les racines de la plante et qui répondent de façon spécifique selon l'espèce végétale (Guerts and Bisselling, 2002; Geurts et al., 2005). Les FN ont un rôle très important car ils déclenchent l'organogenèse du nodule et sont indispensables dans les processus d'infection et de colonisation de la plante hôte (Long, 1996; Guerts and Bisselling, 2002). Les gènes de nodulation sont classés dans trois catégories : (i) les gènes communs *nodABC* qui sont essentiels pour la nodulation et les mutations de ces gènes conduisent à un phénotype Nod⁻; (ii) des gènes spécifiques (*nodEF*, *nodH*, *nodG*, *nodPQ*...etc) qui déterminent le spectre d'hôte des microsymbiotes et conditionnent le taux et la fréquence de la formation des nodosités (**Figure I-3**); (iii) la famille de régulateur (gènes *nodD*) (Maj et al., 2010). Les différentes légumineuses sécrètent des types différents de signaux et les rhizobia ont des structures différentes des protéines NodDs qui sont sensibles à la reconnaissance des signaux des exsudats racinaires. Les protéines NodD sont liées aux promoteurs le plus conservés chez les bactéries (appelé *nodboxes*) et induisent l'expression de plusieurs gènes (Downie, 2010) (**Figure I-4**).

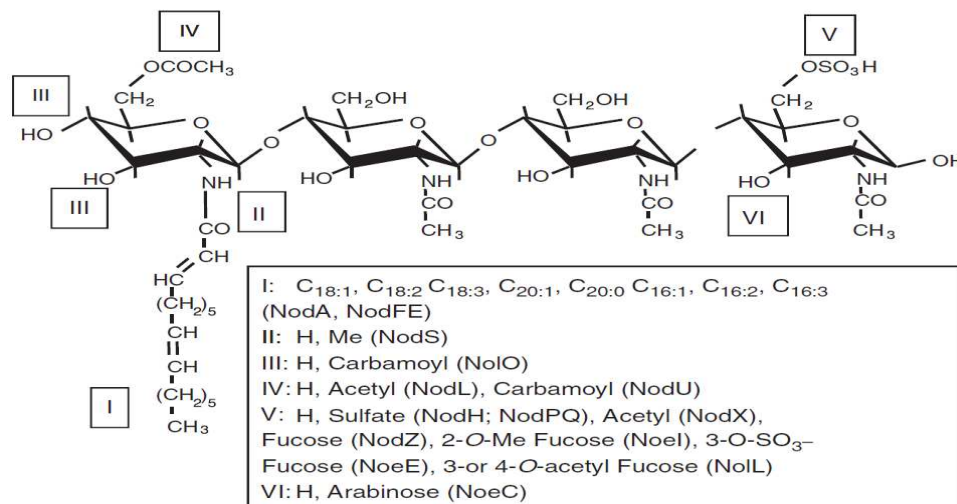


Figure I- 3 : Schéma montrant la diversité des facteurs Nods (FNs) (Downie, 2010).

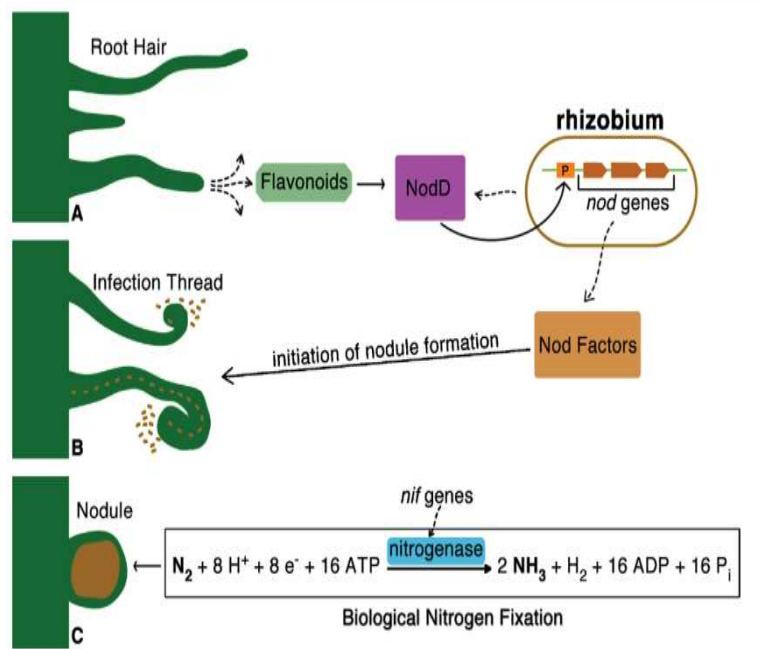


Figure I-4 : Interaction entre le rhizobium et sa plante hôte (Laranjo et al., 2014).

I-2-2-C- Les récepteurs kinases :

L'interaction légumineuse/rhizobium est initiée par la reconnaissance du FN par les récepteurs de la plante hôte. Les récepteurs sont des molécules nécessaires pour faciliter l'infection microbienne et la symbiose (Spaink, 2004; Gust et al., 2012). Les structures des FNs (résidus de glucose N acétyl amines) sont capables de se lier à des récepteurs kinases grâce à leurs domaines LysM (lysine motif) : ces récepteurs kinases sont dénommés LysM-RLKs pour « LysM receptor-like kinase » (Masson-Boivin et al., 2009; Gust et al., 2012) (**Figure I-5**). Les LysM-RLKs identifiés chez les espèces des légumineuses modèles sont LjNFR1/LjNFR5 (Nod Factor Receptor 1 et 5) chez *Lotus japonicus*, GmNFR1/GmNFR5 chez le soja (*Glycine max*) et LYK3/NFP [‘Lysine motif receptor like-kinase 3 et Nod Factor Perception NFP] chez *Medicago truncatula*, leurs mutations changent significativement la capacité de nodulation (Amor et al., 2003; Indrasumunar et al., 2010; Madsen et al., 2011; Toth and Stacey, 2015). Nakagawa et al, (2011) ont montré qu'après une heure d'incubation des racines de *L. japonicus* en présence de FNs, 493 gènes de la racine ont été activés, dont 192 sont régulés spécifiquement par FNs et 331 sont régulés par chitine oligosaccharides. Cet impact concerne certains gènes impliqués dans le système de défense des plantes qui peuvent être activés par des molécules de chitine oligosaccharides excrétées par des microorganismes phytopathogènes. Toutefois et après sept heures de traitement avec le FN, l'expression des gènes de défense retrouve son niveau d'origine. Le récepteur LjNFR1 chez *L. japonicus* est homologue à AtCERK1 (récepteur de chitine chez

Arapidopsis taliana, impliqué dans les réactions de défense de la plante). Les récepteurs hypothétiques de chitine (LjLys6 et LjLys7) appartiennent au même clade du récepteur LjNFR1 chez *L. japonicus* et sont capables d'induire l'expression des gènes symbiotiques indépendamment des récepteurs de FNs à travers la voie symbiotique commune (CSP) qui est nécessaire pour la nodulation et la mycorrhization. Cette étude suppose que les récepteurs de FNs ont évolué à partir d'anciens récepteurs de chitine (Nakagawa et al., 2011).

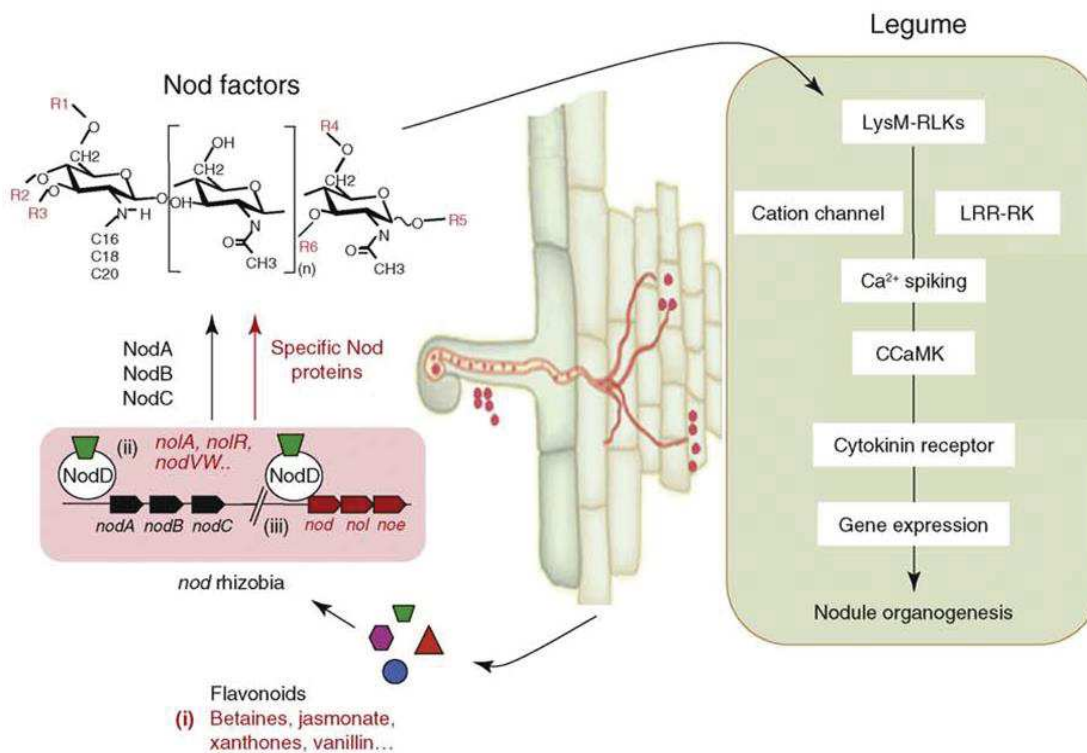


Figure I-5 : Stratégie de nodulation entre les deux partenaires légumineuse/rhizobium : Plusieurs étapes dans ce processus (indiqué en rouge) se succèdent à partir de flavonoïdes jusqu'à la synthèse des FNs, sont résumés ici (i) les flavonoïdes de la plante qui sont reconnus par les protéines régulatrices NodDs. (ii) Les régulateurs qui peuvent moduler l'expression des gènes *nod* chez les rhizobia. (iii) Les gènes de nodulation : la synthèse de FN est contrôlée, principalement, par les gènes *nodABC* qui sont communs à tous les rhizobia. Une souche spécifique contient d'autres gènes de nodulation (*nod*, *nol* ou *noe*) qui ajoutent des décorations différentes à la structure de base (Masson-Boivin et al., 2009).

I-2-2-D- Les systèmes de sécrétion:

Les systèmes de sécrétion T1SS, T2SS et T5SS transportent simplement des protéines et des composés à l'extérieur de la cellule bactérienne. Les types de sécrétion T3SS, T4SS et T6SS contiennent des sous familles capables de transporter les protéines de type effecteurs dans le cytosol des cellules des eucaryotes (**Encadré I**) (Tillotson and Tillotson, 2009; Nelson and Sadowsky, 2015).

Des études récentes (Deakin and Broughton, 2009; Gourion et al., 2015; Nelson and Sadowsky, 2015) ont montré l'existence de traits communs entre les processus d'infection par les rhizobia et ceux développés par les pathogènes. Des analyses transcriptomiques chez *Lotus japonicus* et *Medicago truncatula* ont suggéré que l'expression de gènes impliqués dans la défense de la plante augmente avec le temps après l'inoculation par les rhizobia pendant les stades intermédiaires de développement des nodosités et que le niveau de cette expression diminue après le développement des nodosités matures (D'Antuono et al., 2008; Jones et al., 2008). Cette observation fait écho à l'affirmation selon laquelle « les symbiotes sont des pathogènes intelligents » et qui suppose que les symbiotes sont capables d'éviter le système de défense de la plante (Deakin and Broughton, 2009). La revue de (Nelson and Sadowsky, 2015) a cité diverses études qui suggèrent que les associations symbiotiques peuvent évoluer d'un format de type bénéfique à un format de type pathogène et vice-versa, comme dans le cas d'*Agrobacterium tumefaciens* (pathogène végétal) qui possède une origine ancestrale commune avec le rhizobium. Andrio et al, (2013) ont montré que plus de 300 gènes induits pendant les étapes initiales du processus symbiotique sont régulés par la molécule H₂O₂ (impliquée dans les mécanismes de défense de la plante) chez *Medicago truncatula*. Kimbrel et al (2013) ont pu identifier 268 gènes candidats codant pour des effecteurs impliqués dans les systèmes de sécrétion de type III chez des souches de *Bradyrhizobium japonicum* et *Ensifer fredii*. Ces effecteurs ont co-évolué avec le système de défense de l'hôte. Chez *B. japonicum*, les gènes de sécrétion de type III se retrouvent largement distribués sur une longueur d'environ 700 kb dans l'îlot symbiotique (Kimbrel et al., 2013). Le succès du développement de la symbiose dépend de la capacité à réprimer le système immunitaire de la plante. Cette capacité a un rôle potentiel dans la spécificité des rhizobia envers la plante hôte (Gourion et al., 2015). Les légumineuses ont développé un mécanisme de régulation pour contrôler le nombre de nodosités sur leur système racinaire, *via* un mécanisme appelé « autorégulation de nodulation » (AON) (Herridgea. D and Rose. I, 2000; Kiers. ET et al., 2003; Nelson and Sadowsky, 2015). Cette relation symbiotique peut aisément évoluer vers une interaction de type pathogène si la plante perd sa capacité à réguler le nombre total des nodosités formées ou le nombre des rhizobia formant des nodosités (Herridgea. D and Rose. I, 2000; Kiers. ET et al., 2003). Le séquençage des génomes de plusieurs souches de rhizobia a montré la présence de systèmes de sécrétion similaires à ceux que les bactéries pathogènes utilisent pour infecter la plante hôte. Ces systèmes peuvent être

réprimés par le rhizobia pour éviter la « contre-attaque » par la plante (Marie. C et al., 2001; Krause. A et al., 2002; Gourion et al., 2015; Nelson and Sadowsky, 2015).

Encadré I : Systèmes de sécrétion

Pour que les pathogènes puissent attaquer les cellules hôtes, les bactéries y injectent des facteurs spécifiques tel que l'ADN ou des protéines. Ces facteurs traversent l'enveloppe bactérienne via des « système de sécrétion ». Des études ont montré que les bactéries bénéfiques qui vivent dans la rhizosphère ou qui forment des symbioses avec la plante ont aussi développé différents systèmes de sécrétion qui leur permettent de s'adapter aux conditions environnementales extrêmes et faciliter la colonisation de leurs hôtes. Sept voies de sécrétion de la protéine ont été décrites dont six chez les bactéries Gram négatif (de type I à Type VI) et un système de sécrétion de type VII qui est spécifiquement présent chez les bactéries Gram-positif de l'ordre des Actinomycetales telle que les mycobacteries (Abdallah et al., 2007) (**Figure EI-1**).

Le système de sécrétion de type I (T1SS) :

Ce système permet de délivrer les protéines différenciées en taille et selon leurs fonctions du cytoplasme des bactéries au milieu extracellulaire en une seule étape sans une étape intermédiaire périplasmique. La structure commune des protéines sécrétées est généralement la présence de motifs répétés de glycine-riches nonapeptides connus comme des motifs RTX qui forment la structure stabilisée β -roll par les ions de calcium coordonnés (González and Gonzalez-López, 2013).

Les protéines sécrétées par le système de sécrétion de type I chez les espèces de rhizobia ont été identifiées chez *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* lorsque la protéine NodO est sécrétée via le système de sécrétion de type I (PrsDE) (Krehenbrink and Downie, 2008), seize substrats de type I potentiellement ont été identifié chez *Ensifer meliloti* dont quelques protéines qui sont impliquées dans la synthèse et la sécrétion de EPS ; T1SS a été aussi retrouvé chez *M. huakuii* MAFF303099 et *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (Delepelaire, 2004).

Le système de sécrétion de type II (T2SS) :

Ce système est un processus à deux étapes qui peut être distingués génétiquement et biochimiquement. Les protéines sont synthétisées avec des peptides signal permettant à la sécrétion Sec- ou Tat- dépendante de traverser la membrane cytoplasmique suivie par la disparition du peptide signal et la libération de la protéine mature dans la périplasme (**Figure I. 1**). Ce système peut favoriser la croissance des bactéries dans certaines niches environnementales.

Certaines souches de rhizobia possèdent des gènes codant pour T2SS comme *M. huakuii* MAFF303099 et *B. japonicum* USDA110 (Cianciotto, 2005).

Le système de sécrétion de type III (T3SS) :

Ce système a été étudié intensivement vu son importance dans l'induction de maladies des plantes et des animaux. La machinerie de sécrétion comprenant environ 20 protéines conservées, s'étend de la membrane interne à la membrane externe en traversant l'espace périplasmique et s'allonge à l'extérieur à travers la structure cylindrique appelé « pilus » qui forme un étroit conducteur nécessaire pour la sécrétion de la protéine et l'injection des effecteurs directement dans la cellule hôte. Le terme « effecteur » regroupe l'ensemble des protéines liées à T3SS qui exercent leur fonction principalement dans la cellule hôte. Ce complexe protéique « pilus » forme un canal utilisé par les effecteurs pour déplacer du cytoplasme des bactéries au cytoplasme de la cellule hôte (Pallen et al., 2003).

A l'heure actuelle, plusieurs protéines appelé Nops (en anglais « Nodulation outer proteins ») ont été identifiées comme des protéines sécrétées par T3SS chez les souches de rhizobia : NopA, NopB, NopC, NopD, NopE1/E2, NopF, NopH, NopJ, NopL, NopM, NopP, NopT, NopX, Mlr6361, GunA2 et Pg1. NopD, NopJ, NopM, NopT et Mlr6361 sont des effecteurs qui existent aussi dans les pathogènes des plantes et des animaux alors que NopL, Nop et NopE1/E2 sont spécifiques au rhizobia (Deakin and Broughton, 2009). Le rôle des autres protéines sécrétées telle que GunA2 et Pg1 est potentiellement de dégrader la pectine de la cellule de la plante mais leur fonction n'est pas encore prouvée (González and Gonzalez-López, 2013).

Une mutation dans un des gènes impliqués dans la machinerie T3SS chez la souche *Ensifer fredii* USDA257 permet à la souche d'acquérir la capacité d'induire des nodosités fixatrices d'azote avec les cultivars américains de soja alors que la souche sauvage est incapable de les noduler. Par contre, l'inactivation du même gène chez la souche *E. fredii* HH103 limite la nodulation avec les cultivars américains et asiatiques de soja (Meinhardt et al., 1993; López-Baena et al., 2009). Dans le cas de *M. huakuii* MAFF303099, l'inoculation de *L. japonicus* avec une mutation dans les gènes d'effecteurs Nops réduit l'expression du gène NIN chez la plante (impliqué dans la création des nodules). L'expression de ce gène est nécessaire pour le développement du cordon d'infection et le déclenchement de la division cellulaire qui initie la formation des primordia nodulaires (Sánchez et al., 2009).

Le système de sécrétion de type IV (T4SS) :

Ce système déplace l'ADN et les substrats protéiques à travers l'enveloppe cellulaire par un mécanisme qui exige un contact direct avec la cellule ciblée. Trois types de T4SS ont été décrits : i) les systèmes de conjugaison, sont les machines qui déplacent l'ADN et les protéines aux cellules réceptrices par le processus contact-dépendant, ii) les systèmes translocateurs qui délivrent des protéines ou d'autres molécules d'effecteurs aux cellules eucaryotes ciblées et iii) les systèmes qui déplacent l'ADN vers le milieu extracellulaire. Trois ATPases, VirB4, VirB11 et VirD4 renforcent les substrats de sécrétion et aident à l'assemblage du système. La membrane interne est composée de la protéine polytopique membranaire VirB6 et des protéines bitopiques membranaires VirB8 et VirB10. La structure de la membrane externe est inconnue, le complexe VirB9 avec la lipoprotéine VirB7 peut être une partie de cette structure (González and Gonzalez-López, 2013).

T4SS a été détecté chez *M. loti* R7A, *E. fredii* NGR234 et *E. meliloti* AK83. La mutation de T4SS dans la souche R7A rend cette souche capable de former des nodosités efficaces avec *Leucaena leucocephala* alors que la souche sauvage est incapable de noduler *L. leucocephala* (Hubber et al., 2004).

Le système de sécrétion de type V (T5SS) :

En regardant le nombre limité des protéines demandées pour la livraison des effecteurs, ce système semble être la machine de sécrétion des protéines la plus simple. Les protéines sécrétées par T5SS sont appelées autotransporteurs parce qu'elles sont conduites par leur propre sécrétion. Un très grand nombre des protéines impliquées dans l'agrégation, la formation des biofilms ou l'invasion de la cellule hôte est sécrété via T5SS et la plupart participe à la virulence des pathogènes vis-à-vis des animaux et de l'homme (Henderson et al., 2004).

Chez la souche *Azorhizobium caulinodans* ORS571 qui forme des nodosités sur les racines et les tiges de *Sesbania rostrata* ; La protéine autotransporteur (AoaA) chez ORS571 appartient à T5SS. La mutation dans le gène *aoaA* a diminué la production d'exopolysaccharides et rend cette souche moins fixatrice de l'azote avec *S. rostrata* (Suzuki et al., 2008).

Le système de sécrétion de type VI (T6SS) :

Ce système utilise un grand nombre des protéines de surface cellulaire qui forment un filament qui interagit avec la cellule bactérienne cible. T6SS introduit les protéines effectrices directement dans le cytoplasme de la cellule hôte, analogue aux T3SS et T4SS. T6SS est demandé pour la virulence des pathogènes chez les hommes et les animaux. Il est aussi exigé pour l'efficacité de la colonisation des racines par *R. leguminosarum*. La mutation dans l'opéron impliqué dans la synthèse de T6SS de la souche *R. leguminosarum* sv. trifolii RCR5 permet à cette souche de fixer l'azote avec le pois qui ne le nodulait pas normalement (González and Gonzalez-López, 2013).

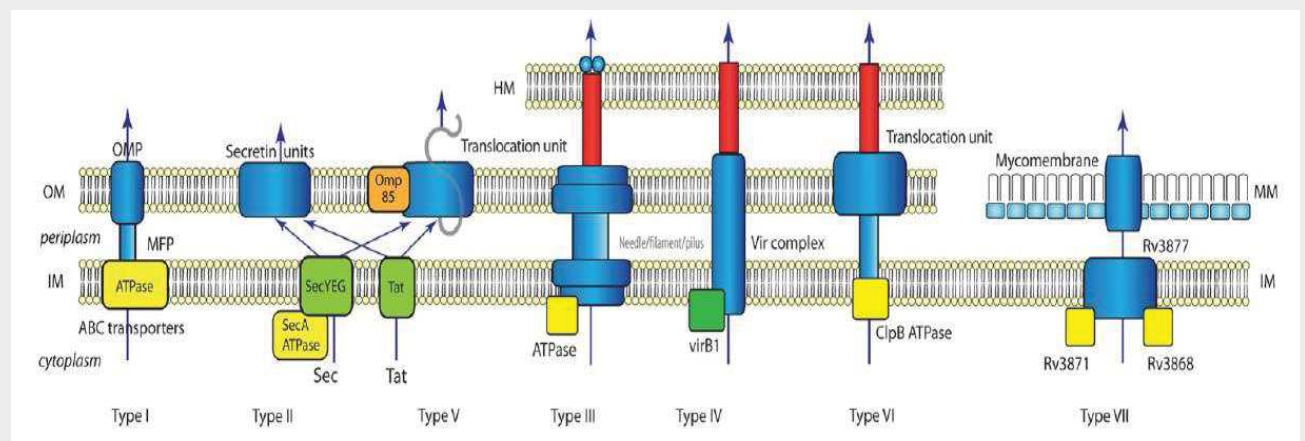


Figure EI-1 : Un résumé des systèmes de sécrétions chez les bactéries. HM : la membrane de l'hôte, OM : la membrane externe, IM : la membrane interne. (Tseng et al., 2009).

La revue de (Nelson and Sadowsky, 2015) montre que les systèmes de sécrétion n'existent pas chez toutes les souches appartenant à une même espèce. La délétion de T3SS et T4SS réduit le nombre de nodosités d'environ 40-60%. Les systèmes de sécrétion peuvent avoir un effet positif ou négatif sur la symbiose selon la souche et la plante hôte (**Tableau I-1**).

Tableau I-1 : Effet du système de sécrétion de type III (T3SS) et de type IV (T4SS) sur la symbiose, références dans la revue de (Nelson and Sadowsky, 2015).

La souche de rhizobia	Le système de sécrétion	N° des protéines sécrétées	L'effet positif sur la symbiose	L'effet négatif sur la symbiose
<i>Rhizobium etli</i> CNPAF512	T3SS	2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Inconnu
<i>Bradyrhizobium elkani</i> USDA61	T3SS	8	<i>Macroptilium atropurpureum</i> , <i>Glycine max</i> cv. Clark, <i>G. max</i> cv. Enrei	<i>Vigna radiata</i> cv. KPS1, <i>G. max</i> cv. Hill
<i>Mesorhizobium huakuii</i> MAFF303099	T3SS	8	<i>Lotus glaber</i> , <i>Lotus japonicas</i> , <i>Lotus corniculatus</i> subsp. <i>frondsus</i> , <i>Lotus filicaulis</i>	<i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Lotus halophilus</i> , <i>Lotus peregrinus</i> var. <i>carmeli</i> , <i>Lotus subbiflorus</i>
<i>Ensifer fredii</i> NGR234	T3SS	15	<i>Tephrosia vogelii</i> , <i>Flemingia congesta</i> , <i>Lablab purpureus</i>	<i>L. leucocephala</i> , <i>Pachyrhizus tuberosus</i> , <i>Crotalaria juncea</i>
<i>E. fredii</i> HH103	T3SS	8	<i>G. max</i> cv. Peking, Heinong 33, Kochi et Williams, <i>Glycyrrhiza uralensis</i>	<i>Erythrina variegata</i>
<i>E. fredii</i> USDA257	T3SS	13	<i>G. max</i> cv. Peking et Williams, <i>M. atropurpeum</i>	<i>G. max</i> cv. McCall, <i>E. variegata</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110	T3SS	36	<i>M. atropurpeum</i> , <i>G. max</i> cv. Williams	<i>V. radiata</i> cv. KPS2
<i>B. japonicum</i> USDA122	T3SS	31	Inconnu	inconnu
<i>Cupriavidus taiwanensis</i> LMG19424	T3SS	inconnu	Inconnu	<i>L. leucocephala</i>
<i>Mesorhizobium loti</i> R7A	T4SS	2	<i>L. corniculatus</i>	<i>L. leucocephala</i>
<i>Ensifer meliloti</i> KH35c	T4SS	inconnu	<i>Medicago truncatula</i> A17, <i>Medicago tricycle</i>	Inconnu
<i>Ensifer medicae</i>	T4SS	inconnu	<i>Medicago truncatula</i> A17	Inconnu

Nelson and Sadowsky, (2015) ont proposé un modèle décrivant le rôle des protéines effectrices dans la symbiose (Figure I-6).

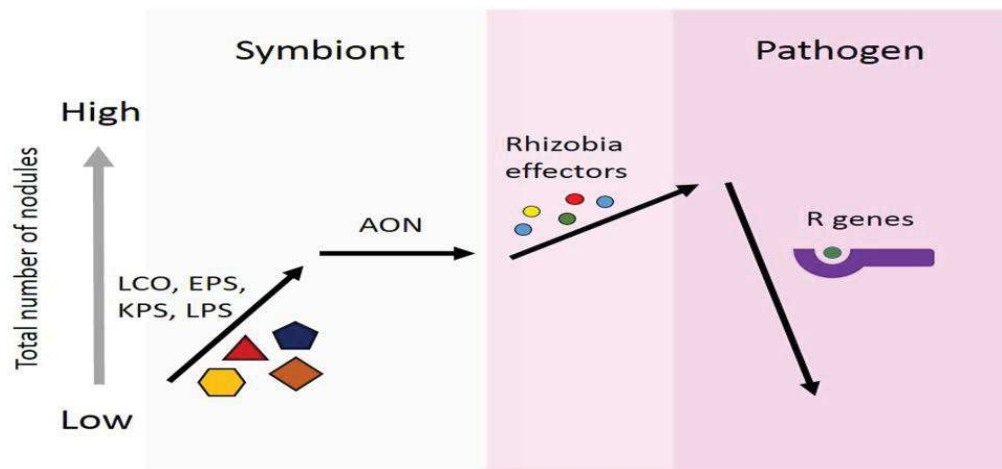


Figure I-6 : Un modèle proposé montrant le rôle de protéines effectrices dans la symbiose. Les rhizobia sécrètent les FNs importants pour la formation des nodosités et la spécificité envers la plante hôte. Les légumineuses limitent le nombre total des nodosités formées en utilisant l'autorégulation des nodosités (AON). Les rhizobia utilisent les protéines effectrices de façon similaire aux pathogènes pour modifier les cellules de la plante hôte et faciliter la formation des nodosités. Avec l'augmentation de nombre des nodosités, l'état symbiotique passe à un état pathogène. En réponse défensive, la plante va développer les gènes R (gènes de résistance) qui sont capables de reconnaître la présence des protéines effectrices, de façon directe ou indirecte (Nelson and Sadowsky, 2015).

La reconnaissance des effecteurs produit une réponse défensive dans la plante ciblée qui va arrêter la formation des nodosités (Nelson and Sadowsky, 2015). Okazaki et al, (2013) ont montré que *B. elkanii* utilise le système de sécrétion de type III (T3SS) pour favoriser la symbiose avec le soja. L'activation de la signalisation de nodulation par T3SS chez le soja ne demande pas une étape initiale de l'interaction symbiotique moléculaire comprenant le FN de rhizobium et le récepteur NFR de la plante hôte. Le T3SS de *B. elkanii* peut introduire l'expression des gènes symbiotiques de la plante ENOD40 'Early nodulin 40' et NIN "Nodule Inception" qui sont impliqués dans les stades précoces et la formation des cordons d'infection des nodosités fixatrice de l'azote (Okazaki et al., 2013) (Figure I-7).

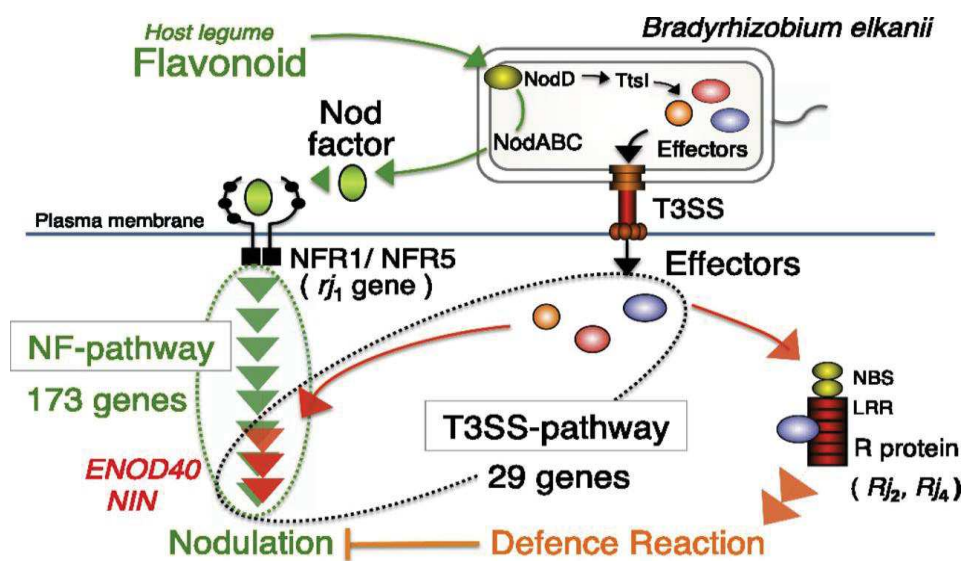


Figure I-7 : Modèle de nodulation par le système de sécrétion de type III chez les rhizobia. Les flavonoïdes de la plante induisent la production des FNs et le T3SS. La reconnaissance de FNs par les récepteurs NF conduit à la nodulation. T3SS injecte les effecteurs protéiques dans les cellules de la plante hôte. Un effecteur participe dans la nodulation alors qu'un autre effecteur est reconnu par le système de défense de la plante qui peut faire avorter la nodulation (d'après Okazaki et al., 2013).

I-2-2-E- Les polysaccharides :

Plusieurs études ont montré qu'il existe d'autres éléments que les systèmes de sécrétion et les FNs, qui ont un effet sur le spectre d'hôte. (Frayssé et al., 2003; Downie, 2010) ont montré l'importance des polysaccharides de surface chez les rhizobia dans l'établissement de la relation symbiotique et des mécanismes de spécificité entre les 2 composantes de la symbiose. Les expolysaccharides (EPS) semblent être essentiels dans la reconnaissance des partenaires symbiotiques et le processus de l'invasion des racines inhibant la réponse défensive de la plante (Frayssé et al., 2003). Les lipopolysaccharides (LPS) ont un rôle spécifique dans les étapes tardives du processus de la nodulation comme la pénétration du cordon d'infection dans les cellules de cortex ou dans la réalisation d'un phénotype fixateur de l'azote (Becker et al., 2005). Les EPS semblent essentielles dans l'infection des plantes hôtes par des rhizobia formant des nodosités indéterminées. La structure chimique des EPS est spécifique à l'espèce ou à la souche (ex ; *R. leguminosarum* sv. *viciae* et sv. *trifolii*) (**Figure I-8**) (Janczarek, 2011).

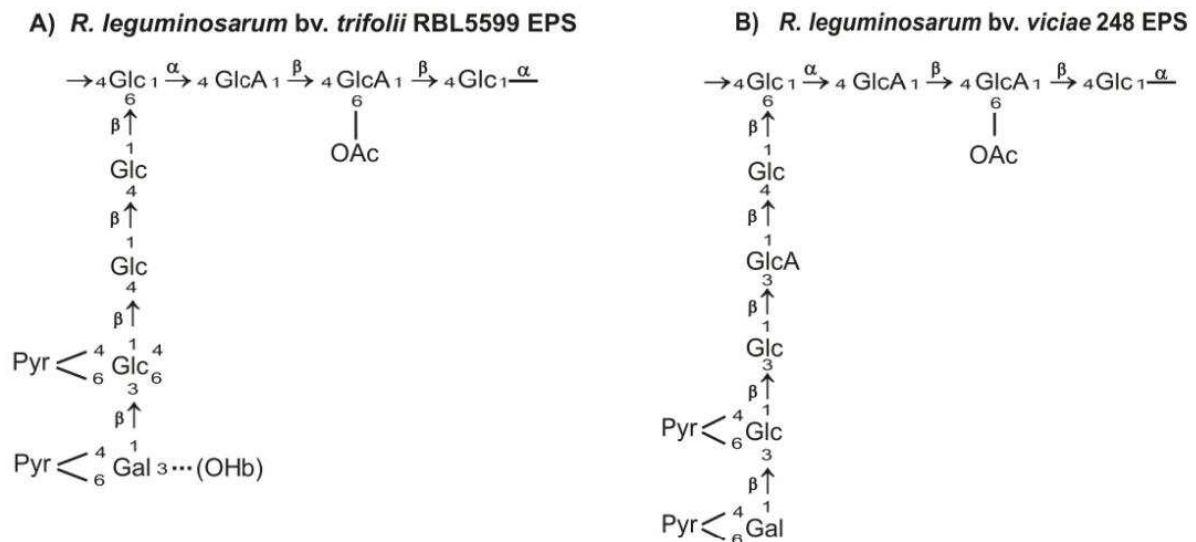


Figure I-8 : Exemples de structures chimiques des expolysaccharides chez des souches de *R. leguminosarum* selon leur symbiovar lié à la plante hôte : symbiovar *trifolii* nodulant le trèfle et symbiovar *viciae* nodulant le pois (Janczarek, 2011).

I-2-3- Spécificité de la symbiose:

L'une des caractéristiques majeures de la symbiose rhizobium-légumineuse est sa spécificité. En effet, un rhizobium donné est capable d'établir une symbiose fixatrice d'azote seulement avec un nombre limité d'espèces végétales, défini comme son spectre d'hôte (**Tableau I-2**) (Perret et al., 2000).

Une espèce de légumineuses pourra établir une association symbiotique avec une ou plusieurs espèces de rhizobia, définissant ainsi le spectre d'hôte de la légumineuse (**Figure I-9**). Les variations du spectre d'hôte du symbiote bactérien vis à vis des espèces de légumineuses sont cependant très importantes. Ainsi les associations peuvent être très spécifiques (aussi appelées spécialistes) dans le cas où une seule espèce de rhizobia peut contracter une symbiose avec une légumineuse donnée ou généralistes, lorsque le spectre d'hôte de l'espèce de rhizobia considérée est large. A titre d'exemples pour le partenaire bactérien, *Azorhizobium caulinodans* ne s'associe qu'avec *Sesbania rostrata* (Dreyfus et al., 1988), contrairement à *Ensifer* sp. NGR234 qui a un spectre d'hôte très large en pouvant s'associer avec 112 genres de légumineuses (Pueppke and Broughton, 1999).

Tableau I-2 : Exemples de la capacité de nodulation de symbiotes de l'ordre des *Rhizobiales* en fonction de l'espèce végétale (Pour les références : Perret et al., 2000). Les plantes sont listées selon leurs sous-familles ; (P) Papilionoideae, (M) Mimosoideae.

L'espèce	L'hôte typicale	Le spectre d'hôte
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Robiniae</i> (P), <i>Sesbania</i> spp	Compatible seulement avec <i>Sesbania punctata</i> et <i>S. rostrata</i>
<i>Bradyrhizobium elkani</i>	<i>Phaseoleae</i> (P), <i>Glycine</i> spp.	<i>Acacieae</i> (M), <i>Mimoseae</i> (M), <i>Desmodieae</i> (P), <i>Loteae</i> (P), <i>Psoraleae</i> (P), <i>Phaseoleae</i> (P), <i>Aeschynomeneae</i> (P)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Phaseoleae</i> (P), <i>Glycine</i> spp.	<i>Aeschynomeneae</i> (P), <i>Arachis</i> spp., <i>Phaseoleae</i> (P), <i>Macroptilium</i> , <i>Vigna</i> spp.
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	<i>Galegeae</i> (P), <i>Astragalus</i> spp.
<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Loteae</i> (P), <i>Lotus</i> spp., <i>Genisteae</i> (P), <i>Lupinus</i> spp.	<i>Mimoseae</i> (M), <i>Mimosa pudica</i> , <i>Leuceana leucocephala</i> ; <i>Phaseoleae</i> (P), <i>Macroptilium atropurpureum</i>
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseoleae</i> (P), <i>Phaseolus</i> spp.	<i>Ingeae</i> (M), <i>Crotalarieae</i> (P), <i>Galegeae</i> (P), <i>Mimoseae</i> (M), <i>Desmodieae</i> (P), <i>Robiniae</i> (P)
<i>Rhizobium fredii</i>	<i>Phaseoleae</i> (P), <i>Desmodieae</i>	<i>Mimoseae</i> (M), <i>Ingeae</i> (M), <i>Sophoreae</i> (P), <i>Amorpheae</i> (P), <i>Millettieae</i> (P), <i>Robiniae</i> (P), <i>Indigofereae</i> (P), <i>Loteae</i> (P)
<i>Rhizobium galegae</i>	<i>Gaegeae</i> (P), <i>Galega</i> spp.	Compatible seulement avec <i>Galega</i> spp.
<i>Rhizobium leguminosarum</i> sv. phaseoli	<i>Phaseoleae</i> (P), <i>Phaseolus</i> spp.	<i>Phaseoleae</i> (P)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> sv. trifolii	<i>Trifolieae</i> (P), <i>Trifolium</i> spp.	<i>Phaseoleae</i> (P), <i>Desmodieae</i> (P), <i>Trifolieae</i> (P), <i>Medicago</i> spp.
<i>Rhizobium leguminosarum</i> sv. viciae	<i>Vicieae</i> (P), <i>Pisum sativum</i> , <i>Vicia</i> spp.	<i>Lathyrus</i> spp. (ex: <i>L. sativa</i>)
<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Phaseoleae</i> (P), <i>Phaseolus</i> spp.	<i>Galegeae</i> (P), <i>Crotalarieae</i> (P), <i>Desmodieae</i> (P), <i>Mimoseae</i> (M), <i>Robiniae</i> (P), <i>Loteae</i> (P)
<i>Ensifer meliloti</i>	<i>Trifolieae</i> (P), <i>Medicago</i> spp., <i>Melilotus</i> spp., <i>Trigonella</i> spp.	ND
<i>Ensifer saheli</i>	<i>Robiniae</i> (P), <i>Sesbania</i> spp.	ND
<i>Ensifer teranga</i> sv. acaciae	<i>Acacieae</i> (M), <i>Acacia</i> spp.	<i>Mimoseae</i> (M), <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Prosopis juliflora</i>
<i>Ensifer teranga</i> bv. sesbaniae	<i>Robiniae</i> (P) <i>Sesbania</i> spp.	ND

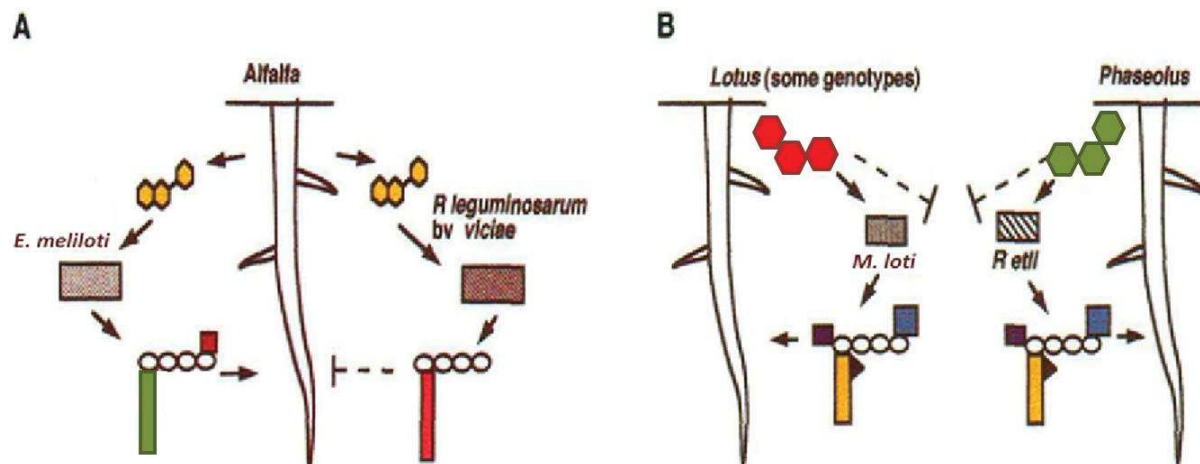


Figure I-9 : Schéma d'échange des signaux symbiotiques et la spécificité d'hôte (Long, 1996).

(A) La spécificité de la luzerne envers *Ensifer meliloti*. Un échange de signaux entre la luzerne et son symbiote compatible, *E. meliloti*, est représenté sur la gauche. La luzerne produit les flavonoïdes qui provoquent la transcription des gènes *nod* dans *E. meliloti*. Les gènes *nod* permettent la synthèse d'un FN (lipo – oligosaccharide), ce qui va conduire à une réponse spécifique de la plante hôte (en rouge et vert). La luzerne déclenche aussi l'expression de l'ensemble des gènes *nod* de l'espèce *R. leguminosarum* sv. *viciae*. Les FN de *R. leguminosarum* bv *viciae* sont synthétisés en réalisant des modifications spécifiques à l'hôte (symbole rouge) mais cela n'est pas adapté avec la luzerne. Par conséquent, les signaux de *R. leguminosarum* bv *viciae* ne provoquent pas de réponse dans la luzerne.

(B) La spécificité de l'hôte est basée sur l'expression des gènes *nod* chez *Mesorhizobium loti*, compatible avec quelques génotypes du *Lotus*, et *Rhizobium etli*, compatible avec *Phaseolus*. Il est possible que les flavonoïdes déclenchés par chaque plante soient différents et spécifiques (rouges vs symboles verts). Cela peut limiter les gammes d'hôtes qui peuvent être nodulées par chaque espèce bactérienne. Les flèches indiquent les signaux efficaces avec l'organisme cible; les lignes pointillées avec une barre indiquent que les éléments ne sont pas efficaces c'est-à-dire qu'il n'y a pas de signaux avec l'organisme cible (Long, 1996).

I-2-4- Définition du terme « symbiovar » dans le cas de la symbiose:

Il apparaît donc que la diversité d'association symbiotique ne dépend ni de la taxonomie bactérienne, ni de celle des légumineuses, ni de la situation géographique ou de l'habitat écologique des légumineuses. Les biovars (variantes biologiques) représentent un groupe de souches bactériennes qui se distinguent d'autres souches de la même espèce sur la base de caractères physiologiques et/ou biochimiques qui peuvent être partagés entre plusieurs espèces en raison de transferts horizontaux de gènes. Des exemples des biovars chez des espèces bactériennes :

- Chez des espèces de rhizobia (appelé symbiovar) : comme *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* nodulant le pois et la vesce ou *R. leguminosarum* bv. *trifolii* nodulant le trèfle (Berkum et al., 1996)
- Chez des espèces pathogènes (appelé pathovar) : comme *Ralstonia solanacearum* bv 1 (infectant la tomate), *R. solanacearum* bv 2 (infectant la pomme de terre), *R. solanacearum* bv

3 (infectant le géranium et la tomate) et *R. solanacearum* bv 4 (infectant la pomme de terre et la tomate) (Huang et al., 2012).

Dans des taxons de rhizobia, le terme biovar est utilisé pour distinguer les sous-groupes symbiotiques au sein de rhizobia et il a été proposé de remplacer cette appellation par symbiovar (Rogel et al., 2011). Le « symbiovar » peut être partagé entre différentes espèces en raison du transfert horizontal des informations symbiotiques. Il a été identifié chez les espèces de *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium* et *Bradyrhizobium*. Les symbiovar peuvent être distingués génétiquement par la phylogénie des gènes de nodulation (*nodA* et *nodC*) et les gènes de la fixation de l'azote (*nifH*) (Amarger et al., 1997; Ba et al., 2002; Ramirez-Bahena et al., 2012). Les symbiovars peuvent être retrouvés dans différentes espèces bactériennes en raison du transfert horizontal d'information symbiotique. Ils ont été identifiés dans des genres de rhizobia tels que : *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer*, et *Rhizobium*. Par exemple le symbiovar ciceri rassemblant les espèces de rhizobia nodulant le pois chiche (*M. amorphae*, *M. tianshanense*, *M. ciceri*, *M. mediterraneum* et *E. meliloti*) ; le symbiovar gallicum (*R. gallicum* et *R. giardinii*), symbiovar giardinii (*R. giardinii*), mimosae (*R. etli*), le symbiovar phaseoli (*R. gallicum*, *R. giardinii*, *R. leguminosarum*, *R. etli* et *R. phaseoli*) pour les espèces de rhizobia nodulant le haricot commun et le symbiovar viciae pour les rhizobia nodulant la vesce (*R. leguminosarum* et *R. pisi*) et des espèces de rhizobia de la fève (*R. fabae*) (**Tableau I-3**) (Rogel et al., 2011), et des souches de rhizobia nodulant le trèfle comme (*R. leguminosarum*, *R. aegyptiacum*, *R. bangladeshense* et *R. pisi*) (Shamseldin et al., 2016).

Tableau I-3 : Exemple des symbiovars connus selon les légumineuses et leurs espèces de rhizobia. (d'après Rogel et al 2011).

Symbiovar	Espèce de rhizobia	Plante hôte des légumineuse
acaciae	<i>Ensifer terangaie</i>	<i>Acacia</i>
	<i>Ensifer sahelense</i>	<i>Acacia</i>
	<i>Ensifer meliloti</i>	<i>Acacia tortilis</i>
acaciellae	<i>Ensifer chiapanecum</i>	<i>Acaciella angustissima</i>
	<i>Ensifer mexicanum</i>	
biserrulae ciceri	<i>Mesorhizobium opportunistum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>
	<i>Mesorhizobium amorphae</i>	<i>Cicer arietinum</i>
	<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	
	<i>Mesorhizobium ciceri</i>	
	<i>Mesorhizobium mediterraneum</i> <i>E. meliloti</i>	
Gallicum	<i>Rhizobium gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris, Leucaena leucocephala</i>
	<i>Rhizobium giardinii</i>	
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	
genistearum giardinii		<i>Genisteae, Loteae</i>
	<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris, Leucaena leucocephala</i>
glycinearum	<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine</i>
lancerottense	<i>E. meliloti</i>	<i>Lotus lancerottense</i>
medicaginis	<i>E. meliloti</i>	<i>Medicago laciniata</i>
mediterraneuse	<i>Ensifer fredii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>E. meliloti</i>	
meliloti	<i>E. meliloti</i>	<i>Medicago sativa, Medicago truncatula</i>
mimosae	<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris, L. leucocephala, Mimosa affinis</i>
officinalis	<i>Rhizobium galegae</i>	<i>Galega officinalis</i>
orientalis	<i>R. galegae</i>	<i>Galega orientalis</i>
orientale	<i>Rhizobium monogolense, Rhizobium spp.</i>	<i>Medicago ruthenica, Phaseolus vulgaris</i>
phaseoli	<i>Rhizobium gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. giardini</i>	
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	
	<i>R. etli</i>	
	<i>Rhizobium phaseoli</i>	
sesbaniae	<i>E. terangaie</i>	<i>Sesbania</i>
	<i>E. sahelense</i>	
	<i>Agrobacterium sp.</i>	
trifolii viciae	<i>R. leguminosarum</i>	<i>Trifolium</i>
	<i>R. leguminosarum</i>	<i>Vicia sativa</i>
	<i>R. fabae</i>	<i>Vicia faba</i>
	<i>R. pisi</i>	<i>Vicia sativa</i>

Notre étude concerne la réhabilitation de sites méditerranéens et dans ce cadre deux Légumineuses ont un intérêt particulier. Une partie de cette synthèse est consacrée à l'importance écologique d'*Anthyllis vulneraria* et de *Lotus corniculatus* et s'est focalisée sur l'aspect microbiologique et la diversité des symbiotes associés à ces deux légumineuses. Certains auteurs ont signalé que des rhizobia symbiotiques de *L. corniculatus* étaient susceptibles de noduler *A. vulneraria*. Ces deux légumineuses s'associent principalement avec des souches appartenant au genre *Mesorhizobium*. Une partie de l'étude bibliographique est donc focalisée sur la diversité des espèces à l'intérieur du genre *Mesorhizobium*, leurs spécificités et leurs interactions avec l'environnement.

I-3 Importance écologique d'*Anthyllis vulneraria* et de *Lotus corniculatus* :

Anthyllis et *Lotus* sont deux genres de légumineuses de la famille de *Fabaceae*, de la tribu de *Loteae* et sont apparentées phylogénétiquement sur la base des séquences ITS (en anglais « Internal Transcribed Spacer ») (**Figure I-10**). Le genre *Lotus* comprend environ 100 espèces annuelles et vivaces. Ce genre est le plus complexe taxonomiquement, le plus large et le plus important dans la tribu *Loteae* grâce à sa large diversité morphologique et géographique (Allan and Porter, 2000). Plusieurs espèces de *Lotus*, du fait leurs capacités adaptatives sont considérées comme de bons modèles biologiques pour leur contribution potentielle dans les opérations de la restauration et de phytoremédiation d'environnements dégradés. Parmi ces espèces, *L. corniculatus* est considérée comme une espèce qui a des capacités adaptatives élevées. Très répandue dans le monde, elle est capable de se développer dans des conditions environnementales très variées (Escaray et al., 2012). En revanche, le genre d'*Anthyllis* ne comprend qu'une vingtaine d'espèces distribuées dans toute l'Europe, l'Afrique et le bassin méditerranéen. Parmi les espèces d'*Anthyllis*, *A. vulneraria* est l'espèce la plus répandue. Espèce bisannuelle, elle compte plus de 30 sous-espèces identifiées sur des critères morphologiques (Nanni et al., 2004). Des écotypes de trois sous-espèces ont été identifiées sur le pourtour cévenol ainsi qu'en Allemagne : (i) la sous-espèce *carpatica*, présente sur le site minier des Avinières et le site minier de Breinic en Allemagne, (ii) la sous-espèce *boscii* présente sur le site minier d'Eylie dans les Pyrénées ariégeoises et (iii) la sous-espèce *praepropera* présente sur les sites non métallicoles du Col du Vent et de La Prunarède en Cévennes. Parmi ces sous-espèces les deux écotypes *carpatica* et *bosci* sont potentiellement métallicoles (tolérantes aux métaux lourds) alors que la sous-espèce *praepropera* est un écotype non métallicole (Mahieu et al., 2013). De plus, *A. vulneraria* subsp *carpatica* est considérée comme une espèce facilitatrice de l'installation d'une couverture végétale durable (Frérot et al., 2006).

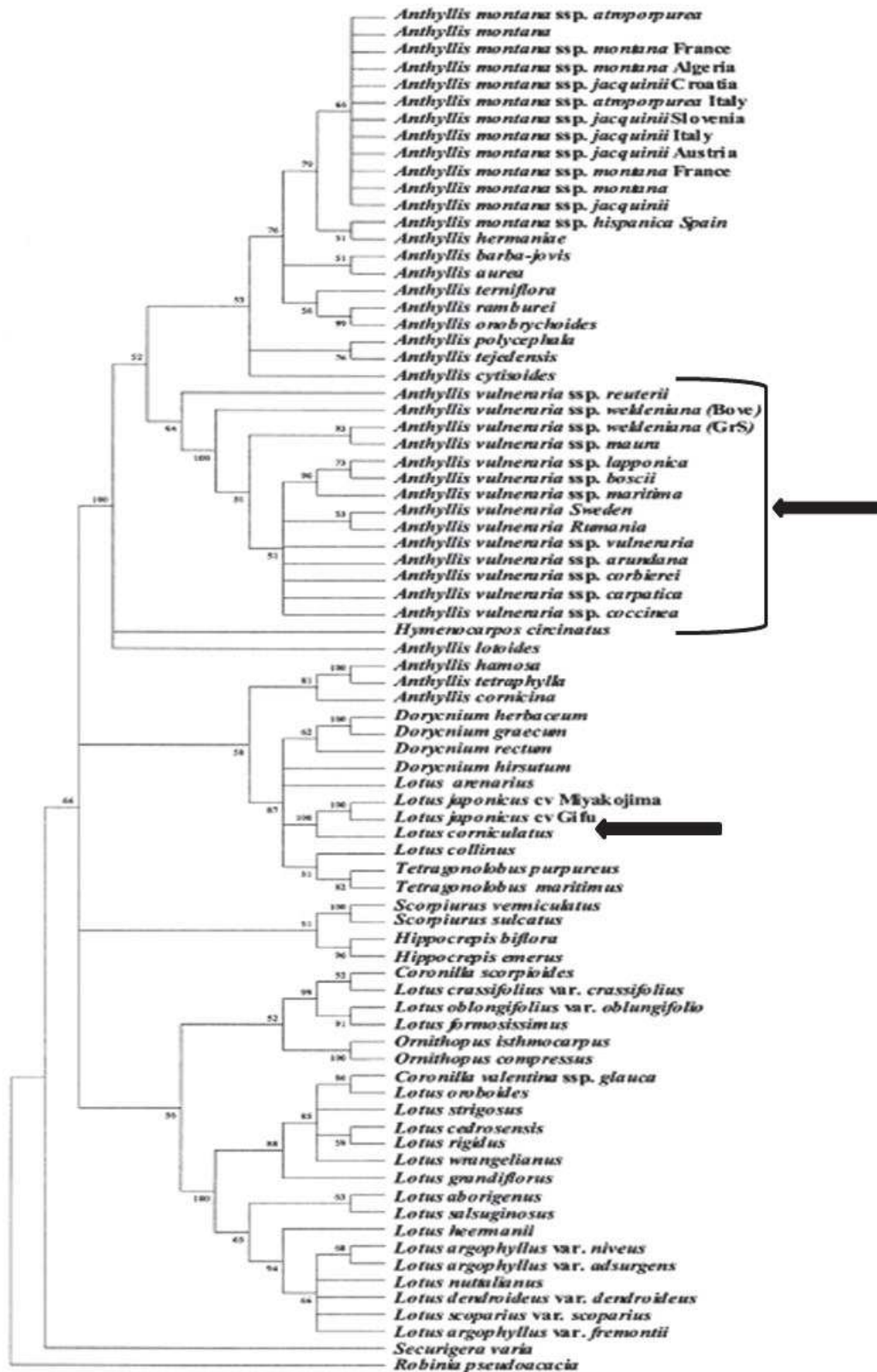


Figure I-10 : Arbre phylogénétique obtenu à l'aide du marqueur moléculaire ITS (Espaceur Interne Transcrit qui une région de l'ADN ribosomique non fonctionnel (en anglais « Internal Transcribed Spacer ») de *Loteae* (Nanni et al., 2004).

1-3-1- La diversité des symbiotes associés à *Lotus* et à *Anthyllis* et leur compatibilité :

La compatibilité des rhizobia associés à *A. vulneraria* et à *L. corniculatus* est connue dans la littérature depuis les années soixante (Abdel-Ghaffar and Jensen, 1966; Jensen and Hansen, 1968). Toutes les espèces de *Lotus* dont *L. corniculatus* forment des nodosités déterminées avec leurs rhizobia associées (Den Herder and Parniske, 2009). La forme des nodosités sur les racines d'*A. vulneraria* ressemble à celles de *L. corniculatus* (Figure I-11).

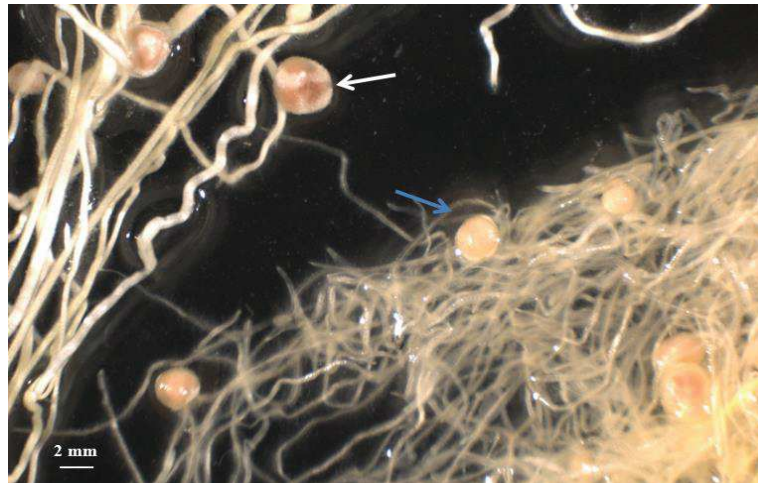


Figure I-11 : Nodosités déterminées d'*A. vulneraria* subsp. *carpatica* (flèche bleu) et *L. corniculatus* (flèche blanche). (Photographie de Mohamad R 2015)

La diversité génétique des souches associées au *Lotus* est mieux étudiée dans la littérature que celles des souches associées à *Anthyllis*. Nous nous focaliserons donc dans un premier temps sur les différents travaux réalisés sur les symbiotes de *L. corniculatus*. Nous aborderons ensuite les travaux relatifs à la structure génétique des symbiotes associées à *A. vulneraria*.

I-3-1-A- La diversité des symbiotes associés au genre *Lotus* :

(a) Les genres de rhizobia nodulant les espèces de *Lotus* :

Plusieurs études ont montré que *L. corniculatus* forment des nodosités efficaces seulement avec des souches du genre *Mesorhizobium* (Ampomah and Huss-Danell, 2011; Gossmann et al., 2012). Initialement *Mesorhizobium loti* a été isolée des nodosités de *L. corniculatus* (Jarvis et al., 1982) et établit une symbiose efficace avec plusieurs espèces de *Lotus*. Certaines espèces de *Lotus* forment des nodosités efficaces avec des souches de *Bradyrhizobium* qui soit ne nodulent pas *L. corniculatus*, soit forment des nodosités inefficaces (Pankhurst et al., 1979; Barrientos et al., 2002; Lindstrom et al., 2010). *M. loti* a été la première espèce décrite comme fixatrice de l'azote et a été isolée de nodosités de *L. corniculatus* (Jarvis et al., 1982). Récemment, deux nouvelles espèces symbiotiques ont été isolées des nodosités de *L.*

corniculatus et sont nommées *M. erdmanii* et *M. jarvisii* (Martinez-Hidalgo et al., 2015). Les bactéries étant capables de noduler *Lotus* présentent un taux de croissance intermédiaire (mesorhizobia avec un temps de génération compris entre trois à sept jours à 28°C) ou un taux de croissance lent (bradyrhizobia, plus de sept jours à 25-30°C) (Jordan, 1982; Irisarri et al., 1996; Jarvis et al., 1997; Lorite et al., 2010a).

(b) La spécificité de la symbiose selon les espèces de *Lotus* :

Les souches de *Mesorhizobium* sont capables de former des symbioses efficaces avec certaines espèces de *Lotus* (et sont rassemblées dans le groupe I) comprenant *L. corniculatus*, *L. tenuis* et *L. japonicus*, alors qu'elles forment des structures apparentées à des pseudonodules, ne contenant pas de bactéries avec d'autres espèces de *Lotus* comme *L. uliginosus*, *L. subbiflorus* et *L. angustissimus* (rassemblées dans le groupe II) (Pankhurst et al., 1979; Monza et al., 1992; Lorite et al., 2010a). Parallèlement, les souches de bradyrhizobia forment des nodosités efficaces avec le groupe II de *Lotus* spp alors qu'elles ne nodulent pas ou forment des nodosités inefficaces avec les espèces de *Lotus* du groupe I (Irisarri et al., 1996). Seule la souche NZP2037 peut former des nodosités efficaces avec les deux groupes de *Lotus* spp (Saeki and Kouchi, 2000). D'après les travaux de Lorite et al. (2010a), *L. uliginosus* (groupe II), *L. corniculatus* et *L. tenuis* (groupe I) ont été utilisées pour piéger des bactéries tolérantes au stress salin de sols de la province de Grenade en Espagne. Aucune nodosité n'a été observée sur *L. uliginosus*, indiquant l'absence de rhizobia qui nodulent le groupe II de *Lotus* dans ce sol. Par contre, *L. corniculatus* et *L. tenuis* ont été abondamment nodulées et 180 souches du genre *Mesorhizobium* ont été isolées de leurs nodosités (Lorite et al., 2010a) : ces souches appartiennent aux espèces *M. tarimense*, *M. tianshanense*, *M. chacoense*, *M. albiziae* et *M. alhagi*. Aucune souche de *M. loti* n'a été détectée. En revanche, les gènes symbiotiques *nodC* et *nifH* du symbiovar de *M. loti* ont été retrouvés chez tous les isolats (Lorite et al., 2010a). La majorité des souches était fixatrice d'azote, et seulement 2% d'entre elles étaient incompatibles avec *L. corniculatus*. Une diversité physiologique au niveau de la tolérance au sel des souches isolées a été détectée et les souches ont été classées selon leur résistance au NaCl : souches sensibles (<150mM de NaCl), souches moyennement tolérantes (150 mM de NaCl) et tolérantes (>150 mM de NaCl). Cependant, la croissance de toutes ces souches était dépendante de la présence de NaCl et leur isolement a été possible dans un milieu TY sel-dépendante (Lorite et al., 2010a). De plus, Granada et al (2014) ont évalué la compatibilité symbiotique et l'efficacité de rhizobia isolées de plusieurs espèces de *Lotus* dont *L. corniculatus* (groupe I), *L. uliginosus* (groupe II) et *L. subbiflorus* (groupe II). Ils ont observé une spécificité symbiotique parmi 33 souches étudiées sur les différentes espèces de *Lotus* : certains isolats fixateurs avec *L. corniculatus* ne nodulent pas *L. uliginosus* et *L. subbiflorus* et d'autres sont compatibles avec *L. uliginosus* ou avec *L. subbiflorus* mais pas avec *L. corniculatus*. Par contre, trois isolats étaient compatibles et efficaces avec les trois espèces de

Lotus. Cette étude montre qu'il existe des souches natives dans les sols au sud du Brésil qui ont un large spectre d'hôte et qui peuvent être efficaces avec plusieurs espèces de *Lotus* (Granada et al., 2014).

(c) Identification de symbiovars pouvant noduler *Lotus* :

Lorite et al, (2010b) ont observé que 50% des souches isolées de différentes espèces de *Lotus* endémiques des îles Canaries appartiennent au genre *Mesorhizobium*, 35% au genre *Ensifer* et 15% aux genres *Rhizobium* et *Agrobacterium*. Cette étude a montré que *L. corniculatus* était uniquement associée avec des souches appartenant au genre *Mesorhizobium*. Ils ont également montré une diversité importante pour les souches isolées au sein de différentes espèces de *Mesorhizobium* (certaines souches sont identiques à *M. alhagi* et d'autres sont proches de *M. opportunistum*, *M. plurifarum*, *M. gobiense*, *M. tianshanense* et *M. caraganae*). En revanche, toutes les séquences du gène *nodC* étaient apparentées aux souches du symbiovar de *M. loti* avec un pourcentage de similarité supérieur à 90%. Il apparaît que, toutes les souches de *Mesorhizobium* ayant une similarité supérieure à 92,5% pour les séquences de *nodC* avec *M. loti* NZP2213^T (souche isolée des nodosités de *L. tenuis* de groupe I (Laguerre et al., 1994), sont capables de noduler *L. corniculatus*, contrairement aux souches qui ont moins de 92,2% de similarité avec *M. loti* NZP2213^T (Lorite et al., 2010b). Pour les 11 souches d'*Ensifer* dont sept d'*Ensifer meliloti*, cette espèce de rhizobia n'était pas connue pour sa capacité à noduler *Lotus* sp.. Les souches d'*Ensifer* isolées étaient capables de noduler et fixer l'azote efficacement avec seulement *L. lancerottensis*, alors que ces souches étaient capables de former des nodosités non fixatrices avec *L. japonicum* et qu'elles n'ont pas nodulé *L. tenuis* ou *L. uliginosus*. Parmi les souches testées, seulement deux souches d'*E. meliloti* étaient moyennement fixatrices avec *L. corniculatus*, alors que les autres souches formaient des nodosités non-fixatrices. Les séquences *nodC* et *nifH* de ces souches étant divergents de ceux des symbiovars d'*E. meliloti*, le biovar lancerottense a été proposé pour les souches de *E. meliloti* nodulant les espèces de *Lotus*, ces isolats sont aussi résistants à la salinité (400-500 mM de NaCl) et au stress alcalin (pH=9) (Leon-Barrios et al., 2009). Par contre, les souches appartenant aux genres *Rhizobium* et *Agrobacterium* n'ont pas été capables de noduler *L. corniculatus*, *nodC* n'ayant pas été détecté. Cette observation suggère que soit les souches de *Rhizobium/Agrobacterium* ne sont pas symbiotiques et qu'elles ont colonisé les nodosités au cours de l'infection par un rhizobium compatible, soit qu'elles possèdent des gènes symbiotiques qui sont divergents (Lorite et al., 2010b).

(d) Espèces de *Mesorhizobium* isolées de nodosités de *Lotus* et leurs gènes de nodulation :

Parallèlement, Estrella et al, (2009) ont isolé 103 isolats de nodosités de *L. tenuis* (groupe I) du sol de Salado River Basin en Argentine qui est un sol hétérogène, mal drainé, caractérisé par des teneurs en éléments nutritifs faibles et des niveaux élevés en sel sodique et pH alcalin. Parmi les 103 souches

isolées et à l'exception d'une seule souche d'*Aminobacter aminovorans*, 61% des souches appartenaient au genre *Mesorhizobium*, et sont apparentées aux espèces *M. huakuii*, *M. chacoense*, *M. loti*, *M. tianshanense* et *M. mediterraeum*. Les 39% restant appartenaient au genre *Rhizobium*, proches de *R. tropici* et *R. etli*. La diversité taxonomique des rhizobia était moins élevée dans les sols salins et toutes les souches appartenaient au genre *Mesorhizobium*. Une diversité plus élevée a été observée dans les sols ne présentant pas de teneurs élevées en sel et les souches ont été regroupées au sein des genres *Mesorhizobium* et *Rhizobium*. Tous les isolats du genre *Mesorhizobium* nodulaient *L. tenuis*, alors que seulement 31% des isolats de *Rhizobium* nodulaient *L. tenuis* (Estrella et al., 2009). Plusieurs études ont montré que les rhizobia nodulant *L. tenuis* ont un spectre d'hôte étroit et que ces dernières ne nodulaient pas les autres espèces de *Lotus* spp.. Par exemple, ces souches sont incapables de former des nodosités fixatrices d'azote avec *L. uliginosus* (groupe II) (Jarvis et al., 1982; Monza et al., 1992). Toutefois, les isolats proches de la souche à plus large spectre *M. loti* NZP2037 sont capables de former des nodosités fixatrices d'azote avec la majorité des espèces de *Lotus* (Estrella et al., 2009). Le gène *nodC* a pu être amplifié pour toutes les souches de *Mesorhizobium* mais pas pour celles de *Rhizobium*. Une hybridation de l'ADN génomique réalisée entre les souches de *Rhizobium* (nodulantes et non nodulantes) et le gène *nodC* de *M. loti* R7A n'a pas permis de détecter une bande d'hybridation de *nodC*. Il est donc supposé que les gènes de nodulation des isolats de *Rhizobium* sont très divergents de ceux de *M. loti*. Les mêmes résultats obtenus pour *nodC*, ont été obtenus avec *nifH*. L'arbre phylogénétique de *nodC* a clairement différencié *M. loti* NZP 2037 qui a un large spectre d'hôte des souches (R7A et MAFF303099) qui ont un étroit spectre d'hôte, suggérant que *nodC* est un indicateur intéressant pour détecter la gamme d'hôte des symbiotes de *Lotus*. Les gènes *nodC* des isolats de *Mesorhizobium* et de la seule souche d'*A. aminovorans*, sont proches et très similaires des gènes *nodC* des souches (R7A et MAFF303099) ayant un spectre d'hôte étroit (Estrella et al., 2009). Par contre, les séquences de *nifH* sont très conservées entre les isolats et leur analyse phylogénétique révèle un cluster différent des autres gènes *nifH* de rhizobia. Les souches de *M. loti* sont minoritaires pour les symbiotes de *L. tenuis* isolées du Salado River Basin (Estrella et al., 2009). *M. loti* est l'espèce la plus fréquemment retrouvée chez *L. tenuis* et *L. corniculatus* (Jarvis et al., 1982; Sullivan et al., 1996; Saeki and Kouchi, 2000; Fulchieri et al., 2001).

(e) Espèces de *Bradyrhizobium* isolées de nodosités de *Lotus*:

Dans l'objectif d'étudier la diversité des rhizobia associés à *L. uliginosus*. Lorite et al, (2012) ont isolé 39 souches bactériennes de *L. uliginosus* dans deux sites au Portugal. Les 39 souches appartenaient au genre *Bradyrhizobium* et avaient une diversité génétique très limitée et étaient étroitement apparentée à *Bradyrhizobium japonicum* sv *genistearum*. Toutes les souches ont été capables de former des nodosités pour une grande majorité efficaces (96,2%) ou partiellement efficaces (3,8%) avec *L. uliginosus*. Alors que (18,2%) des isolats sont inefficaces et (81,8%) partiellement efficaces avec *L. corniculatus*, tous les isolats étaient inefficaces avec l'espèce *L. tenuis*. Les séquences *nodA* des

souches isolées étaient proches de la souche *Bradyrhizobium* sp. NZP2309 pour laquelle le FN a une structure proche de celle de *M. loti* (Bek et al., 2010) mais différente des autres gènes *nodA* des bradyrhizobia. *L. uliginosus* s'associe à des microsymbiotes portant des gènes symbiotiques (*nodA*, *nodC* et *nifH*) phylogénétiquement divergents de ceux de souches nodulant d'autres espèces de *Lotus* (Lorite et al., 2012).

Batista et al, (2013) ont également isolé des souches symbiotiques de *L. uliginosus*. Les analyses génétiques de 75 souches montrent que 74 isolats appartiennent au genre *Bradyrhizobium* sp., à l'exception d'une souche LULIT12 proche de *M. loti* NZP2213^T. La séquence de *nodC* de cette souche est proche de celle de *M. loti* NZP2037 qui a été décrite comme une souche ayant un large spectre hôte (Estrella et al., 2009). Le test de nodulation réalisé avec plusieurs espèces de *Lotus* montre que les 2 souches NZP2037 et LULIT12 de *M. loti* sont très efficaces avec *L. corniculatus*, *L. tenuis*, *L. uliginosus* et *L. subbiflorus* et moyennement efficaces avec *L. japonicus*. Alors que les souches de *Bradyrhizobium* ont été plus efficaces avec *L. uliginosus* et *L. subbiflorus* qu'avec les autres espèces de *Lotus*, certaines souches de *Bradyrhizobium* n'ont pas été capables de noduler ou fixer l'azote avec *L. corniculatus*, *L. tenuis* et *L. japonicus* et 6/8 des souches de *Bradyrhizobium* ont nodulé *L. corniculatus*. Ces travaux sont confirmés par le fait que les souches de *M. loti* sont plus efficaces avec *L. corniculatus* que les souches de *Bradyrhizobium* (Batista et al., 2013) (**Tableau I-4**).

Tableau I-4 : Le spectre d'hôte des souches de *Bradyrhizobium* et de la souche de *Mesorhizobium* isolées de *Lotus uliginosus*, à l'exception de la souche NZP2037 isolée de *L. divaricatus* utilisé comme un témoin (d'après Batista et al 2013).

Souche	Espèce	Phénotype de la symbiose				
		<i>L. uliginosus</i>	<i>L. corniculatus</i>	<i>L. japonicus</i>	<i>L. tenuis</i>	<i>L. subbiflorus</i>
CNP29	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Fix ⁺	Nod ⁻	Fix ⁺	Fix ⁺	Fix ⁺
LULIT25	<i>B. japonicum</i>	Fix ⁺	Fix ⁺	Fix ⁻	Fix ⁺	Fix ⁺
CNG1	<i>B. japonicum</i>	Fix ⁺	Nod ⁻	Fix ⁻	Fix ⁻	Fix ⁺
LUG11	<i>B. japonicum</i>	Fix ⁺	Fix ⁺	Fix ⁻	Nod ⁻	Fix ⁺
CNL7	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Fix ⁺	Fix ⁺	Fix ⁺	Fix ⁺	Fix ⁺
CNL8	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Fix ⁺	Fix ⁺	Fix ⁺	Fix ⁺	Fix ⁺
CNL9	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Fix ⁺	Fix ⁺	Fix ⁺	Fix ⁺	Fix ⁺
LULIT12	<i>Mesorhizobium loti</i>	Fix ⁺	Fix⁺	Fix ⁺	Fix⁺	Fix ⁺
NZP2309	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Fix ⁺	Fix ⁺	Fix ⁻	Fix ⁺	Fix ⁺
NZP2037	<i>M. loti</i>	Fix ⁺	Fix⁺	Fix ⁺	Fix⁺	Fix ⁺

Fix⁺ : les isolats forment des nodosités très efficaces; **Fix⁺** les isolats sont moyennement efficaces; **Fix⁻** : les isolats forment des nodosités inefficaces ; **Nod⁻** : ne nodule pas

I-3-1-B- Les bactéries endophytes : des co-habitants des symbiotes naturels de *Lotus* spp.

Des souches n'appartenant pas aux genres *Mesorhizobium* et *Bradyrhizobium* peuvent être isolées de nodosités d'espèces de *Lotus*. Ces bactéries étaient initialement considérées comme des contaminants sachant que ces souches n'étaient pas capables de re-noduler leur plante d'origine. Plus récemment, il a été montré que des souches appartenant au genre *Rhizobium*, *Burkholderia* ou d'autres genres bactériens étaient des « co-habitants » dans les nodosités avec la souche symbiotique. Différents exemples de souches non-symbiotiques isolées des nodosités de certaines espèces de *L. corniculatus* sont mentionnés dans le paragraphe suivant.

Gossmann et al, (2012) ont observé que parmi 41 souches bactériennes isolées de nodosités de *L. corniculatus* et *L. pedunculatus* dans 21 sites en Europe, il y avait deux types d'association naturelle: *Mesorhizobium* avec *L. corniculatus* et *Bradyrhizobium* associé avec *L. pedunculatus*. Il n'a pas été observé de bradyrhizobia associé à *L. corniculatus*, ni de mesorhizobia associé à *L. pedunculatus*. D'autres souches appartenant aux espèces *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. giardinii*, *Burkholderia* sp. ont été isolées des nodosités de *L. corniculatus* mais elles ne re-nodulaient pas *L. corniculatus*. Une seule souche de *R. leguminosarum* Norway a formé des petits renflements sur les racines de *L. corniculatus* et d'autres espèces de *Lotus*. Une petite variation entre les arbres phylogéniques d'ARNr 16S et *nodC* a été relevée pour les souches de *Mesorhizobium* qui appartenaient toutes à *M. loti*. Les tests de nodulation des souches représentatives montrent deux groupes différents de compatibilité entre *Mesorhizobium* et *Bradyrhizobium* corroborant les résultats d'autres études (Bek et al., 2010; Lohmann et al., 2010; Lorite et al., 2010b). Les souches de *Bradyrhizobium* isolées de *L. pedunculatus* ont nodulé 3 écotypes de *L. japonicus* (Gifu, MG20 et Nepal), *L. filicaulis*, *L. burtii* et *L. glaber* mais elles n'ont fixé l'azote qu'avec leur plante d'hôte d'origine (*L. pedunculatus*). Les souches de *M. loti* isolées de *L. corniculatus* ont nodulé et fixé l'azote avec toutes les espèces de *Lotus* inoculées avec bradyrhizobia alors que pour *L. pedunculatus*, les souches de *Mesorhizobium* ont infecté les racines en formant des gonflements petits et plats sans différenciation cellulaire. Le gène *nodC* n'a pas été détecté pour les souches de *Rhizobium* et de *Burkholderia*. Les souches de *R. giardinii*, *R. etli* et *Burkholderia* sp. isolées de *L. corniculatus* n'ont pas nodulé les autres espèces de *Lotus*. Les souches de *R. leguminosarum* montrent une variation phénotypique importante avec les différentes espèces de *Lotus*. Deux rhizobia différents ont été isolés d'une même nodosité, soit *Mesorhizobium* avec *Burkholderia*, soit *Mesorhizobium* avec *R. leguminosarum* ou bien *Mesorhizobium* avec *R. etli* ou *R. giardinii*. La nodosité hébergeait une souche de *Mesorhizobium* et une autre souche appartenant à une autre espèce de rhizobia ou de *Burkholderia*.

Rejili et al, (2013) ont isolé onze souches symbiotiques des nodosités de *L. creticus* et *L. pusillus* : deux souches de l'espèce *M. alhagi*, deux autres de l'espèce *M. temperatum*, cinq souches proches d'*Ensifer meliloti* et deux souches proches de *R. huaultense*. Des bactéries endophytes ont aussi été isolées de nodosités de *Lotus* sp. et elles appartenaient aux genres *Phyllobacterium* (2 souches),

Starkeya (1 souche) et *Pseudomonas* (1 souche). Cette étude suggère que ces souches qui ne sont pas capables de re-noduler leur plante hôte d'origine, ont infecté les nodosités par co-infection avec les symbiotes naturels de *Lotus* spp..

L'isolement des souches non fixatrices d'azote des nodosités de *Lotus* a été effectué par Zgadzaï et al, (2015) et ils ont montré que les légumineuses étaient capables d'héberger dans leurs nodosités à la fois les bactéries symbiotiques et des endophytes. Dans l'objectif de tester la capacité des endophytes à coloniser et à se multiplier à l'intérieur de nodosités de *Lotus*, les endophytes suivants ont été étudiés : *Herbaspirillum frisingense* GSF30 (endophyte de *Miscanthus*), *Herbaspirillum* sp. B501 (endophyte d'*Oryza sativa*), *Rhizobium giardinii* sp. 129E (endophyte de racines d'*Arachidopsis*), *Burkholderia* sp. KAW25 et *R. mesosinicum* KAW12 tous isolés des racines de *Lotus japonicus*. Ils ont trouvé qu'à l'exception de *H. frisingense*, les quatre autres souches étaient présentes dans les nodosités ou à l'intérieur du cordon d'infection cortical induit par *M. loti*. Mais seulement *Burkholderia* sp. KAW25 et *R. mesosinicum* KAW12 ont été capables de se multiplier et de coloniser efficacement l'intérieur des nodosités. Les nodosités contenant *Burkholderia* sp. KAW25 ont montré des signes de nécroses contrairement aux nodosités hébergeant KAW12 qui apparaît comme plus compatible avec *L. japonicus*. La souche KAW12 isolée du sol d'une forêt japonaise a été identifiée comme une bactérie colonisant les racines de plants de *Lotus* et n'ayant aucun effet sur leur plante hôte. Le génome de KAW12 ne contenait pas les gènes clés de la symbiose rhizobium-légumineuse ou les gènes de fixation de l'azote. La co-inoculation de KAW12 avec la souche sauvage de *M. loti* montre que 8,2 % des nodosités de *L. japonicus* analysées ont été co-infectées par KAW12 avec *M. loti*, alors que dans le cas d'un mutant de *M. loti* où le gène *nodZ* (permet le transfert du fucose en position C6 de la glucosamine terminale du FN) est délété le pourcentage de co-infection par les endophytes était trois fois inférieur (2,4%) (Zgadzaï et al., 2015). La mutation de *nodZ* produit des FNs moins compatibles avec *L. japonicus* (Rodpothong et al., 2009). Les résultats de Zgadzaï et al (2015) révèlent que l'invasion des nodosités par les endophytes dépend du FN et la présence des signaux des FNs compatible est important pour l'infection des nodosités par la souche endophyte KAW12. Dans le cas de la co-inoculation de KAW12 avec *M. loti* *exoU* (*M. loti* *exoU* : une mutation dans le gène *exoU* codant pour l'enzyme glucosyltransférases impliqué dans la biosynthèse des exopolysaccharides (Kelly et al., 2013), KAW12 colonise 33% des nodosités en comparaison avec la souche sauvage *M. loti* (8.2%) ce qui indique que l'infection de KAW12 est limitée par les EPS compatibles produites par la souche de *M. loti*. De plus, la mutation dans les EPS chez la souche KAW12 rend cette souche incapable d'infecter et de se multiplier dans les nodosités de *L. japonicus* ni en mélange avec la souche sauvage de *M. loti* ni avec *M. loti* *exoU*. L'infection et la multiplication de KAW12 dépend de l'initiation de cordons d'infections et le stade de passage à travers l'épiderme est contrôlé par les gènes symbiotiques de la plante (comme *Cyclops*, *Cerberus*, *Nap1*, *ArpC1*) *Npl1*, *Alp1*) contrôlant l'infection et la persistance des bactéries symbiotiques. Le gène *sst1* qui est impliqué dans le stade tardif de la

symbiose *Lotus/M. loti* n'est pas requis pour la multiplication de KAW12 à l'intérieur de la nodosité (Zgadza et al., 2015).

I-3-1-C- La spécificité des symbiotes vis-à-vis de *L. corniculatus* :

Une question se pose : « Pourquoi *L. corniculatus* nodule principalement avec des souches du genre *Mesorhizobium* et non avec des souches de *Rhizobium* ou de *Bradyrhizobium* ? ». Il y a potentiellement des reconnaissances spécifiques entre les deux partenaires.

A l'heure actuelle, les études concernant la compréhension de la spécificité des rhizobia-*Fabaceae* ont montré que les FNs, les flavonoïdes, les exopolysaccharides de surface et le système de sécrétion sont des facteurs limitant la formation des nodosités et la fixation de l'azote par la plante hôte (Rhijn et al., 1998; Spaink, 2004; Nelson and Sadowsky, 2015).

L. corniculatus semble incapable d'établir une symbiose avec des souches d'*Ensifer fredii*, *Ensifer sp.* NGR234, *R. tropici* (Lopez-Lara et al., 1995) et rarement avec *Bradyrhizobium sp.* comme nous l'avons mentionné précédemment. Pour *M. loti* qui a été isolée de nodosités de *L. corniculatus*, son facteur Nod présente une structure particulière (Figure I-12). Seuls les lipochitinoligosaccharides produits par la souche NZP2037 qui a un large spectre hôte, ont un groupe carbomoyl supplémentaire dans le résidu terminal réducteur (Lopez-Lara et al., 1995). La carbomoyl-transférase NodU est spécifique de la carbamoylation en position C-6.

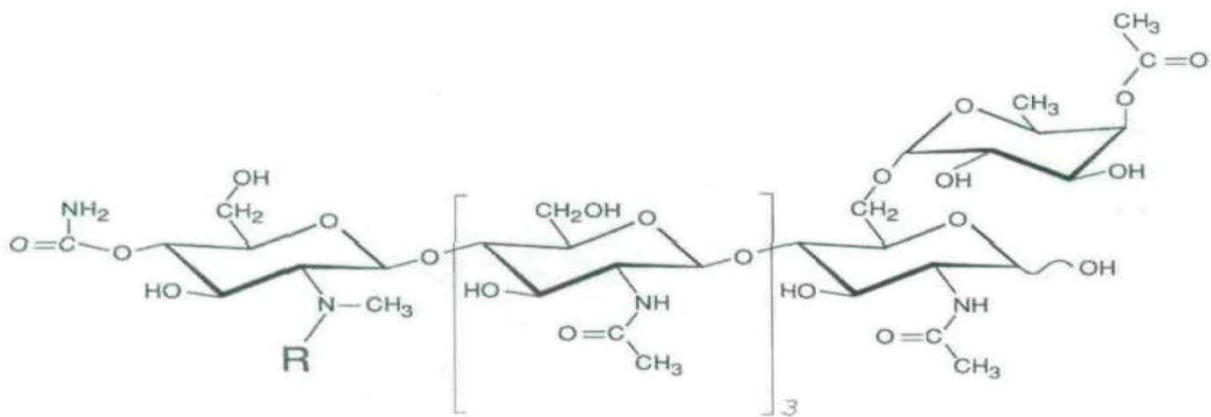


Figure I-12 : la structure de FNs (Lipo-chitin oligosaccharides (LCOs)) chez des souches *M. loti*, E1R, CIAM1801, NZP2235 et NZP2238. R = vaccenoyl ou stearyl (Lopez-Lara et al., 1995).

Les signaux moléculaires comme les flavonoïdes sont des inducteurs des FNs et agissent comme des modulateurs de la spécificité de la symbiose pendant les premiers stades de l'infection. *L. corniculatus* représente un intérêt particulier en raison de sa richesse en flavonoïdes, sa grande diversité de flavonols et deux isoflavonoïdes (Formononetin & Biochanin) (Reynaud and Lussignol, 2005).

Rhijn et al, (1998) ont montré que les lectines situées sur les racines secondaires de légumineuses jouent un rôle important dans la reconnaissance et la spécificité de la symbiose rhizobium-

légumineuse. L'espèce *L. corniculatus* qui est connue pour être nodulée essentiellement par *M. loti*, a pu développer des nodosités inefficaces avec *B. japonicum* (symbiote du soja) après introduction du gène de lectine de soja dans le lotier. Le gène de la lectine de soja a permis à *B. japonicum* de déformer les poils racinaires de *L. corniculatus* transgénique et de former le cordon d'infection mais l'infection s'est arrêtée dans les cellules épidermiques des racines de *L. corniculatus* (Rhijn et al., 1998). *Lotus japonicus* est utilisée comme plante modèle dans les études relatives à la spécificité de la symbiose chez les nodosités de type indéterminé. Les enzymes SYMRK (symbiosis receptor-like kinase) sont des récepteurs kinases contenant un domaine LRR (leucine-rich-repeat) et impliquées dans le processus de régulation de l'interaction symbiotique micro-organismes-plante intracellulaire. Les récepteurs kinases sont requises pour la signalisation des NF et ont un rôle essentiel dans la reconnaissance spécifique des rhizobia dans la première réponse à l'infection par les rhizobia. Les deux gènes qui sont impliqués dans l'infection et le processus de nodulation, sont NFR1 et NFR5 (Spaink, 2004).

De plus, Hubber et al, (2004) ont montré que la région symbiotique du chromosome de sept souches de *M. loti*, contient des gènes qui sont similaires aux gènes structurels *vir* (*virB1-11* ; *virD4*) d'*Agrobacterium tumefaciens* codant pour un système de sécrétion de type IV (T4SS). *M. huakuii* MAFF303099 contient des gènes codant pour un système de sécrétion de type III (T3SS). Les mutants des gènes *virB1* (T4SS) chez *M. loti* R7A ou *rhcJ* (T3SS) chez *M. huakuii* MAFF303099 forment des nodosités tardives sur *L. corniculatus* et ils forment des nodosités indéterminées avec *Leucaena leucocephala* qui normalement forme, avec R7A ou MAFF303099, seulement des structures racinaires ressemblant à des tumeurs non efficaces. Les gènes impliqués dans le système de sécrétion de type IV (T4SS) chez R7A et ou de type III (T3SS) chez MAFF303099 sont donc impliqués dans l'établissement de la symbiose avec *L. corniculatus* mais aussi dans la spécificité des souches de *M. loti* et de *M. huakuii* MAFF303099 envers *L. corniculatus* et dans l'inhibition de nodulation avec *L. leucocephala* (Hubber et al., 2004). Par la suite, (Hubber et al., 2007) ont montré que l'expression de la machinerie (T4SS) chez *M. loti* est strictement contrôlée par une cascade de régulation exigeant premièrement une perception des signaux de la plante par NodD et puis l'activation par VirA/VirG qui sont deux composants du système de régulation de T4SS. Leurs résultats indiquent donc que NodD est un médiateur de l'activation de T4SS dans *M. loti*. Parallèlement, (Okazaki et al., 2010) ont montré que le cluster de gènes (*tts*) codant pour un système de sécrétion de type III chez *M. huakuii* MAFF303099 influence la nodulation avec les espèces de *Lotus*, positivement avec *L. corniculatus* et *L. filicaulis* ou négativement avec *L. halophilus*, *L. peregrinus* et *L. subbiflorus*. L'expression des gènes *tts* est contrôlée par le facteur Nod en présence d'un inducteur de flavonoïde.

Kasai-Maita et al, (2013) ont comparé la région symbiotique de trois souches de *Mesorhizobium* : *M. huakuii* MAFF303099, *M. loti* R7A et *M. loti* NZP2037 pour mettre en évidence les gènes responsables de l'élargissement de la gamme de spectre d'hôte chez la souche NZP2037 isolée de *L.*

divaricatus. En plus de son efficacité vis à vis de sa plante hôte d'origine, cette souche a un large spectre hôte en formant des nodosités efficaces avec *L. pedunculatus*, *L. leucocephala*, *L. corniculatus* et certaines espèces de *Carmichaelia*, *Ornithopus*, *Clianthus* et *Vigna*. La comparaison génomique de la région symbiotique de NZP2037 avec R7A et MAFF303099 a montré que NZP2037 possède un système de sécrétion de type IV comme celui de R7A. Dans l'objectif d'identifier les gènes responsables de l'élargissement du spectre d'hôte, un mutant (T4KO) a été réalisé sur onze gènes *vir* (*virB1-virB11*). Le test de nodulation avec dix espèces de *Lotus* montre que la capacité symbiotique du mutant est comparable à celle de la souche sauvage NZP2037. Ceci indique que le T4SS n'influence pas le spectre d'hôte chez NZP2037. Plusieurs gènes candidats associés à la nodulation étant des homologues des gènes de nodulation : *nodO* (forme des pores dans les membranes végétales pour la sécrétion hétérologues au cours de l'infection), *nodU* (impliqué dans l'activité 6-O-carbamoyltransférase) et *nodFEGA* qui sont accompagnés de séquences *nodbox* dans chaque région des gènes homologues aux gènes de nodulation, ont été identifiés chez NZP2037 mais ils n'ont pas été détectés chez R7A et MAFF303099, à l'exception de deux homologues de *nodFE* qui ont été identifiés chez MAFF303099 mais ils n'étaient pas accompagnés par *nodbox*. Cette étude suggère que l'homologue de *nodU* codant une 6-O-carbamoyl transférase, accompagnée par *nodbox*, pourrait contribuer à la synthèse de FN en modifiant la chaîne latérale du FN comme chez *Ensifer* sp. NGR234. L'homologue de *nodO* pourrait contribuer à l'amélioration de la capacité de reconnaissance. *nodFEGA* peuvent aussi élargir le spectre d'hôte en conférant des variations au FN (modification des acides gras accrochés sur le résidu de glucosamine terminal non réducteur).

I-3-1-D- La région symbiotique chez *M. loti* (l'espèce fréquemment associée à *L. corniculatus*) :

(a) L'îlot symbiotique chez *M. loti* :

Des études fondamentales ont montré que la région symbiotique chez plusieurs souches de *M. loti* est située dans un îlot génomique transférable (**Encadré II**). L'îlot génomique est une région de l'ADN (>10 kb) capable de se séparer de leur chromosome, de se transférer et de s'insérer dans le chromosome récepteur d'autres bactéries. Les bactéries réceptrices sont alors dotées de nouvelles propriétés écologiques leur permettant par exemple d'infecter certains hôtes eucaryotes (pathogènes, symbiotes) ou de coloniser certains écosystèmes (dégradation de polluants, acquisition du fer...) (Hentschel and Hacker, 2001).

L'îlot symbiotique de *M. loti* contient des fonctions qui rendent les souches saprophytiques symbiotiquement compétentes. L'îlot symbiotique partage des caractéristiques communes avec l'îlot de pathogénicité en s'intégrant au niveau du gène phenylalanine tARN de la souches bénéficiaire, il code pour une intégrase de la famille du phage P4 dans leur extrémité 5' (**Figure I-13**) (Sullivan and Ronson, 1998; Hentschel and Hacker, 2001).

Encadré II : l'îlot génomique

La composition du génome bactérien peut être changée à travers une variété des processus comprenant le phénomène du transfert horizontal des gènes. Le transfert horizontal de gènes est un processus dans lequel un organisme intègre des éléments génétiques provenant d'un autre organisme sans en être le descendant, ces éléments sont appelés « îlot génomique ». Ce processus est considéré comme un des facteurs principaux de l'augmentation du fitness des bactéries. Les îlots génétiques se divisent en plusieurs sous types selon le mode de vie du microorganisme : « îlot écologique » dans les bactéries environnementales et « îlot saprophytique », « l'îlot symbiotique » ou « l'îlot pathogène » pour les microorganismes qui s'interagissent avec les hôtes (Hacker and Carniel, 2001) (**Figure EII-1. a**). L'ADN transférables horizontalement est une partie du groupement de gènes bactériens flexibles comprenant les phages, les plasmides les transposons, les intégrons, les îlots génomiques (< 10 kb) et les îlots génomiques (>10 kb). L'îlot génomique peut fournir un avantage sélectif dans des conditions environnementales particulières (stress, conditions *in vivo*, l'exposition aux substrats antibactériens). Chez les bactéries, le transfert horizontal joue un rôle majeur dans leur diversification et l'îlot génomique joue un rôle dans l'évolution du spectre d'hôte, il est impliqué dans la diffusion des gènes variés telle que ceux qui sont impliqués dans la résistance aux antibiotiques ainsi que la propagation des gènes de virulence (Juhás et al., 2009). La majorité des îlots génomiques partagent les caractéristiques suivantes (**Figure EII-1. b**) :

- 1- Les îlots génomiques sont des larges fragments d'ADN (>10kb)
- 2- Ils sont potentiellement réorganisés par les statistiques des nucléotides (ex ; le contenu de GC, le biais cumulatif de GC, la fréquence de tetranucléotide ou l'usage du codon).
- 3- Ils sont souvent insérés aux gènes tARN.
- 4- Ils sont souvent entourés par 16-20 bp des séquences répétées (DR).
- 5- Ils hébergent des gènes fonctionnels ou cryptiques codant des intégrases ou des facteurs liés au système de conjugaison de plasmide ou des phages impliqués dans le transfert de l'îlot génomique.
- 6- Ils sont accompagnés par des éléments d'insertion ou transposons (IS) qui sont impliqués dans la mobilisation des matériaux génétiques.
- 7- Les îlots génomiques contiennent des gènes qui offrent des avantages sélectifs aux bactéries réceptrices. Selon le contenu de leurs gènes, les îlots génomiques sont décrits comme des pathogène, des symbioses, des métaboliques ou des îlots résistants.

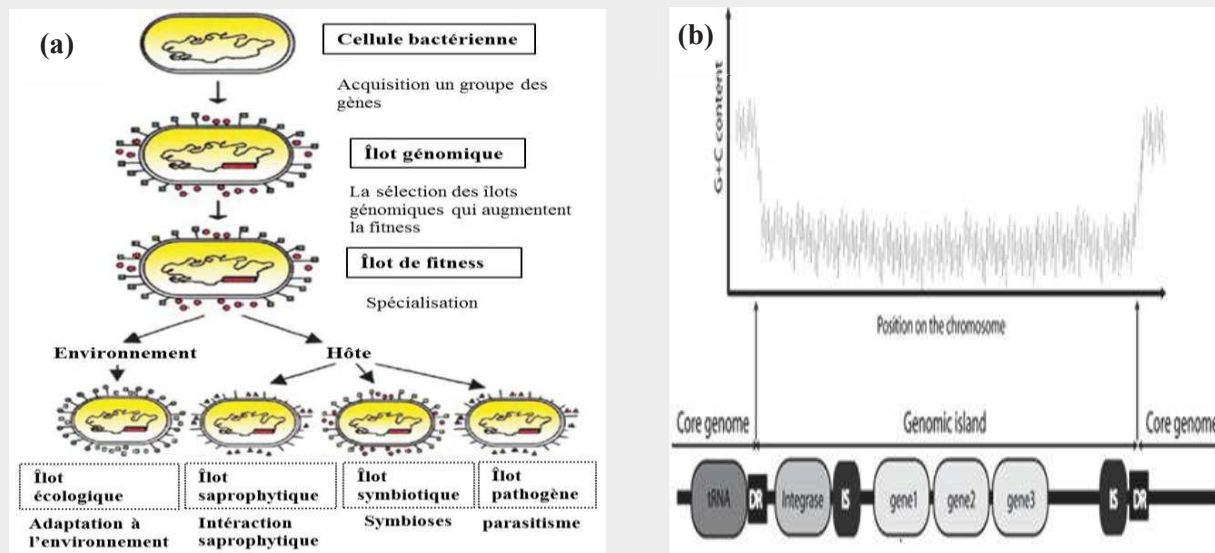


Figure EII-1 : Les caractères généraux des îlots génomiques. (A) Modèle général proposé pour le développement de l'îlot génomique par l'acquisition d'un matériel génétique étrangère. Les gènes acquis peuvent participer dans la survie de la bactérie réceptrice dans l'environnement, la vie d'un saprophyte, la symbiose ou le pathogène (d'après Hacker & Corneil 2001). (B) Les îlots génomiques sont des larges fragments de l'ADN pour lesquels les caractéristiques des nucléotides sont différents du reste du chromosome (Juhás et al., 2009).

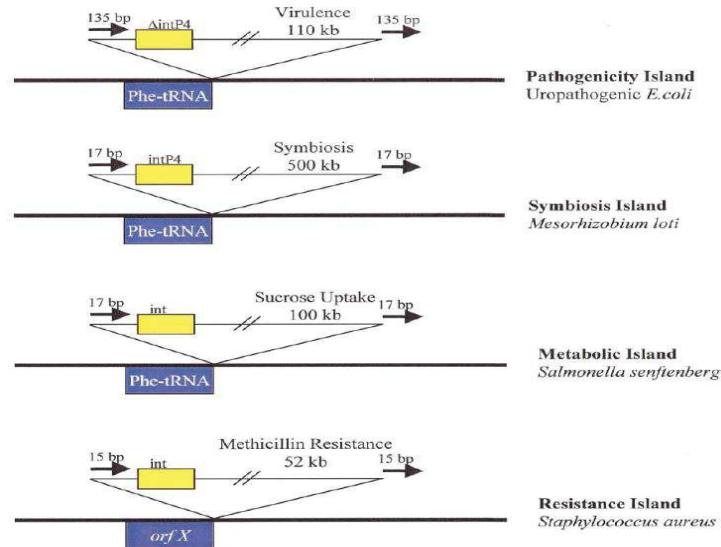


Figure I-13 : Exemples d'îlots génomiques codant pour différentes fonctions chez des souches bactériennes (Hentschel and Hacker, 2001).

(b) Transfert horizontal de l'îlot symbiotique chez *M. loti* :

Sept ans après l'inoculation de *L. corniculatus* avec la souche *M. loti* ICMP3153 dans des sols de Nouvelle Zélande cultivé avec du lotier corniculé, des rhizobia différents de la souche introduite *M. loti* ICMP3153, ont été retrouvés dans les nodosités de *L. corniculatus* (Sullivan et al., 1995). Malgré la diversité génétique de ces souches, toutes les souches isolées partagent une région symbiotique identique avec la souche d'origine ICMP3153. Cette région faisant une taille minimale d'environ 500-600 kb intégrée dans le chromosome des souches. Cette étude met en évidence un transfert horizontal de la région symbiotique de la souche d'inoculation (appelée donneuse) à des souches du sol non symbiotiques (appelées souches réceptrices) et qui sont déjà présentes dans les sols du site. Le transfert horizontal de la région symbiotique d'ADN n'implique pas des plasmides non intégratifs mais des îlots génomiques intégrés dans le chromosome (Sullivan et al., 1995). Afin de montrer que les rhizobia peuvent se retrouver dans le sol en absence de légumineuses et sont capables d'acquérir les gènes symbiotiques à partir d'une autre souche symbiotique, (Sullivan et al., 1996) ont pu isoler des souches non symbiotiques de *Mesorhizobium* en prenant en compte : le temps de la croissance (environ 4 jours), l'absence de croissance sur milieu LB, la présence d'une structure muqueuse sur les cultures sur milieu YM agar, l'absence de nodulation avec *L. corniculatus* et une hybridation positive avec le génome de *M. loti*. Au final quatre souches différentes non symbiotiques ont été isolées directement du sol sans piégeage par la plante-hôte et différentes de la souche ICMP3153. L'origine des rhizobia sur le site est inconnue. Elles seraient potentiellement des bactéries saprophytes relativement fréquentes dans le sol ou bien issues de rhizobia associées aux plantes natives sur le site.

L'hypothèse d'un transfert horizontal des gènes symbiotiques a été confirmée par Sullivan and Ronson, (1998) en reproduisant au laboratoire le transfert horizontal d'une région symbiotique (environ 500 kb) dans le chromosome de *M. loti* ICMP3153. Cet élément symbiotique a été intégré dans le gène phe-tRNA codant une intégrase de la famille du phage P4 avec une séquence entièrement située à l'extrémité 5' gauche de l'îlot avec à son extrémité droite (3'), la présence de 17 nucléotides du gène tRNA à l'extrémité droite (3'). Les gènes retrouvés sur un îlot chromosomique chez une espèce peuvent se retrouver sur le plasmide d'un autre, telle que *Rhizobium etli* qui a les gènes symbiotiques situés sur un plasmid transferable (Brom et al., 2000). Ensuite, Sullivan et al, (2002) ont comparé l'îlot symbiotique transférable de la souche *M. loti* R7A correspondant à 502-kb avec l'îlot symbiotique transférable de 611-kb de la souche MAFF303099. Ils ont trouvé que la région commune de l'ADN (414 gènes) contenait tous les gènes requis pour la synthèse du FN, la fixation de l'azote et le transfert de l'îlot symbiotique.

(c) Comparaison la région symbiotique de *M. loti* R7A avec celle de *Mesorhizobium* MAFF303099 :

Kelly et al, (2014) ont séquencé le génome complet de la souche R7A de *M. loti*. Cette souche a été isolée de *L. corniculatus* du site Lammermoor, Otago en Nouvelle-Zélande en 1993 (Sullivan et al., 1995). R7A (comprenant un chromosome unique codant 6,398 gènes et ne contenant aucun plasmide) est capable de former des symbioses efficaces avec *L. tenuis*, *L. corniculatus*, *L. japonicus*, *L. filicaulis* et *L. burttii*. La souche MAFF303099 quant à elle, contient deux plasmides cryptiques pMLa (351,911 pb) et pMLb (208,315 pb) portant respectivement 320 et 209 gènes codant des protéines (Kaneko et al., 2000). Chez la souche MAFF303099, un fragment d'ADN sur le chromosome de 611-kb contient 30 gènes codant pour la fixation d'azote, 24 gènes codant pour la nodulation et une séquence du gène phe-tRNA situé en partie terminale 3' (Kaneko et al., 2000). En comparant la structure des extrémités de chaque région symbiotique entre les deux souches MAFF303099 et R7A, la séquence ne s'avère pas conservée à l'exception de la région située entre le gène phe-tRNA et celui de l'intégrase de type P4 et qui encadrent les gènes symbiotiques. L'îlot de la souche MAFF303099 est 20% plus long que celui de R7A et la structure de l'îlot symbiotique est différente entre les deux souches (Kaneko et al., 2000). La région symbiotique de R7A semble transférable contrairement à l'îlot symbiotique de MAFF303099 qui semble intransférable (Sullivan and Ronson, 1998; Ramsay et al., 2006) car dans l'îlot symbiotique de MAFF303099 partage les gènes nécessaires pour la synthèse de FN et la fixation de l'azote avec R7A alors que la région des gènes codant pour tRNA et l'enzyme d'intégrase de la famille P4 n'a pas été conservée entre les deux souches (MAFF303099 et R7A) et l'îlot symbiotique de MAFF30309 est 20% plus long que celui de R7A (Kaneko et al., 2000; Sullivan et al., 2002). Ramsay et al, (2006) ont trouvé que le transfert horizontal de la région symbiotique des souches de *Mesorhizobium* symbiotiques aux souches non-symbiotiques exige les gènes *intS* (tyrosine recombinase appartenant à la famille des intégrases de type bactériophage P4) qui est un médiateur de

l'intégration de la région symbiotique dans *phe*-tRNA, *rlxS* (*msi106*, codant pour une enzyme relaxase putative) et *rdjS* (ayant un rôle régulateur dans l'expression de la région symbiotique). Le *msi109* est un membre du cluster *msi110*-*msi106*, impliqué dans le transfert conjugatif. La divergence entre MAFF303099 et les autres souches de *M. loti* a été expliquée par Wang et al (2014) qui ont comparé les génomes des souches *M. huakuii* 7653R, MAFF303099 avec quatre autres génomes de souches de *Mesorhizobium* (*M. opportunistum* WSM2075, *M. australicum* et *M. ciceri* sv. *biserrulae* WSM1271). Ils ont confirmé que la souche MAFF30309 appartenait à *M. huakuii* sv *loti* et ont identifié les différences moléculaires candidates pouvant être responsables de la spécificité des deux souches envers des plantes hôtes. Toutes les souches de *M. huakuii* ont un spectre d'hôte étroit et forment des nodosités fixatrices d'azote seulement avec *Astragalus sinicus* sauf *M. huakuii* MAFF303099 qui a un large spectre d'hôte et est capable de noduler plusieurs espèces de lotier dont *L. corniculatus* et *L. japonicus* (Wang et al., 2014).

I-3-2- Les symbiotes associés à *A. vulneraria* et leur compatibilité avec *L. corniculatus* :

Très peu d'informations sont disponibles sur la diversité des souches associées à *A. vulneraria*. Cette espèce peut être considérée comme une espèce facilitatrice de la revégétalisation d'anciens sites miniers (Frérot et al., 2006). Son succès écologique est dû à son association privilégiée avec des rhizobia appartenant principalement au genre *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1982 ; Novikova et al., 1993 ; Ampomah and Huss-Danell, 2011). Deux espèces ont été définies comme symbiotiques d'*A. vulneraria* : l'espèce *M. metallidurans* très résistante aux métaux lourds (CMI de Zn =16-32 mM, CMI de Cd = 0.3-0.5 mM), isolée d'un site minier au sud de France fortement contaminé en zinc, plomb et cadmium, et provenant de nodosités d'*A. vulneraria* subsp *carpatica* (Vidal et al., 2009) et *Aminobacter anthyllidis* isolées de nodosités d'*A. vulneraria* subsp *pyrenaica*, moyennement résistantes aux métaux lourds (CMI de Zn = 1-2 mM, CMI de Cd = 0,3 mM), isolée de la mine d'Eylie en Pyrénées ariégeoises en France (Maynaud et al., 2012).

D'anciens travaux portant sur la compatibilité des souches associées à *A. vulneraria* et à *L. corniculatus* (Abdel-Ghaffar and Jensen, 1966) distinguent deux groupes différents de souches de rhizobia : un groupe capable de noduler à la fois *A. vulneraria*/ *L. corniculatus* et un autre groupe nodulant *Lupinus/Ornithopus*. Ampomah and Huss-Danell, (2011) ont montré que les espèces *L. corniculatus* et *A. vulneraria* sont principalement nodulées par *Mesorhizobium* mais aussi que quatre isolats appartenant aux genres *Rhodococcus* spp., *Geobacillus* spp. et *Paenibacillus* spp. peuvent être retrouvées dans les nodosités d'*Anthyllis* et du lotier. Ces souches possèderaient le gène *nodA* (94-95% d'identité avec *nodA* de *M. loti*) et ont probablement acquis le gène *nodA* via le transfert horizontal du gène.

I-4 *Mesorhizobium* : diversité, spécificité et interaction avec l'environnement :

I-4-1- Diversité du genre *Mesorhizobium* :

Le genre *Mesorhizobium* comporte des espèces qui ont une grande distribution géographique et sont capable de noduler avec une grande variété des légumineuses qui ont une importance économique comme le pois chiche mais aussi écologique comme le *Lotus* spp. (Laranjo et al., 2014).

D'un point de vue taxonomique (<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>), le genre *Mesorhizobium* appartient à la classe des *Alphaproteobacteria*, l'ordre des *Rhizobiales*, la famille des *Phyllobacteriaceae*. Le préfixe « meso » provient de la position phylogénétique intermédiaire de *Mesorhizobium* entre le complexe *Agrobacterium-Rhizobium-Ensifer* et les genres *Azorhizobium* et *Bradyrhizobium* (Jarvis et al., 1997). Le nom de *Mesorhizobium* a été initialement proposé par Jarvis et al, (1997) pour cinq espèces de rhizobia (*M. loti*, *M. huakuii*, *M. ciceri*, *M. mediterraneum* et *M. tianshanense*). A l'heure actuelle, le genre *Mesorhizobium* comprend 41 espèces isolées de différentes espèces végétales présentes dans différentes régions géographiques sur la planète (**Tableau I-5**).

Tableau I-5 : Espèces de *Mesorhizobium* actuellement décrites, les souches types avec leurs plantes hôtes et le pays d'isolement.

Espèce	Souche type	Plante hôte d'origine	Site ou pays d'isolement	Références
<i>M. abyssinicae</i>	AC98c ^T	<i>Acacia abyssinica/A. tortilis</i>	Sud de l'Ethiopie	(Degefu et al., 2013)
<i>M. albiziae</i>	CCBAU 61158 ^T	<i>Albizia kalkora</i>	Région subtropicale en Chine	(Wang et al., 2007)
<i>M. alhagi</i>	CCNWXJ12-2 ^T	<i>Alhagi sparsifolia</i>	Chine	(Chen et al., 2010)
<i>M. amorphae</i>	ACCC 19665 ^T	<i>Amorpha fruticosa</i>	Chine	(Wang et al., 1999)
<i>M. australicum</i>	WSM2073 ^T	<i>Biserrula pelecinus</i>	Australie	(Nandasena et al., 2009)
<i>M. camelthorni</i>	CCNWXJ 40-4 ^T	<i>Alhagi sparsifolia</i>	Chine	(Chen et al., 2011)
<i>M. caraganae</i>	CCBAU 11299 ^T	<i>Caragana microphylla</i>	Chine	(Guan et al., 2008)
<i>M. chacoense</i>	LMG 19008 ^T	<i>Prosopis alba</i>	Argentine (région aride)	(Velazquez et al., 2001)
<i>M. ciceri</i>	UPM-Ca7 ^T	<i>Cicer arietinum</i>	Beltsville, Maryland, USA	(Nour et al., 1994)
<i>M. gobiense</i>	CCBAU 83330 ^T	<i>Oxytropis glabra</i>	Chine (désert)	(Han et al., 2008)
<i>M. hawassense</i>	AC99b ^T	<i>Sesbania sesban</i>	Sud de l'Ethiopie	(Degefu et al., 2013)
<i>M. huakuii</i>	CCBAU 260 ^T	<i>Astragalus sinicus</i>	Chine	(Chen et al., 1991)
<i>M. loti</i>	NZP 2213 ^T	<i>Lotus corniculatus</i>	Nouvelle Zélande	(Jarvis et al., 1982)
<i>M. mediterraneum</i>	UPM-Ca7 ^T	<i>Cicer arietinum</i>	Espagne	(Nour et al., 1995)
<i>M. metallidurans</i>	STM 2683 ^T	<i>Anthyllis vulneraria</i>	France (site minier, chargé en Zn, Pb et Cd)	(Vidal et al., 2009)
<i>M. muleiense</i>	CCBAU 83963 ^T	<i>Cicer arietinum</i>	Chine (sol alcalin)	(Zhang et al., 2012)

<i>M. opportunistum</i>	WSM2075 ^T	<i>Biserrula pelecinus</i>	Australie	(Nandasena et al., 2009)
<i>M. plurifarium</i>	ORS 1032 ^T	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal	(De Lajudie et al., 1998b)
<i>M. qingshengii</i>	CCBAU 33460 ^T	<i>Astragalus sinicus</i>	Chine	(Zheng et al., 2013)
<i>M. robiniae</i>	CCNWYC 115 ^T	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Chine	(Zhou et al., 2010)
<i>M. sangaii</i>	SCAU7 ^T	<i>Astragalus luteolus</i>	Chine	(Zhou et al., 2013)
<i>M. septentrionale</i>	SDW014 ^T	<i>Astragalus adsurgens</i>	Chine	(Gao et al., 2004)
<i>M. shangrilense</i>	CCBAU 65327 ^T	<i>Caragana bicolor</i>	Chine	(Lu et al., 2009)
<i>M. shonense</i>	AC39a ^T	<i>Acacia abyssinica</i>	Sud de l’Ethiopie	(Degefu et al., 2013)
<i>M. silamurunense</i>	CCBAU 01550 ^T	<i>Astragalus membranaceus</i>	Chine	(Zhao et al., 2012)
<i>M. tamadayense</i>	Ala-3 ^T	<i>Anagyris latifolia</i>	Iles canaries, Espagne	(Ramirez-Bahena et al., 2012)
<i>M. tarimense</i>	CCBAU 83306 ^T	<i>Lotus frondosus</i>	Chine (désert)	(Han et al., 2008)
<i>M. temperatum</i>	SDW018 ^T	<i>Astragalus adsurgens</i>	Chine	(Gao et al., 2004)
<i>M. thiogangeticum</i>	SJT ^T	<i>Clitoria ternatea</i> (rhizosphère)	Inde	(Ghosh and Roy, 2006)
<i>M. tianshanense</i>	A-1BS ^T	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	Chine	(Chen et al., 1995)
<i>M. soli</i>	NHI-8 ^T	<i>Robinia pseudoacacia</i> (rhizosphère)	Corée	(Nguyen et al., 2015)
<i>M. erdmanii</i>	USDA3471 ^T	<i>Lotus corniculatus</i>	Nouvelle Zélande	(Martinez-Hidalgo et al., 2015)
<i>M. jarvisii</i>	ATCC 33669 ^T	<i>Lotus corniculatus</i>	Nouvelle Zélande	(Martinez-Hidalgo et al., 2015)
<i>M. acaciae</i>	RITF 741 ^T	<i>Acacia melanoxylon</i>	Chine	(Zhu et al., 2015)
<i>M. waimense</i>	ICMP 19557 ^T	<i>Sophora longicarinata</i>	Nouvelle Zélande	(De Meyer et al., 2015b)
<i>M. cantuariense</i>	ICMP 19515 ^T	<i>Sophora microphylla</i>	Nouvelle Zélande	(De Meyer et al., 2015b)
<i>M. calcicola</i>	ICMP 19560 ^T	<i>Sophora longicarinata</i>	Nouvelle Zélande	(De Meyer et al., 2015a)
<i>M. waitakense</i>	ICMP 19523 ^T	<i>Sophora microphylla</i>	Nouvelle Zélande	(De Meyer et al., 2015a)
<i>M. sophorae</i>	ICMP 19535 ^T	<i>Sophora microphylla</i>	Nouvelle Zélande	(De Meyer et al., 2015a)
<i>M. newzealandense</i>	ICMP 19545 ^T	<i>Sophora prostrata</i>	Nouvelle Zélande	(De Meyer et al., 2015a)
<i>M. kowhaii</i>	ICMP 19512 ^T	<i>Sophora microphylla</i>	Nouvelle Zélande	(De Meyer et al., 2015a)

Toutes les espèces de *Mesorhizobium* sont symbiotiques à l’exception de deux à savoir : *M. thiogangeticum* isolée de la rhizosphère d’une légumineuse tropicale *Clitoria ternatea* (Ghosh and Roy, 2006) et *M. soli* isolée de rhizosphère de *Robinia pseudoacacia* (Nguyen et al., 2015).

Exemple de la diversité de *Mesorhizobium* : Plusieurs espèces de *Mesorhizobium* peuvent noduler la même espèce de plante comme dans le cas d’*Acacia* où une grande diversité de souches isolées des nodosités d’*Acacia senegal* de deux régions aride (Dahra) et semi-aride (Goudiry) au Sénégal a été observée par (Bakhoum et al., 2014). Les souches isolées du site semi-aride présentent une plus grande

diversité que celles du site aride. Des souches spécifiques de sites géographiques ont été isolées, indiquant ainsi que les caractéristiques physico-chimique des sites géographiques influencent la diversité de rhizobia (Bakhoum et al., 2014). En revanche, toutes les souches nodulant *A. senegal* ont partagé les même séquences des gènes symbiotiques (*nodA* et *nodC*) et aussi du gène de la fixation de l'azote (*nifH*) (Bakhoum et al., 2015). Cela peut être lié au transfert de gènes symbiotiques entre les différentes espèces de rhizobia dans le sol (Bakhoum et al., 2015). Par la suite, Diouf et al, (2015) ont mis en évidence par une comparaison génomique la diversité des souches isolées d'*Acacia senegal* et d'*A. seyal* de sites salins au Sénégal. Cette étude a confirmé, par les analyses MLSA de cinq marqueurs (*atpD*, *dnaJ*, *gyrB*, *recA* et *glnA*), la présence potentielle de plusieurs nouvelles espèces de *Mesorhizobium* nodulant *Acacia*. La comparaison génomique de sept génomes complets de souches isolées d'*A. senegal* et d'*Acacia seyal* montre que quatre souches appartiennent à *M. plurifarium* et les trois autres seraient de nouvelles espèces de *Mesorhizobium*. Les résultats de cette étude montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre la diversité génétique, les caractéristiques de sols et la tolérance des souches à la salinité (Diouf et al., 2015).

I-4-2- La spécificité de *Mesorhizobium* envers leur plante hôte :

I-4-2-A- Les symbiovars dans le genre *Mesorhizobium* :

Dans le cas de *Mesorhizobium*, plusieurs symbiovars ont été décrits chez plusieurs espèces (**Tableau I-3**) ; le symbiovar *ciceri* au sein des espèces *M. amorphae* et *M. tianshanense*, le symbiovar *ciceri* qui nodulent efficacement *Cicer arietinum* (pois chiche) contrairement aux souches types de ces deux espèces *M. amorphae* ACCC 19665^T et *M. tianshanense* USDA 3592^T (Rivas et al., 2007). Les séquences *nifH* et *nodC* des souches de *M. amorphae* et *M. tianshanense* nodulant le pois chiche montrent plus de 99,5% de similarité avec celle des souches types de *M. ciceri* UPM-Ca7^T et *M. mediterraneum* UMP-Ca36^T nodulant *Cicer arietinum* (Nour et al., 1994; Nour et al., 1995). Les gènes *nodC* et *nifH* de *M. amorphae* et ceux de *M. tianshanense* isolés du pois chiche sont divergeants de ceux des souches *M. amorphae* ACCC 19665^T et *M. tianshanense* USDA 3592^T qui partagent seulement environ 75% et 89% de similarité (Rivas et al., 2007). En revanche, deux symbiovars ont été décrits chez l'espèce *M. tamadayense* 'anagyris' ou 'loti'. La souche type de cette espèce a été isolée de *Anagyris latifolia* et les autres souches de *M. tamadayense* ont été isolées de *Lotus berthelotii* (Ramirez-Bahena et al., 2012). De plus, les gènes symbiotiques des différentes espèces de *Mesorhizobium* qui nodulent *Anagyris latifolia* sont très proches (Donate-Correa et al., 2007; Rogel et al., 2011).

M. huakuii symbiovar *loti* MAFF303099 qui avait été identifiée au départ comme une souche de *M. loti* par Jarvis et al (1982) a été récemment réexaminée par Wang et al, (2014) sur la base de la comparaison génomique avec *M. loti* USDA3471^T et de *M. huakuii* 7653R. Les résultats ont confirmé l'appartenance de la souche MAFF303099 à l'espèce *M. huakuii* (Wang et al., 2014). *M. huakuii*

7653R forme des nodosités avec *Astragalus sinicus*, alors que *M. huakuii* MAFF303099 symbiovar *loti* forme des nodosités et fixe l'azote avec plusieurs plantes hôtes du genre *Lotus* comprenant *L. corniculatus* et *L. japonicus* (Estrella et al., 2009).

Deux symbiovars, 'ciceri' et 'bisserulae' ont été mis en évidence au sein de l'espèce *M. ciceri*. *Biserrula pelecinus* qui est une espèce de légumineuse fourragère forme une interaction symbiotique très spécifique avec des souches de *Mesorhizobium* appartenant à l'espèce *M. ciceri* (Nandasena et al., 2007a). Les souches de *Mesorhizobium* isolées de *B. pelecinus* ne nodulent pas *Cicer artietinum* (plante hôte de *M. ciceri*) et vice-versa. De plus, la similarité des séquences de *nodA* entre *M. ciceri* et les mesorhizobia de *Bisserula* est inférieure à 66.9% pour le gène *nodA* et inférieure à 78.6% pour le gène *nifH* (Nandasena et al., 2007a).

I-4-2-B- Le phénomène du transfert lateral de l'îlot symbiotique chez *Mesorhizobium*:

Chez les prokaryotes, le transfert horizontal des gènes à travers les descendances chromosomiques peut être assuré par le plasmide, les phages, les éléments transposables et d'autres éléments accessoires de l'ADN. Les analyses des gènes symbiotiques des souches appartenant aux genres *Mesorhizobium*, *Ensifer* et *Rhizobium* isolées de plusieurs genres de plantes hôtes laisse suggérer que l'association avec la plante hôte peut être importante dans la différenciation des gènes *nod* chez les rhizobia et ces gènes peuvent être soumis au transfert horizontal des gènes entre les souches (Wernegreen and Riley, 1999). Le genre *Mesorhizobium* est préférentiellement associé à des légumineuses très variées et qui ont une large distribution dans le monde comme *Hedysarum*, *Astragalus* et *Oxytropis* (Wernegreen and Riley, 1999).

Des études chez *M. loti* ont montré que les clusters des gènes situés dans l'îlot symbiotique sont collectivement exprimés pendant la symbiose, alors que les gènes situés à l'extérieur de l'îlot sont sous-régulés (Uchiumi et al., 2004). L'îlot symbiotique correspond à une région du chromosome qui a une longueur néoclotidique variable selon la souche : 500-kb chez *M. loti* ICMP3153, 502-kb chez *M. loti* R7A et 611 kb chez MAFF303099 (Sullivan and Ronson, 1998; Uchiumi et al., 2004; Nandasena et al., 2007b). Nandasena et al., (2006) ont confirmé l'existence d'un transfert horizontal de l'îlot symbiotique dans des espèces de *Mesorhizobium* du sol qui deviennent ainsi capables de noduler la légumineuse *Biserrula pelencinus*. Suite à une culture de *Biserrula pelencinus* inoculée avec une seule souche de *Mesorhizobium* (WSM1271), les auteurs ont observé un transfert génétique marqué par la détection des gènes *nodA* et *nifH* de la souche inoculée vers des bactéries du sol (Nandasena et al., 2006). Ce transfert horizontal est suivi par une évolution rapide de compétitivité pour la fixation de l'azote entre la souche inoculée et les souches réceptrices indigènes du sol (Nandasena et al., 2007b).

Mesorhizobium et *Aminobacter* sont deux genres proches phylogénétiquement, appartenant à la famille des *Phyllobacteriaceae*. Le genre *Aminobacter* contient quatre espèces non symbiotiques et une espèce symbiotique *A. anthyllidis* identifiée par Maynaud et al, (2012) et qui est capable de

noduler *A. vulneraria*. Le gène symbiotique *nodA* d'*A. anthyllidis* est phylogénétiquement très proche de celui du symbiovar *loti* révélant ainsi un potentiel transfert horizontal de l'îlot symbiotique d'un *Mesorhizobium* vers *A. anthyllidis* (Maynaud et al., 2012).

Par conséquent, le transfert horizontal des gènes de nodulation d'une espèce à une autre espèce ne permet pas de relier l'espèce bactérienne avec sa capacité à établir une symbiose avec une plante hôte donnée. La spécificité est liée aux gènes symbiotiques et non à l'espèce bactérienne.

I-4-3- Interactions des espèces de *Mesorhizobium* avec l'environnement :

Certaines conditions environnementales sont des facteurs limitants pour la survie, la croissance et les activités des bactéries fixatrices de l'azote. Dans la symbiose rhizobium-légumineuse, le processus de la BNF est intimement lié à l'état physiologique de la plante hôte et à la tolérance des espèces de rhizobia aux conditions environnementales. Les facteurs du milieu comme la température et la salinité du sol réduisent l'abondance et la croissance des rhizobia dans le sol ainsi que la performance de la symbiose rhizobium-légumineuse. En revanche, plusieurs relations symbiotiques tolérantes aux conditions extrêmes de salinité, alcalinité, acidité, sécheresse, teneurs en métaux lourds ont pu être identifiées dans des milieux à fortes contraintes abiotiques (Zahran, 1999; Velazquez et al., 2001; Zhang et al., 2012).

Le genre *Mesorhizobium* contient des espèces capables de former des nodosités avec une large gamme d'espèces différentes de légumineuses. La température optimale de croissance mesurée pour les espèces de *Mesorhizobium* se situe entre 25 et 30°C. Le pH optimal varie de 6 à 8 et les mesorhizobia peuvent tolérer 1-2% de NaCl en général (Laranjo and Oliveira, 2011). Laranjo and Oliveira, (2011) ont aussi observé une grande diversité phénotypique pour les souches types de *Mesorhizobium* dans leur réponse à plusieurs conditions de stress abiotiques. Ainsi seize souches types d'espèces de *Mesorhizobium* ont été testées en les soumettant à différents stress abiotiques ; trois d'entre elles ont montré une grande sensibilité à la température (*M. chacoense*, *M. septentrionale* et *M. temperatum*) et trois autres une meilleure tolérance avec un maximum à 35°C (*M. huakuii*, *M. plurifarum* et *M. thiogangeticum*). Toutes les souches testées de *Mesorhizobium* supportent faiblement un stress alcalin, alors que la moitié des souches sont tolérantes au stress acide, comme *M. ciceri* considérée comme une souche acidophile. En ce qui concerne le stress salin, quatre souches sont sensibles (*M. albiziae*, *M. septentrionale*, *M. temperatum* et *M. huakuii* MAFF303099) et trois souches types sont tolérantes (*M. huakuii*, *M. plurifarum* et *M. thiogangeticum*) (Laranjo and Oliveira, 2011).

Exemples de la tolérance des souches de mesorhizobia aux stress abiotiques :

Des souches appartenant aux espèces de *Mesorhizobium* ont été isolées de sols très variés et parfois de sols présentant de fortes contraintes édaphiques comme *M. amorphae* CCNWGS0123 isolée des

nodosités de *Robinia pseudoacacia* d'un site minier fortement contaminé en Cu, Zn et Pb (Hao et al., 2012) ou de *M. tianshanense*, *M. gobiense* ou *M. taramense* isolées de zones arides ou désertiques.

Jusqu'à présent, toutes les souches de l'espèce de *M. metallidurans* ont été identifiées comme des souches résistantes au Zn et au Cd (CIM de 16-32 mM du Zn et 0.3-0.5 mM de Cd) (Vidal et al., 2009). De plus, 95 souches isolées des nodosités de *Cicer arietinum* d'un sol alcalin en Chine appartenant à l'espèce *M. muleiense* étaient tolérantes au stress alcalin (pH 8.2-8.5) (Zhang et al., 2011; Zhang et al., 2012). 47 souches isolées d'*Acacia senegal* d'un sol salé appartenant à l'espèce de *M. plurifarium* et d'autres espèces nouvelles étaient tolérantes jusqu'à une concentration de 200 mM de NaCl (Bakhoum et al., 2014; Diouf et al., 2015).

I-5 Impact des métaux lourds sur la diversité des bactéries du sol :

La toxicité des métaux lourds, les déficits en phosphore et en azote sont les trois principaux facteurs qui limitent l'installation d'une couverture végétale dans un sol contaminé. Le pH du sol et d'autres caractéristiques du sol (teneur en matière organique, teneur en argile...etc) ont un effet important sur les espèces végétales se développant en présence de contaminants métalliques en raison de l'effet de ces facteurs telluriques sur la disponibilité des métaux et leur toxicité. Ainsi, quand le pH diminue d'une unité, les concentrations de Zn, Ni et Cd dans la solution de sol sont multipliées par environ deux (Christensen, 1984; Sanders et al., 1986; Giller et al., 1998; Benabid and Ghorab, 2014). De plus, les microorganismes présentent des différences considérables pour leur sensibilité vis-à-vis de la toxicité des métaux ce qui peut influencer la structure de la communauté microbienne dans le sol (Giller et al., 1998).

La biodiversité est considérée comme une composante essentielle dans l'adaptation aux changements des conditions environnementales et elle est donc essentielle pour le maintien de la productivité et la stabilité fonctionnelle de l'écosystème (Loreau et al., 2001). En ce qui concerne la diversité fonctionnelle au sein d'une seule espèce, la diversité génétique n'est pas cohérente avec la diversité phénotypique. L'espèce peut avoir une certaine diversité phénotypique dans la tolérance aux conditions environnementales pour maintenir la stabilité fonctionnelle de l'écosystème. Cependant, le risque d'extinction de l'espèce peut aussi être élevé parce que les individus au sein d'une même espèce peuvent partager beaucoup de caractéristiques physiologiques, y compris la sensibilité à des contraintes édaphiques (Laguerre et al., 2006). Les rhizobia sont des bactéries étant répandues dans le sol et la compréhension des facteurs qui peuvent influencer l'abondance, la diversité, la structure génétique des populations et des communautés de rhizobia est importante pour préserver et favoriser la fixation symbiotique de l'azote (Laguerre et al., 2006).

Certaines études ont montré que les populations de rhizobium sont généralement sensibles aux métaux lourds (Baath, 1989; Giller et al., 1998). Par contre, Giller et al, (2009) ont montré que la tolérance des

rhizobia aux métaux lourds peut varier entre les individus au sein d'une même espèce. Ainsi les souches de rhizobia qui sont résistantes aux métaux deviennent-elles dominantes après la contamination du sol en raison de la pression sélective sur les souches capables de survivre dans un sol contaminé. Des souches d' *Ensifer medicae* et de *R. leguminosarum* ont été isolées respectivement de *Medicago* spp et de *Trifolium* spp. à partir de sols très contaminés par du mercure et d'autres métaux comme le Zn et le Cd. Les résultats montrent qu'il n'y avait pas de correspondance entre les phénotypes des souches étudiées et leurs génotypes. Parmi 59 souches de *R. leguminosarum* et *E. medicae* isolées de quatre sites très contaminés au mercure seulement 12 ont été identifiées comme des souches tolérantes au mercure (0,125-0.205 mM), alors que 65.4 % des souches *R. leguminosarum* étaient résistantes au zinc (CIM=1.25 mM) et aucune souche ne tolérait le cadmium (Nonnoi et al., 2012).

Zribi et al, (2015) ont étudié l'effet d'une concentration de 2 mM en Zn sur la nodulation et la biomasse de *Medicago sativa* inoculée séparément par deux souches d'*Ensifer meliloti* (S532 et S112). Aucun effet négatif n'a été détecté sur la nodulation et la biomasse de la plante inoculée avec la souche tolérante au Zn, *E. meliloti* S532, qui est restée efficace contrairement à la souche *E. meliloti* S112 sensible au Zn qui est devenue moins efficace en présence de Zn. La biomasse des plantes de *M. sativa* inoculées par cette souche a été également réduite.

I-6 Mécanismes d'adaptation des bactéries aux métaux lourds :

Les organismes ont développé des mécanismes d'adaptation aux métaux lourds pour contrebalancer leur effet toxique et pour protéger leurs composants cellulaires. Il existe principalement quatre mécanismes d'adaptation aux métaux (**Encadré III**). Les microorganismes possèdent en général une combinaison de ces mécanismes (Pavel et al., 2013) :

- a) L'exclusion des métaux lourds à travers les barrières perméables.
- b) La séquestration intra/extracellulaire (**Figure I-14. a**).
- c) La présence de pompes d'efflux actifs (**Figure I-14. b**).
- d) La réduction enzymatique (**Figure I-14. c**).

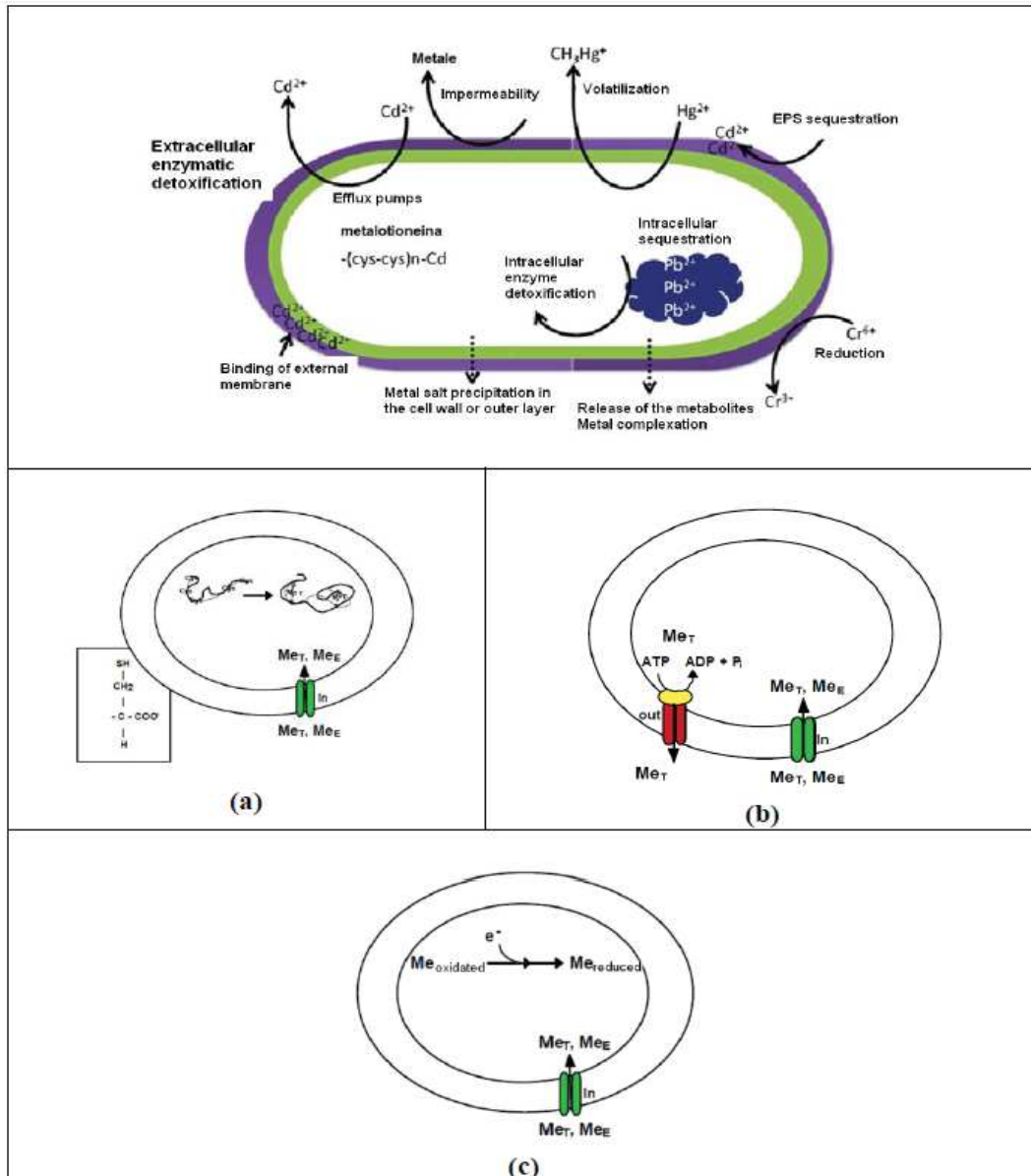


Figure I-14 : Mécanismes de résistance aux effets toxiques des métaux lourds chez les microorganismes: (a) séquestration intra/extracellulaire, (b) pompes d'efflux actifs, (c) réduction enzymatique (Pavel et al., 2013).

Encadré III : Mécanismes de résistance aux métaux lourds:

Les travaux de (Maynaud, 2012) ont porté sur l'identification des gènes de résistance chez *M. metallidurans* STM2683^T isolée de la mine des Avinières et chez une autre souche résistante aux métaux lourds *Mesorhizobium* sp. STM4661 isolée de la mine d'Eylie dans les Pyrénées. Ces travaux ont cité les précédentes études concernant les mécanismes de résistance avec pour chacun un exemple. Ici, je ferai un rappel bref de différents mécanismes en citant quelques exemples (Pour les références, voir Maynaud, 2012).

- I- Immobilisation des métaux lourds sur la paroi bactérienne par la production d'exopolysaccharides de surface (EPS) :** les EPS sont des polymères constitués de plusieurs oses, excrétés dans le milieu et capables d'absorber les métaux lourds présents dans l'environnement. La production des EPS et leur capacité à séquestrer des ions métalliques ont été rapportées chez certaines souches de *Burkholderia* isolées de champs de rizières pollués, pour la réduction de la biodisponibilité du Cd, chez des souches de *Pseudomonas* isolées d'une mine d'Ur, dans le cas de la multi-résistance aux métaux et chez des souches d'*Azospirillum brasilense* pour la résistance au Zn.
- II- Séquestration intracellulaire des métaux lourds par la production de diverses protéines chélatantes :** les métallothionéines de type SmtA sont des protéines intracellulaires riches en cystéine, décrites chez *Synechococcus* PCC 7942 et elles ont été identifiées comme capables de séquestrer des cations de Zn et de Cd. D'autres métallothionéines bactériennes de type BmtA, ont été décrites chez *Anabanea* PCC 7120, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida* et *E. coli* et sont capables de lier de plusieurs ions Zn. Chez *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae*, *Bradyrhizobium* sp. et *Saccharomyces cerevisiae*, la production de glutathion, un tripeptide contenant un groupement thiol qui est généralement synthétisé lors d'un stress oxydatif a été mise en évidence dans la détoxification de cations métalliques tels que le Cd et le Ni. Les réponses transcriptomiques d'*E. coli* lors d'un stress Zn ou Cd met en évidence l'induction de gènes impliqués dans la biosynthèse de cystéines pouvant séquestrer l'excès de métal. Chez *E. coli*, la production de métallochaperones qui sont d'autres protéines riches en cystéine, ont été décrites pour la séquestration d'ions Zn²⁺ dans le périplasma.
- III- Séquestration extracellulaire des métaux lourds par la précipitation de formes insolubles :** *Cupriavidus* sp. et *Klebsiella aerogenes* sont capables de détoxifier le Cd en excréant des sulfures pour limiter l'influx de Cd dans la cellule. Des souches de *Citrobacter* utilisent les phosphates pour précipiter le Cd à l'extérieur de la cellule pour éviter son entrée. Chez la souche *C. metallidurans* CH34 isolée d'un environnement industriel, les auteurs ont montré que suite à de fortes concentrations en métaux, l'opéron *czc* impliqué dans l'efflux de cations métalliques à l'extérieur de la cellule est induit. Cette induction est ensuite suivie par un processus de bioprécipitation des métaux sous forme de bicarbonates ou d'hydroxydes permettant d'empêcher la ré-entrée des cations exportés.
- IV- Transports actifs des métaux lourds par des pompes d'efflux** telles que les PIB-ATPases, les complexes protéiques de type HME-RND (Heavy Metal Efflux Resistance Nodulation and cell-Division), les protéines de la famille CDF (Cation Diffusion Facilitator) et celles de la famille MFS (Major Facilitator Superfamily).

Les transporteurs actifs des métaux lourds correspondent aux diverses pompes d'efflux et existent au sein de quatre classes principales de systèmes d'efflux :

(a) Les **PIB-ATPases** (autres noms : CPX-ATPases ou HM-ATPases) sont des transporteurs de cations métalliques à travers la membrane cellulaire contre leur gradient de concentration en utilisant l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie. Les PIB-ATPases font partie donc de la grande famille des transporteurs ATPases de type P dont le « P » fait référence à la formation d'un intermédiaire aspartate phosphorylé. Cette grande famille comprend quatre sous-groupes selon leur spécificité vis à vis des métaux : (1) PIB-1 comprend les P-ATPases transportant le Cu⁺/Ag⁺ telles que CopA d'*E. coli*, (2) PIB-2 comprend les P-ATPases transportant Zn²⁺/Cd²⁺/Pb²⁺ telles que ZntA d'*E. coli* (Figure I-7), CadA de *Staphylococcus aureus*, (3) PIB-3 comprend les P-ATPases transportant Cu⁺/Ag⁺/Cu²⁺ telles que CopB d'*Enterococcus hirae*, (4) PIB-4 comprend les P-ATPases transportant Co²⁺ telles que CoaT de *Synechocystis* sp.. Outre les sites de phosphorylation, de phosphatase et de fixation de l'ATP, le type IB se distingue des autres types de P-ATPase par la présence de motifs en N- ou C-terminal de la protéine ou au sein de domaines transmembranaires (TMs) liés à la reconnaissance, au transport et à la régulation des cations, appelés « Metal Binding Domain (MBDs) ». Toutes les PIB-ATPases possèdent un motif riche en cystéine dont la séquence en acides aminés est de type CPX (Cystéine, Proline et X = C, Histidine ou Serine) ou SPC, TPC et présentent entre TM6-7 une large boucle cytoplasmique.

(b) Les **protéines transmembranaires de type HME-RND** (Heavy Metal Efflux Resistance Nodulation and cell-Division) sont de gros complexes protéiques appartenant à la famille des protéines RND d'abord décrites dans le transport de substrats impliqués dans la résistance aux métaux lourds (*C. metallidurans*), la nodulation (*M. loti*) et la division cellulaire (*E. coli*). Les HME-RND se composent de trois protéines, la protéine RND constituant la pompe localisée dans la membrane interne qui est couplée à deux autres protéines membranaires ; la protéine de membrane externe (OMF : Outer Membrane Factors) et la protéine de fusion membranaire (MFP : Membrane Fusion Protein) formant un antiport cation/deux protons, permettant l'export d'ions métalliques à l'extérieur de la cellule. En effet, les protons issus de la chaîne respiratoire sont expulsés dans l'espace périplasmique pour servir de co-transporteurs antiports aux cations métalliques. Les protons créent une force proton motrice qui permet l'échange par exemple entre protons et cations métalliques de localisations diverses, au niveau du site actif de la protéine RND. La concentration élevée en cations dans ce dernier permet de les expulser par diffusion. Parmi les HME-RND les plus décrites, le complexe protéique CzcABC codé par l'opéron *czc* présent sur le plasmide pMOL30 de *C. metallidurans* CH34, permet l'adaptation à de fortes concentrations en Co, Ni, Zn et Cd. CzcA constitue la protéine RND localisée dans la membrane interne et possède 12 TMs et deux domaines périplasmiques avec des résidus glutamines et aspartates essentiels au transport de protons. CzcB constitue une protéine périplasmique de la famille des MFP qui est ancrée dans la membrane interne par l'extrémité N-terminale et est au contact de CzcA et CzcC dans le périplasm. CzcC constitue une protéine localisée dans la membrane externe appartenant à la famille des OMF et forme le pore en contact avec CzcA dans le périplasm.

(c) Les **protéines CDF** (Cation Diffusion Facilitator) sont des transporteurs membranaires secondaires de type antiport protons/cations, utilisant la force proton motrice ou le gradient en potassium comme source d'énergie. Ces transporteurs furent les premiers à être définis comme spécifiques de l'exclusion des cations métalliques. Ces transporteurs possèdent six TMs dont les quatre premiers semblent conservés avec un résidu sérine et aspartate. Ils possèdent aussi de nombreux sites de liaison des cations métalliques et de nombreux résidus histidines aux extrémités C- et N-terminales et/ou dans la région située entre les hélices transmembranaires 4 et 5 qui sont essentielles au transport des métaux. La protéine CzcD de type CDF décrite chez *C. metallidurans* CH34 est impliquée dans l'export de Zn, Co et Cd du cytoplasme vers le périplasm. Les protéines CzcD sont sous forme d'un dimère constitué de quatre hélices- α transmembranaires, localisé dans la membrane cytoplasmique et capables de fixer trois atomes de Zn. CzcD est orthologue à ZitB, un autre CDF décrit chez *E. coli*, comme un transport de haute affinité pour le Zn.

(d) Les **systèmes MFS** (Major Facilitator Superfamily) sont des protéines membranaires de type uniport, symport ou antiport qui transportent des solutés de petites tailles en réponse à un gradient chimiosmotique, tels que des hydrates de carbone, les intermédiaires du cycle de Krebs, les antibiotiques, les acides aminés, les nucléosides, les vitamines, ainsi que les cations et anions, mais pas les macromolécules. L'exemple le plus connu est la protéine NreB décrite chez la souche 31A de *C. metallidurans*, qui permet l'efflux spécifique du Ni. Cette protéine possède 12 TMs avec un domaine C-terminal riche en histidine, non essentiel à la fonction de la protéine mais nécessaire à l'acquisition d'une résistance complète.

V- La réduction enzymatique telle que la réduction de As (V) en As (III) catalysée par l'enzyme arsenate reductase chez *E. coli* (Mukhopadhyay and Rosen, 2002) et la réduction de la forme toxique du chromate, Cr (VI), en une forme insoluble, Cr (III), par l'activité de l'enzyme chrome réductase par *Pseudomonas. sp* CRB5 (McLean and Beveridge, 2001).

Références :

- McLean, J., and Beveridge, T.J. (2001) **Chromate reduction by a pseudomonad isolated from a site contaminated with chromated copper arsenate.** *Appl Environ Microbiol* 67: 1076-1084.
- Mukhopadhyay, R., and Rosen, B.P. (2002) **Arsenate Reductases in Prokaryotes and Eukaryotes.** *Environmental Health Perspectives* 110 (Suppl 5): 745-748.

I-7 Adaptation des souches de rhizobia aux métaux lourds :

Beaucoup de travaux ont étudié les mécanismes de résistance chez les bactéries. Je citerai des exemples d'études des mécanismes d'adaptation aux métaux lourds chez les rhizobia.

Peirera *et al.* (2006) ont montré que *R. leguminosarum* bv. *viciae* était capable de résister à de fortes concentrations en Cd grâce à la synthèse intracellulaire de biomolécules (polysaccharides, thiols et acides organiques) capables de séquestrer le Cd et ainsi de limiter sa toxicité et les dommages éventuels. De plus, les auteurs ont aussi mis en évidence la production extracellulaire de LipoPolysaccharides de Surface (LPS) pour immobiliser le Cd sur la paroi cellulaire et limiter alors son entrée dans la cellule.

Chaintreuil *et al.* (2007) ont décrit les premiers *Bradyrhizobium* résistants au Ni, isolés des nodosités de la légumineuse *Serianthese calycina* sur sol contaminé en Ni de Nouvelle Calédonie. Ils ont démontré que la résistance au Ni était due à deux déterminants de résistance codant pour des systèmes d'efflux de type HME-RND ; opéron *cnr* (49 % d'identité avec CnrA de *C. metallidurans* CH34) et *nre* (61 % d'identité avec NreB de CH34). La présence de ces deux marqueurs de résistance au Ni donnent aux souches de *Bradyrhizobium* un avantage pour la croissance dans ces environnements contaminés et pour l'établissement de la symbiose avec la légumineuse.

Hao *et al.* (2012) et Li *et al.* (2012) ont respectivement séquencé les génomes de *M. amorphae* CCNWGS0123 isolé des nodosités de *Robinia pseudoacacia* et *Ensifer meliloti* CCNWSX0020 isolé des nodosités de *Medicago lupulina*, provenant de sites miniers contaminés en Zn/Pb, dans lesquels ils ont identifié de nombreux gènes de résistance aux métaux lourds. Chez *M. amorphae* CCNWGS0123, des gènes impliqués dans la résistance au Cu ont été identifiés tels que ceux codants pour des systèmes d'efflux de type HME-RND (CusAB), des PIB-ATPases (proches de la PIB-ATPase CopA) et des Multicopper oxydases (Hao *et al.*, 2012). Chez *E. meliloti* CCNWSX0020, des gènes impliqués dans la résistance au Cu ont aussi été identifiés tels que ceux codants pour des systèmes d'efflux de type PIB-ATPase et des Multicopper oxydases (Li *et al.*, 2012).

Maynaud *et al.* (2013) ont étudié l'expression des gènes pouvant être impliqués dans la résistance de *M. metallidurans* STM2683^T et *Mesorhizobium* sp. STM4661 aux Zn et Cd provenant de deux sites miniers éloignés géographiquement. L'approche de transcriptomique comparative a montré que près de 1 % (72/6844 et 68/6994 de l'ensemble des séquences codantes CDS (la région codante d'ADN, appelée en anglais « Coding DNA Sequence » prédites chez STM2683 et STM4661 respectivement) est significativement régulée par le Zn et/ou le Cd. Treize des gènes significativement régulés (13/72 gènes pour STM 2683 et 13/68 pour STM 4661) sont impliqués dans le transport du Zn. 15/ 72 chez *M. metallidurans* STM2683^T et 16/72 chez *Mesorhizobium* sp. STM4661 sont impliqués dans la séquestration de Zn et de Cd. De plus, les PIB-ATPases sont des transporteurs de cations métalliques à travers la membrane cellulaire contre le gradient de concentration en utilisant l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie. (Maynaud *et al.*, 2014) ont identifié le gène *cadA* chez *M. metallidurans*

STM2683^T comme un premier gène de résistance codant pour un système d'efflux de type P_{IB}-ATPase impliqué dans la détoxification du Zn et du Cd.

Hao et al, (2015) ont étudié les mécanismes impliqués dans la tolérance au cuivre chez la souche de *M. amorphae* 186 isolée de *Robinia pseudoacacia*. Deux gènes ont été étudiés : *copA* et *lipA*. Ils ont montré que le gène *copA* est impliqué dans la résistance au Cu, le mutant de *copA* chez la souche *M. amorphae* 186 n'est pas capable de résister à une concentration de 0,6 mM de Cu contrairement à une concentration de 1,8 mM de Cu chez la souche sauvage. La mutation du gène *lipA* a plusieurs effets phénotypiques simultanés : la sensibilité au Cu, le blocage de la capacité symbiotique et l'inhibition de la croissance qui impacte à son tour l'expression de la leghémoglobine (Hao et al., 2015). Parallèlement, Xie et al, (2015) ont décrit la diversité génétique de la résistance aux métaux lourds pour trois souches bactériennes qui survivent dans des sites miniers en Chine : *M. amorphae* CCNWGS0123 contient des transporteurs des métaux des familles P-type ATPase, CDF (Facilitateur de diffusion des cations), HupE/UreJ et CHR (transporteur chromato ionique) qui sont impliqués dans la résistance et l'homéostasie du Zn, Cu, Ni et du Chromate; alors que le système CopA/CueO est présumé pomper l'excès de Cu (I) depuis le cytoplasme vers le périplasma via le transporteur accompagné avec CueO, ce qui va oxyder le Cu(I) en Cu (II) dans le périplasma, qui va, à son tour, réduire la toxicité de Cu chez *E. meliloti* CCNWSX0020. Le gène *copA* et ses homologues sont impliqués dans la résistance au Cu chez *M. amorphae* CCNWGS0123 et *A. tumefaciens* CCNWGS0286., Le transporteur ZntA (un gène impliqué dans l'efflux de Zn) avec Czcd (impliqué dans l'export de Zn) sont impliqués dans la résistance au Zn chez la souche d'*A. tumefaciens* CCNWGS0286 (Xie et al., 2015).

I-8 Les différentes stratégies de gestion des sols contaminés :

Il existe trois principales méthodes de dépollution: (i) la **dépollution physique** telle que l'excavation, l'incinération, le traitement thermique, (ii) la **dépollution chimique**, telle que la précipitation, la neutralisation, l'encapsulation, l'oxydo-réduction (Mulligan and Long, 1985; Wuana and Okieimen, 2011), (iii) la **dépollution biologique** qui consiste à utiliser les microorganismes pour modifier la spéciation des métaux (bioremediation) (Carrasco et al., 2005; Prasad et al., 2010) ou à utiliser les plantes pour accumuler les métaux de milieux contaminés ou limiter leur mobilité (phytoremédiation) (Lone et al., 2008; Prasad et al., 2010).

La **phytoremédiation** employée pour gérer des sites contaminés par les métaux comprend la **phytoextraction** et la **phytostabilisation** qui sont deux stratégies distinctes (**Figure I-15**) :

(a) La **phytoextraction** est une technique qui utilise des plantes hyperaccumulatrices de métaux lourds (Brooks, 1998) afin de concentrer les contaminants du sol dans les tissus végétaux (Chaney et al., 2007; Barzanti et al., 2011). La récolte des plantes permet une récupération des métaux lourds

d'intérêt économique (Bani et al., 2007). Parmi ces plantes, l'une des plus connues est *Noccea caerulescens*, largement étudiée par la communauté scientifique car elle est capable d'accumuler de fortes quantités de Zn et de Cd dans les parties aériennes sans manifester de symptômes de toxicité (Epelde et al., 2010; Escaray et al., 2012). Cependant, son utilisation est restreinte à des sols modérément contaminés et son extraction est limitée à la surface du sol et à la fraction de sol accessible par ces végétaux.

(b) La **phytostabilisation** est une technique qui vise à réduire la mobilité des contaminants en utilisant des plantes tolérantes aux métaux lourds en association avec des microorganismes pour limiter la diffusion des particules métalliques par voies aériennes ou hydriques (Dary et al., 2010). Les plantes utilisées accumulent très peu de métaux lourds dans les parties aériennes et vont limiter le transfert dans la chaîne alimentaire (Ghosh and Singh, 2005). Cette technique est efficace pour des zones très contaminées telles que les sites miniers où la méthode de phytoextraction est peu efficace. Les travaux de Frérot et al, (2006) sur la phytostabilisation d'anciens déblais miniers riches en Zn, Cd et Pb dans la région méditerranéenne ont montré *in situ* que la combinaison d'écotypes métallicoles de plantes natives de la région permettait d'améliorer et de régénérer de façon durable et significative la fertilité du sol en l'enrichissant en macroéléments et plus particulièrement en azote.

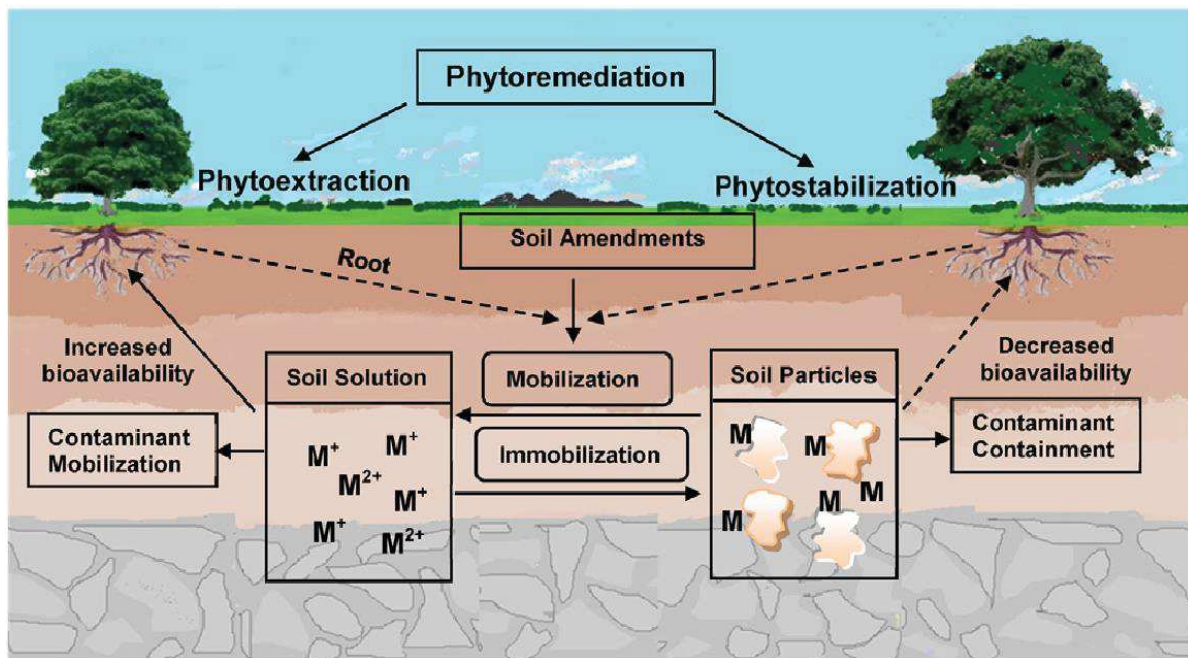


Figure I-15 : Les stratégies de la phytoremédiation utilisées pour dépolluer un sol contaminé en métaux lourds (Bolan et al., 2014).

I-9 La symbiose fixatrice d'azote légumineuses/rhizobia dans la stratégie de phytostabilisation et l'impact des métaux sur la symbiose :

En conditions de carence azotée, comme c'est le cas dans les sols miniers contaminés en métaux lourds et à faibles teneurs en matière organique, les légumineuses peuvent s'associer à des bactéries du sol capable de fixer l'azote atmosphérique et de le réduire sous une forme combinée assimilable, leur permettant ainsi de couvrir en grande partie leurs besoins en azote. Divers facteurs environnementaux tels que la salinité, la sécheresse, l'acidité, l'alcalinité, les métaux lourds et les hydrocarbures, les températures extrêmes, des déficits en nutriments ont des effets néfastes à tous les stades menant à l'établissement de la symbiose c'est-à-dire depuis l'infection jusqu'à la fixation biologique de l'azote en passant par la formation des nodosités, la croissance des rhizobia et de la plante (Zahran, 1999). Le cadmium (Cd) par exemple est l'un des métaux lourds qui même à de faibles doses est très toxique pour les organismes vivants. Son effet sur la symbiose et sur le développement des deux partenaires a été documenté (Pereira et al., 2006; Younis, 2007; Bianucci et al., 2013). Au sein d'une population de *Rhizobium* isolée de *Trifolium pratense* L., le Cd affecte la diversité, la croissance et l'activité microbienne : l'effet de Cd est directement corrélé à la diminution du nombre de nodosités présentes sur les racines (Stan et al., 2011). Au sein des légumineuses, diverses publications font état des effets néfastes du Cd sur la croissance, la photosynthèse, la nutrition, la fixation d'azote chez le haricot et le soja (Azmat et al., 2006; Sheirdil et al., 2012). Une concentration de 10 mM de Cd peut réduire le nombre des nodosités dans le cas de la symbiose *Arachis hypogaea/Bradyrhizobium* quelle que soit la sensibilité de la souche au Cd (Bianucci et al., 2013). Dans le cas de la symbiose *Rhizobium/Acacia auriculiformis*, la formation des nodosités est diminuée de 50 % par de fortes teneurs en Zn (115.6 mg.l⁻¹) et la fixation d'azote diminue avec l'augmentation de la concentration en Zn (Zhang et al., 1998) dès l'apport ou la présence de 38.6 mg.l⁻¹ de Zn. Cependant (Mahieu et al., 2011) ont pu mesurer l'efficacité de la symbiose *A.vulneraria/M. metallidurans* provenant d'un site minier cévenol fortement contaminé en Zn, Pb et Cd. Les résultats ont montré que *M. metallidurans* était adaptée aux conditions environnementales extrêmes et que la légumineuse associée à la bactérie était capable de fixer 80 % de l'azote atmosphérique. Frérot et al (2006) avaient auparavant mis en évidence que la combinaison d'*A. vulneraria* avec d'autres espèces végétales, notamment *Festuca arvernensis* et *Koeleria vallesiana*, permettait d'augmenter significativement la biomasse de ces espèces au bout de 2 ans (Frérot et al., 2006).

Exemples de symbioses fixatrices d'azote utilisées dans des stratégies de revégétalisation :

Hao et al, (2014) ont suggéré que la valorisation de la symbiose rhizobia-légumineuses constituait une stratégie novatrice et performante dans les opérations de phytoremédiation et plus particulièrement de phytostabilisation. Les rhizobia possédant à la fois les mécanismes de résistance aux métaux lourds et agissant comme promoteur de la croissance de la plante via sa capacité à fixer l'azote atmosphérique,

vont augmenter la productivité des légumineuses, l'accumulation des métaux et le contenu en azote dans le sol et dans la plante.

Deux exemples montrent l'efficacité de la symbiose fixatrice d'azote pour revégétaliser des sites pollués en métaux lourds et particulièrement en Zn et en Cd.

Dary et al, (2010) ont évalué le potentiel de la légumineuse *Lupinus luteus* inoculée avec une souche de *Bradyrhizobium* et un consortium de bactéries rhizosphériques qualifiées de PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) pour revégétaliser un site modérément contaminé en métaux lourds (As, Cd, Zn, Cu et Pb) après déversement de boues contaminées provenant de la mine d'Aznalcóllar en Espagne en 1998. Les auteurs ont montré que la légumineuse était bien adaptée aux quantités modérées en métaux lourds présents sur le site, avec une accumulation principalement dans les racines sauf pour le Cu, Cd et Pb qui sont majoritairement accumulés dans les parties aériennes. L'inoculation avec la souche de *Bradyrhizobium* résistante aux métaux lourds a induit une augmentation de 29 % de la biomasse végétale et de 3,9 % l'azote incorporé. L'inoculation avec un consortium de PGPR a lui aussi développé un effet bénéfique sur la biomasse végétale (augmentation de 109 %) et a entraîné une baisse de l'accumulation des métaux par la plante, limitant alors leur intégration dans la chaîne alimentaire.

Mahieu et al, (2011) ont également démontré l'efficacité de la symbiose fixatrice d'azote entre la légumineuse *Anthyllis vulneraria* et *Mesorhizobium metallidurans* provenant d'un site minier cévenol fortement contaminé en Zn, Pb et Cd, comme c'est déjà mentionné.

Chapitre II :

Structure génétique des populations de rhizobia associées à *Anthyllis vulneraria* selon un gradient de contamination du sol en Zn et Cd

II-1- Introduction :

D'anciens sites miniers cévenols en France sont des sites fortement contaminés en Zn, Pb et Cd. Un écotype d'*Anthyllis vulneraria* (subspécies *carpatica*) identifié sur le site minier des Avinières (Frérot et al., 2006) fait partie des rares légumineuses capables de se développer en présence des fortes teneurs en métaux lourds dans cette région. Cet écotype est un modèle écologique intéressant qui favorise l'installation d'une couverture végétale durable en particulier dans des milieux déficients en azote tels que les sites miniers (Frérot et al. 2006). L'utilisation de légumineuses symbiotiques est un atout pour initier un processus de réhabilitation de milieux difficiles, avec l'objectif final de réinstaller un écosystème biologiquement diversifié, fonctionnel et auto-suffisant. La végétalisation permet ainsi la formation d'une couverture continue limitant la propagation des contaminants par voie éolienne ou érosion hydrique. L'acquisition d'un matériel adapté permet ainsi de concevoir une stratégie de phytostabilisation d'anciens sites miniers. L'espèce *A. vulneraria* est capable de s'associer avec des rhizobias appartenant principalement au genre *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1982; Ampomah & Huss-Danell, 2011). Des études antérieures réalisées au LSTM (Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes) ont permis d'isoler des souches bactériennes appartenant à une nouvelle espèce, *M. metallidurans*, définie comme métallicole avec une forte tolérance au Zn et au Cd des souches provenant à l'origine de nodosités d'*A. vulneraria* et d'un site contaminé situé dans les Cévennes (Vidal et al., 2009). Pour qu'un micro-organisme puisse s'adapter à la présence de fortes concentrations de métaux lourds dans le sol, il doit posséder un ensemble de mécanismes de résistance lui permettant de contrebalancer l'effet toxique des métaux. Les systèmes génétiques déterminant ces mécanismes peuvent être situés sur le chromosome ou sur un plasmide des micro-organismes (Bruins et al., 2000). Les travaux de Maynaud et al. (2013) ont mis en évidence par approche transcriptomique les gènes impliqués dans la résistance au Zn et au Cd de la souche type de *M. metallidurans* STM2683^T. Ainsi le gène *cadA*, codant un système d'efflux de type P_{IB}-ATPase, a été identifié comme un gène participant activement à l'adaptation de *M. metallidurans* soumis à un stress métallique de Zn (Maynaud et al., 2014).

Afin que la symbiose *A. vulneraria*/*M. metallidurans* puisse être valorisée efficacement dans le cadre de la végétalisation de sites miniers, il est nécessaire de mieux connaître l'écologie des micro-symbiotes partenaires. Nous avons focalisé notre étude sur la répartition géographique des micro-symbiotes afin de définir leur habitat dans une gamme élargie de sites miniers (autres que le site des Avinières qui a été le premier site étudié (Vidal et al., 2009) ainsi que des sites peu ou pas impactés par les activités minières.

Les sites miniers peuvent présenter des teneurs en métaux lourds suffisamment élevés pour exercer une pression sélective conduisant à l'apparition de génotypes bactériens résistants aux métaux lourds (Baath, 1992; Baath et al., 1998) et la toxicité des métaux lourds peut impacter la structure de la

communauté microbienne dans le sol (Giller et al., 1998). Ainsi, la nature des métaux lourds, leur concentration, leur disponibilité dans le sol et la durée d'exposition peuvent impacter la structure de la communauté microbienne et leur activité. Dans le cas des symbioses, les métaux lourds ont un effet néfaste à tous les niveaux de l'établissement de l'interaction légumineuse/rhizobium depuis l'infection jusqu'à la fixation biologique de l'azote (Zahran, 1999). Cependant, (Lorite et al., 2012) ont montré qu'une contamination en métaux lourds (1500 mg.kg⁻¹ pour As, 109 mg.kg⁻¹ pour Hg et 207.8 mg.kg⁻¹ pour Pb) n'affecte pas toujours l'abondance des nodosités, ni la diversité taxonomique des rhizobia.

La sélection naturelle générée par les conditions environnementales conduit à fixer dans une population les génotypes les plus adaptés (Lakzian et al., 2002; Pereira et al., 2006). Etant donné que la tolérance des rhizobia aux métaux lourds peut varier entre individus d'une même espèce (Giller et al., 2009) et que la stabilité fonctionnelle de l'écosystème est influencée par la biodiversité et sa redondance fonctionnelle qui est à son tour impacté par les facteurs abiotiques (Loreau et al., 2001), cela peut diminuer le nombre des espèces bactériennes qui peuvent résister aux stress métalliques. De plus, d'autres facteurs peuvent, potentiellement, contrôler l'association entre *A. vulneraria* et *M. metallidurans* telle que les relations de spécificité symbiotique qui peuvent être refléter par les gènes de nodulation. (Maynaud et al., 2012) ont montré que la souche type de *M. metallidurans* possède deux gènes *nodA* distincts codant pour une acyltransférase. Les analyses génomiques de STM2683^T montrent qu'une copie est localisée dans l'opéron *nodABC* et l'autre dans le cluster *nodAFEG*. Une spécificité potentielle de STM2683^T envers *A. vulneraria* pourrait être liée à la présence de ces deux copies. Le terme de symbiovar justifié par (Rogel et al., 2011), permet de décrire au sein de plusieurs espèces notamment de *Mesorhizobium* une spécificité envers une gamme d'espèces données de légumineuses (Chapitre I).

L'objectif de ce chapitre est d'étudier la répartition de *M. metallidurans* non seulement dans des sites miniers contaminés mais aussi dans des sites moyennement ou non contaminés. On peut se demander si *M. metallidurans* se retrouve uniquement aux Avinières 1 et dans des sites chargés en métaux ou s'il peut exister des souches de *M. metallidurans* qui seraient sensibles aux métaux lourds dans des sites non contaminés. De même, est-ce que les souches de *M. metallidurans* peuvent participer à la structure génétique et aux activités fonctionnelles de la communauté bactérienne dans d'autres sites miniers et en dehors des sites miniers. Pour répondre à ces questions, 137 souches ont été isolées de nodosités d'*A. vulneraria* à partir de huit sites présentant un gradient de contamination en métaux lourds (avec des sites fortement, moyennement et non contaminés en Zn/Cd/Pb). La capacité des souches à tolérer le Zn et le Cd a été déterminée phénotypiquement par mesure de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et génétiquement en recherchant la présence du gène *cadA* dans les souches. La structure génétique des souches isolées a été analysée à l'aide de marqueurs taxonomiques (ADNr 16S, *recA* et *atpD*) et d'un marqueur symbiotique (*nodA*). Cette étude fait l'objet d'un article scientifique soumis dans *Applied and Environmental Microbiology*.

II-2- Article soumis dans *Applied and Environmental Microbiology* :

(actuellement en cours de revision)

Ancient heavy metal contamination in soils as a driver of tolerant *Anthyllis vulneraria* rhizobial communities.

Roba Mohamad,^a § Geraldine Maynaud,^b § Antoine Le Quéré,^a Céline Vidal,^b Agnieszka Klonowska,^a Erika Yashiro,^d Jean-Claude Cleyet-Marel,^b Brigitte Brunel^c

IRD^a, INRA^b, Montpellier SupAgro^c, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes

UMR113, IRD/INRA/CIRAD/Montpellier SupAgro/Université de Montpellier, Montpellier, France

University of Lausanne, Department of Fundamental Microbiology, Lausanne, Switzerland ^d

§ These authors contributed equally to this work

Address correspondence to Brigitte Brunel, brigitte.brunel@supagro.fr

Running title: Soil Metal Impacts on Anthyllis Rhizobial Composition

ABSTRACT

Anthyllis vulneraria is a legume associated with nitrogen-fixing rhizobia that together offer an adapted biological material for mine-soil phytostabilization by limiting metal pollution. Our study evaluated the genetic and phenotypic properties of a 137 rhizobia collection recovered from soils presenting contrasted metal levels to find rhizobia associated to *Anthyllis* and a given site. Zn-Pb mine soils contained a large majority of metal-tolerant rhizobia belonging mainly to *Mesorhizobium metallidurans*, or to another sister metal-tolerant species. Analysis based on the metal-tolerance *cadA* marker (a gene encoding a metal-efflux P_{IB}-type ATPase transporter) fits with the detection of metal-tolerant populations. At the opposite, metal-sensitive strains were taxonomically distinct from metal-tolerant populations and revealed new *Mesorhizobium* genospecies. Analysis based on the symbiosis *nodA* marker, splits all the populations into two symbiovar assemblages (potentially related to *Anthyllis* or *Lotus* symbiotic capacities) according to soil geographic locations but independently of metal content. Multivariate analysis showed that soil Pb and Cd were differentially impacting the rhizobial communities and that the rhizobial community found in one site was highly divergent from the others. In conclusion, heavy metal levels in soils drive the taxonomic composition of *Anthyllis* rhizobial populations according to their metal-tolerance phenotype but not their symbiotic diversity. In addition to heavy metals, local soil physico-chemical and topo-climatic conditions also impact the rhizobial beta diversity. Locally adapted *Mesorhizobium* strains were different according to mines and their use is recommended for the success of phytostabilization strategies based on *Mesorhizobium*-legume vegetation.

Keywords: symbiotic nitrogen fixation; metal tolerance; multilocus sequence analysis; nodulation gene; P_{IB}-type ATPase; *Aminobacter*; *Mesorhizobium*; phytostabilization.

IMPORTANCE

Phytostabilization of toxic mine spoils aims to limit heavy metal dispersion and environmental pollution by establishing a sustainable plant cover. This eco-friendly method is facilitated by the use of selected and adapted cover crop legumes living in symbiosis with rhizobia that can stimulate plant growth naturally through biological nitrogen fixation. We studied microsymbiont partners of a metal-tolerant legume *Anthyllis vulneraria* tolerant to very highly metal-polluted soils in mine and non-mining sites. Site-specific rhizobial communities were found linked to taxonomic composition and metal tolerance capacity. The rhizobial species *Mesorhizobium metallidurans* was dominant in Zn-Pb mines except one. It was not detected in unpolluted sites where other distinct *Mesorhizobium* species occur. Given the different soil conditions at the respective mining sites, including their heavy metal contamination, re-

vegetation strategies based on rhizobia adapted to local conditions are more likely be successful over the long-term compared to strategies based on less-well-adapted introduced strains.

INTRODUCTION

Metals released by anthropogenic activities like metalliferous mines are a major cause of environmental pollution. Such mining environments are highly vulnerable to soil erosion that results in extensive air and water pollution (1). As metals cannot be degraded or destroyed, they persist within natural environments and disturb ecosystem dynamics. As a consequence, they pose a significant threat to public health (2) and to natural environments (3, 4). To limit metal pollution, it is necessary to rehabilitate metal-contaminated soils as thoroughly as possible. Among phytoremediation strategies, vegetation or phytostabilization offer environmentally friendly and cost effective solutions for limiting metal impact on the environment (5, 6). The practical goal is to develop a sustainable solution based on microbe-assisted phytoremediation that will restore vital functions of soil and plant ecosystems sequestering metals in root systems to prevent further spreading and leaching into soil and ground water. This strategy relies in most cases, on the establishment of plants adapted to metal toxicity as well as to reduced water and nutrient availability (7). Heavy metal contaminated soils, notably mine tailings, are severely depleted in organic materials, notably nitrogen (8). Consequently, in such phytomanagement, inclusion of biological nitrogen-fixing plants such as those from the *Fabaceae* family, able to efficiently interact with symbiotic bacteria (rhizobia), is pivotal for natural soil nitrogen enrichment that improves soil properties, plant growth and successions (9, 10).

Rhizobia are important drivers for environmental and agricultural services and the impact of heavy metals on them has been extensively studied. Elevated metal concentrations influence microbial populations, affecting their growth, abundance, diversity (11-13) and activity (14). Metals exert a selective pressure on microorganisms that results in the emergence of microbial populations with higher tolerance to metals but with lower diversity when compared to unpolluted neighboring areas (11, 15, 16) and may lead to drastic changes in rhizobial populations (17). The metal tolerance may be conferred by the acquisition of plasmids or genomic island (18, 19) harboring metal-resistance genes encoding metal efflux systems, or genes involved in metal intra- or extracellular sequestration, precipitation or reduction to less toxic forms (20). In a given environment, the ratio of metal-resistant to -sensitive microorganisms may be seen as a bio-indicator of the pollution degree (21, 22). However, some reports showed that upon long-term metal contamination, the presence of metals such as zinc (Zn) and cadmium (Cd) did not lead to a decrease in rhizobial diversity (23) or in rhizobia numbers (24). The effects that metals have on microbial diversity and composition (25) depend upon metal availability which is influenced by other factors like climate (26), soil type and structure (27, 28), organic matter (29), pH (30) and plant roots (31).

In the mining area of Saint Laurent-le-Minier (France), which represents one of the most polluted sites in Europe due to high levels of Zn, Cd and lead (Pb), the association between a legume species *Anthyllis vulneraria* and Poaceae plants (*Festuca*, *Koeleria*) has been shown successful for the restoration of a sustainable vegetation cover limiting metal impacts on the environment (32). The *A. vulneraria* ecotype from the Saint Laurent mine belongs to the subspecies *carpatica*. It cannot be considered as a hyperaccumulator but, rather, as a metal-tolerant accumulator that is able to grow in contaminated soil (33), and which tolerates high Zn concentrations compared to non metal-tolerant *Anthyllis* subspecies (34). The rhizobial symbionts found associated with subspecies *carpatica* belong to the species of *Mesorhizobium metallidurans* (35) that efficiently nodulate and present high biological nitrogen fixation rates that range from 70 to 80% (36). Besides being an efficient symbiont of *Anthyllis*, *M. metallidurans* was able to resist to Zn and Cd. Metal-tolerant bacteria display widely represented mechanisms of metal tolerance, and several genes encoding metal efflux and sequestration systems were found significantly up-regulated in the type strain of *M. metallidurans* in response to sub-lethal metal doses (37, 38). Such mechanisms could confer to its populations a selective advantage in highly contaminated soils in contrast to less contaminated or uncontaminated ones.

M. metallidurans was first isolated in the Saint Laurent mine (Avinières site) and was, until now, never reported from other places, raising the question about its occurrence in other soils. Given the potential positive impact of the *M. metallidurans*-*Anthyllis* mediated phytostabilization strategy observed previously at the Saint Laurent mine site, better knowledge of the natural *Anthyllis* rhizobial diversity in relation to metal content may facilitate the detection and selection of appropriate symbiotic bacteria to be used in other Zn, Cd and/or Pb contaminated sites to be restored. This study aims to explore the ecology and the geographic distribution of metal tolerant symbiotic bacteria nodulating *Anthyllis* from soils originating from four mines (M1-M4) across western Europe, as well as two moderately contaminated soils from mine-borders (B1 & B2) and two unpolluted non mining sites (NM1 & NM2). We analyzed taxonomic, symbiotic and metal-resistance markers which, combined with phenotypical tests, enabled us to estimate the taxonomic and functional diversity of *Anthyllis*-nodulating rhizobia in relation to contamination levels of the sampled soils.

MATERIALS AND METHODS

Site and soil sampling. A total of eight sites from the Cévennes area, the Pyrénées Ariégeoises (France) and the Rheinland area (Germany) were sampled. Among them, four mines all closed today were soil sampled: two mines of the St Laurent-le-Minier district in the Cévennes area, Avinières (M1, 43°55'57.39"N/ 3°39'58.5"E, elevation 164 m) and St Bresson (M2, 43°57'24.57"N/3°39'25.69"E, 425 m), the Eylie mine in the Pyrénées Ariégeoises (M3, 42°49'59.59"N/0°56'15.99"E, 960 m) and one old mine now in the reserve of Schlangenberg, Breinic, Germany (M4, 50°44'35.33"N/ 6°15'19.21"E, 294 m). Two soil samples from mine-borders were collected in the Cévennes area, Avinières (B1,

43°55'53.90"N/3°39'44.72"E, 250 m) and St Bresson (B2, 43°57'28.06"N/ 3°39'27.25"E, 455 m). Finally, two samples from non-mining soils were collected in the Cévennes area, 25 kilometers SW from St Laurent-le-Minier: one at the Col du Vent (NM1, 43°44'41.79"N/ 3°27'38.16"E, 703 m) and one at La Prunarède (NM2, 43°52'14.14"N/ 3°30'39.77"E, elevation 707 m).

Soil analyses. For each of the eight sites, five to 10 soil sub-samples were collected across the site at a depth of 1-10 cm, homogenized and sifted through a 2-mm mesh sieve for further chemical soil analyses (pH_(H2O), organic carbon (organic C), total nitrogen (total N) and cation exchange capacity (CEC)). Heavy metal concentrations were determined from 20 g of air-dried soil that were shaken for 30 min with 100 ml of AAAC-EDTA extracting solution (0.5 M ammonium acetate, 0.5 M acetic acid, 0.02 M Na₂EDTA, pH 4.65). The extracts were filtered on folded Schleicher & Schull 595 1/2 filters (125-mm diameter) and analyzed by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES, Varian Vista MPX).

Rhizobia isolation. Seeds from the population of *A. vulneraria* (subspecies *carpatica*) naturally growing in the Avinières mine, were collected. Germinated seeds were grown in tubes containing 10 g of soil samples on top of clay granules. Six weeks later, nodules were recovered and surface-sterilized with 300 µl of 3% calcium hydrochloride for 2 min, rinsed 5 times with distilled water and crushed in 50 µl of sterile distilled water (35). The bacterial suspensions were streaked on yeast extract mannitol (YEM) agar plates and incubated at 28 °C (35). Bacterial colonies appeared after 2-4 weeks incubation and single colonies were checked for purity by repeated streaking on YEM agar. Isolates were stored at -80 °C in 20% glycerol (v/v). In this study, previously isolated rhizobia from mine soils of Avinières, Eylie and Breinic were included (35, 39). The list of *Anthyllis* rhizobia used in the present study is presented in Table II-2-S1.

DNA extraction and sequencing. Genomic DNA was extracted from the isolates according to a standard phenol-chloroform extraction method (40) and stored at -20 °C. Near full-length 16S rRNA genes were amplified by PCR method as previously reported (35). Internal fragments of approximately 500 bp of *recA* and *atpD* were amplified by using primer pairs *recA* 63f/504r and *atpD* 294f/771r (41) with an annealing step of 30 s at 57 °C. For *nodA*, 500-bp fragments were amplified with *nodA* F21Meso/R591Meso primers (42) using a hybridization step of 30 s at 55 °C. Some isolates were characterized by the presence of two copies of the *nodA* gene. In that case, specific primers were designed on the basis of the type strain of *M. metallidurans* STM2683^T draft genome (37) and used to amplify 700 bp. To amplify the *nodA1* gene, which corresponds to the copy of *nodA* inside the *nodABC* operon, primers STM3315 forward (5' TCTGCTCGACGCGACAAGC 3') and STM3316 reverse (5' TCTTCGGTGCCGTCAGCG 3') were used. To amplify *nodA2* (corresponding to the copy of *nodA* in *nodAFEG* cluster), primers STM3313 forward (5' TGCCTCTATGCCGCGATGAGC 3') and STM3314 reverse (5' ATGAGTCCGGCTGGTCTGCG 3') were used for PCR amplification using the following cycling procedure: 35 cycles of a denaturation at 96°C for 30 s, annealing at 57 °C for 45 s and extension at 72°C for 45 s. A 700-bp fragment of the *cadA* metal-resistance gene encoding a

P_{IB}-type ATPase efflux transporter (HE820903) was amplified between the metal-binding site from the TM6 motif (CPC) and the ATP-binding domain from the H8 motif (GDGXNDXP) by using primers designed from the STM2683^T genome: STM2612 forward (5' GACCGAGCGGTTTCATCG 3') and STM2613 reverse (5' CGGTCAGCATCACAGCAG 3') primers were used (38) with an annealing step of 45 s at 57 °C. All PCR amplifications were performed with the GO *Taq* polymerase (Promega, Madison, WI, USA). PCR products were run on 1% agarose gels stained with ethidium bromide in TAE 1X. The corresponding bands were gel extracted, purified with the QIAGEN kit and then sequenced by GenoScreen Company (Lille, France) using the BigDye Terminator v3.1. kit.

Estimation of bacterial tolerance to metals. Minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined in YEM liquid medium. MIC was defined as the lowest metal concentration that inhibited visible growth. One hundred and fifty microliters of medium containing increasing concentrations of metal (0.02, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 18, 20, 24 and 32 mM ZnSO₄ and 0.02, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1, 1.5, 2, 3, 5, 7, 10 and 12 mM CdCl₂) or no metal (positive control) were inoculated with 10 µl of the rhizobial strains that were pre-cultured for four days and adjusted at OD_{600nm}=0.5 prior to inoculation. The cultures were incubated at 28°C with orbital shaking (250 rpm) and growth was monitored for 2 weeks by reading the OD_{600nm} using a spectrofluorometer (TECAN Infinite M200). MIC assays were performed in triplicate for each isolate. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used to assess the significance of MIC differences between paired groups with p value adjustment for multiple comparisons by false discovery rate (FDR) method on the R statistical software.

Phylogenetic and multivariate analyses. Phylogenetic analyses of 16S rRNA, *recA*, *atpD* and *nodA* were performed using nucleotide sequences, and those of *cadA* using amino-acid sequences due to high nucleotide divergences within ATPase pumps. Sequence alignments were performed with Mega 6.06 v6140226 (43) and manually optimized with GeneDoc v2.7.000 (44). Phylogenetic trees were inferred by the Neighbour-Joining method using Kimura two-parameter distances or by the Maximum Likelihood method using General Time Reversible (GTR) using Mega. Confidence of the tree branches was estimated with 1000 bootstrap repetitions. Trees were rooted using *Bradyrhizobium japonicum* sequences for 16S rDNA, *recA* and *atpD* phylogenies, *B. elkanii* for *nodA* phylogeny and *Chelativorans multitrophicus* for CadA phylogeny as outgroups. Additionally, a ML tree was constructed based on concatenated sequences obtained from 16S rDNA, *atpD* and *recA* fragment alignments as mentioned above. The concatenated sequences were then clustered at 100% similarity threshold in QIIME v.1.7.0 (45). QIIME was also used to build a reference tree of the representative sequences from each operational taxonomic unit (OTU) using the FastTree method and a weighted UniFrac matrix (46) was generated. The Vegan package (47) in the R statistical package (<http://www.r-project.org/>) was used to draw the unconstrained principal coordinate analysis (PCoA) plot of all the rhizobial communities. The Vegan function envfit, was used to calculate the effect of the environmental variables on the rhizobial communities. Given the few numbers of sites, a high

statistical significance could not be obtained using envfit, so those variables with $p < 0.2$ were reported in the study with the highest p-value of 0.165 assigned to soil Pb content. Before and after removing the outlier site Eylie (M3) from the dataset, a stepwise model evaluation on the UniFrac matrix was done to determine the best combination of environmental predictors that could explain the rhizobial community composition. The model with the lowest AIC value (AIC = -589.04 and -526.96 for the model with and without M3, respectively) contained the predictors altitude, mean precipitation, Pb, Zn, CEC, Cd, and organic C for the model including site M3, and Pb, Cd, CEC, organic C, % plant nodulation, and limestone for the model excluding site M3 (refer to Table II-2-S3 for further details on each variable). These higher predictor models were plotted in a constrained analysis of principal coordinates (CAP). For both the envfit and stepwise model calculations, the following environmental variables were included: plant nodulation percentage, limestone, clay, sand Zn, Pb, Cd, organic C, total nitrogen contents, CEC, soil pH, altitude and mean annual precipitation (Table II-2-S3). Mean annual temperature was excluded because of its correlation with mean annual precipitation (Spearman's rank correlation of 1). In order to determine the level of correlation of the environmental predictors, a Spearman's rank correlation analysis was done across all of the available predictors using the R package Hmisc. The resulting correlation results were p-value adjusted using the false discovery rate method, and were visualized as a network in Gephi v0.8.2 using the Force Atlas2 algorithm (Fig. II-2-S3).

ANI identity and DDH. To estimate whether the two metal tolerant *Mesorhizobium* strains, *M. metallidurans* STM2683^T and *Mesorhizobium* sp. STM4661, isolated from the Avinières and Eylie mines respectively and for which the genomes have recently been released (37), belong to separated species, the average nucleotide identity (ANI) (48, 49) and *in silico* based DNA-DNA hybridization (DDH) estimates (50) were calculated. The alignment options used for the ANI calculation were 70% minimal identity over more than 700 bp in fragment windows of 1000 bp with a 200 bp step size on reciprocal best hits (two-way ANI). For the DDH measurement, we used the genome to genome distance calculator (GGDC) with the BLAST+ alignment method and the recommended formula (identities / High-scoring Segment Pair lengths). The probability that DDH > 70% was estimated as described by Meier-Kolthoff and colleagues (50).

Nucleotide sequence accession numbers. The nucleotide sequences obtained in this study were deposited in the GenBank database under the following accession numbers: KP749909-19 for the 16S rRNA gene; KP15064, KP150566-70, KP942491-514 for the *recA* gene; KP942467-90 for the *atpD* gene; KP729628-37, FR869676-77 for the *nodA* gene; FN436265, KP735732-51 for *nodA1* gene; FN436266, KP735752-71 for *nodA2* gene; KP687433-49, HE820903 for the *cadA* gene (see Table II-2-S2 for all accession numbers of isolates and reference strains in the supplementary material).

RESULTS

Soil characteristics. The edaphic properties varied in the eight sampled sites (reported in Table II-2-S3). The four mine soils (M1-4) contained the highest EDTA-extractable metal concentrations (between 15.47 to 40.2 g Zn kg⁻¹, 23-82 mg Cd kg⁻¹ and 2.0-15.6 mg Pb kg⁻¹) with M1 soil reaching the highest Zn and Pb concentrations. The two soil samples collected from mine-borders (B1 and B2) displayed moderate Zn and Cd contents (111-207 mg Zn kg⁻¹ and 6.1-9 mg Cd kg⁻¹). A difference was observed in M2 for its Pb content (3.7 g kg⁻¹) which was close to those found in mine soils and higher than the other mine-border soil (170 mg Pb kg⁻¹). Finally, the two non-mining sites (NM1 and NM2) showed, as expected, low metal levels corresponding to unpolluted soils (14-15 mg Zn kg⁻¹, 1.3 mg Cd kg⁻¹ and 46-55 mg Pb kg⁻¹). All soils presented neutral to moderately alkaline pH (7.4-8.0). The organic C and the total N contents were higher in the two mine-border soils than in the corresponding mine soils (M1 and M2) (2.7- to 4.2-fold difference). M3 and M4 mine soils contained more organic C than the two other mine soils (1.7- to 4.4-fold higher).

Rhizobial isolation. The number of nodulated *Anthyllis* plants used for trapping varied between soils collected on the 8 sites. All plants used for trapping were highly nodulated (>80%) except for M1 (52%) and M2 with only 17% of nodulated plants (Table II-2-S3). A total of 137 isolates was considered in this study (Table II-2-S1). A hundred and twelve were newly isolated rhizobial strains from mine (n=40 isolates), mine-border (n=34) and non-mining sites (n=38). These 112 new strains were combined with 25 previously isolated strains that corresponded to 12 *M. metallidurans* from M1 (35), 9 *Aminobacter* (from M3 and M4) (39), and 4 *Mesorhizobium* sp., from M3 (39) and NM2 sites (51).

Metal tolerance of strains. All 137 *Anthyllis* isolates were screened on growth media containing increasing metal concentrations in order to determine Zn- and Cd-MIC values (Fig. II-2-1 and Table II-2-S1). Rhizobial isolates from all mine soils presented significantly higher MIC values for both Zn (MIC = 1-20 mM) and Cd (MIC = 0.1-10 mM) when compared to isolates from the two non-mining soils (with MIC ranges of 0.02-0.8 mM for Zn and 0.02-0.5 mM for Cd) (Fig. II-2-1, $P \leq 0.0002$ in Table II-2-S4). Rhizobial isolates recovered from M3 contained the most Cd-tolerant isolates (MIC = 10 mM) (Fig. II-2-1B). The nine isolates corresponding to the *Aminobacter* strains isolated from M3 and M4 exhibited intermediate levels of metal-tolerance (Table II-2-S1). Regarding isolates from mine-border soils, the Zn and Cd MIC values of all of the isolates from B1 were similar to those of isolates from non-mining soils (non-significant MIC differences in Table II-2-S4) except for two isolates which slightly higher Cd-MIC values (0.8 mM) (Fig. II-2-1B). Furthermore, only isolates from B2 displayed a mixture of both sensitive and tolerant phenotypes based on their growth on metal containing media: (i) a first group of five isolates (STM3880-81, 3887-88 and 3976) displayed Zn- and Cd-MIC values similar to those of isolates from mine soils and (ii) a second one of

seven isolates (STM3971-74, 3891, 3988 and 3991) with Zn- and Cd-MIC values similar to those of isolates from non-mining soils (Fig. II-2-1, Table II-2-S1).

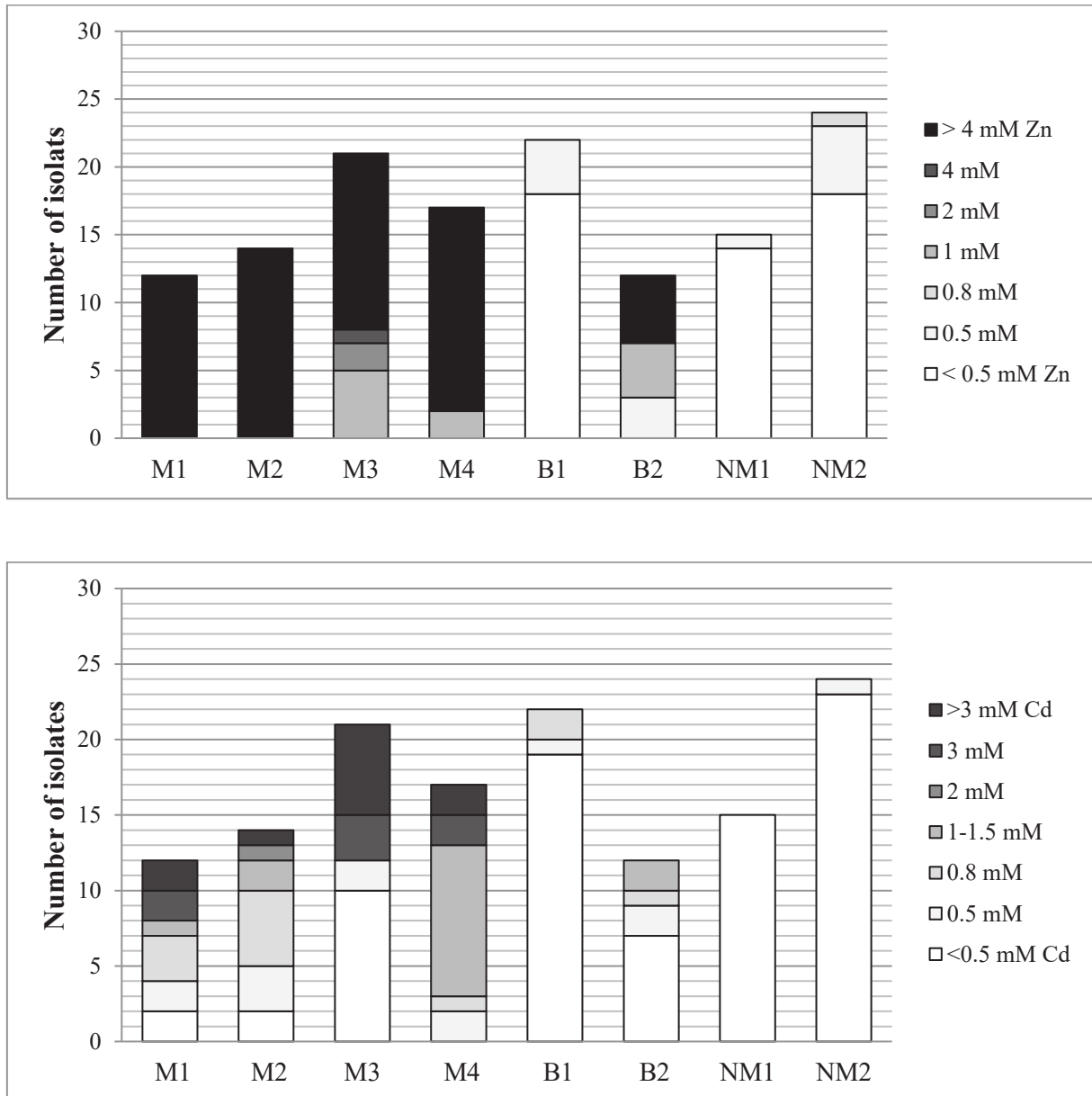


Fig. II-2-1: Zn (A) and Cd (B) MIC data of the 137 *Anthyllis* rhizobia studied and classified by their sites of origin. The OD_{600nm} was assessed after two weeks growth in YEM medium. The results are the means of three replicates. Bars indicate the standard deviations from the means (\pm SD).

Phylogenetic relationships of *Anthyllis* rhizobia using taxonomic marker genes. The 137 symbiotic strains of *A. vulneraria* belonged in a large majority to the genus *Mesorhizobium* (128 isolates out of 137) and less frequently to the genus *Aminobacter* (9/137) (Fig. II-2-S1A).

As a large number of isolates presented identical 16S rRNA sequences, we added the analysis of two housekeeping genes (*recA* and *atpD*) to improve the identification of mesorhizobia and the reliability of the 16S rRNA gene phylogeny. The phylogenetic tree built from the concatenation of 16S rRNA, *recA* and *atpD* partial sequences, shows the distribution of the 137 strains studied within four clusters (TI to TIV) (Fig. II-2-2). Clusters TI, TII and TIII, encompassed all 128 *Anthyllis* strains belonging to the genus *Mesorhizobium*, while cluster TIV contained strains from the genus *Aminobacter*. Intriguingly, these clusters successfully separated metal-sensitive from metal-tolerant strains. Clusters TI and TIII included all of the sensitive strains from the mine-border site B1 and non-mining sites (TI) and all of the sensitive strains from the mine-border site B2 (TIII). These strains were closely related to *M. muleiense*/*M. temperatum* or *M. caraganae*. At the opposite, cluster TII contained all of the intermediately tolerant and tolerant *Mesorhizobium* strains from mine sites and the five metal-tolerant strains from the mine-border B2, and encompassed the same clade as *M. metallidurans*.

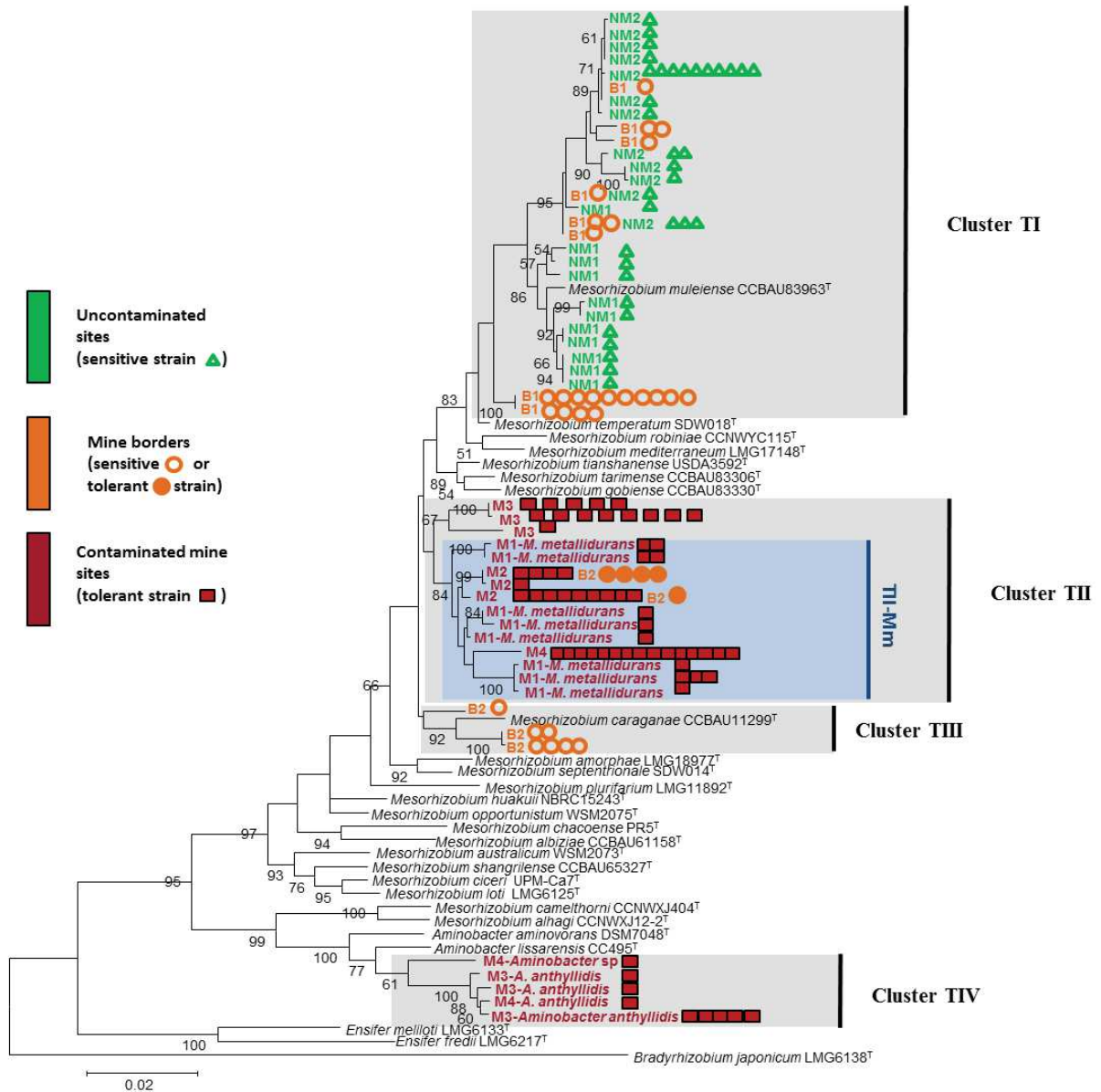


Fig. II-2-2: Maximum-likelihood concatenated phylogenetic tree based on 16S rRNA (1165 nt), *atpD* (381 nt) and *recA* (379 nt) genes showing the relationships between the *A. vulneraria* isolates used in this study and reference strains. GenBank accession numbers are given in Table II-2-S2 and the significance of each branch is indicated by bootstrap values (> 50%) calculated for 1000 subsets. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per 100 nucleotides. *A. vulneraria* nodule isolates are shown using symbols in color depending on site origins and tolerance (filled) or sensitivity (empty) to metals.

Identification and geographical distribution of strains belonging to *M. metallidurans*. To delimit clusters encompassing strains from the species *M. metallidurans* that present sequence variability at the intraspecies level (35), reference strains of previously validated *M. metallidurans* were included in all trees (Fig. II-2-2, Fig. II-2-S1). All of these reference strains clustered together with the same strains from the current study for all phylogenies (clusters R4 (Fig. II-2-S1B), A6 (Fig. II-2-S1C), TII (Fig. II-2-2)) except for all the M3 mesorhizobial strains that appeared separated in the concatenated tree (first branches of TII in Fig. II-2-2) and in the *atpD* tree (cluster A4 in Fig. II-2-S1C). To determine whether *Mesorhizobium* strains originating from the M3 mine could be assigned taxonomically within the species *M. metallidurans*, we measured ANI and estimated their DDH values using the recently released genome sequences from strains STM4661 (M3) and STM2683^T (M1) (37). Both the ANI (92.2%) and the DDH estimates (47.6 %) showed that, based on current thresholds set to ANI above 95% and DDH above 70% for intraspecies genome based comparisons, these strains could not be considered as belonging to the same species and most probably represent 2 distinct *Mesorhizobium* species. Therefore, only the branches in sub-cluster TII-Mm (in dark grey in Fig. II-2-2) were assigned to strains of *M. metallidurans*. *M. metallidurans* strains were all Zn-tolerant (MIC Zn \geq 4 mM), and they represented 46% of the 137 isolated rhizobial *Anthyllis* strains, 67% of the 69 metal-tolerant strains or 77% of the tolerant mesorhizobia. They were only found in mine sites, except M3 that contained no *M. metallidurans* but another metal-resistant *Mesorhizobium* sp. genospecies closely related to *M. metallidurans*.

Heavy metals in soils shape *Anthyllis* rhizobia composition. To study the effect of soil and geographical characteristics on bacterial diversity distributed across the sites, we calculated the weighted UniFrac matrix based on all the 16S rRNA, *recA*, and *atpD* concatenated sequences from the 137 *Anthyllis* strains. Data obtained from the PCoA analysis showed that about 76% of the variation could be explained by axes 1 and 2 (Fig. II-2-3A). The rhizobial community of M3 was highly different from the communities of the other sites along the first principal coordinate, while the second coordinate showed that the rhizobial community diverged between the contaminated and uncontaminated sites. Envfit analysis showed that elevation was the first factor explaining the divergent position of site M3: M3 was located at a higher elevation (960 m) than the other sites (164 to 703 m). Furthermore, axis 2 of the PCoA ordination space was most strongly explained by soil Pb content. Constrained analysis of principal coordinates showed again the importance of elevation in distinguishing M3 from the other communities, while soil organic C content drove all but one of the non-mine and mine-border communities, and Cd, Pb, and Zn drove the rhizobial community composition of the contaminated sites and site B2 (Fig. II-2-3B). In order to better resolve the effect of the different heavy metals on the rhizobial communities, the highly divergent M3 community was removed and the constrained analysis of the *Mesorhizobium*-dominated communities was repeated. This new analysis further indicated that the rhizobial communities at the two mining sites M2 and M4, were most highly influenced by the soil Cd concentrations, while the M1 mine community was more

strongly driven by soil Pb concentrations (Fig. II-2-3C). Rhizobia originating from mine-border site B2 were also more highly driven by Pb concentrations unlike at the corresponding mine (M2). Last but not least, the proportion of nodulated plants increased with decreasing heavy metal contamination at the respective sites.

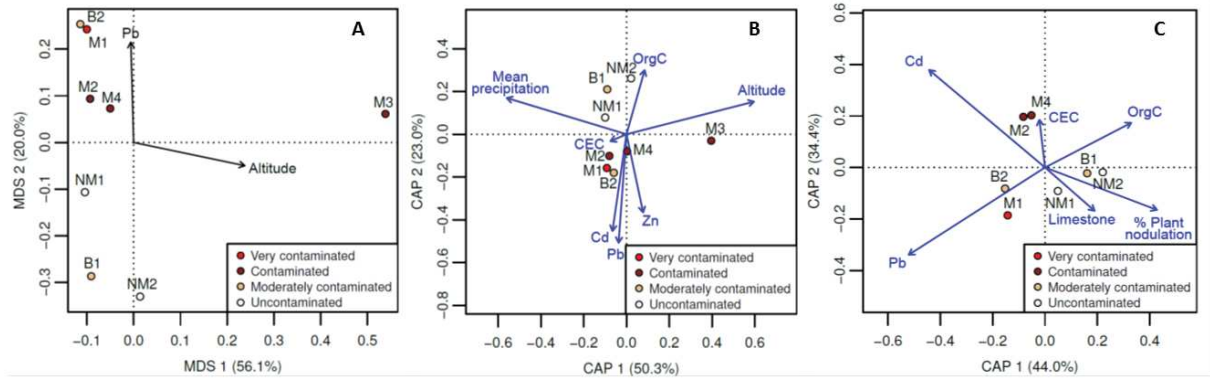


Fig. II-2-3: Ordination analysis of the rhizobial communities. The weighted UniFrac distance matrix from the OTU table that was clustered at a threshold of 100% was used as the input matrix for generating the ordination graph. The points are color-coded according to the degree to which the sites were contaminated with heavy metal compounds. (A) Unconstrained principal coordinates analysis (PCoA), with the environmental variables plotted as directional arrows using envfit (only variables with $p < 0.2$ are shown); and (B-C) constrained analysis of principal coordinates (CAP) of the rhizobial communities. Given that the community from Eyrie (M3) was distantly related to the other rhizobial communities according to Fig. II-2-3A and in order to further resolve the effect of heavy metals on the communities at other sites, M3 was removed prior to constrained ordination analysis in (C).

Occurrence and phylogeny of the *cadA* gene, coding a metal efflux protein, in the *Anthyllis rhizobia* collection. A *cadA* gene fragment was amplified in all mesorhizobia isolates from mine soils (M1-M4) and in isolates from the mine-border B2 that displayed high metal tolerance (Table II-2-S1). Additionally, the *cadA* gene was successfully detected in all the nine intermediately metal-tolerant *Aminobacter* strains from M3 and M4. By contrast, the *cadA* fragment was never amplified from isolates originating from the non-mining soils or from the mine-border soils (B1 and B2) only when strains displayed low Zn and/or Cd MIC values. Thus, in 4 of the sites, the *cadA* marker is detected in all the isolates, in 3 it is never detected, and there is a mixed situation in only one site (B2). The partial CadA protein sequences of all these metal-tolerant mesorhizobia were closely related to CadA of *M. metallidurans* STM2683^T (82-100%, Fig. II-2-S2). All of these mesorhizobial strains belonged to *M. metallidurans* or the new metal-tolerant genospecies (see cluster TII in Fig. II-2-2). Following their taxonomic divergence when compared with *M. metallidurans*, *Aminobacter* isolates shows CadA sequences falling part in a divergent group (CIII in Fig. II-2-S2).

Sequence analysis of the nodulation gene *nodA*. Isolates from M1, B1, NM1 and NM2 (except one strain) have the remarkable feature to possess two copies of the nodulation gene *nodA* (*nodA1* and *nodA2*) (Fig. II-2-4 and Table II-2-S1). These two copies shared high identities with those of *M. metallidurans* STM2683^T (98.7-100%) and formed sister clades with the respective *nodA1* and *nodA2* genes from *M. ciceri* sv. *biserrulae*, *M. opportunistum* and *M. australicum* isolated from *Biserrula pelecinus* L. (Fig. II-2-4). In contrast, the unique copy of *nodA* gene from M2, M3, M4, B2 isolates and one from NM2 were related to those of the *Mesorhizobium* strains isolated from *Lotus* and fell into the symbiovar *loti* (cluster N1 in Fig. II-2-4 and Table II-2-S1).

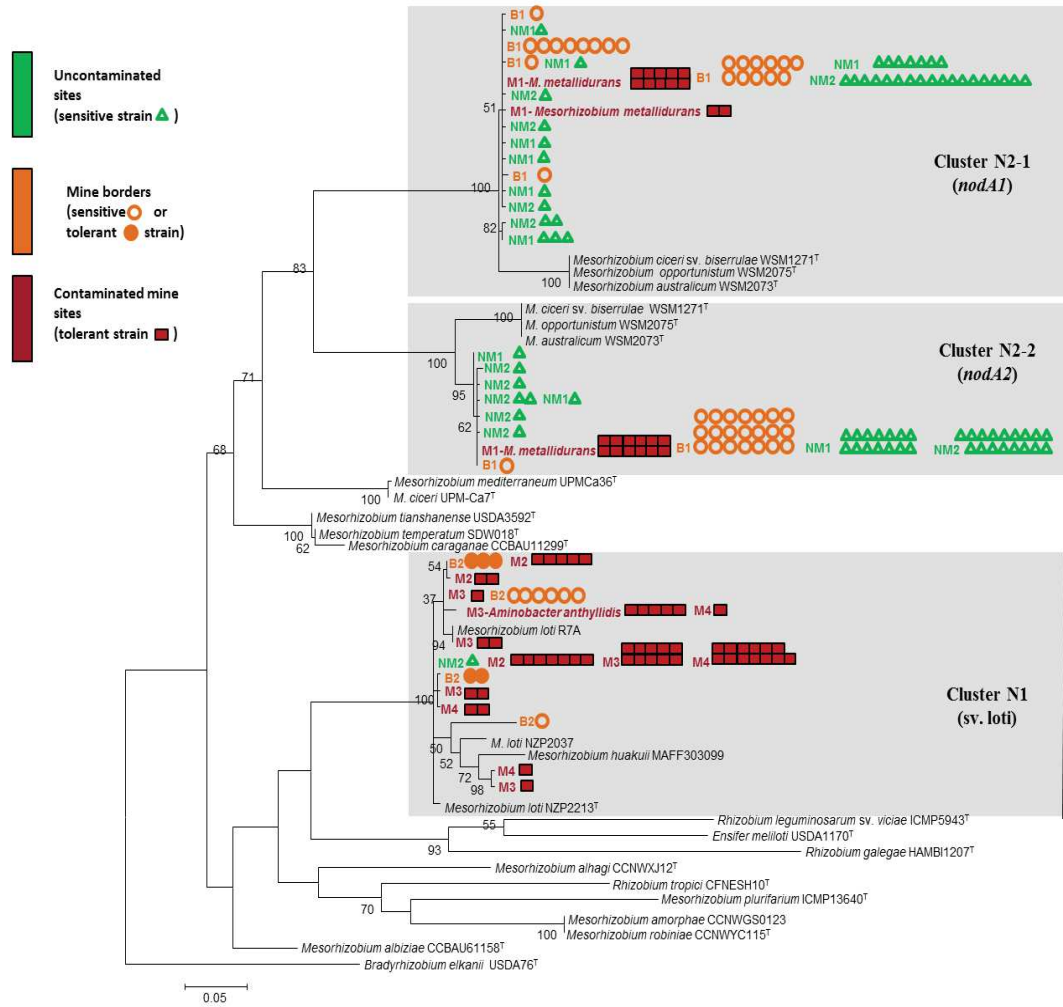


Fig. II-2-4: Maximum-likelihood phylogenetic tree based on partial *nodA* gene sequences (394 nt) showing the relationships between the *A. vulneraria* isolates obtained in this study and reference strains. GenBank accession numbers are given in Table II-2-S2 and the significance of each branch is indicated by a bootstrap value calculated for 1000 subsets (> 50%) at the major branching-points. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions *per* 100 nucleotides. *A. vulneraria* nodule isolates are shown using symbols in color depending on site origins and tolerance (filled) or sensitivity (empty) to metals.

DISCUSSION

Rhizobia associated with metal-tolerant *Anthyllis* plants are important ecological players responsible for the entry of biologically fixed nitrogen into metal contaminated soils. By promoting *Anthyllis* growth, they facilitate the activation of post-mining site restoration. We show a strong signal associated with heavy metal contamination not only on metal tolerance properties but also on the *Anthyllis*-rhizobial phylogenetic composition at a species level.

Metal tolerance was clearly detected with mine sites that contained a high proportion of Zn- and Cd- tolerant rhizobia compared with all isolates from non-mining sites that could be considered as sensitive to both metals. This result agrees with previous studies reporting an increase in metal tolerance correlated with increasing levels of metals in the environment (15, 22, 23). However, the correlation is not absolute for intermediately contaminated sites where it is much more difficult to predict metal tolerance or not and when populations shift from a sensitive phenotype to a tolerant one. Strains from a mine-border behave as if there were no toxic metals available while the other mine-border contains both sensitive and tolerant strains. Mine-border soils were much less contaminated compared to mine soils and contained higher levels of organic matter that could decrease metal mobility and in turn metal availability in soils (52, 53). This could result in a more heterogeneous soil environment with hotspots of metal-available niches interspersed among less metal-available niches at the microscale. The presence of metal-tolerant isolates at B2 could also be linked to the high levels of soil Pb contained in this site, which were similar to those of mine soils. Zn-tolerance is often associated with Cd and/or Pb-tolerance. For example, the P_{IB}-type ATPase ZntA or CadA efflux transporters can confer resistance to Zn, Cd and Pb (54). Therefore, the higher number of metal-tolerant phenotypes we found in B2 may result from the selection pressure exerted by Pb in the soil.

The higher number of metal-tolerant phenotypes in metal-contaminated soils could be related to the acquisition of metal resistance mechanisms such as metal-efflux transporters (12). The presence of *cadA*, previously identified as contributing to high Zn-resistance in *M. metallidurans* STM2683^T (38), coincides with the phenotype of the metal-tolerance in rhizobia from our mine soils and the mine-border soil B2. With 100% of *cadA* detection in the metal-tolerant isolates and no detection in all mesorhizobial sensitive-isolates, *cadA* appears here as a good molecular marker of metal-tolerant *Anthyllis* symbionts. Although different mechanisms could be involved in Zn-Cd-Pb-tolerance, the *cadA* detection, used as a proxy, might show that the different tolerant populations, even the divergent Eylie M3 rhizobial communities, own a similar arsenal to cope with heavy metal soils. A homogenous genetic system restricted to a small part of the genome, was recently shown to be shared by closely related *Acmispon* mesorhizobia communities able to resist to nickel (55).

Besides metal tolerance, the presence or absence of heavy metal contamination impacted species diversity by selecting in unmined and mined sites, contrasted rhizobial lineages based on taxonomic phylogenies. These analysis shows that *Anthyllis* could be nodulated by a large variety of species or putative new species of *Mesorhizobium* or *Aminobacter* depending on the site considered.

A. vulneraria was preferentially nodulated in soils by strains belonging to the genus *Mesorhizobium* (93% of isolates), historically known to be associated with *Anthyllis* (56, 57). Besides the metal-tolerant species *M. metallidurans* detected only on mine sites, a new metal-tolerant genospecies was found in the M3 site revealing species variability not only between contaminated and uncontaminated soils but also within similar metal-polluted sites.

Multivariate analyses based on the weighted Unifrac method confirmed that the rhizobial community recovered from M3 mine was highly divergent from the communities at the other sites. Given the limited number of environmental variables collected for this study, the altitudinal location of M3 relative to the other sites was the only variable that most strongly differentiated site M3. Since altitude in itself does not drive soil bacterial communities (58), but rather, drive other climatic variables that do influence biotic processes (59), it is highly likely that at least the mean annual precipitation, which was negatively correlated with altitude, is impacting the rhizobial community at site M3. Another possible explanation could have been that the M3 mine, located in the Pyrénées Orientales state (southwestern France), experiences either different topo-climatic conditions, in addition to precipitation, compared to the other mine regions and/or a different set of regional and endemic vegetation that could then select for divergent microbial communities (26, 28). Moreover exchanges of metal ore or staff of mining companies between M1-M2 and M4 (Escarré José, personal communication) might explain some kinship between soil substrate and associated bacterial communities.

Leaving this unique particular M3 site, the constrained analysis showed that bacterial communities at the M1 and B2 sites were driven by soil Pb content and at the M2 and M4 mines by Cd concentrations, and that generally, heavy-metal contamination in the soil reduced the efficiency at which plants could be nodulated. Also as mentioned earlier in our discussion, despite site B2 being a mine-border site, the concentration of Pb in the soil at site B2 was equivalent to the other contaminated sites, while Zn and Cd concentrations were closer to what was found at other mine-border and non-mine sites. This likely explains the strong effect of soil Pb observed at site B2 on the rhizobial community structure. In the absence of pollutants, non-mining sites also display distinct mesorhizobial lineages that although not significant here, could be impacted by nutrient-based parameters, notably soil organic carbon and nitrogen contents. This could influence the mesorhizobial diversity distribution, as found for mesorhizobia from legumes grown in barren or rich soil fields (60). Our study demonstrated that rhizobial diversity was strongly affected by heavy metal levels by selecting different genospecies despite previous studies that showed no effect of heavy metals on the rhizobial species diversity (23, 61). Given that these latter studies were focused on *Rhizobium leguminosarum* and *Ensifer medicae* associated respectively with *Trifolium* or medics, this may be attributed to the fact that these two legumes trigger symbiosis with a limited number of rhizobial species which contrasts with *Anthyllis* that appears promiscuous for nodulation. A species shift towards a copper-tolerant rhizobial lineage was reported by Laguerre *et al.* (62) on the promiscuous

plant *Phaseolus* when grown in copper-treated soils. This could reveal the aptitude of such legumes to catch higher species diversity among rhizobia that could be adapted to soil constraints.

The distribution of isolates in the current study when using the *nodA* marker differed from that obtained using the 16S rRNA or housekeeping genes. Such a discrepancy was not surprising given that the *nodA* gene phylogenies tend to resolve symbiotic host associations, unlike the 16S rRNA and housekeeping genes which better reflect the taxonomic position of rhizobia. Isolates from the Cévennes area (M1, B1, NM1 and NM2), generally harbored two complete copies of *nodA* related to those of *M. metallidurans* STM2683^T, an efficient symbiont of *Anthyllis* (39). All of the isolates from the four remaining sites (M2, M3, M4, and B2) showed a different *nodA* lineage that corresponds to the symbiovar *loti* suggesting a cross nodulation activity between *Lotus* and *Anthyllis*. The differences in *nodA* sequences between isolates nodulating *Anthyllis* could be explained by a different host spectrum or a different symbiotic behavior with *Anthyllis* or *Lotus* legumes: this could be two symbiovars within *M. metallidurans* (the symbiovar *loti* and another related to *Anthyllis*). This *nodA* pattern prevalence could be related to the presence of the compatible host plant (*A. vulneraria* and/or *Lotus corniculatus*) in their proximate environments as the legume host can influence the distribution of isolates according to its own geographic distribution (63). Indeed, *L. corniculatus* was commonly found at the St Bresson (M2 and B2) and M3 sites, while none could be listed in the M1 mine. The phylogenies presented in this study strongly suggests that *Lotus* symbionts from the St Bresson, M3 and M4 sites have transferred *nod* genes by horizontal transfer to *Mesorhizobium* isolates nodulating *Anthyllis* at these three sites. Interestingly, the first evidence of such horizontal gene transfer was previously reported among *L. corniculatus* mesorhizobia (64).

In conclusion, our results demonstrate that the intrinsic properties of each site influence the genospecies distribution of isolates but not the symbiotic properties which could relate to the local presence of host plants. Thus *Anthyllis* mesorhizobia exhibit related but distinct species or genospecies distribution across different sites, thereby resulting in distinct sets of species at respective sites. Mesorhizobia show a high variability and capacity to adapt to local and extreme edaphic conditions that are site-specific. This agrees with data revealing taxon-area biogeography within mesorhizobia symbiotic for instance of chickpea (65) or liquorice (66) legumes, and an increasing diversity of species overall within the genus *Mesorhizobium*. This work therefore suggests the use of native plants and microorganisms which are better adapted to local pedo-climatic conditions in particular for the implementation of phytostabilization strategies to remediate metal contamination based on *Mesorhizobium*-legume interactions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank L. Mauré for excellent technical work and Dr. J. Escarré for helpful discussions.

FUNDING INFORMATION

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche Programme « Contaminants, Ecosystèmes et Santé » (CES 2008-12, APTITUDE). R. M. received a PhD grant from Damascus University of the Syrian Government and G.M. from the Ministère de la Recherche et de l'Éducation Nationale (F).

REFERENCES

1. **Sheoran V, Sheoran AS, Poonia P.** 2010. Soil reclamation of abandoned mine land by revegetation: A Review. *Int J Soil Sediment and Water* **3**: 13.
2. **Kampa M, Castanas E.** 2008. Human health effects of air pollution. *Environ Pol* **151**: 362-367.
3. **Nwuche CO, Ugoji EO.** 2008. Effects of heavy metal pollution on the soil microbial activity. *Int J Environ Sci Tech* **5**: 409-414.
4. **Maanan M, Saddik M, Maanan M, Chaibi M, Assobhei O, Zourarah B.** 2015. Environmental and ecological risk assessment of heavy metals in sediments of Nador lagoon, Morocco. *Ecological Indicators* **48**: 616-626.
5. **Lone MI, He ZL, Stoffella PJ, and Yang XE.** 2008. Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: progresses and perspectives. *J Zhejiang Univ Sci B* **9**: 210-220.
6. **Ma Y, Prasad MN, Rajkumar M, Freitas H.** 2011. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnol Adv* **29**: 248-258.
7. **Ghosh M, Singh SP.** 2005. A Review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. *Appl Ecol Environ Res* **3**: 1-18.
8. **Bradshaw, A.** 1997. Restoration of mined lands—using natural processes. *Ecol Engin* **8.4**: 255-269.
9. **Escaray FJ, Menendez AB, Garriz A, Pieckenstain FL, Estrella MJ, Castagno LN, Carrasco P, Sanjuan J, Ruiz OA.** 2012. Ecological and agronomic importance of the plant genus *Lotus*. Its application in grassland sustainability and the amelioration of constrained and contaminated soils. *Plant Sci* **182**: 121-133.
10. **Hao X, Xie P, Zhu YG, Taghavi S, Wei G, Rensing C.** 2015. Copper tolerance mechanisms of *Mesorhizobium amorphae* and its role in aiding phytostabilization by *Robinia pseudoacacia* in copper contaminated soil. *Environ Sci Technol* **49**: 2328-2340.
11. **Giller KE, Witter E, McGrath SP.** 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol Biochem* **30**: 1389-1414.
12. **Lakzian A, Murphy P, Turner A, Beynon JL, Giller KE.** 2002. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* populations in soils with increasing heavy metal contamination: abundance, plasmid profiles, diversity and metal tolerance. *Soil Biol Biochem* **34**: 519-529.

13. **Stan V, Gament E, Cornea CP, Voaides C, Dusa M, Plopeanu G.** 2011. Effects of heavy metal from polluted soils on the *Rhizobium* diversity. *Not Bot Hort Agrobot Cluj* **39**: 88-95.
14. **Khan S, El-Latif Hesham A, Qiao M, Rehman S, He JZ.** 2010. Effects of Cd and Pb on soil microbial community structure and activities. *Environ Sc Pol Res* **17**: 288-296.
15. **Baath E.** 1992. Measurement of heavy metal tolerance of soil bacteria using thymidine incorporation into bacteria extracted after homogenization-centrifugation. *Soil Biol Biochem* **24**: 1167-1172.
16. **Baath E, Díaz-Ravina M, Frostegard A, Campbell CD.** 1998. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Appl Environ Microbiol* **64**: 238-245.
17. **Hirsch PR, Jones MJ, McGrath SP, Giller KE.** 1993. Heavy metals from past applications of sewage sludge decrease the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* populations. *Soil Biol Biochem* **25**: 1485-1490.
18. **Lakzian A, Murphy P, Giller KE.** 2007. Transfer and loss of naturally-occurring plasmids among isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in heavy metal contaminated soils. *Soil Biol Biochem* **39**: 1066-1077.
19. **Janssen PJ, Van Houdt R, Moors H, Monsieurs P, Morin N, Michaux A, Benotmane MA, Leys N, Vallaeyts T, Lapidus A, Monchy S, Médigue C, Taghavi S, McCorkle S, Dunn J, Lelie VdD, Mergeay M.** 2010. The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. *PLoS ONE* **5**: e10433.
20. **Nies DH.** 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**: 730-750.
21. **Doelman P, Jansen E, Michels M, Til MV.** 1994. Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biol Fertil Soils* **17**:177-184.
22. **Diaz-Ravina M, Baath E.** 2001. Response of soil bacterial communities pre-exposed to different metals and reinoculated in an unpolluted soil. *Soil Biol Biochem* **33**: 241-248.
23. **Delorme TA, Gagliardi JV, Angle JS, van Berkum P, Chaney RL.** 2003. Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of clover grown in a zinc and cadmium contaminated soil. *Soil Sci Soc Am J* **67**: 1746-1754.
24. **Chaudri A, McGrath S, Gibbs P, Chambers B, Carlton-Smith C, Bacon J, Campbell C, Aitken M.** 2008. Population size of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in long-term field experiments with sewage sludge cake, metal-amended liquid sludge or metal salts: Effects of zinc, copper and cadmium. *Soil Biol Biochem* **40**: 1670-1680.
25. **Li Z, Ma Z, Kuijp TJ, Yuan Z, Huang L.** 2014. A review of soil heavy metal pollution from mines in China: Pollution and health risk assessment. *Sci Total Environ* **468-469**: 843-853.

26. **Castro HF, Classen AT, Austin EE, Norby RJ, Schadt CW.** 2010. Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers. *Appl Environ Microbiol* **76**: 999-1007.
27. **Latour X, Corbernad T, Laguerre G, Allard F, Lemanceau P.** 1996. The composition of fluorescent *Pseudomonad* populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2449–2456.
28. **Dalmastri C, Chiarini L, Cantale C, Bevivino A, Tabacchioni S.** 1999. Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. *Microbial Ecol* **38**: 273-284.
29. **Maqueda C, Morillo E, Lopez R, Undabeytia T, Cabrera F.** 2014. Influence of organic amendments on Fe, Cu, Mn, and Zn availability and clay minerals of different soils. *Arch Agron Soil Sci* **61**: 599-613.
30. **Fierer N, and Jackson RB.** 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 626-631.
31. **Martínez-Alcalá I, Clemente R, Bernal MP.** 2008. Metal availability and chemical properties in the rhizosphere of *Lupinus albus* L. growing in a high-metal calcareous Soil. *Water, Air, and Soil Pollution* **201**: 283-293.
32. **Frérot H, Lefèbvre C, Gruber W, Colin C, Santos AD, Escarré J.** 2006. Specific interaction between local metallicolous plants improve the phytostabilization of mine soils. *Plant Soil* **282**: 53-65.
33. **Mahieu S, Soussou S, Cleyet Marel JC, Brunel B, Mauré L, Lefèbvre C, Escarré J.** 2013. Local adaptation of metallicolous and non-metallicolous *Anthyllis vulneraria* populations: their utilization in soil restoration. *Restoration Ecology* **21**: 551-559.
34. **Soussou S, Mahieu S, Brunel B, Escarré J, Lebrun M, Banni M, Bousseta H, Cleyet Marel JC.** 2013. Zinc accumulation patterns in four *Anthyllis vulneraria* subspecies supplemented with mineral nitrogen or grown in the presence of their symbiotic bacteria. *Plant Soil* **371**: 423-434.
35. **Vidal C, Chantreuil C, Berge O, Mauré L, Escarré J, Bena G, Brunel B, Cleyet-Marel JC.** 2009. *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metallicolous soil in Languedoc, France. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 850-855.
36. **Mahieu S, Escarré J, Brunel B, Méjamolle A, Soussou S, Galiana A, Cleyet-Marel JC.** 2014. Soil nitrogen balance resulting from N fixation and rhizodeposition by the symbiotic association *Anthyllis vulneraria*/*Mesorhizobium metallidurans* grown in highly polluted Zn, Pb and Cd mine tailings. *Plant Soil* **375**: 175-188.

37. **Maynaud G, Brunel B, Mornico D, Durot M, Severac D, Dubois E, Navarro E, Cleyet-Marel JC, Le Quéré A.** 2013. Genome-wide transcriptional responses of two metal-tolerant symbiotic *Mesorhizobium* isolates to zinc and cadmium exposure. *BMC Genomics* **14**: 292.
38. **Maynaud G, Brunel B, Yashiro E, Mergeay M, Cleyet-Marel JC, Le Quéré A.** 2014. CadA of *Mesorhizobium metallidurans* isolated from a zinc-rich mining soil is a P(IB-2)-type ATPase involved in cadmium and zinc resistance. *Res Microbiol* **165**: 175-189.
39. **Maynaud G, Willems A, Soussou S, Vidal C, Mauré L, Moulin L, Cleyet-Marel JC, Brunel B.** 2012. Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. *Syst Appl Microbiol* **35**: 65-72.
40. **Chen W, Kuo T.** 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucl Acids Res* **21**: 2260.
41. **Gaunt M, Turner S, Rigottier-Gois L, Lloyd-Macgilp S, Young J.** 2001. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 2037-2048.
42. **Laguerre G, Nour SM, Macheret V, Sanjuan J, Drouin P, Amarger N.** 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiol* **147**: 981-993.
43. **Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S.** 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**: 2725-2729.
44. **Nicholas KB, Nicholas HB.** 1997. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.
45. **Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R.** 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Meth* **7**:335–336.
46. **Lozupone C, Rob Knight R.** 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8228-8235.
47. **Dixon P.** 2003. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *J Veg Sci* **14**:927–930.
48. **Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM.** 2007. DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol*, **57**: 81–91.
49. **Richter M, Rossello-Mora R.** 2009. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 19126-19131.

50. **Meier-Kolthoff JP, Auch FA, Hans-Peter Klenk HP, Goker M.** 2013. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics*, **14**:60.
51. **Mahieu S, Frérot H, Vidal C, Galiana A, Heulin K, Mauré L, Brunel B, Lefèbvre C, Escarré J, Cleyet-Marel JC.** 2011. *Anthyllis vulneraria*, *Mesorhizobium metallidurans*; an efficient symbiotic nitrogen fixing association able to grow in mine tailings highly contaminated by Zn, Pb and Cd. *Plant Soil* **342**: 405-417.
52. **McGrath SP, Chaudri AM, Giller KE.** 1995. Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. *J Ind Microbiol Biotechnol* **14**: 94-104.
53. **Lejon DPH, Pascault N, Ranjard L.** 2010. Differential copper impact on density, diversity and resistance of adapted culturable bacterial populations according to soil organic status. *Eur J Soil Biol* **46**: 168-174.
54. **Nies DH.** 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 313-339.
55. **Porter SS, Chang PL, Conow CA, Dunham JP, Friesen ML.** 2016. Association mapping reveals novel serpentine adaptation gene clusters in a population of symbiotic *Mesorhizobium*. *The ISME Journal*, online publication 15 July 2016, <http://doi.org/10.1038/ismej.2016.88>.
56. **Jarvis BDW, Pankhurst CE, Patel JJ.** 1982. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int J Syst Bacteriol* **32**: 378-380.
57. **Ampomah OY, Huss-Danell K.** 2011. Genetic diversity of root nodule bacteria nodulating *Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulneraria* in Sweden. *Syst Appl Microbiol* **34**: 267-275.
58. **Fierer N, McCain CM,** 2011. Microbes do not follow the elevational diversity patterns of plants and animals. *Ecology* **92**:797–804.
59. **Yashiro E, Pinto-Figueroa E, Buri A, Spangenberg JE, Adatte T, Niculita-Hirzel H, Guisan A, van der Meer JR.** Local Environmental Factors Drive Divergent Grassland Soil Bacterial Communities in the Western Swiss Alps. *Appl Environ Microbiol* (Accepted).
60. **Yan H, Ji ZJ, Jiao YS, Wang ET, Chen WF, Guo BL, Chen WX.** 2016. Genetic diversity and distribution of rhizobia associated with the medicinal legumes *Astragalus* spp. and *Hedysarum polybotrys* in agricultural soils. *Syst Appl Microbiol* **39** : 141–149
61. **Nonnoi F, Chinnaswamy A, García de la Torre VS, Coba de la Peña T, Lucas MM, Pueyo JJ.** 2012. Metal tolerance of rhizobial strains isolated from nodules of herbaceous legumes (*Medicago* spp. and *Trifolium* spp.) growing in mercury-contaminated soils. *Appl Soil Ecol* **61**: 49-59.
62. **Laguerre G, Courde L, Nouaim R, Lamy I, Revellin C, Breuil MC, Chaussod R.** 2006. Response of rhizobial populations to moderate copper stress applied to an agricultural soil. *Microb Ecol* **52**: 426-435.

63. **Stepkowski T, Zak M, Moulin L, Kroliczak J, Golinska B, Narozna D. et al.** 2011. *Bradyrhizobium canariense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the two dominant rhizobium species in root nodules of lupin and serradella plants growing in Europe. *Syst Appl Microbiol* **34**: 368-375.
64. **Sullivan JT, Patrick HN, Lowther WL, Scott DB, Ronson CW.** 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 8985-8989.
65. **Zhang JJ, Yu T, K. Lou, P.H. Mao, E.T. Wang, W.F. Chen, W.X. Chen.** 2014. Genotypic alteration and competitive nodulation of *Mesorhizobium muleiense* against exotic chickpea rhizobia in alkaline soils. *Syst Appl Microbiol* **37**: 520–524
66. **Li L, Sinkko H, Montonen L, Wei G, Lindström K, Räsänen LA.** 2012. Biogeography of symbiotic and other endophytic bacteria isolated from medicinal *Glycyrrhiza* species in China. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **79**: 46–68

Supplemental material

Supplemental file 1 –

Detailed description and characterization of the 137 *Anthyllis* rhizobial isolates used in this study (Table II-2-S1); accession numbers of representative isolates and reference strains for the different gene sequences (Table II-2-S2); location, edaphic and climatic characteristics of the sites studied and % of nodulated *Anthyllis* plants used for rhizobial trapping. Soil metals were measured after extraction with AAAC-EDTA solution (Table II-2-S3); *P*-values of MIC paired comparisons by non-parametric statistic tests (Table II-2-S4); phylogenetic analyses of partial 16S rRNA (A), *recA* (B) and *atpD* (C) gene sequences (Fig. II-2-S1); phylogenetic tree of partial CadA protein sequences (Fig. II-2-S2); Spearman correlation network of the environmental parameters available for the study sites (Fig. II-2-S3).

Table II-2-S1 Detailed description and characterization of the 137 *Anthyllis* rhizobial strains used in this study.

Origin site	No. of isolats	MIC (mM)		Phylogenetic group						Reference
		Zn	Cd	16S ^b	<i>recA</i> ^c	<i>atpD</i> ^d	concatenated tree ^c	<i>CadA</i> ^f	<i>nodA</i> ^g	
M1 (Avinières 1) n ^a = 12	STM2683 [†] , STM3292, STM3301, STM3304, STM3305, STM3316, STM3310-11, STM3313-15, STM3317	8-20	0.1-7	SII	R4	A6	TII	CI	N2-1, N2-2	(1)
M2 (St Bresson 1) n=14	STM3443, STM3445, STM3447, STM3448, STM3453, STM3456, STM3459, STM3454, STM3457, STM3458, STM3460, STM3463, STM6539, STM6540	10-18	0.3-5	SII	R4	A6	TII-6	CI-1	N1	This study
M3 (Eylie) n=21	STM4636-37, STM4642, STM4655, STM4658, STM4885, STM4884, STM4656, STM4660, STM4665, STM4859, STM4661-62, STM4664	4-20	0.3-10	SII	R4	A4	TII	CI	N1	This study
	STM4645T, STM4644, STM4640, STM4653, STM4643, STM4646, STM4641	1-2	0.1-0.5	SIII	R7	A7	TIV	CIII		(2)
M4 (Breinic) n= 17	STM6520, STM6521-24, STM6525-27, STM6528-31, STM6534-36	6-18	0.8-5	SII	R4	A6	TII	CI	N1	This study
	STM6498-99	1	0.5	SIII	R7	A7	TIV	CIII		(2)
B1 (Avinières 2) n=22	STM4610-16, STM4633, STM5968-69, STM4623, STM5971, STM5973, STM4620	0.05-0.5	0.05-0.8	SI	R2	A1	TI	ND		This study
	STM4619, STM4631-32, STM6544	0.05-0.5	0.02-0.5	SI	R1	A3	TI	ND	N2-1, N2-2	This study
	STM4622, STM4627, STM4629, STM6546	0.05-0.5	0.02-0.8	SI	R2	A3	TI	ND		This study
B2 (St Bresson 2) n=12	STM3880-81, STM3887-88, STM3976	10-16	0.5-1.5	SII	R4	A6	TII	CI		This study
	STM3972-74, STM3891, STM3988, STM3991	0.5-1	0.1-0.3	SII	R6	A5	TIII	ND	N1	This study
	STM3971	0.5	0.1	SII	R5	A2	TIII	ND		This study
NM1 (Col du Vent) n=15	STM5067-69, STM4912, STM5071-72, STM4926, STM4929, STM4916, STM4919, STM4921-22, STM4923, STM4925	0.05-0.5	0.02-0.1	SI	R1	A1	TI	ND	N2-1, N2-2	This study
	STM4924	0.05	0.05	SI	R1	A3	TI	ND		This study
NM2 (La Prunarède)	STM4669, STM4673, STM4875, STM2682	0.05-0.8	0.05-0.3	SI	R3	A3	TI	ND	N2-1, N2-2	This study (2)

n=24	STM4668, STM4878-80, STM4893-94, STM4677, STM4863-64, STM4876, STM4871- 72, STM4874, STM4890-91	0.05-0.5	0.02-0.3	SI	R2	A3	TI	ND	N2-1, N2-2	This study
	STM4670, STM4869, STM4889, STM4895	0.02-0.5	0.05-0.5	SI	R2	A3	TI	ND	N2-1, N2-2	This study
	STM4676	0.05	0.02	SI	R2	A3	TI	ND	N1-6	This study

^a n, total number of isolates for each soil sample.

^b Clusters (SI-SIII) represent the different groups obtained by 16S rRNA sequence phylogeny analysis.

^c Clusters (TI to TIII) correspond to the different groups obtained by concatenated phylogeny (total of 112 sequences). TIV corresponds to the *Aminobacter* cluster.

^d Clusters from R1 to R7 represent the different groups in the *recA* phylogeny.

^e Clusters from A1 to A7 represent the different groups in the *atpD* phylogeny.

^f indicate isolates amplified for *cadA* fragment in mesorhizobia (CI and CII) or in *Aminobacter* (CIII) isolates. ND: *cadA* region not detected

^g N1 isolates containing one *nodA* copy, and N2 shows isolates containing two *nodA* copies.

Table II-2-S2: accession numbers of representative isolates and references strains for the different gene sequences. Sequences of the rest of the strains are not included as they are identical to below-mentioned representative sequences (see list in Table II-2-S1) and no accession number has been assigned to redundant sequences

16S rDNA	<i>recA</i>	<i>atpD</i>	<i>nodA (or nodA1)</i>	<i>nodA2</i>	<i>cadA</i>
STM6546 (KP749909)	STM5069 (KP150564)	STM4922 (KP942473)	STM2683T (FN436265)	STM2683T (FN436266)	STM3445 (KP687433)
STM4622 (KP749910)	STM4929 (KP942491)	STM4921 (KP942472)	STM6546 (KP735732)	STM6546 (KP735752)	STM3292 (KP687434)
STM4875 (KP749911)	STM4924 (KP942492)	STM4929 (KP942467)	STM4619 (KP735733)	STM4619 (KP735753)	STM3976 (KP687435)
STM4876 (KP749912)	STM5068 (KP942493)	STM4916 (KP942485)	STM4916 (KP735734)	STM4916 (KP735754)	STM3454 (KP687436)
STM5071 (KP749913)	STM5071 (KP942494)	STM5973 (KP942479)	STM4869 (KP735735)	STM4869 (KP735755)	STM6520 (KP687437)
STM5067 (KP749915)	STM6544 (KP150566)	STM5071 (KP942470)	STM3310 (KP735736)	STM3310 (KP735756)	STM3456 (KP687438)
STM3974 (KP749916)	STM4619 (KP942495)	STM5068 (KP942469)	STM4890 (KP735737)	STM4890 (KP735757)	STM2683T(HE820903)
STM4642 (KP749917)	STM5067 (KP942496)	STM3971 (KP942484)	STM5067 (KP735738)	STM5067 (KP735758)	STM3310 (KP687439)
STM4664 (KP749918)	STM4921 (KP942497)	STM6539 (KP942476)	STM5068 (KP735739)	STM5068 (KP735759)	STM4642 (KP687440)
STM3972 (KP749919)	STM4922 (KP942498)	STM3311 (KP942486)	STM5973 (KP735740)	STM5973 (KP735760)	STM4859 (KP687441)
<i>M. robiniae</i> CCNWC115 ^T (EU849582)	STM3974 (KP942499)	STM3304 (KP942487)	STM4929 (KP735741)	STM4929 (KP735761)	STM4637 (KP687442)
<i>M. muleiense</i> CCBAU83963 ^T (HQ316710)	STM3454 (KP942500)	STM3314 (KP942488)	STM4616 (KP735742)	STM4616 (KP735762)	STM4660 (KP687443)
<i>M. temperatum</i> SDW018 ^T (AF508208)	STM3447 (KP942501)	STM3454 (KP942475)	STM5072 (KP735743)	STM5072 (KP735763)	STM4656 (KP687444)
<i>M. mediterraneum</i> LMG17148 ^T (AM181745)	STM6539 (KP942502)	STM6520 (KP942477)	STM4871 (KP735744)	STM4871 (KP735764)	STM3304 (KP687445)
<i>M. caraganae</i> CCBAU11299 ^T (EF149003)	STM4636 (KP942503)	STM4665 (KP942489)	STM4874 (KP735745)	STM4874 (KP735765)	STM6499 (KP687446)
<i>M. tianshanense</i> USDA3592 ^T (AF041447)	STM6520 (KP942504)	STM4884 (KP942490)	STM4631 (KP735746)	STM4631 (KP735766)	STM4644 (KP687447)
<i>M. gobiense</i> CCBAU83330 ^T (EF035064)	STM4875 (KP942505)	STM4642 (KP942483)	STM4879 (KP735747)	STM4879 (KP735767)	STM4653 (KP687448)
<i>M. tarimense</i> CCBAU83306 ^T (EF035058)	STM4669 (KP942506)	STM4622 (KP942480)	STM4894 (KP735748)	STM4894 (KP735768)	STM4645T(KP687449)
<i>M. metallidurans</i> STM2683 ^T (AM930381)	STM2682 (KP942507)	STM4668 (KP942481)	STM4864 (KP735749)	STM4864 (KP735769)	
<i>M. albiziae</i> CCBAU61158 ^T (DQ100066)	STM6546 (KP942508)	STM4876 (KP942482)	STM4878 (KP735750)	STM4878 (KP735770)	
<i>M. chacoense</i> PR5 ^T (AJ278249)	STM5973 (KP942509)	STM4669 (KP942478)	STM5071 (KP735751)	STM5071 (KP735771)	
<i>M. camelthorni</i> CCNWXJ 404 ^T (EU169581)	STM4623 (KP150570)	STM4619 (KP942471)	<i>M. ciceri</i> sv. <i>biserrulae</i> WSM 1271 ^T (CP0024476065060)	<i>M. ciceri</i> sv. <i>biserrulae</i> WSM 1271 ^T (CP002447 6059775)	
<i>M. alhagi</i> CCNWXJ 12-2 ^T (EU169578)	STM4622 (KP942510)	STM4924 (KP942468)	<i>M. opportunistum</i> WSM2075 ^T (Mesop 6436)	<i>M. opportunistum</i> WSM2075 ^T (Mesop 6430)	
<i>M. ciceri</i> UPM-Ca7 ^T (NR_115793)	STM4864 (KP150568)	STM3974 (KP942474)	<i>M. australicum</i> WSM2073 ^T (AY601528)	<i>M. australicum</i> WSM2073 ^T (MesauDRAFT_5545)	

<i>M. loti</i> LMG6125 ^T (NR_118992)	STM4668 (KP942511)	STM3314 identical to STM3297 (AM930389)	STM6539 (KP729628)
<i>M. shangrilense</i> CCBAU65327 ^T (EU074203)	STM4676 (KP150567)	STM3304 identical to STM3294 (AM930393)	STM3976 (KP729629)
<i>M. australicum</i> WSM2073 ^T (AY601516)	STM4891 (KP150569)	STM3311 identical to STM3293 (AM930390)	STM4644 (FR869676)
<i>A. aminovorans</i> DSM 7048 ^T (AJ011759)	STM4876 (KP942512)	<i>M. muleiense</i> CCBAU83963 ^T (HQ316724)	STM4645T(FR869677)
<i>A. lissarensis</i> CC495 ^T (AF107722)	STM4642 (KP942513)	<i>M. temperatum</i> SDW018 ^T (DQ345071)	STM4655 (KP729630)
<i>Aminobacter</i> sp. STM6498 (FR869634)	STM3971 (KP942514)	<i>M. tianshanense</i> CCBAU 3306T (KP251034)	STM4676 (KP729631)
<i>A. anthyllidis</i> STM4645 ^T (NR_108530)	STM3317 identical to STM3297(AM930387)	<i>M. tarimense</i> CCBAU83306 ^T (EF549410)	STM3880 (KP729632)
<i>M. opportunistum</i> WSM2075 ^T (AY601515)	STM3304 identical to STM3294 (AM930385)	<i>M. gobiense</i> CCBAU83330 ^T (EF549409)	STM6521 (KP729633)
<i>M. huakuii</i> NBRC 15243 ^T (AB680816)	STM3311 identical to STM3293 (AM930384)	<i>M. mediterraneum</i> USDA 3392 ^T (AJ294391)	STM4636 (KP729634)
<i>M. plurifarum</i> LMG11892 ^T (Y14158)	<i>M. muleiense</i> CCBAU83963 ^T (HQ316782)	<i>M. robiniae</i> CCNWYC 115 ^T (GQ856506)	STM3971 (KP729635)
<i>M. amorphae</i> LMG18977 ^T (AF041442)	<i>M. temperatum</i> SDW018 ^T (EF639844)	<i>M. amorphae</i> ACCC 19665 ^T (AY688600)	STM4661 (KP729636)
<i>M. septentrionale</i> SDW014 ^T (AF508207)	<i>M. mediterraneum</i> USDA 3392 ^T (AJ294369)	<i>M. septentrionale</i> SDW014 ^T (DQ345070)	STM6526 (KP729637)
<i>E. meliloti</i> LMG6133 ^T (X67222)	<i>M. tianshanense</i> USDA3592 ^T (AJ294368)	<i>M. caraganae</i> CCBAU11299 ^T (EU249379)	<i>M. mediterraneum</i> UPMCa36 ^T (AJ300248)
<i>E. fredii</i> LMG6217 ^T (X67231)	<i>M. gobiense</i> CCBAU83330 ^T (EF549481)	<i>M. ciceri</i> USDA 3383 ^T (AJ294395)	<i>M. ciceri</i> UPM-Ca7 ^T (AJ300247)
<i>B. japonicum</i> LMG6138 ^T (X66024)	<i>M. tarimense</i> CCBAU83306 ^T (EF549482)	<i>M. loti</i> LMG6125 ^T (AM946552)	<i>M. tianshanense</i> USDA3592 ^T (AJ250142)
	<i>M. shangrilense</i> CCBAU65327 ^T (EU672501)	<i>M. shangrilense</i> CCBAU65327 ^T (EU672471)	<i>M. temperatum</i> SDW018 ^T (GQ167238)
	<i>M. caraganae</i> CCBAU11299 ^T (EU249394)	<i>M. opportunistum</i> WSM2075 ^T (HM047119)	<i>M. caraganae</i> CCBAU11299 ^T (GQ167250)
	<i>M. robiniae</i> CCNWYC115 ^T (GQ856501)	<i>M. australicum</i> LMG24608 ^T (JN202306)	<i>A. anthyllidis</i> STM4640 (FR869673)
	<i>M. metallidurans</i> STM3292 (AM930383)	<i>M. huakuii</i> USDA 4779 ^T (AJ294394)	<i>A. anthyllidis</i> STM4643 (FR869675)
	<i>M. metallidurans</i> STM3304 (AM930385)	<i>M. albisiae</i> CCBAU61158 ^T (DQ311090)	<i>A. anthyllidis</i> STM4653 (FR869679)
	<i>M. metallidurans</i> STM3317 (AM930387)	<i>M. chacoense</i> PR5 ^T (AY493460)	<i>A. anthyllidis</i> STM6499 (FR869681)
	<i>M. metallidurans</i> STM2683 ^T (AM930382)	<i>M. metallidurans</i> STM3292 (AM930392)	<i>M. loti</i> R7A (AL672113)
	<i>M. amorphae</i> ACCC 19665 ^T (AY688612)	<i>M. metallidurans</i> STM2683 ^T (AM930388)	<i>Aminobacter</i> sp STM6498 (FR869680)
	<i>M. septentrionale</i> HAMB1 2582 ^T (DQ444304)	<i>M. metallidurans</i> STM3310 (AM930391)	<i>M. loti</i> NZP2037 (AJ300246)

M. australicum LMG 24608^T
 (JN202310)
M. huakuii USDA 4779^T
 (AJ294370)
M. opportunistum WSM2075^T
 (FR863560)
M. loti LMG6125^T (AM182156)

M. ciceri USDA 3383^T
 (AJ294367)
M. plurifarum USDA 4413^T
 (AY688611)
M. albiziae CCBAU61158^T
 (EU249396)
M. chacoense LMG 19008^T
 (AM076370)
M. camelthorni CCNWXJ404^T
 (GU220798)
M. alhagi CCNWXJ12-2^T
 (FJ481878)
A. aminovorans DSM7048^T
 (FR869646)
A. lissarensis CC495^T
 (FR869647)
Aminobacter sp STM6498
 (FR869644)
A. anthyllidis STM4646
 (FR869642)
A. anthyllidis STM4644
 (FR869640)
A. anthyllidis STM6499
 (FR869645)
A. anthyllidis STM4645^T
 (FR869641)
A. anthyllidis STM4640
 (FR869637)
A. anthyllidis STM4641
 (FR869638)
A. anthyllidis STM4643
 (FR869639)
A. anthyllidis STM4653
 (FR869643)
Ensifer meliloti LMG6133^T
 (AM182133)
Ensifer fredii LMG6217^T
 (AM182145)
Bradyrhizobium japonicum
 LMG6138^T (AM182158)

M. plurifarum ORS 1032^T
 (AY785350)
E. meliloti LMG6133^T
 (AM418760)
E. fredii LMG 6217^T
 (AM418761)
A. anthyllidis STM6499
 (FR869656)
A. anthyllidis STM4644
 (FR869651)
A. anthyllidis STM4645^T
 (FR869652)
A. anthyllidis STM4640
 (FR869648)
A. anthyllidis STM4641
 (FR869649)
A. anthyllidis STM4653
 (FR869654)
A. anthyllidis STM4643
 (FR869650)
B. japonicum LMG6138^T
 (AJ294388)

M. plurifarum ICMP13640^T
 (DQ100407)
M. huakuii MAFF303099
 (mlr8755)
M. loti NZP2213^T (L06241)

E. meliloti USDA1170^T
 (Af522456)
R. galegae HAMB11207^T
 (AJ300240)
M. alhagi CCNWXJ12^T
 (EU722474)
R. tropici CFNESH10^T
 (EU291990)
M. amorphae CCNWGS0123
 (MEAMCv1 770009)
M. robiniae CCNWYC115T
 (EU849558)
M. albiziae CCBAU61158^T
 (GQ167236)
B. elkanii USDA76^T (AM117554)

Table II-2-S3: Location, edaphic and climatic characteristics of the sites studied and % of nodulated *Anthyllis* plants used for rhizobial trapping. Soil metals were measured after extraction with AAAC-EDTA solution.

Site of soil sample	Geographical origin	Plant nodulation % (total plant number)	Total limestone (g.kg ⁻¹)	Clay (g.kg ⁻¹)	Sand (g.kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)	Pb (mg kg ⁻¹)	Cd (mg kg ⁻¹)	pH water	Organic C (g kg ⁻¹)	Total N (g kg ⁻¹)	CEC (cmol ⁺ kg ⁻¹)	Altitude (m)	Mean annual precipitation (mm year ⁻¹) ^a	Mean annual temperature (°C year ⁻¹) ^a	Climat type ^b	Latitude/ Longitude
M1 Avinières 1	Cévennes (France), Zn-Pb mine	52 (n=90)	339	64	758	40, 237	15, 551	44	7.8	7.4	0.6	2.0	164	1434	13.6	Csa	43°55'57.39"N/ 3°39'58.5"E
M2 St Bresson 1	Cévennes (France), Zn-Pb mine	17 (n=48)	0	91	581	4, 701	3, 734	82	7.6	12.0	1.4	6.2	425	1434	13.6	Csa	43°57'24.57"N/ 3°39'25.69"E
M3 Eylic	Pyrénées (France), Zn-Pb mine	100 (n=30)	205	78	588	14, 299	4, 256	23	8.0	19.9	1.8	6.0	960	922	10.3	Cfb	42°49'59.59"N/ 0°56'15.99"E
M4 Breinic	Rhineland (Germany), Zn-Pb mine	100 (n=20)	151	158	473	1, 537	2, 023	27	7.6	32.2	3.4	11.0	294	854	9.8	Cfb	50°44'35.33"N/ 6°15'19.21"E
B1 Avinières 2	Cévennes (France), mine border	90 (n=50)	679	133	559	111	170	6.1	7.9	25.8	2.5	8.4	250	1434	13.6	Csa	43°55'53.90"N/ 3°39'44.72"E
B2 St Bresson 2	Cévennes (France), mine border	82 (n=29)	0	132	539	207	3, 675	9	7.7	32.8	4.0	15.4	465	1434	13.6	Csa	43°57'28.06"N/ 3°39'27.25"E
NM1 Col du Vent	Cévennes (F), non-mining area	100 (n=30)	3	38	898	15	46	1.3	7.9	15.6	1.7	6.8	703	1434	13.6	Csa	43°44'41.79"N/ 3°27'38.16"E
NM2 La Prunarède	Cévennes (F), non-mining area	100 (n=30)	3	373	115	14	55	1.3	7.4	36	6.4	8.8	607	1434	13.6	Csa	43°52'14.14"N/ 3°30'39.77"E

^a according to weather stations or statements in the proximity of sampled areas in France and Germany: Cévennes foothills (M1, M2, B1, B2, NM1 and NM2 from data of G. Delmot and B. Dubearnès (personal communications)), M3 and M4 from <http://fr.climate-data.org/location/>.

^b according to the Köppen climate classification: Csa: typical Mediterranean climate with hot summer; Cfb: Oceanic climate with temperate summer.

Table II-2-S4: P-values of MIC paired comparisons by non-parametric statistic tests (Kruskal Wallis test with adjusted *P*-values by False Discovery Rate (FDR) approach), for Zn data above the diagonal and Cd data under the diagonal. In bold *P*<0.01.

Site	M1	M2	M3	M4	B1	B2	NM1	NM2
M1 (Avinières 1)		0.383	0.093	0.030	<0.0001	0.045	<0.0001	<0.0001
M2 (St Bresson 1)	0.607		0.039	0.002	<0.0001	0.026	<0.0001	<0.0001
M3 (Eylie)	0.789	0.789		0.870	<0.0001	0.283	<0.0001	<0.0001
M4 (Breinic)	0.240	0.0098	0.372		<0.0001	0.150	<0.0001	<0.0001
B1 (Avinières 2)	0.0002	<0.0001	<0.0001	<0.0001		<0.0001	<0.0001	<0.0001
B2 (St Bresson 2)	0.046	0.043	0.156	0.0002	0.008		0.122	0.748
NM1 (Col du Vent)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0047	<0.0001		0.122
NM2 (La Prunarède)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.087	0.0002	0.240	

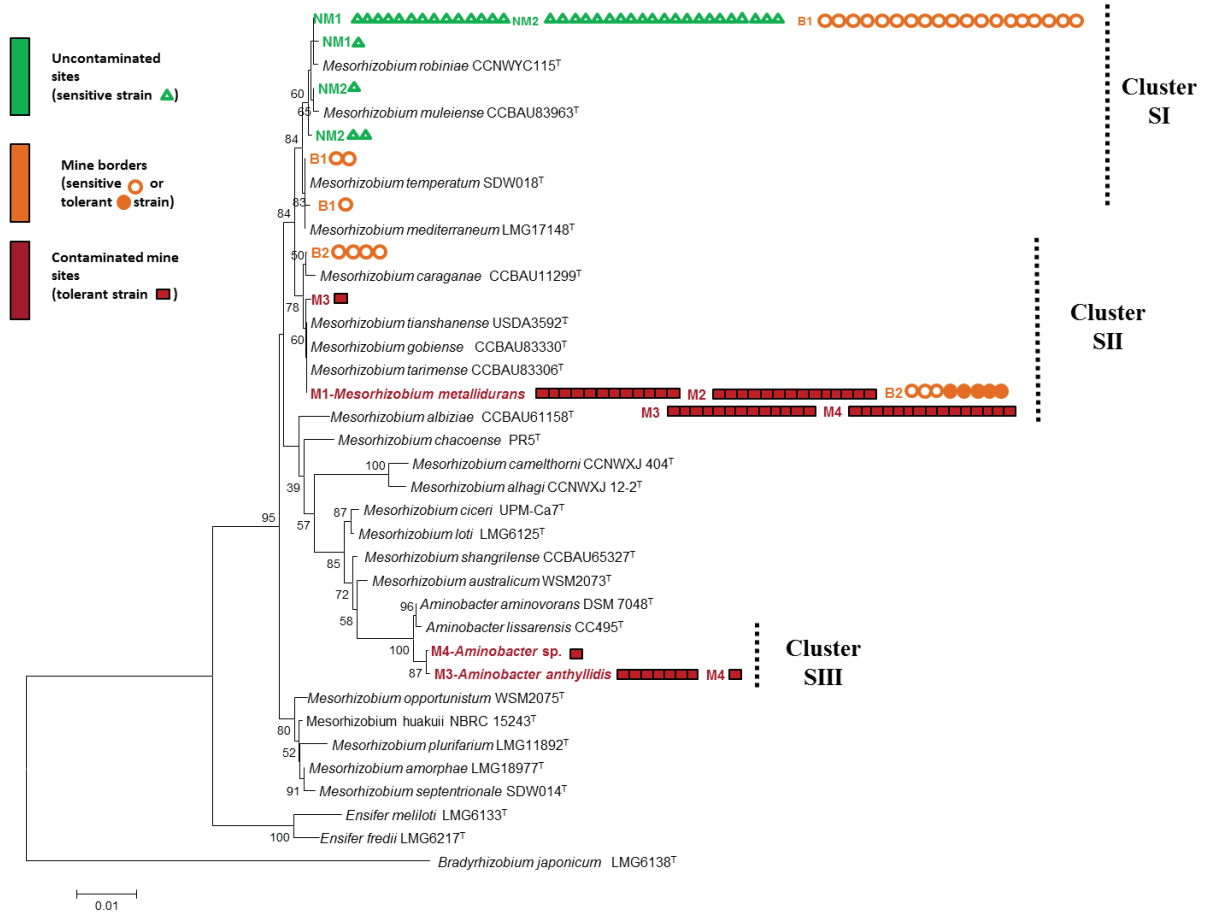


Fig. II-2-S1A: Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences (1165 nt), showing relationships between *A. vulneraria* isolates and reference strains. GenBank accession numbers are given in table II-2-S2. Bootstrap values > 50% are shown. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions *per* 100 nucleotides. *A. vulneraria* nodule isolates are shown in bold. The 16S rRNA phylogenetic group of each sequence is given. *A. vulneraria* nodule isolates are shown using symbols in color depending on site origins and tolerance (filled) or sensitivity (empty) to metals.

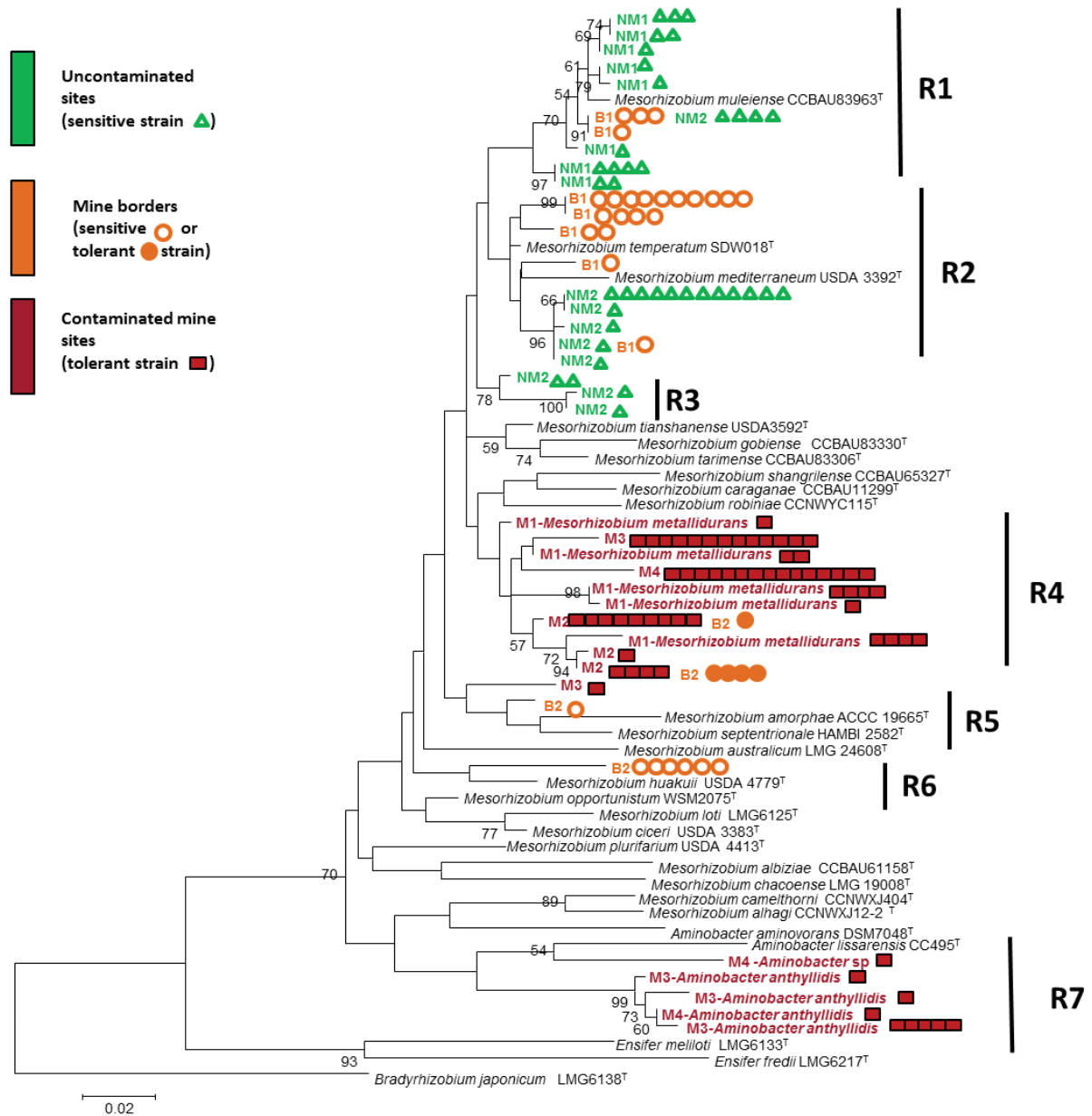


Fig. II-2-S1B: Maximum-likelihood phylogenetic trees of partial *recA* (A) showing the relationships between the *A. vulneraria* isolates obtained in this study and reference strains. Analyses were based on 339 nt. Genbank accession numbers are given next to strain numbers and the significance of each branch is indicated by bootstrap values calculated for 1000 subsets (> 50%) at the major branching-points. The scale bar represents the number of nt substitutions *per* 100 nt. *A. vulneraria* nodule isolates are shown using symbols in color depending on site origins and tolerance (filled) or sensitivity (empty) to metals.

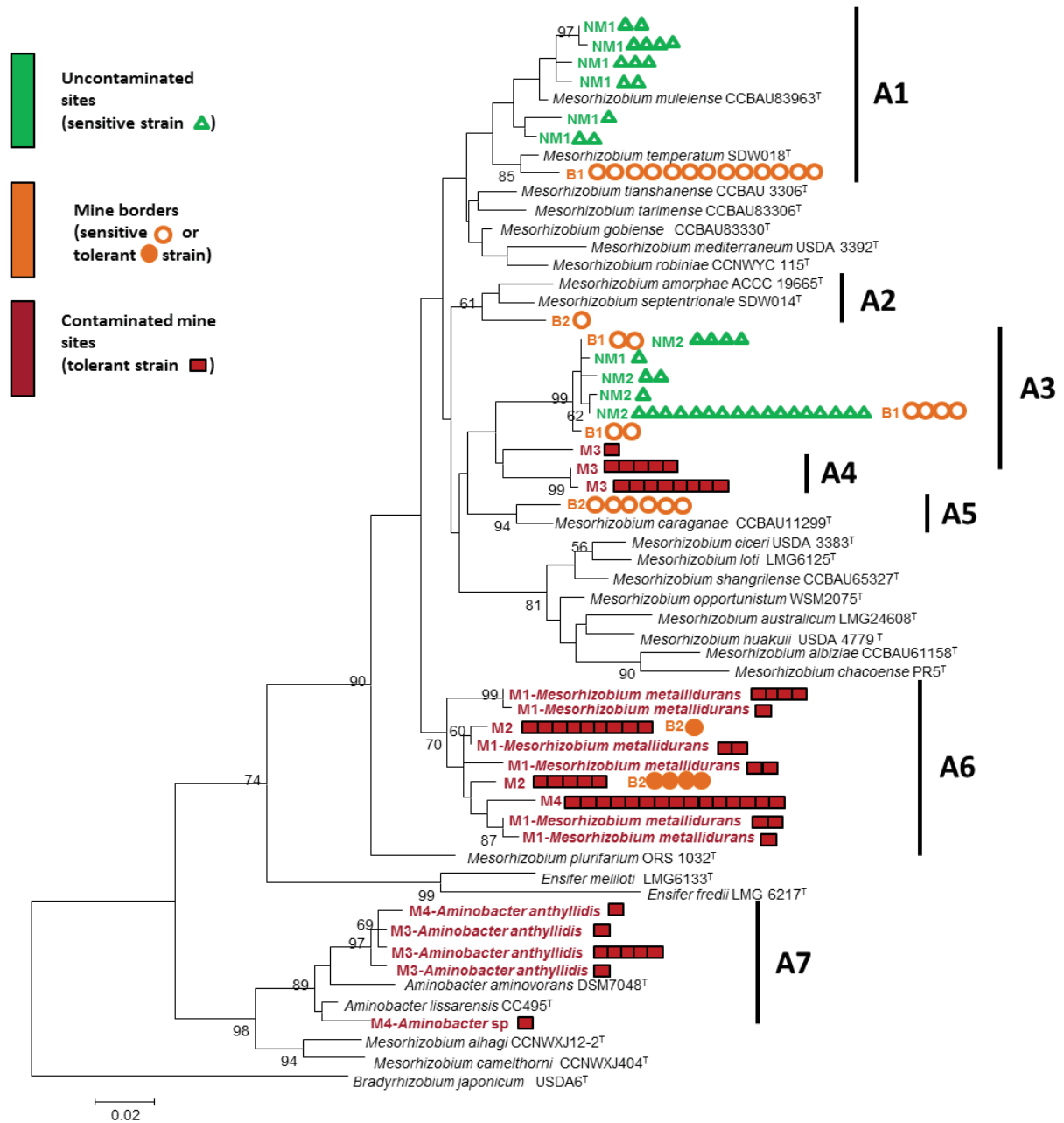


Fig. II-2-S1C: Maximum-likelihood phylogenetic trees of partial *atpD* (B) showing the relationships between the *A. vulneraria* isolates obtained in this study and reference strains. Analyses were based on 375 nt. Bootstraps >50% are indicated (1000 bootstrap). *A. vulneraria* nodule isolates are shown using symbols in color depending on site origins and tolerance (filled) or sensitivity (empty) to metals.

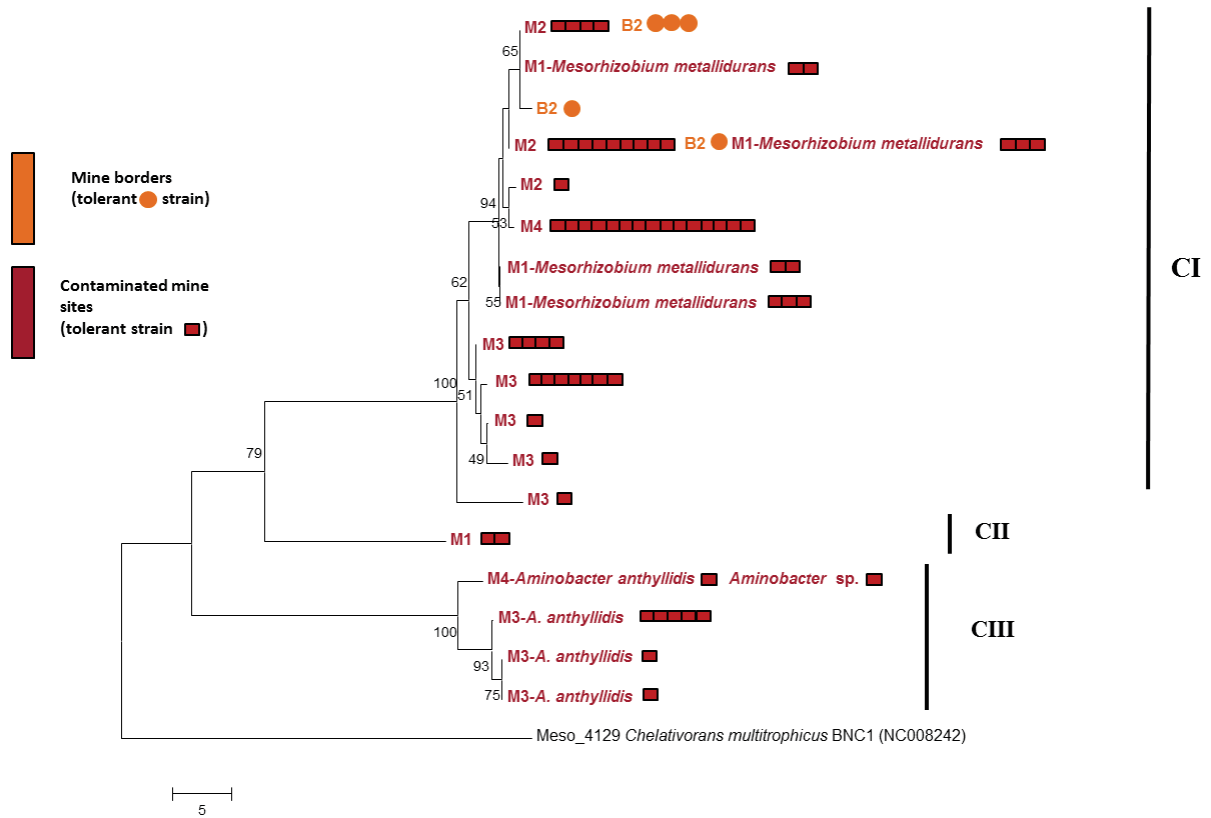


Fig. II-2-S2: Maximum-likelihood phylogenetic tree based on partial CadA protein sequences (203 amino acids) showing the relationships between the *Anthyllis vulneraria* isolates obtained in this study and reference strains. Genbank accession numbers are given in table II-2-S2 and the significance of each branch is indicated by a bootstrap value calculated for 1000 subsets (> 50%) at the major branching-points. *A. vulneraria* nodule isolates are shown using symbols in color depending on site origins.

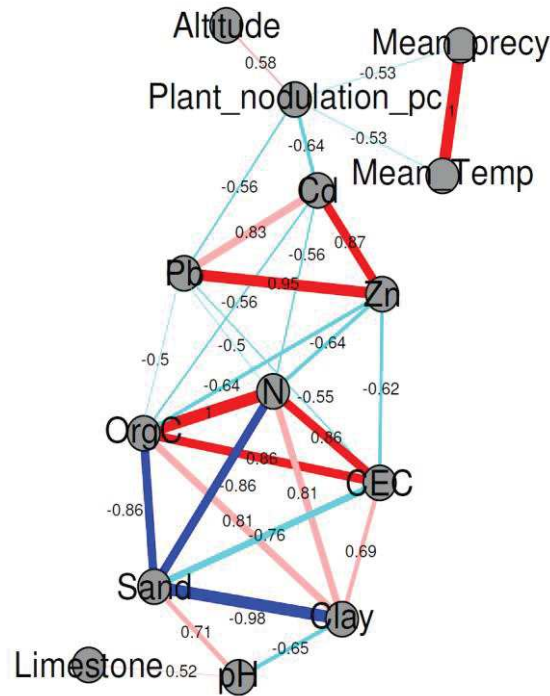


Fig. II-2-S3 Spearman correlation network of the environmental parameters available for the study sites. Only those correlations with coefficients ± 0.5 or above are represented. Each node (gray circles) represents an environmental variable. The edge thickness represents the strength of the correlation, and the respective coefficients are overlaid on the edges. The edge colors are divided into the following categories: positive correlations with FDR-corrected $p < 0.1$ (red) and $p \geq 0.1$ (pink), and negative correlations with FDR-corrected $p < 0.1$ (blue) and $p \geq 0.1$ (cyan).

References of supplementary data

1. **Vidal C, Chantreuil C, Berge O, Maure L, Escarre J, Bena G, Brunel B, Cleyet-Marel JC.** 2009. *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metalicolous soil in Languedoc, France. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 850-855.
2. **Maynaud G, Willems A, Soussou S, Vidal C, Mauré L, Moulin L, Cleyet-Marel JC, Brunel B.** 2012. Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. *Syst Appl Microbiol* **35**: 65-72.

II-3- Synthèse:

Ce chapitre a été consacré à l'étude de la diversité des souches symbiotiques d' *A. vulneraria* isolées à partir de sols échantillonnés dans huit sites : quatre sites fortement contaminés en métaux lourds (Avinières 1 et St Bresson 1 dans les Cévennes ; Eylie en Pyrénées Ariégeoises et Breinic de la région de Schlangenberg en Allemagne) ; deux sites moyennement contaminés situés à la périphérie des mines des Avinières 1 et de St Bresson 1 (appelés Avinières 2 et St Bresson 2 respectivement) et deux sites non contaminés de la région montagneuse des Cévennes (Col du vent et La Prunarède). 137 souches au total, ont été analysées génétiquement et phénotypiquement, y compris 7% des souches définies préalablement comme appartenant au genre *Aminobacter* et à une nouvelle espèce *Aminobacter anthyllidis* (Maynaud et al., 2012). De plus, les douze souches isolées de la mine des Avinières et appartenant à l'espèce *M. metallidurans* (Vidal et al., 2009) ont été incluses dans cette étude comme références pour définir la diversité intraspécifique de l'espèce bactérienne.

Dans cette étude, nous avons trouvé que toutes les souches isolées des sites miniers sont résistantes au Zn ($CMI \geq 1$ mM) et que la plupart d'entre elles (79%) sont résistantes au Cd ($CMI \geq 0,5$ mM). A l'opposé, toutes les souches provenant des sites non contaminés se révèlent être sensibles aux deux métaux. Notre étude est en accord avec des études précédentes montrant une corrélation entre la tolérance des souches aux métaux lourds et le niveau de la contamination du sol en métaux (Diaz-Ravina et al., 1994; Chaudri et al., 2008). Par contre, nous avons trouvé que cette corrélation n'est pas absolue dans les sites moyennement contaminés. Les souches isolées du site des Avinières 2 moyennement contaminé sont, toutes sensibles au Zn et au Cd alors que celles du site de St Bresson 2 forment un mélange de souches sensibles et résistantes. La présence des souches sensibles peut s'expliquer par la présence de teneurs plus élevées en matière organique qui peut diminuer la disponibilité et la toxicité des métaux dans le sol (Lejon et al., 2010). La présence des souches résistantes dans le site de St Bresson 2 pourrait être associée au niveau très élevé de Pb dans ce site et qui aurait exercé une pression de sélection favorisant le développement de souches plus tolérantes.

La résistance des souches aux métaux analysées phénotypiquement semble liée à l'acquisition de mécanismes de résistance aux métaux lourds. Le gène *cadA*, identifié comme participant à la tolérance de Zn chez *M. metallidurans* (Maynaud et al., 2014), ayant été détecté chez 100% des souches résistantes aux métaux lourds et chez 0% des souches sensibles aux métaux, fait de ce gène un marqueur génétique intéressant pour prédire la tolérance des symbiotes d'*Anthyllis*.

Les analyses d'ADNr 16S montrent que 93% des souches étudiées appartiennent au genre *Mesorhizobium*. Ces données complétées avec les marqueurs taxonomiques *recA* et *atpD* montrent que les souches de *Mesorhizobium* sont diversifiées au sein des différentes espèces et sont apparentées aux espèces *M. metallidurans*, *M. muleiense*, *M. caraganae*, *M. mediterraneum*, *M. robiniae* et *M.*

temperatum. Aucune souche symbiotique d'*A. vulneraria* appartenant à *M. australicum* et *M. loti* n'a été isolée dans cette étude (Jarvis et al., 1982; Ampomah and Huss-Danell, 2011). En effet, les sites miniers contiennent des souches appartenant exclusivement à l'espèce *M. metallidurans*, à l'exception des souches isolées de la mine d'Eylie qui appartiennent à une autre espèce métallicole de *Mesorhizobium*. Les sites non contaminés montrent une structure génétique de mesorhizobia différente de celle retrouvée dans les sites contaminés et contiennent des souches qui se regroupent avec les souches types des espèces *M. muleiense*, *M. robiniae*, *M. temperatum* et *M. mediterraneum*. La diversité des souches dans les sites non contaminés nécessite d'être analysée avec des gènes taxonomiques supplémentaires ainsi qu'avec des données d'hybridations ADN-ADN pour consolider leur appartenance à une ou plusieurs nouvelles espèces de *Mesorhizobium*. Les symbiotes d'*Anthyllis* isolés du site de St Bresson 2 sont réparties en deux groupes sur la base de leur niveau de résistance aux métaux lourds. Les souches résistantes appartiennent à l'espèce *M. metallidurans* tandis que les souches sensibles se regroupent avec la souche type de l'espèce *M. caraganae*. Par conséquent, nous avons montré que la composition génétique est fortement affectée par les métaux lourds contrairement à d'autres études qui ont montré que les métaux lourds n'affectaient pas la diversité génétique des microorganismes (Delorme et al., 2003; Tian et al., 2015).

Sur la base d'une analyse reposant sur un marqueur symbiotique (*nodA*), nous avons montré que la répartition de nos isolats est différente et indépendante de la position taxonomique définie par l'ADNr 16S et les gènes de ménage. Les symbiotes d'*Anthyllis* provenant des sites des Avinières 1, des Avinières 2, du Col du vent et de La Prunarède possèdent deux copies *nodA* proches ou identiques à celles de *M. metallidurans* 2683^T. Par contre les isolats issus des sites St Bresson 1, St Bresson 2, Eylie et Breinic possèdent un seul gène *nodA* dont la séquence est proche des bactéries appartenant au symbiovar *loti* nodulant *Lotus corniculatus*. Ce résultat peut être lié à la présence sur le site de la plante hôte compatible qui influence ainsi la prévalence et la répartition des isolats en fonction de leur propre distribution géographique (Stepkowski et al., 2011).

L'espèce *M. metallidurans* apparaît fortement adaptée aux sites miniers très contaminés en Zn, Pb et Cd car elle a été retrouvée uniquement dans ce type d'habitat. Nous n'avons pas isolé de souches de *M. metallidurans* sensibles aux métaux lourds alors que des auteurs ont montré que les propriétés de résistance aux métaux pouvaient être acquises via des éléments génétiques mobiles entre espèces (Janssen et al., 2010). Parallèlement, les rhizobia isolés de la mine d'Eylie sont résistants ou moyennement résistants au Zn et au Cd, n'appartiennent pas à *M. metallidurans* mais à une espèce du genre *Mesorhizobium* inconnue très proche de *M. metallidurans* et quelques souches appartiennent au genre *Aminobacter* (Maynaud et al., 2012) sachant que ce site possède des caractéristiques similaires aux autres sites miniers avec une teneur élevée en métaux lourds. Le fait que seul le site minier d'Eylie soit situé dans les Pyrénées Orientales, interroge sur les propriétés environnementales particulières à

ce site pouvant contribuer à expliquer la différence de composition des souches bactériennes nodulantes telles que le climat, l'humidité, la topographie, la présence de forte quantité de carbone organique et d'azote dans le substrat minier (Dalmastri et al., 1999; Castro et al., 2010).

En résumé, les souches isolées des mines possèdent des caractéristiques phénotypiques et génétiques différentes des souches isolées des sites non contaminés tels que la forte proportion de phénotype métallicole, nous avons observé la dominance de *M. metallidurans* ou d'espèces très proches dans les sites miniers, une corrélation entre les phénotypes métallicoles des isolats et leur attribution taxonomique au sein du genre *Mesorhizobium*. La phylogénie symbiotique du gène *nodA* suggère des comportements symbiotiques différents liés à la plante hôte et non pas aux conditions édaphiques du site. La pollution en métaux lourds affecte la diversité taxonomique et la tolérance aux métaux lourds des micro-organismes du sol alors que la plante hôte affecte la diversité symbiotique indépendamment de la propriété de la tolérance aux métaux en suscitant potentiellement un transfert horizontal des gènes symbiotiques. Ce travail, suggère l'utilisation des microorganismes indigènes mieux adaptés aux conditions pédoclimatiques en particulier pour une stratégie de phytostabilisation visant à revégétaliser les anciens sites miniers sur la base de l'interaction légumineuse/*Mesorhizobium*.

Chapitre III :

**Définitions de nouvelles espèces bactériennes
symbiotiques d'*Anthyllis vulneraria*, appartenant au
genre *Mesorhizobium***

III-1- Introduction :

Dans le chapitre II, nous avons montré que la structure génétique et phénotypique basée sur la tolérance au Zn et au Cd des symbiotes d'*Anthyllis vulneraria* isolés de sites miniers est différente de celle des bactéries isolées de sites non contaminés. *M. metallidurans* a été détectée comme espèce dominante dans plusieurs sites contaminés (à l'exception de la mine d'Eylie) et n'a pas été retrouvée dans les sites non contaminés. Nous avons montré aussi que la composition génétique des symbiotes d'*Anthyllis* dans les sites moyennement contaminés est liée au site géographique. Ainsi, nous avons trouvé que les bactéries de St Bresson 2 possèdent une structure génétique particulière et différente de celle des Avinières 2. La diversité génétique des souches isolées des Avinières 2 est proche de celle des bactéries isolées des sites non contaminés. Nous avons démontré que toutes les souches isolées des sites non contaminés et des Avinières 2 sont sensibles aux métaux lourds (CMI de Zn < 1 mM et CMI de Cd < 0,5 mM). La composition taxonomique des symbiotes d'*Anthyllis* isolés des sites non contaminés et Avinières 2 montre une grande diversité au sein du genre *Mesorhizobium*. Cette diversité appartient potentiellement à plusieurs nouvelles espèces de *Mesorhizobium*. L'arbre phylogénétique d'ADNr 16S (chapitre II) a montré que les souches provenant des sites non contaminés et du site des Avinières 2 sont proches de quatre espèces *M. robiniae* (99,7-99,9%), *M. temperatum* (99,7-100%) *M. muleiense* (99,65-99,91%) et *M. mediterraneum* (99,9-100%). L'arbre concaténé construit avec les séquences de gènes de l'ARNr 16S, de *recA* et *atpD* a confirmé les résultats obtenus à partir de l'arbre phylogénétique de l'ADNr 16S tout en améliorant sa fiabilité. Il confirme ainsi le regroupement de notre collection de rhizobia avec *M. muleiense* (98,2- 99,4%), *M. temperatum* (98,1-99,2%), *M. robiniae* (97,9-98,1%) et *M. mediterraneum* (97,8-98,3%).

Afin de définir le statut taxonomique des groupes génétiques pouvant potentiellement appartenir à de nouvelles espèces de *Mesorhizobium*, l'étude de plusieurs souches a été affinée à l'aide de données nécessaires à la description d'une espèce bactérienne. Pour cela, un échantillon de souches représentatives isolées des deux sites non contaminés ainsi que celui des Avinières 2 ont été choisies pour des analyses génétiques et phénotypiques supplémentaires. Ces dernières concernent notamment la consolidation de l'étude MLSA en séquençant d'autres gènes de ménage (*glnII* et *dnaK*), la différenciation des souches à l'aide des méthodes de MALDI-TOF MS et de l'hybridation ADN-ADN ainsi que l'estimation des indices ANI et DDH déterminés à l'aide du séquençage des génomes de souches représentatives des espèces. Les travaux réalisés dans ce chapitre ont été rédigés sous forme de deux articles : un article scientifique a été soumis dans le journal « *Systematic and Applied Microbiology* » (parties III-2) et le second est en attente de soumission (partie III-3).

III-2- Premier papier taxonomie soumis dans *Systematic and Applied Microbiology*:

***Mesorhizobium delmotii* and *Mesorhizobium prunedense* are two new species containing rhizobial strains within the symbiovar anthyllidis.**

Roba Mohamad^{a*}, Anne Willems^b, Antoine Le Quéré^a, Géraldine Maynaud^a, Marjorie Pervent^a, Maurine Bonabaud^c, Emeric Dubois^c, Jean-Claude Cleyet-Marel^a, Brigitte Brunel^{a*}

^a *Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes CIRAD/INRA/IRD/Montpellier SupAgro, Université de Montpellier, TA A-82/J, 34398 Montpellier, France*

^b *Laboratory of Microbiology, Dept. Biochemistry and Microbiology, Ghent University, Ghent, Belgium*

^c *Plateforme MGX, c/o Institut de Genomique Fonctionnelle, Montpellier, 141 rue de la Cardonille, 34 094 Montpellier Cedex, France.*

* Corresponding authors at: *Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, Campus international de Baillarguet, TA A-82/J, 34398 Montpellier, France*

E-mail addresses: roba392@gmail.com (R. Mohamad), brigitte.brunel@supagro.fr (B. Brunel).

□ Accession numbers are from KP242310 to KP242316, KP242318 for 16S rRNA genes; from KY123742 and from KP150567 to KP150572 for *recA* genes; from KP242300 to KP242305, KP242307, FN436254 for *atpD* genes; from KP300769 to KP300775, KP300777 for *dnaK* gene; and from KP300781 to KP300787, KP300789 for *glnII* genes. Accession numbers of common nodulation genes for the two proposed type strains STM4623^T and STM4891^T are respectively: KU984255 and KU984256 for the first copy of *nodA* gene (in cluster *nodABC*); KU984259 and KU984260 for the second copy of *nodA* gene (in cluster *nodAFEG*) and, KU984251 and KU984252 for *nodC* genes.

ABSTRACT

Eight mesorhizobial symbiotic strains isolated from *Anthyllis vulneraria* root-nodules were studied and compared taxonomically with defined *Mesorhizobium* species. All strains presented identical 16S rDNA sequences but can be differentiated by multilocus sequence analysis of housekeeping genes (*recA*, *atpD*, *glnII* and *dnaK*). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight mass spectrometry analyses separate these strains in two groups and a separate strain. Levels of DNA-DNA relatedness were less than 55% between representative strains and their closest *Mesorhizobium* reference relatives. The two groups containing four and three strains, respectively, originating from border mine and non-mining areas in Cévennes, were further phenotypically characterized. Groupings were further supported by average nucleotide identity values based on genome sequencing, which ranged from 80 to 92% with their close relatives and with each other, confirming these groups represent new *Mesorhizobium* species. Therefore, two novel species *Mesorhizobium delmotii* sp. nov. (type strain STM4623^T =LMG 29640^T =CFBP 8436^T) and *Mesorhizobium prunaredense* sp. nov. (type strain STM4891^T=LMG 29641^T =CFBP 8437^T) are proposed. Type strains of the two proposed species share accessory common nodulation genes within the new symbiovar anthyllidis as found in the *Mesorhizobium metallidurans* type strain.

Keywords: *Mesorhizobium*; symbiosis; *Anthyllis vulneraria*; multilocus sequence analysis; mass spectrometry; average nucleotide identity.

Introduction

The symbiosis between leguminous plants and their associated rhizobia serves as an important resource of nitrogen (N₂) for plants and ecosystems. Rhizobia are able to fix N₂ inside nodules formed on the roots, or occasionally on the stem, of host species [22]. *Anthyllis vulneraria* is a leguminous species of the family Fabaceae (Papilionaceae, Loteae) largely distributed in Europe; it is very variable and includes more than 30 subspecies [28]. One of them is *A. vulneraria* subsp. *carpatica* corresponding to a heavy metal-tolerant ecotype growing in an ancient zinc (Zn) and lead (Pb) mining site [7, 37]. This ecotype is known for its capacity to colonize heavy metal-contaminated soils deficient in nitrogen with their symbiotic bacteria belonging to the species of *Mesorhizobium metallidurans* [41]. This highly efficient N₂-fixing symbiotic association is environmentally interesting to increase plant growth and stimulate soil quality in metal-contaminated soil [18, 19].

N₂-fixing bacteria capable of nodulation with leguminous species (rhizobia) belong to both *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria* classes. Belonging to the former, the genus *Mesorhizobium* has been described by Jarvis and colleagues [12]. The prefix "meso" originates from the intermediate phylogenetic position of *Mesorhizobium* between *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* and also because bacteria belonging to this genus have an intermediate growth rate [12]. They often form N₂-fixing nodules on the roots of a limited range of legume plants [13]. The genus *Mesorhizobium* contains some species with a restricted host range [15, 36]. For now, this genus is the largest after *Rhizobium* and includes 39 symbiotic species, in which *M. metallidurans* is the only defined species of *Mesorhizobium* shown to be metal-tolerant and isolated from root-nodules of metallicolous *A. vulneraria* subsp. *carpatica* [42]. In the course of studying the distribution of *M. metallidurans* on weakly and uncontaminated sites, we obtained rhizobial strains belonging to the genus *Mesorhizobium*, which appeared taxonomically different from *M. metallidurans* or other recognized species of *Mesorhizobium* [26]. Representative strains from different clades were further studied here in order to define their taxonomical positions. Our data allow the proposal of two novel symbiotic mesorhizobial species associated with the metallicolous legume *A. vulneraria* subsp. *carpatica*: *Mesorhizobium delmotii* and *Mesorhizobium prunedense* isolated respectively from moderately polluted and uncontaminated sites.

Materials and methods

Bacterial strains

Eight mesorhizobial strains (STM4623, STM4620, STM5971, STM5969, STM4891, STM4864, STM4676, STM6544) were selected as representatives of a previous collection [26] isolated from nodules of *A. vulneraria* subsp. *carpatica* plants grown on soils sampled in the mine border site of the

Avinières mine (Saint Laurent-le-Minier, France) and a non-mining site (La Prunarède, France) (Table III-2- S1). All strains were stored in 20% glycerol (vol/vol) at -80°C.

Sequencing and phylogenetic analyses

Genomic DNA was extracted by phenol-chloroform extraction method [2]. 16S rRNA gene and housekeeping genes (*recA*, *atpD* and *dnaK*) were partially sequenced by PCR-amplification as described previously [23]. The *glnII* gene internal fragments were PCR-amplified using the primers *glnIIIf/glnIIr* [37, 40]. PCR products were run on 1% (w/v) agarose gels, the corresponding bands were purified with QIAGEN kit and then sequenced by GenoScreen Company (France). Chromatograms were checked using the FinchTV software (v.1.4). Sequences were manually corrected using BioEdit v7.1.3.0 [10] and Genedoc v2.7.000 for optimizing sequence alignments. Phylogenetic constructions were carried out in MEGA6 (version 6.0.6) [39] using CLUSTALW implementation for final alignment. Trees were inferred by neighbor joining (NJ) and maximum-likelihood (ML) methods. NJ trees were based on Kimura's two-parameter model and ML trees on the best fitted ML model and parameters as indicated by the lowest Bayesian Information Criterion score. Tree topologies were tested using 1000 bootstrap replicates.

Biochemical characterization

Phenotypic features of the studied strains were determined using API20NE, API50CH (BioMérieux), and PM1 (AES Chemunex) microplates. Reference type strains (listed in Table III-2-2) and *M. metallidurans* STM2683^T were added for comparison. The tests were carried out according to manufacturer's instructions and were incubated for two weeks. Resistance to 15 antibiotics (Biorad, France), tolerance to NaCl (1-5%), sensitivity to pH (4-12) and temperature (28, 37 and 42°C) were performed as described earlier [23]. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of heavy metals (Zn and Cd) was determined in YEM liquid medium supplemented with ZnSO₄ (0.02-20 mM) or CdCl₂ (0.02-10 mM) by cultivation in microplates with shaking at 350 rpm. Growth was determined by measuring the optical density at 600 nm after 2 weeks of culture at 28°C.

MALDI-TOF MS sample analysis

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) was performed as described previously [46], except that YEM agar growth medium was used to culture the strains for 7 days prior to protein extraction.

G+C content and DNA-DNA hybridization

The G+C of DNA content was determined by HPLC [27]. DNA-DNA hybridizations were carried out by fluorometric method using photobiotin-labelled DNA probes as described [46]. Hybridizations were performed at 46°C in 2x SSC in presence of 50% formamide.

Draft genome sequencing and assembly

For whole genome sequencing, two type strains (STM4623^T, STM4891^T) of the proposed species were grown in 250 ml of YEM broth and DNA isolation was performed using a Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method as presented in the DOI Joint Genome Institute DNA preparation protocols [47]. DNA quality was evaluated on a Nanodrop spectrometer. The draft genomes were produced using Illumina Hiseq technology (Nextera XT kit) at Montpellier Genomix facility (MGX), with 125 bp paired-end sequencing (one lane par sample) on about 400 bp fragments. Sequences were assembled on CLC Genomic workbench v5 as previously described [5]. The draft genome sequences were uploaded into the MicroScope facility [41] and subjected to the automatic annotation pipeline. The genome sequences are available and can be browsed at the Genome Browser MaGe interface (<https://ww.genoscope.cns.fr/agc/microscope/mage/viewer.php>).

Average Nucleotide Identity (ANI) & DNA-DNA Hybridization (DDH) in silico

To consolidate the affiliation of the two type strains (STM4623^T isolated from Avinières 2 site and STM4891^T isolated from La Prunarède site) representing the new species, the average nucleotide identity (ANI) [9, 34] and the *in silico* based DNA-DNA hybridization (DDH) estimates [23] were calculated. The alignment options used for the ANI calculation were 70% minimal identity over more than 700 bp in fragment windows of 1000 bp with a 200 bp step size on reciprocal best hits (two-way ANI). For the DDH measurement, we used the genome to genome distance calculator (GGDC) with the BLAST+ alignment method and the recommended formula (identities / High-scoring Segment Pair lengths). The probability that DDH > 70% was estimated as described previously [28]. Genomes were compared with each other and with complete genome assemblies downloaded from NCBI for the following strains: *M. amorphae* CCNWGS0123^T (NZ_AGSN000000000), *M. australicum* WSM2073^T (NC_019973), *M. ciceri* WSM1271 (NC_014923), *M. huakuii* 7653R (NZ_CP006581), *M. huakuii* MAFF303099 (BA000012), *M. metallidurans* STM2683^T (CAUM000000000), *M. opportunistum* WSM2075^T (CP002279), *M. plurifarum* ORS1032^T (ERS517733), *M. alhagi* CCNWX J12-2^T (AHAM01000001), *M. erdmanii* USDA3471^T (NZ_KI421453), *Mesorhizobium* sp STM4661 (CAAF000000000) and *M. loti* R7A (AZAM01000000).

Plant nodulation assay

Seeds of *A. vulneraria* subsp. *carpatica* were scarified and disinfected as previously described [42]. Four-day-old seedlings were inoculated with each individual type strain by adding 1 ml of growing rhizobial cultures (10^7 cells). Seedlings were grown on a nitrogen-free medium as previously published [21]. Uninoculated seedlings and fertilized ones with 5 mM of nitrogen in the form of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ were used as controls. In addition, *M. metallidurans* STM2683^T was used as positive control for nodulation assay. Root-nodules appeared 15-30 days after inoculation and plants were harvested after 7 weeks of culture in a growth chamber. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Duncan post hoc test ($p < 0.05$).

Results

Phylogenetic analyses

The eight strains used in this study have 100% identity on at least 1317 nt of 16S rDNA sequences. The two proposed type strains (STM4623^T and STM4891^T) were identical on the complete 16S rDNA nucleotide sequence (1470 nt). In the phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequences (1250 nt) the strains shared 99.9% of identity with the type strain of *M. robiniae* (one nucleotide of difference), 99.8% with the type strains of *M. muleiense*, *M. temperatum* and *M. mediterraneum* (two nucleotides of difference) and 99.5% with *M. metallidurans* (six nucleotides of difference) (Fig. III-2-1).

The phylogenetic ML and NJ trees based on concatenated sequences of four partial housekeeping genes (*atpD*, *dnaK*, *glnII* and *recA*) displayed two well-supported groups and regrouped the strains studied according to their site of origin (Fig. III-2-2), except for strain STM6544 isolated from Avinières 2 site that grouped with La Prunarède strains. Members of the group including STM4623^T, STM5969, STM5971 and STM4620 all isolated from Avinières 2 site, shared 100% identity on the four partial gene sequences and branch close to the *M. temperatum* sequence. By contrast the other group containing STM4891^T, STM4676, STM4864 isolated from La Prunarède soil and STM6544 isolated from Avinières 2 were closely related to *M. muleiense*. Regarding phylogenetic trees inferred from individual housekeeping gene sequences (*recA*, *atpD*, *dnaK* or *glnII*), each phylogenetic tree showed a topology similar to that of the concatenated tree (Fig. III-2-S1), except for STM6544 in the *recA* based tree that grouped separately from the two *Anthyllis* groups (Fig. III-2-S1 (A)). Between the two groups of *Anthyllis* isolates, the four partial gene sequences shared more than 90% of nucleotidic identities: 94.5% identity for *atpD* sequences, 97.7% for *glnII* sequences, 96.6-96.9% for *recA* sequences and 98-98.4% for *dnaK* sequences.

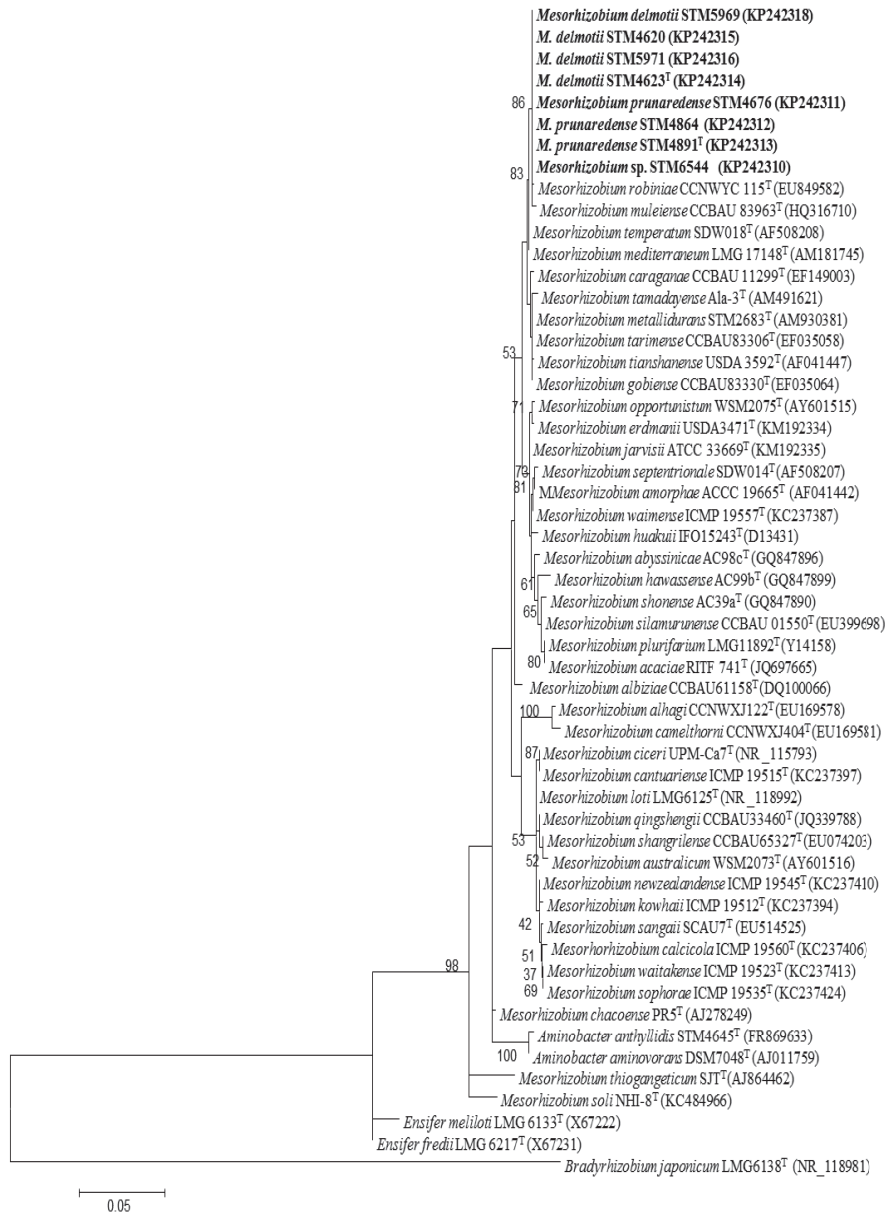


Fig. III-2-1: Maximum-likelihood phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences (1250 nt) of all *Anthyllis* strains used in this study (indicated in bold) and the type strains of *Mesorhizobium* species. The tree was constructed using Kimura 2-parameter+G+I model. Bootstrap values (above 50%) calculated for 1000 subsets are indicated. Filled circles were used to indicate identical nodes generated by maximum-likelihood and neighbor-joining methods. Genbank accession numbers are given in front the strain numbers. Bar represents 5% sequence divergence.

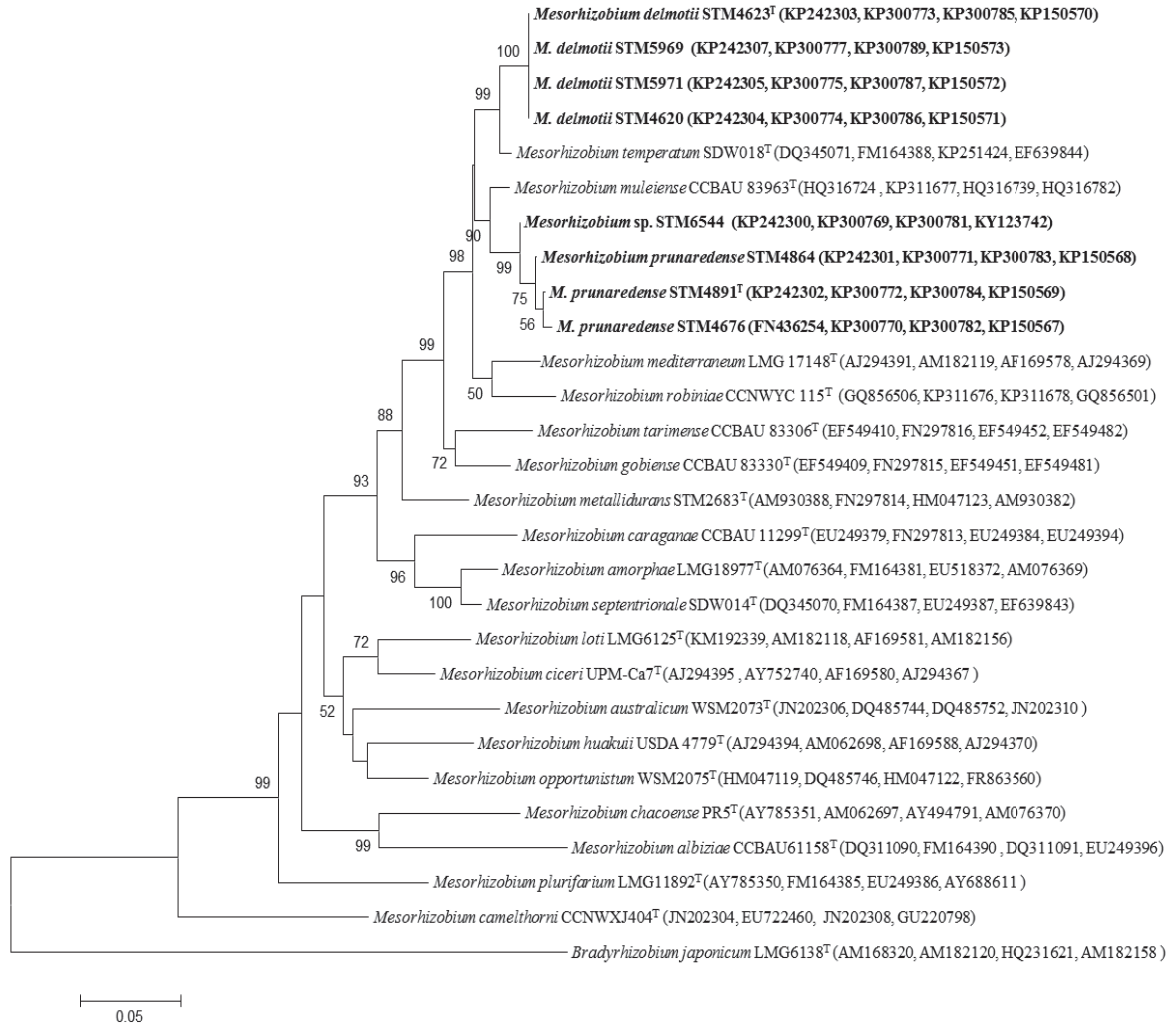


Fig. III-2-2: Maximum-likelihood phylogenetic concatenated tree based on *atpD* (375 nt), *dnaK* (258 nt), *glnII* (504 nt) and *recA* (357 nt) gene sequences, of all *Anthyllis* strains used in this study (indicated in bold) and the type strains of *Mesorhizobium* species. The tree was constructed using the Tamura-Nei+G+I model. The analysis was based on 1276 nt. Bootstrap values (above 50%) calculated for 1000 subsets are indicated. Filled circles were used to indicate identical nodes generated by maximum-likelihood and neighbor-joining methods. Genbank accession numbers are given in front the strain numbers. Bar represents 5% sequence divergence.

MALDI-TOF MS results

The results of MALDI-TOF MS showed that the eight strains could be divided in two groups at about 90% of similarity and a separate strain (Fig. III-2-3). A first group contained STM4620, STM5971, STM4623^T and STM5969, a second one encompassed STM4676, STM4891^T, STM4864, while STM6544 grouped separately. According to MALDI-TOF MS profiles, the two groups and the separate strain appeared different from the type strains of *M. muleiense*, *M. temperatum*, *M. robiniae* and *M. mediterraneum* (Fig. III-2-3) which represent the species most closely related to the strains from *Anthyllis* according to MLSA (multilocus sequence analysis) (Fig. III-2-2). To verify this hypothesis, one representative strain of each clade was chosen for DNA-DNA hybridization (*i. e.* STM4623, STM4891 and STM6544).

DNA-DNA hybridization

DNA-DNA hybridization values displayed a low relatedness between the three representative strains (STM4623^T, STM6544 and STM4891^T) and the reference type strains representing the closest defined species (*M. muleiense*, *M. temperatum*, *M. mediterraneum* and *M. robiniae*): data ranged from 36.8 to 48.3% (Table III-2-2) and confirmed the delineation into 3 groups as revealed above by MALDI-TOF MS and MLSA data applied to our set of *Mesorhizobium* strains. Strain STM6544 is currently a single separate strain and was not investigated further.

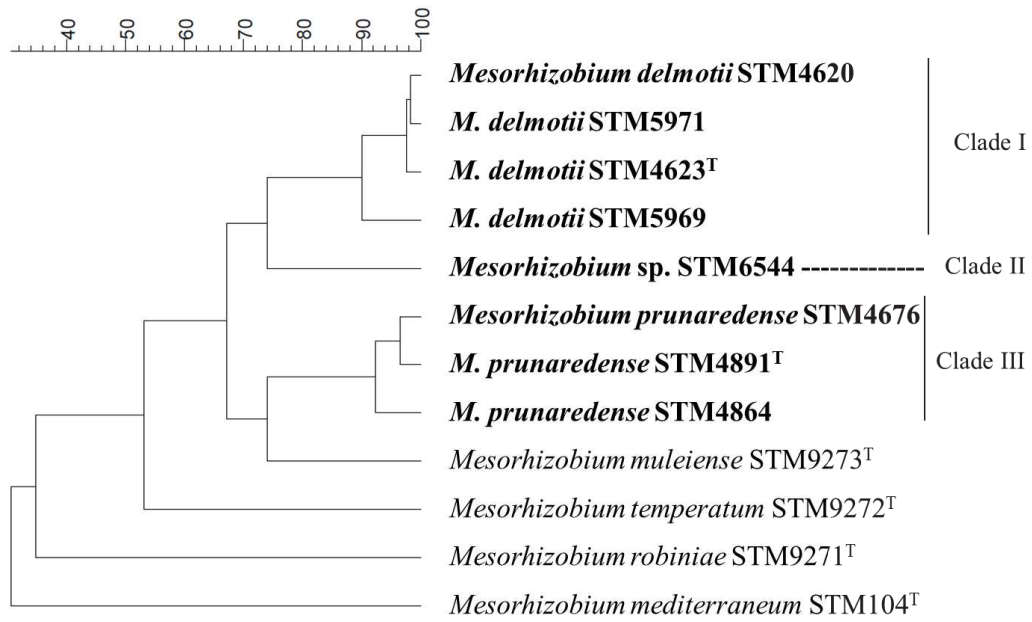


Fig. III-2-3: Dendrogram based on the protein mass fingerprint patterns analyzed by matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for studied strains and reference type strains of *Mesorhizobium*. *Anthyllis* strains included in this study are indicated in bold.

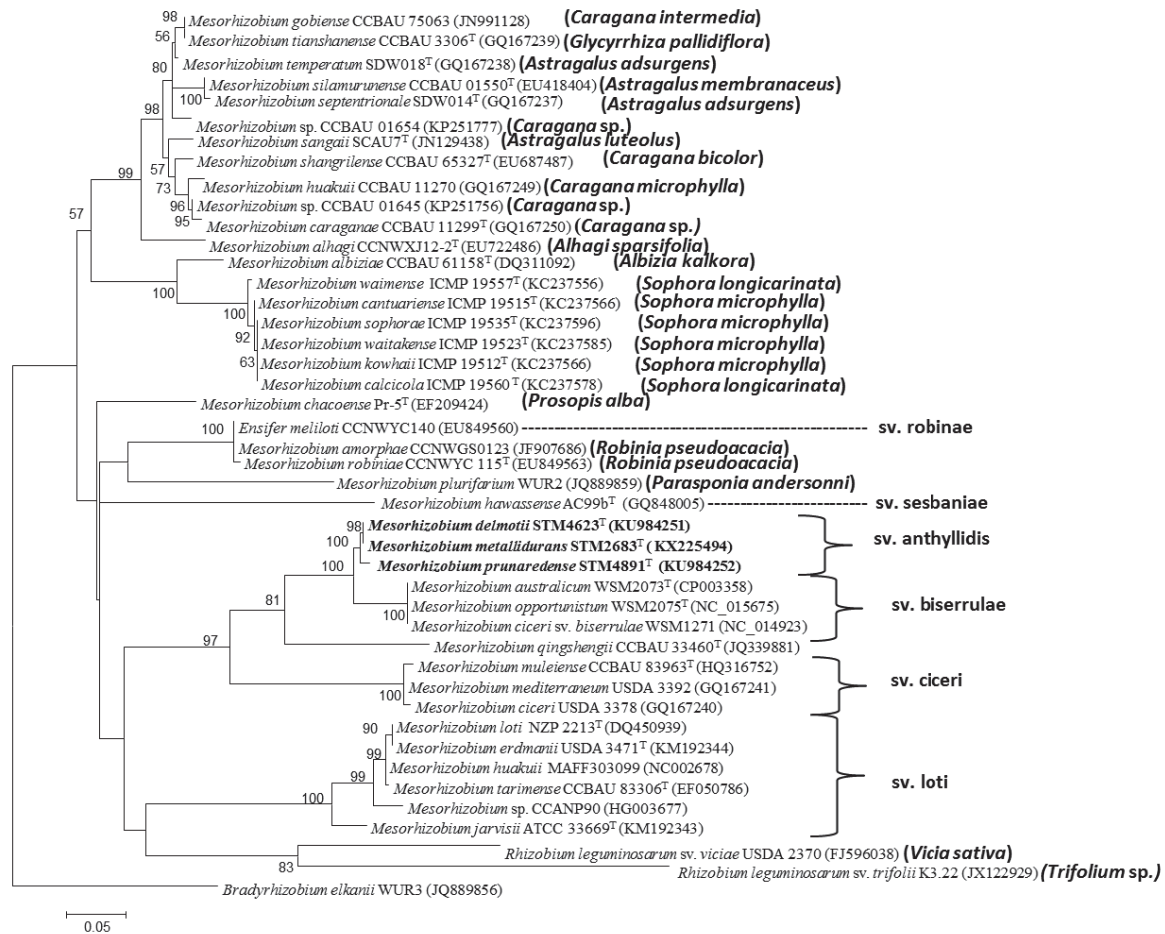


Fig. III-2-4: Maximum-likelihood tree of partial sequences of *nodC* ((393 nt) showing the relationships between the new type strains and reference strains indicating the different symbiovars (sv.) defined within the genus of *Mesorhizobium* and the novel proposed symbiovar (in bold). Tree was constructed using the best model T92+G+I. Bootstraps are based on 1000 replicates. Bar represents 5 nt substitutions per 100 nt. Original host legumes are given in parenthesis for unknown symbiovars. Filled circles were used to indicate identical nodes generated by maximum-likelihood and neighbor-joining methods.

Biochemical characteristics and phenotypic analysis

The seven strains composing the two new proposed species were tested for 164 phenotypic characteristics in parallel with reference strains (*M. mediterraneum* STM104^T, *M. robiniae* STM9271^T, *M. temperatum* STM9272^T, *M. muleiense* STM9273^T and *M. metallidurans* STM2683^T). None of the strains studied could grow on p-hydroxyphenyl acetic acid, M- hydroxyphenyl acetic acid, tyramine, phenylethyl-amine, methyl-βD-xylopyranoside, L-sorbose, inulin, xylitol, gentiobiose, D-lyxose, D-tagatose, D-arabitol, L-arabitol, potassium gluconate and potassium 2-ketogluconate. Most of strains tested were sensitive to neomycin and rifampicin while they were resistant to chloramphenicol, nalixidic acid, erythromycin and gentamicin. Only one discriminative phenotypic characteristic (positive growth on D, L-malic acid for La Prunarède strains) was detected to separate the new proposed species (Table III-2-1). All strains tested grew at 28°C and 37°C, but not at 42°C. All strains were sensitive to NaCl concentrations above 1 %, all grew at pH from 5 to 11 but not at pH

4 or 12 (data not shown). Colonies of the single strain STM6546 appeared one week later than the other strains. All strains were sensitive to Zn and Cd (MIC of Zn = 0.05-0.5mM, MIC of Cd = 0.02-0.1mM) (Table III-2-1).

Table III-2-1: Phenotypic differences among studied strains (1. STM4623^T; 2. STM5969; 3. STM4620; 4. STM5971; 5. STM4891^T; 6. STM4676; 7. STM4864) and reference strains (8. *Mesorhizobium muleiense* STM9273^T; 9. *M. temperatum* STM9272^T. +: positive, - : negative, w: weak reaction or growth. Data are from this study.

Characteristics	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Assimilation of (PM1) :									
L-aspartic acid	-	-	+	-	-	+	-	-	+
D-glucuronic acid	-	-	-	-	-	+	-	+	-
L-lactic acid	-	-	+	-	+	+	-	+	w
Formic acid	-	-	-	-	+	+	-	-	-
D, L-malic acid	-	-	w	-	+	+	+	-	-
L-rhamnose	+	-	+	+	-	+	+	-	w
D-fructose	+	w	+	+	-	+	-	-	-
D-melibiose	-	-	w	-	+	+	-	-	-
Lactulose	-	-	w	+	+	+	-	-	-
Sucrose	+	-	+	+	+	+	-	-	+
L-glutamine, M-tartaric acid	-	-	+	-	+	-	+	-	w
Glucose-1-phosphate	-	-	+	-	+	-	+	-	+
Tween 80, α -hydroxy glutaric acid- γ -lactone	-	-	-	-	+	-	+	-	-
β -methyl-D-glucoside	-	-	w	-	+	-	+	-	-
Maltotriose	-	-	+	-	+	+	+	-	-
2-Deoxy adenosine	-	-	+	-	+	+	+	w	-
Adenosine	-	-	-	-	+	-	+	w	-
M-Inositol	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Glycyl-L-glutamic acid, Tricarballic acid	-	-	+	-	-	-	+	+	-
L-Serine	-	-	-	-	-	-	+	+	-
L-Threonine	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D-Psicose	+	+	+	-	+	+	+	-	+
Fermentation (API50CH) :									
α -D-glucose	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Resistance to :									
Streptomycin 10 μ g	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Cefuroxime 30 μ g	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Kanamycin 30 μ g	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Vancomycin 30 μ g	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Ciprofloxacin 5 μ g	-	-	+	-	-	-	-	-	+

Table III-2-2: % GC and DNA-DNA hybridization values between representative strains of *Mesorhizobium* isolated from *A. vulneraria* from Avinières 2 (STM4623^T and STM6544), La Prunarède site (STM4891^T) and type strains of *M. robiniae* STM9271^T, *M. temperatum* STM9272^T, *M. muleiense* STM9273^T and *M. mediterraneum* STM104^T.

Strain	%GC	STM4623 ^T	STM4891 ^T	STM6544
<i>M. delmotii</i> sp. nov. STM4623 ^T	62.1	100		
<i>M. prunaredense</i> sp. nov. STM4891 ^T	62.4	48.3	100	
<i>Mesorhizobium</i> sp. STM6544	62.1	43.9	46.4	100
<i>M. mediterraneum</i> STM104 ^T	62.3	48.1	40.6	39.3
<i>M. robiniae</i> STM9271 ^T	62.1	45.2	39	40.6
<i>M. temperatum</i> STM9272 ^T	62.6	38.9	41.3	40.2
<i>M. muleiense</i> STM9273 ^T	62.2	44.3	43.9	36.8

Draft genome sequencing of type strains, ANI & DDH calculations

The GC contents obtained from the draft genomes were 61.7 and 61.9% for STM4623^T and STM4891^T, respectively (Table III-2-2). The derived ANI and DDH values ranged from 80.6 to 93.7% for ANI and, from 17 to 53.5% for DDH between the two studied representative strain genomes and available genomes of mesorhizobial species (Table III-2-3). Based on current thresholds set to ANI above 95% and DDH above 70% for intraspecies genomes comparisons, STM4623^T and STM4891^T belonged to two new species (Table III-2-3). Both ANI and DDH values indicated that the two proposed type strains were also different from *Mesorhizobium* sp. STM4661 associated as well to *A. vulneraria* but isolated from Eylie mine [24].

Table III-2-3: Average nucleotide identity (ANI) and DNA-DNA hybridization *in silico* (DDH) between strains representing the novel clades and the most closely related sequenced members among the genus *Mesorhizobium*.

Methods	%ANI		% DDH	
	STM4623 ^T	STM4891 ^T	STM4623 ^T	STM4891 ^T
<i>M. delmotii</i> sp nov. STM4623 ^T	100	93.69 ± 3.10	100	53.50 ± 2.69
<i>M. prunedense</i> sp nov. STM4891 ^T	93.69 ± 3.10	100	53.50 ± 2.69	100
<i>M. amorphae</i> CCNWGS0123	85.10 ± 4.24	85.22 ± 4.19	29.50 ± 2.44	29.50 ± 2.44
<i>M. australicum</i> WSM2073 ^T	83.61 ± 4	83.60 ± 4.09	26.80 ± 2.42	26.70 ± 2.42
<i>M. ciceri</i> WSM1271	84.20 ± 3.93	84.14 ± 4.08	27.60 ± 2.43	27.80 ± 2.43
<i>M. huakuii</i> 7653R	84.07 ± 4.21	84.02 ± 4.27	27.50 ± 2.43	27.50 ± 2.43
<i>M. huakuii</i> MAFF303099	84.35 ± 4.68	84.35 ± 4.61	27.70 ± 3.5	27.80 ± 2.43
<i>M. metallidurans</i> STM2683 ^T	87.92 ± 4.96	87.90 ± 4.99	34.20 ± 2.47	34.10 ± 2.47
<i>M. opportunistum</i> WSM2075 ^T	84.08 ± 4.11	84.17 ± 4.19	27.50 ± 2.43	27.80 ± 2.43
<i>M. plurifarum</i> ORS 1032 ^T	82.75 ± 4.12	82.94 ± 4.13	25.60 ± 2.41	25.90 ± 2.41
<i>M. alhagi</i> CCNWX J12-2 ^T	80.71 ± 5.09	80.63 ± 4.82	22.90 ± 2.37	22.90 ± 2.37
<i>M. loti</i> R7A	84.13 ± 4.4	84.28 ± 4.3	27.70 ± 2.45	27.70 ± 2.4
<i>M. erdmanii</i> USDA 3471 ^T	83.89 ± 3.93	84.01 ± 4.31	26.80 ± 2.45	28.10 ± 2.45
<i>Mesorhizobium</i> sp. STM4661	87.18 ± 3.97	87.12 ± 3.96	33.3 ± 2.5	33 ± 2.45

Symbiotic properties

The two proposed type strains were able to form nodules with their original host plant (*A. vulneraria* subsp *carpatica*). Slight significant differences (*p-value* ≤ 0.05) were observed between them or the strain *M. metallidurans* STM2683^T on nodule biomass and chlorophyll content (Table III-2-S2), while plant biomass was similar in all treatments. These differences tend to show that strains STM2683^T and

STM4891^T could be more efficient in fixing nitrogen than the strain STM4623^T on *A. vulneraria* subsp. *carpatica*.

Symbiotic genes from the two genome-sequenced strains representing the two proposed species are closely related to those of *M. metallidurans* STM2683^T. The three strains STM4623^T, STM4891^T and STM2683^T harbor two copies of *nodA* (*nodA1* in *nodABC* operon and *nodA2* in *nodAGEF*). *nodA2* is 100% identical between the three strains while *nodA1* shows 0.3% of divergence (2 nt) in STM4623^T compared to STM4891^T and STM2683^T. *nodA1* and *nodA2* sequences shared between 78.5 and 78.7% of identity. By contrast, the *nodC* sequences were slightly distinct with 99.4% of identity between the two proposed type strains and 99.5-99.8% when they were compared to the type strain of *M. metallidurans*. These nodulation genes are similar to those of symbiovar *anthyllidis* related to symbiosis with *Anthyllis* as for the type strain of *M. metallidurans* STM2683^T (Fig. III-2-4).

Discussion

A. vulneraria is the most widespread species of the genus *Anthyllis* [29]. It is a biannual species, associated mainly with bacteria from the genus *Mesorhizobium* [1, 42], and able less frequently to form effective nodules with strains belonging to the genus *Aminobacter* [23]. In the present study, eight strains of the genus *Mesorhizobium* previously isolated from root-nodules of *A. vulneraria* subsp. *carpatica* plants grown on border mine and uncontaminated soils [26] were further investigated to analyze their taxonomic positions: two novel species are proposed (*M. delmottii* and *M. prunaredense*) based on analyses of representative strains selected within two larger rhizobial groups containing 14 and 17 strains respectively [26].

All the eight studied strains shared the same complete 16S rRNA gene sequences, despite belonging at least to two different bacterial species. This feature has been observed for other species in the genus *Mesorhizobium* where identical 16S rDNA sequences over the available lengths were found for *M. plurifarum*/*M. acaciae* [4, 48] or *M. metallidurans*/*M. gobiense* species [11, 42]. The phylogenetic positions of the studied strains could be demarcated by using multilocus sequence analysis (MLSA of *recA*, *atpD*, *glnII* and *dnaK*) and building a phylogenetic tree based on concatenated sequences to provide a better resolution below the genus level. This is in agreement with previous conclusions using an equivalent set of housekeeping genes not only within *Mesorhizobium* [3, 32] but also within *Bradyrhizobium* which displays much conserved classical taxonomic markers or some conflictive phylogenies [35].

Interestingly, MALDI-TOF analyses highlighted an equivalent mesorhizobial clustering than the MLSA phylogeny, with strain STM6544 separated from the others, proposing its affiliation to novel genospecies. Based on the threshold set above 70% for the intraspecies isolates [43], DNA-DNA hybridization shows that the representative strains isolated from *A. vulneraria* subsp. *carpatica* studied

here belong to three unknown species. The MALDI-TOF methodology, recently evaluated for its capability to differentiate species among Rhizobiaceae family or bradyrhizobia [6], shows its powerful capacity to separate closely related species within *Mesorhizobium* and confirms that it is an excellent alternative to classical microbiological identification at a species level [20].

Draft genomes of the two type strains *Mesorhizobium* sp. STM4623^T and *Mesorhizobium* sp. STM4891^T were determined in order to consolidate their affiliation to distinct species because genome sequencing of type strains was shown to provide a dataset that allows an unequivocal identification at the species level [44]. Following Richter and colleagues [34] who reported a correlation between ANI and DDH *in silico*, we used genome based species delineation methods, and confirmed that type strains of the two new proposed mesorhizobial species have less than 95% ANI and less than 70% *in silico* DDH with *M. metallidurans*. ANI and *in silico* DDH values are becoming the gold standard in rhizobial taxonomy and can be used as alternatives for estimating DNA-DNA relatedness. They are currently considered better than wet lab DDH which has been shown to produce variable results from lab to lab and from different DNA samples [16, 31].

Following a polyphasic and consensus approach for bacterial species definition [8], species distinctiveness of our mesorhizobial strains was consistent using wet lab DNA-DNA relatedness, MLSA sequence analyses (based on four housekeeping genes), MALDI-TOF MS analyses and *in silico* ANI and DDH analyses. This increases the number of rhizobial species in the genus *Mesorhizobium* to 44 (including the recently defined *Mesorhizobium olivaresii* [17]), three of them isolated from *A. vulneraria*. All representative strains studied here, were metal-sensitive as well as all the similar strains previously isolated although some of them originated from a moderately metal-contaminated border mine site [26]. Indeed one strain (STM4627) from the *M. prunaredense* group and all the 14 strains from the *M. delmotti* group were found in the periphery of the St-Laurent mine where the metal-tolerant species *M. metallidurans* was first recovered [42]. The metal pump CadA, involved in metal-tolerance [25] that was found in two resistant mesorhizobial strains STM2683^T and STM4661 [24] could not be found in both genomes of the proposed type strains.

A previous review [30] considered that many phenotypic tests in the identification of new rhizobial species were questionable and proposed the elimination of this requirement for novel rhizobial species description, especially when phenotypic dendrograms and genetic data were incongruent. For example, this was demonstrated for *Rhizobium tropici* type A (now reclassified as *Rhizobium leucaenae*) [33] strains which were genotypically separated from *R. tropici* type B strains (currently classified as *R. tropici*) or other rhizobial species while phenotypic tests had shown that both types belong to a single “*tropici* group” [21]. The two new proposed species as well as the previously recognized species *M. metallidurans* and *Aminobacter anthyllidis* were isolated from nodules of *A. vulneraria*. Yet, these two newly proposed species can be distinguished from *M. metallidurans* by their sensitivity heavy metals [42] and from *A. anthyllidis* by their tolerance to nalidixic acid and sensitivity to neomycin and NaCl [23]. All new strains presented MIC values in the

same range as those obtained previously when the sensitive *Mesorhizobium tianshanense* type strain (MIC of Zn = 0.1 and Cd= 0.1 mM) was tested, which contrasts with the resistant *M. metallidurans* type strain (MIC of Zn =20 and Cd= 0.5 mM) [42]. Moreover, they show a higher sensitivity to Zn and Cd compared to the intermediate tolerance observed in *Aminobacter* strains of *A. anthyllidis* [23].

Although not informative for taxonomy [8], accessory genes involved in strain adaptation are still highly interesting to investigate bacterial ecology, particularly for rhizobial specialization. By comparing nodulation genes that reflected legume-host relationship [36], we found a separate *nodC* cluster distinct from the other symbiovars in *Mesorhizobium*: this cluster represents a new symbiovar called anthyllidis which was found in three species isolated from *Anthyllis* and nodulating *Anthyllis* (the two novel proposed species and *M. metallidurans*). This extends the capacity of different *Mesorhizobium* species to share a same symbiovar [14].

Description of *Mesorhizobium delmotii* sp. nov.

Mesorhizobium delmotii (del.mo'ti.i. N.L. gen. masc. n., of Delmot, named for Guy Delmot, an organic farmer who made significant helps for the development of scientific studies and teaching regarding the Avinieres site in St-Laurent-Le- Minier, France)

Cells are Gram-negative, aerobic and non-spore forming rods. Colonies appearing on YEM agar medium within 7 days of incubation (28°C) are circular, convex, have a creamy color and usually a diameter of 1-3 mm. The maximum temperature for aerobic growth is 37°C, no growth was observed at 42°C. Strains studied are sensitive to 1% of NaCl, grow at a pH range of 5-11 and are sensitive to Zn and Cd in YEM broth. The DNA mol% GC content of the type strain is 61.7 or 62.1 mol% by draft genome analysis and HLPC, respectively. The type strain is STM4623^T (=LMG 29640^T =CFBP8436^T) was isolated from a root-nodule of *A. vulneraria* from border mining site (Avinières 2), in the south of France. The strain was able to nodulate *A. vulneraria*.

Description of *Mesorhizobium prunedense* sp. nov.

Mesorhizobium prunedense (pru.na.re.den'se. N.L. neut. adj. *prunedense*, from La Prunardère, referring to the geographical origin of the first strains)

Gram-negative, aerobic and non-spore forming rods. Colonies appearing on YEM agar medium within 7 days of incubation (28°C) are circular, convex, have a creamy color and usually a diameter of 1-3 mm. The maximum temperature for aerobic growth is 37°C, no growth was observed at 42°C. This species is sensitive to 1% of NaCl, grow at a pH range of 5-11 and is sensitive to Zn and Cd in YEM broth. Feature that discriminated this species from the above proposed novel species is its growth on DL malic acid (Table III-2-1). The mol% GC content of the type strain is 61.9 or 62.4 mol%, by draft genome and HLPC analyses, respectively. The type strain STM4891^T (=LMG 29641^T =CFBP8437^T)

was isolated from a root-nodule of *Anthyllis vulneraria* from uncontaminated site (La Prunarède), region of Languedoc-Roussillon, France. The strain was able to nodulate *A. vulneraria*.

Acknowledgements

We thank Dr. L. Moulin for his help in MLSA analyses, and L. Mauré and L. Lebbe for excellent technical assistance. This work was partially supported by the French national research agency (ANR Programme « Contaminants, Ecosystèmes et Santé », SyMetal). R. M. received a PhD grant from Damascus University in Syria. The LABGeM (CEA/IG/Genoscope & CNRS UMR8030) and the France Génomique National infrastructure (funded as part of Investissement d'Avenir program managed by Agence Nationale pour la Recherche, contract ANR-10-INBS-09) are acknowledged for support within the MicroScope annotation facility.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version

References

- [1] Ampomah, O.Y., Huss-Danell, K. (2011) Genetic diversity of root nodule bacteria nodulating *Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulneraria* in Sweden. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 267-275.
- [2] Chen, W.P., Kuo, T.T. (1993) A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.*, 21, 2260-2260.
- [3] Degefu, T., Wolde-meskel E., Frostegard, A. (2011) Multilocus sequence analyses reveal several unnamed *Mesorhizobium* genospecies nodulating *Acacia* species and *Sesbania sesban* trees in Southern regions of Ethiopia. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 216-226.
- [4] De Lajudie, P., Willems, A., Nick, G., Moreira, F., Molouba, F., Hoste, B., Torck, U., Neyra, M., Collins, M.D., Lindström, K., Dreyfus, B., Gillis, M. (1998) Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 48, 369-382.
- [5] Diouf, F., Diouf, D., Klonowska, A., Le Quéré, A., Bakhoun, N., Fall, D., Neyra, M., Parrinello, H., Diouf, M., Ndoye, I., Moulin, L. (2015) Genetic and genomic diversity studies of *Acacia* symbionts in Senegal reveal new species of *Mesorhizobium* with a putative geographical pattern. *PLoS ONE*. 10, e0117667.
- [6] Ferreira, L., Sanchez-Juanes, F., Garcia-Fraile, P., Rivas, R., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E. Golzalez-Buitrago, J.M., Velazquez, E. (2011) MALDI-TOF mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family *Rhizobiaceae*. *PLoS ONE* 6, e20223.

- [7] Frérot, H., Lefèbvre, C., Gruber, W., Collin, C., Santos, A.D., Escarré, J. (2006) Specific interactions between local metallicolous plants improve the phytostabilization of mine soils. *Plant Soil* 282, 53-65.
- [8] Gevers, D., Cohan, F.M., Lawrence, J.G., Spratt, B.G., Coenye, T., Feil, E.J. et al. (2005) Re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 733-739.
- [9] Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P., Tiedje, J.M. (2007) DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 81-91.
- [10] Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 4.
- [11] Han, T.X., Han, L.L., Wu, L.J., Chen, W.F., Sui, X.H., Gu, J.G. Wang, E.T., Chen, W.X. (2008) *Mesorhizobium gobiense* sp. nov. and *Mesorhizobium tarimense* sp. nov., isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 2610-2618.
- [12] Jarvis, B.D.W., Van Berkum, P., Chen, W.X., Nour, S.M., Fernandez, M.P., Cleyet-Marel, J.C., Gillis, M. (1997) Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 47, 895-898.
- [13] Laranjo, M., Alexandre, A., Oliveira, S. (2014) Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiol. Res.* 169, 2-17.
- [14] Laranjo, M., Young, J.P., and Oliveira, S. (2012) Multilocus sequence analysis reveals multiple symbiovars within *Mesorhizobium* species. *Syst Appl Microbiol* 35: 359-367.
- [15] Lemaire, B., Dlodlo, O., Chimphango, S., Stirton, C., Schrire, B., Boatwright, J.S. Honnay, O., Smets, E., Sprent, J., James, E.K., Muasya, A.M. (2014) Symbiotic diversity, specificity and distribution of rhizobia in native legumes of the Core Cape Subregion (South Africa). *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, 1-17.
- [16] Lopez-Guerrero, M.G., Ormeno-Orrillo, E., Velazquez, E., Rogel, M.A., Acosta, J.L., Gonzalez, V., Martinez, J., Martinez-Romero, E. (2012) *Rhizobium etli* taxonomy revised with novel genomic data and analyses. *Syst. Appl. Microbiol.* 35, 353-358.
- [17] Lorite, M.J, Flores-Félix, J.D., Peix, A., Sanjuan, J., Velasquez, E. 2016. *Mesorhizobium olivaresii* sp.nov. isolated from *Lotus corniculatus* nodules. *Syst. Appl. Microbiol.* 39, 557-561.
- [18] Mahieu, S., Frérot, H., Vidal, C., Galiana, A., Heulin, K., Maure, L., Brunel, B., Lefèbvre, C., Escarré, J., Cleyet-Marel, J.C. (2011) *Anthyllis vulneraria/Mesorhizobium metallidurans*, an efficient symbiotic nitrogen fixing association able to grow in mine tailings highly contaminated by Zn, Pb and Cd. *Plant Soil.* 342, 405-417.
- [19] Mahieu, S., Escarré, J., Brunel, B., Méjamolle, A., Soussou, S., Galiana, A., Cleyet-Marel, J.C. (2014). Soil nitrogen balance resulting from N fixation and rhizodeposition by the symbiotic

- association *Anthyllis vulneraria*/*Mesorhizobium metallidurans* grown in highly polluted Zn, Pb and Cd mine tailings. *Plant Soil* 375, 175-188.
- [20] Maier, T., Klepel, S., Renner, U., Kostrzewa, M. (2006) Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. *Nat. Methods* 3, i-ii. doi:10.1038/nmeth870.
- [21] Martiez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F., Franco, A., Graham, P., Pardo, M. (1991) *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 41.3, 417-426.
- [22] Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., Batut, J. (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes?. *Trends Microbiol.* 17, 458-466.
- [23] Maynaud, G., Willems, A., Soussou, S., Vidal, C., Maure, L., Moulin, L. Cleyet-Marel, J.C., Brunel, B. (2012) Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 35, 65-72.
- [24] Maynaud, G., Brunel, B., Mornico, D., Durot, M., Severac, D., Dubois, E. Navarro, E., Cleyet-Marel, J.C., Le Quéré, A. (2013) Genome-wide transcriptional responses of two metal-tolerant symbiotic *Mesorhizobium* isolates to zinc and cadmium exposure. *BMC Genomics.* 14, 292.
- [25] Maynaud, G., Brunel, B., Yashiro, E., Mergeay, M., Cleyet-Marel, J.C., Le Quéré, A. (2014) CadA of *Mesorhizobium metallidurans* isolated from a zinc-rich mining soil is a P(IB-2)-type ATPase involved in cadmium and zinc resistance. *Res. Microbiol.* 165, 175-189.
- [26] Mohamad R, G Maynaud, A Le Quéré, C Vidal, A Klonowska, E Yashiro, J-C Cleyet-Marel, B Brunel. 2017. Ancient heavy metal contamination in soils as a driver of tolerant *Anthyllis vulneraria* rhizobial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* Accepted manuscript posted online 28 October 2016 , doi:10.1128/AEM.01735-16
- [27] Meier-Kolthoff, J., Auch, A., Klenk, H., Göker, M. (2013) Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC bioinformatics* 14. 1.
- [28] Mesbah, M., Premachandran, U., Whitman, W. (1989) Precise measurement of the G-C content of deoxyribonucleic acid by high performance liquid chromatography. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 39, 159-167.
- [29] Nanni, L., Ferradini, N., Taffetani, F., Papa, R. (2004) Molecular phylogeny of *Anthyllis* spp. *Plant Biology.* 6, 454-464.
- [30] Ormeno-Orrillo, E., Martinez-Romero, E. (2013) Phenotypic tests in *Rhizobium* species description: an opinion and (a sympatric speciation) hypothesis. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 145-147.
- [31] Ormeno-Orrillo, E., Servin-Garciduenas, L.E., Rogel, M.A., Gonzalez, V., Peralta, H., Mora, J., Martinez-Romero, J., Martinez-Romero, E. (2015) Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the *Rhizobiaceae* family in light of genomics. *Syst. Appl. Microbiol* 38, 287-291.

- [32] Perez-Yepez, J., Armas-Capote, N., Velazquez, E., Perez-Galdona, R., Rivas, R., Leon-Barrios, M. (2014) Evaluation of seven housekeeping genes for multilocus sequence analysis of the genus *Mesorhizobium*: Resolving the taxonomic affiliation of the *Cicer canariense* rhizobia. *Syst. Appl. Microbiol* 37, 553-559.
- [33] Ribeiro, R.A., Rogel, M.A., Lopez-Lopez, A., Ormeno-Orrillo, E., Barcellos, F.G., Martinez, J. Thompson, F.L., Martinez-Romero, E., Mariangela, H. (2012) Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. *Int. J Syst. Evol. Microbiol* 62, 1179-1184.
- [34] Richter, M., Rossello-Mora, R. (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 19126-19131.
- [35] Rivas, R., Martens, M., de Lajudie, P., Willems, A. (2009) Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Syst. Appl. Microbiol.* 32, 101-110.
- [36] Rogel, M.A., Ormeno-Orrillo, E., Martinez Romero, E. (2011) Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 96-104.
- [37] Roma Neto, I.V., Ribeiro, R.A., Hungria, M. (2010) Genetic diversity of elite rhizobial strains of subtropical and tropical legumes based on the 16S rRNA and *glnII* genes. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1291-1302.
- [38] Soussou, S., Mahieu, S., Brunel, B., Escarré, J., Lebrun, M., Banni, M., Boussetta, M., Cleyet-Marel, J.C. (2013) Zinc accumulation patterns in four *Anthyllis vulneraria* subspecies supplemented with mineral nitrogen or grown in the presence of their symbiotic bacteria. *Plant Soil.* 371, 423-434.
- [39] Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729.
- [40] Turner, S.L., Young, J.P.W. (2000) The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Mol. Biol. Evol.* 17, 309-319.
- [41] Vallenet, D., Engelen, S., Mornico, D., Cruveiller, S., Fleury, L., Lajus, A., Rouy, Z., Roche, D., Salvignol, G., Scarpelli, C., Médigue, C. (2009) MicroScope: a platform for microbial genome annotation and comparative genomics. *Database (Oxford)*, 2009: bap021.
- [42] Vidal, C., Chantreuil, C., Berge, O., Maure, L., Escarre, J., Bena, G. Brunel, B., Cleyet-Marel, J.C. (2009) *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metalicolous soil in Languedoc, France. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 850-855.
- [43] Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P., Trüper, H.G. (1987) Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 37, 463-464.
- [44] Whitman, W.B. (2015) Genome sequences as the type material for taxonomic descriptions of prokaryotes. *Syst. Appl. Microbiol.* 38, 217-222.

- [45] Wieme, A., Cleenwerck, I., Van Landschoot, A., Vandamme, P. (2012) *Pediococcus lolii* DSM 19927^T and JCM 15055^T are strains of *Pediococcus acidilactici*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62, 3105-3108.
- [46] Willems, A., Doignon-Bourcier, F., Goris, J., Coopman, R., de Lajudie, P., De Vos, P., Gillis, M. (2001) DNA–DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 1315-1322.
- [47] William S, Feil H, Copeland A (2012) Bacterial genomic DNA isolation using CTAB. Available:
- [48] Zhu, Y., Lu, J., Chen, Y., Wang, S., Sui, X., Kang, L. (2015) *Mesorhizobium acaciae* sp. nov., isolated from root nodules of *Acacia melanoxyton* R. Br. in south China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65, 3558-3563.

Supplementary data:**Table III-2-S1:** Bacterial strains from *A. vulneraria* subsp. *carpatica* used in this study, growth characteristic in YEM medium and heavy metal-sensitivity.

Strain	Geographical origin (France)	Growth on solid YEM (days)*	MIC of Zn and Cd
STM4623	Periphery of Avinières mine, Gard	7	0.1 mM Zn- 0.1 mM Cd
STM5969	Periphery of Avinières mine, Gard	7	0.05 mM Zn- 0.05 mM Cd
STM4620	Periphery of Avinières mine, Gard	7	0.5 mM Zn- 0.1 mM Cd
STM5971	Periphery of Avinières mine, Gard	7	0.1 mM Zn- 0.1 mM Cd
STM6544	Periphery of Avinières mine	14	0.05 mM Zn- 0.02 mM Cd
STM4676	La Prunarède, Hérault	7	0.05 mM Zn- 0.02 mM Cd
STM4891	La Prunarède, Hérault	7	0.5 mM Zn- 0.1 mM Cd
STM4864	La Prunarède, Hérault	7	0.1 mM Zn- 0.02 mM Cd

*Colonies at 1-3 mm diameters.

Table II-2-S2: Nodulation and nitrogen fixation abilities (means \pm standard deviation) on *Anthyllis vulneraria* subsp. *carpatica* inoculated with *Mesorhizobium* type strains. Positive and negative controls (*Mesorhizobium metallidurans* STM2683^T, uninoculated and fertilized plants with 5 mM of nitrogen in the form of Ca (NO₃)₂). Different letters indicate significant differences at $p = 0.05$ (Duncan post hoc test).

Strain or treatment	Number of nodulated plants	Nodule number (per plant)	Dry nodule biomass (mg plant ⁻¹)	Dry root biomass (mg plant ⁻¹)	Dry shoot biomass (mg plant ⁻¹)	Chlorophyll content (SPAD units)
<i>M. delmotii</i> sp. nov. STM4623 ^T	10/10	42.7 \pm 21.6 a	3.6 \pm 1.61 bc	47.97 \pm 8.56 a	120.18 \pm 23.38 a	43.37 \pm 7.03 b
<i>M. prunaredense</i> sp. nov. STM4891 ^T	10/10	31.7 \pm 16.3 a	7.71 \pm 3.74 a	54.88 \pm 67.63 a	113.27 \pm 17.66 a	48.01 \pm 5.64 ab
<i>M. metallidurans</i> STM2683 ^T	6/10	35.7 \pm 38.9 ab	5.32 \pm 5.86 ab	73.72 \pm 23.25 a	142.97 \pm 40.87 a	50.42 \pm 4.69 a
Nitrogen control	0/8	0	0	59.71 \pm 41.89 a	182.76 \pm 114.32 a	55.5 \pm 5.00 a
Uninoculated control	0/10	0	0	51.4 \pm 10.18 a	115.23 \pm 15.85 a	43.94 \pm 4.36 b

Fig. III-2-S1(B) *recA*

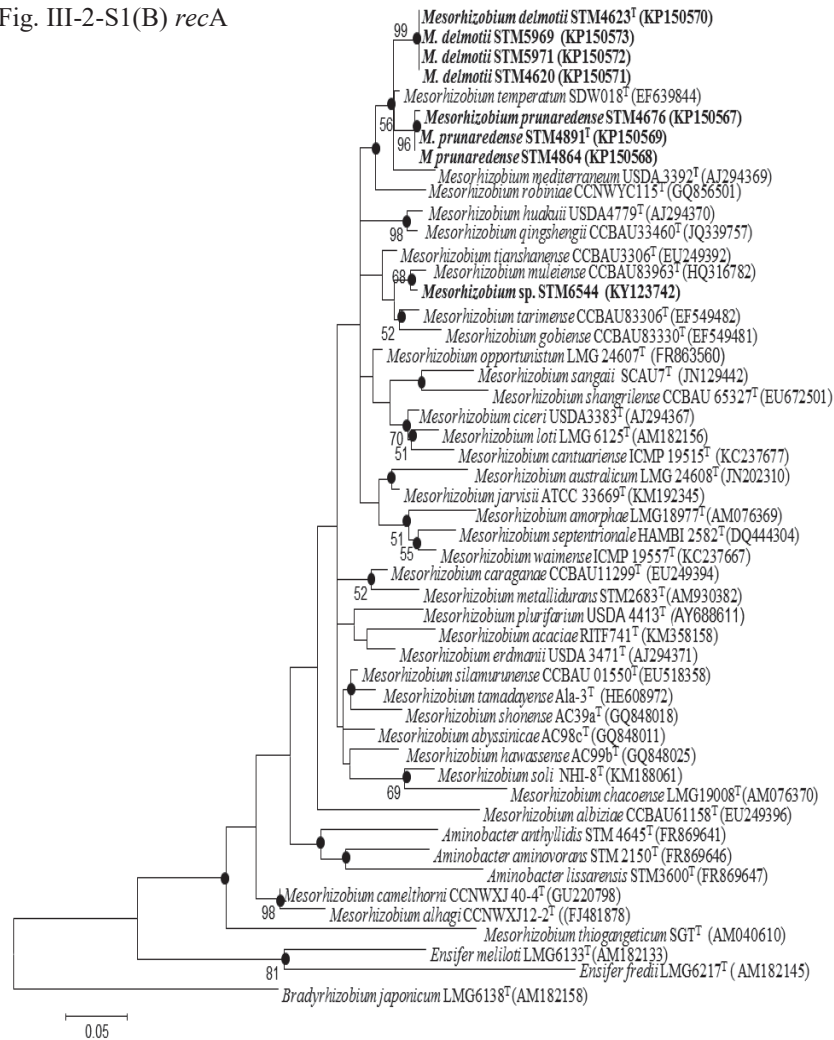


Fig. III-2-S1(B) *atpD*

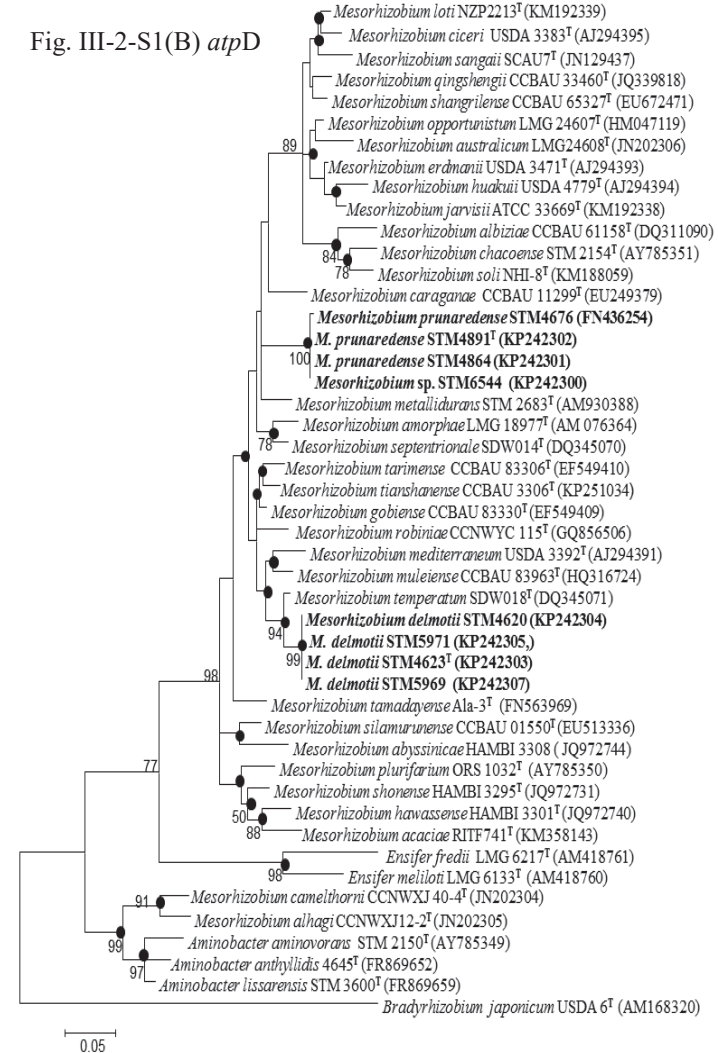


Fig. III-2-S1(C) *dnaK*

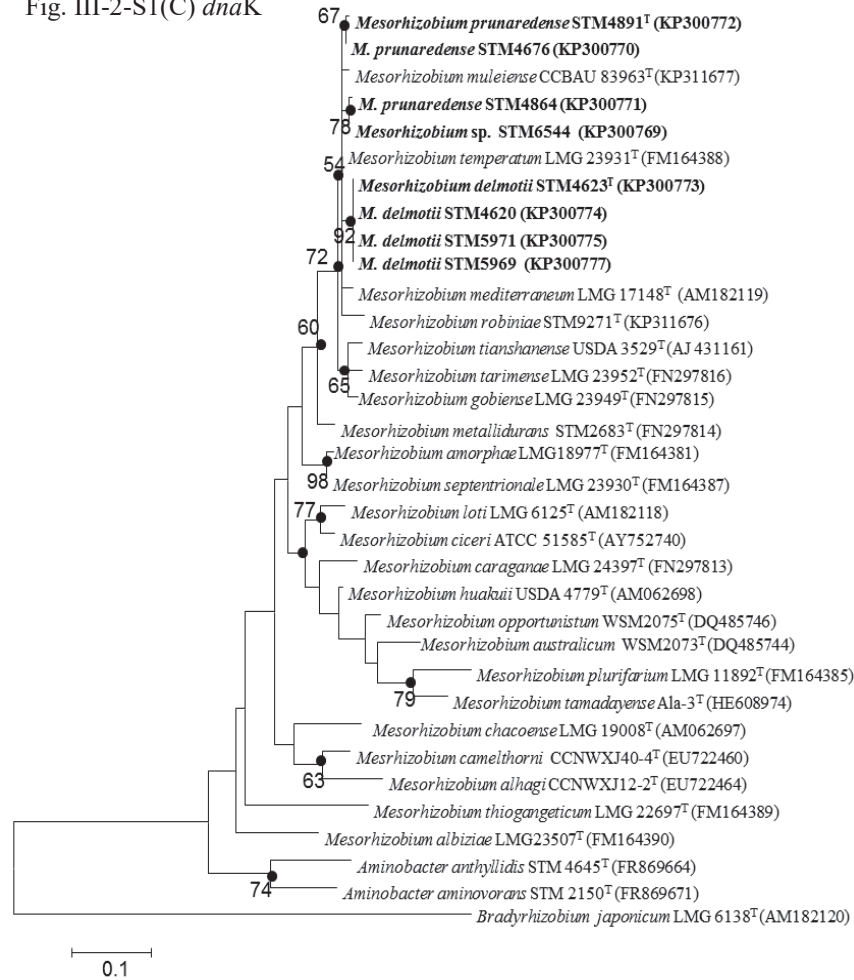


Fig. III-2-S1(D) *glnII*

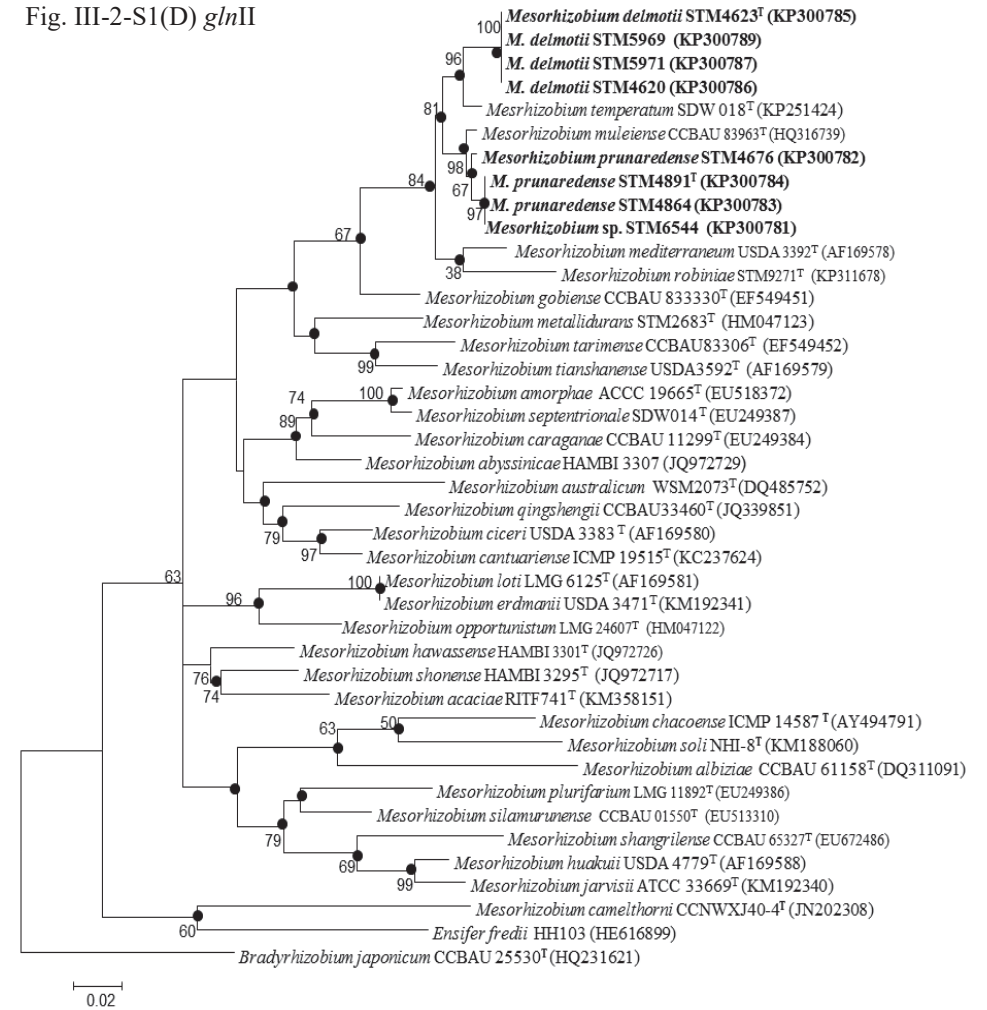


Fig. III-2-S1: Maximum-likelihood phylogenetic trees of partial gene sequences of *recA* (291 nt) (A), *atpD* (375 nt) (B), *dnaK* (252 nt) (C) and *glnII* (504 nt) (D) of all strains used in this study and the type strains of *Mesorhizobium* species. Trees were constructed using the best model T92+G+I (*recA*, *atpD*), T92+G (*dnaK*) or GTR+G+I (*glnII*). Genbank accession numbers are given in front of the strain numbers. Bootstrap values (based on 1000 replications) higher than 50% are shown at the branching points. Bar indicates 10% sequence divergence. Filled circles were used to indicate identical nodes generated by maximum-likelihood and neighbor-joining methods.

III-3- Deuxième papier taxonomie à soumettre dans *Systematic and Applied Microbiology*:

***Mesorhizobium faucesventi* sp. nov. and *Mesorhizobium escarrei* sp. nov. are two novel species isolated from *Anthyllis vulneraria* root nodules in south of France**

Roba Mohamad^a, Anne Willems^b, Antoine Le Quéré^a, Marjorie Prevent^a, Géraldine Maynaud^a, Maurine Bonabaud^c, Emeric Dubois^c, Jean-Claude Cleyet-Marel^a, Brigitte Brunel^a

^a *Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, CIRAD, INRA, IRD, /Montpellier SupAgro, Université de Montpellier, TA A-82/J, 34398 Montpellier, France*

^b *Laboratory of Microbiology, Dept. Biochemistry and Microbiology, Ghent University, Ghent, Belgium*

^c *Montpellier GenomiX, Montpellier, 141 rue de la Cardonille, 34 094 Montpellier Cedex, France.*

* Corresponding authors at: *Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, Campus international de Baillarguet, TA A-82/J, 34398 Montpellier, France*

□ Accession numbers : Sequences of the different partial genes were deposited in GenBank under the following accession numbers: from KU508773 to KU508778, KP150564 to KP150564, KJ511006, KP942498 for *recA* gene; from KP242297 to KP242299, KP242306, KU508779 to KU508783 for *atpD* gene; from KU508784 to Ku242789, from KP242308 to KP242309, KU555366 for 16S rRNA sequences; from KP300766 to KP300768, KP300776, from KU555367 to KU555372 for *dnaK* sequences; from KP300778 to KP300780, KP300788, from KU555373 to KU555378 for *glnII* sequences. Accession numbers of nodulation genes of type strains are *nodA1* (KU984257) *nodA2* (KU984261) and *nodC* (KU984253) for STM4922^T; *nodA1* (KU984258) *nodA2* (KU984262) and *nodC* (KU984254) for STM5069^T.

Abstract

Ten mesorhizobial strains isolated from root-nodules of *Anthyllis vulneraria* by trapping using soils from the Cevennes region in southern France were studied to resolve their taxonomy. Their 16S rDNA sequences were identical and indicated that they belonged to the genus *Mesorhizobium* with as closest defined species *M. robiniae* CCNWYC115^T. Their evolutionary relationships with defined species were further characterized by multilocus sequence analysis (MLSA) using 4 housekeeping genes (*recA*, *atpD*, *glnII* and *dnaK*), revealing two main groups, and suggest that they belong to two distinct species. These results were well-supported by MALDI-TOF analyses, DNA-DNA hybridization (<56.9%), and genome based species delineation methods confirming their affiliation to two novel proposed species. *Mesorhizobium faucesventi* (STM4922^T=LMG 29643^T =CFBP 8438^T) and *Mesorhizobium escarrei* (type strain STM5069^T =LMG 19642^T =CFBP 8439^T) are proposed as names for these two novel species. The nodulation gene sequences of *nodC* and *nodA* of these type strains were closely related to symbiovar anthyllidis and shared more than 99.5% of identity with those of *Mesorhizobium metallidurans* STM2683^T that was also recovered from the same legume species.

Keywords: *Mesorhizobium*, MLSA, MALDI-TOF, ANI, *DDH in silico*, *Anthyllis*, root nodule

Introduction

Leguminous plants provide a wide range of agronomic and ecological services. While grain legumes are important resources for the alimentation of humans and animals, thanks to their rich protein, mineral element and vitamin content, symbiotic legumes can naturally improve soil fertility upon association with nitrogen fixing bacteria commonly named rhizobia with whom they develop nodules on their roots or stems [15, 4, 19, 20]. Rhizobia are gram-negative bacteria belonging mainly to the *Rhizobiaceae* family of Alpha-proteobacteria [12] and have been classified in the 8 genera *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Neorhizobium* and *Pararhizobium* [5, 22, 27, 26]. However, their diversity is expanding as rhizobial strains have been classified within others genera of Alpha-proteobacteria, such as *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Aminobacter*, *Microvirga*, *Shinella* and *Phyllobacterium*, or from the Beta-proteobacteiral genera *Burkholderia*, *Cupriavidus* and *Ralstonia* [1, 2, 23, 9].

The genus *Mesorhizobium* was firstly described by Jarvis and colleagues [13] who showed that members of this taxon had an intermediate phylogenetic position between *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* genera. The genus *Mesorhizobium* has since then greatly expanded and contains, at the time of writing, 43 species, 41 of which being symbiotic species and commonly named mesorhizobia. The majority of species within this genus present a narrow host range as they often form nitrogen-fixing nodules on a limited range of legume plants [17] and species specific symbiovars, related to their host plant have been defined [33, 18]. *Anthyllis vulneraria* belongs to the

Fabaceae family. This species is able to establish a symbiotic relationship with rhizobia and contains 30 subspecies, such as *vulneraria*, *praepropera* or *carpatica*. *A. vulneraria* subsp *carpatica* presents a particular ecological interest for the phytostabilization of ancient mining sites. This metallicolous ecotype could be considered as a facilitator species for the restoration of a plant cover in metal contaminated soil deficient in nitrogen notably through its association with the symbiotic bacterium *Mesorhizobium metallidurans* [10, 37]. Recently, the diversity of strains associated to *A. vulneraria* subsp *carpatica* isolated from soils with different heavy metal levels was studied demonstrating their affiliation, principally, to the *Mesorhizobium* genus, however, their diversity was highly affected by heavy metal levels of the soils (Mohamad et al., under review). In this later study, *M. metallidurans*, previously recovered from highly metal contaminated soils [37] confirmed its particular adaptation to such environment. By contrast, others species of *Mesorhizobium* were recovered from *A. vulneraria* nodules when moderately and uncontaminated soils were used for trapping. Two species *Mesorhizobium delmotii* and *Mesorhizobium prunaredense* were recently characterized as novel species associated to *A. vulneraria* isolated from moderately and uncontaminated sites, respectively (Mohamad et al., submitted). The diversity study from Mohamad and colleagues (under review) clearly suggested a greater diversity among *Anthyllis* mesorhizobia in uncontaminated soils and we want here to further investigate the spectrum of rhizobia which can develop the symbiosis with this plant species. In the present study, the taxonomic position of ten mesorhizobial symbionts of *A. vulneraria* isolated from another uncontaminated site (named Col du Vent) which is close to La Prunarède site, where *M. prunaredense* was isolated, are presented.

Material and methods

Bacterial strains and growth conditions:

Ten strains (STM4922, STM4925, STM4912, STM4921, STM4926, STM4919, STM5069, STM4923, STM4929 and STM5072) trapped by *Anthyllis vulneraria* were obtained as part of an earlier study (Mohamad et al., under review). They originated from soil samples collected at the Col du Vent site in Cevennes (Hérault department), south of France, 51 kms West of Montpellier (France). All strains were cultured in yeast extract mannitol (YEM) medium [23] at 28°C for 5-6 days and kept in 20% (v/v) glycerol at -80 °C.

DNA extraction, sequencing and phylogenetic analyses

Genomic DNA was isolated from rhizobial cells grown in YEM broth using a phenol-chloroform procedure [3]. 16S rDNA and housekeeping genes (*recA*, *atpD* and *dnaK*) were partially sequenced by

PCR-amplification as described in [23], *glnII* gene internal fragments were PCR-amplified as previously described [34]. PCR products were run on 1% agarose gels, the corresponding bands were purified with QIAGEN and then sequenced by GenoScreen Company (France). Chromatograms were checked using the FinchTV software (v.1.4). The sequences obtained were aligned with reference sequences and phylogenetic trees were inferred as described previously (Mohamad *et al.*, submitted).

Biochemical characterization

Phenotypic features of the strains studied were determined using API20NE and API50CH (BioMerieux), PM1 Microplate (AES Chemunex) and antibiotic disks (Biorad, France) for testing their susceptibility to 15 antibiotics as previously described [23]. Their tolerance to NaCl (1, 2, 3, 4 and 5% W/V), to various pH (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 and 12), and to high temperatures (37°C and 42°C) were estimated based on their growth capacity in YEM liquid media as described previously [23]. Briefly, their growth was determined by measuring the optical density at 600 nm after culture incubation for 2 weeks at 28°C with shaking at 350 rpm.

MALDI-TOF MS sample analysis, G+C content and DNA-DNA hybridization

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) on selected strains was performed as described previously [38]. All conditions were exactly as previously described except that YEM agar growth medium was used to culture the strains prior to protein extraction [38]. According to MALDI-TOF results, two representative strains were chosen to be analyzed by DNA-DNA hybridization with type strains of reference species *M. delmotii*, *M. prunaredense*, *M. robiniae*, *M. temperatum*, *M. mediterraneum* and *M. muleiense*. According to MALDI-TOF results, two representative strains were chosen to be analyzed by DNA-DNA hybridization with type strains of reference species of *M. delmotii*, *M. prunaredense*, *M. robiniae*, *M. temperatum*, *M. mediterraneum* and *M. muleiense*. The G+C content was determined by HPLC [25]. DNA-DNA hybridizations were carried out by a fluorometric method using photobiotin-labelled DNA probes as described [39]. Hybridizations were performed at 45°C in 2X SSC in the presence of 50% formamide.

Draft genome sequencing and assembly

For draft genome sequencing, type strains were grown in 250 ml of broth Yeast-mannitol medium and DNA isolation was performed using a CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) bacterial genomic DNA isolation method as described previously [40]. DNA quality was evaluated on a Nanodrop spectrometer. The draft genomes were produced using Illumina Hiseq technology (Nextera XT kit) at Montpellier Genomix facility (MGX), with 125 bp paired-end sequencing (one lane par sample) on about 400 bp fragments. Sequences were assembled on CLC Genomic workbench v5 as described in [8]. Draft genome sequences were integrated into the MicroScope facility [36] for automated

annotation and are accessible through the web interface (<https://ww.genoscope.cns.fr/agc/microscope/mage/viewer.php>)

Average Nucleotide Identity (ANI) & in silico DNA-DNA Hybridization (DDH)

The Average Nucleotide Identity (ANI) [11, 31] and *in silico* based DNA-DNA Hybridization (DDH) estimates [24] between draft genomes of the two type strains presented here as well as other strains of *Anthyllis mesorhizobia* (STM4623, isolated from Avinières 2 site, STM4891^T isolated from La Prunarède and STM4661 isolated from the Eylie mine or defined Mesorhizobial species for which genomes have been released previously (*M. amorphae*, *M. australicum*, *M. huakuii*, *M. ciceri*, *M. huakuii*, *M. metallidurans*, *M. opportunistum*, *M. plurifarum*, *M. alhagi*, *M. erdmanii* and *M. loti*) were calculated. accessions and general genome characteristics are listed in Table III-3-S1. The alignment options used for the ANI calculation were 70% minimal identity over more than 700 bp in fragment windows of 1000 bp with a 200 bp step size on reciprocal best hits (two-way ANI). For the DDH measurement, we used the Genome to Genome Distance Calculator (GGDC) with the BLAST+ alignment method and the recommended formula (identities / High-scoring Segment Pair lengths). The probability that DDH > 70% was estimated as described by [24].

Nodulation tests

Strains were verified for their infectiveness on *A. vulneraria* subsp. *carpatica* seeds. Axenically pre-germinated seeds were transplanted to autoclaved tubes (10 replicates) containing attapulgitite and N-free nutrient solution, and were inoculated as described previously [23]. Un-inoculated and fertilized seedlings with 5 mM of nitrogen (Ca(NO₃)₂) were used as controls. *M. metallidurans* STM2683^T was used as positive control for nodulation on *Anthyllis*. Root nodules and plants were harvested after 7 weeks and data were analyzed as described previously (Mohamad et al., submitted).

Results

Soil characteristics and strains studied

Soil samples from Col du Vent used in this study contain 3 g.kg⁻¹ of total limestone, 38 g.kg⁻¹ of clay, 898 g.kg⁻¹ of sand. Heavy metal concentrations were 15 mg.kg⁻¹ of Zn, 46 mg.kg⁻¹ of Pb, 1.3 mg.kg⁻¹ of Cd. In addition, the soil contained 15 g.kg⁻¹ and 1.7 g.kg⁻¹ of organic carbon and total nitrogen respectively, and Cation Exchange Capacity (CEC) was 6.8 cmol⁺ Kg⁻¹. Ten strains were isolated from root nodules of *A. vulneraria* by trapping with the soil of Col du Vent. These strains were all capable of developing nodules upon inoculation. Colonies of 1-3 mm appeared after 8-10 days of incubation (28°C) on YEM agar medium.

Phylogenetic analysis

The ten strains included in this study showed 100% similarity over 1268 nt of their 16S rDNA sequences. Their 16S rDNA sequence shared 99.9% similarity with the type strain of *M. robiniae* CCNWYC115^T (one nucleotide of difference) and 99.8% with the type strains of *M. muleiense* CCBAU83963^T, *M. temperatum* SDW018^T and *M. mediterraneum* STM104^T (two nucleotides of difference) (Fig. III-3-1).

In contrast to the 16S rDNA tree, the phylogenetic tree based on four housekeeping genes (*atpD*, *dnaK*, *glnII* and *recA*) which corresponded to 1468 nt of concatenated sequences splitted the 10 isolates in two well-supported groups (100% bootstrap). The first group contained STM4922, STM4925, STM4912, STM4921, STM4926 and STM4919 while the second group grouped together STM5069, STM4923, STM4929 and STM5072. Using the concatenated sequences, the isolates under study showed the greatest similarity to *M. muleiense* CCBAU83963^T (with 99% bootstrap) with which they shared 98% and 98.3% of sequence similarities for the first and the second group respectively while the similarity between these two groups was 98.2% (Fig. III-3-2).

Phylogenetic trees obtained from single housekeeping gene sequences (*recA*, *atpD*, *dnaK* and *glnII*) are provided as supplementary data (Fig. III-3-S1). The percentage similarity between the two groups were 97.6% on 292 nt of *recA* sequences, about 98.8% on 358 nt of *atpD* sequences, 99.2% on 253 nt of *dnaK* sequences and 97.3% on 446 nt of *glnII* sequences. The two groups shared the same genetic distance with *M. muleiense* CCBAU83963^T (97.5%) on the *glnII* gene, 98.4% with *M. muleiense* CCBAU83963^T and *M. temperatum* SDW018^T on *dnaK* sequences. The second group containing (STM5069, STM4923, STM4929, STM5072) was closely related to *M. abyssinicae* AC98c^T (97.3%) on *recA* gene sequences (Fig. III-3-S1).

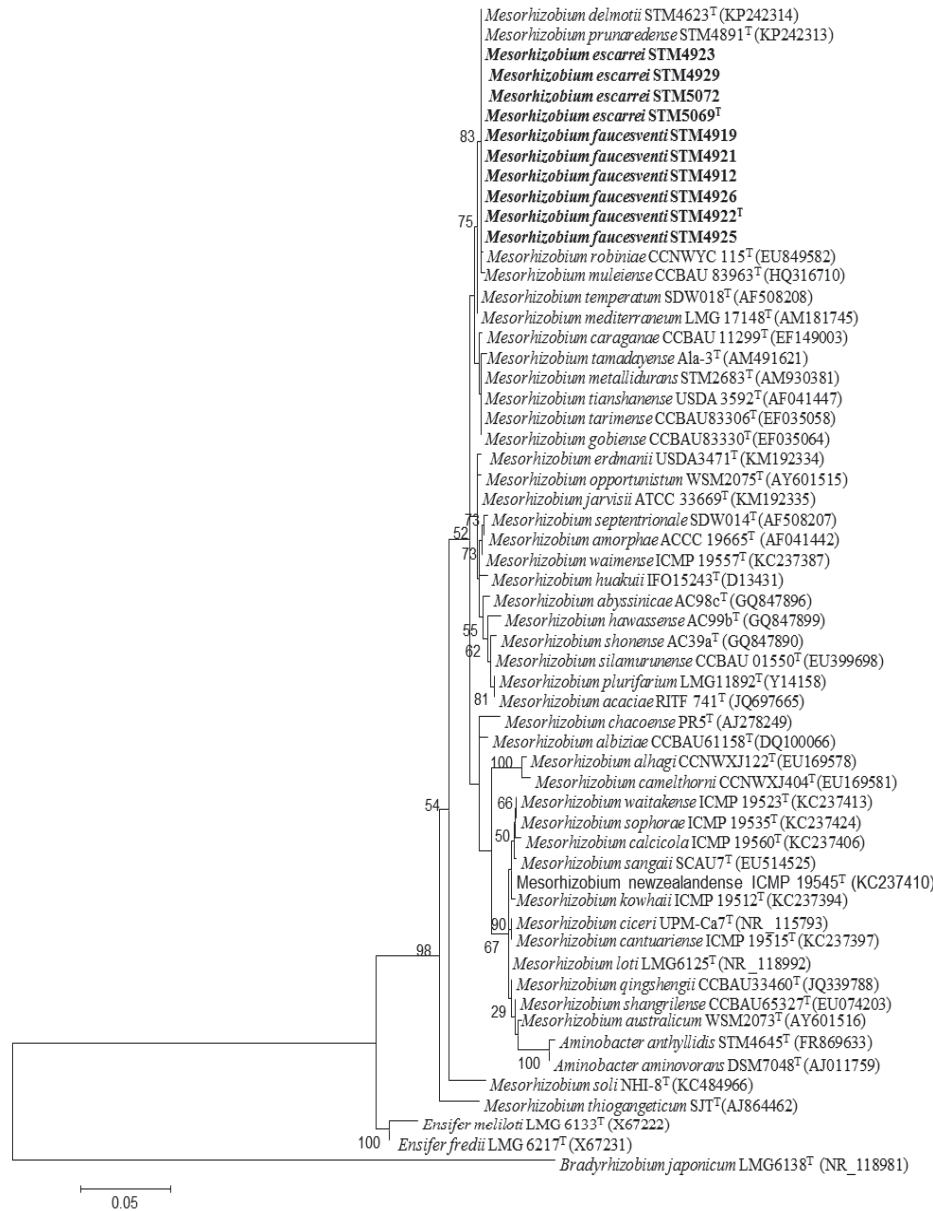


Fig. III-3-1: Maximum-likelihood phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of all strains used in this study and the type strains of *Mesorhizobium* species. The analysis was based on 1216 nt. The tree was constructed using the best model K2+G+I Genbank accession numbers are given the strain numbers and the significance of each branch is indicated by the bootstrap value calculated for 1000 subsets (above 50%) at the major branch-points. The scale bar represents the number of nucleotides substitutions per 100 nucleotides. New *Anthyllis vulneraria* nodules isolates are indicated in bold.

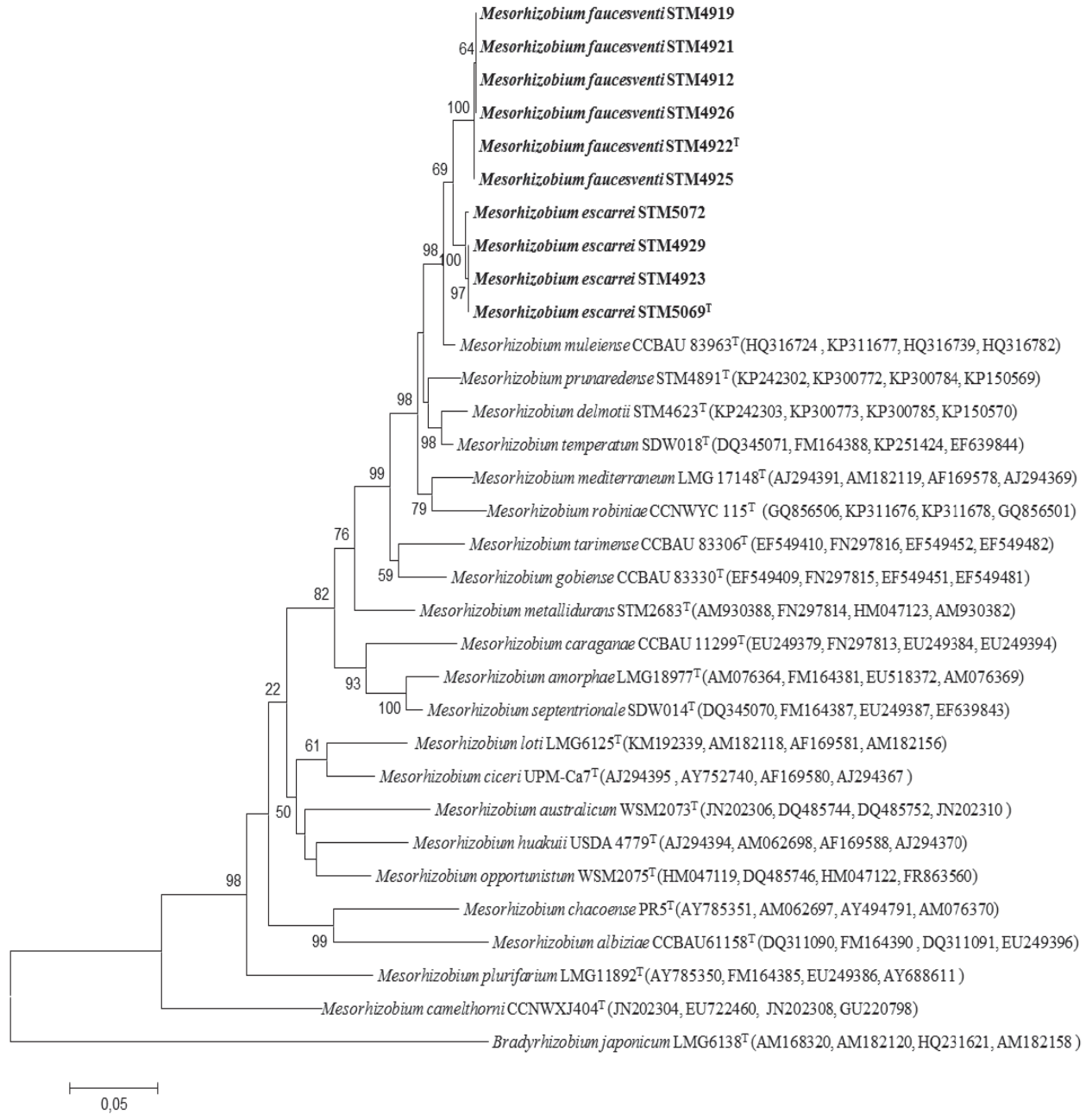


Fig. III-3-2: Maximum-likelihood phylogenetic tree based on *atpD* (375 nt), *dnaK* (252 nt), *glnII* (504 nt) and *recA* (357 nt) gene sequences, of all strains used in this study and the type strains of *Mesorhizobium* species. The tree was constructed using the best model GTR+G+I. Genbank accession numbers are given the strain numbers and the significance of each branch is indicated by the bootstrap value calculated for 1000 subsets (above 50%) at the major branch-points. The scale bar represents the number of nucleotides substitutions per 100 nucleotides. New *Anthyllis vulneraria* nodules isolates are indicated in bold.

MALDI-TOF, DNA-DNA hybridization and GC%

To test for the reliability of results obtained by MLSA, we used MALDI-TOF MS which is based on protein diversity. Using this approach, the new strains were divided into two groups, and corroborated MLSA analyses. Less than 50% similarity was found between the two groups. These were also different from reference species *M. temperatum*, *M. muleiense*, *M. delmotii*, *M. prunaredense*, *M. robiniae* and *M. mediterraneum* proposing the affiliation of the two groups to two new species (Fig. III-3-3).

To further strengthen this affiliation to two different and novel species, one representative strain from each group was tested in DNA-DNA hybridization assays which included the closest type strains of reference species *M. muleiense*, *M. temperatum*, *M. mediterraneum*, *M. robiniae*, *M. delmotii* and *M. prunaredense*. The percent of DNA-DNA hybridization was estimated to 45.4% between the two representative strains and varied from 32.2 to 50.7% when reference strains were tested and their G+C content were very close and ranged from 62.1 to 62.6% (Table III-3-1). These results confirmed the affiliation of our isolates to two novel species.

Table III-3-1: The percentage of GC and DNA-DNA hybridization values between five *Mesorhizobium* strains isolated from *A. vulneraria* and *M. robiniae* CCNWYC115^T, *M. temperatum* SDW018^T, *M. muleiense* CCBAU83963^T, *M. mediterraneum* STM104^T.

Souches	%GC	STM	STM	STM	STM	STM	STM	STM9271T	STM	STM
		4922T	5069T	4623T	4891T	6544T	104T		9272T	9273T
STM	62.4	100								
4922T										
STM	62.1	45,4	100							
5069T										
STM	62.1	50.7	42.6	100						
4623T										
STM	62.4	58	40.2	48,3	100					
4891T										
STM	62.1	56,9	40,9	43,9	46,4	100				
6544T										
STM	62.3	41	38,2	48,1	40,6	39,3	100			
104T										
STM	62.1	44,7	33	45,2	39	40,6		100		
9271T										
STM	62.6	39	32,2	38,9	41,3	40,2			100	
9272T										
STM	62.2	39,7	35,6	44,3	43,9	36,8				100
9273T										

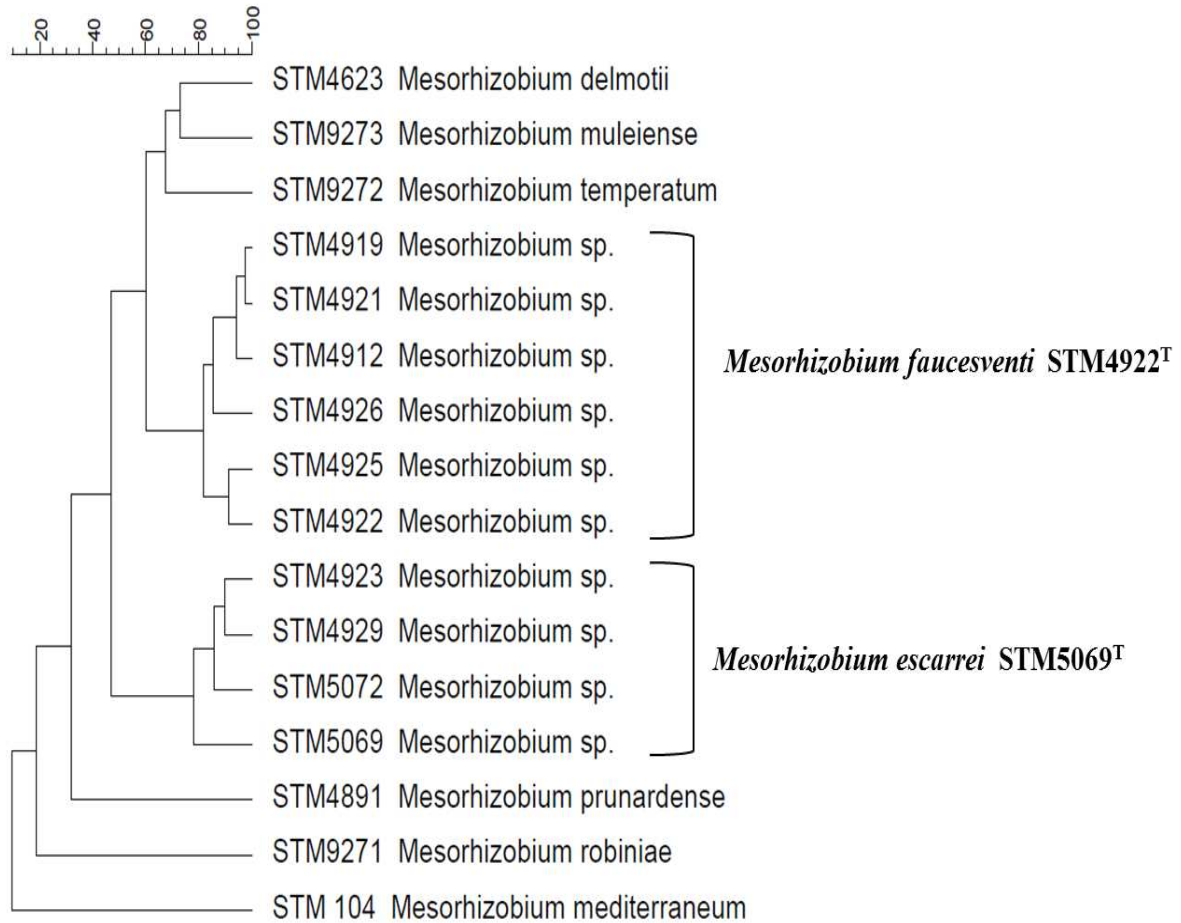


Fig. III-3-3: Dendrogram based on the protein mass fingerprint patterns analyzed by Time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for strains studied and reference type strains of *Mesorhizobium*. strains included in this study are indicated in bold.

Biochemical characteristics and phenotypic analysis

The ten mesorhizobial strains (STM4922, STM4919, STM4921, STM4912, STM4926, STM4925, STM5069, STM4929, STM5072 and STM4923) and reference strains of (*M. mediterraneum* STM104^T, *M. robiniae* STM9271^T, *M. temperatum* STM9272^T, *M. muleiense* 9273^T) were examined for 164 phenotypic characteristics (Table III-3-S2). All strains and reference strains were capable to utilize L-lyxose while they were not able to assimilate L-Arabinose which contrasts with reference strains. Regarding antibiotic characteristics, all strains were resistant to chloramphenicol and erythromycin. No discriminative phenotypic characteristic could be detected between the two proposed species (Tables III-3-S2 & III-3-S3). All the strains tested grew at 28°C, most strains grew at 37°C (with the exception of STM4923, STM4929 and STM4919) and no growth was observed at 42°C.

ANI & DDH calculations

Draft genomes of type strains were produced in order to consolidate the affiliation of *Mesorhizobium* sp1 (Col du Vent) STM4922^T and *Mesorhizobium* sp2 (Col du Vent) STM5069^T to two different species. Surprisingly, when using draft genomes from these two strains, the ANI value returned 95.70 % which would suggest that they belong to the same species. Conversely, *in silico* DDH indicated 64.2 % of genome relatedness. These results show conflicting results as current thresholds are set to ANI above 95% and DDH above 70% for intraspecies genome based comparisons (Table III-3-2). These strains were also compared with reference genomes of *Mesorhizobium* type strains, available in the database. Both STM4922^T and STM5069^T presented similar percentages of ANI or DDH with references genomes, ranging from 80.67 to 94.88% for ANI values and from 22.70 to 59.20% for DDH calculations (Table III-3-2).

Table III-3-2: Average Nucleotide Identity (ANI) and DNA-DNA Hybridization *in silico* (DDH) between studies strains and reference strains.

Strain	ANI		DDH	
	STM4922 ^T	STM5069 ^T	STM4922 ^T	STM5069 ^T
<i>Mesorhizobium</i> sp. nov STM4922 ^T	100	95.70 ± 2.7	100	64.20 ± 2.88
<i>Mesorhizobium</i> sp nov. STM5069 ^T	95.70 ± 2.7	100	64.20 ± 2.88	100
<i>M. delmotii</i> STM4623 ^T	93.37 ± 3.14	93.30 ± 3.22	52.00 ± 2.67	51.70 ± 2.66
<i>M. prunaredense</i> STM4891 ^T	94.88 ± 2.9	94.77 ± 2.86	59.20 ± 2.80	58.50 ± 2.78
<i>M. amorphae</i> CCNWGS0123 ^T	85.00 ± 4.23	85.09 ± 4.17	29.20 ± 2.44	29.50 ± 2.44
<i>M. australicum</i> WSM2073 ^T	83.64 ± 4.06	83.50 ± 4.05	26.90 ± 2.42	26.90 ± 2.42
<i>M. ciceri</i> WSM1271	84.20 ± 3.99	84.17 ± 4.02	27.80 ± 2.43	27.70 ± 2.43
<i>M. huakuii</i> 7653R	83.93 ± 4.22	84.06 ± 4.17	27.40 ± 2.43	27.70 ± 2.43
<i>M. huakuii</i> MAFF303099	84.17 ± 4.58	84.25 ± 4.52	27.60 ± 2.43	27.70 ± 2.43
<i>M. metallidurans</i> STM2683 ^T	87.72 ± 4.87	87.72 ± 4.94	33.70 ± 2.47	33.90 ± 2.47
<i>M. opportunistum</i> WSM2075 ^T	84.15 ± 4.11	84.13 ± 4.07	27.70 ± 2.43	27.80 ± 2.43
<i>M. plurifarum</i> ORS 1032 ^T	82.781 ± 4.15	82.79 ± 4.09	25.60 ± 2.41	25.60 ± 2.41
<i>M. alhagi</i> CCNWX J12-2 ^T	80.67 ± 4.95	80.75 ± 5.05	22.70 ± 2.37	23.00 ± 2.37
<i>M. loti</i> R7A	84.13 ± 4.3	84.17 ± 4.32	27.60 ± 2.45	27.70 ± 2.4
<i>M. erdmanii</i> USDA 3471 ^T	83.86 ± 3.96	83.71 ± 3.91	27.20 ± 2.55	27.50 ± 2.4
<i>Mesorhizobium</i> sp. STM4661	86.97 ± 3.87	86.95 ± 3.89	32.70 ± 2.5	32.90 ± 2.45

Nodulation properties

The type strains of the two novel proposed species STM4922^T and STM5069^T were able to nodulate their original host (*A. vulneraria* subsp *carpatica*). No significant differences (p value=0.05) were observed on the nodule number or biomasses between STM4922^T, STM5069^T and positive control STM2683^T (Table III-3-3). These type strains harbor two copies of the *nodA* gene symbiovar anthyllidis, as described for *M. metallidurans* STM2683^T [23] with 78.7 and 78.5% similarities between the two copies in STM4922^T and STM5069^T, respectively. The first copy of the *nodA* gene was 99.8% and 100% similar to that of *M. metallidurans* STM2683^T for STM4922^T and STM5069^T respectively, while the second copy of *nodA* gene of STM4922^T and STM5069^T were identical with that of *M. metallidurans* STM2683^T. Finally, the partial *nodC* gene sequences were identical between the two type strains and at 99.9% similar with *nodC* partial gene sequence of *M. metallidurans* STM2683^T (Fig. III-3-S2).

Table III-3-3: Nodulation abilities (means \pm standard deviation) on *A. vulneraria* subsp *carpatica* inoculated with *Mesorhizobium* types strains. Positive and negative control (*M. metallidurans* STM2683^T, uninoculated and fertilized plants with 5mM of Ca(NO₃)₂).

Strain or treatment	Number of plant nodulated	Nodule number (per plant)	Dry nodule biomass (mg/plant)	Dry root biomass (mg)	Dry shoot biomass (mg)	Chlorophyll content (SPAD units)
STM4922	9/10	69,3 \pm 28 a	5,63 \pm 2,59 a	48,37 \pm 8,09 a	114,43 \pm 16,71 a	43,14 \pm 3,38 b
STM5069	10/10	39,7 \pm 26,3 ab	4,33 \pm 2,66 a	51,28 \pm 10,22 a	112,88 \pm 25,99 a	41,38 \pm 3,83 b
<i>M. metallidurans</i> STM2683 ^T	6/10	35,7 \pm 38,9 bc	5,32 \pm 5,86 a	73,72 \pm 23,25 a	142,97 \pm 40,87 a	50,42 \pm 4,69 a
Nitrogen control	0/8	0	0	59.71 \pm 41.89 a	182.76 \pm 114.32 a	55.5 \pm 5 a
Uninoculated control	0/10	0	0	51.4 \pm 10.18 a	115.23 \pm 15.85 a	43.94 \pm 4.36 b

Discussion

Two novel proposal species were isolated from root nodules of *Anthyllis vulneraria* using uncontaminated soils collected at the Col du Vent site. This increases the number of rhizobial species isolated from *A. vulneraria* to six; *M. metallidurans* [37], *Aminobacter anthyllidis* [23], *Mesorhizobium delmotii*, *Mesorhizobium prunaredense* (Mohamad et al., submitted), *Mesorhizobium faucesventi* STM4922^T and *Mesorhizobium escarrei* STM5069^T in the present study. Our isolates representing two novel proposed species belong to the genus *Mesorhizobium* and were isolated from the same geographic site which further demonstrates the wide range of mesorhizobia *A. vulneraria* can associate with. Several studies have reported the discovery of novel mesorhizobial species from a single plant species at a single site. For example, *Mesorhizobium calcicola* and *M. waimense* that nodulate *Sophora longicarinata* were isolated from the same site “alluvial limestone river terrace, Waima/Ure River, Marlborough” in New Zealand where *Mesorhizobium cantuariense* and *M. kowhahi* were also recovered but from nodules of another species of *Sophora* (*S. micropylla*) [7, 6, 35]. The present study further expand the diversity of species found within the *Mesorhizobium* genus that appears particularly wide as shown by the increasing number of species identified during the last decade. Furthermore, given the high diversity of species that can develop the symbiosis with a single plant species at a single site, many more are expected to be discovered.

In the present study, the ten strains studied shared the same 16S rDNA gene sequences which were also identical to that of *Mesorhizobium delmotii* or *Mesorhizobium prunaredense*. Two groups were however phylogenetically distinguished using concatenated partial sequences from four housekeeping genes (*recA*, *atpD*, *dnaK* and *glnII*). Phylogenetic trees of individual genes were not congruent, as shown for the *recA* and *atpD* phylogenies which support a MLSA based approach to refine the taxonomic positioning among strains and species within the *Mesorhizobium* genus [32]. Being recovered from an uncontaminated site, these two novel species were sensitive to Zn (MIC = 0.02-0.5 mM) and to Cd (MIC = 0.02-0.1mM) (Mohamad et al., under review), despite their association with the metallicolous *A. vulneraria* subspecies *carpatica* which shows that this plant species is permissive toward a broad spectrum of rhizobia. Interestingly, the *cadA* marker gene, coding for a P_{IB}-type ATPase involved in Zn and Cd transport in *M. metallidurans* STM2683^T, was not detected in the ten strains studied by PCR amplification. The genome sequences of type strains STM4922^T and STM5069^T confirmed the absence of this marker gene and corroborates with their metal sensitivity.

The percentages of G+C calculated using genome sequences were slightly different from those calculated using DDH relatedness. These correspond to 61.8% for STM4922^T and 61.7% for STM5069^T according to genome sequences while the GC% values were 62.4 and 62.1% for STM4922^T and STM5069^T using experimental DDH relatedness. The accuracy of genome based approaches to delineate bacterial species will most probably become the norm in rhizobial taxonomy.

Ormeno-Orillo and colleagues [29] and our results demonstrate that laborious and tedious wet lab experiments provide approximations. Nevertheless, such laborious methods may be required to confirm the actual taxonomical positioning of uncharacterized microorganisms. Indeed, the ANI value (95.70%) obtained when comparing the two proposed type strains was not discriminative in contrast to wet lab based DDH. This result contrasts with previous report [29] who proposed using ANI values as an essential standard in rhizobial taxonomy. However, this threshold of 95% ANI may be adjusted depending on the genus studied as shown in a large study performed on 6787 genomes [14] that showed some variations in this threshold for interspecies delineation and which indicated that this ANI threshold may vary from 95 to 96%. Using another genome wide approach, an *in silico* DDH between the two strains,

we found however, that these two genomes presented 64.2% relatedness which is under the threshold of 70% set for intraspecies comparisons. The use of several methods for genome based species delineation may be required for closely related species such as those reported here which may still need wet lab experiments to be clarified. MALDI-TOF MS analyzes confirmed the MLSA results and further support this approach as an alternative solution from DDH relatedness for the identification of new species [21] (Mohamad et al submitted).

Overall, based on the wet DNA-DNA hybridization results, MALDI TOF MS and genome based ANI and DDH estimations, we show that the two sequenced strains representing 4 or 6 isolates belong to novel and distinct species that are closely related. This demonstrates that a large number of *Mesorhizobium* genospecies are able to associate to *A. vulneraria*. Such broad spectrum of mesorhizobia the plant can develop the symbiosis with has been found for other plant species as exemplified by several *Cicer* species [16] which suggest an active lateral gene transfer among mesorhizobial species. Interestingly, all type strains of mesorhizobial species nodulating *A. vulneraria* share nodulation genes similar to those of symbiovar anthyllidis as found in *M. metallidurans* type strain [23].

Phenotypic tests were not congruent with genetic analyses as no discriminative substrate assimilation nor antibiotic tolerance spectrum could be used to distinguish the two groups. These results are in accordance with previous studies [30, 28] who reported that phenotypic results did not corroborate genetic data and cannot be used systematically for the distinction of bacterial species. However, our new isolates were not able to assimilate L-Arabinose which seems the only tests which distinguished clearly our new strains from reference strains studied here. All strains tested were also resistant to chloramphenicol and all were either resistant or intermediately resistant to erythromycin, cefuroxim and gentamicin.

***Mesorhizobium faucesventi* sp. nov (type strain STM4922^T):**

FAUCES, IUM, f pl, of mountain pass; L gen. n. *ventus*, of the wind; M L. gen. n. *faucesventi*, *Col du Vent*)

Cells are Gram-negative, aerobic and non-spore forming rods. Colonies appearing on YEM agar medium within 7 days of incubation (28°C) are circular, convex, have a creamy color and usually a diameter of 1-3 mm. The maximum temperature for aerobic growth is 37°C and no growth was observed at 42°C. This species is sensitive to 1% of NaCl, grow at a pH range of 5-11. Detailed phenotypic and antibiotic characteristics and its ability to utilize and assimilate the substrates are given in tables (III-3-S2 and III-3-S3). The GC mol% content of the type strain is 62.4 mol%. Type strain STM4922^T was isolated from an individual root nodule of *Anthyllis vulneraria* from Col du Vent site, department Hérault, a region of Languedoc-Roussillon, France.

***Mesorhizobium escarrei* sp. nov (type strain STM5069^T):**

(N.L. gen. masc. n., of Escarré, named for José Escarré, a researcher who was the first to develop scientific projects and research on the *Anthyllis vulneraria* ecotype recovered from St Laurent-Le-Minier, France).

Cells are gram-negative, aerobic and non-spore forming rods. Colonies appearing on YEM agar medium within 7 days of incubation (28°C) are circular, convex, have a creamy color, opaque and usually a diameter of 1-3 mm. The maximum temperature for aerobic growth is 37°C and no growth was observed at 42°C. This species is sensitive to 1% of NaCl, grow at a pH range of 5-11. Detailed phenotypic and antibiotic characteristics and its ability to utilize and assimilate the substrates are given in tables (III-3-S2 and III-3-S3). The GC mol% content of the type strain is 62.1 mol%. Type strain STM5069^T was isolated from root nodules of *Anthyllis vulneraria* from Col du Vent site, department Hérault, region of Languedoc-Roussillon, France

Acknowledgements

We thank Dr. L. Moulin for his help in MLSA analyses, and L. Mauré and L. Lebbe for excellent technical assistance. This work was partially supported by the French national research agency (ANR Programme « Contaminants, Ecosystèmes et Santé », SyMetal). R. M. received a PhD grant from Damascus University in Syria. The LABGeM (CEA/IG/Genoscope & CNRS UMR8030) and the France Génomique National infrastructure (funded as part of Investissement d'avenir program managed by Agence Nationale pour la Recherche, contract ANR-10-INBS-09) are acknowledged for support within the MicroScope annotation facility.

References

- [1] Balachandar, D., Raja, P., Kumar, K., and Sundaram, S.P. (2007) Non-rhizobial nodulation in legumes. *Biothechnol. Mol. Biol. Rev.* 2, 49-57.
- [2] Chen, W.M., Moulin, L., Bontemps, C., Vandamme, P., Bena, G., and Boivin-Masson, C. (2003) Legume Symbiotic Nitrogen Fixation by β -Proteobacteria Is Widespread in Nature. *J. Bacteriol.* 185, 7266-7272.
- [3] Chen, W.P., and Kuo, T.T. (1993) A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 21, 2260-2260.
- [4] Chianu, J.N., Nkonya, E.M., Mairura, F.S., Chianu, J.N., and Akinnifesi, F.K. (2011) Biological nitrogen fixation and socioeconomic factors for legume production in sub-Saharan Africa: a review. *Agron. Sustain. Dev.* 31, 139-154.
- [5] De Lajudie, P., Laurent-Fulele, E., Willems, A., Torck, U., Coopman, R., Collins, M. et al. (1998) *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Inter.J. Syst. Evol. bacteriol.* 48, 1277-1290.
- [6] De Meyer, S., Tan, H., Heenan, P., Andrews, M., and Willems, A. (2015a) *Mesorhizobium waimense* sp. nov. isolated from *Sophora longicarinata* root nodules and *Mesorhizobium cantuariense* sp. nov. isolated from *Sophora microphylla* root nodules. *Inter. J. Syst. Evol. Micrbiol.* 65, 3419-3426.
- [7] De Meyer, S., Tan, H., Andrews, M., Heenan, P., and Willems, A. (2015b) *Mesorhizobium calcicola* sp. nov., *Mesorhizobium waitakense* sp. nov., *Mesorhizobium sophorae* sp. nov., *Mesorhizobium newzealandense* sp. nov. and *Mesorhizobium kowhii* sp. nov. isolated from *Sophora* root nodules in New Zealand. *Inter. J. Syst. Evol. Micrbiol.* 66, 786-795.
- [8] Diouf, F., Diouf, D., Klonowska, A., Le Quere, A., Bakhoum, N., Fall, D. et al. (2015) Genetic and genomic diversity studies of *Acacia* symbionts in Senegal reveal new species of *Mesorhizobium* with a putative geographical pattern. *PLoS One.* 10, e0117667.
- [9] Dwivedi, S.L., Sahrawat, K.L., Upadhyaya, H.D., Mengoni, A., Galardini, M., Bazzicalupo, M. et al. (2015) Advances in host plant and rhizobium genomics to enhance symbiotic nitrogen Fixation in Grain Legumes. *Adv. Agron.* 129, 1-116.
- [10] Frérot, H., Lefèbvre, C., Gruber, W., Collin, C., Santos, A.D., and Escarré, J. (2006) Specific interactions between local metallicolous plants improve the phytostabilization of mine soils. *Plant. Soil.* 282, 53-65.
- [11] Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P., and Tiedje, J.M. (2007) DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 81-91.
- [12] Gyaneshwar, P., Hirsch, A.M., Moulin, L., Chen, W.M., Elliott, G.N., Bontemps, C. et al. (2011) Legume-nodulating Betaproteobacteria: diversity, host range and future prospects.

- Mol. Plant-Microbe. Interact. 24, 1276-1288.
- [13] Jarvis, B., Berkum, V.P., Chen, W., Nour, S., Fernandez, M., Cleyet-Marel, J., and Gills, M. (1997) Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. Int. J. Syst. Evol. Bacteriol. 47, 895-898.
- [14] Kim, M., Oh, H.S., Park, S.C., and Chun, J. (2014) Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64, 346-351.
- [15] Köpke, U., and Nemecek, T. (2010) Ecological services of faba bean. Field. Crops. Res. Journal. 115, 217-233.
- [16] Laranjo, M., Young, J.P., and Oliveira, S. (2012) Multilocus sequence analysis reveals multiple symbiovars within *Mesorhizobium* species. Syst. Appl. Microbiol. 35, 359-367.
- [17] Laranjo, M., Alexandre, A., and Oliveira, S. (2014) Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the *Mesorhizobium* genus. Microbiol. Res. 169; 2-17.
- [18] Lemaire, B., Dlodlo, O., Chimphango, S., Stirton, C., Schrire, B., Boatwright, J.S. et al. (2014) Symbiotic diversity, specificity and distribution of rhizobia in native legumes of the Core Cape Subregion (South Africa). FEMS. Microbiol. Ecol. 91, 1-17.
- [19] Lupwayi, N., Kennedy, A., and Chirwa, R. (2011) Grain legume impacts on soil biological processes in sub-Saharan Africa. Afr. J. of Plant Sci. 5, 1-7.
- [20] Mahieu, S., Frérot, H., Vidal, C., Galiana, A., Heulin, K., Maure, L. et al. (2011) *Anthyllis vulneraria*/*Mesorhizobium metallidurans*, an efficient symbiotic nitrogen fixing association able to grow in mine tailings highly contaminated by Zn, Pb and Cd. Plant. Soil. 342, 405-417.
- [21] Maier, T., Klepel, S., Renner, U., and Kostrzewa, M. (2006) Fast and reliable maldi-tof ms-based microorganism identification. Nature. Methods/Application. Notes.
- [22] Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., and Batut, J. (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? Trends. Microbiol. 17, 458-466.
- [23] Maynaud, G., Willems, A., Soussou, S., Vidal, C., Maure, L., Moulin, L. et al. (2012) Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. Syst. Appl. Microbiol. 35, 65-72.
- [24] Meier-Kolthoff, J., Auch, A., Klenk, H., and Göker, M. (2013) Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. BMC bioinformatics. 14, 60.
- [25] Mesbah, M., Premachandran, U., and Whitman, W. (1989) Precise measurement of the G-C content of deoxyribonucleic acid by high performance liquid chromatography. Int. J. Syst. Bacteriol. 39, 159-167.
- [26] Mousavi, S.A., Willems, A., Nesme, X., de Lajudie, P., and Lindstrom, K. (2015) Revised

- phylogeny of *Rhizobiaceae*: proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. *Syst. Appl. Microbiol.* 38, 84-90.
- [27] Mousavi, S.A., Osterman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L. et al. (2014) Phylogeny of the *Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 37, 208-215.
- [28] Ormeno-Orrillo, E., and Martinez-Romero, E. (2013) Phenotypic tests in *Rhizobium* species description: an opinion and (a sympatric speciation) hypothesis. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 145-147.
- [29] Ormeno-Orrillo, E., Servin-Garciduenas, L.E., Rogel, M.A., Gonzalez, V., Peralta, H., Mora, J. et al. (2015) Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the *Rhizobiaceae* family in light of genomics. *Syst. Appl. Microbiol.* 38, 287-291.
- [30] Ribeiro, R.A., Rogel, M.A., Lopez-Lopez, A., Ormeno-Orrillo, E., Barcellos, F.G., Martinez, J. et al. (2012) Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 1179-1184.
- [31] Richter, M., and Rossello-Mora, R. (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 19126-19131.
- [32] Rivas, R., Martens, M., de Lajudie, P., and Willems, A. (2009) Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Syst. Appl. Microbiol.* 32, 101-110.
- [33] Rogel, M.A., Ormeno-Orrillo, E., and Martinez Romero, E. (2011) Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 96-104.
- [34] Roma Neto, I.V., Ribeiro, R.A., and Hungria, M. (2010) Genetic diversity of elite rhizobial strains of subtropical and tropical legumes based on the 16S rRNA and *glnII* genes. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1291-1302.
- [35] Tan, H.W., Heenan, P.B., De Meyer, S.E., Willems, A., and Andrews, M. (2015) Diverse novel mesorhizobia nodulate New Zealand native *Sophora* species. *Syst. Appl. Microbiol.* 38, 91-98.
- [36] Vallenet, D., Engelen, S., Mornico, D., Cruveiller, S., Fleury, L., Lajus, A., Rouy, Z., Roche, D., Salvignol, G., Scarpelli, C. and Médigue, C., 2009. (2009) MicroScope: a platform for microbial genome annotation and comparative genomics. *Database.* 2009, bap021.
- [37] Vidal, C., Chantreuil, C., Berge, O., Maure, L., Escarre, J., Bena, G. et al. (2009) *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metalicolous soil in Languedoc, France. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 850-855.
- [38] Wieme, A., Cleenwerck, I., Van Landschoot, A., and Vandamme, P. (2012) *Pediococcus lolii* DSM 19927^T and JCM 15055^T are strains of *Pediococcus acidilactici*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 3105-3108.
- [39] Willems, A., Doignon-Bourcier, F., Goris, J., Coopman, R., de Lajudie, P., De Vos, P., and Gillis, M. (2001) DNA-DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1315-1322.

[40] William, S., and Feil, H. (2012) Bacterial genomic DNA isolation using CTAB. Sigma. 50, 687

Supplementary data:

Table III-3-S1 Accessions and characteristics of the studied and reference genomes used for average nucleotide identity (ANI) and *in silico* DNA-DNA hybridation (DDH) calculations.

Bacterial strain ^a	GOLD id/Genbank ID ^b	Contig nb	Estimated size (in Pb)	Gene count	GC%	Host plant	reference
<i>Mesorhizobium</i> sp. nov STM4922 ^T	nd	96	6751843	7342	62.08%	<i>Anthyllis vulneraria</i>	This study
<i>Mesorhizobium</i> sp nov. STM5069 ^T	nd	200	7732934	8430	61.97%	<i>Anthyllis vulneraria</i>	This study
<i>M. delmotii</i> STM4623 ^T	nd	113	7610212	8335	61.85%	<i>Anthyllis vulneraria</i>	Mohamad et al., submitted
<i>M. prunaredense</i> STM4891 ^T	nd	82	7021974	7561	62.06%	<i>Anthyllis vulneraria</i>	Mohamad et al., submitted
<i>M. amorphae</i> CCNWGS0123	Ga0009659/ AGSN00000000	274	7293571	7136	62.87%	<i>Robinia pseudoacacia</i>	[5]
<i>M. australicum</i> WSM2073 ^T	Ga0024980/CP003358	1	6200534	6080	62.8%	<i>Biserrula pelecinus</i>	[9]
<i>M. ciceri</i> sv <i>bissurula</i> WSM1271	Ga0029339/CP002448	2	6690028	6531	62.56%	<i>Biserrula pelecinus</i>	[8]
<i>M. huakuii</i> 7653R	Ga0058148/CP006581	3	6881675	7245	62.93%	<i>Astragalus sinicus</i>	[1]
<i>M. huakuii</i> MAFF303099	Ga0029340/BA000012	3	7596297	7356	62.51%	<i>Lotus corniculatus</i>	[4]
<i>M. metallidurans</i> STM2683 ^T	Ga0040834/ CAUM00000000	191	6232533	6079	62.45%	<i>Anthyllis vulneraria</i>	[11]
<i>M. opportunistum</i> WSM2075 ^T	Ga0025124/CP002279	1	6884444	6747	62.87%	<i>Biserrula pelecinus</i>	[9]
<i>M. plurifarium</i> ORS 1032 ^T	Ga0100579/CCND00000000	52	7092330	7293	64.09%	<i>Acacia senegal</i>	[3]
<i>M. alhagi</i> CCNWX J12-2 ^T	Ga0009704/AHAM00000000	375	6968952	7244	62.65%	<i>Alhagi sparsifolia</i>	[2]
<i>M. loti</i> R7A	Ga0025148/AZAM00000000	3	6529530	6398	62.93%	<i>Lotus corniculatus</i>	[10]
<i>M. erdmannii</i> USDA 3471 ^T	Ga0025199/AXAE00000000	55	7023073	6785	62.61%	<i>Lotus corniculatus</i>	[6]
<i>Mesorhizobium</i> sp. STM4661	Ga0035947/ CAAF00000000	89	6547395	6333	62.36%	<i>Anthyllis vulneraria</i>	[7]

^aData for the genomes of strains STM4622^T, STM5069^T, *M. delmotii* STM4623^T and *M. prunaredense* STM4891^T were recuperated from (<https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/mage/viewer.php>).
nd accession number non available until now for this strains.

Table III-3-S2: Differential phenotypic characteristics among strains studied and reference strains (STM4922; STM4925; STM4921; STM4926; STM4912; STM4919; STM5069; STM5072; STM4929; STM4923); (*Mesorhizobium muleiense* STM9273^T this study); STM9271 (*M. robiniae* STM9271^T (Mohamad et al., submitted), 9272 (*M. temperatum* STM9272^T this study); 104 (Mohamad et al., submitted). + : positive effect, - : negative effect, w: weakly positive, v: variable.

Characteristics	STM492	STM492	STM492	STM492	STM491	STM491	STM506	STM507	STM492	STM492	STM927	STM927	STM927	STM10
	2	5	1	6	2	9	9	2	9	3	3	1	2	4
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
N-Acetyl-DGlucosamine	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	v	+
D-Saccharic Acid	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	v	-
Succinic Acid	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	w
D-Galactose	+	w	-	+	-	-	-	+	+	-	w	+	+	+
L-Aspartic Acid	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
L-Proline	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
D-Alanine	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D-Trehalose	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
D-Mannose	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Dulcitol	+	-	-	-	-	w	w	-	-	-	-	+	+	-
D-Sorbitol	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	w	+	v	w
Glycerol	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
L-Fucose	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
D-Glucuronic Acid	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
D-Gluconic Acid	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	w	-	-	-

D,L- α -Glycerol-Phosphate	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
D-Xylose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Lactic Acid	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	w	+
Formic Acid	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
D-Mannitol	+	-	-	-	-	w	+	+	-	-	-	+	-	+
L-Glutamic Acid	+	-	-	-	-	-	w	-	-	-	-	+	-	+
D,L-Malic Acid	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	v	+	v	w
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Tween 20	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	w	+
D-Fructose	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+
Acetic Acid	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
α -D-Glucose	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+
Maltose	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+
D-Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Thymidine	w	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
D-Aspartic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	w	-	-	-
D-Glucosaminic Acid	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	w	+	-	-
1,2-Propanediol	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	w	-	-	-
Tween 40	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

α-Keto-Glutaric Acid	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Keto-Butyric Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
α-Methyl-D-Galactoside	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
α-D-Lactose	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Lactulose	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Sucrose	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Uridine	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	v	+	v	-
L-Glutamine	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	w	-
M-Tartaric Acid	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	w	-
Glucose-1-Phosphate	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
Fructose-6-Phosphate	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
Tween 80	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
α-Hydroxy Glutaric Acid-γ-Lactone	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
α-Hydroxy Butyric Acid		-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
β-Methyl-D-Glucoside	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+

Adonitol	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
Maltotriose	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
2-Deoxy Adenosine	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	w	+	-	-
Adenosine	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	+	-	-
Glycyl-L-Aspartic Acid	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
Citric Acid	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
M-Inositol	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
D-Threonine	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Fumaric Acid	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
Bromo Succinic Acid	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Propionic Acid	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Mucic Acid	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Glycolic Acid	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
Glyoxylic Acid	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
D-Cellobiose	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
Inosine	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Glycyl-L-Glutamic Acid	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Tricarballic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
L-Serine	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

L-Threonine	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
L-Alanine	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
L-Alanyl-Glycine	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
Acetoacetic Acid	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
N-Acetyl-β-D-Mannosamine	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Mono Methyl Succinate	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Methyl Pyruvate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Glycyl-L-Proline	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
D-Psicose	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
L-Lyxose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucuronamide	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyruvic Acid	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
L-Galactonic Acid-γ-Lactone	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D-Galacturonic Acid	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Aminoethanol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Potassium nitrate	-	w	-	-	-	-	-	-	w	-	-	w	-	w	-
L-tryptophane	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
L-arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

urea	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	v	-
esculine ferric citrate	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
gelatin (bovine origin)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
4-nitrophényl-βD-galactopyranoside	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
N-acetyl-glucosamine	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D-maltose	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-	-	-	-	-
phenylacetic acid	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-	-	-	-	-
D-xylose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
glucose	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
methyl-αD-mannopyranoside	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
methyl-αD-glucopyranoside	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
N-acetylglucosamine	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
amygdalin	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
arbutin	-	-	-	-	-	-	-	w	-	-	w	-	-	-
salicin	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

D-cellobiose	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
D-maltose	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D-melibiose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-saccharose (sucrose)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D-trehalose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-melezitose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D-rafinose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
amidon (starch)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
glycogen	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D-turanose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
potassium 5- ketogluconate	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
potassium 2- ketogluconate	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Table III-3-S3: Antibiotic characterization among strains studied (STM4922; STM4925; STM4921; STM4926; STM4912; STM4919; STM5069; STM5072; STM4929; STM4923) and reference strains (*Mesorhizobium muleiense* STM9273^T this study); STM9271 (*M. robiniae* STM9271^T (Mohamad et al., submitted), 9272 (*M. temperatum* STM9272^T this study); 104 (*M. mediterraneum* STM104^T (Mohamad et al., submitted)). (; R: resistant, S: sensitive, I: intermediate (diameter of the inhibition zone) [neomycin: <13mm (R), >=17 (S); ciprofloxacin: <22mm (R), >=25mm (S); polymixin B: <15mm (R), >=15mm (S); penicillin: <18mm (R), >=29mm (S); streptomycin: <11mm (R), >=15mm (S); rifampicin: <14mm (R), >=19mm (S); cefuroxim: <22mm (R), >=22mm (S); kanamycin: v: variable.

Antibiotics	STM4922	STM4925	STM4919	STM4921	STM4926	STM4912	STM506 9	STM507 2	STM492 3	STM492 9	STM927 3	STM927 1	STM927 2	STM10 4
Nalidixic acid à 30µg	R	R	S	I	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R
neomycin 30µg	S	I	S	I	S	I	S	S	R	R	S	S	v	S
ciprofloxacin 5µg	R	S	I	R	R	R	S	S	I	S	v	R	R	S
polymixin B 300IU	S	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	R	v	R
penicillin G 10IU	R	S	R	R	R	R	S	S	I	R	I	R	R	R
streptomycin 10µg	R	I	R	R	S	I	S	S	S	S	S	R	R	R
rifampicin 30µg	S	S	S	I	I	I	S	S	S	S	S	S	I	S
cefuroxim 30µg	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
kanamycin 30µg	R	R	S	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R
erythromicin 15µg	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R
gentamicin 10µg	R	R	R	R	I	R	R	I	R	S	R	R	R	R
tetracyclin 30µg	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ampicillin 10µg	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S
vancomycin 30µg	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	v	R	v	R
chloramphenicol 30µg	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

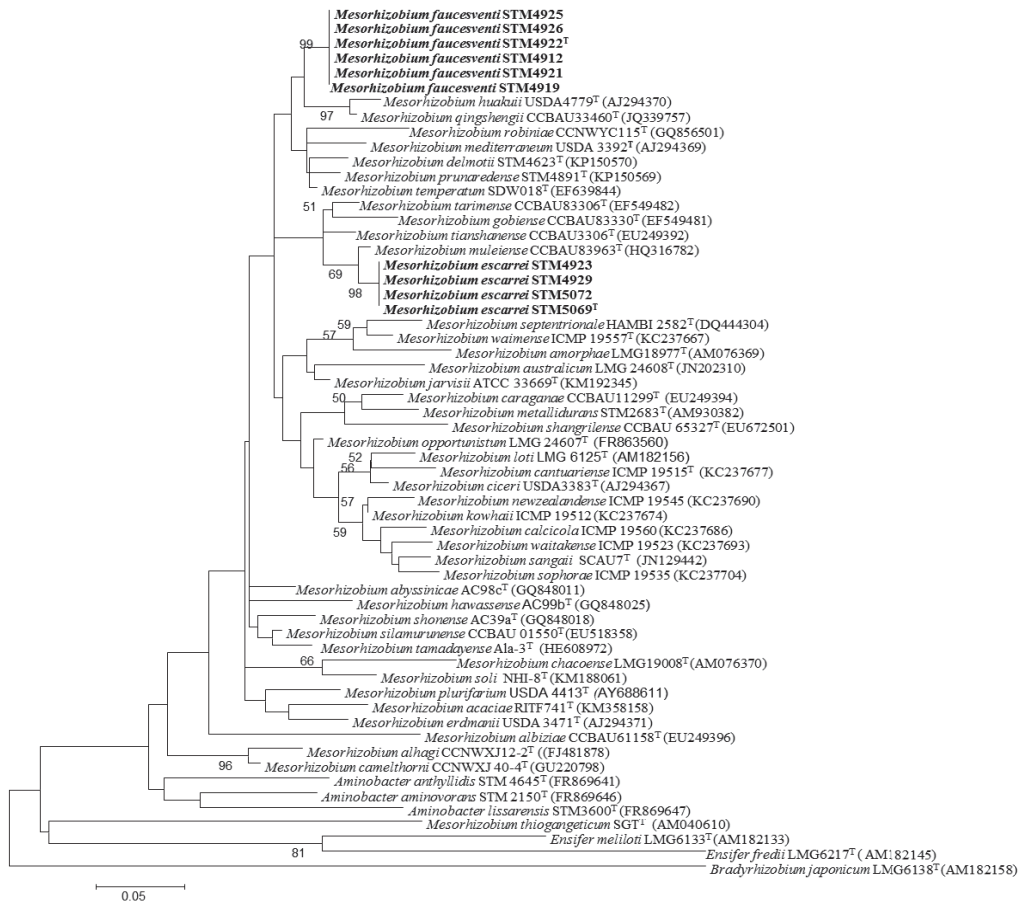


Fig. III-3-S1A: Maximum-likelihood phylogenetic trees of partial *recA* (A) showing the relationships between the *A. vulneraria* isolates obtained in this study and reference strains. Tree was constructed using the best model T92+G+I. Analyses were based on 291 nt sequences and bootstraps on 1000 replicates. Bar represents the number of nt substitutions *per* 100 nt.

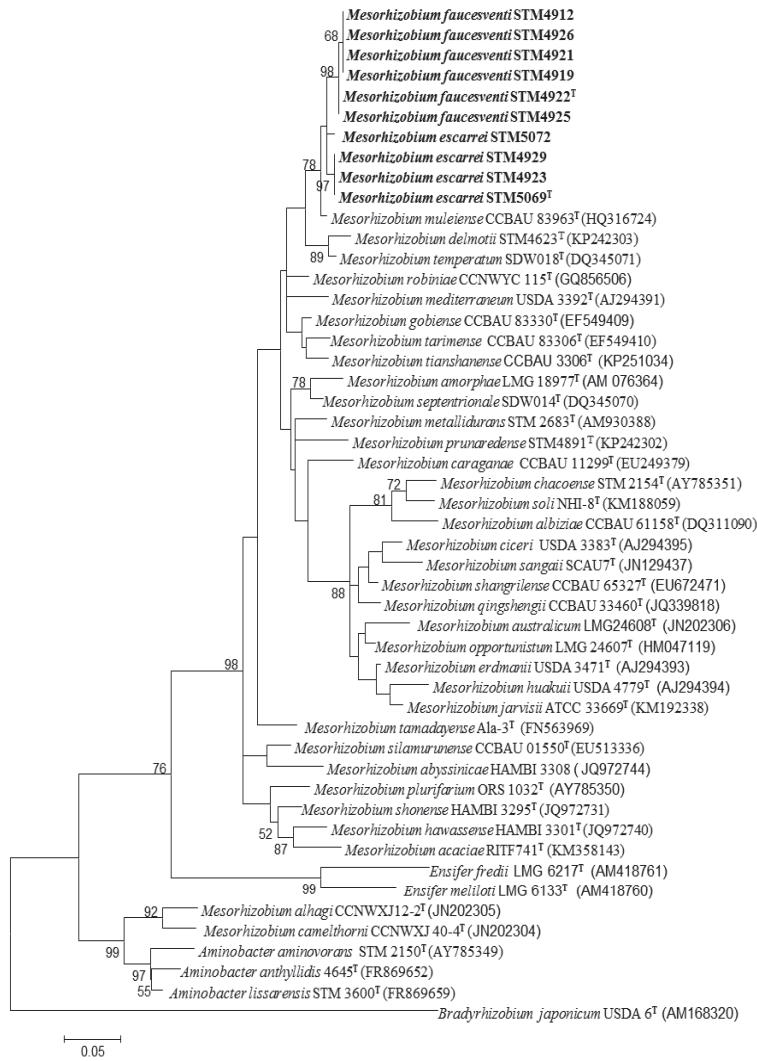


Fig. III-3-S1B: Maximum-likelihood phylogenetic trees of partial *atpD* (B) showing the relationships between the *A. vulneraria* isolates obtained in this study and reference strains. Tree was constructed using the best model TN93+G+I. Analyses were based on 375 nt sequences and bootstraps on 1000 replicates. Bar represents the number of nt substitutions per 100 nt.

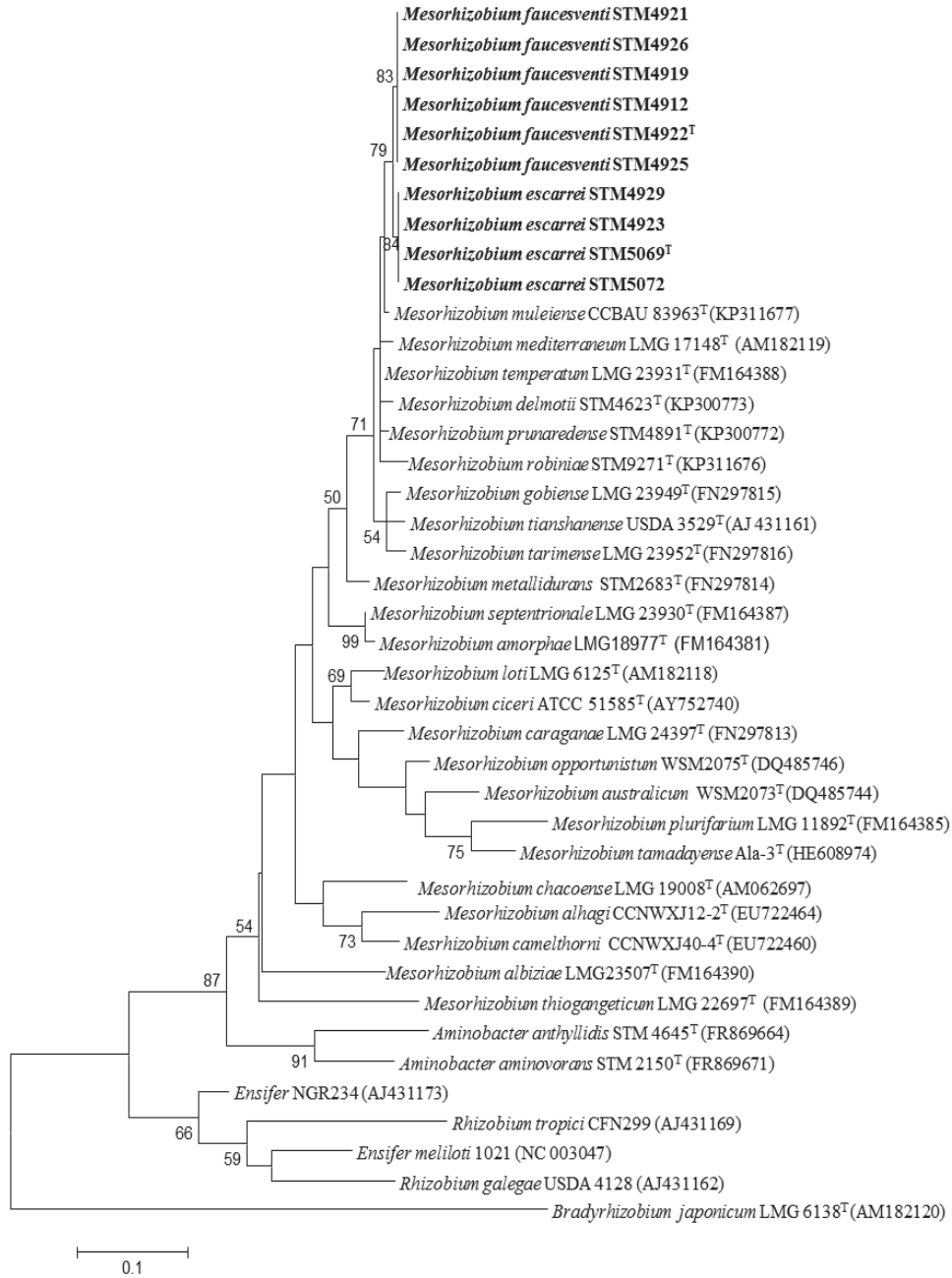


Fig. III-3-S1C: Maximum-likelihood phylogenetic trees of partial *dnaK* (C) showing the relationships between the *A. vulneraria* isolates obtained in this study and reference strains. Tree was constructed using the best model T92+G. Analyses were based on 252 nt sequences and bootstraps on 1000 replicates. Bar represents the number of nt substitutions *per* 100 nt.

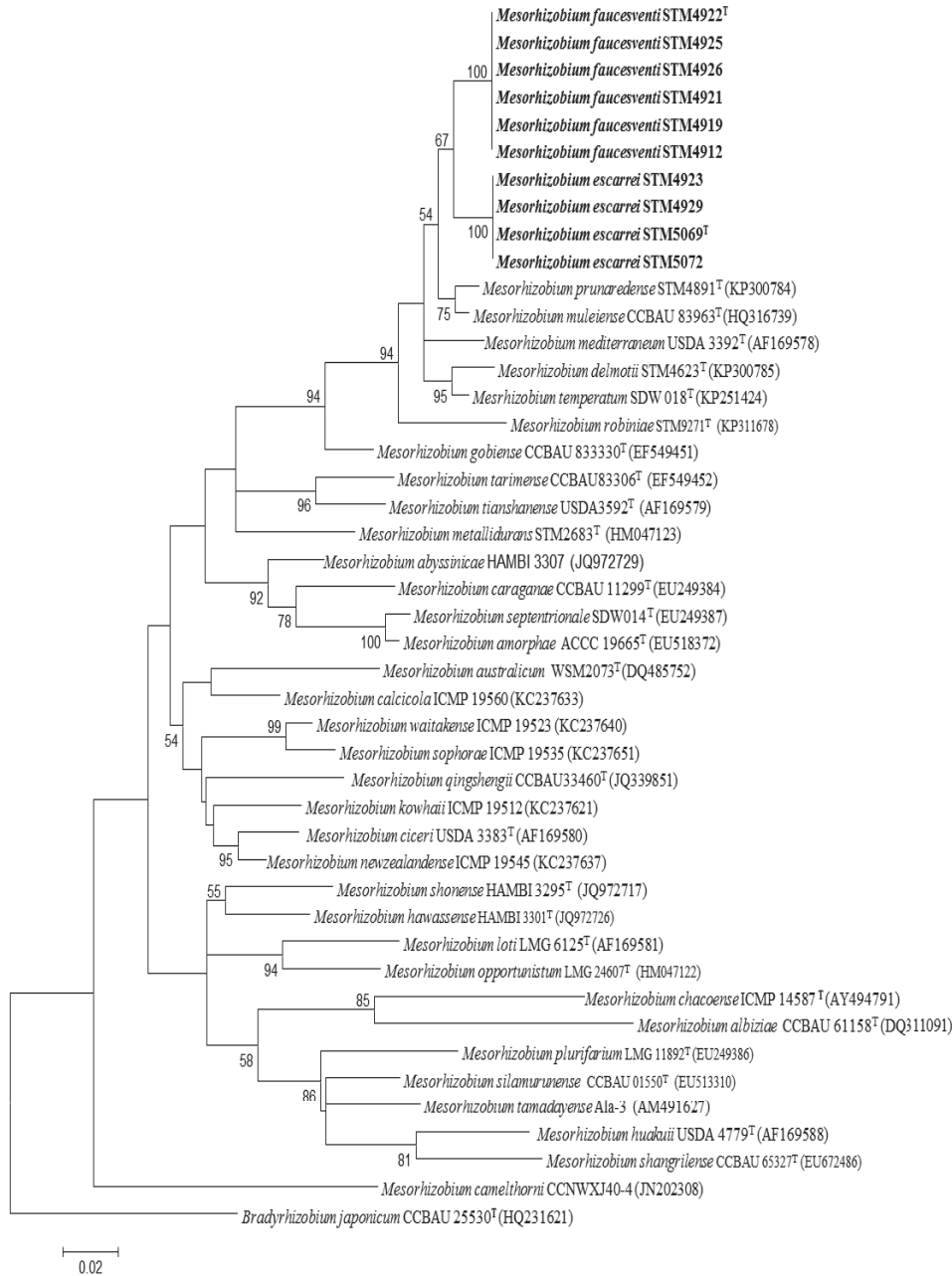


Fig. III-3-S1D: Maximum-likelihood phylogenetic trees of partial *glnII* (D) showing the relationships between the *A. vulneraria* isolates obtained in this study and reference strains. Tree was constructed using the best model GTR+G+I Analyses were based on 474nt sequences and bootstraps on 1000 replicates. Bar represents the number of nt substitutions *per* 100 nt.

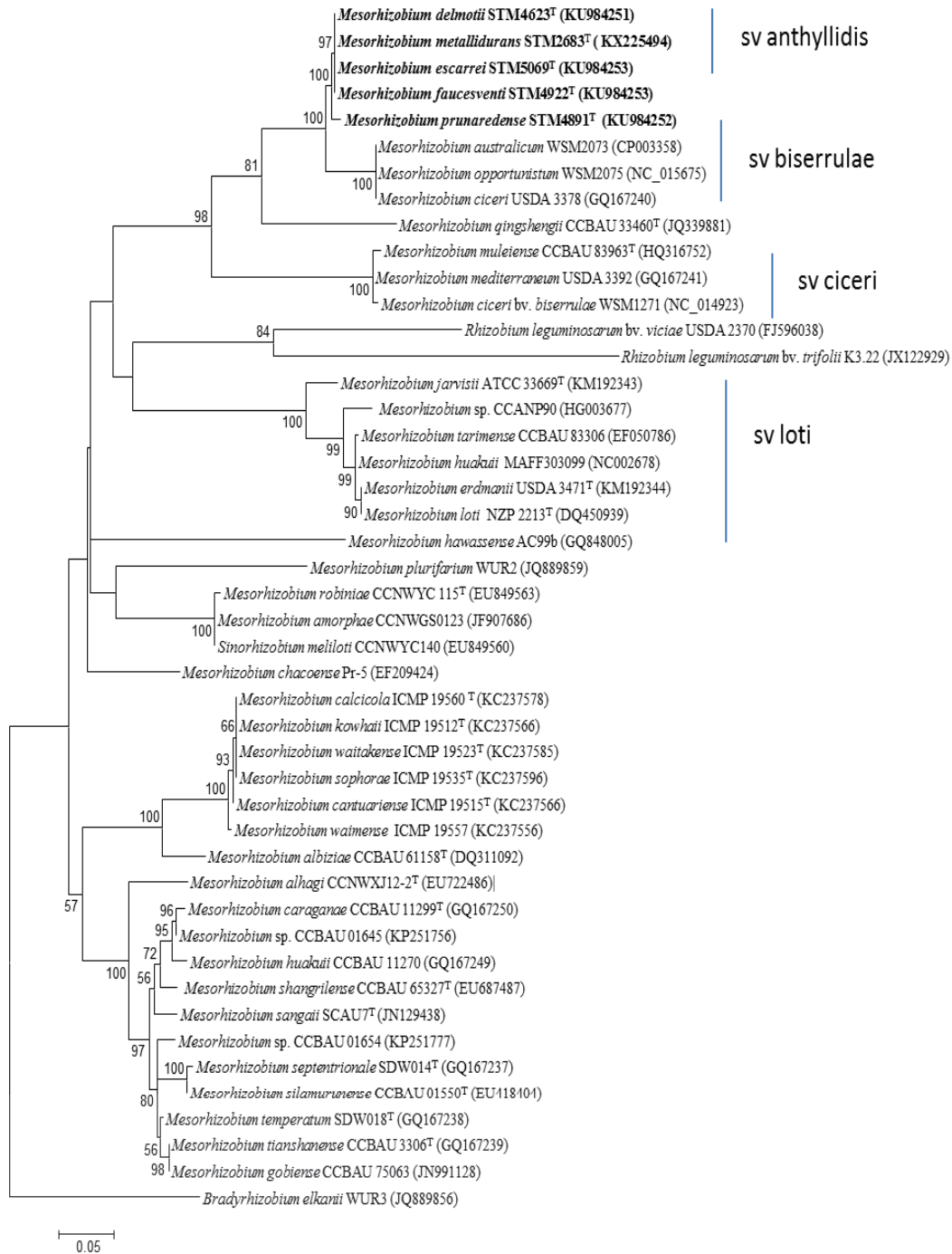


Fig. III-3-S2: Maximum-likelihood phylogenetic trees of partial *nodC* showing the relationships between the type strains of novel proposal species and reference strains. Tree was constructed using the best model T92+G+I. Analyses were based on 393nt sequences and bootstraps on 1000 replicates. Bar represents the number of nt substitutions per 100 nt.

Reference of Table III-3-S1 in supplementary data:

- [1] Chen, W., Li, G., Qi, Y., ET., W., Yuan, H., and LI, J. (1991) *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 41, 275-280.
- [2] Chen, W.M., Zhu, W.F., Bontemps, C., Young, J.P., and Wei, G.H. (2010) *Mesorhizobium alhagi* sp. nov., isolated from wild *Alhagi sparsifolia* in north-western China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60, 958-962.
- [3] De Lajudie, P., willems, A., Nick, G., Moreira, F., Molouba, F., Host, B. et al. (1998b) Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 48, 369-382.
- [4] Jarvis, B., Pankhurst, C., and Patel, J. (1982) *Rhizobiurn loti*, a new species of legume root nodule bacteria. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 32, 378-380.
- [5] Hao, X., Lin, Y., Johnstone, L., Baltrus, D.A., Miller, S.J., Wei, G. and Rensing, C. (2012a) Draft genome sequence of plant growth-promoting rhizobium *Mesorhizobium amorphae*, isolated from zinc-lead mine tailings. J. Bacteriol. 194, 736-737.
- [6] Martínez-Hidalgo, P., Ramírez-Bahena, M.H., Flores-Felix, J.D., Rivas, R., Igual, J.M., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., León-Barrios, M., Peix, A. and Velázquez, E., (2015) Revision of the taxonomic status of type strains of *Mesorhizobium loti* and reclassification of strain USDA 3471T as the type strain of *Mesorhizobium erdmanii* sp. nov. and ATCC 33669T as the type strain of *Mesorhizobium jarvisii* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65, 1703-1708.
- [7] Maynaud, G., Brunel, B., Mornico, D., Durot, M., Severac, D., Dubois, E. et al. (2013) Genome-wide transcriptional responses of two metal-tolerant symbiotic *Mesorhizobium* isolates to zinc and cadmium exposure. BMC Genomics 14, 292.
- [8] Nandasena, K.G., O'Hara, G.W., Tiwari, R.P., Willems, A., and Howieson, J.G. (2007a) *Mesorhizobium ciceri* biovar biserrulae, a novel biovar nodulating the pasture legume *Biserrula pelecinus* L. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57, 1041-1045.
- [9] Nandasena, K.G., O'Hara, G.W., Tiwari, R.P., Willems, A., and Howieson, J.G. (2009) *Mesorhizobium australicum* sp. nov. and *Mesorhizobium opportunistum* sp. nov., isolated from *Biserrula pelecinus* L. in Australia. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59, 2140-2147.
- [10] Sullivan, J., Patrick, H., Lowther, W., Scott, D., and Ronson, C. (1995) Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 8985-8989.
- [11] Vidal, C., Chantreuil, C., Berge, O., Maure, L., Escarre, J., Bena, G., Brunel, B. and Cleyet-Marel, J.C. (2009) *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metalicolous soil in Languedoc, France. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59, 850-855.

III-4- Synthèse :

Ce chapitre est focalisé sur la description de nouvelles espèces du genre *Mesorhizobium* isolées des sites non contaminés (Col du Vent et La Prunarède) et d'un site moyennement contaminé (Avinières 2). Pour qu'une nouvelle espèce bactérienne soit définie, de nombreux tests génétiques et phénotypiques doivent être réalisés et des niveaux d'hybridation d'ADN-ADN < 70 doivent être obtenus entre les nouvelles souches et les souches types représentant les espèces les plus proches phylogénétiquement (Chen and Kuo, 1993).

Parmi les 61 souches isolées des sites Col du Vent, La Prunarède et des Avinières 2 (Chapitre II), 18 souches représentatives ont été utilisées dans cette étude pour identifier les espèces de mesorhizobia symbiotes d'*A. vulneraria* et sensibles aux métaux lourds. Cinq d'entre elles proviennent des Avinières 2, trois autres de La Prunarède et les dix restantes du site du Col du Vent. Bien que les 18 souches choisies partagent la même séquence d'ADNr 16S, elles appartiennent à cinq nouvelles espèces du genre *Mesorhizobium* (*M. delmotii*, *M. prunaredense*, *Mesorhizobium escarrei* and *Mesorhizobium faucesventi* et *Mesorhizobium* sp STM6544). Des études antérieures ont démontré que deux espèces bactériennes peuvent avoir une séquence d'ADNr 16S entièrement identique comme c'est le cas pour les espèces *M. metallidurans* et *M. gobiense* (Han et al., 2008; Vidal et al., 2009). La position phylogénétique des souches étudiées a été définie par les analyses des séquences multiloci (MLSA de *recA*, *atpD*, *glnII* et *dnaK*) et par la construction d'un arbre phylogénétique concaténé qui permet de fournir une meilleure résolution entre les espèces de *Mesorhizobium* (Degefu et al., 2011) mais aussi entre les espèces appartenant à d'autres genres de rhizobia tels que le genre *Bradyrhizobium* (Rivas et al., 2009). Les analyses de la spectrométrie de masse MALDI-TOF ont permis d'assembler les souches clairement selon leur appartenance à une espèce donnée, ce qui a été confirmé par les données d'hybridation ADN-ADN. La méthodologie MALDI-TOF, récemment utilisée pour sa capacité à différencier les espèces au sein de la famille des *Rhizobiaceae* et du genre *Bradyrhizobium* (Ferreira et al., 2011), montre ici une puissante capacité à distinguer les espèces de *Mesorhizobium* et confirme qu'elle est une excellente alternative à l'identification microbiologique classique au niveau de l'espèce (Maier et al., 2006). Le séquençage des génomes des souches types permet une identification indiscutable des espèces bactériennes (Whitman, 2015). Les valeurs seuils d'ANI >95% et de DDH >70% *in silico* des souches bactériennes appartenant à la même espèce ont été rapportées par (Richter and Rossello-Mora, 2009). Ainsi, ces valeurs nous ont permis de distinguer les souches types de nos nouvelles espèces, *M. delmotii* et *M. prunaredense*, par rapport à celles de *Mesorhizobium* pour lesquelles des souches représentatives ont déjà été séquencées (dont *M. metallidurans* STM2683^T). (Partie III-2). Par contre, la valeur d'ANI calculée entre les deux souches types de *Mesorhizobium escarrei* and *Mesorhizobium faucesventi* s'est avérée être supérieure à 95% alors que celle du DDH est inférieure à 70%. (Zhang et al., 2012) ont montré que deux souches ayant une valeur supérieure du ANI>95% pourraient appartenir à deux espèces différentes (Partie III-3).

Des analyses préliminaires de MALDI-TOF ont montré aussi que STM5068 et STM5071 (souches isolées du col du Vent (chapitre II)) appartiennent à une autre nouvelle espèce non définie. L'hybridation ADN-ADN n'a malheureusement pas pu être réalisée dans notre étude pour confirmer ces résultats.

Ce travail nous a permis de définir de nouvelles espèces sensibles aux métaux lourds isolées d'*A. vulneraria* et d'estimer la répartition de ces espèces dans les différents sites moyennement ou non contaminés (Figure III-4-1) en prenant en compte la position taxonomique des 61 souches sensibles sur l'arbre phylogénétique concaténé dans le chapitre II (Figure II-2). *Mesorhizobium* sp. STM6544 semble la seule espèce commune aux trois sites. *M. prunardense* se retrouve majoritairement sur le site de La Prunarède et minoritairement sur le site des Avinières 2. Des spécificités des espèces selon les sites ont été observées, telles que *M. delmotii* semble spécifique du site des Avinières 2. Les espèces de *Mesorhizobium escarrei* and *Mesorhizobium faucesventi* et *Mesorhizobium* sp. STM5071 sont spécifiques du site Col du Vent (Figure III-4-1). Des études antérieures ont mis en évidence la présence de deux autres espèces symbiotiques d'*A. vulneraria*, résistantes aux métaux lourds, isolées de deux sites miniers éloignés géographiquement : *M. metallidurans* de la mine des Avinières (Vidal et al., 2009) et *Aminobacter anthyllidis* de la mine d'Eylie et de la mine de Breinic (Maynaud et al., 2012).

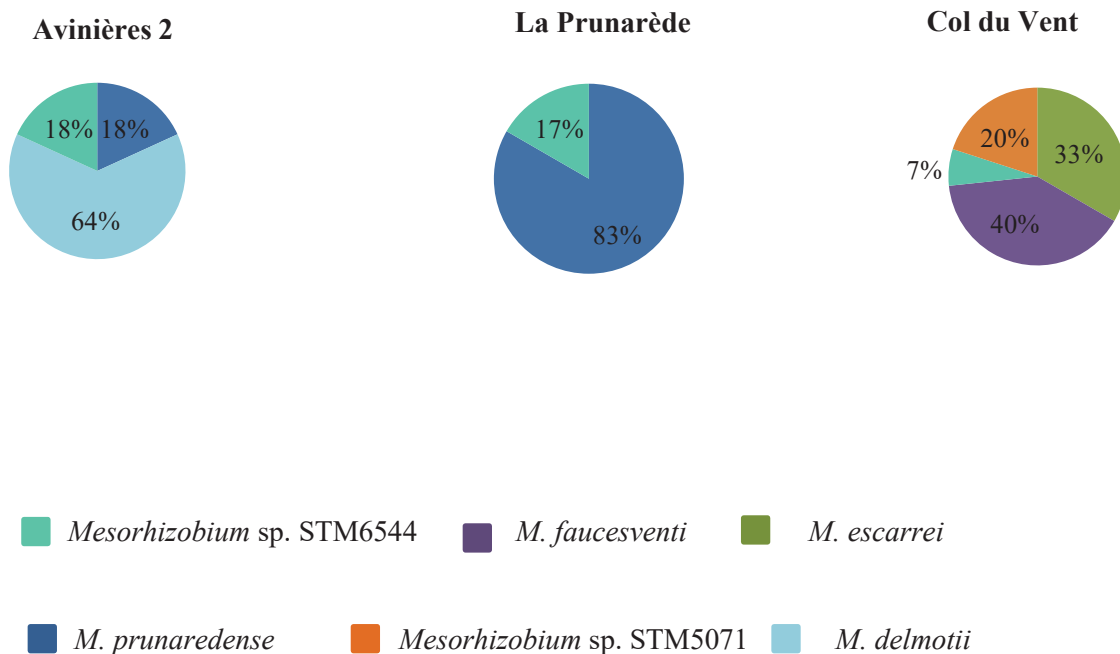


Figure III-4-1 : La diversité taxonomique des souches sensibles isolées d'un site moyennement contaminé (Avinières 2) et des sites non contaminés (Col du Vent et La Prunarède).

Nous avons montré que *A. vulneraria* est capable de s'associer à plusieurs espèces de rhizobia selon le site géographique ou à plusieurs espèces isolées du même site. D'autres études ont montré que plusieurs espèces de *Mesorhizobium* peuvent être isolées de nodosités de la même espèce végétale à partir de sites différents ou du même site et c'est notamment le cas avec *M. waitakense*, *M. sophorae*, *M. kowhahi* et *M. cantuariense* isolées de nodosités de *Sophora microphylla* (De Meyer et al., 2015a; De Meyer et al., 2015b).

Les gènes de nodulation des souches types des quatre nouvelles espèces décrites sont similaires à ceux du symbiovar anthyllidis lié aux symbiotes d'*Anthyllis* tels qu'ils avaient été décrits chez la souche *M. metallidurans* STM2683^T (Maynaud et al., 2012)

En résumé, quatre nouvelles espèces ont été isolées des nodosités d'*A. vulneraria* et leur capacité symbiotique a été vérifiée. L'hybridation ADN-ADN a confirmé l'appartenance de chaque souche représentante choisie sur la base du regroupement de la méthode de la spectrométrie de masse MALDI-TOF à une nouvelle espèce différente. Les calculs d'ANI et DDH *in silico* ont été cohérents avec les résultats de l'hybridation ADN-ADN et permettent de distinguer les souches types des nouvelles espèces des autres souches types de *Mesorhizobium*. Ainsi, deux nouvelles espèces ont été définies (*M. prunedense* et *M. delmotii*) et deux autres seront à nommer (*Mesorhizobium escarrei* et *Mesorhizobium faucesventi* issues du Col vent). Cela va augmenter le nombre d'espèces isolées d'*A. vulneraria* et le porter à six. La spéciation des souches étudiées est potentiellement liée aux sites géographiques et le rôle de la plante hôte sera abordé dans le chapitre suivant.

Chapitre IV :

**Structure génétique des populations de rhizobia
associées à *Lotus corniculatus* dans des sols
présentant des teneurs variables en Zn et en Cd.
Comparaison avec la diversité des symbiotes
d'*Anthyllis vulneraria***

IV-1-Introduction :

Les travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire participent efficacement à la mise en sécurité et à la réhabilitation des anciens sites miniers fortement contaminés en métaux lourds par la technique de la phytostabilisation. Afin de pouvoir créer une couverture végétale durable, l'utilisation d'espèces végétales adaptées aux contraintes inhérentes aux déblais miniers est indispensable, notamment pour assurer une entrée permanente en azote dans le sol et dans le système de cultures. Ainsi, certaines plantes comme *Lotus corniculatus* appartenant à la famille des *Fabaceae* sont des bonnes candidates grâce à leur capacité à s'adapter à des conditions environnementales très variées, voir même extrêmes. *Lotus corniculatus* est, en effet, une espèce qui présente une grande diversité génotypique et phénotypique avec une interfécondité entre des populations éloignées géographiquement, ce qui peut conduire à des différences dans la survie et l'adaptation à des conditions environnementales variables (Smith et al., 2009; Escaray et al., 2012). De plus, les symbiotes associés aux *Fabaceae* peuvent participer efficacement à l'adaptation de ces plantes à de fortes contraintes notamment en modifiant la spéciation du métal et en diminuant sa disponibilité dans le sol (Zahran, 1999; Carrasco et al., 2005; Prasad et al., 2010). Le succès écologique de *L. corniculatus* est ainsi favorisé par son association avec des bactéries appartenant principalement au genre *Mesorhizobium* (Pankhurst et al., 1979; Monza et al., 1992; Lorite et al., 2010) et l'espèce *Mesorhizobium loti* a été isolée pour la première fois de nodosités de cette légumineuse (Jarvis et al., 1982).

Afin que l'association *L. corniculatus*/rhizobia soit efficace et puisse être utilisée dans la stratégie de la phytoremediation des sites miniers, il est non seulement nécessaire de disposer d'un génotype de *L. corniculatus* adapté aux métaux lourds mais également de procéder à l'analyse de la structure génétique et phénotypique de ses bactéries symbiotiques afin d'avoir la maîtrise de cette association plante/bactérie et de contrôler la stabilité fonctionnelle de l'écosystème. Nous avons pu observer une population de *L. corniculatus* sur un site minier mais nous n'avons aucune information sur les souches bactériennes qui peuvent s'associer à cette légumineuse dans ces sols fortement ou moyennement contaminés en métaux lourds.

Dans les chapitres II et III, nous avons étudié la diversité taxonomique des symbiotes associés à *Anthyllis vulneraria* présents sur des sites avec des sols aux teneurs variables en Zn, Pb et Cd. On a montré que cette diversité est influencée principalement par les teneurs de métaux lourds dans le sol. La diversité dans les sites fortement contaminés est limitée et on trouve principalement des bactéries appartenant à l'espèce *M. metallidurans* ou proches de cette espèce alors que les sites moyennement ou non contaminés possèdent une grande diversité au sein du genre *Mesorhizobium*; cette diversité contient plusieurs espèces potentielles et quatre d'entre-elles ont fait l'objet d'une définition

taxonomique (chapitres II et III). Nous avons vu aussi que la répartition des isolats selon leur comportement symbiotique est différente de celle obtenue en utilisant les marqueurs taxonomiques (ADNr 16S, *recA* et *atpD*). Cette diversité symbiotique a été influencée par l'espèce végétale indépendamment du niveau des métaux lourds dans le sol. Des différences dans la séquence de *nodA* ont été observées selon les sites géographiques : les souches possèdent soit deux gènes *nodA* caractéristiques du symbiovar anthyllidis comme celui de la souche type *M. metallidurans* STM2683^T (Maynaud et al., 2012), soit un seul gène *nodA* typique du symbiovar loti comme celui de *M. loti* nodulant *L. corniculatus* (Jarvis et al., 1982). Cette répartition selon le type *nodA* peut être liée à la présence de la plante hôte compatible (*A. vulneraria* ou *L. corniculatus*) dans l'environnement étudié.

La compatibilité entre des souches associées à *A. vulneraria* et à *L. corniculatus* a été mentionnée (Abdel-Ghaffar and Jensen, 1966; Ampomah and Huss-Danell, 2011), mais nous n'avons pas de connaissances sur leurs identités et si toutes présentent cette capacité de nodulation croisée. De plus, nous n'avons pas d'information concernant l'efficacité des souches compatibles avec les deux légumineuses. Cette compatibilité peut être aussi modifiée par la présence de métaux dans le sol, suggérant d'avoir des souches spécifiques associées à chaque légumineuse. Par exemple, le génotype de *L. corniculatus* adapté aux métaux lourds a été retrouvé sur un site minier (Montdardier) et il n'a pas été observé sur la mine des Avinières où est présent l'écotype d'*A. vulneraria* métallicole. Inversement, l'écotype d'*A. vulneraria* subsp *carpatica* n'a pas été détecté sur la mine de Montdardier.

Ce chapitre est ainsi consacré à l'étude de la répartition taxonomique des symbiotes associés à *L. corniculatus* dans des sites présentant différents degrés de contamination en métaux, à la mesure de la performance des symbiotes d'*A. vulneraria* avec les deux légumineuses et à la détermination des souches spécifiques pour chaque légumineuse. Pour cela, des souches ont été isolées des nodosités des deux légumineuses après piégeage des bactéries présentes dans des sols fortement contaminés en métaux lourds (Montdardier 1 (MD1) et Avinières 1 (AH1)) et moyennement contaminés situés à la périphérie des sites miniers (Montdardier 2 (MD2) et Avinières 2 (AH2)). Ensuite, les souches ont été analysées phénotypiquement pour tester leur phénotype de tolérance aux métaux lourds et génétiquement en utilisant des marqueurs taxonomiques (ADNr 16S, *recA* et *atpD*), un marqueur symbiotique (*nodA*) et un marqueur impliqué dans la tolérance des souches aux métaux lourds (*cadA*). Les travaux présentés dans ce chapitre avec les différents résultats ont été rédigés sous forme d'un article scientifique destiné à être soumis pour publication.

IV-2-Article en préparation

Comparison of *Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulneraria* rhizobial genetic structures impacted by heavy metal contents in soils

Roba Mohamad^a, Antoine Le Quéré^a, Marjorie Pervent^b, Maurine Bonabaud^d, Emeric Dubois^d
Jean-Claude Cleyet-Marel^b, Brigitte Brunel^c

^a IRD, ^b INRA, ^c Montpellier SupAgro, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes UMR113, IRD/INRA/CIRAD/Montpellier SupAgro/Université de Montpellier, Montpellier, France

^d Plateforme MGX, c/o Institut de Genomique Fonctionnelle, Montpellier, 141 rue de la Cardonille, 34 094 Montpellier Cedex, France.

Address correspondences to Roba Mohamad roba392@gmail.com

Brigitte Brunel brigitte.brunel@supagro.fr

Keywords: symbiotic nitrogen fixation; metal tolerance; multilocus sequence analysis; nodulation gene; symbiovar; *Mesorhizobium*

Running title: Lotus-and Anthyllis-nodulating rhizobia.

ABSTRACT

Specialization of symbiotic rhizobia could be driven by plant host or abiotic factors from their habitat. We hypothesize that the genetic composition of rhizobia associated to legume plants may reflect their abilities to adapt to extreme metallic conditions. Our work was focused on two ecotypes of *Anthyllis vulneraria* and *Lotus corniculatus* well adapted to mining sites. A previous study showed that strains having symbiovar loti were isolated from *A. vulneraria* root-nodules and therefore that *Lotus* could share symbionts with *Anthyllis*. We analyzed the phenotypic and genetic composition of symbionts associated with these legumes to identify which symbionts could be compatible between the two legume species and how host plant and/or soil metal concentrations could shape rhizobial populations. The metal tolerance phenotype and genetic diversity of 88 isolates trapped by *L. corniculatus*, were compared to 82 new isolates of *A. vulneraria* and six *Anthyllis*-nodulating reference strains. Isolates were obtained from two mine soils and two border-mine soils. Mine soils contained a high proportion of metal-tolerant strains while mine-border soils contained in great majority metal-sensitive strains. *Lotus*- and *Anthyllis* isolates belonged, mainly to the genus *Mesorhizobium*. Taxonomic markers split metal-tolerant isolates obtained from mine soils into two large clusters: one grouped strains of

Mesorhizobium metallidurans, previously described as a metal-tolerant species associated with *A. vulneraria* in metal-rich mining substrate, and the other cluster encompassed strains belonging to a novel potential metal-tolerant species. By contrast, mine-border soils displayed a mesorhizobial taxonomic composition distinct from those found in mine soils: these strains belonged, in great majority, to one or several novel potential metal-sensitive species and a few of them were closely related to strains of *Mesorhizobium prunedense*, a recently described *Anthyllis*-nodulating species. The symbiotic traits reflected by a nodulation gene (*nodA*) revealed the division of the populations into three *nodA* profiles, one related to *Anthyllis* and two related to *Lotus*. The symbiotic properties were affected by the host plant used for trapping, but were independent of heavy metal concentrations in soils. *A. vulneraria* plants could be nodulated by strains having the three profiles of *nodA* contrary to *Lotus* which appeared less promiscuous and was strictly nodulated by *nodA* profiles related to *Lotus*. Our results revealed that soil metal concentrations shape rhizobial taxonomic composition while host plant did not impact the taxonomic diversity but symbiotic diversity. *Anthyllis* and *Lotus* were able to associate with the same species but a symbiotic specificity was observed in *Lotus* symbionts. A local adaptation highlights the importance of using native plants and their associated indigenous symbionts as an essential resource for optimizing a successful vegetation cover system.

INTRODUCTION

The toxicity of heavy metals and the deficiency of nitrogen are the two limiting factors in the establishment of a sustainable vegetation cover in metal-contaminated soils. Heavy-metal contaminated soils could impose various adverse effects on bioactivity, richness and diversity of microorganisms. Numerous studies have demonstrated that size, composition and activity of soil microbial communities could decrease with increasing heavy metal concentrations because of differences in microbial sensitivities to metal toxicity that may induce the development of metal-resistant microbial populations (Giller et al., 1998; Yao et al., 2003; Xie et al., 2016). The use of tolerant plants with their associated microorganisms in a phytostabilization strategy for treating metal-contaminated sites is a suitable method by modifying metal speciation and limiting the spread of metal particles by air, water or through food chains (Carrasco et al., 2005; Dary et al., 2010; Prasad et al., 2010). In nitrogen deficiency conditions, as in case of mining sites rich in heavy metals, legumes with their rhizobial partnerships fixing atmospheric dinitrogen allow covering to a large extent the nitrogen requirement by plant cropping used in phytostabilization of mining sites (Frérot et al., 2006). Moreover, heavy metals have a harmful effect along symbiosis stages from the infection to the biological nitrogen fixation (Zahran, 1999). Therefore, the use of rhizobia tolerant to heavy metals can help for the ecological success of their host plants in mining soils.

Lotus corniculatus and *Anthyllis vulneraria*, are two legumes belonging to the family *Fabaceae*, and the tribe *Loteae*. The compatibility of some strains associated with both of them has been mentioned previously (Abdel-Ghaffar and Jensen, 1966; Ampomah and Huss-Danell, 2011). Yet the compatibility and efficiency of strains nodulating *Anthyllis* and *Lotus* stills very poorly documented notably under metal constraints. *L. corniculatus* and *A. vulneraria* most frequently associate with strains belonged to the genus *Mesorhizobium* (Ampomah and Huss-Danell, 2011). (Mohamad et al., under review) showed that strains belonging to symbiovar anthyllidis and others belonging to symbiovar loti were isolated from nodules of *A. vulneraria* suggesting the interrelationships between the two symbiovars according to the host plant *Anthyllis* or *Lotus* that may induce difference in nodulation, efficiency and competitiveness. *L. corniculatus* is a perennial species, with an ecological importance due to ecotypes able to adapt to a broad range of environmental conditions (Aydemir and Sünger, 2011; Escaray et al., 2012). A metal-tolerant ecotype of *L. corniculatus* was found in Montdardier mine (Cévennes, France) at a 10-kilometer distance from the Avinières mine where the metal tolerant species *Mesorhizobium metallidurans* associated with *A. vulneraria* was firstly detected (Vidal et al., 2009). *A. vulneraria* is a biennial legume, considered as a facilitator for vegetalizing mining sites (Frérot et al., 2006) due to its privileged association with *M. metallidurans* (Frérot et al., 2006). (Mahieu et al., 2011) demonstrated the high effectiveness of the *A. vulneraria*/*M. metallidurans* symbiosis in a mine soil (Avinières 1 in Cévennes), which was extremely contaminated in Zn, Pb and Cd. A previous study was focused on the genetic diversity and speciation of isolates associated with *A. vulneraria* under different levels of heavy metals (Mohamad et al., under review). For now, six species isolated from *Anthyllis* root nodules were identified from contaminated and uncontaminated soils: *M. metallidurans* (a metal-tolerant species found in Avinières mine) (Vidal et al., 2009), *Aminobacter anthyllidis* (a moderately tolerant species isolated from two mines) (Maynaud et al., 2012), *Mesorhizobium delmotii* and *Mesorhizobium prunaredense*, two metal-sensitive species isolated from a border-mine and an uncontaminated site respectively (Mohamad et al submitted), *Mesorhizobium escarrei* and *Mesorhizobium faucesventi*, two other metal-sensitive species isolated from uncontaminated sites (Mohamad et al. in preparation). Expect for *A. anthyllidis* type strain displaying the symbiovar loti, the type strains of the five other species fell in symbiovar anthyllidis. On the other hand, *Mesorhizobium loti* was the first species isolated from *L. corniculatus* root nodules (Jarvis et al., 1982). Preliminary tests showed that strains having symbiovar loti were able to establish effective nodules with *A. vulneraria* and *L. corniculatus*, while *Anthyllis*-nodulating strains with symbiovar anthyllidis were not able to nodulate *L. corniculatus* (unpublished data). The plant's metal tolerance could be enhanced by symbiotic rhizobia (Kong et al., 2015). Thus, the adaptation of an ecotype of *L. corniculatus* to heavy metals may be promoted by phenotypic and genetic composition of its associated rhizobia.

Therefore, in this work we studied the phenotypic and genetic structure of rhizobial populations associated with *L. corniculatus* in contaminated and moderately contaminated soils by Zn and Cd.

Analyses based on taxonomic, symbiotic and metal-resistance genetic markers combined with metal-tolerance and symbiosis phenotypic tests were performed to estimate the taxonomical and functional diversity of *Lotus*-nodulating rhizobia in relation to contamination levels of soils and were compared with symbiotic populations of *A. vulneraria*. This work allows highlighting the genetic structure of rhizobia associated with *L. corniculatus* in highly and moderately contaminated soils to facilitate the detection and selection of symbiotic organisms potentially beneficial for promoting a phytostabilization strategy based on rhizobium-legume interactions.

MATERIALS AND METHODS

Site and soil sampling. Soils were sampled from four sites in the Cévennes area in south of France: two originated from mine sites (one located at the Avinières mine called AH1 and one at Montdardier mine called MD1) whereas the two other ones were from their respective mine borders (named Avinières 2 (AH2) and Montdardier 2 (MD2)). For each of the four sites, five soil sub-samples were collected across the site at a depth of 1-10 cm and mixed together except for site MD1 where sub-samples showed heterogeneity based on soil color and vegetation cover density and were separately kept. Georeferenced coordinates of sampling points were: AH1 (43°55'56.19''N, 3°39'47.21''E. elevation 246 m); AH2 (43°56'01.20''N, 3°39'48.12''E. elevation 277 m); MD1 (43°56'01.68''N, 3°36'33.40''E. elevation 492 m); MD2 (43°55'50.94''N, 3°36'27.80''E. elevation 547 m).

Soil analyses. Soil samples were homogenized and sifted through a 2-mm mesh sieve for further physico-chemical soil analyses (soil texture, $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$, organic carbon and total nitrogen, Cation Exchange Capacity (CEC) and heavy metal concentrations (Zn, Pb and Cd)). Heavy metal concentrations were determined using the BCR (European Community Bureau of Reference) method (Quevauviller et al., 1997) by the laboratory of INRA (Arras France): 5 g of air-dried soil sieved to 2 mm were shaken 1h at 20°C in a 0.05 M EDTA solution of ammonium salt (pH 7) with a ratio soil/EDTA solution of 1/10 (w/v). The extracts were centrifuged, filtered and analyzed by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES-VarianVista MPX) except for Chrome (Cr) which was measured by Atomic Absorption with Electrothermal Atomization (AAET-VarianVista MPX).

Rhizobial trapping and isolation. Seeds from local populations of *Lotus corniculatus* growing in the Montdardier mine and *Anthyllis vulneraria* subspecies *carpatica* growing in the Avinières mine, were collected and used for trapping bacterial strains with soils sampled in the four study sites (AH1, MD1, AH2 and MD2). Six weeks later, nodules were harvested and surface-

sterilized with 300 µl of 3% calcium hypochlorite for 2 min, rinsed 5 times with sterile Milli-Q water and crushed in 50 µl of sterile water (Vidal et al., 2009). Data on *Anthyllis* and *Lotus* plants nodulated after rhizobial trapping were analyzed using two-factors-ANOVA (sites, plant hosts), or one-factor ANOVA (sites) for each plant. The bacterial suspensions were streaked on Yeast Extract Mannitol (YEM) agar plates and incubated at 28 °C. Bacterial colonies appeared after 2-4 week incubation and single colonies were purified by repeated streaking on YEM agar. Isolates were stored at -80 °C in 20% glycerol (v/v). The list of *Lotus*- and *Anthyllis*-nodulating rhizobial strains used in the present study is presented in Table IV-2-S1.

DNA extraction and sequencing. Genomic DNA of all isolats was extracted according to a standard phenol-chloroform extraction method (Chen and Kuo, 1993) and stored at -20°C. Near full-length 16S rRNA genes were amplified by PCR method as previously reported (Vidal et al., 2009). Internal fragment of approximately 500 bp of *recA* and *atpD* were amplified by using primer pairs *recA* 63f/504r and *atpD* 294f/771r (Gaunt et al., 2001) with a hybridization step of 30 seconds at 57 °C. For *nodA*, 500-bp fragments were amplified with *nodA* F21Meso/R591Meso primers (Maynaud et al., 2012) using a hybridization step of 30 seconds at 55 °C. Some isolates within symbiovars anthyllidis or loti contained two copies of *nodA*. To detect copies of symbiovar anthyllidis, specific primers *nodA1*-sv.anthyllidis STM3315 forward (5' TCTGCTCGACGCGACAAGC 3') and STM3316 reverse (5' TCTTCGGTGCCGTCAGCG 3') were used to amplify the *nodA1* copy (inside the *nodABC* operon), and the set of primers *nodA2*-sv.anthyllidis STM3313 forward (5' TGCCTCTATGCCGCGATGAGC 3') and STM3314 reverse (5' ATGAGTCCGGCTGGTCTGCG 3') was used to amplify the *nodA2* copy in *nodFEGA* cluster (Mohamad et al., under review). To detect *nodA* copies of symbiovar loti, two sets of primers were designated with sequences of the strain *M. loti* NZP2037 previously described as a broad host-range strain harboring two *nodA* genes (Kasai-Maita et al., 2013): primers *nodA1*-sv.*loti* STM4851 forward (5' GAATTGCAGCTTCCGATCAC 3') and STM4850 reverse (5' GTCCAATTGGGAGCACCAT 3') allows the amplification of the *nodA1* copy and the set of primers STM4855 forward (5' GGCCTTCAACGCAAACCAT 3') and STM4856 reverse (5' CGTTCAATCGGCACAACCAC 3') the amplification of *nodA2*. PCR cycling conditions involved an initial 5' min denaturation step at 96°C, followed by 35 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 52°C, and 1' at 72°C, and a final elongation step of 7' min at 72°C. A 700-bp fragment of the *cadA* metal-resistance gene encoding a P_{1B}-type ATPase efflux transporter (HE820903) was amplified using primers designed from the STM2683^T genome (Maynaud et al., 2014), STM2612f/STM2613r with a hybridization step of 45 seconds at 57°C (Mohamad et al., under review). All PCR amplifications were performed with GO *Taq* polymerase (Promega). PCR products were run on 1% agarose gels stained with ethidium bromide in TAE 1X. The corresponding bands were gel extracted, purified with the QIAGEN kit and then sequenced by GenoScreen Company (Lille, France) using the BigDye Terminator v3.1. kit.

Estimation of bacterial tolerance to metals. Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) defined as the lowest metal concentration that inhibited visible growth, were determined in 96-well microplates using YEM liquid medium. Rhizobial strains were pre-cultured for 4 days, and each culture was adjusted at OD_{600nm} = 0.5 before inoculation. One hundred and fifty µl of YEM medium containing increasing concentrations of metal (0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, and 18 mM ZnSO₄ and 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1, 1.5, 2, 3, 5 and 7 mM CdCl₂) or no metal (positive control) were inoculated with 10 µl of a 4-day pre-culture at the optical density (OD) of 0.5 and incubated at 28°C on an orbital shaker (350 rpm). Growth was monitored for 2 weeks by reading the OD_{600nm} using a spectrofluorometer (TECAN Infinite M200). MIC assays were performed in triplicate for each isolate.

Phylogenetic analyses. Phylogenetic analyses of 16S rRNA, *recA*, *atpD* and *nodA* were performed using nucleotide sequences, and those of *cadA* using amino-acid sequences due to high nucleotidic divergences within ATPase pumps. Sequences were manually corrected and optimized with BioEdit v7.1.3.0 (Hall, 1999) and the sequence alignment was optimized using GeneDoc v2.7.000 (Nicholas and Nicholas, 1997). Phylogenetic constructions were carried out in MEGA6 (version 6.0.6) (Tamura et al., 2013) using CLUSTALW implementation for final alignment. Except for *CadA* phylogenetic tree, all other trees (16S rDNA, *recA*, *atpD*, *nodA* and the concatenated tree of 16S rDNA, *recA* and *atpD*) were inferred by the Maximum-Likelihood (ML) method using the best fitted ML model and parameters as indicated by the lowest Bayesian Information Criterion score. Tree topologies were tested using 1000 bootstrap replicates. In contrast, the *CadA* phylogenetic tree was constructed by Neighbour-Joining (NJ) method using Kimura two-parameters model. Trees were rooted using *Bradyrhizobium japonicum* sequences for 16S rDNA, *recA* and *atpD* phylogenies, *B. elkanii* for *nodA* phylogeny and *Chelativorans multitrophicus* for *CadA* phylogeny as outgroups.

Draft genome sequencing and assembly. Four representative strains have been chosen to sequence their whole genomes (STM9308, STM9357, STM9373 and STM9818). These strains were grown in 250 ml of broth YEM and DNA isolation was performed using a CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) bacterial genomic DNA isolation method (William and Feil, 2012). DNA quality and quantity were evaluated on a Nanodrop spectrometer. The draft genomes of four strains were produced using Illumina Hiseq technology (Nextera XT kit) at Montpellier Genomix platform (MGX), with paired-end sequencing on 700 bp fragments. Sequences were assembled on CLC Genomic workbench v5 as described in (Diouf et al., 2015). The draft genome sequences were uploaded into the MicroScope platform (Vallenet et al. 2009) and subjected to the automatic annotation pipeline. The genome sequences are available and can be browsed at the Genome Browser MaGe interface (<https://ww.genoscope.cns.fr/agc/microscope/mage/viewer.php>).

Average Nucleotide Identity (ANI) & DNA-DNA Hybridization (DDH) *in silico*. To estimate whether STM9308, STM9357, STM9373 and STM9818 belong to separated genospecies, the Average Nucleotide Identity (ANI) (Goris et al., 2007) (Richter and Rossello-Mora, 2009) and *in silico* based DNA-DNA Hybridization (DDH) estimates (Meier-Kolthoff et al., 2013) were calculated. The alignment options used for the ANI calculation were 30% minimal identity over more than 700 bp in fragment windows of 1000 bp with a 200 bp step size on reciprocal best hits (two-way ANI). For the DDH measurement, we used the Genome to Genome Distance Calculator (GGDC) with the BLAST+ alignment method and the recommended formula (identities / High-scoring Segment Pair lengths). The probability that DDH > 70% was estimated as described by Meier-Kolthoff and colleagues (2013). Genomes were compared with each other and with complete genome assemblies downloaded from NCBI for the following strains: *M. delmotii* STM4623^T, *M. prunedense* STM4891^T, *Mesorhizobium faucesventi* STM4922^T, *Mesorhizobium escarrei* STM5069^T, *M. amorphae* CCNWGS0123^T (NZ_AGSN000000000), *M. australicum* WSM2073^T (NC_019973), *M. ciceri* WSM1271 (NC_014923), *M. huakuii* 7653R (NZ_CP006581), *M. huakuii* MAFF303099 (BA000012), *M. metallidurans* STM2683^T (CAUM000000000), *M. opportunistum* WSM2075^T (CP002279), *M. plurifarium* ORS1032^T (ERS517733), *M. alhagi* CCNWX J12-2^T (AHAM01000001), *M. erdmanii* USDA3471^T (NZ_KI421453), *Mesorhizobium* sp. STM4661 (CAAF000000000) and *M. loti* R7A (AZAM010000000).

Search of metal resistance genes in genome assemblies by Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). The sequence contigs (>200 bp) of the four genomes of STM9818, 9308, STM9357 and STM9373 were deposited in the Microscope platform (<https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/home/>) with the previously published genomes of *M. metallidurans* STM2683^T, STM4661 and *M. amorphae* CCNWGS012 (Maynaud et al., 2013; Maynaud et al., 2014; Xie et al., 2015). Tools of the Blast & pattern searches were used to look for homologs of the *cadA* gene or other genes involved in the resistance to heavy metal. For that, the amino acid sequence of each target gene of STM2683^T were blasted with the assembly of each genome draft deposited in the MicroScope platform. This analysis was realized using BlastP with homology constraints $\geq 0\%$ and identity $\geq 0\%$ to detect all homologs or specific gene fragments potentially involved in metal resistance to heavy metal.

Cross nodulation tests of representative strains. To investigate the nodulation ability of strains on *Lotus* and *Anthyllis*, fifteen representative strains were chosen according to their *nodA* gene patterns and origins as following. Four had the two *nodA* copies characteristic of symbiovar anthyllidis (strains STM9416, STM9436 (both from site AH1 and *Anthyllis* trapped), STM9780 (MD2, *Lotus*), in addition to *M. metallidurans* STM2683^T). Six had the two *nodA* copies corresponding to symbiovar loti (strains STM9305, STM9312, STM9818 (MD1, *Lotus*) and strains

STM9344, STM9342, STM9391 (MD1, *Anthyllis*). Finally, five had one *nodA* copy of symbiovar *loti* (STM9316 (MD1, *Anthyllis*), STM9313, STM9311 (MD1, *Lotus*), STM9378 (MD2, *Anthyllis*) and STM9373 (MD2, *Lotus*). Seeds of *L. corniculatus* (collected from the Montdardier mine MD1) and *A. vulneraria* subsp. *carpatica* (from Avinières mine AH1) were scarified and disinfected as previously described (Vidal et al., 2009). Seedlings were inoculated with individual strains by adding growing rhizobial cultures (10^7 cell per seedling). Seedlings were grown in tubes containing sterilized attapulgite and were placed in a growth chamber as previously described (Maynaud et al., 2012). Uninoculated seedlings and seedlings fertilized with 5 mM of N- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ were used as controls. Root nodules appeared 15-30 days after inoculation and were fully developed three weeks later. This test was followed by another one using the same strains with metal contaminated soil from mine site of Avinières. The soil was sterilized with gamma rays and then mixed with attapulgite (20% (wt/wt) and tubes containing both were autoclaved. Seeds and strains were prepared as described above. Eight weeks after inoculation, plants were harvested; numbers of nodules generated by individual inoculated strain were counted. Dry weights of plant material (roots, shoots and nodules) were taken after incubation at 60°C for one week. Some nodules were checked for strain identity and compared with the inoculated strain after isolate purification on YEM plates and typing by *recA* and *nodA* sequencing.

Nucleotide sequence accession numbers. The nucleotide sequences were deposited in the GenBank database under the following accession numbers: KU900639-656 for 16S rRNA genes; KU900657-689 for *recA* genes; KU877848-878 for *atpD* genes; KU900960-708 for *nodA* genes; KU900709-712 for *nodA1* genes (sv. *anthyllidis*); KU900717-718 for *nodA2* genes (sv. *anthyllidis*); KU900713-716 for *nodA1* genes (sv. *loti*), KU900719-724 for *nodA2* gene (sv. *loti*), KU900725-730 for *cadA* genes (see table IV-2-S2 in the supplementary data).

RESULTS

Soil characteristics. Heavy metal contents and physico-chemical characteristics of the four soils sampled are presented in Table IV-2-1. The two mine sites (MD1 and AH1) were highly contaminated in Zn (from 2020 in AH1 to 4216 ± 1434 mg kg⁻¹ in MD1), Pb (8250 mg kg⁻¹ in AH1 and 7634 ± 5365 mg kg⁻¹ in MD1) and Cd (22.3 mg.kg⁻¹ in AH1 and 25.5 ± 5.4 mg.kg⁻¹ in MD1). The two soil samples collected from the borders of the mines (AH2 and MD2) displayed low Zn and Cd contents compared to those from mine sites (88 - 122 mg Zn kg⁻¹, 1.04 - 9.07 mg Cd kg⁻¹ and 134 - 189 mg Pb kg⁻¹). All soils presented neutral to moderately alkaline pH. The organic matter was 1.6- to 3.2-fold lower in the two mine soils (AH1 and MD1) than in the mine border MD2, the total nitrogen contents were also lower (1.8- to 3.9-fold) in mine soils than in mine border MD2. By contrast, the MD1 mining soil contained more organic C and N than the mine soil AH1 (about x2) and reached these of the mine border AH2 (Table IV-2-1).

Rhizobial trapping and isolation. The number of nodules per plant collected on roots of *Lotus* and *Anthyllis* varied between sites with a strong interaction site x trap-plant (Table IV-2-2). Concerning *Lotus*, plants were significantly better nodulated when grown on Montdardier (MD1-MD2) soils than on soils of Avinieres (AH1 and AH2). The nodulation rate on *Lotus* was drastically reduced in the highly contaminated soil of AH1 (only 2 plants on 10 were found nodulated) Concerning *Anthyllis*, most of the plant-roots were found nodulated whatever the soil tested. Yet, the soil MD1 revealed a higher number of nodules per plant (means of 49.8) than the geographically close soil MD2 (12.1) (Table IV-2-2). Rhizobial isolation was more difficult from AH2 soil with success rates reaching 16.7% for *Anthyllis* and 25.7% for *Lotus* while they ranged from 55% to 94.3% in the other sites (Table IV-2-2). After isolation and purification from crushed root-nodules, a total of 170 isolates were obtained. Eighty-eight strains originated from nodules of *Lotus* plants (33 isolates from site MD1, 11 from AH1, 37 from MD2 and 7 from AH2) and 82 were isolated from *Anthyllis* root-nodules (31 isolates from MD1, 11 from AH1, 32 from MD2 and 8 from AH2).

TABLE IV-2-1: Physico-chemical characteristics of the studied soils and % of nodulated *Anthyllis* and *Lotus* plants used for rhizobial trapping. Soil metals were measured after soil extraction with a 0.05 M EDTA solution pH=7 (ratio 1:10 (w/v)).

Site of soil sample	Geographical origin	Silt (g kg ⁻¹)	Clay (g kg ⁻¹)	Sand (g kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)	Pb (mg kg ⁻¹)	Cd (mg kg ⁻¹)	Cu (mg kg ⁻¹)	Ni (mg kg ⁻¹)	Cr (mg kg ⁻¹)	pH water	Organic matter (g kg ⁻¹)	Total N (g kg ⁻¹)	CEC (cmol ⁺ kg ⁻¹)
Avinières mine (AH1)	Cévennes (France), Zn-Pb mine	245	26	728	2 020	8 250	22.3	1.18	0.413	0.145	7.9	27.5	1.2	3.6
Montdardier mine (MD1)	Cévennes (France), Zn-Pb mine	459.4 ± 74.9	136.4 ± 56.8	398.2 ± 88.1	4216 ± 1434.3	7634 ± 5365.5	27.57 ± 5.75	16 ± 7.7	1.8 ± 0.49	0.11 ± 0.064	7.5 ± 0.3	49 ± 31.1	2.85 ± 1.41	9.7 ± 4.9
Avinières mine border (AH2)	Cévennes (France), mine border	322	131	547	122	189	9.07	2.31	0.484	0.16	7.9	59.3	2.7	11.1
Montdardier mine border (MD2)	Cévennes (France), mine border	457	235	308	87.9	134	1.04	4.58	2.92	0.0595	7.7	87.5	4.7	20.1

TABLE IV-2-2: Data on *Anthyllis* and *Lotus* plants nodulated after rhizobial trapping on the four study sites, and the percentage of successful rhizobial isolation on YEM plates.

Site of soil sample	Trap host plant	Number of nodulated plants (n=10)	Total number of nodules	Nodule numbers per plant ^a	Number of nodules used for isolation	Number of strains isolated	Percentage of successful isolation
Montdardier mine (MD1)	<i>Anthyllis</i>	9	498	49.8 ± 35.8 a	36	31	86.1
	<i>Lotus</i>	9	337	33.7 ± 24.2 (a)	35	33	94.3
Montdardier border (MD2)	<i>Anthyllis</i>	9	121	12.1 ± 10.7 b	59	32	57.6
	<i>Lotus</i>	10	266	26.6 ± 19.6 (a)	55	37	69.1
Avinières mine (AH1)	<i>Anthyllis</i>	10	370	37 ± 30 ab	20	11	55
	<i>Lotus</i>	2	12	1.2 ± 3.16 (b)	12	11	91.7
Avinières border (AH2)	<i>Anthyllis</i>	10	233	23.3 ± 19.7 ab	54	8	16.7
	<i>Lotus</i>	10	95	9.5 ± 9.07 (b)	35	7	25.7
Total		69/80	1932		306	170	57.5

^a Means + SD followed by the same superscript letter are not significantly different (one-factor ANOVA for each trap host plant, followed by test post-hoc of Newman and Keuls, p < 0.05), data of *Lotus* are in bold. By 2-factor ANOVA, interaction site x trap plant host was significant (p-value=0.007) (data not shown).

Metal tolerance of strains according to isolation site and host plant

All the 170 *Lotus*- and *Anthyllis*- isolates were screened on growth media containing increasing metal concentrations in order to determine Zn- and Cd-MIC values (Table IV-3, Table IV-2-S1 and Fig. IV-2-1). All rhizobial strains trapped by *Lotus* and originating from mine soils (MD1 and AH1) were tolerant to Zn (MIC ≥ 1 mM) and 93.2% of them were tolerant to Cd (MIC ≥ 0.5 mM). About 90% of *Anthyllis*-isolates isolated from mine soils (MD1 and AH1) resisted to Zn (MIC ≥ 1 mM) whereas 65% were tolerant to Cd (MIC ≥ 0.8 mM). Only two strains (STM9335 and STM9340) recovered from nodules of *A. vulneraria* grown on MD1 mine soil were metal-sensitive (MIC of Zn = 0.5 mM and MIC of Cd = 0.1 mM). By contrast, all metal-sensitive strains associated with *L. corniculatus* were isolated from mine-border soils. 82% of *Lotus*-strains isolated from mine-borders were sensitive to Zn (MIC = 0.5 mM) and all isolates were sensitive to less than 0.5 mM of Cd. Regarding *Anthyllis* isolates obtained from mine-border soils, 72% were Zn-sensitive (MIC = 0.5 mM) and 88% of *Anthyllis* isolates were Cd-sensitive (MIC = 0.05-0.5 mM) (Fig. IV-2-1 and Table IV-2-S1). Only two strains isolated from AH2 site were Zn-tolerant; STM9438 (MIC of Zn = 1 mM) isolated from *A. vulneraria* and STM9426 (MIC of Zn = 8 mM) isolated from *L. corniculatus*. Intriguingly, MIC-Cd of *Anthyllis*-isolates were significantly lower than MIC-Cd of *Lotus*-isolates from the mine AH1 and the mine-border site MD2, while no significant difference was notified between *Anthyllis*- and *Lotus*-isolates about MIC-Zn data. Regardless the host plant, MIC-Cd values of strains from MD1 site were significantly higher than MIC-Cd of AH1-isolates contrary to MIC-Zn results. In addition, no-significant differences were obtained between AH1 and MD2 on MIC-Cd contrary to MIC-Zn (Table IV-2-S3).

Table IV-2-3: Metal tolerance and phylogenetic characteristics of the 170 strains isolated from *Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulneraria* root nodules used in this study.

Origin site	Plant host used for trapping	No. of isolates	MIC		Phylogenetic group									
			Zn (mM)	Cd (mM)	16S ^b	<i>recA</i> ^b	<i>atpD</i> ^b	<i>nodA</i> ^c	CadA ^d	concatenated (16S, <i>atpD</i> , <i>recA</i>) ^c				
Montdardier mine	<i>A. vulneraria</i>	STM9316	>4	0.5≤MIC≤1	SI	RII	AIV	N2	CI	TI				
MD1	(n= 31) ^a	STM9317, STM9321-22, STM9328, STM9811, STM9332, STM9339	>4	>1	SIV	RVI	AVI	N2	CI	TI				
		STM9336		0.5≤MIC≤1										
		STM9345												
		STM9323	1≤MIC≤4	<0.5					N3					
		STM9391	>4	0.5≤MIC≤1										
		STM9341		>1										
		STM9338		<0.5					AII		N2	ND ^g	TIV	
		STM9344							AIV		N3	CI	TI	
		STM9335	<1					SIV	RVI		AVI	N2	ND	TII
		STM9324	>4	>1				SIII	RIII		AI			TV
		STM9325, 29, 34	1≤MIC≤4	0.5≤MIC≤1								N3		
		STM9326	>4											
		STM9327		>1										
		STM9330	1≤MIC≤4	<0.5										
		STM9342, STM9809, STM9318, 20		>1										

		STM9343	>4	<0.5						
		STM9796, STM9319		$0.5 \leq \text{MIC} \leq 1$				N2		
		STM9340	<1	<0.5						
Montardier mine MD1	<i>L. corniculatus</i> (n=33)	STM9288-90, STM9294-98, STM9300-01, STM9306, STM9309, STM9311, STM9816	>4	>1	SI	RII	AIV	N2	CI	TI
		STM9305						N3		
		STM9313			$0.5 \leq \text{MIC} \leq 1$				N2	
		STM9820			>1					
		STM9314			<0.5					ND
		STM9292	$1 \leq \text{MIC} \leq 4$	$0.5 \leq \text{MIC} \leq 1$	SIII	RIII	AI	N3		TV
		STM9293, STM9304						N2		
		STM9291	>4					N3		
		STM9303	$1 \leq \text{MIC} \leq 4$	<0.5						
		STM9302	>4	$0.5 \leq \text{MIC} \leq 1$				N2		
		STM9308		>1						
		STM9310	$1 \leq \text{MIC} \leq 4$							
		STM9312, STM9818	>4	$0.5 \leq \text{MIC} \leq 1$				N3		
		STM9819, STM9808						N2		
		STM9299		>1						
		STM9286						N3		
STM9287	$1 \leq \text{MIC} \leq 4$	$0.5 \leq \text{MIC} \leq 1$								
Avinières mine (AH1)	<i>A. vulneraria</i> (n=11)	STM9416	>4	$0.5 \leq \text{MIC} \leq 1$	SI	RII	AIV	N1	CI	TI
		STM9417, STM9421-22, STM9425, STM9807	>4	<0.5						
		STM9423	$1 \leq \text{MIC} \leq 4$	<0.5						

		STM9756	>4	>1						
		STM9420	$1 \leq \text{MIC} \leq 4$	$0.5 \leq \text{MIC} \leq 1$						
		STM9419	>4	<0.5						
		STM9418	>4	<0.5			AVI			
Avinières mine (AH1)	<i>L. corniculatus</i> (n=11)	STM9407	>4	>1	SI	RII	AIV	N2	CI	TI
		STM9409, STM9411-14								
		STM9408		$0.5 \leq \text{MIC} \leq 1$						
		STM9415								
		STM9758								
		STM9410								
		STM9757		<0.5						
Montardier border mine MD2	<i>A. vulneraria</i> (n=32)	STM9377	>4	<0.5	SIV	RVI	AVI	N2	CII	TII
		STM9380								
		STM9386		>1						
		STM9389								
		STM9383-84	<1	<0.5						
		STM9387	$1 \leq \text{MIC} \leq 4$	$0.5 \leq \text{MIC} \leq 1$						
		STM9394		<0.5						
		STM9395-97	<1							
		STM9399	$1 \leq \text{MIC} \leq 4$							
		STM9400	<1							
		STM9403	$1 \leq \text{MIC} \leq 4$	$0.5 \leq \text{MIC} \leq 1$						
		STM9792-93	<1	<0.5						

		STM9398	>4	>1			AIV		
		STM9381-82, 85; STM9401-02; STM9392-93; STM9405; STM9812; STM9376, 79	<1	<0.5			AVI	ND	
		STM9378	1≤MIC≤4	0.5≤MIC≤1					
		STM9404		0.5≤MIC≤1		RII	AIV		TI
		STM9390	<1	<0.5	SV	RVIII	AVII	ND	TVI
		STM9821	<1	<0.5	SII	RI	AIII	ND	TIII
Montardier border mine MD2	<i>L. corniculatus</i> (n=37)	STM9347, STM9349	<1	<0.5	SIV	RVI	AVI	N2	CII
		STM9351, STM9356, STM9370	1≤MIC≤4						
		STM9357-58, STM9360	<1						
		STM9368	>4			RIII			
		STM9352-54; STM9359, 61, 63, 65-67, 69; STM9372-75; STM9773, 75-76, 78-79; STM9346, 50	<1			RV		ND	
		STM9371		0.5≤MIC≤1					
		STM9774	1≤MIC≤4	<0.5					
		STM9782							
		STM9348	>4						
		STM9777	<1					N3	
		STM9780					AIV	N1	
		STM9355			SII	RI	AIII	N2	TIII
Avinières border mine (AH2)	<i>A. vulneraria</i>	STM9436	<1	<0.5	SII	RI	AV	N1	ND
		STM9444							

	(n=8)	STM9817									
		STM9442									
		STM9440									
		STM9791									
		STM9438									1≤MIC≤4
		STM9443									<1
Avinières border mine (AH2)	<i>L. corniculatus</i> (n=7)	STM9432	<1	<0.5	SII	RI	AIII	N3	ND	TIII	
		STM9435						ND			
		STM9801, 05						N3			
		STM9799						N2			
		STM9434			SV	RVIII	AVII	ND		TVI	
		STM9426	>4	0.5≤MIC≤1	SVI	RIX	AVIII	N2		TVIII	

^a n, total number of isolates for each soil sample.

^b Clusters SI to SVI, RI to RVII and AI to AVII as defined by phylogenetic groupings of 16S rRNA, *recA* and *atpD* trees respectively.

^c Clusters (TI-TVIII) correspond to the different groups defined by concatenated phylogenetic tree that includes 176 sequences.

^d CI-CII: indicate the two groups of mesorhizobial isolates containing *cadA* marker.

^e N1 isolates containing two *nodA* copies of symbiovar anthyllidis, N2 shows isolates containing one *nodA* copy of symbiovar loti, N3 encompasses strains containing two *nodA* copies of symbiovar loti

[§] ND not detected by PCR amplification

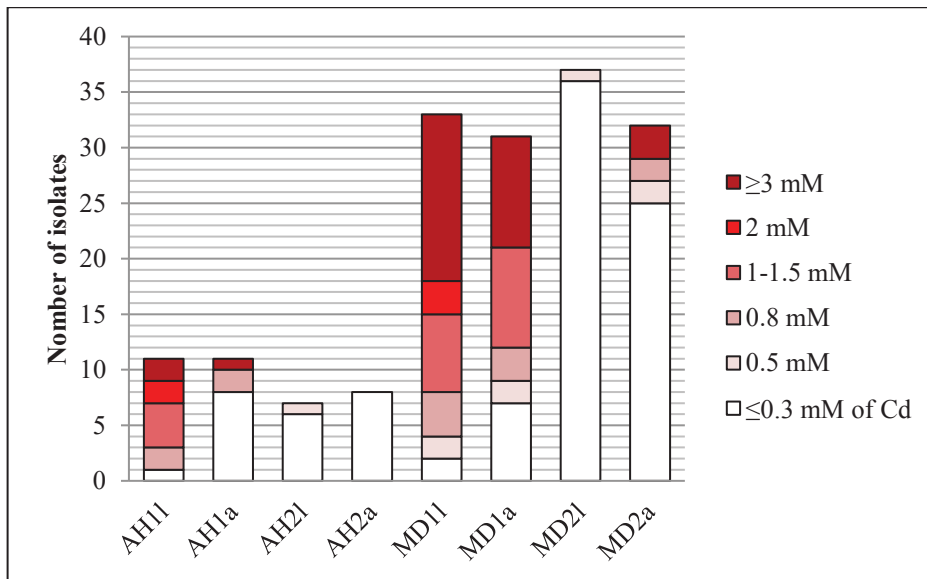
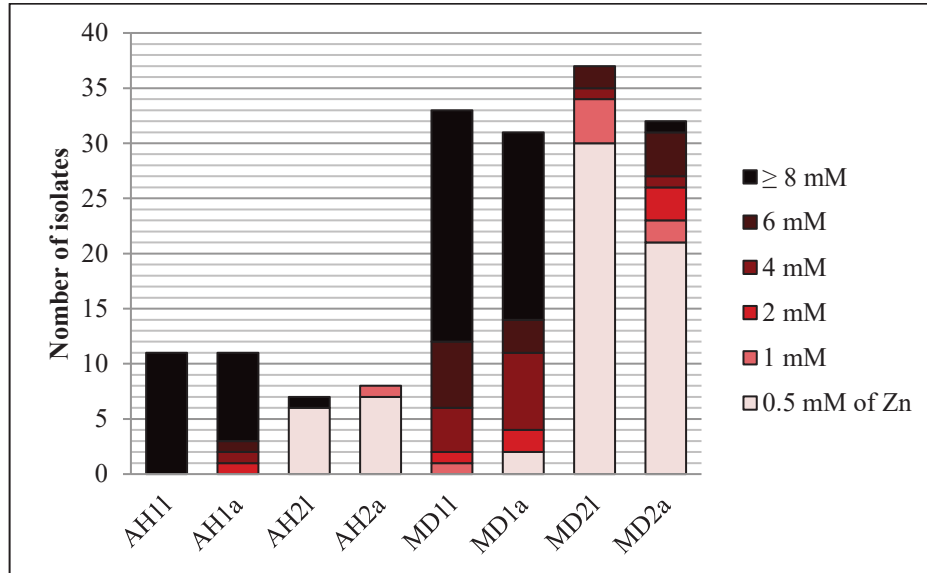


Fig. IV-2-1: Zn (A) and Cd (B) MIC data of the 170 *Anthyllis*- and *Lotus*-rhizobia studied and classified by their sites of origin. The OD_{600nm} was assessed after two-week growth in YEM medium. The results are the means of three replicates. Bars indicate the standard deviations from the means (\pm SD).

Phylogenetic relationships of *Lotus* rhizobial isolates using 16S rRNA, *recA* and *atpD* marker genes in comparison with *Anthyllis* isolates:

The 16S rRNA phylogenetic tree encompassing all the 170 *Lotus*- and *Anthyllis*-isolates and their closely related type strain sequences is shown in Fig. IV-2-2. 95.9% of our isolates belonged to the genus *Mesorhizobium*, 3.5% belonged to the genus *Rhizobium* and 0.6% (corresponding to one strain isolated from a *Lotus* root-nodule) belonged to the genus *Bradyrhizobium*. The 170 isolates distributed in six clusters. Clusters from SI to SIV included strains of *Mesorhizobium*, while the cluster SV encompasses strains belonging to the genus *Rhizobium*: this latter included five strains isolated from *Anthyllis* root-nodules and mine border sites (STM9390 from MD2 site; STM9443, STM9438, STM9440 and STM9791 from AH2 site) and one *Lotus* isolate (STM9434 from AH2). STM9390 and STM9443 grouped with *Rhizobium giardinii* while STM9434, STM9791, STM9438 and STM9440 were related to *Rhizobium leguminosarum*. Cluster SVI contained one strain isolated from *Lotus* (STM4926 from AH2 site) that grouped with *Bradyrhizobium japonicum* (Tables IV-2-3 & IV-2-S1 and Fig. IV-2-2). Clusters SII and SIV contained *Lotus* and *Anthyllis* mesorhizobial strains isolated from mine-border soils. Cluster SII included all *Lotus*- and *Anthyllis*-strains of *Mesorhizobium* isolated from AH2 site and two strains isolated from MD2 site (one *Anthyllis* isolate STM9821 and one *Lotus* isolate STM9355). All strains in cluster SII were identical (at 1138 nt of 16S rDNA sequences) to the type strain of *Mesorhizobium delmotii*, *Mesorhizobium prunaredense*, *Mesorhizobium escarrei*, *Mesorhizobium faucesventi*, *M. mediterraneum* and *M. temperatum*. Cluster SIV contained mainly, mesorhizobial strains isolated from MD2 site and one strain (STM9335) isolated from MD1 site, all strains were identical to *M. amorphae* at 1138nt. Clusters SI and SIII included all mesorhizobial strains isolated from mine sites MD1 and AH1, except STM9335 and STM9338. Cluster SI contained all *Lotus* and *Anthyllis* strains isolated from AH1 and 32 strains isolated from MD1 (18 *Lotus* strains and 14 *Anthyllis* strains), all isolates in cluster SI were identical to *M. metallidurans*, *M. tianshanense*, *M. gobiense* and *M. tarimense*, except for STM9338 closely related to *M. caraganae* (one nt of difference). Cluster SIII contained mainly, mesorhizobial isolates from MD1 mine site (15 strains isolated from *Lotus* and 15 from *Anthyllis* root nodules), our isolates grouped in the branch SIII-2 were identical to the type strain of *M. loti*, while STM9340 in branch SIII-1 was identical to *M. shangrilense*; and two *Anthyllis* strains STM9318 and STM9809 were related to *M. loti*, *M. ciceri* and *M. cantuariense* (separated by 1-3/1138 nt). The number of branches in each cluster was very limited: for example, regarding mesorhizobial isolates, cluster SII contained three branches (SII-1 to SII-3), SI and SIII four branches (SII-1 to SII-4), SIII-1 to SIII-4), and SIV contained a unique branch (SIV-1). Thus, to refine the distinction and affiliation of our isolates, especially *Mesorhizobium* isolates, into different species, housekeeping genes were sequenced (*recA* and *atpD*) and separated phylogenetic trees of each of them were constructed as presented in Fig. IV-2-S1 (A) and (B) respectively. *recA* phylogenetic tree had the same topology as 16S rDNA tree, except for STM9368 and STM9404 originated from the mine border MD2 which were not clustered in the same way, and grouped with

strains isolated from MD1 and AH1 (branches RII-1 and RIII-1, Fig. IV-2-S1 (A)). Phylogenetic tree of *recA* sequences is composed of nine clusters (from RI to RIX) and phylogenetic tree of *atpD* sequences of eight clusters (from AI to AVIII). The two phylogenetic trees grouped mainly, strains from mining and border-mine sites in separated clusters, indicating a rhizobial geographic distribution related to metal levels in the soil. To consolidate bootstraps a concatenated tree of 16S rDNA and two housekeeping genes (*recA* and *atpD*) was constructed (Fig. IV-2-3). Keeping a compatible topology with the 16S rDNA tree, the concatenated tree notably allows more distinction among isolates. Eight clusters were distinct among concatenated tree (from TI to TVIII). Clusters from TI to TV contained all isolates of the genus *Mesorhizobium*; while cluster TVI contained six isolates of the genus *Rhizobium* and TVII contained one strain of *Bradyrhizobium*. All mesorhizobia isolated from MD2 and AH2 border-mine sites were grouped in two clusters TII and TIII, except STM9404. Cluster TIII contained all mesorhizobial strains from AH2 site and two strains from MD2 site (STM9821 trapped with *Anthyllis* and STM9355 trapped with *Lotus*), and this cluster was divided into six branches, the branch TIII-6 including STM9436, STM9444 and STM9817 was identical to the type strain of *Mesorhizobium delmotii*, while the branches from TIII-1 to TIII-5 were closely related to strains of the species *Mesorhizobium prunaredense*. Cluster TII mainly contained, isolates from MD2 border-mine site (29 *Anthyllis*-isolates and 36 *Lotus*-isolates) and only one *Anthyllis*-isolate (STM9335) recovered from MD1 mine, and related to the species *M. amorphae* and *M. septentrionale*. All mesorhizobial isolates from mine sites MD1 and AH1 were grouped into two clusters (TI and TV) except two strains (STM9338 in cluster TIV and STM9335 in cluster TII). All isolates from AH1 mine site belonged to *M. metallidurans*, except one *Anthyllis*-isolate (STM9418) that fall closely related to STM4661 (branch TI-17) and appeared to belong to an unknown species. The strains from the MD1 mine site were distributed between TI (18 *Lotus*-isolates and 14 *Anthyllis*-isolates), TIV (one *Anthyllis*-isolate STM9338) and TV (15 *Lotus*-and 15 *Anthyllis*-isolates). STM9338 in cluster TIV was closely related to *M. caraganae*. Isolates in cluster TV were closely related to the species of *M. ciceri* and *M. loti*, except STM9340 which grouped with the type strains of *M. australicum* (Tables IV-2-3 & IV-2-4, Fig. IV-2-3).

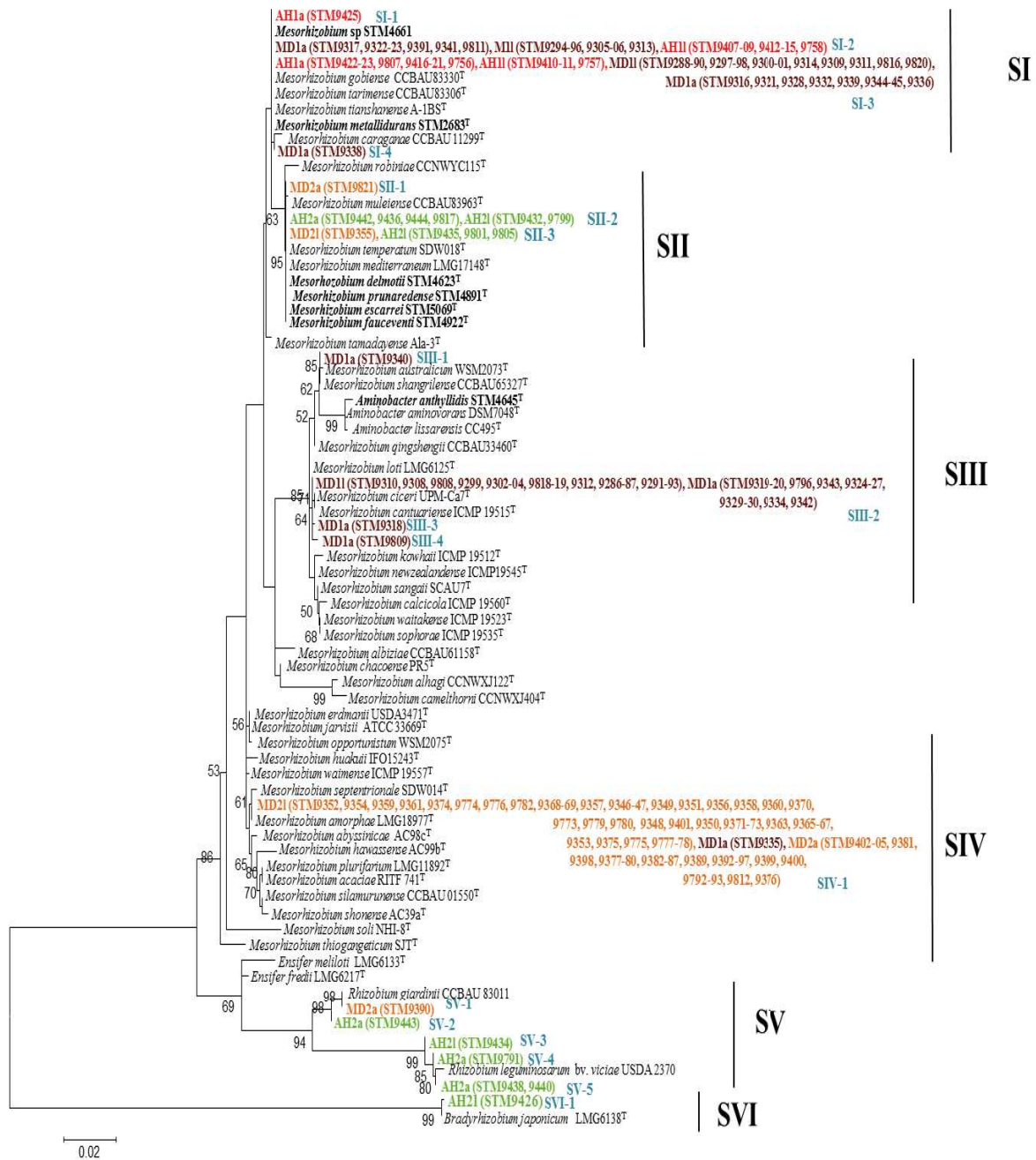


Fig. IV-2-2: Maximum-Likelihood phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences, showing the relationships between isolates nodulating *Anthyllis vulneraria* and *Lotus corniculatus* and reference strains. The analysis was based on 1138 nt. The tree was constructed using K2+G+I model. Genbank accession numbers are given in table IV-2-S2 and the significance of each branch is indicated by a bootstrap value (> 50%) calculated for 1000 subsets. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions *per* 100 nucleotides. The color of *Anthyllis*-isolates (a) and *Lotus*-isolates (l) are shown according to isolation site; the isolates from MD1, AH1, MD2 and AH2 are in brown, red, orange and green respectively.

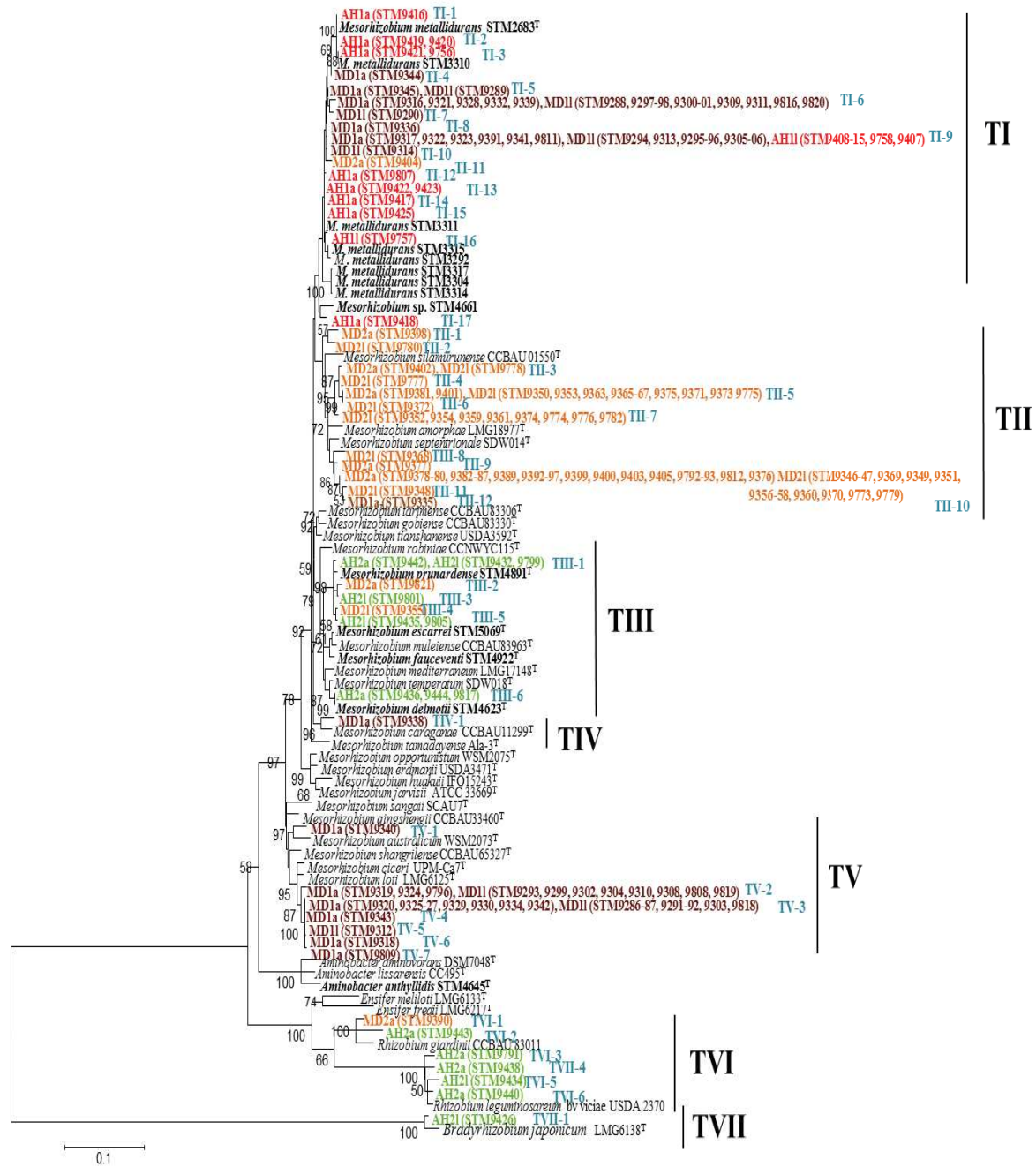


Fig. IV-2-3: Maximum-Likelihood concatenated phylogenetic tree based on 16S rRNA, *atpD* and *recA* gene sequences showing the relationships between the *Anthyllis vulneraria* and *Lotus corniculatus* isolates used in this study and reference strains. The analysis was based on 1086 nt for 16S rRNA gene sequences, 378 nt for *atpD* gene sequences and 255 nt for *recA* gene sequences. The tree was constructed using TN93+G+I model. Genbank accession numbers are given in table IV-2-S2 and the significance of each branch is indicated by bootstrap values calculated for 1000 subsets. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per 100 nucleotides. Colors of *Anthyllis*-isolates (a) and *Lotus*-isolates (l) are shown according to their isolation site: isolates from MD1, AH1, MD2 and AH2 are in brown, red, orange and green respectively.

Table IV-2-4: Numbers of isolates from *Anthyllis* and *Lotus* nodules (n=170) belonging to each phylogenetic group defined by 16S rRNA, *recA*, *atpD*, *CadA* and *nodA* typing.

Soil sample	Plant species	n ^a	16S rRNA phylogenetic tree																	concatenated phylogenetic tree								
			SI-1	SI-2	SI-3	SII-1	SII-2	SII-3	SII-4	SIII-1	SIII-2	SIII-3	SIII-4	SIV-1	SV-1	SV-2	SV-3	SV-4	SV-5	SVI-1	TI	TII	TIII	TIV	TV	TVI	TVII	TVIII
MD1	<i>Anthyllis</i>	32	0	0	0	1	8	6	1	1	1	12	1	1	0	0	0	0	0	0	14	0	1	0	1	15	0	0
	<i>Lotus</i>	33	0	0	0	0	12	6	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	0	0	15	0	0
AH1	<i>Anthyllis</i>	18	0	0	0	0	10	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	1	0	0	0	0	0	0	
	<i>Lotus</i>	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	
MD2	<i>Anthyllis</i>	31	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	29	1	0	0	0	0	1	0	0	1	29	0	1	0	
	<i>Lotus</i>	38	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37	0	0	0	0	0	0	0	0	1	36	0	0	0	
AH2	<i>Anthyllis</i>	8	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	0	0	0	0	4	0	0	4	0	
	<i>Lotus</i>	7	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	5	0	0	1	1	
Total		170	6	4	1	1	33	20	1	1	1	27	1	67	1	1	1	1	2	1	54	1	1	11	66	30	6	1

Soil sample	Plant species	<i>recA</i>						<i>atpD</i>						<i>CadA</i>			<i>nodA</i>				
		RI	RII	RIII	RIV	RV	RVI	AI	AII	AIII	AIV	AV	AVI	AVII	CI	CII	ND ^b	N1	N2	N3	ND
M1	<i>Anthyllis</i>	15	0	1	15	0	0	16	0	0	1	15	0	0	14	0	17	0	16	15	0
	<i>Lotus</i>	18	0	0	15	0	0	17	0	0	0	15	0	0	17	0	16	0	25	8	0
AH1	<i>Anthyllis</i>	11	0	0	0	0	0	10	0	0	1	0	0	0	11	0	0	11	0	0	
	<i>Lotus</i>	11	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	11	0	0
M2	<i>Anthyllis</i>	1	1	28	1	1	0	2	1	0	28	0	1	0	0	17	17	2	30	0	2
	<i>Lotus</i>	0	1	36	0	0	0	1	1	0	35	0	0	0	0	9	29	1	36	1	0
AH2	<i>Anthyllis</i>	0	4	0	0	4	0	0	1	3	0	0	4	0	0	9	4	1	0	4	
	<i>Lotus</i>	0	5	0	0	1	1	0	5	0	0	0	1	1	0	9	0	2	5	2	
Total <i>Anthyllis</i> and <i>Lotus</i>		56	11	65	31	6	1	57	8	3	65	30	6	1	53	26	68	18	121	29	8

^a n, total number of isolates for each soil sample. ^b ND: not detected by amplification.

Affiliation of the isolates into the species *M. metallidurans* or other mesorhizobial species associated with *A. vulneraria*

Until now, six symbiotic species associated with *A. vulneraria* have been defined; *M. metallidurans* (from Avinières mine), *Aminobacter anthyllidis* (from Eylie mine), *M. delmotii* (from AH2), *M. prunaredense* (from an uncontaminated site, La Prunarède in Cévennes), *Mesorhizobium faucesventi* and *Mesorhizobium escarrei* (from an uncontaminated site, Col du Vent in Cévennes).

M. metallidurans, is until now the only defined species among the genus *Mesorhizobium*, tolerant to heavy metals and isolated from mining sites. To delimit clusters encompassing strains from this species, we notified in the concatenated tree all reference strains of *M. metallidurans* previously validated (Vidal *et al.*, 2009) and found that cluster TI (Fig. IV-2-3) corresponds to strains belonging to *M. metallidurans*. This cluster encompassed isolates obtained from the mine site AH1 whatever the trap host plant used and 45-55% of strains isolated from MD1 associated to *A. vulneraria* and *L. corniculatus*, respectively and one metal-tolerant strain (STM9404) associated with *Anthyllis* isolated from MD2. *M. metallidurans* was not detected in mine-border sites but in mine soils with high levels of heavy metal. In the MD1 mine, some strains although metal-tolerant, were not affiliated to *M. metallidurans* and they may belong to another novel species (cluster TV in Fig. IV-2-3). Besides, one metal-tolerant strain (STM9418) from AH1 was related to a previous characterized high metal-tolerant strain *Mesorhizobium* sp. STM4661 (Maynaud *et al.*, 2013). Concerning the metal-sensitive strains, in AH2 site, three *Anthyllis*-isolates were identical to the *M. delmotii* type strain while the rest of the *Lotus*- and *Anthyllis* mesorhizobia grouped with *M. prunaredense* (Fig. IV-2-3). In MD2 site, only two strains (STM9821 from *Anthyllis* and STM9355 from *Lotus*) could be affiliated to the species *M. prunaredense* while all other strains belonged to one or several potential new species closed to *M. ciceri* and *M. loti*. No strain of the genus *Aminobacter* was isolated.

ANI Average nucleotide identity (ANI) & DNA-DNA hybridization *in silico* (DDH):

Genomes of four mesorhizobial strains isolated by trapping with *Lotus* grown on the MD1 mine soil (STM9308 and STM9818) or on the MD2 mine border soil (STM9357 and STM9373) were sequenced. Concerning the two metal-tolerant strains (STM9308 and STM9818) that belonged both to cluster TV, their ANI and DDH values were estimated against their genome sequences and the genome sequence of the type strain *M. metallidurans* STM2683^T already available (Maynaud *et al.*, 2013) (Table IV-2-5). Both ANI (98.33%) and DDH values (79.20%) between STM9308 and STM9818 were found superior to the current thresholds set to ANI above 95% and DDH above 70% for intraspecies genomes. Therefore, these strains could be considered as belonging to a same species, which is different from *M. metallidurans* as both the ANI (85.3%, 85.2%) and the DDH (37.2% and 38.5%) values compared to strain *M. metallidurans* STM2683^T were above the genospecies thresholds (Table IV-2-5). In addition, STM9308 and STM9818 did not belong to *M. ciceri* (based on the

available genome), a species closely related to these strains (ANI (90.88-90.90%) and DDH (43.3-43.5%) with STM9818 and STM9308 respectively) or to *M. loti*, a species isolated from root-nodules of *L. corniculatus*, or any of the *Mesorhizobium* species where genomes were available (Table IV-2-5). This suggests that these strains could be affiliated to a new metal-tolerant species of *Mesorhizobium*. Concerning the two metal-sensitive strains (STM9373 and STM9357), the ANI and DDH values were calculated between them and the closely related species *M. amorphae* (genome available) (Table IV-2-5). As unexpected, it was difficult to estimate whether STM9373 and STM9357 fell into the same genospecies. Indeed, their ANI values (above 95%) and DDH values (under 70%) did not converge to a same conclusion about their affiliation to a same species. This particular case was also encountered when comparing STM9357 with *M. amorphae* (ANI (95.40%) and DDH (55.40%)). By contrast, the ANI (94.19%) and DDH (53.90%) values indicated that STM9373 did not belong to *M. amorphae*.

Table IV-2-5: Average Nucleotide Identity (ANI in % ± confidence interval) under the diagonal and *in silico* DNA-DNA Hybridization (DDH in %± confidence interval) above the diagonal and indicated in bold.

strains/ strains	STM 9308	STM9 357	STM9 373	STM9 818	STM4 922T	STM5 069T	STM4 623T	STM4 891T	CCNWG S0123T	WSM2 073T	WSM 1271	7653R	MAFF3 03099	STM2 683T	WSM2 075T	ORS 1032T	CCN WX J12- 2T	R7A	USD A 3471T	STM 4661
STM930 8	100	31.40 ± 2.46	30.00 ± 2.45	84.10 ± 2.59	28.30 ± 2.44	28.40 ± 2.44	28.50 ± 2.44	28.50 ± 2.44	29.20 ± 2.44	31.30 ± 2.46	43.50 ± 2.54	32.90 ± 2.46	33.00 ± 2.46	29.30 ± 2.44	33.40 ± 2.47	26.00 ± 2.41	21.80 ± 2.35	34.30 ± 2.45	33.20 ± 2.5	31.10 ± 2.45
STM935 7	87.06 ± 6.38	100	57.80 ± 2.77	30.20 ± 2.45	29.10 ± 2.44	29.20 ± 2.44	29.40 ± 2.44	29.40 ± 2.44	62.90 ± 2.86	27.50 ± 2.43	28.30 ± 2.44	28.30 ± 2.43	28.30 ± 2.43	30.80 ± 2.45	28.20 ± 2.43	27.00 ± 2.42	22.00 ± 2.35	29.80 ± 2.45	27.50 ± 2.4	32.5 ± 2.45
STM937 3	85.77 ± 5.23	97.49 ±2.97	100	30.20 ± 2.45	29.30 ± 2.44	29.40 ± 2.44	29.50 ± 2.44	29.70 ± 2.45	56.30 ± 2.74	27.80 ± 2.43	28.40 ± 2.44	28.40 ± 2.44	28.70 ± 2.44	30.80 ± 2.45	28.30 ± 2.44	27.20 ± 2.43	21.90 ± 2.35	29.60 % ± 2.45	28.10 % ± 2.45	32.30 % ± 2.45
STM981 8	98.33 ± 2.52	86.05 ±5.52	85.90 ±5.21	100	28.30 ± 2.44	28.50 ± 2.44	28.40 ± 2.44	28.70 ± 2.44	29.20 ± 2.44	31.20 ± 2.45	43.30 ± 2.54	32.80 ± 2.46	32.60 ± 2.46	29.50 ± 2.44	33.40 ± 2.47	26.00 ± 2.41	21.90 ± 2.35	34.10 ± 2.5	33.20 ± 2.45	31.40 ± 2.45
<i>M.</i> <i>faucesven</i> <i>ti</i>	84.52 ± 4.23	85.04 ±4.20	85.06 ±4.15	84.53 ±4.27	100	64.20 ± 2.88	52.00 ± 2.67	59.20 ± 2.80	29.20 ± 2.44	26.90 ± 2.42	27.80 ± 2.43	27.40 ± 2.43	27.60 ± 2.43	33.70 ± 2.47	27.70 ± 2.43	25.60 ± 2.41	22.70 ± 2.37	27.60 ± 2.45	27.20 ± 2.55	32.70 ± 2.5
STM492 2 ^T																				
<i>M.</i> <i>escarrei</i>	84.58 ± 4.25	84.99 ±4.24	85.10 ±4.20	84.65 ±4.26	95.70 ± 2.7	100	51.70 ± 2.66	58.50 ± 2.78	29.50 ± 2.44	26.90 ± 2.42	27.70 ± 2.43	27.70 ± 2.43	27.70 ± 2.43	33.90 ± 2.47	27.80 ± 2.43	25.60 ± 2.41	23.00 ± 2.37	27.50 ± 2.43	27.50 ± 2.4	32.90 ± 2.45
STM506 9 ^T																				
<i>M.</i> <i>delmotii</i>	84.68 ± 4.23	85.06 ±4.25	85.14 ±4.23	84.70 ±4.29	93.37 ± 3.14	93.30 ± 3.22	100	53.50 ± 2.69	29.50% ± 2.44	26.80 % ± 2.42	27.60 % ± 2.43	27.50 % ± 2.43	27.90% ± 2.43	34.20 % ± 2.47	27.50 % ± 2.43	25.60 % ± 2.41	22.90 % ± 2.37	27.70 % ± 2.45	26.80 % ± 2.45	33.30 % ± 2.5
STM462 3 ^T																				
<i>M.</i> <i>prunared</i>	84.66 ± 4.23	85.19 ±4.23	85.40 ±4.30	84.81 ±4.29	94.88 ± 2.9	94.77 ± 2.86	93.69 ± 3.10	100	29.50% ± 2.44	26.70 % ±	27.80 % ±	27.50 % ±	27.80% ± 2.43	34.10 % ±	27.80 % ±	25.90 % ±	22.90 % ±	27.70 % ±	28.10 % ±	33.00 % ±

<i>ense</i>	4.23									2.42	2.43	2.43		2.47	2.43	2.41	2.37	2.4	2.45	2.45	
STM489																					
<i>M.</i>																					
<i>amrphae</i>	85.15	95.40	94.19	85.15	85.00	85.09	85.10	85.22		27.60	28.40	28.40	28.80%	30.90	28.30	27.10	22.10	28.70	28.00	31.10	
CCNWG	±	±3.06	±3.19	±4.50	± 4.23	± 4.17	± 4.24	± 4.19	100	% ±	% ±	% ±	± 2.44	% ±	% ±	% ±	% ±	% ±	% ±	% ±	
S0123 ^T	4.48									2.43	2.44	2.44		2.45	2.43	2.42	2.35	2.45	2.45	2.45	
<i>M.</i>																					
<i>australicum</i>	86.06	83.91	84.23	86.04	83.64	83.50	83.61	83.60	84.03±4.2	100	30.80	33.50	32.80 ±	27.80	33.20	26.60	21.00	33.50	28.70	27.80	
WSM207	±	±4.22	±4.29	±3.71	± 4.06	± 4.05	± 4	± 4.09	8		± 2.45	± 2.47	2.46	± 2.43	± 2.47	± 2.42	± 2.33	± 2.5	± 2.45	± 2.4	
3 ^T	3.79																				
<i>M. ciceri</i>	90.90	84.47	84.56	90.88	84.20	84.17	84.20	84.14	84.54±4.2	85.85±		32.00	31.90%	28.60	33.40	25.90	20.90	32.40	25.20	28.90	
WSM127	±	±4.23	±4.25	±3.33	± 3.99	± 4.02	± 3.93	± 4.08	9	3.71	100	% ±	± 2.46	% ±	% ±	% ±	% ±	% ±	% ±	% ±	
1	3.36											2.46		2.44	2.47	2.41	2.33	2.45	2.4	2.45	
<i>M.</i>																					
<i>huakuii</i>	86.82	84.57	84.67	86.84	83.93	84.06	84.07	84.02	84.67±4.3	87.15±	86.47	100	56.10%	28.40	36.10	26.70	21.80	56.60	35.30	28.50	
7653R	±	±4.38	±4.37	±3.89	± 4.22	± 4.17	± 4.21	± 4.27	8	3.61	±3.82		± 2.74	% ±	% ±	% ±	% ±	% ±	% ±	% ±	
3099	3.87													2.44	2.48	2.42	2.35	2.75	2.45	2.45	
<i>M.</i>																					
<i>huakuii</i>	86.87	84.74	84.80	86.81	84.17	84.25	84.35	84.35	85.00±4.6	87.04±	86.43	94.08	100	28.60	36.30	26.70	22.10	87.5	23.30	28.60	
MAFF30	±	±4.57	±4.57	±3.99	± 4.58	± 4.52	± 4.68	± 4.61	8	3.73	±4.06	± 2.54		% ±	% ±	% ±	% ±	% ±	% ±	% ±	
3099	3.99													2.44	2.48	2.42	2.35	2.35	2.4	2.4	
<i>M.</i>																					
<i>metallidurans</i>	85.20	86.00	86.03	85.26	87.72	87.72	87.92	87.90	86.00±4.2	84.26±	84.63	84.67	84.85±	100	28.90	26.60	22.20	28.70	27.60	47.70	
STM268	±	±4.20	± 4.23	±4.28	± 4.87	± 4.94	± 4.96	± 4.99	0	4.05	±4.11	±4.19	4.46		% ±	% ±	% ±	% ±	% ±	% ±	
3 ^T	4.20														2.44	2.42	2.36	2.4	2.45	2.6	
<i>M.</i>																					
<i>opportunistum</i>	87.14	84.58	84.69	87.12	84.15	84.13	84.08	84.17	84.62±4.3	86.94±	87.22	88.20	88.18±	84.85	100	26.80	22.00	36.30	31.90	28.80	
WSM207	±	±4.34	±4.37	±3.74	± 4.11	± 4.07	± 4.11	± 4.19	1	3.65	±4.05	±3.61	3.64	±4.20		± 2.42	± 2.35	± 2.5	± 2.45	±	
5 ^T	3.68																			2.45	

<i>M. plurifariu</i>	83.10 ± 4.20	83.82 ±4.15	83.83 ±4.07	83.10 ±4.17	82.78 ±4.15	82.79 ±4.09	82.75 ±4.12	82.94 ±4.13	83.87± 4.09	83.51± 4.17	83.17 ±4.18	83.68 ±4.36	83.80± 4.46	83.43 ±4.08	83.78± 4.35	100	21.60 ±2.34	26.50 ±2.4	25.00 ±2.4	26.40 ±2.4
<i>M. alhagi</i>	79.95 ± 4.74	80.06 ±4.74	80.17 ±4.80	80.02 ±4.80	80.67 ±4.95	80.75 ±5.05	80.71 ±5.09	80.63 ±4.82	80.09±4.8 1	79.45± 4.21	79.72 ±4.28	79.89 ±4.69	80.02±4 .72	80.15 ±4.57	79.95± 4.60	79.60 ±4.43	100	22.00 ±2.35	20.50 ±2.35	22.40 ± 2.35
<i>M. loti</i>	87.69 ± 4.68	85.85 ±5.51	85.62 ±5.32	87.59 ±4.59	84.13 ±4.3	84.17 ±4.32	84.13 ±4.4	84.28 ±4.3	84.85±4.3 8	87.15± 3.62	86.59 ±3.78	94.10 ±2.72	98.64±1 .83	84.76 ±4.25	88.14± 3.57	83.45 ±4.37	80.09 ±4.83	100	37.10 ±2.45	28.40 ±2.4
<i>M. erdma</i>	86.50 ± 3.26	84.67 ±3.95	84.64 ±3.83	86.57 ±3.26	83.86 ±3.96	83.71 ±3.91	83.89 ±3.93	84.01 ±4.31	84.46±4.1 4	<75	84.06 ±4.42	88.34 ±3.60	83.09± 5.55	84.17 ±3.90	86.09± 3.54	82.63 ±4.05	78.73 ±4.18	88.00 ±3.95	100	27.90 ±2.4
<i>Mesorhiz</i>	86.41 ± 5.27	87.20 ±5.20	86.91 ±4.93	86.85 ±5.55	86.97 ±3.87	86.95 ±3.89	87.18 ±3.97	87.12 ±3.96	86.17±4.1 4	84.17± 4.08	84.77 ±4.09	84.70 ±4.28	84.85±4 .57	92.21 ±3.21	84.85± 4.09	83.35 ±4.18	80.42 ±4.84	86.12 ±5.53	84.33 ±3.86	100

Occurrence and phylogeny of partial *cadA* gene, coding a metal efflux protein, in *Lotus* and *Anthyllis* rhizobial collections:

The partial fragment used to detect the *cadA* gene was amplified in all isolates from the mine sites (MD1, AH1) and the mine border MD2 but not in isolates of the mine border AH2 (Fig. IV-2-5). The *cadA* fragment was amplified in all AH1 isolates (11 *Lotus* isolates and 11 *Anthyllis* isolates, displaying values of MIC = 2-18 mM Zn and 0.1-5 mM Cd, 31/64 of MD1 isolates (14 of *Anthyllis* isolates (MIC = 4-18 mM Zn and 0.1-7 mM Cd) and 17 of *Lotus* isolates (MIC = 6-18 mM Zn and 1-7 mM Cd)) and in MD2 isolates for 37.7% of them (i.e. 14 of *Anthyllis* isolates (MIC = 0.5-12 mM Zn and 0.1-7 mM Cd) and (12 *Lotus* isolates (MIC = 0.5-6 mM Zn and 0.3 mM Cd)) (Fig. IV-2-4 and Table IV-2-S1). CadA protein partial sequences fell into two clusters (CI and CII in Fig. IV-2-S2). Cluster CI contained strains closely related to *M. metallidurans* 2683^T (91.4-100% identities out of 207 amino acids); this cluster was composed of five branches (CI-1 to CI-5), included strains from the mining sites MD1 and AH1. CII contained one branch (CII-1) consisted of isolates from mine border MD2 and grouped together with *Mesorhizobium* sp. 4661 (98.6% identity). Paradoxically, the *cadA* fragment was detected in metal-sensitive strains recovered from the mine-border MD2. This marker was detected in a total of 26 strains from the mine-border MD2: 13 of them were heavy metal-tolerant (MIC = 1-12 mM Zn and 0.1-7 mM Cd) and the 13 others were metal-sensitive (this corresponds to 8 *Anthyllis* isolates (STM9383-84, STM9395-97, STM9792-93 and STM9400) and 5 *Lotus* isolates (STM9347, STM9349, STM9357-58 and STM9360)). Unexpected results were also obtained with some metal-tolerant strains where *cadA* fragment could not be detected: this corresponds to 15/31 MD1-*Anthyllis* isolates, 16/33 M1-*Lotus* isolates (MIC of Zn= 1-18 mM Zn and of Cd 0.1-7 mM), four isolates from MD2 (two isolated from *Anthyllis* (STM9378 and STM9404) and two from *Lotus* (STM9348 and STM9774)) and two tolerant strains isolated from AH2 (STM9438 (*Anthyllis*, MIC of Zn= 1 mM Zn and of Cd= 0.3 mM) and STM9426 (*Lotus*, MIC of Zn= 8 mM and of Cd 0.5 mM)) (Tables IV-2-3 & IV-2-S1).

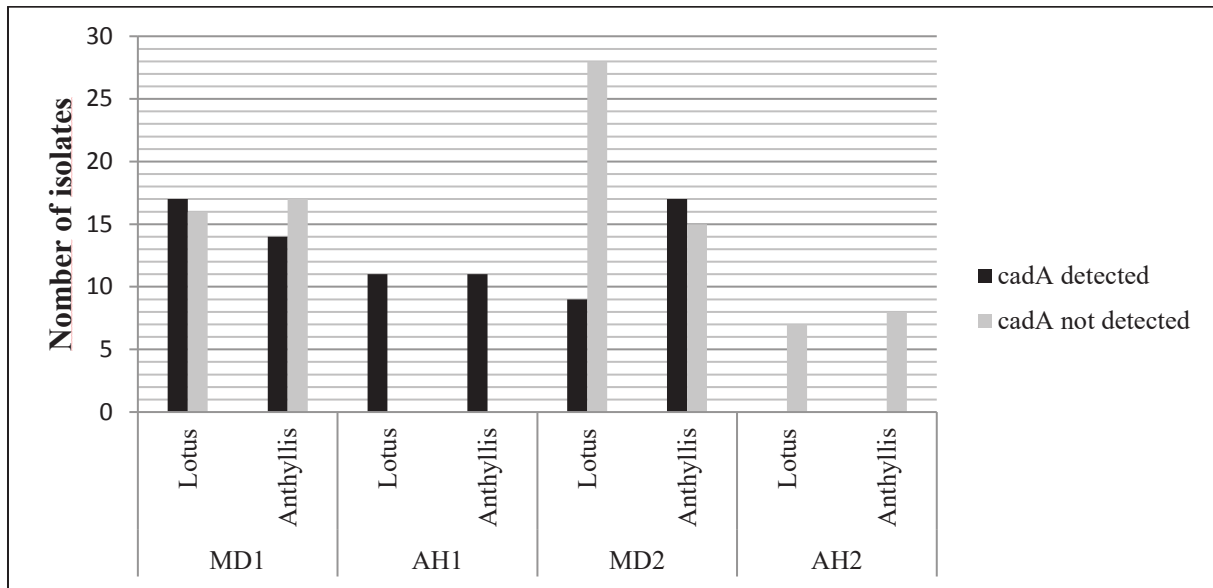


Fig. IV-2-4: Presence (black bars) and absence (grey bars) of the *cadA* marker as detected by PCR amplification in *Mesorhizobium* from *Anthyllis vulneraria* and *Lotus corniculatus* root nodules from four soils contaminated and moderately contaminated in heavy metals (mine soils of AH1, MD1, mine-border soils of AH2 and MD2).

Analysis metal-resistant gene in genomic assemblies of four studied strains:

The gene *cadA* coding for a system efflux of Zn and Cd (Maynaud et al., 2014) was not found along the two metal tolerant strains STM9308 and STM9818 and on the genome of one sensitive strain STM9373. By contrast, STM9357 genome revealed a *cadA* homologue (MES9357_V1_140024) of 759 aa with 93.3-94.1% protein identities when compared to STM2683 and STM4661 respectively. However, the two latter strains have a longer protein sequence (910-915 aa respectively) than STM9357. The alignment position of *cadA* gene of STM9357 with STM2683 and STM4661 initiated after about 150 aa indicating an uncompleted *cadA* gene in the STM9657 genome. Other genes involved in metal tolerance were searched in the newly sequenced genome of the four strains such as *zitB*, a gene involved in an efflux of zinc across the plasma membrane as described in *Escherichia coli* (Chao and Fu, 2004). Recently this gene was detected in the metal-tolerant strain of *M. amorphae* CCNWGS0123, with a 45% amino acid identity with ZitB of *E. coli* (Xie et al., 2015). This gene was absent along the genome of *M. metallidurans* STM2683^T whereas STM4661 had both *cadA* and *zitB* genes. By contrast, the genome of the metal-tolerant strain STM9308 isolated from Montdardier (MD1) mine had a *zitB* gene sequence (MES9308_v1_270108) with a length of 326 aa sharing 85% and 39.25% of amino acid identities with those of *M. amorphae* CCNWGS0123 (MEAMCv1-130034) and *Mesorhizobium* sp. STM4661 (MESS4v1-3600039) respectively. This gene was also detected in the genome of other metal-tolerant strains: a *zitB* gene of STM9818 ((MES9818_v1_240091) also isolated from Montdardier mine MD1 shared a 96.18% identity with STM9308 on the complete nucleotide sequence (312 aa) of *zitB* gene (MES9308_v1_270108). However, the genomes of the two metal-

sensitive mesorhizobia STM9373 and STM9357 also revealed *zitB* gene sequences MES9373_v1_80083 and MES9357_v1_71874 (about 86-88% identities with STM9308 and STM9818) and shared >96% identities with *M. amorphae* CCNWGS0123 (MEAMCv1-130034) and about 40% with *Mesorhizobium* sp. STM4661 (MESS4v1-3600039). Searching *czcD* gene, involved in cobalt, Zn and Cd resistance in *Cupriavidus metallidurans* (von Rozycki and Nies, 2009), a fragment of 305 aa homologue to a *czcD* protein, was detected in the two metal-tolerant strains STM9308 (MES9308_v1_460102) and STM9818 (MES9818_v1_310272) with 100% identity on nucleotide sequences and with 87.15 and 88.64% of identity between these latter and two fragment homologs of 132 aa and 179 aa of STM2683^T (MESSv2_730268, MESSv2_730269) and 91.8% identity with *czcD* protein (305 aa) in *Mesorhizobium* sp. STM4661 (MESS4v1_630039). Interestingly, this gene *czcD* was not detected in the two metal-sensitive strains STM9357 and STM9373. In the case of *zntA* gene, coding a Zn(II) translocating P-type ATPase in *Escherichia coli* genome (Rensing et al., 1997), two *zntA*-like genes were found in the genome of STM9308 (MES9308_v1_460141, MES9308_v1_480009) and three *zntA*-like genes were found in STM9818 (MES9818_V1_310231, MES9818_v1310115 and MES9818_v1_350004) with about 64% of identities between the two protein sequences (MES9308_v1_460141) and (MES9308_v1_480009) or (MES9818_V1_310231) and (MES9818_v1310115). The identity of the two strains was 100% aa for the first homolog (MES9308_v1_460141 and MES9818_V1_310231) and 95.35 % aa identity on the second one (MES9308_v1_480009 and MES9818_v1310115): the first one of STM9308 and STM9818 had 77.9 and 77, 8 % aa identities with *ZntA* sequence of *M. metallidurans* STM2683^T and the second one had 67.2 and 67.7% with *ZntA* protein sequence of STM2683 (MESS2V1_980073) (Maynaud et al., 2013) (table IV-2-S4). By contrast, the third *zntA*-like gene found in STM9818 (MES9818_v1_350004) had less identity (about 50% aa) with all other *zntA*-like genes found in STM9308 and STM9818 (Table IV-2-S4). The metal-sensitive strains STM9357 and STM9373 had only one *zntA*-like gene with 65.3 and 81.8% of identities with STM2683.

Analysis of a symbiotic gene (*nodA*) and distribution in *Lotus* and *Anthyllis* rhizobial collections:

Differences in *nodA* sequences were independent of heavy metal levels measured in the soils. All mesorhizobial *Anthyllis*-isolates from Avinières (AH1 and AH2) sites presented the particularity to possess two copies of *nodA* (*nodA1* and *nodA2*) representing the symbiovar anthyllidis (Fig. IV-2-5 and Table IV-2-4). By contrast, all *Lotus* mesorhizobia from AH1 possessed a single copy of *nodA* related to the symbiovar loti or in the case of site AH2, one or two copies of *nodA* also related to symbiovar loti. Such double copy of *nodA* was described in broad host-range strains such as *M. loti* NZP2037 (Kasai-Maita et al., 2013). The strain STM9426 was found apart as its *nodA* gene was related to *Bradyrhizobium japonicum*. Intriguingly, all *Lotus* and *Anthyllis* strains isolated from MD1 were of symbiovar loti with either one or two copies of *nodA*: strains with one copy appear slightly dominant (25/33 of *Lotus*-nodulating strains and 15/31 of *Anthyllis*-nodulating strains). By contrast in MD2 mine border, all strains trapped by *Anthyllis* and *Lotus* had the single *nodA* copy of symbiovar loti. Two exceptions were notified among mesorhizobial strains trapped with *Lotus* isolated from MD2 that the strain STM9777 is the only strains isolated from MD2 mine-border having the two *nodA* copies of symbiovar loti and STM9780 which was the only strain isolated from *Lotus* of symbiovar anthyllidis. In addition, no *nodA* gene could be detected in two strains of *Mesorhizobium* (STM9821 and STM9435) and for the five strains belonging to the genus *Rhizobium* (STM9440, STM9434, STM9438, STM9443 and STM9390).

The two *nodA* copies of symbiovar anthyllidis shared a 77.5-77.7% nucleotidic identity when compared and those of symbiovar loti shared a 77.2-78.3% nucleotidic identity. The partial *nodA1* sequences of symbiovar anthyllidis among our isolate collection shared a strong identity (99.5-100%) with the *nodA1* sequence of *M. metallidurans* STM2683^T. The partial *nodA2* sequences of symbiovar anthyllidis found in our isolates shared 99.8-100% similarities with the *nodA2* sequence of STM2683^T. For the symbiovar loti with two *nodA* copies, the partial *nodA1* sequences shared 93.3-99.2% identities with the single *nodA* copy of symbiovar loti and shared 93.6-95.7% identities with the *nodA1* of the reference strain *M. loti* NZP2037. The partial *nodA2* sequences of symbiovar loti shared 94.1-98.9% identities between our isolates and shared 93-94.4% identities with the *nodA2* of *M. loti* NZP2037.

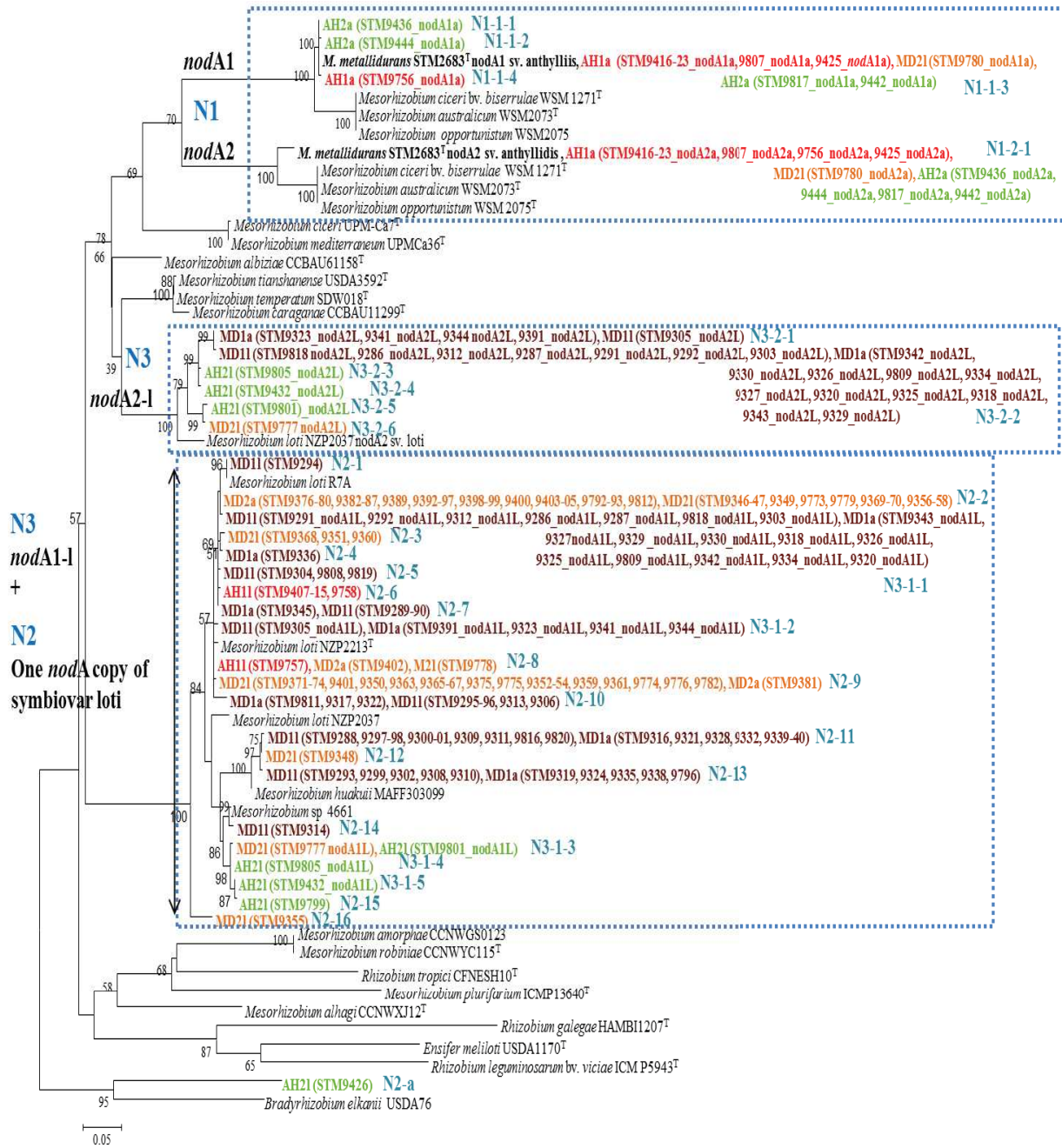


Fig. IV-2-5: Maximum-Likelihood phylogenetic tree based on partial *nodA* gene sequences (366 nt) showing the relationships between the *Anthyllis vulneraria* and *Lotus corniculatus* isolates obtained in this study and reference strains. The tree was constructed using T92+G+I model. Genbank accession numbers are given in table IV-2-S2 and the significance of each branch is indicated by a bootstrap value calculated for 1000 subsets (> 50%) at the major branching-points. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per 100 nucleotides. Colors of *Anthyllis*-isolates (a) and *Lotus*-isolates (l) are shown according to their isolation site the isolates from MD1, AH1, MD2 and AH2 are in brown, red, orange and green respectively.

Nodulation and nitrogen fixation properties in absence of heavy metals:

Among 15 tested strains (14 representative strains and STM2683^T), the four strains of symbiovar anthyllidis did not nodulate *Lotus*, except for strain STM9780 (the only one isolated from *Lotus*) which was able to highly nodulate both legume species. All tested strains of symbiovar loti whatever the *nodA* copy number highly nodulated *Lotus* without a significant difference with the other strains for nodulation or nitrogen fixation (Table IV-2-6). Strains of symbiovar anthyllidis (STM2683^T, STM9416, STM9436 and STM9780) correctly nodulated plants of *Anthyllis*. No significant difference was observed between these four strains not only on nodule number but also on root or shoot biomass (Table IV-2-6). As unexpected, one strain (STM9344 of symbiovar loti) isolated from root-nodules of *Anthyllis* by trapping were not able to renodulate *Anthyllis*. Moreover, two *Lotus*-strains (STM9313 and STM9305) of symbiovar loti that were able to nodulate *Lotus*, did not nodulate *Anthyllis* (Table IV-2-6). Thus, among the 11 strains tested belonging to symbiovar loti, 3 nodulated only *Lotus* plants while the others nodulated both legumes. Seven strains (STM9818, STM9378, STM9436, STM9373, STM9342, STM9312, STM2683^T) showed symbiotic *Anthyllis* plants with a significant higher chlorophyll contents than the uninoculated control, for two of them (STM9378, STM9818) corroborated by a significant higher shoot biomass. At the opposite, four strains (STM9316, STM9391, STM9311 and STM9780) displayed the lowest shoot biomass of *Anthyllis* plants but were among the most significant N₂ fixers in symbiosis with *Lotus*.

Table IV-2-6: Nodulation and nitrogen fixation parameters (mean ± standard deviation (n=10 plants)) on *Lotus corniculatus* (indicated in bold) and *Anthyllis vulneraria* subspecies *carpatica* inoculated with 14 representative strains, *M. metallidurans* STM2683^T, or supplemented with nitrogen (5 mM) or uninoculated as positive or negative controls.

Treatment : strains ^a or controls	Isolation site	Host plant used for trapping	Symbiovar or <i>nodA</i> type	Plant tested	Nodule numbers /plant ^b	Dry nodule biomass ^b (g/plant)	Dry root biomass ^b (g/plant)	Dry shoot biomass ^b (g/plant)	Nodular density ^b (number/mm unite)	Chlorophyll content ^b (SPAD units)
STM9436	AH1	<i>Anthyllis</i>	symbiovar anthyllidis	<i>Lotus</i>	0	0	0.09±0.02 (cd)	0.064±0.013 (cd)	0	29.297±4.33 (b)
				<i>Anthyllis</i>	26.8 ± 18.4 abc	0.009±0.006 bc	0.05±0.02 b	0.12±0.037 c	0.055±0.032 abcd	48.47±16.22 abc
STM9416				<i>Lotus</i>	0	0	0.1±0.02 (bcd)	0.074±0.02 (cd)	0	27.32±5.6 (b)
				<i>Anthyllis</i>	18.9 ± 8.2 bc	0.0045±0.0046 c	0.07±0.02 ab	0.131±0.037 bc	0.0365±0.014 abcd	41.6±11.14 abcd
STM9780	MD2	<i>Lotus</i>		<i>Lotus</i>	58.4 ± 45.3 (a)	0.018±0.012 (a)	0.14±0.06 (abc)	0.163±0.084 (ab)	0.081±0.04 (a)	48.42±9.25 (a)
				<i>Anthyllis</i>	19.8 ± 18.3 bc	0.0066±0.0061 c	0.05±0.01 ab	0.132±0.039 bc	0.035±0.036 abcd	30.57±10.4 de
STM9305	MD1	<i>Lotus</i>	symbiovar loti with 2 <i>nodA</i> copies (as the reference <i>M. loti</i> NZP2037)	<i>Lotus</i>	52.6 ± 23.6 (a)	0.015±0.007 (ab)	0.14±0.04 (abc)	0.146±0.053 (abc)	0.077±0.04 (a)	45.98±6.1 (a)
				<i>Anthyllis</i>	0	0	0.04±0.001 b	0.1±0.015 c	0	27.62±10.09 de
STM9312				<i>Lotus</i>	57.1 ± 26.2 (a)	0.011±0.005 (ab)	0.15±0.04 (abc)	0.174±0.072 (ab)	0.084±0.032 (a)	47.82±5.36 (a)
				<i>Anthyllis</i>	37.1 ± 25.9 abc	0.008±0.005 bc	0.08±0.02 ab	0.167±0.06 bc	0.061±0.036 abcd	47.72±8.96 abc
STM9818				<i>Lotus</i>	64 ± 59.6 (a)	0.012±0.007 (ab)	0.14±0.04 (abc)	0.186±0.078 (ab)	0.113±0.05 (a)	46.3±7.9 (a)
				<i>Anthyllis</i>	57.5 ± 39.3 ab	0.015±0.015 ab	0.08±0.02 ab	0.212±0.087 ab	0.097±0.07 ab	44.94±15.46 abc
STM9344		<i>Anthyllis</i>		<i>Lotus</i>	68.2 ± 41.4 (a)	0.015±0.006 (ab)	0.14±0.03 (abc)	0.171±0.048 (ab)	0.101±0.05 (a)	48.78±4.48 (a)
				<i>Anthyllis</i>	0	0	0.03±0.01 b	0.111±0.028 c	0	35.64±6.6 cd
STM9342				<i>Lotus</i>	60 ± 21.3 (a)	0.014±0.005 (ab)	0.16±0.06 (ab)	0.218±0.084 (a)	0.073±0.015 (a)	52.73±6.93 (a)
				<i>Anthyllis</i>	36.8 ± 26.8 abc	0.006±0.005 c	0.05±0.01 ab	0.138±0.043 bc	0.062±0.046 abc	48.11±9.6 abc
STM9391				<i>Lotus</i>	40.2±20.3 (ab)	0.009±0.005 (b)	0.13±0.03 (abcd)	0.121±0.06 (abcd)	0.058±0.025 (a)	43.2±7.67 (a)
				<i>Anthyllis</i>	11.7 ± 17.9 c	0.004±0.007 c	0.05±0.02 ab	0.131±0.07 bc	0.022±0.024 cd	38.31±9.6 bcd
STM9313	MD1	<i>Lotus</i>	symbiovar loti with one copy of <i>nodA</i>	<i>Lotus</i>	35.6 ± 21.7 (ab)	0.01±0.007 (ab)	0.1±0.07 (abcd)	0.11±0.057 (bcd)	0.06±0.042 (a)	40.59±9.65 (a)
				<i>Anthyllis</i>	0	0	0.03±0.01 b	0.086±0.022 c	0	17.06±6.67 e
STM9311				<i>Lotus</i>	47.9 ± 10.4 (a)	0.009±0.002 (b)	0.09±0.01 (bcd)	0.114±0.02 (bcd)	0.09±0.02 (a)	45.71±7.1 (a)
				<i>Anthyllis</i>	20.2 ± 22.4 bc	0.003±0.003 c	0.04±0.02 b	0.104±0.045 c	0.033±0.031 bcd	40.71±7.4 abcd

STM9373	MD2			<i>Lotus</i>	75.3 ± 41.7 (a)	0.016±0.006 (ab)	0.17±0.05 (a)	0.21±0.074 (a)	0.085±0.033 (a)	51.75±8.27 (a)
				<i>Anthyllis</i>	16.9 ± 9.6 bc	0.006±0.004 c	0.12±0.01 a	0.13±0.036 bc	0.029±0.017 bcd	47.2±12.15 abc
STM9316	MD1	<i>Anthyllis</i>		<i>Lotus</i>	63.3 ± 25.8 (a)	0.016±0.008 (ab)	0.15±0.06 (abc)	0.152±0.068 (abc)	0.09±0.034 (a)	44.96±8.57 (a)
				<i>Anthyllis</i>	3.4 ± 5.2 c	0.001±0.003 c	0.04±0.01 b	0.085±0.031 c	0.0057±0.0072 d	29.83±8.77 de
STM9378	MD2			<i>Lotus</i>	57.5 ± 39 (a)	0.0105±0.0071 (ab)	0.15±0.08 (abc)	0.186±0.1 (ab)	0.081±0.048 (a)	47.93±12.66 (a)
				<i>Anthyllis</i>	50.7 ± 29.6 ab	0.018±0.014 a	0.09±0.03 ab	0.261±0.13 a	0.082±0.038 ab	54.057±9.94 a
STM2683T	Avinières	<i>Anthyllis</i>	symbiovar	<i>Lotus</i>	0	0	0.11±0.03 (abcd)	0.067±0.02 (cd)	0	28.91±5.72 (b)
(reference)	mine		anthyllidis	<i>Anthyllis</i>	58.3 ± 64.3 a	0.0085±0.009 bc	0.08±0.03 ab	0.174±0.087 bc	0.11±0.086 a	45.89±9.2 abc
Negative				<i>Lotus</i>	0	0	0.07±0.03 (d)	0.056±0.032 (d)	0	24.0083±6.39 (b)
control				<i>Anthyllis</i>	0	0	0.04±0.02 b	0.089±0.044 c	0	26.33±10.03 de
Nitrogen				<i>Lotus</i>	0	0	0.11±0.04 (abcd)	0.076±0.036 (cd)	0	44.387±13.93 (a)
control				<i>Anthyllis</i>	0	0	0.08 ± 0.02 ab	0.252±0.016 a	0	51.61±9.05 ab

^a all strains were metal tolerant except STM9373 and STM378 were were metal-sensitive.

^b Data were analyzed by one factor ANOVA either for *Lotus* (in bold) or for *Anthyllis*.

***In vitro* nodulation and fixation properties in the presence of metal-contaminated soil:**

Nodulation capacities of the strains were not affected by the metal-contaminated soil even if strains were metal-sensible (STM9780 and STM9373). As bacterial cells for inoculation were added when seedling were already growing in soil, metal-rich soil may did not have time to affect sensitive strains and hamper nodulation initiation. Yet, plant biomass of symbiotic *Lotus* was low in presence of mining soil as well as the nitrogen control. By contrast for the metal-tolerant *Anthyllis*, the nodulation and fixation abilities was not affected by the presence of heavy metal-rich soil where plants better grew than in absence of mining soil. Strains of symbiovar anthyllidis still not able to nodulate *Lotus*, except STM9780 which was able to nodulate *Anthyllis* and *Lotus* in presence and absence of heavy metals. All the 15 tested strains were able to nodulate *Anthyllis* including STM9344, STM9305 and STM9313 which were not able to nodulate *Anthyllis* in the absence of contaminated soil. STM9416 formed, significantly, more nodules on *Anthyllis* roots than the other strains including the type strain of *M. metallidurans* STM2683. No significant effect on N₂-fixation could be observed between all strains either with *Anthyllis* or with *Lotus* (Table IV-2-7). However, *Lotus* shoot biomass was very low and leaf surfaces were very small to the point that SPAD measurements were not possible. Compared to treatments without contaminated soil, *Lotus* plants had fewer nodules in contaminated soil and were less developed in contaminated soil, contrary to *Anthyllis* plants which had more nodules and produced more plant biomass (root, shoot and nodules) in contaminated soil than without soil.

Table IV-2-7: Nodulation and nitrogen fixation parameters (mean ± standard deviation (n=10 plants)) on *Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulneraria* subspecies *carpatica* grown in contaminated soil and inoculated with 14 representative strains, STM2683^T or two nitrogens and uninoculated controls.

Treatment : strains ^a or controls	Isolation site	Host plant used for trapping	Symbiovar or <i>nodA</i> type	plant tested	Nodule numbers/plant ^b	Dry nodules biomass ^b (g/plant)	Dry root biomass ^b (g/plant)	Dry shoot biomass ^b (g/plant)	Nodular density ^b (number/mm unite)	Chlorophyll content ^b (SPAD units)
STM9436	AH1	<i>Anthyllis</i>	2 copies of <i>nodA</i> gene symbiovar anthyllidis	<i>Lotus</i>	0	0	0.095±0.027 (a)	0.043±0.016 (a)	0	ND ^c
				<i>Anthyllis</i>	52.5±33.4 b	0.012±0.007 a	0.07±0.02 abc	0.177±0.048 a	0.096±0.055 bc	47.64±6.43 ab
STM9416				<i>Lotus</i>	0	0	0.063±0.04 (ab)	0.03±0.03 (a)	0	ND
				<i>Anthyllis</i>	98.8±50.9 a	0.017±0.006 a	0.08±0.018 abc	0.21±0.047 a	0.167±0.08 a	51.57±4.26 ab
STM9780	M2	<i>Lotus</i>		<i>Lotus</i>	9.9±13.3 (abc)	0.0013±0.002 (a)	0.053±0.032 (ab)	0.03±0.024 (a)	0.02±0.026 (abc)	ND
				<i>Anthyllis</i>	68.4±33.4 b	0.02±0.009 a	0.077±0.02 abc	0.18±0.043 a	0.12±0.05 abc	48.76±6.95 ab
STM9305	M1	<i>Lotus</i>	2 copies of <i>nodA</i> gene symbiovar loti NZP2037	<i>Lotus</i>	12.4±9.6 (abc)	0.0018±0.002 (a)	0.081±0.031 (ab)	0.044±0.02 (a)	0.027±0.018 (abc)	ND
				<i>Anthyllis</i>	40±32.6 b	0.01±0.008 a	0.062±0.024 bc	0.18±0.07 a	0.075±0.06 bc	46.82±7.81 ab
STM9312				<i>Lotus</i>	20.8±16.6 (ab)	0.0022±0.0017 (a)	0.08±0.035 (ab)	0.053±0.03 (a)	0.043±0.021 (ab)	ND
				<i>Anthyllis</i>	56.9±18 b	0.019±0.0065 a	0.09±0.021 (abc)	0.2±0.04 a	0.096±0.04 bc	49.8±5.22 ab
STM9818				<i>Lotus</i>	7.6±18.6 (abc)	0.00055±0.001 (a)	0.058±0.026 (ab)	0.023±0.014 (a)	0.016±0.038 (abc)	ND
				<i>Anthyllis</i>	58.6±23.1 b	0.016±0.009 a	0.064±0.024 bc	0.18±0.057 a	0.12±0.035 abc	49.76±5.6 ab
STM9344		<i>Anthyllis</i>		<i>Lotus</i>	22.1±24.4 (a)	0.0028±0.003 (a)	0.084±0.043 (ab)	0.061±0.052 (a)	0.04±0.03 (ab)	ND
				<i>Anthyllis</i>	33.4±27.6 b	0.012±0.007 a	0.096±0.02 abc	0.24±0.09 a	0.05±0.04 cd	52.86±8.2 ab
STM9342				<i>Lotus</i>	19.6±14.7 (abc)	0.0027±0.0021 (a)	0.087±0.047 (ab)	0.054±0.035 (a)	0.037±0.027 (abc)	ND
				<i>Anthyllis</i>	33±27.3 b	0.01±0.007 a	0.061±0.027 bc	0.137±0.055 a	0.064±0.043 bcd	77.07±12 b
STM9391				<i>Lotus</i>	9.7±14.6 (abc)	0.0026±0.0047 (a)	0.08±0.055 (ab)	0.047±0.05 (a)	0.017±0.017 (abc)	ND
				<i>Anthyllis</i>	41.4±12.8 b	0.01±0.004 a	0.073±0.017 abc	0.19±0.055 a	0.07±0.021 bc	49.17±4.97 ab
STM9313	M1	<i>Lotus</i>	One copy of <i>nodA</i> gene symbiovar loti	<i>Lotus</i>	10.1±9.7 (abc)	0.0018±0.0026 (a)	0.09±0.045 (ab)	0.045±0.04 (a)	0.021±0.016 (abc)	ND
				<i>Anthyllis</i>	42.9±23.5 b	0.01±0.005 a	0.086±0.03 abc	0.22±0.092 a	0.071±0.027 bc	53.26±10.85 ab
STM9311				<i>Lotus</i>	11.6±15.8 (abc)	0.002±0.003 (a)	0.054±0.036 (ab)	0.031±0.032 (a)	0.027±0.028 (abc)	ND
				<i>Anthyllis</i>	48.3±28.1 b	0.013±0.0067 a	0.083±0.02 abc	0.18±0.054 a	0.081±0.042 bc	48.04±4.47 ab
STM9373	M2			<i>Lotus</i>	5.1±6.4 (abc)	0.00046±0.0009 (a)	0.051±0.027 (abc)	0.027±0.02 (a)	0.013±0.014 (abc)	ND
				<i>Anthyllis</i>	46.7±25.4 b	0.012±0.006 a	0.068±0.012 ab	0.17±0.035 a	0.083±0.048 bc	50.33±5.4 ab

STM9316	M1	<i>Anthyllis</i>		<i>Lotus</i>	16±16.3 (abc)	0.0022±0.0015 (a)	0.061±0.024 (ab)	0.04±0.023 (a)	0.047±0.057 (a)	ND
				<i>Anthyllis</i>	57.4±22.4 b	0.017±0.009 a	0.085±0.031 abc	0.21±0.077 a	0.11±0.045 bc	45.2±8.77 ab
STM9378	M2			<i>Lotus</i>	16.3±19 (abc)	0.0019±0.0017 (a)	0.081±0.054 (ab)	0.056±0.043 (a)	0.027±0.024 (abc)	ND
				<i>Anthyllis</i>	59.3±21.9 b	0.016±0.005 a	0.097±0.021 abc	0.3±0.1 a	0.098±0.038 bc	55.6±5.83 ab
STM2683T (Control)	Avinières mine	<i>Anthyllis</i>	2 copies of <i>nodA</i> gene symbiovar <i>anthyllidis</i>	<i>Lotus</i>	0	0	0.047±0.03 (ab)	0.034±0.032 (a)	0	ND
				<i>Anthyllis</i>	63±36.4 b	0.016±0.007 a	0.06±0.016 c	0.17±0.051 a	0.13±0.068 ab	52.58±4.1 ab
Negative control				<i>Lotus</i>	0	0	0.053±0.03 (ab)	0.034±0.025 (a)	0	ND
				<i>Anthyllis</i>	0	0	0.063±0.011 bc	0.13±0.022 a	0	40.17±9.9 b
Nitrogen control				<i>Lotus</i>	0	0	0.03±0.012 (b)	0.011±0.005 (a)	0	ND
				<i>Anthyllis</i>	0	0	0.1±0.04 ab	0.21±0.066 a	0	66.58±47.5 a

^a all strains were metal tolerant except STM9373 and STM378 were were metal-sensitive.

^b Data were analyzed by one factor ANOVA either for *Lotus* (in bold) or for *Anthyllis*.

^c ND: not measurable because of the small surface of leaf

DISCUSSION:

L. corniculatus is a candidate plant species to be used in vegetalization strategy, due to its capacity to adapt to extreme environmental conditions, with various perennial ecotypes (Aydemir and Sünger, 2011; Escaray et al., 2012). *A. vulneraria* is an open land species exhibiting a high variability that contains perennial, annual to biennial subspecies, some ecotypes are able to survive in nutrient environmental stress such as the ecotypes of *A. vulneraria* subsp. *carpatica* or subsp. *pyrenaica* (formely *boscii*) which were able to grow on mining sites (Mahieu et al., 2013). In the present study, we used seeds of legume plant ecotypes of *L. corniculatus* and *A. vulneraria* subspecies *carpatica* growing in Montdardier and Avinières mining sites (MD1 and AH1) respectively. Previous studies reported that the use of plant genotypes growing spontaneously in mine sites improved sustainably and significantly soil fertility by enrichment in soil organic nitrogen (Frérot et al., 2006). (Belimov et al., 2015) showed that the legume genotypes play a major role in nodulation success under metallic stress considering that the first factor was to use plant genotypes adapted to heavy metals to establish an efficient symbiotic system in the presence of elevated Cd concentrations. It was also repeatedly shown that rhizobial symbionts could establish efficient nitrogen-fixing nodules and contribute to the adaptation of legumes to a wider range of adverse conditions such as salinity, alkalinity, drought (Zahran, 1999; Slattery et al., 2001) and heavy metal toxicity (Safronova et al., 2011; Fatnassi et al., 2015).

Here, we conducted a phenotypic and phylogenetic study of *Lotus*-rhizobia in comparison with new *Anthyllis*-nodulating rhizobia isolated in the same experimental conditions. All new isolates were originated from mine sites (0.2-0.57 % Zn, 0.3-1.7% Pb, 0.02-0.03 ‰ Cd) or mine border sites less contaminated in heavy-metals (0.088-0.12‰ Zn, 0.13-0.2‰ Pb, 0.001-0.01 ‰ Cd). Our results showed that about 81% of the metal-tolerant strains (at least to Zn) were isolated from highly contaminated mine sites, while 97% of the metal-sensitive strains were provided from mine border sites. Among strains originating from mining sites, almost all strains were tolerant at least to Zn (MIC of Zn \geq 1mM) and only 19% of Zn-tolerant strains were Cd tolerant (MIC of Cd \geq 0.5 mM): the exception was two *Anthyllis* nodulating-strains isolated from Montdardier mine which were sensitive strains to both metals. The presence of these two latter metal-sensitive strains can be explained by their protection into micro-niches against local heavy-metal concentrations (Giller et al., 1998; Delorme et al., 2003; Broos et al., 2005). Higher numbers of metal-tolerant bacteria were isolated from metal-contaminated environments, as reported by (Delorme et al., 2003; Chaudri et al., 2008). It was also found that natural selection favored bacterial strains well adapted to specific environment conditions and may result in a fixation of such genotypes in the population (Lakzian et al., 2002; Pereira et al., 2006). A prevalence of metal-tolerant genotypes within a bacterial population, inhabiting an highly metal-contaminated area, may be a consequence of a prolonged metal selective pressure (Giller et al., 1998; Lakzian et al., 2007). The mine sites presented heavy-metal concentrations high enough to

generate a selective pressure leading to the emergence of genotypes with high metal tolerance, as described by (Baath, 1992; Baath et al., 1998). In this work, the high number of Cd-sensitive strains isolated from Avinières (AH1) and Montdardier (MD1) mine sites were obtained from *A. vulneraria* root-nodules. In moderately contaminated border sites, the composition of the mesorhizobial populations was different and got closer to that of non-contaminated sites. 65 and 81% of *Anthyllis*- and *Lotus*-strains isolated from MD2 were sensitive to Zn, respectively whereas, 88.86% of *Anthyllis*- and *Lotus*-strains isolated from AH2 were Zn-sensitive. Moderately contaminated sites contained both Zn-tolerant and Zn-sensitive strains that could be explained by less heavy metal contents compared to mining sites and higher levels of organic matter which could decrease the bioavailability of metals in the soil (Lejon et al., 2010). Many studies reported that soil physicochemical properties could influence heavy metal toxicity or modulate its bioavailability and toxicity (Kenarova et al., 2014; Zhang et al., 2016).

Metal-tolerant phenotype in highly contaminated sites could be related to the acquisition of resistance mechanisms that can be used by bacterial strains to cope with different types of metal stress (Nies, 1992; Diaz-Ravina et al., 1994). We showed that *cadA* gene, previously described as the first mesorhizobial P_{IB}-type ATPase involved in Zn and Cd transport in *M. metallidurans* STM2683^T (Maynaud et al., 2014), was detected in all tolerant strains isolated from AH1 mine where STM2683^T was isolated. Intriguingly, the *cadA* marker was not detected in all the metal-tolerant isolates of Montdardier (MD1) mine, indicating that these strains had, potentially, other resistance mechanisms. The metal-tolerant strains showed a diversity of metal resistant genetic determinants which could vary according to strain and metal (Xie et al., 2015). (Nies, 1999) described three efflux mechanisms involved in Zn and Cd resistance and detoxification in bacteria: P-type ATPase, CDF (Cation Diffusion Facilitator) proteins and RND-driven (resistance nodulation division family) transporters. Among CDF transporters, ZitB involved in an efflux of zinc across the plasma membrane as described in *Escherichia coli* (Chao and Fu, 2004). The genome of the four sequenced strains STM9308, STM9818, STM9357 and STM9373 had a *zitB* gene sequence sharing more than >85% of amino acid identities with those of *M. amorphae* CCNWGS0123 and about 40% identity with *Mesorhizobium* sp. STM4661). (Pereira et al., 2006) reported that isolates of a same species (*R. leguminosarum*) with different Cd-tolerances (from sensitive (MIC of Cd = 0.2mM), to extremely resistant (MIC of Cd = 1 mM)) presented several mechanisms involved in Cd resistance, with the existence of resistance mechanisms common to all isolates: a main common one was the presence and/or induction of lipopolysaccharides that could sequester most of the metal extracellularly, acting as a first-defence barrier against Cd stress. In our study, the isolates from Montdardier mine could be divided into two separated populations: one corresponds to those of *M. metallidurans* with a *cadA* marker and another composed of tolerant mesorhizobial population without *cadA* gene, which has potentially other mechanisms of adaptation to heavy metals. As unexpected and opposite to MD1 data, *cadA* marker

was detected in 23% of the metal-sensitive strains of MD2 site. Additionally, this gene fragment was not detected in all metal-tolerant strains isolated from Montdardier (MD2) site or isolated from Avinières (AH2) site contrary to our previous study (Mohamad et al., under review). Unfortunately, no information is available about the role of a truncated sequence at the 5' terminal *cadA* gene, missed in *cadA* gene of metal-sensitive strain STM9357 isolated from MD2, in *cadA* gene function and we suggest that might explain that this strain is no more resistant to heavy metals. The presence of several fragments of *zntA*-like gene could, potentially, explain the resistance of STM9308 and STM9818 to Zn and Cd, whereas, the metal-sensitive strains STM9357 and STM9373 had one fragment of *zntA*-like gene. Furthermore, *czcD* gene could play a role in the resistance of STM9308 and STM9818 whereas this gene in STM2683^T was split into two fragments potentially non-functional. Intriguingly, this gene was not detected in the metal-sensitive strains STM9373 and STM9357. Until now, we were not able to determine the mechanism involved in the heavy metal resistance of MD1-isolates that did not contain the *cadA* gene.

Previous studies showed that abiotic factors reduced generally rhizobial population size, diversity and legumes-rhizobia signal exchange in the soil (Slattery et al., 2001; Lira et al., 2015). Nevertheless, the literature contains contrasting results about the effect of heavy metals on the genetic differentiation of metallicolous populations compared to non-metallicolous microbial diversities. (Xie et al., 2016) suggested that the total bioactivity, richness and diversity of microorganisms decreased with increasing heavy metal concentrations because of the sensitivity of most microorganisms to heavy metal toxicity. (Olenska and Malek, 2015) revealed a substantial reduction in genotypes and nucleotide diversities of *nifH* gene fragments within a *R. leguminosarum* sv. *trifolii* population isolated from root-nodules of *Trifolium repens* growing in an heavy metal contaminated waste-heap area in Poland compared to an unpolluted control area. By contrast, other studies showed no effect of heavy metal on microbial diversity (Delorme et al., 2003; Tian et al., 2015). In this work, our results showed that the genetic composition was affected by natural selection of the heavy metal soil contents by selecting specific taxonomic groups. Almost all *Anthyllis*- and *Lotus*-nodulating strains belonged to the same taxonomic species and there was no effect of the trapping host plant on their taxonomic position. These results were not surprising given that the taxonomic diversity was reflected by housekeeping genes or 16S rDNA, and not by symbiotic genes linking to the legume/rhizobia interaction. 95 and 98% of *Anthyllis*- and *Lotus*-strains, respectively, belonged to the genus *Mesorhizobium*. Only four *Anthyllis*-strains isolated from mine-borders belonged to the genus *Rhizobium*. No *Rhizobium* strains were previously isolated from *Anthyllis* that was found associated only with symbionts of *Mesorhizobium* or *Aminobacter* (Ampomah and Huss-Danell, 2011; Maynaud et al., 2012) (Mohamad et al., under review). Two non mesorhizobial *Lotus*-strains were also isolated from mine-borders: one which was sensitive, belonged to the genus *Rhizobium* while the other belonged to *Bradyrhizobium* (STM9426) and was metal-tolerant. *M. loti* is known to be the main species able to trigger a symbiosis with *L.*

corniculatus (Monza et al., 1992; Lorite et al., 2010b; Lorite et al., 2010a; Gossmann et al., 2012). In addition, *Bradyrhizobium* have be found on *Lotus* roots too but such strains were either unable to re-nodulate *L. corniculatus* or unable to form effective nodules with *L. corniculatus* (Pankhurst et al., 1979; Barrientos et al., 2002; Lindstrom et al., 2010). (Lorite et al., 2012) also isolated bradyrhizobial strains from *L. uliginosus* root-nodules: these bradyrhizobia exhibited a broad host range, and they were able to nodulate efficiently *L. corniculatus*. A previous study reported that strains of *Rhizobium* belonging to *R. leguminosarum*, *R. etli* and *R. giardinii* could be also isolated from *L. corniculatus* root-nodules but these strains were unable to re-nodulate the *Lotus* species (Gossmann et al., 2012). We suppose that such strains of *Rhizobium* associated with *L. corniculatus* are potentially, bacterial endophytes, coexisting in nodules with symbiotic mesorhizobia, as previously described (Zgadza et al., 2015). Regarding the diversity composition of *Mesorhizobium* strains according to heavy metal levels and their heavy metal-tolerance, we showed that all *Lotus*- and *Anthyllis*-strains from Avinières (MD1) mine site belonged to *M. metallidurans* which is, until now, the unique species adapted to Avinières mine soil (Vidal et al., 2009) (Mohamad et al., under review). Opposite to Avinières (AH1), Montdardier mine (MD1) site showed a wider diversity, with in addition to *M. metallidurans*, another new metallicolous species related to *M. ciceri* and *M. loti* and in which *cadA* marker could not be detected. The two metal-tolerant species isolated from mining sites did not included any metal-sensitive strains. The only two sensitive *Anthyllis*-strains that were isolated from Montdardier mine were taxonomically separated from metal-tolerant strains: the strain (STM9340) grouped with *M. australicum* and *M. loti* and the strain (STM9335) clustered with *M. septenterionale*. According to previous studies demonstrating that heavy metals impact taxonomic diversity (Yao et al., 2003; Xie et al., 2016) (Mohamad et al., under review), we confirmed here that the mesorhizobial strains isolated from mine-borders were different from those isolated from mine sites: strains of Avinières (AH2) mine-border appeared closed to two known species: *M. delmotii* previously isolated from the same site and *M. prunaredense* originated from a neighbor uncontaminated site in Cévennes (Mohamad et al., submitted). The other sensitive mesorhizobia were from Montdardier (MD2) site and were closely related to *M. prunaredense*, *M. amorphae* and *M. septenterionale*.

Concerning the new potential metal-tolerant species, the estimation of ANI and DDH values for the two metaltolerant strains STM9308 and STM9818 shows that they belong to a same species (ANI value >95% and DDH value > 75%). As they were phylogenetically similar with 28 other MD1 strains, this showed that about 45% of isolates from MD1 could not be assigned to *M. ciceri* or *M. metallidurans* revealing their affiliation to a new metal-tolerant species of *Mesorhizobium* in Montdardier (MD1) mine. We suggest that this new putative species has a potential local adaptation to the Montdardier mine and may use mechanisms of metal-adaptation different from that described in *M. metallidurans* STM2683^T (Maynaud et al., 2013). In addition, Montdardier (MD2) mine-border revealed at least one new genospecies based on the ANI and DDH estimates of the two genomic

sequences STM 9373 and STM9357. A second genospecies is more hypothetical as the ANI value between these strains was above the threshold value and the *in silico* DDH estimate under the threshold value for the genospecies delimitation. Such absence of correlation between the ANI cut-off and the boundary of 70% DDH similarity has been already reported in some cases (Richter and Rossello-Mora, 2009). Additionally, ANI values were 94.2-95.4% between these two strains (STM9373, STM9357) and *M. amorphae*, respectively, revealing an ANI that fall within the 2% gap for the genospecies delimitation: such ANI comprised between the intraspecies ($\geq 96\%$) and interspecies ($\leq 94\%$) genospecies definition was already described among rhizobial strains (Zhang et al., 2012). In addition, we could not confirmed with the ANI and DDH estimations we obtained, that our isolates did not fell into the species *M. septentrionale* because no genome of this species was available at this time in databases. Thus further taxonomic analyses will be helpful for determining species attribution.

The “symbiovar” term has been used to distinguish symbiotically distinct subgroups within a single rhizobial species (Rogel et al., 2011) and can be closely mirrored by common *nod* gene phylogeny of *nodA* or *nodC*. In this work, we could distinguish three *nodA* profiles that fit with two symbiovars: the first one corresponds to symbiovar anthyllidis with strains isolated only from *Anthyllis* in AH1 and AH2, as first detected in *M. metallidurans* STM2683^T (Maynaud et al., 2012) and in moderately contaminated and uncontaminated sites as recently described in *M. delmotii* STM4623^T, *M. prunaredense* STM4891^T, *M. escarrei* and *Mesorhizobium faucesventi* (Mohamad et al. submitted; Mohamad et al. in preparation). The second one corresponds to symbiovar loti which could be separated into two *nodA* profiles; those with two copies of *nodA* as previously described in the reference strain *M. loti* NZP2037 that differed from most other strains of *M. loti* by its broad host range (Estrella et al., 2009; Kasai-Maita et al., 2013), and the other with one copy of *nodA* closely related to *nodA* of *M. loti* NZP2213^T, *M. loti* R7A and *M. huakuii* MAFF303099 and previously described as strains having a narrow host range (Jarvis et al., 1982; Monza et al., 1992; Estrella et al., 2009; Lorite et al., 2010b). The Nod factor produced by the strain NZP2037 with two *nodA* copies, contains an extra carbamoyl group at its non-reducing end compared to that produced by most other *M. loti* strains (López-Lara et al., 1995) and the NZP2037 symbiosis island contains a *nodU* gene that is likely responsible for this modification (Kasai-Maita et al., 2013). The symbiosis island was also found to contain *nodFEGA* genes absent from *M. loti* strain R7A that may lead to the incorporation of unsaturated fatty acid moieties on the Nod factor (Kasai-Maita et al., 2013). Whether these genes contribute to the broad host range of strain NZP2037 has not been reported (Kelly et al., 2014).

Particular cases must be mentioned about *nodA* characteristics; one corresponds to STM9780 which was the only *Lotus* nodulating-strain displaying the symbiovar anthyllidis, another was the *Bradyrhizobium* strain STM9426 which harbored one copy of *nodA* related to the distant group of *Bradyrhizobium elkani* USDA76 isolated from *Glycine max* (Stepkowski et al., 2007). In addition,

nodA genes for *Rhizobium* strains and two *Mesorhizobium* strains (STM9435 and STM9821) isolated from *L. corniculatus* and *A. vulneraria*, respectively could not be amplified: we suppose that either these strains had specific *nodA* sequences that we could not amplify with the primers we used or these strains were coexisting in nodules as bacterial endophytes with the nodulating strain, such as described by (Zgadżaj et al., 2015). The occurrence of the two symbiovars appears congruent with the distribution of the host plants on the studied geographic sites influenced by either the *Anthyllis* (Avinières) or the *Lotus* (Montdardier) dominance. Since previous studies (Stepkowski et al., 2007) reported that symbiotic genes could be favoured by plant host distribution, we suggest that the pre-existence of the host plant on the study sites should have played a role in selecting predominant *nodA* patterns on each site: we hypothesize that *A. vulneraria* contributed to the predominance of strains with the symbiovar anthyllidis on the Avinières mine while *L. corniculatus* favored strains of symbiovar loti in Montdardier (MD1) mine. Intriguingly, all mesorhizobial *Lotus*- and *Anthyllis*-strains isolated from Montdardier MD2 (except one *Lotus*-strain) belonged to symbiovar loti with one *nodA* copy, while the majority of the *Lotus*- mesorhizobia from Avinières AH2 were of symbiovar loti with two *nodA* copies and all mesorhizobial *Anthyllis*-strains from Avinières AH2 displayed the symbiovar anthyllidis. Consequently, *L. corniculatus* have only trapped strains of symbiovar loti (whatever the *nodA* copy number), while *A. vulneraria* were able to trap strains of both symbiovars loti and anthyllidis but it favored the selection of symbiovar anthyllidis. In addition, except STM9780, *L. corniculatus* was not able to easily associate with strains of symbiovar anthyllidis. Only a few nodules could be recovered from roots of *L. corniculatus* grown on Avinières AH1 mine soil despite the abundance of strains belonged to symbiovar anthyllidis in this soil, as revealed by the *Anthyllis* trapping data.

Therefore, we verify our hypothesis about the nodulation capacity of our strains according to their symbiovar profile on a sample of representative mesorhizobia in mono-inoculation conditions. Strains of sv. loti nodulated, generally, both legume species. The strains with the symbiovar anthyllidis were not able to nodulate *L. corniculatus*, except the strain STM9780 detected as sv. anthyllidis that was able to nodulate here *Lotus* and *Anthyllis*. In fact, this strain STM9780 was isolated from MD2 using *Lotus* as trap plant, whereas, all other strains with symbiovar anthyllidis were trapped with *Anthyllis* whatever the geographic site. Therefore, we suggested that the culture of STM9780 might have a nodulation gene of symbiovar loti that allowed the nodulation of *Lotus*. However, we did not succeed to amplify a *nodA* with specific primers of symbiovar loti from STM9780 and therefore we could not verify whether this strain could also possess a *nodA* of sv. loti. It was showed that other factors such as exopolysaccharides and secretion systems displayed limiting factors for nodulation and nitrogen fixation (Rhijn et al., 1998; Spaink, 2004; Nelson and Sadowsky, 2015). (Hubber et al., 2004) demonstrated that genes coding a type IV secretion system (T4SS) in *M. loti* R7A or a type III secretion system (T3SS) in *M. huakuii* MAFF303099 were involved in the establishment of an host-

specific symbiosis with *L. corniculatus*. The failure of strains belonging to symbiovar anthyllidis to nodulate *L. corniculatus* was also obtained with the type strains of new mesorhizobial species we defined (STM4623^T, STM4891^T, STM5069^T and STM4922^T) all isolated from *A. vulneraria* root-nodules. This preferential association could explain the little number of strains trapped by *L. corniculatus* after growing on Avinières (AH1 and AH2) soils which were dominated by a population of symbiovar anthyllidis and which in the case of AH1 may contain a low population of sv. loti. In mono-inoculation test, all strains of symbiovar loti (whatever the *nodA* copy number and their trapping host plant) were effective with *L. corniculatus* but a significant difference was observed in their nodulation capacity with *A. vulneraria* and several strains having symbiovar loti was not able to renodulate *A. vulneraria*: this result was not linked to the number of *nodA* copies in sv. loti. Some early studies have suggested nodulation compatibilities of strains from *A. vulneraria* (all of symbiovar loti) with *L. corniculatus* (Abdel-Ghaffar and Jensen, 1966; Ampomah and Huss-Danell, 2011) but our results showed that this compatibility depends on the symbiovar of strains indicating that not all strains having symbiovar loti were able to nodulate *Anthyllis*. The nodulation capacity towards *Lotus* and *Anthyllis* was conserved in the presence of contaminated soil. All tested strains, without exception, were able to renodulate *A. vulneraria* in the presence of contaminated soil but not always in mining soil-free conditions (STM9344); this needs to be checked for consolidating conclusions. Our results showed that *A. vulneraria* seems to be more adapted to contaminated Avinières AH1 soil than *L. corniculatus* as *Anthyllis* plants showed a better growth on mine soil and were not affected by metal-rich soil contrary to *Lotus*. Surprisingly, the difference in metal tolerance of the tested strains did not affect their nodulation capacity in tubes containing metal-contaminated soil as sensitive strains were recovered from nodules as well as metal-tolerant strains. Only, the *nodA* types impacted the nodulation and N₂-fixation abilities. The two *nodA* copies of symbiovar anthyllidis were specific for nodulation of *A. vulneraria* confirming a functional symbiosis trait of the symbiovar anthyllidis towards *Anthyllis*.

MD2 mine-border, presented the most complicated case in terms of phylogenetic and phenotypic diversity because of (i) the presence of a metal-tolerant cluster with strains having the *cadA* marker and another tolerant one with strains without *cadA* (ii) the presence of metal-sensitive strains having *cadA* marker (iii) the high diversity among *Mesorhizobium* species belonging potentially to several new species, in addition to one *Anthyllis*-strain STM9390 belonging to the genus *Rhizobium* (iv) the branch of the concatenated tree (TV-10) containing both sensitive and tolerant strains, suggesting that both phenotypes were inside a same species and that they may acquire their mechanisms of heavy metal-tolerance by horizontal transfer.

Our results revealed no strain belonging to *M. loti*, a typical species generally isolated from *L. corniculatus* root-nodules as described by (Jarvis et al., 1982). In addition, no strain belonged to *M. erdmanii* and *M. jarvisii* recently described by (Martinez-Hidalgo et al., 2015) as species were also

isolated from *L. corniculatus* root nodules. The diversity of our strains was strongly affected by isolation site. Additionally, we confirm that all *M. metallidurans* strains were metal-tolerant and were detected only in mining sites, except one strain (STM9404 isolated from Montdardier MD2 site). We also showed variability among symbiotic symbiovars of *M. metallidurans* strains, not related to its taxonomic position: these symbiovars could be characterized by three profiles of *nodA* gene that were related to trapping plant hosts and geographic sites. *M. metallidurans* strains associated with *A. vulneraria* presented the three profiles of *nodA* gene: symbiovar anthyllidis in Avinières AH1 mine and symbiovar loti either with one *nodA* copy (9/13) or two *nodA* copies in Montdardier MD1 (4/13). All *M. metallidurans* strains associated with *L. corniculatus* were of symbiovar loti with one *nodA* copy, except one strain (STM9305 from MD1 having two *nodA* copies of symbiovar loti). Thus, we could distinguish strains between the two mining sites by their *nodA* profiles influenced by the host plant used in the trapping. *M. metallidurans* strains of symbiovar anthyllidis were not found in Montdardier MD1 and those having two *nodA* copies of symbiovar loti were not detected in the Avinières AH1 mine site.

In conclusion, our results focused on the comparison of phenotypic and genetic diversity of rhizobial populations associated with *L. corniculatus* and *A. vulneraria* isolated from highly and moderately contaminated soils, revealed that (i) metal-tolerant strains were dominant in highly contaminated sites, independently from the trap legume species (ii) genetic composition was strongly affected by the high concentration of heavy metals in soils as dominant species were different in mine soils from those of moderately contaminated sites (iii) *M. metallidurans* was the only species detected in the Avinières mine site whatever the trap plant species we used, and the difference of symbiovars was linked to the trap plant species (iv) the Montdardier MD1 mine revealed the presence of a potential novel metal-tolerant species besides *M. metallidurans* (v) mine-borders presented symbionts with phenotypic and genetic compositions different from those found in mine sites, also revealing the presence of a novel potential species on Montdardier MD2 site (vi) the presence of three *nodA* types according to both host plants and geographic sites, suggests the importance of native plants in the adaptation of their rhizobial partners for nodulation. This work suggests that the genetic composition reflects the adaptation abilities of bacterial populations to changing environmental conditions. Considering the adaptation of native plants and their local bacterial partners at the site level, we recommend the use of local site-specific biological resources for implementation in phytostabilization strategies for treating metal-rich mine sites.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche Programme « Contaminants, Ecosystèmes et Santé » (CES 2010-14, ANR-2010 CESA 006 01SyMetal). R. M. received a PhD grant from the Syrian Government. The LABGeM (CEA/IG/Genoscope & CNRS UMR8030) and the France Génomique National infrastructure (funded as part of Investissement d'Avenir program managed by Agence Nationale pour la Recherche, contract ANR-10-INBS-09) are acknowledged for support within the MicroScope annotation facility.

REFERENCES

- Abdel-Ghaffar, A., and Jensen, H. (1966) The rhizobia of *Lupinus densiflorus* Benth., with some remarks on the classification of root nodule bacteria. *Archiv für Mikrobiologie* **54**: 393-405.
- Ampomah, O.Y., and Huss-Danell, K. (2011) Genetic diversity of root nodule bacteria nodulating *Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulneraria* in Sweden. *Syst Appl Microbiol* **34**: 267-275.
- Aydemir, S., and Sünger, H. (2011) Bioreclamation effect and growth of a leguminous forage plant (*Lotus corniculatus*) in calcareous saline-sodic soil. *African Journal of Biotechnology* **10**.
- Baath, E. (1992) Measurement of heavy metal tolerance of soil bacteria using thymidine incorporation into bacteria extracted after homogenization–centrifugation. *Soil Biol Biochem* **24**: 1167-1172.
- Baath, E., Diaz-Ravina, M., Frostegård, A., and Campbell, C. (1998) Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Appl Environ Microbiol* **64**: 238-245.
- Barrientos, L., Higuera, M., Acuna, H., Guerrero, J., Ortega, F., and Seguel, I. (2002) Symbiotic effectiveness of indigenous strains of *Mesorhizobium loti* and *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) in three *Lotus* plant species. *Agricultura Técnica (Chile)* **62**: 226-236.
- Belimov, A.A., Puhalsky, I.V., Safronova, V.I., Shaposhnikov, A.I., Vishnyakova, M.A., Semenova, E.V. et al. (2015) Role of plant genotype and soil conditions in symbiotic plant-microbe interactions for adaptation of plants to cadmium-polluted soils. *Water, Air, & Soil Pollution* **226**.
- Broos, K., Beyens, H., and Smolders, E. (2005) Survival of rhizobia in soil is sensitive to elevated zinc in the absence of the host plant. *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 573-579.
- Carrasco, J.A., Armario, P., Pajuelo, E., Burgos, A., Caviedes, M.A., López, R. et al. (2005) Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite mine. *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 1131-1140.
- Chao, Y., and Fu, D. (2004) Kinetic study of the antiport mechanism of an *Escherichia coli* zinc transporter, ZitB. *J Biol Chem* **279**: 12043-12050.
- Chaudri, A., McGrath, S., Gibbs, P., Chambers, B., Carlton-Smith, C., Bacon, J. et al. (2008) Population size of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii in long-term field experiments with sewage sludge cake, metal-amended liquid sludge or metal salts: Effects of zinc, copper and cadmium. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 1670-1680.

- Chen, W., and Kuo, T. (1993) A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucl Acids Res* **21**: 2260.
- Dary, M., Chamber-Perez, M.A., Palomares, A.J., and Pajuelo, E. (2010) "In situ" phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *J Hazard Mater* **177**: 323-330.
- Delorme, T., Gagliardi, J., Angle, J., van Berkum, P., and Chaney, R. (2003) Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of clover grown in a zinc and cadmium contaminated soil. *Soil Sci Soc Am J* **67**: 1746-1754.
- Diaz-Ravina, M., Baath, M., and Frostegard, A. (1994) Multiple heavy metal tolerance of soil bacterial communities and its measurement by thymidine incorporation technique. *Appl Environ Microbiol* **60**: 2238–2247.
- Diouf, F., Diouf, D., Klonowska, A., Le Quere, A., Bakhoun, N., Fall, D. et al. (2015) Genetic and genomic diversity studies of Acacia symbionts in Senegal reveal new species of *Mesorhizobium* with a putative geographical pattern. *PLoS One* **10**: e0117667.
- Escaray, F.J., Menendez, A.B., Garriz, A., Pieckenstain, F.L., Estrella, M.J., Castagno, L.N. et al. (2012) Ecological and agronomic importance of the plant genus *Lotus*. Its application in grassland sustainability and the amelioration of constrained and contaminated soils. *Plant Sci* **182**: 121-133.
- Estrella, M.J., Munoz, S., Soto, M.J., Ruiz, O., and Sanjuan, J. (2009) Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Appl Environ Microbiol* **75**: 1088-1098.
- Fatnassi, I.C., Chiboub, M., Saadani, O., Jebara, M., and Jebara, S.H. (2015) Phytostabilization of moderate copper contaminated soils using co-inoculation of *Vicia faba* with plant growth promoting bacteria. *J Basic Microbiol* **55**: 303-311.
- Frérot, H., Lefèbvre, C., Gruber, W., Collin, C., Santos, A.D., and Escarré, J. (2006) Specific interactions between local metalicolous plants improve the phytostabilization of mine soils. *Plant and Soil* **282**: 53-65.
- Gaunt, M., Turner, S., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilps, S., and Young, J. (2001) Phylogenies of atpD and recA support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 2037-2048.
- Giller, K.E., Witter, E., and McGrath, S.P. (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry* **30**: 1389-1414.
- Gossmann, J.A., Markmann, K., Brachmann, A., Rose, L.E., and Parniske, M. (2012) Polymorphic infection and organogenesis patterns induced by a *Rhizobium leguminosarum* isolate from Lotus root nodules are determined by the host genotype. *New Phytol* **196**: 561-573.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series*, pp. 95-98.

- Hubber, A., Vergunst, A.C., Sullivan, J.T., Hooykaas, P.J., and Ronson, C.W. (2004) Symbiotic phenotypes and translocated effector proteins of the *Mesorhizobium loti* strain R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Mol Microbiol* **54**: 561-574.
- Jarvis, B., Pankhurst, C., and Patel, J. (1982) *Rhizobiurn loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *International journal of systematic bacteriology* **32**: 378-380.
- Kasai-Maita, H., Hirakawa, H., Nakamura, Y., Kaneko, T., Miki, K., Maruya, J. et al. (2013) Commonalities and differences among symbiosis islands of three *Mesorhizobium loti* strains. *Microbes and Environments* **28**: 275-278.
- Kelly, S., Sullivan, J., Ronson, C., Tian, R., Brau, L., Munk, C. et al. (2014) Genome sequence of the *Lotus* spp. microsymbiont *Mesorhizobium loti* strain R7A. *Stand Genomic Sci* **9**: 6.
- Kenarova, A., Radeva, G., Traykov, I., and Boteva, S. (2014) Community level physiological profiles of bacterial communities inhabiting uranium mining impacted sites. *Ecotoxicol Environ Saf* **100**: 226-232.
- Kong, Z., Mohamad, O.A., Deng, Z., Liu, X., Glick, B.R., and Wei, G. (2015) Rhizobial symbiosis effect on the growth, metal uptake, and antioxidant responses of *Medicago lupulina* under copper stress. *Environ Sci Pollut Res Int* **22**: 12479-12489.
- Lakzian, A., Murphy, P., and Giller, K.E. (2007) Transfer and loss of naturally-occurring plasmids among isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in heavy metal contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry* **39**: 1066-1077.
- Lakzian, A., Murphy, P., Turner, A., Beynon, J., and Giller, K. (2002) *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* populations in soils with increasing heavy metal contamination: abundance, plasmid profiles, diversity and metal tolerance. *Soil Biology and Biochemistry* **34.4**: 519-529.
- Lejon, D.P.H., Pascault, N., and Ranjard, L. (2010) Differential copper impact on density, diversity and resistance of adapted culturable bacterial populations according to soil organic status. *European Journal of Soil Biology* **46**: 168-174.
- Lindstrom, K., Murwira, M., Willems, A., and Altier, N. (2010) The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Res Microbiol* **161**: 453-463.
- Lira, M.A., Jr., Nascimento, L.R., and Fracetto, G.G. (2015) Legume-rhizobia signal exchange: promiscuity and environmental effects. *Front Microbiol* **6**: 945.
- López-Lara, I.M., Berg, J.D., Thomas-Oates, J.E., Glushka, J., Lugtenberg, B.J., and Spaink, H.P. (1995) Structural identification of the iipo-chitin oligosaccharide nodulation signals of *Rhizobium loti*. *Mol Microbiol* **15**: 627-638.
- Lorite, M.J., Videira e Castro, I., Munoz, S., and Sanjuan, J. (2012) Phylogenetic relationship of *Lotus uliginosus* symbionts with bradyrhizobia nodulating genistoid legumes. *FEMS Microbiol Ecol* **79**: 454-464.

- Lorite, M.J., Munoz, S., Olivares, J., Soto, M.J., and Sanjuan, J. (2010a) Characterization of strains unlike *Mesorhizobium loti* that nodulate lotus spp. in saline soils of Granada, Spain. *Appl Environ Microbiol* **76**: 4019-4026.
- Lorite, M.J., Donate-Correa, J., del Arco-Aguilar, M., Perez Galdona, R., Sanjuan, J., and Leon-Barrios, M. (2010b) *Lotus* endemic to the Canary Islands are nodulated by diverse and novel rhizobial species and symbiotypes. *Syst Appl Microbiol* **33**: 282-290.
- Mahieu, S., Soussou, S., Cleyet-Marel, J.-C., Brunel, B., Mauré, L., Lefèbvre, C., and Escarré, J. (2013) Local adaptation of metallicolous and non-metallicolous *Anthyllis vulneraria* populations: their utilization in soil restoration. *Restoration Ecology* **21**: 551-559.
- Mahieu, S., Frérot, H., Vidal, C., Galiana, A., Heulin, K., Maure, L. et al. (2011) *Anthyllis vulneraria*/*Mesorhizobium metallidurans*, an efficient symbiotic nitrogen fixing association able to grow in mine tailings highly contaminated by Zn, Pb and Cd. *Plant and Soil* **342**: 405-417.
- Martinez-Hidalgo, P., Ramirez-Bahena, M.H., Flores-Felix, J.D., Rivas, R., Igual, J.M., Mateos, P.F. et al. (2015) Revision of the taxonomic status of type strains of *Mesorhizobium loti* and reclassification of strain USDA 3471^T as the type strain of *Mesorhizobium erdmanii* sp. nov. and ATCC 33669^T as the type strain of *Mesorhizobium jarvisii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**: 1703-1708.
- Maynaud, G., Brunel, B., Yashiro, E., Mergeay, M., Cleyet-Marel, J.C., and Le Quere, A. (2014) CadA of *Mesorhizobium metallidurans* isolated from a zinc-rich mining soil is a P(IB-2)-type ATPase involved in cadmium and zinc resistance. *Res Microbiol* **165**: 175-189.
- Maynaud, G., Willems, A., Soussou, S., Vidal, C., Maure, L., Moulin, L. et al. (2012) Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. *Syst Appl Microbiol* **35**: 65-72.
- Maynaud, G., Brunel, B., Mornico, D., Durot, M., Severac, D., Dubois, E. et al. (2013) Genome-wide transcriptional responses of two metal-tolerant symbiotic *Mesorhizobium* isolates to Zinc and Cadmium exposure. *BMC Genomics* **14**: 292.
- Monza, J., FAIHANO, E., and Arias, A. (1992) Characterization of an indigenous population of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus* *Soil Biol, Biochem* **24**: 241-247.
- Nelson, M.S., and Sadowsky, M.J. (2015) Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. *Front Plant Sci* **6**.
- Nicholas, K., and Nicholas, H.J. (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. 1997. *Distributed by the author*.
- Nies, D. (1992) Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. *Plasmid* **27**: 17-28.
- Nies, D.H. (1999) Microbial heavy metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**: 730-750.
- Olenska, E., and Malek, W. (2015) Genetic differentiation of *Trifolium repens* microsymbionts deriving from Zn-Pb waste-heap and control area in Poland. *J Basic Microbiol* **55**: 462-470.

- Pankhurst, C.E., Craig, A.S. and Jones, W.T., 1979. Effectiveness of *Lotus* root nodules I. Morphology and flavolan content of nodules formed on *Lotus pedunculatus* by fast-growing *Lotus* rhizobia. *Journal of Experimental Botany*, **30**:1085-1093.
- Pereira, S.I., Lima, A.I., and Figueira, E.M. (2006) Screening possible mechanisms mediating cadmium resistance in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae isolated from contaminated Portuguese soils. *Microb Ecol* **52**: 176-186.
- Prasad, R., Kawaguchi, S., and Ng, D.T. (2010) A nucleus-based quality control mechanism for cytosolic proteins. *Mol Biol Cell* **21**: 2117-2127.
- Quevauviller, P., Rauret, G., Rubio, R., López-Sánchez, J.-F., Ure, A., Bacon, J., and Muntau, H. (1997) Certified reference materials for the quality control of EDTA-and acetic acid-extractable contents of trace elements in sewage sludge amended soils (CRMs 483 and 484). *Fresenius' journal of analytical chemistry* **357**: 611-618.
- Rensing, C., Mitra, B., and Rosen, B.P. (1997) The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn (II)-translocating P-type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 14326-14331.
- Rhijn, P., Goldberg, R., and Hirsch, A. (1998) *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. *The Plant Cell* **10**, **8**: 1233-1249.
- Richter, M., and Rossello-Mora, R. (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 19126-19131.
- Rogel, M.A., Ormeno-Orrillo, E., and Martinez Romero, E. (2011) Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Syst Appl Microbiol* **34**: 96-104.
- Safronova, V.I., Piluzza, G., Bullitta, S., and Belimov, A.A. (2011) Use of legume-microbe symbioses for phytoremediation of heavy metal polluted soils: advantages and potential problems. In I. A. Golubev (Ed.), *Handbook of phytoremediation*: 443-469.
- Slattery, J.F., Coventry, D.R., and Slattery, W.J. (2001) Rhizobial ecology as affected by the soil environment. *Animal Production Science* **41**: 289-298.
- Spaink, H.P. (2004) Specific recognition of bacteria by plant LysM domain receptor kinases. *Trends Microbiol* **12**: 201-204.
- Stepkowski, T., Hughes, C.E., Law, I.J., Markiewicz, L., Gurda, D., Chlebicka, A., and Moulin, L. (2007) Diversification of lupine *Bradyrhizobium* strains: evidence from nodulation gene trees. *Appl Environ Microbiol* **73**: 3254-3264.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**: 2725-2729.
- Tian, W., Zhang, Z., Hu, X., Tian, R., Zhang, J., Xiao, X., and Xi, Y. (2015) Short-term changes in total heavy metal concentration and bacterial community composition after replicated and heavy application of pig manure-based compost in an organic vegetable production system. *Biology and Fertility of Soils* **51**: 593-603.

- Vidal, C., Chantreuil, C., Berge, O., Maure, L., Escarre, J., Bena, G. et al. (2009) *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metallicolous soil in Languedoc, France. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 850-855.
- von Rozycki, T., and Nies, D.H. (2009) *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie van Leeuwenhoek* **96**: 115-139.
- William, S., and Feil, H. (2012) Bacterial genomic DNA isolation using CTAB. *Sigma* **50**: 6876.
- Xie, P., Hao, X., Herzberg, M., Luo, Y., Nies, D.H., and Wei, G. (2015) Genomic analyses of metal resistance genes in three plant growth promoting bacteria of legume plants in Northwest mine tailings, China. *J Environ Sci (China)* **27**: 179-187.
- Xie, Y., Fan, J., Zhu, W., Amombo, E., Lou, Y., Chen, L., and Fu, J. (2016) Effect of heavy metals pollution on soil microbial diversity and bermudagrass genetic variation. *Front Plant Sci* **7**: 755.
- Yao, H., Xu, J., and Huang, C. (2003) Substrate utilization pattern, biomass and activity of microbial communities in a sequence of heavy metal-polluted paddy soils. *Geoderma* **115**: 139-148.
- Zahran, H. (1999) Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and molecular biology reviews* **63**, **4**: 968-989.
- Zgadzaj, R., James, E.K., Kelly, S., Kawaharada, Y., de Jonge, N., Jensen, D.B. et al. (2015) A legume genetic framework controls infection of nodules by symbiotic and endophytic bacteria. *PLoS Genet* **11**: e1005280.
- Zhang, C., Nie, S., Liang, J., Zeng, G., Wu, H., Hua, S. et al. (2016) Effects of heavy metals and soil physicochemical properties on wetland soil microbial biomass and bacterial community structure. *Sci Total Environ* **557-558**: 785-790.
- Zhang, Y., Tian, C., Sui, X., Chen, W., and Chen, W. (2012) Robust markers reflecting phylogeny and taxonomy of rhizobia. *PloS one* **7**, **9**: e44936.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table IV-2-S1: Detailed description and characterization of the 170 strains isolated from *Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulneraria* used in this study.

Origin site	Plant host	No. of isolates	MIC	MIC							Phylogenetic group Concatenated (16S, atpD, recA) ^e	Reference
				Zn (mM)	Cd (mM)	16S ^b	recA ^d	atpD ^d	nodA ^e	CadA ^f		
Montdardier 1 MD1 (n ^o = 31)	<i>A. vulneraria</i>	1	STM9316	8	1	SI-3	RII-8	AIV-1	N2-11	CI-2	TI-6	This study
		2	STM9317	12	7	SI-2	RII-4	AIV-6	N2-10	CI-3	TI-9	This study
		3	STM9318	4	1.5	SIII-3	RIII-1	AI-1	N3-1-1, N3-2-2	ND	TV-6	This study
		4	STM9319	8	1	SIII-2	RIII-3	AI-2	N2-13	ND	TV-2	This study
		5	STM9320	4	1.5	SIII-2	RIII-1	AI-1	N3-1-1, N3-2-2	ND	TV-3	This study
		6	STM9321	10	3	SI-3	RII-8	AIV-1	N2-11	CI-1	TI-6	This study
		7	STM9322	12	7	SI-2	RII-4	AIV-6	N2-10	CI-3	TI-9	This study
		8	STM9323	4	0.3	SI-2	RII-4	AIV-6	N3-1-2, N3-2-1	CI-3	TI-9	This study
		9	STM9324	8	1.5	SIII-2	RIII-3	AI-2	N2-13	ND	TV-2	This study
		10	STM9325	4	0.8	SIII-2	RIII-1	AI-1	N3-1-1, N3-2-2	ND	TV-3	This study
		11	STM9326	8	1	SIII-2	RIII-1	AI-1	N3-1-1, N3-2-2	ND	TV-3	This study
		12	STM9327	8	7	SIII-2	RIII-1	AI-1	N3-1-1, N3-2-2	ND	TV-3	This study
		13	STM9328	12	7	SI-3	RII-8	AIV-1	N2-11	CI-1	TI-6	This study
		14	STM9329	2	0.5	SIII-2	RIII-1	AI-1	N3-1-1, N3-2-2	ND	TV-3	This study
		15	STM9330	2	0.3	SIII-2	RIII-1	AI-1	N3-1-1, N3-2-2	ND	TV-3	This study
		16	STM9391	18	1	SI-2	RII-4	AIV-6	N3-1-2, N3-2-1	CI-3	TI-9	This study
		17	STM9332	16	7	SI-3	RII-8	AIV-1	N2-11	CI-1	TI-6	This study
		18	STM9334	4	0.8	SIII-2	RIII-1	AI-1	N3-1-1, N3-2-2	ND	TV-3	This study
		19	STM9335	0.5	0.1	SIV-1	RVI-4	AVI-2	N2-13	ND	TII-12	This study
		20	STM9336	6	0.8	SI-3	RII-5	AIV-6	N2-4	CI-3	TI-8	This study
		21	STM9338	6	0.1	SI-4	RIV-1	AII-1	N2-13	ND	TIV-1	This study
		22	STM9339	10	7	SI-3	RII-8	AIV-1	N2-11	CI-1	TI-6	This study
		23	STM9340	0.5	0.1	SIII-1	RVII-1	AI-2	N2-11	ND	TV-1	This study
		24	STM9341	18	1.5	SI-2	RII-4	AIV-6	N3-1-2, N3-2-1	CI-3	TI-9	This study

		25	STM9342	4	7	SIII-2	RIII-1	AI-1	N3-1-1, N3-2-2	ND	TV-3	This study
		26	STM9343	8	0.3	SIII-2	RIII-2	AI-1	N3-1-1, N3-2-2	ND	TV-4	This study
		27	STM9345	6	1	SI-3	RII-9	AIV-6	N2-7	CI-3	TI-5	This study
		28	STM9809	4	7	SIII-4	RIII-1	AI-1	N3-1-1, N3-2-2	ND	TV-7	This study
		29	STM9796	10	0.5	SIII-2	RIII-3	AI-2	N2-13	ND	TV-2	This study
		30	STM9811	12	7	SI-2	RII-4	AIV-6	N2-10	CI-3	TI-9	This study
		31	STM9344	10	0.1	SI-3	RII-6	AIV-6	N3-1-2, N3-2-1	CI-3	TI-4	This study
Montardier 1 MD1 (n=33)	<i>L. corniculatus</i>	1	STM9286	12	1.5	SIII-2	RIII-1	AI-1	N3-1-1, N3-2-2	ND	TV-3	This study
		2	STM9287	2	0.8	SIII-2	RIII-1	AI-1	N3-1-1, N3-2-2	ND	TV-3	This study
		3	STM9288	18	7	SI-3	RII-8	AIV-1	N2-11	CI-1	TI-6	This study
		4	STM9289	6	7	SI-3	RII-9	AIV-6	N2-7	CI-3	TI-5	This study
		5	STM9290	8	7	SI-3	RII-7	AIV-4	N2-7	CI-1	TI-7	This study
		6	STM9291	6	1	SIII-2	RIII-1	AI-1	N3-1-1, N3-2-2	ND	TV-3	This study
		7	STM9292	4	0.5	SIII-2	RIII-1	AI-1	N3-1-1, N3-2-2	ND	TV-3	This study
		8	STM9293	4	0.8	SIII-2	RIII-3	AI-2	N2-13	ND	TV-2	This study
		9	STM9294	12	5	SI-2	RII-4	AIV-6	N2-1	CI-3	TI-9	This study
		10	STM9295	18	7	SI-2	RII-4	AIV-6	N2-10	CI-3	TI-9	This study
		11	STM9296	12	7	SI-2	RII-4	AIV-6	N2-10	CI-3	TI-9	This study
		12	STM9297	10	7	SI-3	RII-8	AIV-1	N2-11	CI-1	TI-6	This study
		13	STM9298	12	7	SI-3	RII-8	AIV-1	N2-11	CI-1	TI-6	This study
		14	STM9299	6	7	SIII-2	RIII-3	AI-2	N2-13	ND	TV-2	This study
		15	STM9300	14	7	SI-3	RII-8	AIV-1	N2-11	CI-1	TI-6	This study
		16	STM9301	14	7	SI-3	RII-8	AIV-1	N2-11	CI-1	TI-6	This study
		17	STM9302	6	0.8	SIII-2	RIII-3	AI-2	N2-13	ND	TV-2	This study
		18	STM9303	4	0.3	SIII-2	RIII-1	AI-1	N3-1-1, N3-2-2	ND	TV-3	This study
		19	STM9304	1	1	SIII-2	RIII-3	AI-2	N2-5	ND	TV-2	This study
		20	STM9305	8	2	SI-2	RII-4	AIV-6	N3-1-2, N3-2-1	CI-3	TI-9	This study
		21	STM9306	10	5	SI-2	RII-4	AIV-6	N2-10	CI-3	TI-9	This study
		22	STM9308	10	1.5	SIII-2	RIII-3	AI-2	N2-13	ND	TV-2	This study
		23	STM9309	10	2	SI-3	RII-8	AIV-1	N2-11	CI-1	TI-6	This study

		24	STM9310	4	2	SIII-2	RIII-3	AI-2	N2-13	ND	TV-2	This study
		25	STM9311	12	5	SI-3	RII-8	AIV-1	N2-11	CI-1	TI-6	This study
		26	STM9312	8	1	SIII-2	RIII-1	AI-1	N3-1-1, N3-2-2	ND	TV-5	This study
		27	STM9313	12	1	SI-2	RII-4	AIV-6	N2-10	CI-3	TI-9	This study
		28	STM9314	8	0.1	SI-3	RII-1	AIV-6	N2-14	ND	TI-10	This study
		29	STM9816	10	5	SI-3	RII-8	AIV-1	N2-11	CI-1	TI-6	This study
		30	STM9818	6	0.8	SIII-2	RIII-1	AI-1	N3-1-1, N3-2-2	ND	TV-3	This study
		31	STM9819	18	0.5	SIII-2	RIII-3	AI-2	N2-5	ND	TV-2	This study
		32	STM9808	6	1	SIII-2	RIII-3	AI-2	N2-5	ND	TV-2	This study
		33	STM9820	12	7	SI-3	RII-8	AIV-1	N2-11	CI-1	TI-6	This study
Avinières 1 AH1 (n=11)	<i>A. vulneraria</i>	1	STM9416	10	0.8	SI-3	RII-6	AIV-2	N1-1-3, N1-2-1	CI-4	TI-1	This study
		2	STM9417	8	0.1	SI-3	RII-2	AIV-7	N1-1-3, N1-2-1	CI-1	TI-14	This study
		3	STM9418	6	0.1	SI-3	RII-2	AVI-1	N1-1-3, N1-2-1	CI-1	TI-17	This study
		4	STM9419	8	0.1	SI-3	RII-6	AIV-2	N1-1-3, N1-2-1	CI-4	TI-2	This study
		5	STM9420	2	0.8	SI-3	RII-6	AIV-2	N1-1-3, N1-2-1	CI-4	TI-2	This study
		6	STM9421	10	0.1	SI-3	RII-6	AIV-3	N1-1-3, N1-2-1	CI-4	TI-2	This study
		7	STM9422	10	0.1	SI-3	RII-2	AIV-7	N1-1-3, N1-2-1	CI-1	TI-13	This study
		8	STM9423	4	0.1	SI-3	RII-2	AIV-7	N1-1-3, N1-2-1	CI-1	TI-13	This study
		9	STM9425	8	0.1	SI-1	RII-2	AIV-7	N1-1-3, N1-2-1	CI-1	TI-15	This study
		10	STM9756	18	3	SI-3	RII-6	AIV-3	N1-1-4, N1-2-1	CI-4	TI-2	This study
		11	STM9807	8	0.1	SI-3	RII-1	AIV-7	N1-1-3, N1-2-1	CI-1	TI-12	This study
Avinières 1 AH1 (n=11)	<i>L. corniculatus</i>	1	STM9407	10	2	SI-2	RII-4	AIV-6	N2-6	CI-3	TI-9	This study
		2	STM9408	8	1	SI-2	RII-4	AIV-6	N2-6	CI-3	TI-9	This study
		3	STM9409	12	5	SI-2	RII-4	AIV-6	N2-6	CI-3	TI-9	This study
		4	STM9410	8	0.8	SI-3	RII-4	AIV-6	N2-6	CI-3	TI-9	This study
		5	STM9411	12	1.5	SI-3	RII-4	AIV-6	N2-6	CI-3	TI-9	This study
		6	STM9412	10	2	SI-2	RII-4	AIV-6	N2-6	CI-3	TI-9	This study
		7	STM9413	10	1.5	SI-2	RII-4	AIV-6	N2-6	CI-3	TI-9	This study
		8	STM9414	12	5	SI-2	RII-4	AIV-6	N2-6	CI-3	TI-9	This study
		9	STM9415	10	0.8	SI-2	RII-4	AIV-6	N2-6	CI-3	TI-9	This study

		10	STM9758	8	1	SI-2	RII-4	AIV-6	N2-6	CI-3	TI-9	This study
		11	STM9757	16	0.1	SI-3	RII-3	AIV-5	N2-8	CI-5	TI-16	This study
Montardier 2 MD2 (n=32)	<i>A. vulneraria</i>	1	STM9376	0.5	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	ND	TII-10	This study
		2	STM9377	12	0.1	SIV-1	RVI-1	AVI-1	N2-2	CII-1	TII-9	This study
		3	STM9378	1	0.8	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	ND	TII-10	This study
		4	STM9379	0.5	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	ND	TII-10	This study
		5	STM9380	6	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	CII-1	TII-10	This study
		6	STM9381	0.5	0.3	SIV-1	RV-2	AVI-5	N2-9	ND	TII-5	This study
		7	STM9382	0.5	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	ND	TII-10	This study
		8	STM9383	0.5	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	CII-1	TII-10	This study
		9	STM9384	0.5	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	CII-1	TII-10	This study
		10	STM9385	0.5	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	ND	TII-10	This study
		11	STM9386	6	7	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	CII-1	TII-10	This study
		12	STM9387	4	0.5	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	CII-1	TII-10	This study
		13	STM9389	6	7	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	CII-1	TII-10	This study
		14	STM9390	0.5	0.1	SV-1	RVIII-1	AVII-1	ND	ND	TVI-1	This study
		15	STM9392	0.5	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	ND	TII-10	This study
		16	STM9393	0.5	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	ND	TII-10	This study
		17	STM9394	2	0.1	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	CII-1	TII-10	This study
		18	STM9395	0.5	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	CII-1	TII-10	This study
		19	STM9396	0.5	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	CII-1	TII-10	This study
		20	STM9397	0.5	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	CII-1	TII-10	This study
		21	STM9398	6	7	SIV-1	RVI-3	AIV-1	N2-2	CII-1	TII-1	This study
		22	STM9399	2	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	CII-1	TII-10	This study
		23	STM9400	0.5	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	CII-1	TII-10	This study
		24	STM9401	0.5	0.3	SIV-1	RV-2	AVI-5	N2-9	ND	TII-5	This study
		25	STM9402	0.5	0.05	SIV-1	RV-2	AVI-3	N2-8	ND	TII-3	This study
		26	STM9403	2	0.5	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	CII-1	TII-10	This study
		27	STM9404	1	0.8	SIV-1	RII-2	AIV-6	N2-2	ND	TI-11	This study
		28	STM9405	0.5	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	ND	TII-10	This study

		29	STM9792	0.5	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	CII-1	TII-10	This study
		30	STM9793	0.5	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	CII-1	TII-10	This study
		31	STM9812	0.5	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	ND	TII-10	This study
		32	STM9821	0.5	0.05	SII-1	RI-6	AIII-3	ND	ND	TIII-2	This study
Montardier 2 MD2 (n=37)	<i>L. corniculatus</i>	1	STM9346	0.5	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	ND	TII-10	This study
		2	STM9347	0.5	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	CII-1	TII-10	This study
		3	STM9348	6	0.3	SIV-1	RVI-2	AVI-2	N2-12	ND	TII-11	This study
		4	STM9349	0.5	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	CII-1	TII-10	This study
		5	STM9350	0.5	0.3	SIV-1	RV-2	AVI-5	N2-9	ND	TII-5	This study
		6	STM9351	4	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-3	CII-1	TII-10	This study
		7	STM9352	0.5	0.3	SIV-1	RV-1	AVI-4	N2-9	ND	TII-7	This study
		8	STM9353	0.5	0.3	SIV-1	RV-2	AVI-5	N2-9	ND	TII-5	This study
		9	STM9354	0.5	0.1	SIV-1	RV-1	AVI-4	N2-9	ND	TII-7	This study
		10	STM9355	0.5	0.05	SII-3	RI-2	AIII-1	N2-16	ND	TIII-4	This study
		11	STM9356	1	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	CII-1	TII-10	This study
		12	STM9357	0.5	0.05	SIV-1	RVI-2	AVI-1	N2-2	CII-1	TII-10	This study
		13	STM9358	0.5	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	CII-1	TII-10	This study
		14	STM9359	0.5	0.1	SIV-1	RV-1	AVI-4	N2-9	ND	TII-7	This study
		15	STM9360	0.5	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-3	CII-1	TII-10	This study
		16	STM9361	0.5	0.1	SIV-1	RV-1	AVI-4	N2-9	ND	TII-7	This study
		17	STM9363	0.5	0.1	SIV-1	RV-2	AVI-5	N2-9	ND	TII-5	This study
		18	STM9365	0.5	0.3	SIV-1	RV-2	AVI-5	N2-9	ND	TII-5	This study
		19	STM9366	0.5	0.05	SIV-1	RV-2	AVI-5	N2-9	ND	TII-5	This study
		20	STM9367	0.5	0.3	SIV-1	RV-2	AVI-5	N2-9	ND	TII-5	This study
		21	STM9368	6	0.3	SIV-1	RIII-1	AVI-1	N2-3	CII-1	TII-8	This study
		22	STM9369	0.5	0.3	SIV-1	RVI-2	AVI-1	N2-2	ND	TII-10	This study
		23	STM9370	1	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	CII-1	TII-10	This study
		24	STM9371	0.5	0.5	SIV-1	RV-2	AVI-5	N2-9	ND	TII-5	This study
		25	STM9372	0.5	0.3	SIV-1	RV-2	AVI-6	N2-9	ND	TII-6	This study
		26	STM9373	0.5	0.3	SIV-1	RV-2	AVI-5	N2-9	ND	TII-5	This study

		27	STM9374	0.5	0.3	SIV-1	RV-1	AVI-4	N2-9	ND	TII-7	This study
		28	STM9375	0.5	0.3	SIV-1	RV-2	AVI-5	N2-9	ND	TII-5	This study
		29	STM9773	0.5	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	ND	TII-10	This study
		30	STM9774	1	0.3	SIV-1	RV-1	AVI-4	N2-9	ND	TII-7	This study
		31	STM9775	0.5	0.3	SIV-1	RV-2	AVI-5	N2-9	ND	TII-5	This study
		32	STM9776	0.5	0.3	SIV-1	RV-1	AVI-4	N2-9	ND	TII-7	This study
		33	STM9777	0.5	0.1	SIV-1	RV-2	AVI-4	N3-1-3, N3-2-6	ND	TII-4	This study
		34	STM9778	0.5	0.1	SIV-1	RV-2	AVI-3	N2-8	ND	TII-3	This study
		35	STM9779	0.5	0.3	SIV-1	RVI-3	AVI-1	N2-2	ND	TII-10	This study
		36	STM9780	0.5	0.3	SIV-1	RV-1	AIV-7	N1-1-1, N1-2-1	ND	TII-2	This study
		37	STM9782	1	0.05	SIV-1	RV-1	AVI-4	N2-9	ND	TII-7	This study
Avinières 2 AH2 (n=8)	<i>A. vulneraria</i>	1	STM9436	0.5	0.3	SII-2	RI-1	AV-1	N1-1-1, N1-2-1	ND	TIII-6	This study
		2	STM9438	1	0.3	SV-5	RVIII-6	AVII-4	ND	ND	TVI-4	This study
		3	STM9442	0.5	0.05	SII-2	RI-5	AIII-1	N1-1-1, N1-2-1	ND	TIII-1	This study
		4	STM9444	0.5	0.3	SII-2	RI-1	AV-1	N1-1-2, N1-2-1	ND	TIII-6	This study
		5	STM9791	0.5	0.3	SV-4	RVIII-5	AVII-3	ND	ND	TVI-3	This study
		6	STM9817	0.5	0.3	SII-2	RI-1	AV-1	N1-1-1, N1-2-1	ND	TIII-6	This study
		7	STM9443	0.5	0.05	SV-2	RVIII-2	AVII-2	ND	ND	TVI-2	This study
		8	STM9440	0.5	0.3	SV-5	RVIII-3	AVII-5	ND	ND	TVI-6	This study
Avinières 2 AH2 (n=7)	<i>L. corniculatus</i>	1	STM9426	8	0.5	SVI-1	RIX-1	AVIII-1	N2-a	ND	TVII-1	This study
		2	STM9432	0.5	0.1	SII-2	RI-5	AIII-1	N3-1-5, N3-2-4	ND	TIII-1	This study
		3	STM9434	0.5	0.3	SV-3	RVIII-4	AVII-6	ND	ND	TVI-5	This study
		4	STM9435	0.5	0.1	SII-3	RI-3	AIII-2	ND	ND	TIII-5	This study
		5	STM9805	0.5	0.1	SII-3	RI-3	AIII-2	N3-1-4, N3-2-3	ND	TIII-5	This study
		6	STM9801	0.5	0.05	SII-3	RI-4	AIII-4	N3-1-3, N3-2-5	ND	TIII-3	This study
		7	STM9799	0.5	0.05	SII-2	RI-5	AIII-1	N2-15	ND	TIII-1	This study

^a n, total number of isolates for each soil sample. ^b From (SI-1) to (SVI-1) represent different 16S rRNA sequence branches, (SI, SII, SIII, SIV, SVII) corresponds to different clusters grouping our strains.

^c Clusters (TI-TVII) correspond to 176 sequences of different groups in concatenated phylogeny. From (TI-1) to (TVII-1) correspond to different branches contained our strains in concatenated tree.

^d From (RI-1) to (RVII-1) correspond to different branches in recA phylogenetic tree. (AI-1)-(AVI-1): represent different branches in the atpD phylogeny.

^e N1 isolates containing one or two copies of the *nodA* gene symbiovar anthyllidis, and N2, shows isolates containing one copies of the *nodA* gene symbiovar loti, N3 represent strains containing two copies of *nodA* gene symbiovar loti.

^f CI-1 to CII-1: indicate the different branches of mesorhizobial isolates containing *cadA* gene.

ND gene not detected.

Table IV-2-S2: Accession numbers of representative and reference strains for the different genes used in this study.

16S rDNA	<i>recA</i>	<i>atpD</i>	<i>nodA</i>	<i>nodA2</i> symbiovar <i>loti</i>	<i>nodA2</i> symbiovar anthyllidis	<i>cadA</i>
STM9432 (KU900639)	STM9440 (KU900657)	STM9436 (KU877848)	STM9426 (KU900690)	STM9801 (KU900719)	STM9425 (KU900717)	STM9339 (KU900725)
STM9355 (KU900640)	STM9390 (KU900658)	STM9362 (KU877849)	STM9355 (KU900691)	STM9777 (KU900720)	STM9487 (KU900718)	STM9316 (KU900726)
STM9821 (KU900641)	STM9443 (KU900659)	STM9378 (KU877850)	STM9799 (KU900692)	STM9432 (KU900721)	<i>M. metallidurans</i> STM2683 ^T (FN436265)	STM9345 (KU900727)
STM9294 (KU900642)	STM9426 (KU900660)	STM9348 (KU877851)	STM9314 (KU900693)	STM9805 (KU900722)	<i>M. ciceri</i> bv. <i>biserrulae</i> WSM 1271 ^T (CP002447 6059775)	STM9756 (KU900728)
STM9425 (KU900643)	STM9791 (KU900661)	STM9402 (KU877852)	STM9796 (KU900694)	STM9818 (KU900723)	<i>M. australicum</i> WSM2073 ^T (MesauDRAFT_5545)	STM9757 (KU900729)
STM9410 (KU900644)	STM9438 (KU900662)	STM9354 (KU877853)	STM9348 (KU900695)	STM9391 (KU900724)	<i>M. opportunistum</i> WSM 2075 ^T (Mesop 6430)	STM9380 (KU900730)
STM9338 (KU900645)	STM9434 (KU900663)	STM9353 (KU877854)	STM9340 (KU900696)	<i>M. loti</i> NZP2037 (mln05)		
STM9354 (KU900646)	STM9377 (KU900664)	STM9372 (KU877855)	STM9811 (KU900697)			
STM9809 (KU900647)	STM9338 (KU900665)	STM9338 (KU877856)	STM9372 (KU900698)			
STM9340 (KU900648)	STM9780 (KU900666)	STM9487 (KU877857)	STM9757 (KU900699)			
STM9310 (KU900649)	STM9353 (KU900667)	STM9801 (KU877858)	STM9362 (KU900700)			
STM9318 (KU900650)	STM9348 (KU900668)	STM9821 (KU877859)	STM9336 (KU900701)			
STM9390 (KU900651)	STM9357 (KU900669)	STM9388 (KU877860)	STM9345 (KU900702)			
STM9443 (KU900652)	STM9335 (KU900670)	STM9790 (KU877861)	STM9407 (KU900703)			
STM9438 (KU900653)	STM9410 (KU900671)	STM9419 (KU877862)	STM9304 (KU900704)			
STM9791 (KU900654)	STM9288 (KU900672)	STM9421 (KU877863)	STM9368 (KU900705)			
STM9434 (KU900655)	STM9290 (KU900673)	STM9290 (KU877864)	STM9393 (KU900706)			
STM9426 (KU900656)	STM9421 (KU900674)	STM9410 (KU877865)	STM9294 (KU900707)			
<i>M. fauceventi</i> STM4922 ^T (KU555366)	STM9336 (KU900675)	STM9422 (KU877866)	STM9388 (KU900708)			
<i>Mesorhizobium</i> sp STM4661 identical to STM4664 (KP749918)	STM9289 (KU900676)	STM9757 (KU877867)	STM9777 (KU900713)			
<i>M. escarrei</i> STM5069 ^T (KP242308)	STM9425 (KU900677)	STM9316 (KU877868)	STM9432 (KU900714)			
<i>M. prunaredense</i> STM4891 ^T (KP242313)	STM9308 (KU900678)	STM9340 (KU877869)	STM9800 (KU900715)			
<i>M. delmotii</i> STM4623 ^T (KP242314)	STM9286 (KU900679)	STM9343 (KU877870)	STM9805 (KU900716)			
<i>M. gobiense</i> CCBAU83330 ^T (EF035064)	STM9343 (KU900680)	STM9310 (KU877871)	STM9777 (KU900713)			
<i>M. tarimense</i> CCBAU83306 ^T (EF035058)	STM9340 (KU900681)	STM9390 (KU877872)	STM9432 (KU900714)			
<i>M. tianshanense</i> A-1BS ^T (AF041447)	STM9757 (KU900682)	STM9443 (KU877873)	STM9800 (KU900715)			

<i>M. metallidurans</i> STM2683 ^T (AM930381)	STM9432 (KU900683)	STM9434 (KU877874)	STM9805 (KU900716)
<i>M. caraganae</i> CCBAU 11299 ^T (EF149003)	STM9355 (KU900684)	STM9438 (KU877875)	STM9425 (KU900709)
<i>M. robiniae</i> CCNWC115 ^T (EU849582)	STM9821 (KU900685)	STM9440 (KU877876)	STM9444 (KU900710)
<i>M. muleiense</i> CCBAU83963 ^T (HQ316710)	STM9801 (KU900686)	STM9791 (KU877877)	STM9756 (KU900711)
<i>M. temperatum</i> SDW018 ^T (AF508208)	STM9805 (KU900687)	STM9426 (KU877878)	STM9436 (KU900712)
<i>M. mediterraneum</i> LMG17148 ^T (AM181745)	STM9436 (KU900688)	<i>M. loti</i> NZP2213 ^T (KM192339)	<i>M. ciceri</i> bv. biserrulae WSM 1271T (CP002447 6065060)
<i>M. tamadayense</i> Ala-3 ^T (AM491621)	STM9314 (KU900689)	<i>M. ciceri</i> USDA 3383 ^T (AJ294395)	<i>M. australicum</i> WSM2073 ^T (AY601528)
<i>M. australicum</i> WSM2073 ^T (AY601516)	<i>M. prunedense</i> STM4891 ^T (KP150569)	<i>M. sangaii</i> SCAU7 ^T (JN129437)	<i>M. opportunistum</i> WSM2075 (Mesop 6436)
<i>M. shangrilense</i> CCBAU65327 ^T (EU074203)	<i>M. temperatum</i> SDW018 ^T (EF639844)	<i>M. qingshengii</i> CCBAU 33460 ^T (JQ339818)	<i>M. metallidurans</i> STM2683 ^T (FN436266)
<i>A. anthyllidis</i> STM4645 ^T (FR869633)	<i>M. mediterraneum</i> LMG17148 ^T (AM182157)	<i>M. shangrilense</i> CCBAU65327 ^T (EU672471)	<i>M. ciceri</i> UPM-Ca7 ^T (AJ300247)
<i>A. aminovorans</i> DSM7048 ^T (AJ011759)	<i>M. delmotii</i> 4623 ^T (KP150570)	<i>M. australicum</i> WSM2073 ^T (JN202306)	<i>M. mediterraneum</i> UPMCa36 ^T (AJ300248)
<i>A. lissarensis</i> CC495 ^T (AF107722)	<i>M. fauceventi</i> STM4922 ^T (KP942498)	<i>M. opportunistum</i> WSM2075 ^T (CP002279)	<i>M. albiziae</i> CCBAU61158 ^T (GQ167236)
<i>M. qingshengii</i> CCBAU33460 ^T (JQ339788)	<i>M. huakuii</i> USDA 4779 ^T (AJ294370)	<i>M. erdmanii</i> USDA 3471 ^T (AJ294393)	<i>M. tianshanense</i> USDA3592 ^T (AJ250142)
<i>M. loti</i> LMG6125 ^T (NR 118992)	<i>M. qingshengii</i> CCBAU33460 ^T (JQ339757)	<i>M. huakuii</i> USDA 4779 ^T (AJ294394)	<i>M. temperatum</i> SDW018 ^T (GQ167238)
<i>M. ciceri</i> UPM-Ca7 ^T (NR 115793)	<i>M. tianshanense</i> CCBAU 3306 ^T (EU249392)	<i>M. jarvisii</i> ATCC 33669 ^T (KM192338)	<i>M. caraganae</i> CCBAU11299 ^T (GQ167250)
<i>M. cantuariense</i> ICMP 19515 ^T (KC237397)	<i>M. tarimense</i> CCBAU83306 ^T (EF549482)	<i>M. albiziae</i> CCBAU 61158 ^T (DQ311090)	<i>M. loti</i> R7A (AL672113)
<i>M. kowhaii</i> ICMP 19512 ^T (KC237394)	<i>M. gobiense</i> CCBAU83330 ^T (EF549481)	<i>M. chacoense</i> STM 2154 ^T (AY785351)	<i>M. loti</i> NZP2213 ^T (L06241)
<i>M. newzealandense</i> ICMP19545 ^T (KC237410)	<i>M. escarrei</i> STM5069 ^T (KP150564)	<i>M. soli</i> NHI-8 ^T (KM188059)	<i>M. loti</i> NZP2037 (AJ300246)
<i>M. sangaii</i> SCAU7 ^T (EU514525)	<i>M. muleiense</i> CCBAU83963 ^T (HQ316782)	<i>Mesorhizobium</i> sp. STM4661 identical to STM4665 (KP942489)	<i>M. huakuii</i> MAFF303099 (mlr8755)
<i>M. calcicola</i> ICMP 19560 ^T (KC237406)	<i>M. metallidurans</i> STM3304 (AM930385)	<i>M. caraganae</i> CCBAU11299 ^T (EU249379)	<i>Mesorhizobium</i> sp. 4661 (KP729636)
<i>M. waitakense</i> ICMP 19523 ^T (KC237413)	<i>M. metallidurans</i> STM3317 (AM930387)	<i>M. prunedense</i> STM4891 ^T (KP242302)	<i>M. amorphae</i> CCNWGS0123 (MEAMCv1 770009)
<i>M. sophorae</i> ICMP 19535 ^T (KC237424)	<i>M. metallidurans</i> STM3292 (AM930383)	<i>M. metallidurans</i> STM 2683 ^T (AM930388)	<i>M. robiniae</i> CCNWYC115 ^T (EU849558)
<i>M. albiziae</i> CCBAU61158 ^T (DQ100066)	<i>M. metallidurans</i> STM3311 (AM930384)	<i>M. metallidurans</i> STM3310 (AM930391)	<i>R. tropici</i> CFNESH10 ^T (EU291990)
<i>M. chacoense</i> PR5 ^T (AJ278249)	<i>Mesorhizobium</i> sp. STM4661 identical to STM4636 (KP942503)	<i>M. metallidurans</i> STM3304 identical to STM3294 (AM930393)	<i>M. plurifarum</i> ICMP13640 ^T (DQ100407)
<i>M. alhagi</i> CCNWXJ122 ^T (EU169578)	<i>M. metallidurans</i> STM2683 ^T (AM930382)	<i>M. metallidurans</i> STM3314 identical to STM3297	<i>M. alhagi</i> CCNWXJ12 ^T (EU722474)

		(AM930389)		
<i>M. camelthorni</i> CCNWXJ404 ^T (EU169581)	<i>M. abyssinicae</i> AC98c ^T (GQ848011)	<i>M. metallidurans</i> STM3292 (AM930392)	<i>R. galegae</i> HAMB11207 ^T (AJ300240)	
<i>M. erdmanii</i> USDA3471 ^T (KM192334)	<i>M. shonense</i> AC39a ^T (GQ848018)	<i>M. metallidurans</i> STM3311 (AM930390)	<i>E. meliloti</i> USDA1170 ^T (Af522456)	
<i>M. jarvisii</i> ATCC 33669 ^T (KM192335)	<i>M. silamurunense</i> CCBAU 01550 ^T (EU518358)	<i>M. fauceventi</i> STM4922 ^T (KP242297)	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> ICM P5943 ^T (DQ100408)	
<i>M. opportunistum</i> WSM2075 ^T (AY601515)	<i>M. hawassense</i> AC99b ^T (GQ848025)	<i>M. muleiense</i> CCBAU83963 ^T (HQ316724)	<i>B. elkanii</i> USDA76 (AM117554)	
<i>M. huakuii</i> IFO15243 ^T (D13431)	<i>M. tamadayense</i> Ala-3 ^T (HE608972)	<i>M. escarrei</i> STM5069 ^T (KP242298)		
<i>M. waimense</i> ICMP 19557 ^T (KC237387)	<i>M. robiniae</i> CCNWC115 ^T (GQ856501)	<i>M. delmotii</i> STM4623 ^T (KP242303)		
<i>M. septentrionale</i> SDW014 ^T (AF508207)	<i>M. opportunistum</i> WSM2075 ^T (FR863560)	<i>M. temperatum</i> SDW018 ^T (DQ345071)		
<i>M. amorphae</i> LMG18977 ^T (AF041442)	<i>M. loti</i> LMG6125 ^T (AM182156)	<i>M. robiniae</i> CCNWC 115 ^T (GQ856506)		
<i>M. abyssinicae</i> AC98c ^T (GQ847896)	<i>M. cantuariense</i> ICMP 19515 ^T (KC237677)	<i>M. mediterraneum</i> LMG17148 ^T (AJ294391)		
<i>M. hawassense</i> AC99b ^T (GQ847899)	<i>M. ciceri</i> USDA 3383 ^T (AJ294367)	<i>M. gobiense</i> CCBAU83330 ^T (EF549409)		
<i>M. plurifarum</i> LMG11892 ^T (Y14158)	<i>M. newzealandense</i> ICMP 19545 ^T (KC237690)	<i>M. tarimense</i> CCBAU83306 ^T (EF549410)		
<i>M. acaciae</i> RITF 741 ^T (JQ697665)	<i>M. kowhii</i> ICMP 19512 ^T (KC237674)	<i>M. tianshanense</i> CCBAU 3306 (KP251034)		
<i>M. silamurunense</i> CCBAU 01550 ^T (EU399698)	<i>M. sangaii</i> SCAU7 ^T (JN129442)	<i>M. amorphae</i> LMG18977 ^T (AM 076364)		
<i>M. shonense</i> AC39a ^T (GQ847890)	<i>M. waitakense</i> ICMP 19523 ^T (KC237693)	<i>M. septentrionale</i> SDW014 ^T (DQ345070)		
<i>M. soli</i> NHI-8 ^T (KC484966)	<i>M. calcicola</i> ICMP 19560 ^T (KC237686)	<i>M. tamadayense</i> Ala-3 ^T (FN563969)		
<i>M. thiogangeticum</i> SJT ^T (AJ864462)	<i>M. sophorae</i> ICMP 19535 ^T (KC237704)	<i>M. silamurunense</i> CCBAU 01550 ^T (EU513336)		
<i>E. meliloti</i> LMG6133 ^T (X67222)	<i>M. caraganae</i> CCBAU11299 ^T (EU249394)	<i>M. abyssinicae</i> HAMB1 3308 (JQ972744)		
<i>E. fredii</i> LMG6217 ^T (X67231)	<i>M. shangrilense</i> CCBAU65327 ^T (EU672501)	<i>M. shonense</i> HAMB1 3295 ^T (JQ972731)		
<i>R. giardinii</i> CCBAU 83011 (EU399716)	<i>M. australicum</i> WSM2073 ^T (JN202310)	<i>M. plurifarum</i> ORS1001 (AY907377)		
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> USDA 2370 (U28386)	<i>M. jarvisii</i> ATCC 33669 ^T (KM192345)	<i>M. hawassense</i> HAMB1 3301 ^T (JQ972740)		
<i>B. japonicum</i> LMG6138 ^T (NR_118981)	<i>M. waimense</i> ICMP 19557 ^T (KC237667)	<i>M. acaciae</i> RITF741 ^T (KM358143)		
	<i>M. septentrionale</i> HAMB1 2582 ^T (DQ444304)	<i>R. giardinii</i> CCBAU 83011 (EU532140)		
	<i>M. amorphae</i> LMG18977 ^T (AM076369)	<i>Ensifer fredii</i> LMG 6217 ^T (AM418761)		
	<i>M. chacoense</i> LMG19008 ^T	<i>Ensifer meliloti</i> LMG6133 ^T		

(AM076370)	(AM418760)
<i>M. soli</i> NHI-8 ^T (KM188061)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae GLR11 (KC679516)
<i>M. plurifarium</i> USDA 4413 ^T (AY688611)	<i>M. alhagi</i> CCNWXJ12-2 ^T (JN202305)
<i>M. acaciae</i> RITF741 ^T (KM358158)	<i>M. camelthorni</i> CCNWXJ404 ^T (JN202304)
<i>M. erdmanii</i> USDA 3471 ^T (AJ294371)	<i>A. aminovorans</i> STM2150 ^T (AY785349)
<i>A. aminovorans</i> DSM7048 ^T (FR869646)	<i>A. anthyllidis</i> STM4645 ^T (FR869652)
<i>A. lissarensis</i> CC495 ^T (FR869647)	<i>A. lissarensis</i> STM3600 ^T (FR869659)
<i>M. albiziae</i> CCBAU61158 ^T (EU249396)	<i>B. japonicum</i> USDA6 ^T (AJ294388)
<i>A. anthyllidis</i> STM4645 ^T (FR869641)	
<i>M. thiogangeticum</i> SGT ^T (AM040610)	
<i>R. giardinii</i> CCBAU 83011 (EU532142)	
<i>E. meliloti</i> LMG6133 ^T (AM182133)	
<i>E. fredii</i> LMG6217 ^T (AM182145)	
<i>R. leguminosarum</i> bv. viciae GLR11 (KC679457)	
<i>M. alhagi</i> CCNWXJ12-2 ^T (FJ481878)	
<i>M. camelthorni</i> CCNWXJ404 ^T (GU220798)	
<i>B. japonicum</i> LMG6138 ^T (AM182158)	

Table IV-2-S3: P-values of MIC paired comparisons by non-parametric statistic tests (Mann-Whitney U test), for Zn and Cd data between each site (white boxes) and between the two host plants for each of the four sites (dark grey boxes).

MIC-Zn per site	Montdardier 1 (MD1)	Avinières 1 (AH1)	Montdardier 2 (MD2)	Avinières 2 (AH2)
Montdardier 1 (MD1)	0.156 (<i>Lotus</i> versus <i>Anthyllis</i>)			
Avinière1 (AH1)	0.291	0.053 (<i>Lotus</i> versus <i>Anthyllis</i>)		
Montdardier 2 (MD2)	<0.0001	<0.0001	0.103 (<i>Lotus</i> versus <i>Anthyllis</i>)	
Avinières 2 (AH2)	<0.0001	<0.0001	0.316	0.845 (<i>Lotus</i> versus <i>Anthyllis</i>)

MIC-Cd per site	Montdardier 1 (MD1)	Avinières 1 (AH1)	Montdardier 2 (MD2)	Avinières 2 (AH2)
Montdardier 1 (MD1)	0.143 (<i>Lotus</i> versus <i>Anthyllis</i>)			
Avinière1 (AH1)	0.003	0.003 (<i>Lotus</i> versus <i>Anthyllis</i>)		
Montdardier 2 (MD2)	<0.0001	0.059	0.030 (<i>Lotus</i> versus <i>Anthyllis</i>)	
Avinières 2 (AH2)	<0.0001	0.012	0.049	0.386 (<i>Lotus</i> versus <i>Anthyllis</i>)

Table IV-2-S4: Characteristics and percentage of similarity among amino acid sequences of *zntA*-like genes found in the genomes sequenced in this study in comparison with the genome of STM2683.

strain	<i>zntA</i> -like gene	(% of identity of amino acid sequences of <i>zntA</i> -like gene (% of identity))								
		Length aa	MES9308 _v1_460141	MES9308 _v1_480009	MES9818 _v1_310231	MES9818 _v1310115	MES9818 _v1_350004	MES9357 _v1_50212	MES9373 _v1_60225	MESS2V1 _980073
STM9308	MES9308_v1_460141	775	100%							
	MES9308_v1_480009	747	63.65%	100%						
STM9818	MES9818_v1_310231	774	100%	63.65%	100%					
	MES9818_v1310115	747	64.4%	95.35%	64.4%	100%				
	MES9818_v1_350004	729	57.33%	52.22%	57.33%	52.03%	100%			
STM9357	MES9357_v1_50212	725	64.42%	66.22%	64.55%	66.62%	52.79%	100%		
STM9373	MES9373_v1_60225	727	75.36%	66.13%	75.42%	67.35%	54.42%	67.08%	100%	
STM2683	MESS2V1_980073	773	77.9%	67.2 %	77.8 %	67.7%	52.43%	65.32%	81.77%	100%

^a amino acid

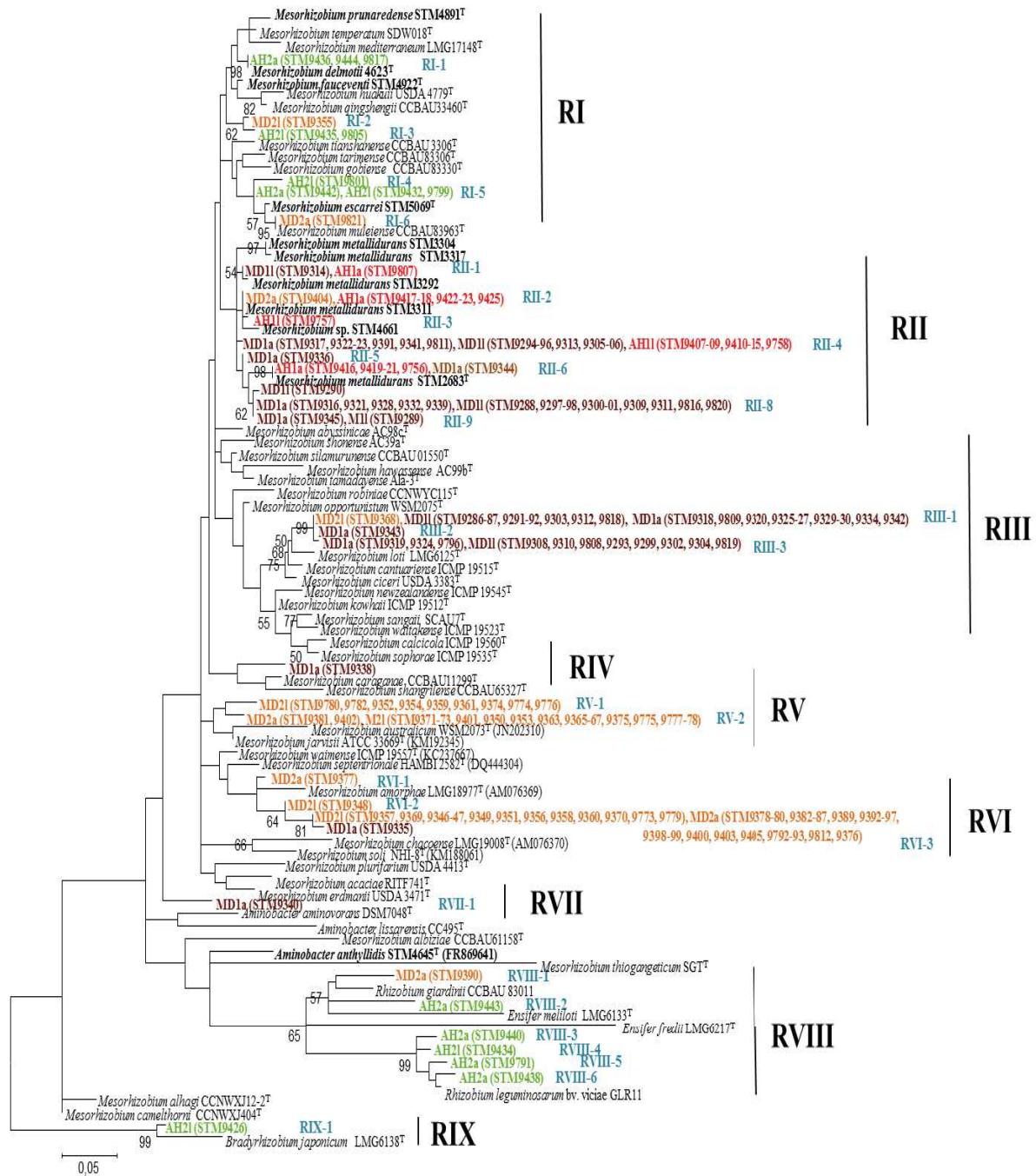


Fig. IV-2-S1A: Maximum-likelihood phylogenetic trees of partial *recA* gene sequences showing the relationships between the *Anthyllis vulneraria* and *Lotus corniculatus* isolates obtained in this study and reference strains. Analyses were based on 246 nt for *recA* sequences using GTR+G+I model. Genbank accession numbers are given in table IV-2-S2 and the significance of each branch is indicated by bootstrap values calculated for 1000 subsets (> 50%) at the major branching-points. The scale bar represents the number of nt substitutions *per* 100 nt. Color of *Anthyllis*-isolates (a) and *Lotus*-isolates (l) are shown according to isolation site (isolates from MD1, AH1, MD2 and AH2 are in brown, red, orange and green respectively).

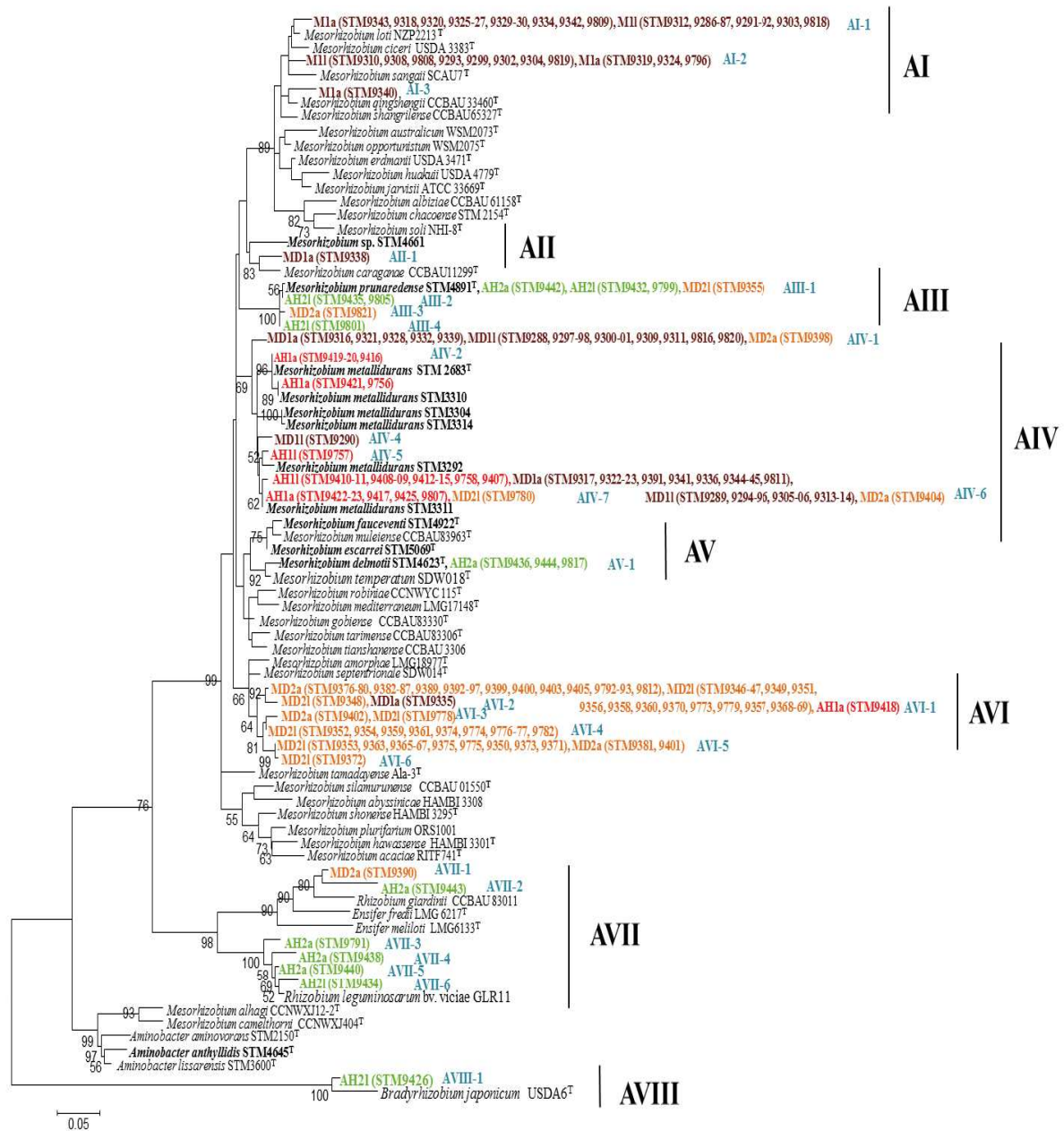


Fig. IV-2-S1B: Maximum-likelihood phylogenetic trees of partial *atpD* gene sequences showing the relationships between the *Anthyllis vulneraria* and *Lotus corniculatus* isolates obtained in this study and reference strains. Analyses were based on 378 nt for *atpD* sequences using TN93+G+I model. Genbank accession numbers are given in table IV-2-S2 and the significance of each branch is indicated by bootstrap values calculated for 1000 subsets (> 50%) at the major branching-points. The scale bar represents the number of nt substitutions *per* 100 nt. Color of *Anthyllis* isolates (a) and *Lotus*-isolates (l) are shown according to isolation site (isolates from MD1, AH1, MD2 and AH2 are in brown, red, orange and green respectively).

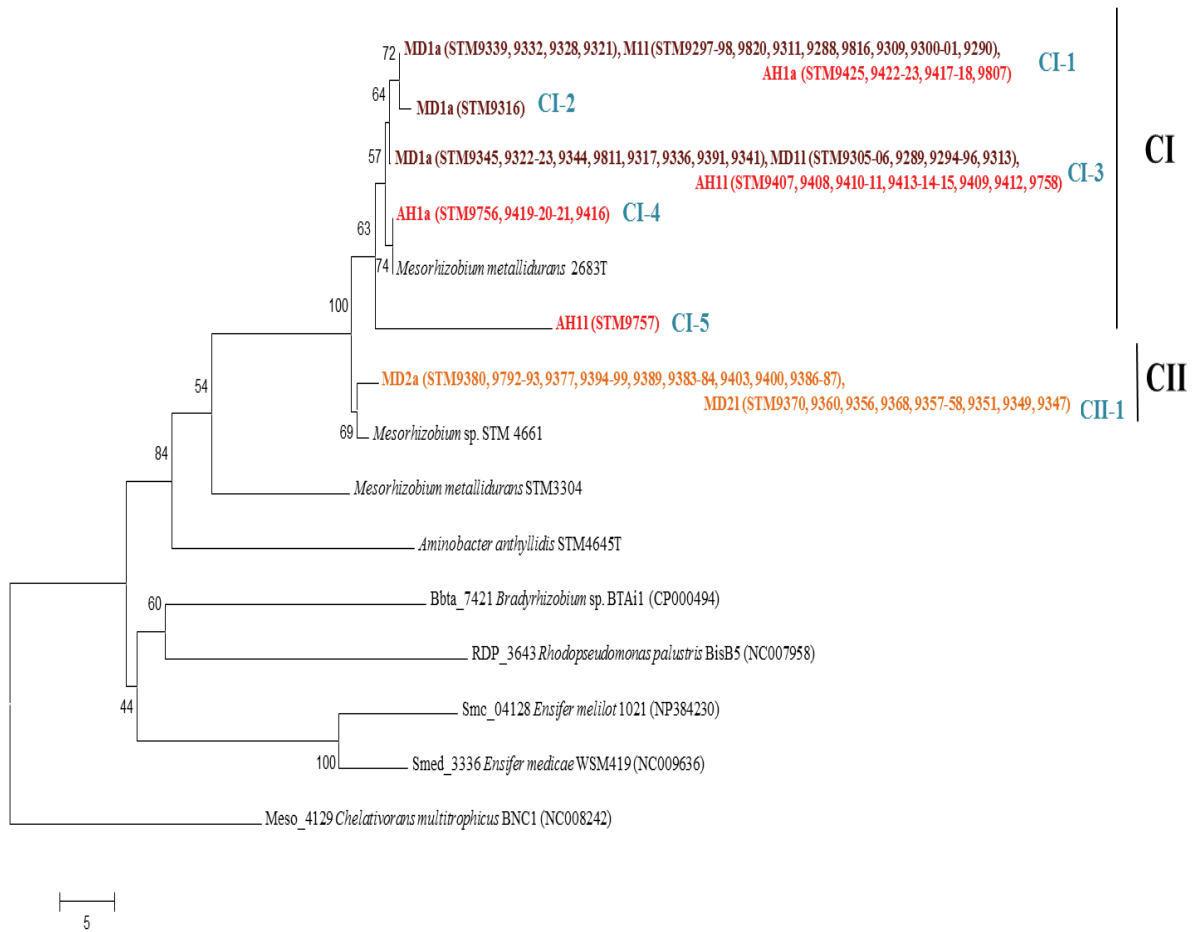


Fig. IV-2-S2: Neighbor-joining phylogenetic tree based on partial CadA protein sequences (207 amino acids) showing the relationships between the *Anthyllis vulneraria* and *Lotus corniculatus* isolates obtained in this study and reference strains. The tree was constructed using Kimura 2-paratemeters. Genbank accession numbers are given next to strain numbers and the significance of each branch is indicated by a bootstrap value calculated for 1000 subsets (> 50%) at the major branching-points. The scale bar represents the number of nt substitutions *per* 100 nt. (a) *Anthyllis*-isolates and (l) *Lotus*-isolates (l)

IV-3- Synthèse :

Ce chapitre a permis l'étude de la diversité des souches associées à *L. corniculatus* et sa comparaison avec celle des symbiotes d'*A. vulneraria*, isolés des sites miniers fortement contaminés en Zn, Pb et Cd des Cévennes (Avinières (AH1) et Montdardier (MD1)) ou de sites moyennement contaminés situés dans les périphéries des sites miniers (Avinières (AH2) et Montdardier (MD2)).

Au total, 170 nouvelles souches ont été isolées des nodosités des écotypes métallicoles de *L. corniculatus* (88 souches) et d'*A. vulneraria* (82 souches). Nous avons montré que 75 % des souches résistantes ont été isolées des sites miniers, alors que la plus grande majorité des souches sensibles proviennent des sites moyennement contaminés. Des études antérieures ont montré que la sélection naturelle favorise les souches bactériennes qui sont les mieux adaptées aux conditions environnementales spécifiques, ce qui peut conduire à la fixation d'un génotype dans la population (Lakzian et al., 2002; Pereira et al., 2006). Les sites miniers ont des teneurs en métaux lourds assez élevées pour exercer une pression sélective conduisant à l'apparition de génotypes fortement tolérants aux métaux lourds (Baath, 1992; Baath et al., 1998). Cette pression sélective permet de développer des mécanismes de résistance à différents stress métalliques (Nies, 1992; Diaz-Ravina et al., 1994). Nous avons détecté le gène *cadA*, appartenant à la famille P_{IB}-type ATPase et impliqué dans le transport de Zn et de Cd (Maynaud et al., 2014) chez tous les symbiotes de *Lotus* et d'*Anthyllis* isolés de la mine des Avinières AH1. Par contre, ce gène n'a pas été détecté chez toutes les souches tolérantes isolées de la mine Montdardier MD1 ce qui indique que ces souches contiennent potentiellement un autre mécanisme de résistance. Le séquençage de deux souches (STM9308 et STM9818) isolées de Montdardier MD1 confirme l'absence du gène *cadA* dans leurs génomes. Nous avons détecté le fragment du gène *cadA* chez 25% des souches sensibles isolées du site Montdardier AH2. Ainsi, ce site présente un cas particulier du point de vue de sa composition taxonomique et phénotypique en raison de (i) la présence de souches tolérantes n'ayant pas le gène *cadA* (ii) la présence de souches sensibles ayant le gène *cadA* (iii) l'appartenance, à la fois de souches sensibles et d'autres résistantes à la même espèce de *Mesorhizobium*.

Les données obtenues avec les marqueurs taxonomiques montrent que 94-98% des souches isolées d'*A. vulneraria* et de *L. corniculatus* appartiennent au genre *Mesorhizobium*, ce qui est en accord avec des études antérieures qui ont montré que ces deux légumineuses nodulent principalement avec des souches appartenant principalement à ce genre (Jarvis et al., 1982; Ampomah and Huss-Danell, 2011). La structure génétique des souches étudiées a été fortement affectée par les teneurs en métaux lourds dans les sols et nos résultats révèlent une très forte présence de *M. metallidurans* dans les sites fortement contaminés. Plusieurs travaux ont montré que les facteurs abiotiques diminuent généralement les populations de rhizobia, leur diversité et leur interaction avec la plante hôte (Slattery et al., 2001; Lira et al., 2015) mais cela ne se vérifie pas toujours (Delorme et al., 2003; Tian et al., 2015). Toutes les souches isolées de la mine des Avinières AH1 appartiennent à *M. metallidurans*, à

l'exception d'une qui est proche de *Mesorhizobium* sp. STM4661 isolée de la mine d'Eylie (Pyrénées). En revanche, 48% des souches isolées du site de Montdardier MD1 appartiennent à l'espèce *M. metallidurans* et 52% des souches appartiennent à une autre espèce métallicole proche de *Mesorhizobium ciceri* et de *Mesorhizobium loti*. Seulement, deux souches sensibles associées à *A. vulneraria* ont été isolées de Montdardier MD1. Elles sont éloignées phylogénétiquement des souches résistantes et regroupées avec les souches sensibles. Nous avons montré aussi que les sites moyennement contaminés présentent une diversité génétique différente de celle observée sur les sites miniers. Les souches de *Mesorhizobium* isolées du site des Avinières AH2 appartiennent exclusivement à deux nouvelles espèces *Mesorhizobium delmotti* et *Mesorhizobium prunedense* (Mohamad et al soumis) et la majorité des symbiotes de *Lotus* et d'*Anthyllis* isolés de Montdardier MD2 appartiennent potentiellement à de nouvelles espèces de *Mesorhizobium*. Nous n'avons détecté aucune souche de *M. loti*, (l'espèce type isolée de *L. corniculatus*, (Jarvis et al., 1982)) ou de *M. erdmanii* et *M. jarvisii* qui ont été récemment décrites comme des nouvelles espèces isolées des nodosités de *L. corniculatus* (Martinez-Hidalgo et al., 2015). Quelques souches appartenant au genre *Rhizobium* ont été isolées des sites moyennement contaminés et sont majoritairement isolées des nodosités d'*A. vulneraria*. Les souches appartenant au genre *Rhizobium* n'étaient jamais isolées, auparavant, des nodosités d'*A. vulneraria* et toutes les souches précédemment isolées des nodosités de cette espèce appartenaient au genre *Mesorhizobium* ou *Aminobacter* (Ampomah and Huss-Danell, 2011; Maynaud et al., 2012) (Mohamad et al en cours de révision). Deux souches appartenant aux genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* ont été isolées des nodosités de *L. corniculatus*. (Gossmann et al., 2012) ont isolé des souches de *Rhizobium* de nodosités de *L. corniculatus* qui se sont révélées incapables de former des nodosités sur la plante-hôte d'origine : elles pouvaient toutefois initier un début de reconnaissance pouvant aller à la formation de petits renflements sur les racines de *L. corniculatus*. Nous supposons que les souches de *Rhizobium* pourraient être des endophytes accompagnant une souche symbiotique de *Mesorhizobium* (Zgadzaj et al., 2015). Cette hypothèse est en accord avec les travaux de (Barrientos et al., 2002; Lindstrom et al., 2010) qui ont isolé des souches de *Bradyrhizobium* ne nodulant pas *L. corniculatus* ou bien formant des nodosités inefficaces. Par contre, les travaux de (Lorite et al., 2012) ont permis d'isoler des souches de *Bradyrhizobium* qui ont un spectre large hôte et qui sont capables de noduler *L. corniculatus*. Il serait donc intéressant de tester la souche de *Bradyrhizobium* obtenue dans cette étude pour vérifier sa capacité de renoduler *L. corniculatus*, voire d'autres espèces de *Lotus* et ainsi déterminer son spectre d'hôte sur une gamme plus large d'espèces végétales.

Les estimations des ANI et DDH révèlent que les souches isolées de la mine de Montdardier MD1 n'appartiennent pas à l'espèce de *M. ciceri* ou à *M. loti* et appartient à une nouvelle espèce métallicole de *Mesorhizobium*. De même, sur le site de Montdardier MD2, au moins une nouvelle espèce a été identifiée sur la base des analyses ANI et DDH obtenues à partir des génomes des deux souches séquencées STM9373 et STM9357. Nous n'avons pas pu confirmer l'appartenance de ces

deux souches à la même espèce ou à deux espèces différentes en raison de l'incohérence entre les valeurs d'ANI et DDH : les estimateurs ANI et DDH sont généralement le miroir l'un de l'autre avec pour deux souches appartenant à une espèce un ANI > 95% associé à un DDH >70% (Richter and Rossello-Mora, 2009). Pour confirmer que ces deux souches appartiennent à deux espèces différentes, des comparaisons de l'ensemble des gènes orthologues et des analyses des blocs de synténies telles que celles effectuées pour confirmer l'appartenance de la souche MAFF303099 à *M. huakuii* symbiovar loti (Wang et al., 2014) devraient être effectuées entre les deux souches STM9373 et STM9357.

Au niveau des propriétés symbiotiques, nous avons montré que la diversité symbiotique est indépendante des teneurs en métaux dans le sol mais qu'elle est liée à la plante hôte utilisée pour le piégeage des symbiotes et à la préexistence de l'espèce végétale sur le site. Nous avons trouvé que les souches de *Mesorhizobium* isolées d'*Anthyllis* isolées des sites des Avinières AH1 et des Avinières AH2 possèdent deux gènes *nodA* comme décrit chez *M. metallidurans* STM2683^T (Maynaud et al., 2012). Les symbiotes de *Lotus* isolés du site des Avinières AH1 sont toutes du symbiovar loti avec un seul gène *nodA* comme la souche type de *M. loti* NZP2213^T (Jarvis et al., 1982) alors que ceux du site des Avinières AH2 appartiennent aussi symbiovar loti mais avec deux gènes *nodA* comme chez *M. loti* NZP2037 qui présente un large spectre d'hôte (Estrella et al., 2009; Kasai-Maita et al., 2013). En revanche, les symbiotes d'*Anthyllis* et de *Lotus* isolées de la mine de Montdardier MD1 appartiennent toutes au symbiovar loti avec indifféremment une copie ou deux copies du gène *nodA*, mais ne possèdent pas les gènes *nodA* du symbiovar anthyllidis, ce qui indique que les propriétés symbiotiques des souches de *Mesorhizobium* présentes sur le site de Montdardier MD1 ont été influencées par la préexistence de *L. corniculatus* sur le site. Nous avons montré la dominance du symbiovar loti avec un seul gène *nodA* chez les symbiotes d'*Anthyllis* et de *Lotus* sur le site Montdardier MD2. Ainsi, *Anthyllis* a été capable de s'associer avec des souches ayant les trois profils de *nodA* contrairement à *Lotus* qui est associé à des souches uniquement du symbiovar loti à l'exception d'une seule souche. La présence de cette seule souche du symbiovar anthyllidis isolée à partir de *Lotus*, nous conduit à s'interroger sur les autres facteurs qui ont pu modifier la capacité symbiotique de cette souche. Des études antérieures ont montré que le système de sécrétion chez les rhizobia peut aussi influencer la capacité symbiotique de la souche bactérienne (Rhijn et al., 1998; Spaink, 2004; Nelson and Sadowsky, 2015). Nous avons montré avec un test de mono-inoculation que le symbiovar anthyllidis est incompatible avec *L. corniculatus*. Cela pourrait expliquer la dominance de ce symbiovar sur la mine des Avinières influencée par la présence d'*Anthyllis*. Cela pourrait aussi expliquer le nombre restreint de souches isolées de *L. corniculatus* avec le sol des Avinières AH1. Ainsi, on a pu distinguer deux symbiovars principaux selon la plante hôte et également déterminer à l'intérieur du symbiovar loti deux catégories : des souches de symbiovar loti ayant un étroit spectre d'hôte et d'autres ayant un large spectre d'hôte comme cela a été décrit par (Estrella et al., 2009; Kasai-Maita et al., 2013).

En résumé, ce chapitre a été consacré à l'étude de la diversité génétique et phénotypique des souches isolées de *L. corniculatus* isolées de sites fortement ou moyennement contaminés en métaux lourds et nous l'avons comparé avec celle des bactéries isolées d'*A. vulneraria*. Nous avons montré que (i) les souches tolérantes aux métaux lourds sont dominantes sur les sites fortement contaminés, indépendamment de l'espèce végétale à laquelle elles sont associées (ii) la diversité taxonomique a été influencée par les teneurs en métaux lourds et le site géographique (iii) *M. metallidurans* est la seule espèce isolée de la mine des Avinières MD1. Les souches de cette espèce appartiennent au symbiovar anthyllidis lorsqu'elles sont piégées à partir d'*Anthyllis* et au symbiovar loti avec un gène *nodA* lorsqu'elles proviennent de *Lotus* (iv) le site de Montdardier MD1 révèle la présence, en plus de *M. metallidurans*, d'une nouvelle espèce métallicole (v) les sites moyennement contaminés présentent une composition génétique et phénotypique différente de celle trouvée sur les sites miniers (vi) trois profils de gène *nodA* ont été détectés et le symbiovar anthyllidis semble spécifique à l'*A. vulneraria*. Ce travail montre l'influence du site géographique et de la plante hôte sur la diversité génétique et symbiotique. *L. corniculatus* avec ses bactéries symbiotiques locales associées est un matériel biologique intéressant à utiliser dans un programme de revégétalisation des anciens sites miniers en complément d'*A.vulneraria*. Ainsi, nous suggérons que l'utilisation de *Fabacées* natives avec leurs bactéries symbiotiques est particulièrement pertinente pour développer des stratégies de phytostabilisation durable.

Chapitre V :

Discussion générale et perspectives

Les métaux lourds dans le sol influencent les populations de rhizobia en impactant leur croissance, leur abondance, leur diversité génétique, leur propriété symbiotique ainsi que leur tolérance aux métaux (Stan et al., 2011). Les travaux de recherche réalisés lors de ma thèse ont permis de mettre en évidence la diversité des populations de rhizobia associées aux écotypes de deux espèces de légumineuses (*Anthyllis vulneraria* subsp *carpatica* et *Lotus corniculatus*) adaptées à des sites fortement contaminés en métaux lourds et d'analyser la diversité des souches isolées respectivement de sites contaminés, moyennement ou non contaminés. L'étude de la répartition de l'espèce de *Mesorhizobium* métallicole, *M. metallidurans*, isolée de nodosités d'*A. vulneraria* (Vidal et al., 2009), plante naturellement présente sur des sites présentant des niveaux variables de contamination des sols en métaux lourds a été présentée dans le **chapitre II**. Le **chapitre III** a été consacré à la définition de nouvelles espèces de *Mesorhizobium* non métallicoles associées à *A. vulneraria* et isolées des sites peu contaminés et non contaminés. Le **chapitre IV** a été consacré à l'étude de la structure génétique et phénotypique de la communauté bactérienne symbiotique associée à *L. corniculatus* présent sur des sites fortement et moyennement contaminés en métaux lourds, puis à sa comparaison avec celle des souches associées à *A. vulneraria*.

L'étude de la structure phénotypique et génétique des rhizobia associées à *A. vulneraria* (chapitre II) isolées des sites avec des différents degrés de contamination métallique ont montré que les sites miniers fortement contaminés en Zn, Pb et Cd ont une signature phénotypique et génétique différente de celle des sites non contaminés. *M. metallidurans* est l'espèce de rhizobium dominante sur la majorité des sites contaminés, à l'exception de celui site d'Eylie. Les souches isolées d'*A. vulneraria* et de *L. corniculatus* présents sur les sites fortement contaminés (Montdardier 1 et Avinières 1) sont génétiquement différentes des souches isolées dans des sites moins contaminés situés à la périphérie des deux sites miniers et ceci indépendamment de la plante hôte à partir de laquelle ont été effectués les isolements (chapitre IV). Ainsi, *M. metallidurans* a pu être isolé de nodosités d'*A. vulneraria* et également de *L. corniculatus* sur les deux sites miniers et une nouvelle espèce métallicole proche de *M. loti* et *M. ciceri* a été identifiée sur le site de Montdardier 1.

Impact des métaux lourds sur le phénotype de tolérance des souches selon le site :

Les souches analysées phénotypiquement ont été isolées de huit sites pour les résultats présentés dans le chapitre II et de quatre sites pour ceux présentés dans le chapitre IV (Tableau V-1).

Tableau V-1 : Localisation géographique et caractéristique des sites où ont été prélevés les sols pour le piégeage et l'isolement des bactéries symbiotiques.

	Site (nom et pays)	région/pays	Niveau de contamination du sol en Zn/Pb/Cd	Plant hôte utilisé pour l'isolement des souches
Chapitre II	Avinières 1 St Bresson 1	Cévennes/France	site miniers, très contaminé	<i>A. vulneraria</i>
	Eylie	Pyrénées ariégeoises/France		
	Breinic	Rheinland/Allemagne		
	Avinières 2	Cévennes/France	la périphérie des Avinières 1, moyennement contaminé	
	St Bresson 2		la périphérie de St Bresson 1, moyennement contaminé	
	Col du Vent la Prunarède		non contaminé non contaminé	
Chapitre IV	Avinières 1 Montdardier 1	Cévennes/France	site miniers, très contaminé	<i>A. vulneraria</i> et <i>L. corniculatus</i>
	Avinières 2		la périphérie des Avinières 1, moyennement contaminé	
	Montdardier 2		la périphérie de Montdardier 1, moyennement contaminé	

Les analyses de tolérance aux Zn et Cd des souches étudiées ont montré que les teneurs en métaux lourds dans le sol influencent la structure de phénotypes de tolérance aux métaux de nos isolats. La proportion des populations des rhizobia la plus résistante aux métaux lourds a été isolée des sites fortement contaminés ce qui est en accord avec de précédentes études (Baath, 1992; Chaudri et al., 2008; Nonnoi et al., 2012). 98,1 et 100% des souches isolées des sites contaminés après piégeage avec *A. vulneraria* et de *L. corniculatus* respectivement, sont résistantes au Zn et/ou au Cd (Figure V-1). Par contre, les sites non contaminés contiennent exclusivement des rhizobia sensibles (CMI de Zn < 1mM) (cas des symbiotes d'*Anthyllis*) (Figure V-1. A). Une expérience de piégeage avec *L. corniculatus* à partir des sites non contaminés permettrait de vérifier la sensibilité de ces souches associées aux métaux lourds en comparaison avec celles des souches isolées d'*Anthyllis*.

Le pourcentage des souches tolérantes aux métaux lourds diminue avec la diminution des teneurs de métaux lourds dans le sol ce qui correspond au cas des sites situés dans les périphéries des sites miniers, en particulière Montdardier 2 et St Bresson 2 (Figure V-1). En effet, le site des Avinières 2 ne contient que des souches sensibles associées à *A. vulneraria* et à *L. corniculatus* (à l'exception d'une) alors que les sites St Bresson 2 et Montdardier 2 contiennent les deux populations (résistante et sensible). 42% des souches isolées de St Bresson 2 sont résistantes au Zn et/ou au Cd et 58% sont sensibles au Zn et au Cd (Figure V-1). Dans le cas du site Montdardier 2, la grande majorité des

souches bactériennes sont sensibles aux métaux lourds, cela correspond à 66 et 80% des souches associées à *A. vulneraria* et à *L. corniculatus*, respectivement. Les périphéries des sites miniers sont beaucoup moins contaminées en Zn et Cd et contiennent une plus forte quantité de carbone organique et d'azote que les sites miniers et ce qui peut expliquer la présence d'une forte proportion des souches sensibles (Lejon et al., 2010). Cependant les sites de St Bresson 2 et Montdardier 2 présentent une population de rhizobia tolérante aux métaux lourds non négligeables. La présence des rhizobia tolérantes aux métaux lourds sur St Bresson 2 pourrait être due à la pression de sélection exercée par la forte concentration en Pb qui est comparable à celle des sites miniers. La tolérance au Zn est souvent associée à celle du Cd et du Pb comme en témoignent certains transporteurs des métaux lourds de type P_{IB} -ATPase qui transportent à la fois le Zn, le Cd et le Pb (Nies, 2003). Le site de Montdardier 2 ne contient pas de teneurs métalliques équivalents à ceux des sites miniers, et la présence des souches résistantes sur ce site est potentiellement liée à l'hétérogénéité du site.

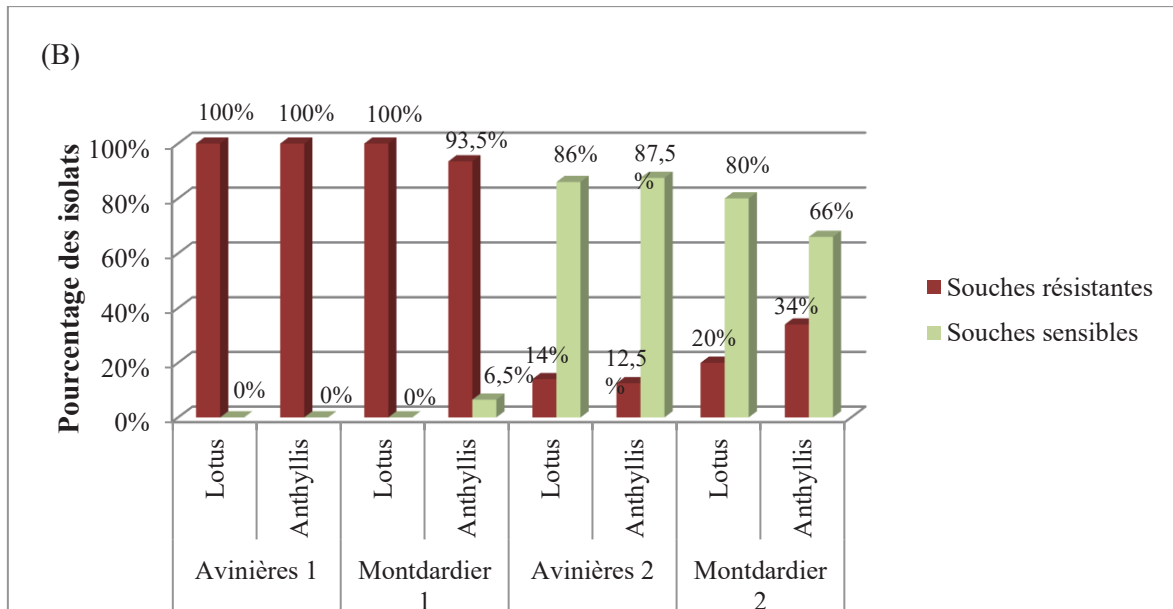
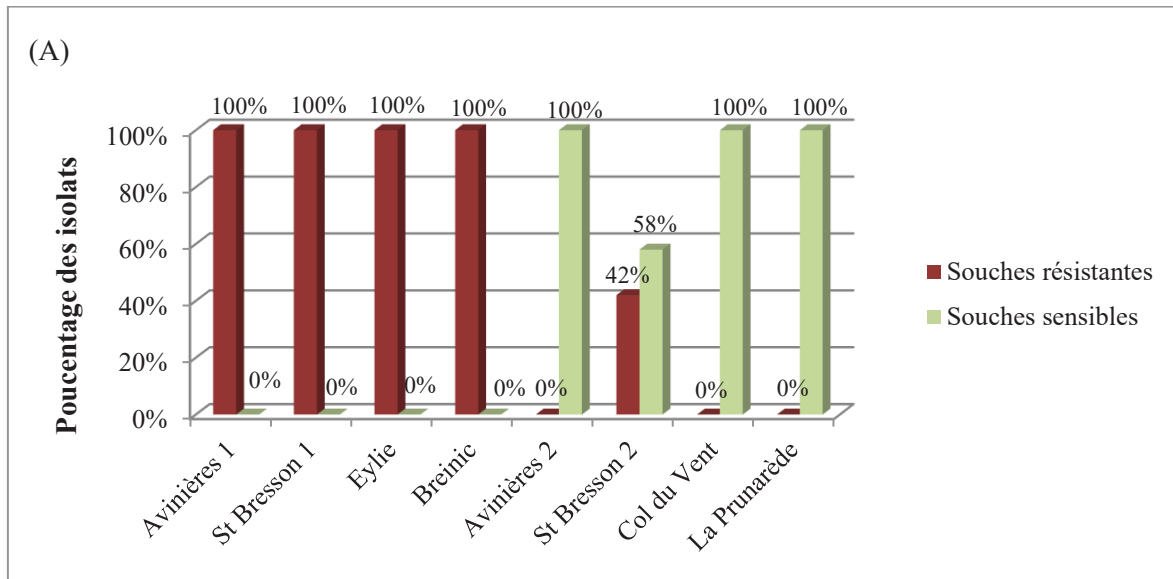


Figure V-1 : Tolérance aux métaux lourds (Zn et Cd) des souches isolées d'*A. vulneraria* (A) ou d'*A. vulneraria* et de *L. corniculatus* (B) à partir de sites présentant un gradient de contamination métallique sites miniers (Avinières 1, St Bresson 1, Eylie, Breinic et Montdardier 1) périphéries de sites miniers (Avinières 2, St Bresson 2 et Montdardier 2) et sites non contaminés (Col du Vent et La Prunarède).

Impact des métaux lourds sur la structure génétique des populations associées à *A. vulneraria* et à *L. corniculatus* :

L'étude de la diversité de rhizobia associés à *A. vulneraria* et à *L. corniculatus* isolées des sites fortement contaminés, moyennement contaminés et non contaminés (pour ces derniers uniquement dans le cas d'*Anthyllis*) a montré que la composition génétique des rhizobia symbiotiques a été fortement impacté par le niveau des métaux lourds dans le sol contrairement à ce qui a été observé par (Tian et al., 2015). Les sites miniers des Avinières 1, St Bresson 1, Breinic contiennent exclusivement des souches appartenant à *M. metallidurans* (**chapitre II**), aucune souche appartenant à une autre espèce n'a été détectée (à l'exception de deux isolats du genre *Aminobacter* isolés de la mine Breinic). Par contre, Montdardier 1 semble comprendre, en plus de *M. metallidurans*, des populations appartenant à une autre espèce métallicole de *Mesorhizobium*, proche de *M. ciceri* et de *M. loti* (Figure V-2).

Deux de ces souches (STM 9308 et STM9818 proche de *M. ciceri*, *M. loti* et isolées de *L. corniculatus*) ont été séquencées. Les analyses de leurs génomes à l'aide des méthodes ANI (<95%) et DDH (<70) et leur comparaison à ceux des souches de *M. metallidurans* STM2683^T, *M. ciceri* WSM1271 et *M. loti* R7A suggèrent que les souches STM9308 et STM9818 appartiennent à une nouvelle espèce bactérienne métallicole. Le site d'Eylie possède une signature phylogénétique spécifique, avec la présence d'une diversité de rhizobia différente de celle retrouvée sur les autres sites miniers. Les isolats d'Eylie appartiennent au genre *Mesorhizobium* et *Aminobacter*. Aucun isolat obtenu à partir de ce site n'appartient à *M. metallidurans* et ils semblent appartenir à une nouvelle espèce métallicole proche de *M. metallidurans*. Les analyses ANI et DDH du génome de la souche STM4661 isolée du site Eylie comparé avec les génomes de *M. metallidurans* 2683^T et STM9308 de la mine de Montdardier montre que la souche STM4661 appartient vraisemblablement à une autre nouvelle espèce de *Mesorhizobium* tolérante aux métaux lourds. Des analyses génétiques supplémentaires complétant l'analyse MLSA avec d'autres marqueurs génétiques, l'analyse de MALDI-TOF MS ou l'hybridation ADN-ADN de plusieurs souches appartenant à ces deux nouvelles espèces potentielles de *Mesorhizobium* devraient être effectuées pour confirmer l'appartenance de STM4661 et STM9308 à deux nouvelles espèces métallicoles. *M. metallidurans* reste la seule espèce métallicole présente sur plusieurs sites miniers fortement contaminés en métaux lourds (Figure V-2). *Aminobacter anthyllidis* est une espèce qui a été décrite assez récemment (Maynaud et al., 2012) et seuls les sites miniers d'Eylie et Breinic contiennent une faible proportion de souches appartenant à cette espèce (12% et 33%, respectivement). La présence d'une autre espèce métallicole sur le site Montdardier 1 pourrait être liée, potentiellement à la présence d'une autre légumineuse (*Robinia pseudoacacia*) qui est souvent associée à des *Mesorhizobium* (Wei et al., 2009; Zhou et al., 2010). Pour comprendre l'origine évolutive de la nouvelle espèce métallicole isolées de Montdardier 1, il serait intéressant d'analyser la diversité génétique des souches associées aux autres légumineuses

présentes sur le site en utilisant des marqueurs chromosomiques afin d'avoir une meilleure représentativité de la diversité bactérienne associée à ce site.

Répartition de *M. metallidurans* dans des sites présentant différentes teneurs de contamination en métaux lourds :

M. metallidurans est une espèce métallophile isolée à l'origine d'*A. vulneraria* présent sur le site de la mine des Avinières (Avinières 1). Il a été montré que toutes les souches appartenant à *M. metallidurans* sont résistantes au Zn (CMI de Zn = 16-32 mM et CMI de Cd = 0,3-0.5 mM) (Vidal et al., 2009). Les travaux réalisés au cours de cette thèse, ont permis de mettre en évidence la répartition de cette espèce selon les teneurs en métaux lourds dans le sol. Les souches appartenant à *M. metallidurans* ou très proches ont été retrouvées exclusivement sur les sites miniers fortement contaminés en métaux lourds ou moyennement contaminés avec une teneur de Pb très élevée (cas de St Bresson 2) (Figure V-2). Le site d'Eylie semble le seul site minier ne contenant pas de souches appartenant à *M. metallidurans* (Chapitre II) alors que 100% des souches issues du site des Avinières et de St Bresson 1, 50% des souches de Montdardier 1, 88% des souches de Breinic et 41% des souches de St Bresson 2 appartiennent à *M. metallidurans*. La structure génétique des populations de rhizobias dans les sites contaminés a été affectée par la pression sélective naturelle liée aux conditions environnementales particulières des sites miniers avec d'une part par la forte contamination en métaux lourds et d'autre part par le déficit en azote et en éléments nutritifs (Baath, 1992; Baath et al., 1998; Giller et al., 1998; Olenska and Malek, 2015). Les souches appartenant à *M. metallidurans* sont compatibles avec *L. corniculatus* et *A. vulneraria* et ceci est particulièrement évident pour celles provenant de Montdardier 1 (M1) où 54,5% des souches isolées de *Lotus* et 45,2% des souches isolées d'*Anthyllis* appartiennent à l'espèce *M. metallidurans* (Chapitre IV) (Figure V-2). L'espèce *M. metallidurans* n'a été retrouvée ni dans les sites non contaminés ni dans les sites moyennement contaminés (à l'exception de St Bresson 2 qui présente de fortes teneurs en plomb). De plus, aucune souche sensible de *M. metallidurans* n'a été détectée. Cela peut être expliqué par la sélection naturelle étant la force évolutionnaire qui diminue dans de conditions environnementales particulières la taille d'une population et sa diversité génétique (Wagner, 2005; Olenska and Malek, 2015). Suite à ces résultats, nous suggérons l'utilisation de *M. metallidurans* comme bio-indicateur de la contamination de sol en métaux lourds.

Composition taxonomique et phénotypique des souches symbiotiques d'*A. vulneraria* et de *L. corniculatus* isolées de sites moyennement ou non contaminés :

Toutes les souches symbiotiques d'*A. vulneraria* isolées des sites non contaminés (Col du Vent et La Prunarède) sont sensibles aux métaux lourds (CMI de Zn < 1mM, CMI de Cd < 0.5 mM) (chapitre II).

Les sites non contaminés présentent une composition bactérienne différente de celle des sites miniers et plusieurs nouvelles espèces de *Mesorhizobium* associées à *A. vulneraria* ont été identifiées. Ces nouvelles espèces bactériennes sont sensibles aux métaux lourds et proches des espèces *M. muleiense*, *M. temperatum*, *M. mediterraneum* et *M. robiniae* (chapitre III) (Figure V-2). Le site de La Prunarède contient des populations symbiotiques d'*A. vulneraria* différentes de celles retrouvées sur le site Col du Vent et ces dernières appartiennent à l'espèce *Mesorhizobium prunedense* (Mohamad et al soumis). Par contre, le site Col du Vent contient des souches appartenant à plusieurs nouvelles espèces du genre *Mesorhizobium* (*Mesorhizobium escarrei*, *Mesorhizobium faucesventi*) (Mohamad et al en préparation). Chaque site non contaminé a une signature génétique différente. L'isolement des souches présentes sur des sites non pollués à *L. corniculatus* comme plante hôte pourrait être intéressant à effectuer afin de les comparer génétiquement avec les souches isolées d'*A. vulneraria*. La présence de souches appartenant à l'espèce de *M. prunedense*, isolées à l'origine du site de La Prunarède, sur les sites moyennement contaminés (Avinières 2 et Montdardier 2) et de souches de *Mesorhizobium* sp. proches de STM6544 (plus de 99,5 % d'identité) après piégeage avec *A. vulneraria* et avec *L. corniculatus* sur les sites de La Prunarède, Col du Vent et Avinières 2 pourraient s'expliquer par les faibles teneurs en métaux lourds, les conditions topographiques et climatiques similaires et la présence d'*A. vulneraria* sur les trois sites (Figure V-2).

Les sites moyennement contaminés (Avinières 2, St Bresson 2 et Montdardier 2) situés à la périphérie des sites miniers des Avinières, St Bresson et Montdardier, présentent trois cas particuliers. La diversité génétique des souches isolées des Avinières 2 semble indépendante de l'espèce végétale. Les souches isolées de ce site appartiennent majoritairement à *M. delmotii* et à *M. prunedense*. La préférence de *L. corniculatus* envers les souches de *M. prunedense* peut être liée aux propriétés symbiotiques de cette espèce (une souche appartenant à cette espèce a des gènes symbiotiques liés à *Lotus* « nommé symbiovar loti »), alors qu'aucune souche de *M. delmotii* n'a le symbiovar loti (voir le paragraphe suivant). Les souches de *Rhizobium* (isolées des nodosités d'*Anthyllis* et de *Lotus*) ne nodulent pas nécessairement ces plantes et sont potentiellement des endophytes présents dans le système racinaire comme cela a été montré par (Zgadza et al., 2015) pour *Lotus japonicus*. Des tests d'infection racinaire en mono-inoculation seraient nécessaires pour vérifier la capacité symbiotique de ces souches. Le marquage de telles souches de *Rhizobium* par l'insertion d'une protéine fluorescente (GFP) permettrait de vérifier la compatibilité de ces souches avec *L. corniculatus* et *A. vulneraria* et de suivre leur capacité à infecter leurs racines et former des nodosités (Gossmann et al., 2012). En revanche, 58% des symbiotes d'*A. vulneraria* isolés du site St Bresson 2 appartiennent potentiellement à une nouvelle espèce sensible aux métaux lourds éloignée de celles retrouvées sur Avinières 2 (*M. delmotii*, *M. prunedense* et *Mesorhizobium* sp. STM5644) et proche de *Mesorhizobium caraganae* (Figure V-2). Enfin le site de Montdardier 2 représente un troisième scénario différent de celui qui a été retrouvé sur les deux autres sites moyennement contaminés : les souches isolées de ce site sont

majoritairement regroupées avec la souche type *M. septentrionale*. Des expérimentations de piégeage avec toutes les légumineuses présentes sur les sites moyennement contaminés permettraient de mettre en évidence la structure génétique des souches isolées dans ces sites. De telles expériences devraient être suivies par des tests de nodulation pour vérifier la compatibilité symbiotique des souches avec leurs plantes hôtes.

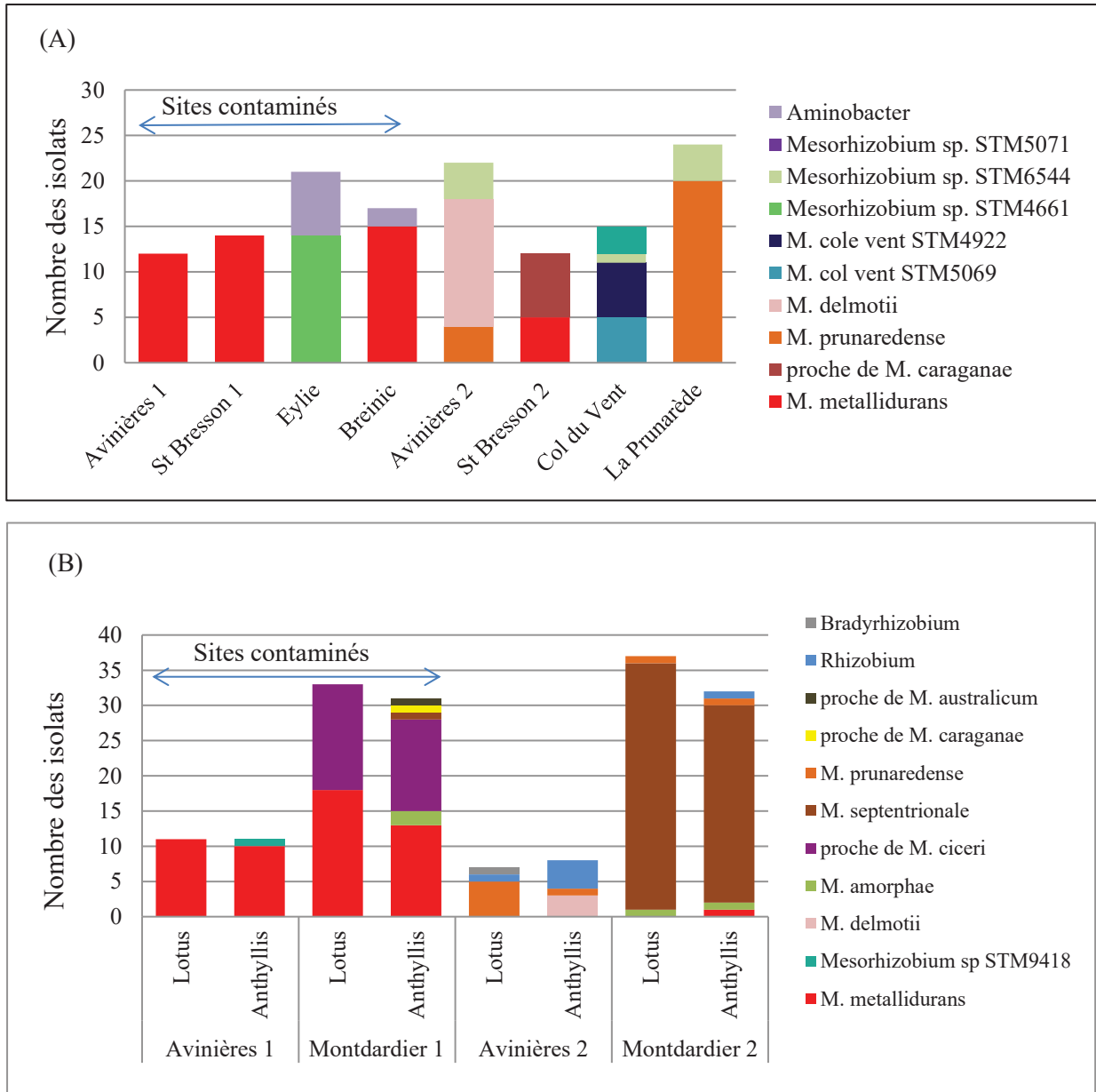


Figure V-2 : Répartition des souches étudiées associées à *A. vulneraria* (A) ou *A. vulneraria* et *L. corniculatus* (B) isolées des différents sites : Avinières 1, St Bresson 1, Eylie, Breinic et Montdardier 1 correspondent aux sites miniers très contaminés en métaux lourds. Avinières 2, St Bresson 2 et Montdardier 2 correspondent aux sites moyennement contaminés situés à la périphérie des sites miniers. Col du Vent et La Prunarède correspondent à deux sites non contaminés localisés dans la région des Cévennes.

Effet de la plante hôte utilisée pour le piégeage et la présence de la plante hôte sur le site d'isolement sur les propriétés symbiotiques des souches étudiées :

Quels que soient les teneurs en métaux dans le sol, la diversité symbiotique apparaît indépendante de la contamination métallique et influencée par la présence de la plante hôte sur le site (Tableau V-2). Dans les sites des Avinières 1 et 2, Col de Vent et La Prunarède les souches isolées d'*A. vulneraria* possède exclusivement deux gènes *nodA* symbiovar anthyllidis comme décrit chez STM2683^T (Maynaud et al., 2012), à l'exception de la souche STM4676 appartenant à *M. prunaredense* ayant une seule gène *nodA* symbiovar loti (chapitre II). La détection des souches de *M. prunaredense* ayant des gènes *nodA* symbiovar loti et la présence de cette espèce sur le site des Avinières 2 (Figure V-2. A) pourrait s'expliquer par le fait que *Lotus* a piégé des souches apparentées à cette espèce. *M. prunaredense* peut se retrouver aussi sur le site de Montdardier 2 associée à *A. vulneraria* et à *L. corniculatus* alors que *M. delmotii* et *M. escarrei* et *M. faucesventi* semblent spécifiques à leur site géographique. Les souches isolées d'*A. vulneraria* à St Bresson 1 et 2, Breinic et Eylie ont un seul gène *nodA* symbiovar loti. Dans le cas du site de Montdardier, la dominance de *L. corniculatus* sur le site rend l'histoire plus compliquée avec la détection de souches isolées d'*Anthyllis* ayant soit un gène *nodA* symbiovar loti ayant un étroit spectre d'hôte (Estrella et al., 2009) soit deux gènes symbiovar loti tels que décrit chez la souche NZP 2037 dite à large spectre d'hôtes (Kasai-Maita et al., 2013). *L. corniculatus* est strictement associé aux souches ayant un ou deux gènes *nodA* symbiovar loti quel que soit le site géographique (Figure V-3). *Anthyllis* est dominante sur le site des Avinières et sur la base des souches testées, le lotier est incapable de piéger des souches ayant deux gènes *nodA* symbiovar *Anthyllis*. La différence dans le comportement symbiotique celui de symbiovar anthyllidis ou celui de symbiovar loti est potentiellement liée à la présence de la plante hôte (*Anthyllis* ou *Lotus*) sur le site. Des travaux antérieurs ont montré que la plante hôte est le facteur clé pouvant influencer la diversité symbiotique et imposer une répartition géographique spécifique des bactéries qui lui sont associées (Han et al., 2010; Stepkowski et al., 2011).

Tableau V-2 : Relation entre le symbiovar des souches isolées et : le site, la présence sur le site de la plante hôte utilisée pour le piégeage

Site étudié (localisation)	Présence ^a observée des légumineuses (<i>Anthyllis</i> ^b et/ou de <i>Lotier</i>)	Symbiovar détecté au sein des populations de rhizobia après piégeage avec <i>A. vulneraria</i> (écotype <i>carpatica</i>) ^c	Symbiovar détecté au sein des populations de rhizobia après piégeage avec <i>L. corniculatus</i>
Breinic (Allemagne)	<i>Anthyllis</i>	loti	ND
Avinières 1 (Cévennes)	<i>Anthyllis</i>	Anthyllidis ^d	loti
Avinières 2 (Cévennes)	<i>Anthyllis</i> et <i>Lotier</i>	Anthyllidis ^d	loti
St Bresson 1 (Cévennes)	<i>Lotier</i>	loti	ND
St Bresson 2 (Cévennes)	<i>Lotier</i>	loti	ND
Eylie (Pyrénées)	<i>Anthyllis</i> et <i>Lotier</i>	loti	ND
Montdardier 1 (Cévennes)	<i>Lotier</i>	loti	loti
Montdardier 2 (Cévennes)	<i>Lotier</i>	loti	loti (un anthyllidis ^f)
Col du vent (Cévennes)	<i>Anthyllis</i>	anthyllidis	ND
La Prunarède (Cévennes)	<i>Anthyllis</i>	anthyllidis (et un loti ^e)	ND

^a au dire d'expert (J. Escarré, C. Lefèbvre, JC Cleyet-Marel).

^b écotype *boscii* (site d'Eylie), écotype *praepropera* (Col du Vent), indéterminé (La Prunarède), écotype *carpatica* (autres sites)

^c la répartition des symbiovars en fonction de la plante-hôte utilisée est indiquée dans la figure V-3.

^d le symbiovar loti est détecté seulement après piégeage avec la légumineuse *Lotus*

^e STM4676 est la seule souche isolées du site de La Prunarède ayant un symbiovar loti

^f STM9780 est la seule souche associée à *L. corniculatus* ayant un symbiovar anthyllidis

ND piégeage n'a pas été réalisé avec *L. corniculatus*.

Le genre *Lotus* est répandu sur les sites d'Eylie, Montdardier (1 et 2) et St Bresson (1 et 2) alors qu'aucune espèce de *Lotus* n'a été retrouvée sur le bassin des Avinières 1. Les tests de nodulation réalisées sur une quinzaine de souches ayant des profils différents sur la base du marqueur symbiotique *nodA* ont montré que les souches testées ayant deux gènes *nodA* caractéristiques du symbiovar anthyllidis sont incapables de noduler *L. corniculatus* contrairement à *A. vulneraria* qui a été nodulée par des souches possédant les trois profils de *nodA* que nous avons identifiés lors de notre étude. Cependant, une exception est à noter pour la souche STM9780 (isolée du site de Montdardier 2) présentant les deux gènes *nodA* du symbiovar anthyllidis qui s'est avérée capable de noduler aussi bien les plantes de *L. corniculatus* que *A. vulneraria* (chapitre IV) (Figure V-3). Deux hypothèses pourraient expliquer la capacité de cette souche à noduler *Lotus* : (i) présence de gènes de nodulation compatibles avec *Lotus* (ii) système de sécrétion pouvant réduire ou élargir le spectre hôte d'une souche de rhizobium (Gourion et al., 2015). Pour cela, il serait intéressant de séquencer le génome de la souche STM9780 pour effectuer une comparaison génomique avec les autres souches du même symbiovar anthyllidis et chercher les gènes impliqués dans le système de sécrétion. Ces derniers pourraient être mutés distinctivement pour étudier leur effet sur la nodulation de cette souche avec *Lotus*. De plus, des différences de nodulation entre les souches possédant toutes des gènes *nodA* du symbiovar loti ont été trouvées avec *Anthyllis*. Les souches associées à *Lotus* ont pu, potentiellement, transférer horizontalement leur îlot symbiotique à des souches de *Mesorhizobium* non symbiotique comme cela a été décrit par (Sullivan et al., 2002) pour des souches nodulant aussi *L. corniculatus*. Pour comprendre cette différence de nodulation avec l'incapacité à noduler *Anthyllis* pour des souches du sv. loti, la comparaison des génomes d'une souche nodulant efficacement *Anthyllis* et une autre qui ne nodule pas cette espèce permettrait de caractériser et de comparer leurs îlots symbiotiques. Actuellement, les génomes de dix souches sont disponibles au laboratoire : les génomes de quatre souches ayant un seul gène *nodA* du symbiovar loti (STM 9308, STM9357, STM4661 et STM9373), le génome d'une souche ayant les deux gènes *nodA* du symbiovar loti (STM9818), et les génomes de cinq souches ayant les deux gènes *nodA* du symbiovar anthyllidis (STM2683^T, STM4891^T, STM4623^T, STM4922^T, STM5069^T). La comparaison des génomes de ces souches permettrait d'étudier l'origine évolutive des gènes symbiotiques par la recherche et la caractérisation de l'îlot symbiotique. Pour mieux comprendre le rôle fonctionnel des deux gènes *nodA* typiques du symbiovar anthyllidis et leur spécificité envers *A. vulneraria*, il faudrait tester ces souches sur une gamme de légumineuses afin de déterminer leur spectre d'hôte, il serait également intéressant de les muter distinctement et d'étudier leurs effets sur la symbiose et la fixation de l'azote avec *A. vulneraria*.

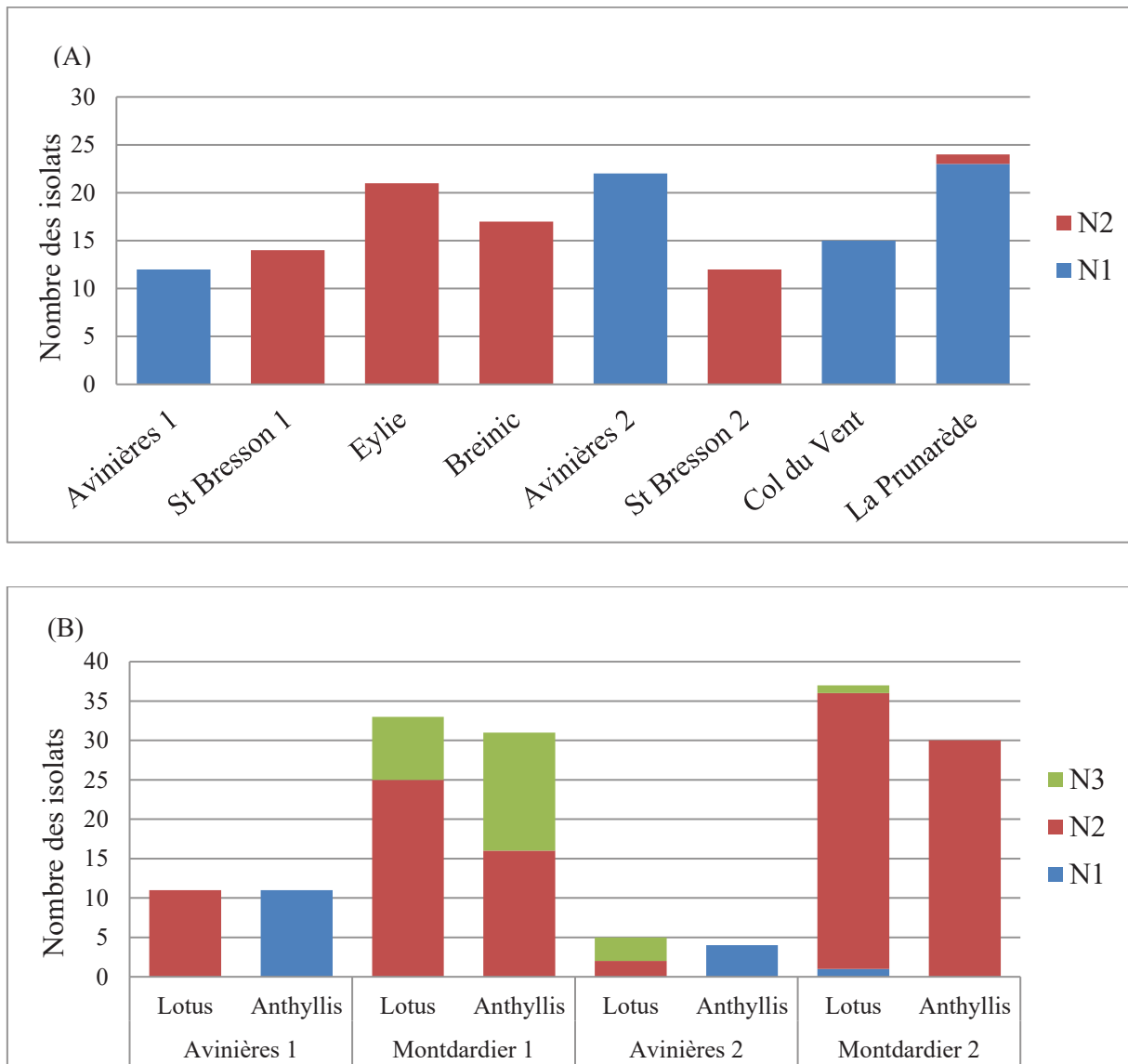


Figure V-3 : Répartition, en fonction des sites, des isolats identifiés sur la base du type de gène *nodA* des souches isolées soit uniquement d'*A. vulneraria* (A), soit d'*A. vulneraria* et de *L. corniculatus* à partir du même échantillon de sol (B). N1 correspond aux souches ayant les deux gènes *nodA* du symbiovar anthyllidis, N2 correspond aux souches ayant un gène *nodA* du symbiovar loti (spectre d'hôtes étroit), N3 correspond aux souches ayant deux gènes *nodA* du symbiovar loti (large spectre d'hôtes).

Propriétés symbiotiques des souches de *M. metallidurans* en fonction de la plante hôte :

Contrairement à la répartition exclusive des souches de *M. metallidurans* dans des sites miniers et leur phénotype strictement tolérant aux métaux lourds, les comportements symbiotiques de ces souches semblent plus larges et plus diversifiés. *M. metallidurans* a été isolé de nodosités d'*A. vulneraria* mais également de nodosités de *L. corniculatus*. Elle présente, lors de son association avec *Anthyllis*, des souches possédant une diversité de profils *nodA* différente de celle des souches isolées de *L. corniculatus*.

Les souches de *M. metallidurans* isolées d'*A. vulneraria* de la mine des Avinières appartiennent, toutes, au symbiovar anthyllidis, alors que les souches de *M. metallidurans* provenant des nodosités de *L. corniculatus* sont du symbiovar loti (Figure V-4). Cela peut indiquer la préférence d'*A. vulneraria* vis-à-vis des souches du symbiovar anthyllidis ou l'incompatibilité de nodulation de *Lotus* avec le symbiovar anthyllidis. Ces résultats pourraient traduire la présence dans le sol de la mine des Avinières de souches non symbiotiques de *M. metallidurans* qui auraient acquis des gènes symbiotiques par transfert horizontal d'îlots symbiotiques. Des essais préliminaires pour isoler des souches de *M. metallidurans* non symbiotiques ont été effectués au début de ma thèse pour tester cette hypothèse mais nous n'avons pas réussi à isoler de souche de *Mesorhizobium* directement du sol sur un milieu enrichi en zinc. Les isolats qui ont été caractérisés par leur séquence d'ADNr 16S se sont avérées appartenir au genre *Inquilinus* qui comprend des espèces isolées de patients atteints de mucoviscidose ou à partir du sol. Les analyses métagénomiques du sol de la mine des Avinières ont montré que les séquences d'ADNr 16S de *Mesorhizobium* représentaient seulement 0,3% du total des séquences bactériennes d'ADNr 16S détectées (Isabelle Navarro, communication personnelle). La possibilité d'isoler des souches non symbiotiques de *Mesorhizobium* et plus encore de l'espèce *M. metallidurans* directement du sol est donc très faible.

Les souches de *M. metallidurans* provenant de la mine de Montdardier possèdent soit un gène *nodA* soit deux gènes *nodA* appartenant tous au symbiovar loti, quelle que soit la plante hôte utilisée pour le piégeage des souches. Toutefois, 97 et 87% des souches de *M. metallidurans* piégées respectivement par *Lotus* et *Anthyllis*, ont un gène *nodA* du symbiovar loti (chapitre IV) (Figure V-4). Cela peut potentiellement traduire la préférence des souches de *M. metallidurans* à porter un gène *nodA* symbiovar loti dans ce site minier. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser un test de mono-inoculation avec des souches de *M. metallidurans* ayant un ou deux gènes *nodA* symbiovar loti pour tester leur efficacité. Ensuite, le test de l'efficacité pourrait être complété par un test de compétition en se basant sur les souches ayant la même efficacité avec *Anthyllis* et avec *Lotus*. Une collection de souches pour lequel un inoculum mixte serait ainsi préparé : chaque inoculum contiendrait le même pourcentage de deux souches, une ayant un gène *nodA* du symbiovar loti et l'autre ayant les deux gènes *nodA* du symbiovar loti (et qui pourraient être distinguées par exemple, à l'aide d'un marqueur de résistance à un antibiotique). Chaque inoculum serait testé sur *L.*

corniculatus et *A. vulneraria* afin de déterminer leur capacité de compétition pour la nodulation. Le symbiovar anthyllidis n'a pas été détecté sur le site de Montdardier : cela pourrait être lié à la préexistence du *Lotus* sur le site qui a favorisé la dominance du symbiovar loti dans le site par amplification de ces souches au niveau de son système racinaire. Pour mieux comprendre le rôle des différents gènes *nodA* de *M. metallidurans*, il serait intéressant de muter séparément les deux copies *nodA* du symbiovar anthyllidis ainsi que celles du symbiovar loti et de tester les souches mutées sur une gamme de légumineuses proches phylogénétiquement d'*Anthyllis* et de *Lotus* ou sur d'autres espèces au sein de ces 2 genres, afin de comparer l'étendue de leurs spectres d'hôtes. Des tests de compétitions (comme présentés plus haut) pourraient répondre à la question de préférence de *M. metallidurans* associées à *Anthyllis* envers les souches ayant deux gènes *nodA* symbiovar anthyllidis ou envers des souches de symbiovar loti quand les trois profils sont présents dans les mêmes proportions dans l'inoculum.

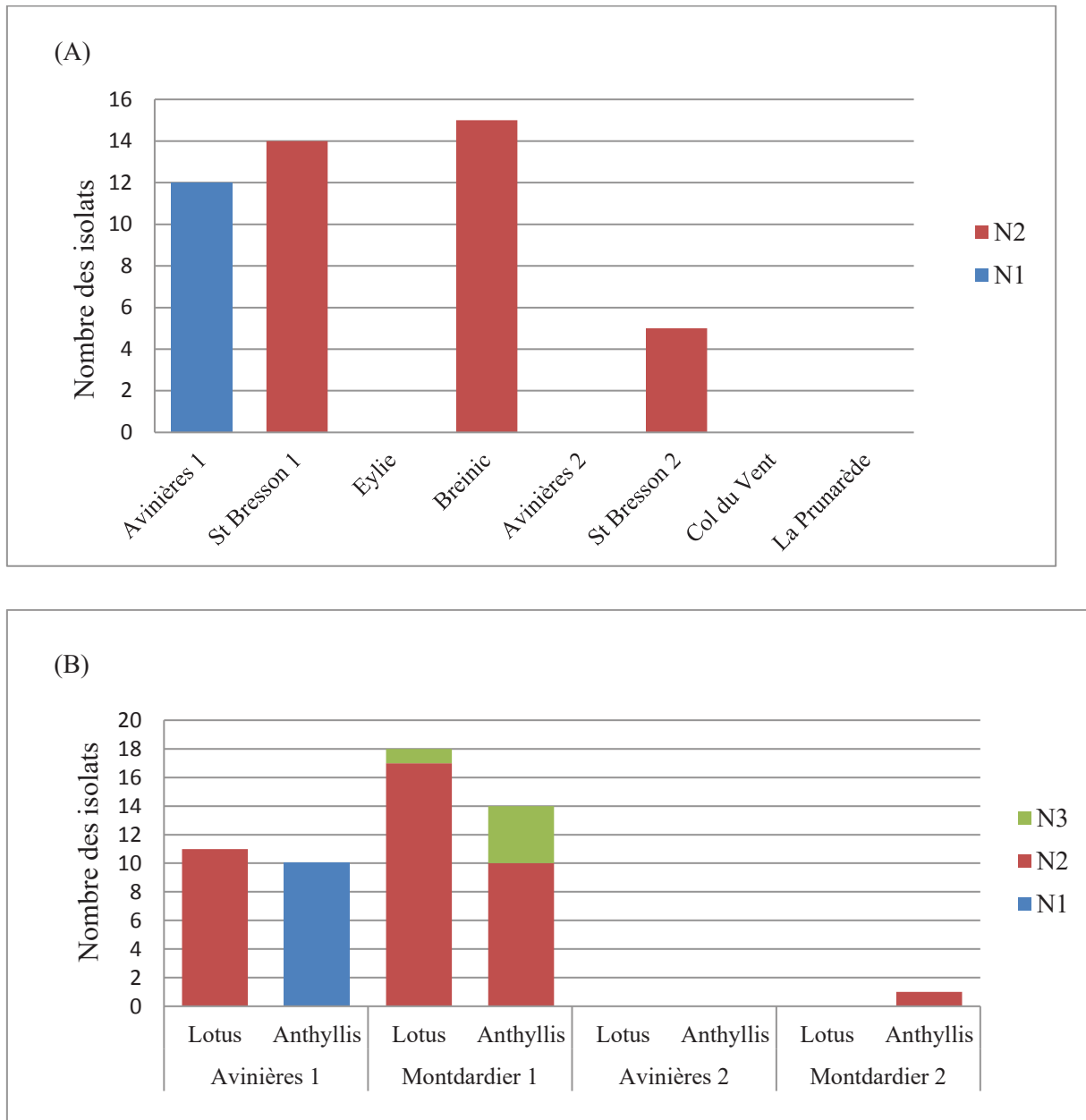


Figure V-4 : Types de gène *nodA* des souches isolées selon le site géographique à partir de nodosités d'*A. vulneraria* (A, cf. chapitre II) ou d'*A. vulneraria* et de *L. corniculatus* à partir du même échantillon de sol et dans les mêmes conditions expérimentales (B, cf. chapitre IV). N1 correspond aux souches du symbiotype anthyllidés présentant deux gènes *nodA*, N2 correspond aux souches du symbiotype loti avec un gène *nodA* (spectre d'hôte étroit (Estrella et al., 2009)), N3 correspond aux souches du symbiotype loti ayant deux gènes *nodA* (large spectre d'hôte défini selon (Estrella et al., 2009; Kasai-Maita et al., 2013)).

Propriétés symbiotiques des souches de *Mesorhizobium* sp. (espèce métallicole, site Montdardier) selon la plante hôte (chapitre IV):

Le sol de la mine de Montdardier a la particularité de contenir deux espèces de *Mesorhizobium* métallicoles à savoir *M. metallidurans* et une espèce non définie proche de *M. ciceri* et de *M. loti*. Les CMI de Zn et de Cd des souches appartenant à la nouvelle espèce métallicole *Mesorhizobium* sp. est de 1-12 mM pour le Zn et de 0.3-7 mM pour le Cd. 73% des souches isolées de nodosités d'*Anthyllis* appartenant à cette espèce (*Mesorhizobium* sp.) ont les deux gènes *nodA* du symbiovar *loti* et 27 % ont le profil avec un seul gène *nodA* sv. *loti*. Par contre, *L. corniculatus* semble piéger sur ce même site de façon pratiquement équivalente les souches ayant les deux types de profils *nodA* (Figure V-5). La préférence d'*Anthyllis* à piéger les souches ayant les deux gènes *nodA* du symbiovar *loti* contrairement à ce qui a été retrouvé avec *M. metallidurans* (71% des souches de *M. metallidurans* associées à *Anthyllis* sur la mine de Montdardier ont un seul gène *nodA* symbiovar *loti*) pourrait s'expliquer, soit par la présence d'une plus forte population appartenant à cette espèce présentant les deux gènes *nodA* de *loti* que celle ne possédant qu'un gène *nodA* du symbiovar *loti*, soit par leur capacité compétitive conduisant à un meilleur succès avec *Anthyllis* que celles des souches ayant un seul gène *nodA* symbiovar *loti*.

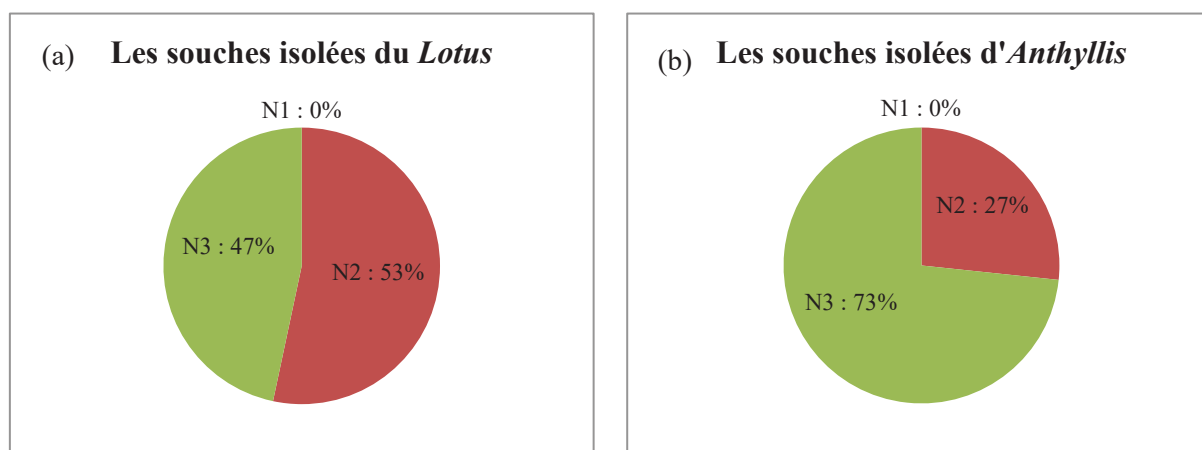


Figure V-5 : Répartition des types *nodA* des souches de la nouvelle espèce métallicole du genre *Mesorhizobium* détectée sur la mine de Montdardier en fonction de la plante hôte utilisée pour le piégeage des souches, (a) souches isolées des nodosités de *L. corniculatus*, (b) souches isolées des nodosités d'*A. vulneraria* (chapitre IV). N1 correspond aux souches ayant deux gènes *nodA* symbiovar anthyllidis, N2 (en rouge) correspond aux souches ayant un gène *nodA* symbiovar loti (spectre d'hôte étroit), N3 (en vert) correspond aux souches du symbiovar loti ayant deux gènes *nodA* (large spectre d'hôte (Estrella et al., 2009; Kasai-Maita et al., 2013).

Utilisation du marqueur *cadA* comme indicateur de la tolérance des souches aux métaux lourds ?

Dans les sites contaminés, le gène *cadA* a été détecté uniquement chez les souches appartenant à l'espèce *M. metallidurans* ou à des espèces proches phylogénétiquement (chapitres II et IV) (Figure V-6). Par contre, aucune souche appartenant à la nouvelle espèce métallicole de la mine Montdardier 1 n'a donné de signal d'amplification pour le marqueur *cadA* (chapitre IV). L'analyse des génomes de souches résistantes comme STM9308 (CMI de Zn = 10mM, de Cd = 1.5mM) et STM9818 (CMI de Zn = 6mM, de Cd = 0.8mM) n'a pas permis de détecter le gène *cadA* chez ces deux souches. La recherche des gènes impliqués dans la résistance des souches où le gène *cadA* n'a pas été détecté, permettrait de comprendre les autres mécanismes de résistance utilisés par ces nouvelles souches de *Mesorhizobium* sp. métallicoles. Des travaux antérieurs ont montré que les gènes (*zitB*, *czcD*, *zntA*) chez la souche CCNWGS0123 de *M. amorphae* étaient impliqués dans sa résistance au Zn (Xie et al 2015). Les gènes *czcD* et *zntA* ont été retrouvés non seulement dans les génomes des souches résistantes mais aussi dans ceux des souches sensibles telle que *M. delmotii* STM4623^T, *M. prunaredense* STM4891^T, STM9357 et STM9373. Le gène *zitB* a été détecté dans les génomes des souches résistantes (STM9308 et STM9818) et sensibles (STM9357 et STM9373) isolées de Montdardier 1 et 2 mais il n'a pas été détecté dans le génome de *M. metallidurans* STM2683^T ou STM4623^T et STM4891^T. Des analyses transcriptomiques de type RNAseq permettraient d'identifier les gènes impliqués dans la résistance des souches au Zn et au Cd comme les travaux réalisés avec des *Mesorhizobium* métallicoles (Maynaud et al., 2013).

Alors que le marqueur *cadA* avait été détecté uniquement chez les souches de *M. metallidurans*, ce gène a été détecté chez 25% de souches sensibles de Montdardier 2 (chapitre IV). L'analyse du gène complet de *cadA* de la souche STM9357 qui a été séquencée (souche sensible aux métaux lourds avec le marqueur *cadA* détecté) montre que ce gène *cadA* est proche de celui des souches résistantes STM4661 et STM2683^T mais qu'il est tronqué de 450 nt en début de séquence nucléotidique qui est une région particulière de *cadA* potentiellement indispensable à l'expression de la résistance au Zn et au Cd (Maynaud et al., 2014). Pour connaître l'importance et le rôle de cette région dans la tolérance aux métaux des souches, il serait judicieux de déléter cette région chez la souche STM 4661 ou une autre souche résistante (comme STM2683^T) et de comparer leurs niveaux de résistance au Zn et au Cd.

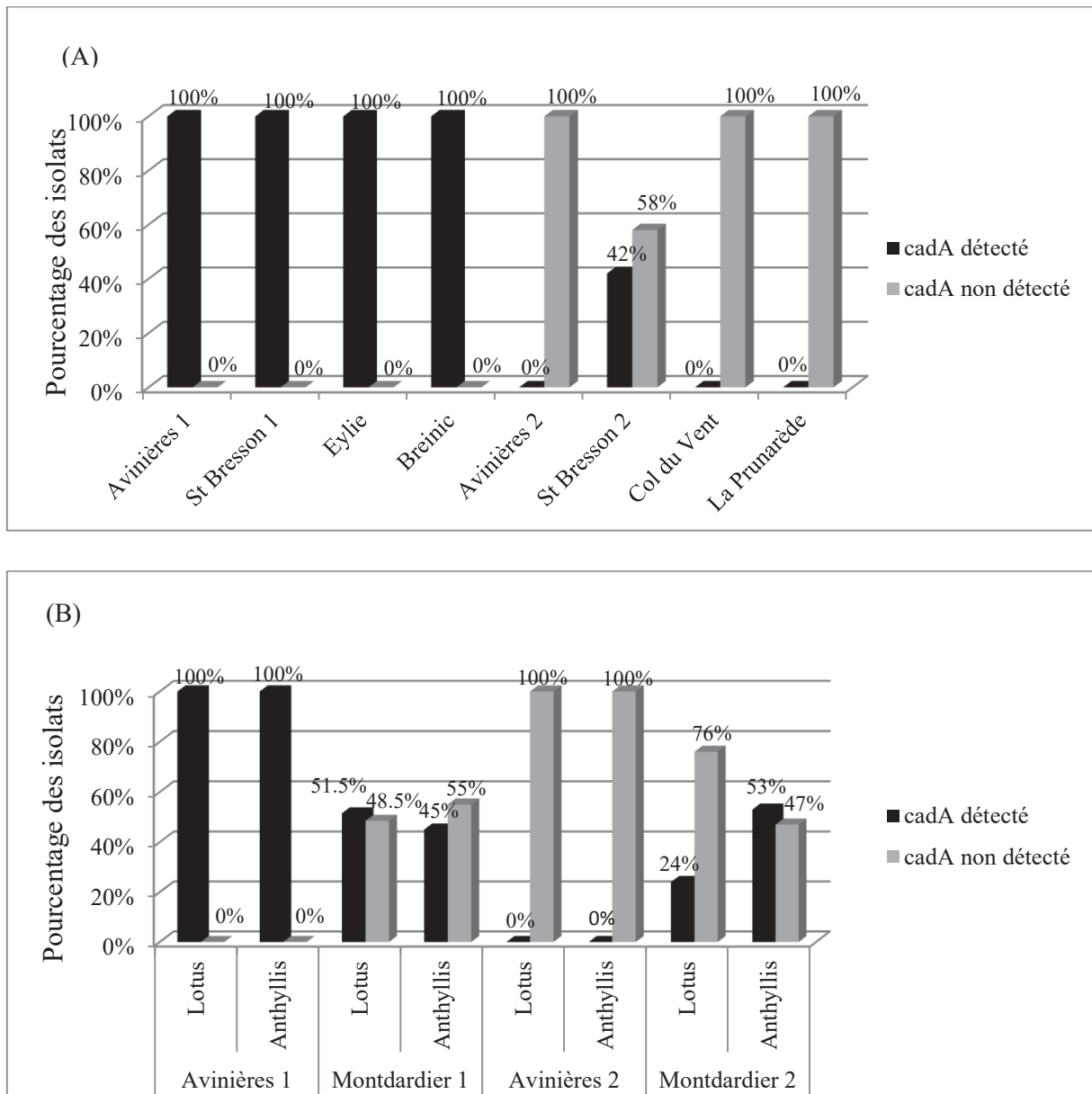


Figure V-6 : Pourcentage des isolats pour lesquels un fragment du gène *cadA* a été détecté par amplification PCR. Isolats provenant d'*A. vulneraria* (A) ou d'*A. vulneraria* et de *L. corniculatus* (B). En noir le pourcentage des souches ayant le marqueur *cadA*, en gris le pourcentage des souches avec le marqueur *cadA* non détecté.

Le cas particulier de la mine Eylie dans les Pyrénées ariégeoises

La mine d'Eylie partage des caractéristiques communes avec les autres sites miniers telles que le fond géochimique riche en Zn, Pb et Cd, la présence d'un écotype métallicole d'*A. vulneraria* associé à des souches bactériennes appartenant aux genres *Mesorhizobium* ou *Aminobacter* et les souches isolées de ce site sont toutes résistantes aux métaux lourds et ont le gène *cadA*. Cependant, aucune souche de *M. metallidurans* n'a été détectée sur le site. La composition génétique des souches du site d'Eylie peut s'expliquer par la présence d'autres espèces des légumineuses comme *L. corniculatus* et *A. vulneraria* subsp. *boscii* et quelques individus appartenant aux genres *Medicago* et *Onobrychis*. Des travaux préliminaires ont montré que les souches isolées de *L. corniculatus* peuvent appartenir à *Rhizobium*, *Aminobacter*, *Phyllobacterium* ou *Bradyrhizobium* (Vidal, 2008). Parmi ces genres et d'après la littérature seul *Bradyrhizobium* est capable de former des nodosités efficaces avec *L. corniculatus* alors que des souches de *Rhizobium* ont pu être retrouvées à l'intérieur des nodosités comme des bactéries accompagnatrices d'une souche nodulante (Gossmann et al., 2012). Une analyse de la diversité génétique des souches isolées directement de nodosités des différentes espèces des légumineuses répandues sur le site permettrait de mieux connaître la structure génétique des symbiotes adaptés au site d'Eylie. La population bactérienne sur le site d'Eylie peut aussi être influencée par les conditions pédoclimatiques. Le site d'Eylie possède des facteurs abiotiques particuliers et différents de ceux des autres sites situés dans la région des Cévennes et de Breinic en Allemagne. Différents travaux ont montré que les facteurs environnementaux peuvent orienter la diversité génétique et la composition génétique des rhizobia (Van Cauwenberghe et al., 2015; Li et al., 2016). Par exemple, les travaux de (Ji et al., 2015) ont montré que des mesorhizobia associés à *Caragana* ont évolué de façon divergente selon leur répartition géographique. Ainsi, la composition et la diversité des rhizobia dans le sol peuvent-elles varier selon le type de sol (Garbeva et al., 2004), le pH et la teneur en azote (Van Cauwenberghe et al., 2015; Li et al., 2016) ou des facteurs biotiques tels que les plantes hôtes présentes sur le site (Lemaire et al., 2014). Afin de déterminer les conditions environnementales biotiques ou abiotiques pouvant conduire la diversité des souches sur Eylie, il serait important d'analyser la diversité des symbiotes associées aux légumineuses répandues sur les sites en utilisant plusieurs marqueurs taxonomiques (*recA*, *atpD*, *glnII* et *dnaK*) et symbiotiques (*nodA*, *nodC*, *nodD*) et réaliser des analyses Unifrac en utilisant les caractéristiques du sol, la situation géo-climatique et les facteurs biotiques tels que la présence des plantes-hôtes.

En conclusion, l'ensemble de ce travail de thèse a permis d'analyser la composition taxonomique et symbiotique, les propriétés symbiotiques et de résistance aux métaux lourds phénotypiquement et génétiquement des souches isolées de divers sites présentant un gradient de contamination métallique et associées à *A. vulneraria* et *L. corniculatus*. Ce travail peut être considéré comme un premier pas vers l'étude de l'adaptation des souches associées à *L. corniculatus* aux métaux lourds. Il sera possible désormais d'étudier les déterminants génétiques impliqués dans la tolérance des souches nodulant *L. corniculatus* aux conditions extrêmes métalliques, en particulier pour les souches du site minier de Montdardier 1 qui appartiennent à une espèce métallicole non identifiée. Ce travail a permis également de montrer que la pression sélective exercée par les métaux lourds dans les sites contaminés en métaux lourds a pu impacter la structure génétique et phénotypique des symbiotes d'*A. vulneraria* et de *L. corniculatus*, alors que les propriétés symbiotiques sont influencées par la présence de la plante hôte sur les sites. Ce travail a pu confirmer aussi la grande diversité taxonomique des souches sensibles symbiotiques de l'*Anthyllis* isolées des sites moyennement ou non contaminés en métaux lourds, l'impact des propriétés abiotiques de chaque site sur la répartition des souches bactériennes associées à *A. vulneraria*. Cette dernière a été décrite comme une espèce végétale facilitatrice de l'installation d'autres espèces végétales et elle est donc importante dans les premières étapes d'une stratégie de phytostabilisation. Ce travail confirme l'importance d'utiliser des espèces végétales natives avec leurs bactéries associées comme ressources biologiques essentielles pour assurer le succès de la revégétalisation des sites miniers.

Références bibliographiques

- Abdallah, A.M., van Pittius, N.C.G., Champion, P.A.D., Cox, J., Luirink, J., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Appelmek, B.J. and Bitter, W. (2007)** Type VII secretion—mycobacteria show the way. *Nature reviews microbiology* **5**, **11**: 883-891.
- Abdel-Ghaffar, A., and Jensen, H. (1966)** The Rhizobia of *Lupinus densiflorus* Benth., with some remarks on the classification of root nodule bacteria. *Archiv für Mikrobiologie* **54**, **4**: 393-405.
- Allan, G., and Porter, J. (2000)** Tribal delimitation and phylogenetic relationships of Loteae coronilleae (Faboideae: Fabaceae) with special reference to *Lotus*: evidence from nuclear ribosomal ITS sequences. *American Journal of Botany* **87**, **12**: 1871–1881.
- Amarger, N., Macheret, V., and Laguerre, G. (1997)** *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, **4**: 996-1006.
- Amor, B.B., Shaw, S.L., Oldroyd, G.E., Maillet, F., Penmetsa, R.V., Cook, D. et al. (2003)** The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *The Plant Journal* **34**, **4**: 495-506.
- Ampomah, O.Y., and Huss-Danell, K. (2011)** Genetic diversity of root nodule bacteria nodulating *Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulneraria* in Sweden. *Syst Appl Microbiol* **34**, **4**: 267-275.
- Andrio, E., Marino, D., Marmeys, A., de Segonzac, M.D., Damiani, I., Genre, A. et al. (2013)** Hydrogen peroxide-regulated genes in the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *New Phytologist* **198**, **1**: 179-189.
- Azmat, R., Hayat, A., Khanum, A., Talat, T., and Uddin, F. (2006)** The inhibition of bean plant metabolism by Cd metal and atrazine III: Effect of seaweed *Codium iyengarii* on metal, herbicide toxicity and rhizosphere of the soil. *Biotechnology* **5**, **1**: 85-89.
- Ba, S., Willems, A., De Lajudie, P., Roche, P., Jeder, H., Quatrini, P. et al. (2002)** Symbiotic and taxonomic diversity of rhizobia isolated from *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in Africa. *Systematic and applied microbiology* **25**, **1**: 130-145.
- Baath, E. (1989)** Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water, Air and soil pollution* **47**, **3-4**: 335-379.
- Baath, E. (1992)**. Measurement of heavy metal tolerance of soil bacteria using thymidine incorporation into bacteria extracted after homogenization-centrifugation. *Soil Biology and Biochemistry* **24**, **11**: 1167-1172.
- Baath, E., Díaz-Raviña, M., Frostegård, Å. and Campbell, C.D. (1998)** Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Applied and environmental Microbiology*, **64**, **1**: 238-245.

- Bakhoun, N., Roux, C.L., Diouf, D., Kane, A., Ndoye, F., Fall, D. et al. (2014)** Distribution and diversity of rhizobial populations associated with *Acacia senegal* (L.) Willd. provenances in senegalese arid and semi arid regions. *Open Journal of Forestry* **04. 2**: 136-143.
- Bakhoun, N., Galiana, A., Le Roux, C., Kane, A., Duponnois, R., Ndoye, F. et al. (2015)** Phylogeny of nodulation genes and symbiotic diversity of *Acacia senegal* (L.) Willd. and *A. seyal* (Del.) *Mesorhizobium* strains from different regions of Senegal. *Microb Ecol* **69. 3**: 641-651.
- Balachandar, D., Raja, P., Kumar, K., and Sundaram, S.P. (2007)** Non-rhizobial nodulation in legumes. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* **2. 2**: 49-57.
- Bani, A., Echevarria, G., Sulçe, S., Morel, J.L., and Mullai, A. (2007)** In-situ phytoextraction of Ni by a native population of *Alyssum murale* on an ultramafic site (Albania). *Plant and Soil* **293. 1-2**: 79-89.
- Bañuelos, G.S., and Ajwa, H.A. (1999)** Trace elements in soils and plants: An overview. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* **34. 4**: 951-974.
- Barrientos, L., Higuera, M., Acuna, H., Guerrero, J., Ortega, F., and Seguel, I. (2002)** Symbiotic effectiveness of indigenous strains of *Mesorhizobium loti* and *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) in three *Lotus* plant species. *Agricultura Técnica (Chile)* **62. 2**: 226-236.
- Barzanti, R., Colzi, I., Arnetoli, M., Gallo, A., Pignattelli, S., Gabbrielli, R., and Gonnelli, C. (2011)** Cadmium phytoextraction potential of different *Alyssum* species. *J Hazard Mater* **196**: 66-72.
- Batista, L., Tomasco, I., Lorite, M.J., Sanjuán, J., and Monza, J. (2013)** Diversity and phylogeny of rhizobial strains isolated from *Lotus uliginosus* grown in Uruguayan soils. *Applied Soil Ecology* **66**: 19-28.
- Becker, A., Fraysse, N., and Sharypova, L. (2005)** Recent advances in studies on structure and symbiosis-related function of rhizobial K-antigens and lipopolysaccharides. *Molecular plant-microbe interactions* **18. 9**: 899-905.
- Bek, A., Sauer, J., Thygesen, M., Duus, J., Petersen, B., Thirup, S. et al. (2010)** Improved characterization of Nod factors and genetically based variation in LysM receptor domains identify amino acids expendable for Nod factor recognition in *Lotus* spp. *MPMI* **23. 1**: 58-66.
- Belesky DP, in Beuselinck PR (Ed.) (1999)** *Lotus* Species Used in Reclamation, Renovation and Revegetation, Lotus species used in reclamation, renovation, and revegetation." *Trefoil: The Science and Technology of Lotus trefoilthesien*: 133-143.
- Benabid, H., and Ghorab, M.F. (2014)** Study of the effect of pH on the toxicity and bioaccumulation of cadmium on beans [*Phaseolus Vulgaris*]. *International Journal of Environmental Science and Development* **5. 5**: 463-466.
- Benson, D.R., and Silvester, W.B. (1993)** Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiological Reviews* **57.2**: 293-319.

- Berkum, P., Beyene, D., and Eardly, B. (1996)** Phylogenetic relationships among *Rhizobium* Species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *International journal of systematic bacteriology* **46. 1**: 240-244.
- Bianucci, E., Furlan, A., Rivadeneira, J., Sobrino-Plata, J., Carpena-Ruiz, R.O., Tordable Mdel, C. et al. (2013)** Influence of cadmium on the symbiotic interaction established between peanut (*Arachis hypogaea* L.) and sensitive or tolerant bradyrhizobial strains. *J Environ Manage* **130**: 126-134.
- Bocchi, S., and Malgioglio, A. (2010)** *Azolla-Anabaena* as a biofertilizer for rice paddy fields in the Po Valley, a temperate rice area in Northern Italy. *International Journal of Agronomy* **2010**.
- Bolan, N., Kunhikrishnan, A., Thangarajan, R., Kumpiene, J., Park, J., Makino, T. et al. (2014)** Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils-to mobilize or to immobilize?. *Journal of Hazardous Materials* **266**: 141-166.
- Boularbah, A., Schwartz, C., Bitton, G., Abouddrar, W., Ouhammou, A., and Morel, J.L. (2006)** Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco: 2. Assessment of metal accumulation and toxicity in plants. *Chemosphere* **63. 5**: 811-817.
- Brom, S., Garcia-de los Santos, A., Cervantes, L., Palacios, R., and Romero, D. (2000)** In *Rhizobium etli* symbiotic plasmid transfer, nodulation competitiveness and cellular growth require interaction among different replicons. *Plasmid* **44. 1**: 34-43.
- Brooks, R.R. (1998)** Plants that hyperaccumulate heavy metals: their role in phytoremediation, microbiology, archaeology, mineral exploration and phytomining: *CAB international*: 55-94.
- Bruins, M.R., Kapil, S., and Oehme, F.W. (2000)** Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety* **45, 3**: 198-207.
- Carlsson, G., and Huss-Danell, K. (2003)** Nitrogen fixation in perennial forage legumes in the field. *Plant and Soil* **253. 2**: 353-372.
- Carrasco, J.A., Armario, P., Pajuelo, E., Burgos, A., Caviedes, M.A., López, R. et al. (2005)** Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite mine. *Soil Biology and Biochemistry* **37. 6**: 1131-1140.
- Castro, H.F., Classen, A.T., Austin, E.E., Norby, R.J., and Schadt, C.W. (2010)** Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers. *Applied and environmental microbiology* **76, 4**: 999-1007.
- Chaney, R.L., Angle, J.S., Broadhurst, C.L., Peters, C.A., Tappero, R.V., and Sparks, D.L. (2007)** Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies. *Journal of Environmental Quality* **36. 5**: 1429-1443.
- Chen, W., Li, G., Qi, Y., ET., W., Yuan, H., and LI, J. (1991)** *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **41.2**: 275-280.

- Chen, W.P., and Kuo, T.T. (1993)** A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research* **21**, **9**: 2260-2260.
- Chen, W., Wang, E., Wang, S., Li, Y., Chen, X., and Li, Y. (1995)** Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**, **1**: 153-159.
- Chen, W.M., Zhu, W.F., Bontemps, C., Young, J.P., and Wei, G.H. (2010)** *Mesorhizobium alhagi* sp. nov., isolated from wild *Alhagi sparsifolia* in north-western China. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, **4**: 958-962.
- Chen, W.M., Zhu, W.F., Bontemps, C., Young, J.P., and Wei, G.H. (2011)** *Mesorhizobium camelthorni* sp. nov., isolated from *Alhagi sparsifolia*. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, **3**: 574-579.
- Chen, W.M., Moulin, L., Bontemps, C., Vandamme, P., Bena, G., and Boivin-Masson, C. (2003)** Legume symbiotic nitrogen fixation by β -proteobacteria is widespread in nature. *Journal of Bacteriology* **185**, **24**: 7266-7272.
- Chianu, J.N., Nkonya, E.M., Mairura, F.S., Chianu, J.N., and Akinnifesi, F.K. (2011)** Biological nitrogen fixation and socioeconomic factors for legume production in sub-Saharan Africa: a review. *Agronomy for Sustainable Development* **31**: 139-154.
- Christensen, T. (1984)** Cadmium soil sorption at low concentrations. I. Effect of time, cadmium load, pH and calcium. *Water, Air and Soil Pollution* **21**: 105-114.
- Chaudri, A., McGrath, S., Gibbs, P., Chambers, B., Carlton-Smith, C., Bacon, J., Campbell, C. and Aitken, M. (2008)** Population size of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii in long-term field experiments with sewage sludge cake, metal-amended liquid sludge or metal salts: Effects of zinc, copper and cadmium. *Soil Biology and Biochemistry* **40**, **7**: 1670-1680.
- Cianciotto, N.P. (2005)** Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends in Microbiology* **13**, **12**: 581-588.
- Dalmastri, C., Chiarini, L., Cantale, C., Bevivino, A., and Tabacchioni, S. (1999)** Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated Burkholderia cepacia populations. *Microbial Ecology* **38**, **3**: 273-284.
- D'Antuono, A.L., Ott, T., Krusell, L., Voroshilova, V., Ugalde, R.A., Udvardi, M., and Lepek, V.C. (2008)** Defects in rhizobial cyclic glucan and lipopolysaccharide synthesis alter legume gene expression during nodule development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**, **1**: 50-60.
- Dary, M., Chamber-Perez, M.A., Palomares, A.J., and Pajuelo, E. (2010)** "In situ" phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *Journal of Hazardous Materials* **177**, **1**: 323-330.
- De Lajudie, P., Laurent-Fulele, E., Willems, A., Torck, U., Coopman, R., Collins, M. et al. (1998a)** *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, **4**: 1277-1290.

- De Lajudie, P., willems, A., Nick, G., Moreira, F., Molouba, F., Host, B. et al. (1998b)** Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48. 2**: 369-382.
- De Meyer, S., Tan, H., Andrews, M., Heenan, P., and Willems, A. (2015a)** *Mesorhizobium calcicola* sp. nov., *Mesorhizobium waitakense* sp. nov., *Mesorhizobium sophorae* sp. nov., *Mesorhizobium newzealandense* sp. nov. and *Mesorhizobium kowhahi* sp. nov. isolated from *Sophora* root nodules in New Zealand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **66.2**: 786-795.
- De Meyer, S., Tan, H., Heenan, P., Andrews, M., and Willems, A. (2015b)** *Mesorhizobium waimense* sp. nov. isolated from *Sophora longicarinata* root nodules and *Mesorhizobium cantuariense* sp. nov. isolated from *Sophora microphylla* root nodules. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **65. 10**: 3419-3426.
- De Rijke, E., Zappey, H., Ariese, F., Gooijer, C., and Brinkman, U.A. (2004)** Flavonoids in *Leguminosae*: analysis of extracts of *T. pratense* L., *T. dubium* L., *T. repens* L., and *L. corniculatus* L. leaves using liquid chromatography with UV, mass spectrometric and fluorescence detection. *Anal Bioanal Chem* **378. 4**: 995-1006.
- Deakin, W.J., and Broughton, W. (2009)** Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nature Reviews Microbiology* **7. 4**: 312-320.
- Degefu, T., Wolde-meskel, E. and Frostegard, A. (2011).** Multilocus sequence analyses reveal several unnamed *Mesorhizobium* genospecies nodulating *Acacia* species and *Sesbania sesban* trees in Southern regions of Ethiopia. *Systematic and applied microbiology* **34.3**: 216-226.
- Degefu, T., Wolde-meskel, E., Liu, B., Cleenwerck, I., Willems, A., and Frostegard, A. (2013)** *Mesorhizobium shonense* sp nov., *Mesorhizobium hawassense* sp nov and *Mesorhizobium abyssinicae* sp nov., isolated from root nodules of different agroforestry legume trees. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **63. 5**: 1746-1753.
- Delepelaire, P. (2004)** Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1694. 1**: 149-161.
- Delorme, T., Gagliardi, J., Angle, J., van Berkum, P., and Chaney, R. (2003)** Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of clover grown in a zinc and cadmium contaminated soil. *Soil Science Society of America Journal* **67, 6**: 1746-1754.
- Den Herder, G., and Parniske, M. (2009)** The unbearable naivety of legumes in symbiosis. *Current opinion in plant biology* **12. 4**: 491-499.
- Diaz, P., Borsani, O., Monza, J. (2005)** *Lotus*-Related Species and their Agronomic Importance, In *Lotus japonicas. Handbook Springer Netherlands*: 25-37.
- Diaz-Ravina, M., Baath, M., and Frostegard, A. (1994)** Multiple heavy metal tolerance of soil bacterial communities and its measurement by thymidine incorporation technique. *Applied and environmental microbiology* **60, 7**: 2238–2247.

- Diouf, F., Diouf, D., Klonowska, A., Le Quere, A., Bakhoun, N., Fall, D. et al. (2015)** Genetic and genomic diversity studies of *Acacia* symbionts in Senegal reveal new species of *Mesorhizobium* with a putative geographical pattern. *PLoS One* **10**, **2**: e0117667.
- Donate-Correa, J., Leon-Barrios, M., Hernandez, M., Perez-Galdona, R., and del Arco-Aguilar, M. (2007)** Different *Mesorhizobium* species sharing the same symbiotic genes nodulate the shrub legume *Anagyris latifolia*. *Systematic and applied microbiology* **30**, **8**: 615-623.
- Downie, J.A. (2010)** The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS microbiology reviews* **34**, **2**: 150-170.
- Dreyfus, B., Garcia, J., and Gillis, M. (1988)** Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov. sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**, **1**: 89-98.
- Dwivedi, S.L., Sahrawat, K.L., Upadhyaya, H.D., Mengoni, A., Galardini, M., Bazzicalupo, M., Biondi, E.G., Hungria, M., Kaschuk, G., Blair, M.W. and Ortiz, R. (2015)** Chapter one-advances in host plant and rhizobium genomics to enhance symbiotic nitrogen fixation in grain legumes. *Advances in Agronomy* **129**: 1-116.
- Egamberdieva, D., Abd-Allah, E.F., and Teixeira da Silva, J.A. (2016)** Microbially Assisted Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Soils. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00020-5>. 483-498.
- Epelde, L., Becerril, J.M., Kowalchuk, G.A., Deng, Y., Zhou, J., and Garbisu, C. (2010)** Impact of metal pollution and *Thlaspi caerulescens* growth on soil microbial communities. *Applied and environmental microbiology* **76**, **23**: 7843-7853.
- Escaray, F.J., Menendez, A.B., Garriz, A., Pieckenstain, F.L., Estrella, M.J., Castagno, L.N. Carrasco, P., Sanjuán, J. and Ruiz, O.A. (2012)** Ecological and agronomic importance of the plant genus *Lotus*. Its application in grassland sustainability and the amelioration of constrained and contaminated soils. *Plant Science* **182**: 121-133.
- Estrella, M.J., Munoz, S., Soto, M.J., Ruiz, O., and Sanjuan, J. (2009)** Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Applied and environmental microbiology* **75**, **4**: 1088-1098.
- Fay, P. (1992)** Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiological Reviews* **56**, **2**: 340-373.
- Ferreira, L., Sánchez-Juanes, F., García-Fraile, P., Rivas, R., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., González-Buitrago, J.M. and Velázquez, E. (2011).** MALDI-TOF mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family *Rhizobiaceae*. *PLoS One* **6**, **5**: e20223.
- Foucher, F., and Kondorosi, E. (2000)** Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant molecular biology* **43**, **5-6**: 773-786.

- Franche, C., Lindström, K., and Elmerich, C. (2009)** Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil* **321. 1-2**: 35-59.
- Frayse, N., Couderc, F., and Poinso, V. (2003)** Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *European Journal of Biochemistry* **270. 7**: 1365-1380.
- Frérot, H., Lefèbvre, C., Gruber, W., Collin, C., Santos, A.D., and Escarré, J. (2006)** Specific interactions between local metallophilous plants improve the phytostabilization of mine soils. *Plant and Soil* **282. 1-2**: 53-65.
- Fulchieri, M., Estrella, M., and Iglesias, A. (2001)** Characterization of *Rhizobium loti* strains from the Salado River Basin. *Antonie van Leeuwenhoek* **79. 2**: 119-125.
- Gao, J.L., Turner, S.L., Kan, F.L., Wang, E.T., Tan, Z.Y., Qiu, Y.H. et al. (2004)** *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54. 6**: 2003-2012.
- Garbeva, P., van Veen, J.A., and van Elsas, J.D. (2004)** Microbial diversity in soil: selection microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu Rev Phytopathol* **42**: 243-270.
- Geurts, R., Fedorova, E., and Bisseling, T. (2005)** Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Current opinion in plant biology* **8. 4**: 346-352.
- Ghosh, M., and Singh, S. (2005)** A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. *Asian Journal on Energy and Environment* **6. 4**: 18.
- Ghosh, W., and Roy, P. (2006)** *Mesorhizobium thiogangeticum* sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph from rhizosphere soil of an Indian tropical leguminous plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56. 1**: 91-97.
- Giller, K.E., Witter, E., and McGrath, S.P. (1998)** Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry* **30. 10**: 1389-1414.
- Giller, K.E., Witter, E., and McGrath, S.P. (2009)** Heavy metals and soil microbes. *Soil Biology and Biochemistry* **41. 10**: 2031-2037.
- González, M.B.R., and Gonzalez-López, J. (2013)** Beneficial Plant-microbial interactions: Ecology and applications: *CRC Press*. 468 page.
- Goormachtig, S., Mergaert, P., Van Montagu, M., and Holsters, M. (1998)** The symbiotic interaction between *Azorhizobium caulinodans* and *Sesbania rostrata* molecular cross-talk in a beneficial plant-bacterium interaction. *Sub-cellular biochemistry* **29**: 117-164.
- Gossmann, J.A., Markmann, K., Brachmann, A., Rose, L.E., and Parniske, M. (2012)** Polymorphic infection and organogenesis patterns induced by a *Rhizobium leguminosarum* isolate from *Lotus* root nodules are determined by the host genotype. *New Phytologist* **196. 2**: 561-573.
- Gourion, B., Berrabah, F., Ratet, P., and Stacey, G. (2015)** *Rhizobium*-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends in Plant Science* **20. 3**: 186-194.

- Granada, C., Strochein, M., Vargas, L., M., B., Saccol de Sá, E., and Passaglia, L. (2014)** Genetic diversity and symbiotic compatibility among rhizobial strains and *Desmodium incanum* and *Lotus* spp. plants. *Genetics and molecular biology* **37. 2**: 396-405.
- Granqvist, E., Sun, J., Op den Camp, R., Pujic, P., Hill, L., Normand, P. et al. (2015)** Bacterial-induced calcium oscillations are common to nitrogen-fixing associations of nodulating legumes and nonlegumes. *New Phytologist* **207. 3**: 551-558.
- Guan, S.H., Chen, W.F., Wang, E.T., Lu, Y.L., Yan, X.R., Zhang, X.X., and Chen, W.X. (2008)** *Mesorhizobium caraganae* sp. nov., a novel rhizobial species nodulated with *Caragana* spp. in China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **58. 11**: 2646-2653.
- Guala, S.D., Vega, F.A., and Covelo, E.F. (2010)** The dynamics of heavy metals in plant–soil interactions. *Ecological Modelling* **221. 8**: 1148-1152.
- Guerts, R., and Bisseling, T. (2002)** *Rhizobium* Nod factor perception and signalling. *The Plant Cell* **14**.suppl 1: S239-S249.
- Gust, A.A., Willmann, R., Desaki, Y., Grabherr, H.M., and Nurnberger, T. (2012)** Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. *Trends Plant Sci* **17. 8**: 495-502.
- Gyaneshwar, P., Hirsch, A.M., Moulin, L., Chen, W.M., Elliott, G.N., Bontemps, C., Estrada-de los Santos, P., Gross, E., dos Reis Jr, F.B., Sprent, J.I. and Young, J.P.W. (2011)** Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Molecular plant-microbe interactions*, **24.11**: 1276-1288.
- Hacker, J., and Carniel, E. (2001)** Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. *EMBO reports* **2. 5**: 376-381.
- Han, T. X., Han, L. L., Wu, L. J., Chen, W. F., Sui X. H., Gu J. G., Wang, E. T., and Chen, W. X. (2008)** *Mesorhizobium gobiense* sp. nov. and *Mesorhizobium tarimense* sp. nov., isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **58.11**: 2610-2618.
- Han, T.X., Tian, C.F., Wang, E.T., and Chen, W.X. (2010)** Associations among rhizobial chromosomal background, nod genes, and host plants based on the analysis of symbiosis of indigenous rhizobia and wild legumes native to Xinjiang. *Microb Ecol* **59**: 311-323.
- Hao, X., Lin, Y., Johnstone, L., Baltrus, D.A., Miller, S.J., Wei, G. and Rensing, C. (2012a)** Draft genome sequence of plant growth-promoting rhizobium *Mesorhizobium amorphae*, isolated from zinc-lead mine tailings. *Journal of bacteriology* **194. 3**: 736-737.
- Hao, X., Xie, P., Zhu, Y.G., Taghavi, S., Wei, G., and Rensing, C. (2015)** Copper tolerance mechanisms of *Mesorhizobium amorphae* and its role in aiding phytostabilization by *Robinia pseudoacacia* in copper contaminated soil. *Environmental science & technology* **49. 4**: 2328-2340.
- Hao, X., Taghavi, S., Xie, P., Orbach, M.J., Alwathnani, H.A., Rensing, C., and Wei, G. (2014)** Phytoremediation of heavy and transition metals aided by legume-rhizobia symbiosis. *International journal of phytoremediation* **16. 2**: 179-202.

- Hassan, S., and Mathesius, U. (2012)** The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of experimental botany* **63. 9**: 3429-3444.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C., and Ala'Aldeen, D. (2004)** Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and molecular biology reviews* **68. 4**: 692-744.
- Hentschel, U., and Hacker, J. (2001)** Pathogenicity islands: the tip of the iceberg. *Microbes and infection* **3.7**: 545-548.
- Herridge, D.F., Peoples, M.B., and Boddey, R.M. (2008)** Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil* **311. 1-2**: 1-18.
- Herridge, D., and Rose, I. (2000)** Breeding for enhanced nitrogen fixation in crop legumes. *Field Crops Research* **65. 2**: 229-248.
- Hirsch, A. (1992)** Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist* **122.2**: 211-237.
- Huang, Q., Yan, X., and Wang, J.F. (2012)** Improved biovar test for *Ralstonia solanacearum*. *Journal of microbiological methods* **88. 2**: 271-274.
- Hubber, A., Sullivan, J., and Ronson, C. (2007)** Symbiosis-induced cascade regulation of the *Mesorhizobium loti* R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Molecular plant-microbe interactions* **20.3**: 255-261.
- Hubber, A., Vergunst, A.C., Sullivan, J.T., Hooykaas, P.J., and Ronson, C.W. (2004)** Symbiotic phenotypes and translocated effector proteins of the *Mesorhizobium loti* strain R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Molecular microbiology* **54. 2**: 561-574.
- Indrasumunar, A., Kereszt, A., Searle, I., Miyagi, M., Li, D., Nguyen, C.D. Men, A., Carroll, B.J. and Gresshoff, P.M. (2010)** Inactivation of duplicated nod factor receptor 5 (NFR5) genes in recessive loss-of-function non-nodulation mutants of allotetraploid soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Plant and cell physiology* **51. 2**: 201-214.
- Irisarri, E., Milnitsky, F., Monza, J., and Bedmar, E. (1996)** Characterization of rhizobia nodulating *Lotus subbiflorus* from Uruguayan soils. *Plant and Soil* **180. 1**: 39-47.
- Janczarek, M. (2011)** Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. *International journal of molecular sciences* **12. 11**: 7898-7933.
- Janssen, P.J., Van Houdt, R., Moors, H., Monsieurs, P., Morin, N., Michaux, A. et al. (2010)** The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. *PLoS One* **5. 5**: e10433.
- Jarvis, B., Pankhurst, C., and Patel, J. (1982)** *Rhizobiurn loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *International journal of systematic bacteriology* **32. 3**: 378-380.
- Jarvis, B., Berkum, V.P., Chen, W., Nour, S., Fernandez, M., Cleyet-Marel, J., and Gills, M. (1997)** Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*,

and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47. 3**: 895-898.

Jensen, H., and Hansen, A. (1968) Observations on host plant relationships in root nodule bacteria of the *Lotus-Anthyllis* and *Lupinus-Ornithopus* groups. *Acta Agric Scand* **18. 3**: 135-142.

Jiménez, D.J., Montaña J.S., and Martínez, M.M. (2011) Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable-grown colombian soils." *Brazilian Journal of Microbiology. Brazilian Journal of Microbiology* **42.3**: 846-858.

Ji, Z., Yan, H., Cui, Q., Wang, E., and Chen, W. (2015) Genetic divergence and gene flow among *Mesorhizobium* strains nodulating the shrub legume Caragana. *Syst Appl Microbiol* **38**: 176-183.

Jones, K.M., Sharopova, N., Lohar, D.P., Zhang, J.Q., VandenBosch, K.A., and Walker, G.C. (2008) Differential response of the plant *Medicago truncatula* to its symbiont *Sinorhizobium meliloti* or an exopolysaccharide-deficient mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105. 2**: 704-709.

Jordan, D. (1982) transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **32.1**: 136-139.

Juhas, M., van der Meer, J.R., Gaillard, M., Harding, R.M., Hood, D.W., and Crook, D.W. (2009) Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS microbiology reviews* **33. 2**: 376-393.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K. and Kimura, T., (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA research*, **7.6**: 331-338.

Kasai-Maita, H., Hirakawa, H., Nakamura, Y., Kaneko, T., Miki, K., Maruya, J., Okazaki, S., Tabata, S., Saeki, K. and Sato, S., (2013) Commonalities and differences among symbiosis islands of three *Mesorhizobium loti* strains. *Microbes and Environments*, **28.2**: 275-278.

Kelly, S.J., Muszynski, A., Kawaharada, Y., Hubber, A.M., Sullivan, J.T., Sandal, N., Carlson, R.W., Stougaard, J. and Ronson, C.W., (2013) Conditional requirement for exopolysaccharide in the *Mesorhizobium-Lotus* symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **26.3**: 319-329.

Kelly, S., Sullivan, J., Ronson, C., Tian, R., Bräu, L., Davenport, K., Daligault, H., Erkkila, T., Goodwin, L., Gu, W. and Munk, C., (2014) Genome sequence of the *Lotus* spp. microsymbiont *Mesorhizobium loti* strain NZP2037. *Standards in genomic sciences*, **9.1**: 1.

Kiers. ET, R.A., Rousseau. RA, West. SA, and Denison. RF (2003) Host sanctions and the legume-rhizobium mutualism. *Nature* **425. 6953**: 78–81.doi: 10.1038/nature01931.

Kimbrel, J.A., Thomas, W.J., Jiang, Y., Creason, A.L., Thireault, C.A., Sachs, J.L., and Chang, J.H. (2013) Mutualistic co-evolution of type III effector genes in *Sinorhizobium fredii* and *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS Pathogens* **9. 2**: e1003204.

- Köpke, U., and Nemecek, T. (2010)** Ecological services of faba bean. *Field Crops Research* **115**: 217-233.
- Kranz, R.G., and Haselkorn, R. (1985)** Anaerobic regulation of nitrogen-fixation genes in *Rhodospseudomonas capsulata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83. 18**: 6805-6809.
- Krause, A, Doerfel, A, and Göttfert, M (2002)** Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15. 12**: 1228–1235.
- Krehenbrink, M., and Downie, J.A. (2008)** Identification of protein secretion systems and novel secreted proteins in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *BMC Genomics* **9. 1**: 55.
- Laguerre, G., Allard, M.-R., Revoy, F., and Amarger, N. (1994)** Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* **60. 1**: 56-63.
- Laguerre, G., Courde, L., Nouaim, R., Lamy, I., Revellin, C., Breuil, M.C., and Chaussod, R. (2006)** Response of rhizobial populations to moderate copper stress applied to an agricultural soil. *Microbial ecology* **52. 3**: 426-435.
- Lakzian, A., Murphy, P., Turner, A., Beynon, J., and Giller, K. (2002)** *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* populations in soils with increasing heavy metal contamination: abundance, plasmid profiles, diversity and metal tolerance. *Soil Biology and Biochemistry* **34. 4**: 519-529.
- Lampinen, R. (1992)** *Anthyllis vulneraria* complex in Finland. *Memoranda Society for Fauna Flora Fennica* **68. 4**: 105-117.
- Laranjo, M., and Oliveira, S. (2011)** Tolerance of *Mesorhizobium* type strains to different environmental stresses. *Antonie van Leeuwenhoek* **99. 3**: 651-662.
- Laranjo, M., Alexandre, A., and Oliveira, S. (2014)** Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiol Res* **169. 1**: 2-17.
- Leon-Barrios, M., Lorite, M.J., Donate-Correa, J., and Sanjuan, J. (2009)** *Ensifer meliloti* bv. *lancerottense* establishes nitrogen-fixing symbiosis with *Lotus* endemic to the Canary Islands and shows distinctive symbiotic genotypes and host range. *Systematic and applied microbiology* **32. 6**: 413-420.
- Lejon, D.P.H., Pascault, N., and Ranjard, L. (2010)** Differential copper impact on density, diversity and resistance of adapted culturable bacterial populations according to soil organic status. *European Journal of Soil Biology* **46. 2**: 168-174.
- Lemaire, B., Dlodlo, O., Chimphango, S., Stirton, C., Schrire, B., Boatwright, J.S. et al. (2014)** Symbiotic diversity, specificity and distribution of rhizobia in native legumes of the Core Cape Subregion (South Africa). *FEMS Microbiol Ecol* **91**: 1-17.
- Lindstrom, K., Murwira, M., Willems, A., and Altier, N. (2010)** The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Research in microbiology* **161. 6**: 453-463.

- Li, Y., Li, X., Liu, Y., Wang, E.T., Ren, C., Liu, W. et al. (2016)** Genetic diversity and community structure of rhizobia nodulating *Sesbania cannabina* in saline-alkaline soils. *Syst Appl Microbiol* **39**: 195-202.
- Lira, M.A., Jr., Nascimento, L.R., and Fracetto, G.G. (2015)** Legume-rhizobia signal exchange: promiscuity and environmental effects. *Frontiers in microbiology* **6**: 945.
- Lohmann, G., Shimoda, Y., Nielsen, M., Jørgensen, F., Grossmann, C., Sandal, N. et al. (2010)** Evolution and regulation of the *Lotus japonicus* LysM receptor gene family. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **23. 4**: 510-521.
- Lone, M.I., He, Z.L., Stoffella, P.J., and Yang, X.E. (2008)** Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: progresses and perspectives. *J Zhejiang Univ Sci B* **9. 3**: 210-220.
- Long, S.R., (1996)** *Rhizobium* symbiosis: nod factors in perspective. *The Plant Cell* **8.10**: 1885.
- López-Baena, F.J., Monreal, J.A., Pérez-Montaño, F., Guasch-Vidal, B., Bellogín, R.A., Vinardell, J.M., and Ollero, F.J. (2009)** The absence of Nops secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103 increases GmPR1 expression in Williams soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22. 11**: 1445-1454.
- Lopez-Lara, I., van den Berg, J., Thomas-Oates, J., Glushka, J., Lugtenberg, B., and Spaink, H. (1995)** Structural identification of the iipo-chitin oligosaccharide nodulation signals of *Rhizobium loti*. *Molecular Microbiology* **15 .4**: 627-638.
- Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., Bengtsson, J., Grime, J.P., Hector, A., Hooper, D.U., Huston, M.A., Raffaelli, D., Schmid, B. and Tilman, D. (2001)** Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *science*, **294. 5543**: 804-808.
- Lorite, M.J., Videira e Castro, I., Munoz, S., and Sanjuan, J. (2012)** Phylogenetic relationship of *Lotus uliginosus* symbionts with bradyrhizobia nodulating genistoid legumes. *FEMS Microbiol Ecol* **79. 2**: 454-464.
- Lorite, M.J., Munoz, S., Olivares, J., Soto, M.J., and Sanjuan, J. (2010a)** Characterization of strains unlike *Mesorhizobium loti* that nodulate lotus spp. in saline soils of Granada, Spain. *Applied and environmental microbiology* **76. 12**: 4019-4026.
- Lorite, M.J., Donate-Correa, J., del Arco-Aguilar, M., Perez Galdona, R., Sanjuan, J., and Leon-Barrios, M. (2010b)** *Lotus* endemic to the Canary Islands are nodulated by diverse and novel rhizobial species and symbiotypes. *Systematic and applied microbiology* **33. 5**: 282-290.
- Lu, Y.L., Chen, W.F., Wang, E.T., Han, L.L., Zhang, X.X., Chen, W.X., and Han, S.Z. (2009)** *Mesorhizobium shangrilense* sp. nov., isolated from root nodules of *Caragana* species. *Int J Syst Evol Microbiol* **59. 12**: 3012-3018.
- Lupwayi, N. Z., Kennedy, A.C., and Chirwa, M., (2011)** Grain legume impacts on soil biological processes in sub-Saharan Africa. *African Journal of Plant Science*, **5.1**: 1-7.
- MacLean, A.M., Finan, T.M., and Sadowsky, M.J. (2007)** Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes. *Plant Physiology* **144. 2**: 615-622.

- Madsen, E.B., Antolín-Llovera, M., Grossmann, C., Ye, J., Vieweg, S., Broghammer, A., Krusell, L., Radutoiu, S., Jensen, O.N., Stougaard, J. and Parniske, M., (2011)** Autophosphorylation is essential for the in vivo function of the *Lotus japonicus* Nod factor receptor 1 and receptor-mediated signalling in cooperation with Nod factor receptor 5. *The Plant Journal*, **65.3**: 404-417.
- Mahieu, S., Soussou, S., Cleyet-Marel, J.C., Brunel, B., Mauré, L., Lefèbvre, C., and Escarré, J. (2013)** Local Adaptation of Metallicolous and Non-Metallicolous *Anthyllis vulneraria* Populations: Their Utilization in Soil Restoration. *Restoration Ecology* **21. 5**: 551-559.
- Mahieu, S., Frérot, H., Vidal, C., Galiana, A., Heulin, K., Maure, L. et al. (2011)** *Anthyllis vulneraria*/ *Mesorhizobium metallidurans*, an efficient symbiotic nitrogen fixing association able to grow in mine tailings highly contaminated by Zn, Pb and Cd. *Plant and Soil* **342. 1-2**: 405-417.
- Maier, T., Klepel, S., Renner, U., and Kostrzewa, M. (2006)** Fast and reliable maldi-tof ms-based microorganism identification. *Nature Methods| Application Notes*.
- Maj, D., Wielbo, J., Marek-Kozaczuk, M., and Skorupska, A. (2010)** Response to flavonoids as a factor influencing competitiveness and symbiotic activity of *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiological research* **165. 1**: 50-60.
- Marie, C., Broughton, W.J, and Deakin, W.J., (2001)** *Rhizobium* type III secretion systems: legume charmers or alarmers?. *Current opinion in plant biology* **4. 4**: 336-342.
- Martínez-Hidalgo, P., Ramírez-Bahena, M.H., Flores-Felix, J.D., Rivas, R., Igual, J.M., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., León-Barrios, M., Peix, A. and Velázquez, E., (2015)** Revision of the taxonomic status of type strains of *Mesorhizobium loti* and reclassification of strain USDA 3471T as the type strain of *Mesorhizobium erdmanii* sp. nov. and ATCC 33669T as the type strain of *Mesorhizobium jarvisii* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **65.6**: 1703-1708.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., and Batut, J. (2009)** Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes?. *Trends in microbiology*, **17. 10**: 458-466.
- Maynaud, G. (2012)** Adaptation aux métaux lourds de populations de rhizobia impliquées dans la phytostabilisation de déblais miniers : Identification des mécanismes d'adaptation au Zn et au Cd, et structuration des populations de rhizobia adaptées aux sites miniers Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, **46-53** pages.
- Maynaud, G., Brunel, B., Yashiro, E., Mergeay, M., Cleyet-Marel, J.C., and Le Quere, A. (2014)** CadA of *Mesorhizobium metallidurans* isolated from a zinc-rich mining soil is a P(IB-2)-type ATPase involved in cadmium and zinc resistance. *Research in microbiology* **165. 3**: 175-189.
- Maynaud, G., Willems, A., Soussou, S., Vidal, C., Mauré, L., Moulin, L., Cleyet-Marel, J.C. and Brunel, B., (2012)** Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. *Systematic and applied microbiology*, **35.2**: 65-72.

- Maynaud, G., Brunel, B., Mornico, D., Durot, M., Severac, D., Dubois, E. et al. (2013)** Genome-wide transcriptional responses of two metal-tolerant symbiotic *Mesorhizobium* isolates to zinc and cadmium exposure. *BMC Genomics* **14**, 1: 292.
- Meinhardt, L., Krishnan, H., Balatti, P., and Pueppke, S. (1993)** Molecular cloning and characterization of a sym plasmid locus that regulates cultivar-specific nodulation of soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. *Molecular microbiology* **9**, 1: 17-29.
- Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O. et al. (2006)** Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the Rhizobium–legume symbiosis. *National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 13: 5230-5235.
- Mergeay, M., Monchy, S., Vallaey, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P. et al. (2003)** *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS microbiology reviews* **27**, 2-3: 385-410.
- Monza, J., FAIHANO, E., and Arias, A. (1992)** Characterization of an indigenous population of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus*. *Soil Biology and Biochemistry* **24**, 3: 241-247.
- Mousavi, S.A., Willems, A., Nesme, X., de Lajudie, P., and Lindstrom, K. (2015)** Revised phylogeny of *Rhizobiaceae*: proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. *Systematic and applied microbiology* **38**, 2: 84-90.
- Mousavi, S.A., Österman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L., Paulin, L., De Lajudie, P. and Lindström, K., (2014)** Phylogeny of the *Rhizobium–Allorhizobium–Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Systematic and applied microbiology*, **37**, 3: 208-215.
- Mulligan, J., and Long, S. (1985)** Induction of *Rhizobium meliloti nodC* expression by plant exudate requires nodD. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**, 19: 6609-6613.
- Nakagawa, T., Kaku, H., Shimoda, Y., Sugiyama, A., Shimamura, M., Takanashi, K., Yazaki, K., Aoki, T., Shibuya, N. and Kouchi, H., (2011)** From defense to symbiosis: limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume–*Rhizobium* symbiosis. *The Plant Journal* **65**, 2: 169-180.
- Nandasena, K.G., O'Hara G, W., Tiwari, R.P., and Howieson, J.G. (2006)** Rapid in situ evolution of nodulating strains for *Biserrula pelecinus* L. through lateral transfer of a symbiosis island from the original mesorhizobial inoculant. *Applied and environmental microbiology* **72**, 11: 7365-7367.
- Nandasena, K.G., O'Hara, G.W., Tiwari, R.P., Willems, A., and Howieson, J.G. (2007a)** *Mesorhizobium ciceri* biovar biserrulae, a novel biovar nodulating the pasture legume *Biserrula pelecinus* L. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **57**, 5: 1041-1045.
- Nandasena, K.G., O'Hara, G.W., Tiwari, R.P., Sezmis, E., and Howieson, J.G. (2007b)** In situ lateral transfer of symbiosis islands results in rapid evolution of diverse competitive strains of mesorhizobia suboptimal in symbiotic nitrogen fixation on the pasture legume *Biserrula pelecinus* L. *Environmental microbiology* **9**, 10: 2496-2511.

- Nandasena, K.G., O'Hara, G.W., Tiwari, R.P., Willems, A., and Howieson, J.G. (2009)** *Mesorhizobium australicum* sp. nov. and *Mesorhizobium opportunistum* sp. nov., isolated from *Biserrula pelecinus* L. in Australia. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **59**. 9: 2140-2147.
- Nanni, L., Ferradini, N., Taffetani, F., and Papa, R. (2004)** Molecular phylogeny of *Anthyllis* spp. *Plant biology* **6**. 4: 454-464.
- Nelson, M.S., and Sadowsky, M.J. (2015)** Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. *Frontiers in plant science* **6**.
- Nguyen, T.M., Pham, V.H., and Kim, J. (2015)** *Mesorhizobium soli* sp. nov., a novel species isolated from the rhizosphere of *Robinia pseudoacacia* L. in South Korea by using a modified culture method. *Antonie van Leeuwenhoek* **108**. 2: 301-310.
- Nies, D. (1992)** Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. *Plasmid* **27**: 17-28.
- Nies, D.H. (2003)** Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 313-339.
- Nilsson, M., Bergman, B., and Rasmussen, U. (2000)** Cyanobacterial diversity in geographically related and distant host plants of the genus *Gunnera*. *Archives of microbiology* **173**. 2: 97-102.
- Nonnoi, F., Chinnaswamy, A., García de la Torre, V.S., Coba de la Peña, T., Lucas, M.M., and Pueyo, J.J. (2012)** Metal tolerance of rhizobial strains isolated from nodules of herbaceous legumes (*Medicago* spp. and *Trifolium* spp.) growing in mercury-contaminated soils. *Applied Soil Ecology* **61**: 49-59.
- Nour, S., Fernandez, M., Normand, P., and Cleyet-Marel, J.C. (1994)** *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *International journal of systematic bacteriology* **44**. 3: 511-522.
- Nour, S., Cleyet-Marel, J., Normand, P., and Fernandez, M. (1995)** Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology* **45**. 4: 640-648.
- Novikova, N., Pavlova, E., and Limeshchenko, E. (1993)** Phage sensitivity and host range of *Rhizobium* strains isolated from root nodules of temperate legumes. *Plant and soil* **151**. 1: 45-53.
- Okazaki, S., Kaneko, T., Sato, S., and Saeki, K. (2013)** Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**. 42: 17131-17136.
- Okazaki, S., Okabe, S., Higashi, M., Shimoda, Y., Sato, S., Tabata, S. et al. (2010)** Identification and functional analysis of type III effector proteins in *Mesorhizobium loti*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**. 2: 223-234.
- Olenska, E., and Malek, W. (2015)** Genetic differentiation of *Trifolium repens* microsymbionts deriving from Zn-Pb waste-heap and control area in Poland. *Journal of Basic Microbiology* **55**. 4: 462-470.

- Op De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Rineau, F., Smits, M., Vangronsveld, J., and Colpaert, J.V. (2015)** Impact of metal pollution on fungal diversity and community structures. *Environmental microbiology* **17**, 6: 2035-2047.
- Op den Camp, R.H., Polone, E., Fedorova, E., Roelofsen, W., Squartini, A., Op den Camp, H.J., Bisseling, T. and Geurts, R. (2012)** Non-legume *Parasponia andersonii* deploys a broad rhizobium host range strategy resulting in largely variable symbiotic effectiveness. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**, 7: 954-963.
- Paau, A.S., Bloch, C.B., and Brill, W.J. (1980)** Developmental fate of *Rhizobium meliloti* bacteroids in alfalfa nodules. *Journal of Bacteriology* **143**, 3: 1480-1490.
- Pallen, M.J., Chaudhuri, R.R., and Henderson, I.R. (2003)** Genomic analysis of secretion systems. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 5: 519-527.
- Pankhurst, C.E., Craig, A.S. and Jones, W.T. (1979)** Effectiveness of *Lotus* root nodules I. Morphology and flavolan content of nodules formed on *Lotus pedunculatus* by fast-growing *Lotus* rhizobia. *Journal of Experimental Botany*, **30**, 6: 1085-1093.
- Pavel, V., Sobariu, D., Fertu, I., Stătescu, F., and Gavrilesu, M. (2013)** Symbiosis in the environment biomanagement of soils contaminated with heavy metals. *European Journal of Science and Theology* **9**, 4: 211-224.
- Peoples, M.B., Herridge, D.F., Ladha, J.K (1995)** Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production?. *Plant and soil* **174**, 1-2: 3-28.
- Pereira, S.I., Lima, A.I., and Figueira, E.M. (2006)** Screening possible mechanisms mediating cadmium resistance in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae isolated from contaminated Portuguese soils. *Microbial Ecology* **52**, 2: 176-186.
- Perret, X., Staehelin, C., and Broughton, W. (2000)** Molecular basis of symbiosis promiscuity. *Microbiology and molecular biology reviews* **64**, 1: 180-201.
- Prasad, R., Kawaguchi, S., and Ng, D.T. (2010)** A nucleus-based quality control mechanism for cytosolic proteins. *Molecular biology of the cell* **21**, 13: 2117-2127.
- Pueppke, S.G. and Broughton, W.J. (1999)** *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**, 4: 293-318.
- Puri, A., Padda, K.P., and Chanway, C.P. (2015)** Can a diazotrophic endophyte originally isolated from lodgepole pine colonize an agricultural crop (corn) and promote its growth?. *Soil Biology and Biochemistry* **89**: 210-216.
- Ramirez-Bahena, M.H., Hernandez, M., Peix, A., Velazquez, E., and Leon-Barrios, M. (2012)** Mesorhizobial strains nodulating *Anagyris latifolia* and *Lotus berthelotii* in Tamadaya ravine (Tenerife, Canary Islands) are two symbiovars of the same species, *Mesorhizobium tamadayense* sp. nov. *Systematic and applied microbiology* **35**, 5: 334-341.
- Ramsay, J.P., Sullivan, J.T., Stuart, G.S., Lamont, I.L., and Ronson, C.W. (2006)** Excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* R7A symbiosis island requires an integrase IntS, a novel

recombination directionality factor RdfS, and a putative relaxase RlxS. *Molecular microbiology* **62. 3**: 723-734.

Reeves, R.D., Schwartz, C., Morel, J.L., and Edmondson, J. (2001) Distribution and metal-accumulating behavior of *Thlaspi caerulescens* and associated metallophytes in France. *International journal of Phytoremediation* **3. 2**: 145-172.

Rejili, M., Mahdhi, M., Domínguez-Núñez, J.A., and Mars, M. (2013) The phenotypic, phylogenetic and symbiotic characterization of rhizobia nodulating *Lotus* sp. in Tunisian arid soils. *Annals of Microbiology* **64. 1**: 355-362.

Reynaud, J., and Lussignol, M. (2005) The flavonoids of *Lotus corniculatus*. *Lotus Newsletter* **35. 1**: 75-82.

Rhijn, P., Goldberg, R., and Hirsch, A. (1998) *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. *The Plant Cell* **10. 8**: 1233-1249.

Richter, M. and Rosselló-Móra, R. (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106. 45**: 19126-19131.

Rivas, R., Laranjo, M., Mateos, P.F., Oliveira, S., Martinez-Molina, E., and Velazquez, E. (2007) Strains of *Mesorhizobium amorphae* and *Mesorhizobium tianshanense*, carrying symbiotic genes of common chickpea endosymbiotic species, constitute a novel biovar (ciceri) capable of nodulating *Cicer arietinum*. *Letters in applied microbiology* **44. 4**: 412-418.

Rivas, R., Martens, M., De Lajudie, P. and Willems, A. (2009) Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Systematic and applied microbiology* **32. 2**: 101-110.

Rodpothong, P., Sullivan, J.T., Songsrirote, K., Sumpton, D., Cheung, K.W.-T., Thomas-Oates, J. Radutoiu, S., Stougaard, J. and Ronson, C.W. (2009) Nodulation gene mutants of *Mesorhizobium loti* R7A-*nodZ* and *noIL* mutants have host-specific phenotypes on *Lotus* spp. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22. 12**: 1546-1554.

Rogel, M.A., Ormeno-Orrillo, E., and Martinez Romero, E. (2011) Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Systematic and Applied Microbiology* **34. 2**: 96-104.

Saeki, K., and Kouchi, H. (2000) The *Lotus* symbiont, *Mesorhizobium loti*: molecular genetic techniques and application. *Journal of Plant Research* **113.4**: 457-465.

Sánchez, C., Iannino, F., Deakin, W.J., Ugalde, R.A., and Lepek, V.C. (2009) Characterization of the *Mesorhizobium loti* MAFF303099 type-three protein secretion system. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22. 5**: 519-528.

Sanders, J., McGrath, S., and Adams, T. (1986) Zinc, copper and nickel concentrations in ryegrass grown on sludge-contaminated soils of different pH. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **37. 10**: 961-968.

Schumpp, O., and Deakin, W.J. (2010) How inefficient rhizobia prolong their existence within nodules. *Trends in Plant Science* **15. 4**: 189-195.

- Shamseldin, A., Carro, L., Peix, A., Velazquez, E., Moawad, H., and Sadowsky, M.J. (2016)** The symbiovar trifolii of *Rhizobium bangladeshense* and *Rhizobium aegyptiacum* sp. nov. nodulate *Trifolium alexandrinum* in Egypt. *Systematic and applied microbiology* **39**, 4: 275-279.
- Sheirdil, R., Bashir, K., Hayat, R., and Akhtar, M. (2012)** Effect of cadmium on soybean (*Glycine max* L) growth and nitrogen fixation. *African Journal of Biotechnology* **11**, 8: 1886-1891.
- Slattery, J.F., Coventry, D.R., and Slattery, W.J. (2001)** Rhizobial ecology as affected by the soil environment. *Animal Production Science* **41**, 3: 289-298.
- Smith BM, Diaz A, Daniels R, L. Winder L, J.M. Holland JM, (2009)** Regional and ecotype traits in *Lotus corniculatus* L., with reference to restoration ecology. *Restoration Ecology* **17**, 1: 12–23.
- Spaink, H.P. (2004)** Specific recognition of bacteria by plant LysM domain receptor kinases. *Trends in microbiology* **12**, 5: 201-204.
- Sprent, J.I. (2007)** Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytologist* **174**, 1: 11-25.
- Stan, V., Gament, E., Cornea, C., Voaides, C., Dusa, M., and Plopeanu, G. (2011)** Effects of heavy metal from polluted soils on the *Rhizobium* diversity. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **39**, 1: 88-95.
- Steiner JJ (2001)** Adaptive ecology of *Lotus corniculatus* G. Genotypes: L.I Plant morphology and RAPD marker characterizations. *Crop Science*. **41**: 1968–1980.
- Stępkowski, T., Żak, M., Moulin, L., Króliczak, J., Golińska, B., Narożna, D., Safronova, V.I. and Mądrzak, C.J. (2011)** *Bradyrhizobium canariense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the two dominant rhizobium species in root nodules of lupin and serradella plants growing in Europe. *Systematic and applied microbiology* **34**, 5: 368-375.
- Sullivan, J., and Ronson, C. (1998)** Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 9: 5145-5149.
- Sullivan, J., Eardly, B., Berkum, P., and Ronson, C. (1996)** Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 8: 2818-2825.
- Sullivan, J., Patrick, H., Lowther, W., Scott, D., and Ronson, C. (1995)** Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 19: 8985-8989.
- Sullivan, J.T., Trzebiatowski, J.R., Cruickshank, R.W., Gouzy, J., Brown, S.D., Elliot, R.M. et al. (2002)** Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *Journal of Bacteriology* **184**, 11: 3086-3095.
- Suzuki, T., Aono, T., Liu, C.T., Suzuki, S., Iki, T., Yokota, K., and Oyaizu, H. (2008)** An outer membrane autotransporter, AoaA, of *Azorhizobium caulinodans* is required for sustaining high N₂-fixing activity of stem nodules. *FEMS Microbiology Letters* **285**, 1: 16-24.

- Teng, Y., Wang, X., Li, L., Li, Z., and Luo, Y. (2015)** Rhizobia and their bio-partners as novel drivers for functional remediation in contaminated soils. *Frontiers in plant science* **6**: 32.
- Tian, W., Zhang, Z., Hu, X., Tian, R., Zhang, J., Xiao, X., and Xi, Y. (2015)** Short-term changes in total heavy metal concentration and bacterial community composition after replicated and heavy application of pig manure-based compost in an organic vegetable production system. *Biology and Fertility of Soils* **51. 5**: 593-603.
- Tillotson, G., and Tillotson, J. (2009)** Bacterial secreted proteins: secretory mechanisms and role in pathogenesis. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **7. 6**: 691-693.
- Toth, K., and Stacey, G. (2015)** Does plant immunity play a critical role during initiation of the legume-rhizobium symbiosis?. *Frontiers in plant science* **6**: 401.
- Traas, J., Hülskamp, M., Gendreau, E., and Höfte, H. (1998)** Endoreduplication and development: rule without dividing?. *Current opinion in plant biology* **1. 6**: 498-503.
- Tseng, T.T., Tyler, B.M., and Setubal, J.C. (2009)** Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol* **9. 1**: 1.
- Uchiumi, T., Ohwada, T., Itakura, M., Mitsui, H., Nukui, N., Dawadi, P., Kaneko, T., Tabata, S., Yokoyama, T., Tejima, K. and Saeki, K. (2004)** Expression islands clustered on the symbiosis island of the *Mesorhizobium loti* genome. *Journal of bacteriology* **186. 8**: 2439-2448.
- Van Cauwenberghe, J., Michiels, J., and Honnay, O. (2015)** Effects of local environmental variables and geographical location on the genetic diversity and composition of *Rhizobium leguminosarum* nodulating *Vicia cracca* populations. *Soil Biology and Biochemistry* **90**: 71-79.
- Vance, C.P. (2001)** Symbiotic Nitrogen Fixation and Phosphorus Acquisition. Plant Nutrition in a World of Declining Renewable Resources. *Plant Physiology* **127. 2**: 390-397.
- Velázquez, E., Igual, J.M., Willems, A., Fernández, M.P., Muñoz, E., Mateos, P.F., Abril, A., Toro, N., Normand, P., Cervantes, E. and Gillis, M. (2001)** *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51. 3**: 1011-1021.
- Vidal (2008)** Etude taxonomique, phylogénétique et génétique des bactéries symbiotes des légumineuses métallophiles adaptées aux sites contaminés par le zinc et le cadmium. *Thèse de Doctorat, Université Montpellier II*: 158 pages.
- Vidal, C., Chantreuil, C., Berge, O., Maure, L., Escarre, J., Bena, G., Brunel, B. and Cleyet-Marel, J.C. (2009)** *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metalicolous soil in Languedoc, France. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59.4**: 850-855.
- Wagner, A. (2005)** Robustness, evolvability, and neutrality. *FEBS Letters* **579. 8**: 1772-1778.
- Wang, E.T., Berkum, P., Su, X., Beyene, D., Chen, W., and Martinez-Romerol, E. (1999)** Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49. 1**: 51-65.

- Wang, F.Q., Wang, E.T., Liu, J., Chen, Q., Sui, X.H., Chen, W.F., and Chen, W.X. (2007)** *Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57. 6**: 1192-1199.
- Wang, S., Hao, B., Li, J., Gu, H., J., P., Xie, F. et al. (2014)** Whole-genome sequencing of *Mesorhizobium huakuii* 7653R provides molecular insights into host specificity and symbiosis island dynamics. *BMC Genomics* **15. 1**: 440-455.
- Wei, G., Chen, W., Zhu, W., Chen, C., Young, J.P., and Bontemps, C. (2009)** Invasive *Robinia pseudoacacia* in China is nodulated by *Mesorhizobium* and *Sinorhizobium* species that share similar nodulation genes with native American symbionts. *FEMS Microbiol Ecol* **68**: 320-328.
- Wei, Z., Xi, B., Zhao, Y., Wang, S., Liu, H., and Jiang, Y. (2007)** Effect of inoculating microbes in municipal solid waste composting on characteristics of humic acid. *Chemosphere* **68. 2**: 368-374.
- Wernegreen, J., and Riley, M. (1999)** Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages. *Molecular biology and evolution* **16. 1**: 98-113.
- Whitman, W.B. (2015)** Genome sequences as the type material for taxonomic descriptions of prokaryotes. *Systematic and applied microbiology* **38**: 217-222.
- Willems, A. (2006)** The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and Soil* **287. 1-2**: 3-14.
- Wong, M.H. (2003)** Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere* **50. 6**: 775-780.
- Wuana, R.A., and Okieimen, F.E. (2011)** Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *Isrn Ecology* **2011**: 1-20.
- Xie, P., Hao, X., Herzberg, M., Luo, Y., Nies, D.H., and Wei, G. (2015)** Genomic analyses of metal resistance genes in three plant growth promoting bacteria of legume plants in Northwest mine tailings, China. *Journal of Environmental Sciences* **27**: 179-187.
- Yadav, S.K., Juwarkar, A.A., Kumar, G.P., Thawale, P.R., Singh, S.K., and Chakrabarti, T. (2009)** Bioaccumulation and phyto-translocation of arsenic, chromium and zinc by *Jatropha curcas* L.: impact of dairy sludge and biofertilizer. *Bioresource Technology* **100. 20**: 4616-4622.
- Younis, M. (2007)** Responses of *Lablab purpureus*-*Rhizobium* symbiosis to heavy metals in pot and field experiments. *World Journal of Agricultural Sciences* **3. 1**: 111-122.
- Zahrán, H. (1999)** *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and molecular biology reviews* **63.4**: 968-989.
- Zgadżaj, R., James, E.K., Kelly, S., Kawaharada, Y., de Jonge, N., Jensen, D.B., Madsen, L.H. and Radutoiu, S. (2015)** A legume genetic framework controls infection of nodules by symbiotic and endophytic bacteria. *PLoS Genetics* **11.6**: e1005280.

- Zhang, J.J., Liu, T.Y., Chen, W.F., Wang, E.T., Sui, X.H., Zhang, X.X., Li, Y., Li, Y. and Chen, W.X. (2012) *Mesorhizobium muleiense* sp. nov., nodulating with *Cicer arietinum* L. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **62**. 11: 2737-2742.
- Zhang, Y., Tian, C., Sui, X., Chen, W., and Chen, W. (2012) Robust Markers Reflecting Phylogeny and Taxonomy of Rhizobia. *PloS one* **7**.9: e44936.
- Zhang, J.J., Lou, K., Jin, X., Mao, P.H., Wang, E.T., Tian, C.F., Sui, X.H., Chen, W.F. and Chen, W.X. (2012) Distinctive *Mesorhizobium* populations associated with *Cicer arietinum* L. in alkaline soils of Xinjiang, China. *Plant and soil* **353**. 1-2: 123-134.
- Zhang, Z., Wong, M., Nie, X., and Lan, C. (1998) Effects of zinc (zinc sulfate) on Rhizobia-earleaf acacia (*Acacia auriculaeformis*) symbiotic association. *Bioresource Technology* **64**: 97-104.
- Zhao, C.T., Wang, E.T., Zhang, Y.M., Chen, W.F., Sui, X.H., Chen, W.X., Liu, H.C. and Zhang, X.X. (2012) *Mesorhizobium silamurunense* sp. nov., isolated from root nodules of *Astragalus* species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **62**.9: 2180-2186.
- Zheng, W.T., Li Jr, Y., Wang, R., Sui, X.H., Zhang, X.X., Zhang, J.J., Wang, E.T. and Chen, W.X. (2013) *Mesorhizobium qingshengii* sp. nov., isolated from effective nodules of *Astragalus sinicus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **63**.6: 2002-2007.
- Zhou, P.F., Chen, W.M., and Wei, G.H. (2010) *Mesorhizobium robiniae* sp. nov., isolated from root nodules of *Robinia pseudoacacia*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **60**. 11: 2552-2556.
- Zhou, S., Li, Q., Jiang, H., Lindstrom, K., and Zhang, X. (2013) *Mesorhizobium sangaii* sp. nov., isolated from the root nodules of *Astragalus luteolus* and *Astragalus ernestii*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **63**. 8: 2794-2799.
- Zhu, Y.J., Lu, J.K., Chen, Y.L., Wang, S.K., Sui, X.H. and Kang, L.H. (2015) *Mesorhizobium acaciae* sp. nov., isolated from root nodules of *Acacia melanoxylon* R. Br. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **65**.10: 3558-3563.
- Zribi, K., Nouairi, I., Slama, I., Talbi-Zribi, O., and Mhadhbi, H. (2015) *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis promotes the bioaccumulation of zinc in nodulated roots. *International journal of phytoremediation* **17**. 1: 49-55.

Adaptation des bactéries symbiotiques de légumineuses métallicoles : effets des métaux lourds et de la plante hôte sur la composition des populations de rhizobia symbiotiques d'*Anthyllis vulneraria* et de *Lotus corniculatus*

Résumé. Deux légumineuses (*Anthyllis vulneraria* et *Lotus corniculatus*) adaptées aux métaux lourds constituent un matériel d'intérêt pour la phytostabilisation de sites miniers. Leur fonction de fixatrices biologiques d'azote grâce à leur symbiose avec des bactéries symbiotiques permet l'établissement efficace d'une couverture végétale durable limitant la dispersion des métaux dans l'environnement. Nos objectifs ont été d'étudier les effets des métaux lourds et de la plante hôte sur les populations symbiotiques naturellement associées à ces légumineuses en analysant (i) les populations symbiotiques associées à *A. vulneraria* sur 8 sites contaminés ou non (ii) les populations de rhizobia associées à *L. corniculatus* qui ont été comparées à celles d'*Anthyllis*. La distribution des souches de *Mesorhizobium* isolées de nodosités d'*A. vulneraria* et provenant de plusieurs sites contaminés ou non dépend des fortes teneurs en métaux lourds des sols qui sélectionnent fortement les souches symbiotiques résistantes et influencent leur composition taxonomique. Les souches appartenant à l'espèce *M. metallidurans* ont été retrouvées seulement dans les sites fortement contaminés. Deux nouvelles espèces potentielles et résistantes aux métaux semblent exister chacune sur un site minier distinct. L'une d'elle est proche de *M. ciceri* et de *M. loti* et tous ses membres présentent la particularité de ne pas posséder de gène *cadA*, un gène impliqué dans la tolérance aux métaux chez *M. metallidurans*. Par contre, les sites non contaminés révèlent une diversité taxonomique différente avec la présence de nouvelles espèces de *Mesorhizobium* sensibles aux métaux lourds. Quatre de ces nouvelles espèces ont été définies. *A. vulneraria* et *L. corniculatus* partagent la même diversité taxonomique dans les sites contaminés testés. Par contre, les propriétés symbiotiques des souches varient selon la plante hôte utilisée pour le piégeage. Les souches appartiennent soit au symbiovar (sv.) anthyllidis soit au sv. loti selon le site géographique d'origine et ceci indépendamment des teneurs en métaux lourds dans le sol. *A. vulneraria* s'associe avec les souches possédant les sv. anthyllidis ou sv. loti. En revanche, *L. corniculatus* ne s'associe qu'avec des souches du sv. loti. Dans tous les sols qu'ils soient contaminés ou non, *A. vulneraria* nodule préférentiellement avec le sv. anthyllidis. En conclusion, *A. vulneraria* et *L. corniculatus* établissent des symbioses avec les mêmes espèces de *Mesorhizobium* et s'associent préférentiellement avec un sv. Les taxons retrouvés dépendent fortement des sites d'isolement, ce qui pourrait traduire des adaptations particulières aux conditions environnementales. L'utilisation des ressources biologiques locales est une stratégie que nous recommandons pour la végétalisation d'anciens sites miniers.

Mots clés : Phytostabilisation, *Mesorhizobium*, tolérance aux métaux, symbiovar, diversité, *cadA*.

Adaptation of symbiotic bacteria to metallicolous legumes: impacts of heavy metals and the host plant on the composition of rhizobial populations symbiotic to *Anthyllis vulneraria* and to *Lotus corniculatus*

Abstract. Two legumes (*Anthyllis vulneraria* and *Lotus corniculatus*) adapted to heavy metals form an interesting material for phytostabilisation strategy in mining sites. As biological nitrogen fixators, these legumes associated with compatible symbiotic bacteria provide an efficient establishment of a sustainable cover vegetation limiting metal dispersion in the environment. Our objectives were to study the effects of heavy metals and the host plant on symbiotic populations naturally associated with these legumes by analyzing (i) symbiotic populations associated with *A. vulneraria* on 8 contaminated and uncontaminated sites (ii) rhizobial populations associated with *L. corniculatus* that were compared with those of *Anthyllis*. The distribution of mesorhizobial strains isolated from *A. vulneraria* root-nodules from several contaminated and uncontaminated sites depends on high levels of heavy metals in soils by selecting highly resistant strains and impacting the taxonomic composition. Strains belonging to *M. metallidurans* were only found in highly contaminated sites. Two new potential metal-tolerant species were detected in two distinct mines. One of them was closely related to *M. ciceri* and *M. loti* and its members had the feature of not -possessing the *cadA* gene, a gene involved in metal-tolerance among *M. metallidurans* strains. By contrast, uncontaminated sites revealed a different taxonomic diversity with new species sensitive to heavy metals. Four of these new species were defined. *A. vulneraria* and *L. corniculatus* share the same taxonomic diversity in the contaminated sites tested. By contrast, symbiotic properties of the strains vary depending on the host plant used for trapping. Strains belong either to symbiovar (sv.) anthyllidis or to sv. loti according to geographic origins and independently of heavy metal levels in soils. *A. vulneraria* associated with strains of sv. anthyllidis or sv. loti. In contrast, *L. corniculatus* only associated with strains of sv. loti. In contaminated or uncontaminated soils, *A. vulneraria* was preferentially nodulated by sv. anthyllidis. In conclusion, *A. vulneraria* and *L. corniculatus* established symbiotic relationships with the same taxonomic groups of *Mesorhizobium* but associated with different symbiovars. The finding of taxonomic groups strongly depends on geographical sites, suggesting special adaptations to environmental conditions. Use of local biological resources is the strategy we recommend for revegetation of old mines.

Keyword: Phytostabilisation, *Mesorhizobium*, metal tolerance, symbiovar, diversity, *cadA* gene.