

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de Biologie et Ecologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie et Génomiques Végétales

Intitulé :

Recherche des actinomycètes dans la rhizosphère de *Casuarina equisetifolia* en sol dégradé du Nord Algérien :

Cas de *Frankia*

Présenté et soutenu par : KAHLOUCHE Imen

Le : 16 /06/2015

TABCHICHE Rima

Jury d'évaluation :

Président du jury : BOUSBA Ratiba

M.C.A à l'Université des frères MENTOURI

Rapporteur : YKHLEF Nadia

professeur à l'Université des frères MENTOURI

Examineurs : BENABDOUN Faiza Meriem

M.A.A à l'Université des frères MENTOURI

Année universitaire
2014 – 2015

Remerciements

Tout d'abord, je remercie le bon Dieu le plus puissant de m'avoir aidé à réaliser ce travail.

*Je tiens à remercier mon encadreur Mme **YKHLEF Nadia**, professeur à l'Université des frères MENTOURI pour son aide précieuse et ses conseils judicieux, je lui assure le témoignage de ma profonde reconnaissance.*

*J'adresse tous mes remerciements au Professeur **Djekoun Abdelhamid**, responsable de l'équipe de Biotechnologie et Amélioration des Plantes, au laboratoire GBBV.*

*Je tiens à remercier Mme **BOUSBA Ratiba**, docteur à l'Université des frères MENTOURI qui me fait l'honneur de présider le jury.*

*J'adresse tous mes remerciements à Mme **BENABDOUN Faïza Meriem**, docteur à l'Université des frères MENTOURI qui me fait l'honneur d'examiner mon travail.*

*Je voudrais remercier du fond du cœur Mr **HAOUAM Seif-Eddine**, pour m'avoir soutenue au cours de ma pratique, ses remarques constructives, ses conseils et ses encouragements m'ont été très précieux et m'ont permis de mener à bien mon travail.*

*Je remercie également Mr. **BELBEKRI Nadir**, ingénieur de laboratoire, ainsi que Mme **BOULDEDJ Ryma** pour leur disponibilité et leur encouragement.*

*Je tiens aussi à remercier **l'ensemble des enseignants** de la spécialité « BTGV » pour avoir consacré leur temps et leur savoir faire afin de nous faire bénéficier de la meilleure formation.*

Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

Mes chers parents.

Mon grand père Saleh.

Mes frères : Wail et Amine.

Ma belle sœur : Manel.

Ma cousine : Meriem.

Mes copines : Rima et Meryouma.

IMEN

Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

Mes très chers parents

Qui ont toujours été là pour moi.

Mes frères : Samy, Rachid, Seif-Eddine, L'arbi

Et le chouchou Rassim Djaouad.

Mes sœurs : Sara et Maroua.

Mon fiancé Issam.

Mes beaux parents.

Ma belle sœur Rayen.

Mon beau frère Adem.

Toute ma famille : mes tantes, mes oncles, mes

cousins et mes cousines.

Mes copines : Imy et Meryouma.

RIMA

Résumé

L'azote constitue l'un des facteurs limitant la croissance et le développement des végétaux pour son utilisation dans la synthèse de la chlorophylle et des protéines, il se trouve dans l'atmosphère sous forme non assimilable par la plante. Certaines bactéries du sol ont la capacité de transformer l'azote atmosphérique sous une forme assimilable par la plante et remédier ainsi à la carence azotée des sols.

Les plantes actinorhiziennes représentent le deuxième groupe de plantes fixatrices d'azote après les légumineuses, ils sont largement plantés sur des sols carencés en azote pour l'assainissement et la réhabilitation des terrains dégradés, la dépollution des sols de métaux lourds et la lutte contre l'érosion et la désertification.

Ces plantes ont la capacité de développer au niveau racinaire une symbiose avec l'actinobactérie fixatrice d'azote *Frankia*, cette association engendre la formation de nodules ou « actinorhizes », au sein desquels *Frankia* transforme l'azote atmosphérique en ammoniac assimilable par la plante hôte. Ces bactéries se caractérisent par les gènes *nif* organisés en opéron *nifHDK* codant pour la nitrogénase, l'enzyme responsable de la fixation d'azote.

Le but de cette étude est l'identification de nouvelles souches de *Frankia* parmi nos isolats, qui ont été isolés à partir de nodules ou du sol prélevés dans la rhizosphère de *Casuarina equisetifolia* plantés dans des zones à caractère dégradé en Algérie. Par une extraction de l'ADNg des isolats à partir des cultures sur milieu liquide BAP (Fontaine 1986) afin de l'utiliser comme matrice pour amplifier une partie de la région *nif*, qui est une région très conservée dans le génome, pour l'identification des *Frankia* parmi nos isolats, une autre amplification consiste à amplifier la région intergénique *rrn* pour la caractérisation des actinomycètes entre elles et par rapport au témoin CcI3.

Mots clés : *Casuarina*, *Frankia*, Symbiose fixatrice d'azote, Plantes actinorhiziennes, Actinomycètes, gène *nif*.

Abstract

Nitrogen is one of the factors limiting the growth and development of plants. Nitrogen is for use in the synthesis of chlorophyll and proteins, it is in the atmosphere and cannot be assimilated by the plant in this form. Some soil bacteria have the ability to transform atmospheric nitrogen into a readable form by the plant and so remedy the soil nitrogen deficiency.

Actinorhizal plants are the second group of nitrogen-fixing plants after leguminous plants; they are widely planted in poor soil nitrogen for the remediation and rehabilitation of degraded land, remediation of heavy metal soil and the fight against erosion and desertification.

These plants have the ability to develop on roots a symbiotic nitrogen fixation with actinobacteria *Frankia*, this association leads to the formation of nodules, in which *Frankia* transforms nitrogen gas into ammonia available by the host plant. These actinobacteria are characterized by *nif* genes organized in *nif*HDK operon encoding nitrogenase, which can reduce N_2 to NH_3 .

The purpose of this study is identifying new *Frankia* strains among our isolates, which were isolated from nodules or soil collected from the rhizosphere of *Casuarina equisetifolia* planted in degraded areas in Algeria. By extraction of DNA from isolates in liquid cultures on BAP (Fontaine 1986). for use as a template to amplify a portion of the *nif* region, which is a region highly conserved in the genome, for identifying *Frankia* among our isolates, further amplification consists of amplifying the RNA intergenic region to characterize actinomycetes each other and relative to CcI3 control.

Keywords: *Casuarina*, *Frankia*, Symbiotic nitrogen-fixing, Actinorhizal Plants, Actinomycetes, *nif* gene.

Liste des abréviations	1
Liste des illustrations	2
Introduction générale	5
Partie 1 : Synthèse bibliographique	7
I. Les symbioses fixatrices d'azote	7
I.1. Importance de la fixation de l'azote.....	8
I.2. Les carences en éléments nutritifs des sols.....	9
I.3. La symbiose fixatrice d'azote chez les légumineuses.....	10
II. Les symbioses actinorhiziennes	11
II.1. Le partenaire végétale : Les plantes actinorhiziennes.....	11
II.1.1. Historique de <i>Casuarina</i>	12
II.1.2. La famille des <i>Casuarinacées</i>	14
II.1.3. Utilisation des plantes actinorhiziennes.....	15
II.2. Le partenaire bactérien : <i>Frankia</i>	18
II.2.1. Historique.....	18
II.2.2. Taxonomie.....	18
II.2.3. Morphologie.....	19
II.2.4 Structure génomique de <i>Frankia</i>	23
II.2.4.1. La région ribosomal.....	23
II.2.4.2. La région de codage de la nitrogénase.....	23
II.2.5. Caractéristiques de la souche CcI3.....	24
III. Comparaison de quelques aspects caractérisant la symbiose actinorhizienne et la symbiose chez les légumineuses	26
IV. Établissement de la symbiose actinorhizienne	28
IV.1.Le processus d'infection.....	28
IV.1.1. Infection intercellulaire.....	28
IV.1.2. Infection intracellulaire.....	28
IV.2.Morphologie et développement du nodule.....	30
IV.3. Valeur et intérêt de la symbiose actinorhizienne.....	31
V. Les milieux de culture	32

V.1. Description de quelques milieux de culture.....	33
V.1.1. Les milieux non sélectifs.....	33
V.1.2. Les milieux non sélectifs enrichis.....	34
V.1.3. Les milieux sélectifs.....	34
V.1.4. Les milieux d'enrichissement.....	34
V.2. Croissance et développement des actinomycètes.....	35
Partie 2 : Matériel et méthodes.....	36
I. Matériels.....	36
I.1. Matériel bactérien	36
I.2. Matériel végétal.....	36
II. Méthodes.....	37
II.1. Prospection et échantillonnage	37
II.2. Isolement des actinomycètes à partir du sol.....	38
II.3. Isolement des actinomycètes à partir du nodule.....	39
II.4. La mise en culture des isolats obtenus.....	39
II.5. Extraction d'ADN génomique des cultures des isolats obtenus.....	39
II.6. Dosage d'ADN.....	40
II.7. Amplification par polymérisation en chaîne (PCR).....	40
II.8. Electrophorèse sur gel d'agarose	40
Partie 3 : Résultats et discussion.....	41
I. Résultats d'extraction d'ADNg.....	43
II. Résultats de PCR.....	50
II.1. La PCR à partir des ADNg dilué.....	53
II.2. La PCR à partir des produits PCR.....	54
Conclusion et perspectives	57
Liste des références bibliographiques.....	59
Liste des annexes	64

°C : Degré Celsius.

16S et 23S : ADN ribosomaux codant pour respectivement pour les sous-unités 16S et 23S du ribosome.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ADNg : ADN génomique.

ADNr : ADN ribosomal.

ARN : Acide ribonucléique.

ATP : Adénosine triphosphate.

BAP : Buffered mineral medium added of Phosphatidylcholine.

BET : Bromure d'éthidium.

bp : Paire de bases.

dNTP : Désoxyribonucléotide triphosphate.

DPM : Frankia Defined propionate Minimal Medium.

EDTA : Acide éthylène diamino tétraacétique.

IGS : Intergenic Spacer / Région intergénique.

kb : Kilobases.

MA : Million D'années.

MES-Tris : 2- (N-morpholino) éthanesulfonique-Hydroxyméthylaminométhane.

nif : nitrogen fixation.

PCR : Polymerase chain reaction.

rpm : Rotation par minutes.

rrn : Région intergénique hypervariable des ADNr 16S et 23S.

TBE : Tris-borate-EDTA.

Les Figures

Figure 1. Exemples d'utilisation des espèces <i>Casuarina</i> dans le monde.....	17
Figure 2. Les relations entre les clades de <i>Frankia</i> et le genre plantes actinorhiziennes depuis les dicotylédones vraies.....	20
Figure 3. Vues microscopiques sous lumière blanche d'une culture de <i>Frankia</i> comme elle apparait durant la fixation de N ₂	21
Figure 4. Photo micrographiques Optique Nomarski.....	22
Figure 5. Représentation schématique des deux modes d'infection des plantes actinorhiziennes par <i>Frankia</i>	29
Figure 6. Coupe longitudinale d'un lobe nodulaire actinorhizien.....	31
Figure 7. Schéma représentatif de la technique de dilution en série utilisée lors de l'isolement à partir du sol.....	37
Figure 8. Profil électrophorétique démontrant la présence d'ADN génomique après extraction d'ADNg de l'isolat RI.....	43
Figure 9. Profil électrophorétique démontrant la présence d'ADN génomique après extraction d'ADNg des isolats 13AUTO, SAA, CREPS et du témoin CcI3.....	44
Figure 10. Profil électrophorétique démontrant la présence d'ADN génomique après extraction d'ADNg de l'isolat MV et du témoin CcI3.....	46
Figure 11. Profil électrophorétique démontrant la présence d'ADN génomique après extraction d'ADNg des isolats SLH et LB.....	47
Figure 12. Profil électrophorétique démontrant la présence d'ADN génomique après extraction d'ADNg des isolats CH, BP et BBA.....	48
Figure 13. Profil électrophorétique des produits PCR des isolats CcI3, 13AUTO, RI, CREPS et SAA amplifiés avec les amorces <i>nifD</i> -K.....	50
Figure 14. Profil électrophorétique des produits PCR des isolats CcI3, 13AUTO, RI, CREPS et SAA amplifiés avec les amorces <i>rnn</i>	50
Figure 15. Profil électrophorétique des produits PCR des isolats CcI3, MV, LB et SLH avec les amorces <i>nifD</i> -K.....	51
Figure 16. Profil électrophorétique des produits PCR des isolats CcI3, MV, LB et SLH avec les amorces <i>rnn</i>	51

Figure 17. Profil électrophorétique des produits PCR des isolats CH, BP et BBA amplifiés avec les amorces <i>nifD</i> -K.....	52
Figure 18. Profil électrophorétique des produits PCR des isolats CH, BP et BBA amplifiés avec les amorces <i>rrn</i>	52
Figure 19. Profil électrophorétique des produits PCR des isolats à partir des ADNg dilué amplifiés avec les amorces <i>nifD</i> -K.....	53
Figure 20. Profil électrophorétique des produits PCR des isolats à partir des ADNg dilué amplifiés avec les amorces <i>rrn</i>	53
Figure 21. Profil électrophorétique des produits PCR des isolats à partir des produits PCR précédents amplifiés avec les amorces <i>nifD</i> -K.....	54
Figure 22. Profil électrophorétique des produits PCR des isolats à partir des produits PCR précédents amplifiés avec les amorces <i>rrn</i>	54

Les Tableaux

Tableau 1 : Taxonomie, et répartition géographique des plantes actinorhiziennes.....	13
Tableau 2 : Les souches de <i>Frankia</i> dont le génome a été séquencé.....	25
Tableau 3 : Comparaison des principales caractéristiques des symbioses actinorhiziennes et des symbioses rhizobiennes.....	27
Tableau 4 : Localisation des sites d'échantillonnages pour l'isolement à la recherche de <i>Frankia</i>	37
Tableau 5 : Isolats obtenus et analysés dans cette étude.....	41
Tableau 6.a: Les résultats des dosages de l'ADNg extraits de l'isolat RI au Nanodrop.....	42
Tableau 6.b: Les résultats des dosages de l'ADNg extraits des isolats 13AUTO, CREPS et SAA et du témoin CcI3 au Nanodrop.....	43
Tableau 6.c: Les résultats des dosages de l'ADNg extraits de l'isolat MV et du témoin CcI3 au Nanodrop.....	45
Tableau 6.d: Les résultats des dosages de l'ADNg extraits des isolats LB et SLH au Nanodrop.....	46
Tableau 6.e: Les résultats des dosages de l'ADNg extraits des isolats CH, BP et BBA au Nanodrop.....	47

Introduction

PDF Pro Evaluation

Les sols ont une vocation principale de production agricole et sylvicole et assurent le développement de la végétation naturelle, support de la biodiversité. Les sols sont aussi des réacteurs biologiques qui assurent de nombreuses fonctions environnementales. En ralentissant l'écoulement de l'eau de pluie qu'ils absorbent partiellement, les sols participent de la prévention des inondations et des coulées de boue. Ils jouent un rôle de filtre et stockent en partie des molécules introduites par l'homme (métaux lourds, produits phytosanitaires...), étant ainsi des acteurs indirects de la qualité de l'eau. Après les océans, les sols sont le deuxième réservoir de carbone (C), en contact avec l'atmosphère.

Les terres dégradées sont définies par les sols qui ont perdu la productivité primaire due aux stress abiotiques ou biotiques. Parmi les stress abiotiques, la sécheresse, la salinité et les métaux lourds sont les principales menaces dans les zones tropicales. Ces contraintes affectent la croissance des plantes et réduisent leur productivité (Diagne *et al.*, 2013a).

L'Algérie constitue une entité écologique exceptionnelle dans la biosphère. La croissance démographique galopante, les conditions climatiques difficiles, la surexploitation des ressources naturelles ont généré des problèmes de dégradation et perte irréversible de la structure des sols, d'érosion éolienne et hydrique. A cela s'ajoute le problème de la salinisation suite à l'irrigation. De plus, le rétrécissement des aires de pâturage, la détérioration des infrastructures agricoles, la diminution des capacités de rétention des barrages et donc, du potentiel d'irrigation, accélèrent le processus de désertification. Par ailleurs, la forêt algérienne, actuellement fragile, a besoin d'être protégée car elle présente de nombreux atouts en rapport avec sa grande diversité biologique et son impact sur l'équilibre socioéconomique du pays. Il s'avère donc nécessaire, pour le succès des plans d'aménagement et de lutte contre la dégradation de l'environnement, de développer une approche intégrée et participative de tous les acteurs concernés (Benderradji *et al.*, 2006).

Pour la lutte contre cette dégradation, l'utilisation des engrais chimiques pour compenser ces carences est controversée; leur prix augmente et leur impact est néfaste sur le réchauffement climatique, l'environnement et la santé des populations. Une alternative consiste à exploiter les facultés développées par certaines espèces végétales pour s'adapter à des environnements carencés. Un exemple est donné par les symbioses fixatrices d'azote (Hoher *et al.*, 2009).

Les plantes fixatrices d'azote comme les espèces actinorhiziennes capables de pousser dans des sols pauvres et perturbés, sont largement plantés pour la remise en état de ces terres dégradées. Il a été rapporté que l'association des microbes du sol en particulier les bactéries

fixatrices d'azote *Frankia* avec ces plantes actinorhiziennes peut atténuer les effets néfastes des stress biotiques et abiotiques (Diagne et al., 2013a). Parmi les plantes actinorhiziennes, la famille des *Casuarinaceae* appartient à l'ordre des *casuarinales*. Elle compte quatre genres, *Allocasuarina*, *Casuarina*, *Ceuthostoma* et *Gymnostoma*, et constitue un groupe d'environ 90 espèces d'arbres et d'arbustes, dont l'aire d'origine s'étend de l'Australie aux îles du Pacifique et au Sud-Est de l'Asie. Les *Casuarinaceae* possèdent des rameaux chlorophylliens photosynthétiques et des feuilles réduites à des écailles verticillées cornées, limitant la perte en eau et leur permettant de survivre dans des climats chauds et secs. En association avec *Frankia* et des champignons mycorhiziens, les *Casuarinaceae* peuvent croître sur des sols marginaux carencés. Cette famille comprend également des essences tropicales, subtropicales ou méditerranéennes, adaptées à différents climats (arides à humides), à différentes altitudes (0 à 3 000 mètres) et à différents sols (acides à alcalins). L'ensemble de ces propriétés facilite l'introduction de ces arbres en zone tropicale. Ainsi *Casuarina* joue un rôle essentiel dans les zones tropicales : en fixant l'azote et en contribuant à la restauration de la fertilité des sols (Hochoer et al., 2009).

Quant à *Frankia* l'actinobactérie fixatrice d'azote de gramme positif qui forme une association symbiotique avec des plantes actinorhiziennes, c'est une bactérie filamenteuse, trouvée dans les nodules des racines ou à l'état libre dans le sol. Parmi les espèces de *Frankiaceae*, la capacité de fixer l'azote est limitée à *Frankia*. Cette bactérie microaérophile est caractérisée par un haut pourcentage en GC et une croissance lente (Diagne et al., 2013a).

L'objectif de ce travail est l'identification de nouvelles souches de l'actinomycète *Frankia* non répertoriées isolées à partir des nodules de *Casuarina equisetifolia* ou à partir du sol pris dans la rhizosphère de l'arbre. Ce travail a pour but la recherche d'une nouvelle souche infective et effective (l'activité fixatrice d'azote spécifique des nodules, appréciée par la réduction de C_2H_2 , s'élève à quelque mole/gramme de C_2H_4 ce qui indique que la souche est infective et effective), obtenue à partir des prospections sur le sol dégradés en Algérie et qui soit un meilleur partenaire symbiotique chez *C. equisetifolia* par rapport à la souche de référence et connue Cc13 qui sera notre témoin positif dans cette étude. Pour cela, on a extrait l'ADN des isolats obtenus à partir des cultures sur milieu liquide BAP et on a amplifié deux régions d'ADN (l'opéron ribosomique *rrn* et la région intergénique *nifD-K*).

Chapitre I:
Synthese
bibliographique

PDF PRO-Evaluation

I. Les symbioses fixatrices d'azote

L'azote, quatrième constituant chez les plantes après le carbone, l'hydrogène et l'oxygène utilisé dans l'élaboration de molécules importantes comme les protéines, les acides nucléiques et la chlorophylle, est indispensable au développement des organismes vivants. Par ailleurs, ce composé est l'un des premiers éléments limitant la croissance végétale après l'eau, la lumière et le phosphore, ce qui est en apparence contradiction avec les quantités d'azote existant dans l'atmosphère terrestre (78% de l'air) sous forme de diazote (N_2). La plupart de ces molécules sont difficilement accessible aux plantes car elles ne peuvent absorber cet élément que sous forme de nitrate (NO_3^-), d'ammonium (NH_4^+) ou d'ammoniaque (NH_3) (Benabdoun, 2012). Certains procaryotes sont dotés d'une capacité à transformer l'azote atmosphérique sous une forme assimilable par la plante et pallier de ce fait la carence azotée dans le sol. Ces organismes sont dits « fixateurs » d'azote ou « diazotrophes » (Downie, 2005).

Ces bactéries possèdent notamment les gènes *nif* (nitrogène fixation) organisés en opéron comprenant *nifH*, *nifD* et *nifK* codant pour les sous-unités de la nitrogénase. Le complexe nitrogénase comprend : (i) la dinitrogénase (protéine I), hétérotétramère $\alpha_2\beta_2$ directement responsable de la réduction de N_2 en NH_3 , (ii) la dinitrogénase réductase (protéine II), homodimère qui assure le transfert des électrons nécessaires à la réduction de N_2 , d'un donneur à la dinitrogénase. La nitrogénase fonctionnant uniquement en milieu anaérobie, la plante différencie des structures particulières au niveau des racines appelées nodules (*Rhizobia*-légumineuses) ou actinorhizes (Actinoriziennes) ayant une architecture limitant les entrées d'oxygène. Les bactéries fixatrices libres d'azotes, possèdent également les gènes *nif*, et la nitrogénase fonctionne uniquement en milieu microaérobie avec des faibles teneurs en azote (Walker, 2010).

Cependant les principales symbioses fixatrices d'azote sont les symbioses nodulaires. Il en existe deux types, la symbiose actinorhizienne qui implique des bactéries filamenteuses du genre *Frankia* et la symbiose *Rhizobium*-légumineuses. Ces deux symbioses sont caractérisées par la formation d'un nouvel organe au niveau des racines, le nodule ou nodosité, à l'intérieur duquel certaines cellules sont envahies par les micro-symbiotes fixateurs d'azote. Ce dernier est un organe dont le rôle et l'origine sont exclusivement symbiotiques. La mise en place de cet organe, développé *de novo* et facultatif pour la survie

de la plante, requiert un programme d'organogénèse induit par la présence du micro-symbiote (Godfroy, 2008).

La réaction de fixation de l'azote est très coûteuse en énergie (ATP et pouvoir réducteur). De ce fait, la fixation de l'azote par les bactéries diazotrophes à l'état libre est peu efficace : de l'ordre de la dizaine de $\text{kg N}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$. L'association symbiotique entre des bactéries fixatrices d'azote et certaines plantes permet d'améliorer considérablement cette valeur pour atteindre une centaine de $\text{kgN}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$ (Peret, 2007).

I.1. Importance de la fixation biologique de l'azote

Les besoins en azote de l'agriculture mondiale vont considérablement augmenter à cause de la croissance de la population qui dépassera 8 milliards d'individus au cours du siècle prochain. A ce besoin pressant en ressource azotée, se greffent de nombreux problèmes dans les pays développés comme dans ceux en voie de développement. Dans les pays développés, l'utilisation massive d'engrais industriel peut provoquer la pollution des nappes phréatiques, des lacs, et causer la déstabilisation de la structure des sols. Dans les pays pauvres, si l'ajout d'engrais industriels reste très limité, les écosystèmes naturels sont fragilisés par les cultures intensives, la sécheresse ou le lessivage des sols et le surpâturage. Afin de contourner ces problèmes de pollution et de carence en azote, l'utilisation de la fixation biologique de l'azote semble être la solution la plus appropriée. Chez les fixateurs libres, la quantité d'azote fixée est de l'ordre de 0,1 à 10 kg/ha/an . Par contre, dans le cas des systèmes symbiotiques, la quantité d'azote fixée directement disponible pour la plante hôte peut atteindre 100 kg/ha/an (chez les arbres) (Diouf, 1996).

Les associations symbiotiques fixatrices d'azote présentent un intérêt majeur au niveau économique, agronomique et écologique. Elles permettent en effet de limiter les apports d'engrais azotés, coûteux et polluants, dans les écosystèmes cultivés et assurent le maintien de la fertilité des sols dans les milieux naturels. Elles sont de ce fait d'une grande utilité pour la restauration de milieux dégradés (Domergue, 2006).

Les arbres fixateurs de N_2 sont appelés à jouer un rôle de plus en plus important dans les différents types d'écosystèmes : en forêt en tant que producteurs de biomasse, qu'ils soient plantés en culture pure ou en association avec des espèces non fixatrices de N_2 . Ainsi que dans les systèmes sylvo-pastoraux en tant que producteurs de fourrage, ce rôle étant potentiellement très important dans les zones arides et semi-arides ; dans les agro-systèmes où

interviennent dans la protection des sols (notamment contre toutes les formes d'érosion), ou comme régénérateurs de la fertilité, dans le cadre de systèmes culturels variés : jachères forestières, cultures en allées ou cultures associées. Les systèmes fixateurs de N_2 pérennes présentent par rapport aux systèmes utilisés en agriculture deux avantages majeurs : Ils sont moins exigeants sur le plan nutritionnel et peuvent donc être installés dans des sols très pauvres délaissés par l'agriculteur ; Leurs performances peuvent être améliorées par des méthodes simples, fondées sur l'exploitation de la variabilité naturelle suivie de multiplication végétative (Dommergues et *al.*, 1988).

Les symbioses fixatrices d'azote jouent un rôle économique considérable. Elles sont utilisées à des fins d'enrichissement des sols en semant ou en plantant des végétaux dits améliorants, qui peuvent alors être utilisés pour réaliser des productions de type agricole ou forestier. En effet, ces symbioses restituent aux sols stériles, lors de la chute des feuilles, une matière organique riche en composés azotés, grâce à laquelle une végétation pourra s'implanter. Ils constituent de ce fait le premier maillon pour la reconstitution d'un écosystème (Soualmia, 2010).

I.2. Les carences en éléments nutritifs des sols

Toute plante a besoin pour vivre d'un apport d'éléments nutritifs. Ceux-ci sont absorbés essentiellement sous forme minérale. On distingue entre les éléments principaux parmi lesquels on compte l'azote, le phosphore, le potassium, le calcium, le magnésium, le soufre et les oligo-éléments comme le bore, le fer, le cuivre, le manganèse, le molybdène et le zinc, dont la plante n'a besoin qu'en quantité très faible. Mais il y a des sols qui souffrent de plusieurs carences qui est l'approvisionnement des plantes en un ou plusieurs éléments nutritifs on citera quelques exemples décrites ci-dessous :

- **Carence en Phosphore**

Le phosphore stimule l'enracinement, équilibre le tallage, stimule la fécondation et raccourcit la maturation. Il stimule la reprise après un stress (attaque de rongeurs, froid etc.). La carence en phosphore peut limiter les rendements Elle provoque une diminution de la production de protéines et de vitamines. Parmi les sols carencés en phosphore, les sols très acides et les sols alcalins. Les symptômes d'une carence en phosphore se manifestent par une coloration vert foncé des feuilles et une réduction du tallage. Le développement de la plante

est retardé et très hétérogène. Dans la plupart des sols de bas-fonds le phosphore est souvent présent en quantité non négligeable (Wopereis et *al.*, 2008).

- **Carence en potassium**

Le potassium joue un rôle important dans la synthèse, la transformation et le transport des hydrates de carbone vers les grains. C'est pourquoi sa carence se ressent par un faible poids des grains. Le potassium joue également un rôle important dans la résistance à un certain nombre de stress dont la sécheresse, les insectes et maladies. Les symptômes d'une carence en potassium se manifestent par la résistance au gel et à la sécheresse se trouve réduite, une coloration vert foncé des feuilles et un jaunissement des bordures des feuilles avec des petites taches brunes. Les symptômes apparaissent d'abord sur les vieilles feuilles et progressent de la bordure de la feuille vers le centre. La coloration des vieilles feuilles change du jaune vers le brun, les bordures et le bout de la feuille deviennent secs. Si la carence persiste, les jeunes feuilles sont affectées. Le potassium est un élément mobile dans le sol. Les sols carencés en potassium sont très argileux, sableux ou riches en humus.....etc (Wopereis et *al.*, 2008).

- **Carence en magnésium**

Chez les plantes carencées en Mg, la production d'hydrates de carbone est réduite, qui servent à la protéosynthèse, s'accumulent dans les feuilles. Les sols à carences magnésiennes sont, les sols à agriculture intensive, sols légers ou acides (Wopereis et *al.*, 2008).

- **Carence en azote**

L'azote est essentiel pour un développement normal de la plante. Sa carence induit un rabougrissement des plantes et un jaunissement uniforme des feuilles. La teneur en azote dans le sol peut être estimée en observant sa couleur, sa texture et sa structure. Un sol argileux, avec une couleur foncée et une bonne structure, avec une grande activité biologique (présence de vers de terre) dans la plupart des cas un bon niveau d'azote. Les sols insuffisamment fertilisés; sols souvent sableux, filtrants, acides ou pauvres en humus (Wopereis et *al.*, 2008).

I.3. La symbiose fixatrice d'azote chez les légumineuses

La famille des légumineuses subdivisée en trois sous-familles : *Cesalpinoidae*, les *Mimosoidae* et les *Papilionidae* (Willems, 2006), comprend environ 670 genres et 19700 espèces (Domergue, 2006).

La symbiose rhizobienne est une association entre les plantes de la famille des légumineuses et des bactéries du type *Rhizobium* permettant de réduire l'azote atmosphérique en des formes assimilables par les plantes. A bénéfice réciproque, cette association donne lieu à des interactions multiples entre les deux partenaires. Au cours de ces interactions, un nouvel organe, le nodule, est formé sur les racines ou plus rarement sur les tiges à partir de primordia racinaires dormants et disposés en rang le long de la tige (Romain, 2011).

Au sein de cet organe, les bactéries se spécialisent dans la réduction de l'azote atmosphérique en composés azotés directement assimilables par la plante. Cependant, la symbiose est un processus transitoire puisque les nodules sont des organes sénescents à terme et qui perdent donc leur capacité à fixer l'azote (Le Guerhier, 2013).

Les légumineuses jouent donc un rôle essentiel dans les écosystèmes naturels, en agriculture et en agroforesterie, en colonisant des espaces pauvres en azote et en constituant une source majeure de fertilisants naturels et économiques pour les cultures. Cependant, beaucoup de légumineuses sont sensibles à la sécheresse et à l'acidité des sols, ce qui gêne l'expansion de ces cultures dans les régions à faible pluviométrie (Riah, 2014)

II. Les symbioses actinorhiziennes

Une autre importante interaction plante-microbe est la symbiose entre les membres des actinomycètes fixatrice d'azote du genre *Frankia* et les plantes ligneuses non légumineuses, les plantes actinorhizienne.

II.1. Le partenaire végétale : les plantes actinorhiziennes

Le terme plante actinorhizienne décrit l'interaction symbiotique entre *Frankia* (actino) et les racines des plantes (Rhiza) (Maunuksela, 2001)

Les plantes susceptibles d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec l'actinomycète tellurique *Frankia* sont appelées plantes actinorhiziennes. L'établissement de la symbiose implique le développement d'un nouvel organe, l'actinorhize ou nodule actinorhizien, qui est le site de la fixation d'azote atmosphérique par le microsymbiote (Hocher et al., 2009).

Ce sont principalement des plantes ligneuses, capables de coloniser des sols pauvres et de tolérer une grande variété de stress (Hocher et al., 2010). Ils représentent un groupe diversifié d'environ 220 espèces appartenant à huit familles de plantes réparties dans les trois

ordres, Fagales (*Betulaceae*, *Casuarinaceae* et *Myricaceae*), Rosales (*Rosaceae*, *Eleagnaceae* et *Rhamnaceae*) et Cucurbitales (*Datisceae* et *Coriariaceae*) (Santi et al., 2013).

Apparues il y a environ 80 MA, les symbioses actinorhiziennes sont moins étudiées que les symbioses Légumineuses-*Rhizobium*, mais ont néanmoins une grande importance écologique. Par ailleurs, cette relation symbiotique avec *Frankia* présente des différences notables avec la symbiose rhizobienne (Benabdoun, 2012).

Parmi les espèces les plus connues, on peut citer l'aulne (*Alnus glutinosa*), le filao (*Casuarina equisetifolia*), l'olivier de bohème (*Eleagnus angustifolia*) ou encore le céanothe (*Ceanothus dentatus*) (Benabdoun et al., 2012).

II.1.1. Historique de *Casuarina*

Le nom *Casuarina* est dérivé du mot papoue "kasuari", qui se réfère à la similitude entre le feuillage tombant de l'arbre et les plumes de l'oiseau Casuar (Diouf et al., 2008).

Quelques espèces appartenant au genre *Casuarina* ont été exportées, à partir de la fin du XIX^{ème} siècle, vers toutes les zones tropicales et subtropicales du globe. Actuellement, ces grands arbres servent principalement de brise-vent protégeant les cultures des embruns sales, de stabilisateurs de dunes, et leur bois fournit un charbon à très haute teneur calorifique (Diem et Dommergues, 1990; El-Lakany, 1983).

Les *Casuarinacées* ont la capacité d'établir des doubles symbioses ou même triples symbioses pour le *Casuarina equisetifolia* (*Frankia*, champignons endomycorhizes et champignons ectomycorhizes) leur permettant de coloniser des sols très pauvres et de pousser dans des conditions défavorables (Maggia, 1991).

Casuarina ont été introduits en Afrique, Asie et en Europe centrale, Amérique du Nord et du Sud pour le reboisement des zones côtières et terres dégradé (Diem et Dommergues 1990; Zhong et al., 2010). Dans certains pays, dont le Sénégal, l'Egypte, le Bénin, le Kenya, l'Afrique du Sud et Madagascar, *Casuarina* est largement planté, alors que dans d'autres, sa présence est très réduite et se limite à la décoration (Diagne et al., 2013b)

Tableau.1: Taxonomie, et répartition géographique des plantes actinorhiziennes (Benabdoun, 2012).

famille	Genre	Nombre total d'espèces	Nombre d'espèce nodulantes	Origine géographique
<i>Betulaceae</i>	<i>Alnus</i>	47	47	Europe, Asie, Amérique du Nord, Les Andes
<i>Casuarinaceae</i>	<i>Allocasuarina</i>	59	54	Australie
	<i>Casuarina</i>	18	18	Australie, Asie Tropicale, Pacifique Sud-Ouest
	<i>Ceuthostoma</i>	2	2	Océanie
	<i>Gymnostoma</i>	18	18	Australie, Nouvelle-Calédonie, Sumatra
<i>Coriariaceae</i>	<i>Coriaria</i>	16	16	Méditerranée, Asie, Nouvelle-Zélande, Amérique du Nord
<i>Datisceae</i>	<i>Datisca</i>	2	2	Asie, Amérique du Nord, Europe
<i>Elaeagnaceae</i>	<i>Elaeagnus</i>	45	35	Asie, Amérique du Nord,
	<i>Hyppophae</i>	3	2	Europe Europe, Asie
	<i>Shepherdia</i>	3	2	Amérique du Nord
<i>Myricaceae</i>	<i>Comptonia</i>	1	1	Amérique du Nord
	<i>Myrica</i>	60	28	Tous les continents sauf l'Australie
<i>Rhamnaceae</i>	<i>Adolphia</i>	1	1	Amérique du Nord
	<i>Ceanothus</i>	55	31	Amérique du Nord
	<i>Colletia</i>	17	4	Amérique du Sud
	<i>Discaria</i>	10	5	Amérique du Sud, Australie, Nouvelle-Zélande
	<i>Kentrothammus</i>	2	2	
	<i>Talguenea</i>	1	1	Amérique du Sud
	<i>Trevoa</i>	6	2	Amérique du Sud
<i>Rosaceae</i>	<i>Cercocarpus</i>	20	4	Mexique, Sud-Ouest des Etats-Unis
	<i>Chamaebatia</i>	2	1	Sierra Nevada
	<i>Cowania</i>	25	1	Mexique, Sud-Ouest des Etats-Unis
	<i>Dryas</i>	3	1	Antarctique
	<i>Purshia</i>	4	2	Amérique du Nord-Ouest

En 1895, les *Casuarinas* ont été introduits dans les régions tropicales de la Chine. Les *Casuarinas* actuellement couvrent environ 300 000 hectares. Principalement dans les zones côtières (Zhong et al., 2010). Parmi le grand nombre d'espèces introduit, *Casuarina equisetifolia* L. Johnson, *C. cunninghamiana* Miq., *C. glauca* Sieber ex Sprengel et *C. junghuhniana* Miq., qui ont le plus réussis et sont au centre de la recherche et développement en cours en Chine (Zhong et al., 2013).

Les *Casuarinas* ont été introduits en Egypte sur une grande échelle à la fin du 18^{ème} siècle. *Casuarina* actuellement est le genre répandu dans la plupart des cultures forestières égyptiennes (Mansour and Megahed 2002). Trois espèces sont cultivés, *C. equisetifolia*, *C. glauca* et *C. cunninghamiana*, et un hybride naturel entre les deux dernières espèces a également été décrit (Badran et al., 1979).

Les *Casuarinas* ont été aussi introduits en Algérie au début du 19^{ème} siècle par la colonisation française. Utilisés comme des plantes ornementales et comme brise-vent autour des cultures marachaires ainsi que pour séparer les différentes cultures

II.1.2. La famille des *Casuarinacées*

La famille des angiospermes *Casuarinaceae* provient d'Australie et des îles du Pacifique occidental, où ses membres se trouvent dans des environnements allant des forêts tropicales aux régions boisées arides et les sites salins. La famille comprend plus de 80 espèces d'arbres et arbustes en quatre genres: *Allocasuarina*, *Casuarina*, *Gymnostoma* et *Ceuthostoma* (Rouvier et al., 1995).

- ***Allocasuarina***

Ce genre comprend 53 espèces endémiques à l'Australie principalement en Australie du Sud.

- ***Gymnostoma***

Le genre *Gymnostoma* comprend 18 espèces. On les rencontre en Malaisie, aux îles Fiji, en Nouvelle-Calédonie et au Nord-Est d'Australie où il n'existe qu'une seule espèce *G. australianum*. Ailleurs, c'est le *G. sumatrana* qui devient localement important.

- ***Ceuthostoma***

Jadis, ce genre était inclus dans celui de *Gymnostoma*. A présent le genre *Ceuthostomane* compte que deux espèces (*C. palawanse* et *C. terminale*) qui poussent en Malaisie, de Palawan (Philippines) à Bornéo en Nouvelle-Guinée.

- *Casuarina*

Le genre *Casuarina* comprend 17 espèces. On les rencontre en Asie du Sud-Est, en Malaisie, en Mélanésie, en Polynésie, en Nouvelle-Calédonie et en Australie (Sougoufara, 1990).

Ces plantes possèdent des rameaux chlorophylliens à activité photosynthétique et des feuilles réduites à des écailles verticillées cornées, limitant les pertes en eau et leur permettant de survivre dans des climats chauds et secs. En association avec *Frankia* et des champignons *mycorhiziens*, les *Casuarinaceae* peuvent croître sur des sols marginaux carencés en azote et en phosphore. La famille des *Casuarinaceae* comprend des essences tropicales, subtropicales ou méditerranéennes, adaptées à différents climats (arides à humides), à différentes altitudes (0 à 3 000 m) et à différents types de sols (acides à alcalins). L'ensemble de ces propriétés facilite l'introduction de ces arbres en zone tropicale, en dehors de leur aire d'origine (Diouf et al., 2008).

Un certain nombre d'espèces de *Casuarinaceae* sont connus pour leurs taux de croissance rapide sur les sols pauvres, Cette croissance dépend souvent de la formation de nodules racinaires actinorhiziens efficaces en association avec l'actinomycète du sol *Frankia sp* (Rouvier et al., 1995).

II.1.3. Utilisation des plantes actinorhiziennes

Les plantes actinorhiziennes sont des arbres ou des arbustes ligneux. Ils sont présents sur tous les continents à l'exception de l'Antarctique. *Casuarina* et *Alnus* sont les plantes actinorhiziennes les plus importants et les plus répandus en raison de leur utilisation dans la restauration des sols, les systèmes agroforestiers, la stabilisation des dunes et les brise-vent. Ils sont généralement des espèces pionnières qui colonisent les milieux perturbés à faible fertilité des sols et facilitent la création et le développement des communautés végétales ultérieures (Diagne et al., 2013).

Les Plantes actinorhiziennes sont un groupe spécifique de non-légumineuses, dicotylédones ligneuses ayant des partenaires symbiotiques, les nodules racinaires fixateurs d'azote qui sont induits sur les racines des espèces végétales actinorhiziennes par les actinomycètes du sol du genre *Frankia*. Il y a un manque d'informations basique sur les plantes actinorhiziennes en Afrique par rapport aux autres grandes masses terrestres dans le monde. Les résultats indiquent que la plupart, sinon tous, les pays africains et les régions

climatiques ont des espèces actinorhiziennes indigènes ou introduites. Une synthèse des informations disponibles indiquent qu'il ya six familles, neuf genres et 38 espèces de plantes rapportées actinorhiziennes en Afrique. Dont, 21 espèces sont indigènes et 17 sont exotiques. L'état actuel et la connaissance des plantes actinorhiziennes africaines indique un besoin de concentrer les recherches sur leurs biogéographies, la biologie, l'écologie, la génétique et l'utilisation (Gtari et Dawson, 2011).

L'utilisation en sylviculture des plantes actinorhiziennes n'est plus à démontrer. Ces plantes sont largement utilisées de par le monde pour reboiser, lutter contre l'érosion ou produire du bois de feu (Maggia, 1991). Parmi eux, les plantes des familles des *Casuarinaceae* et *Betulaceae* sont le plus largement planté dans le monde entier pour la réhabilitation des terres dégradées (Diagne et al., 2013).

Afin de lutter contre la désertification en Algérie, le programme du « barrage vert » a été lancé dans les années 70, consistant en une bande boisée de 1200 kilomètres de long sur 20 kilomètres de large. Parmi les espèces choisies, on trouve l'olivier de bohème et les *Casuarinas*. En Algérie, les *Casuarinas* sont souvent utilisés comme brise-vent associés aux cultures maraîchères, pour la réhabilitation des anciennes carrières, pour prévenir les glissements de terrains grâce à leur système racinaire, et aussi comme plantes ornementales en zone urbaine (Benabdoun, 2012).

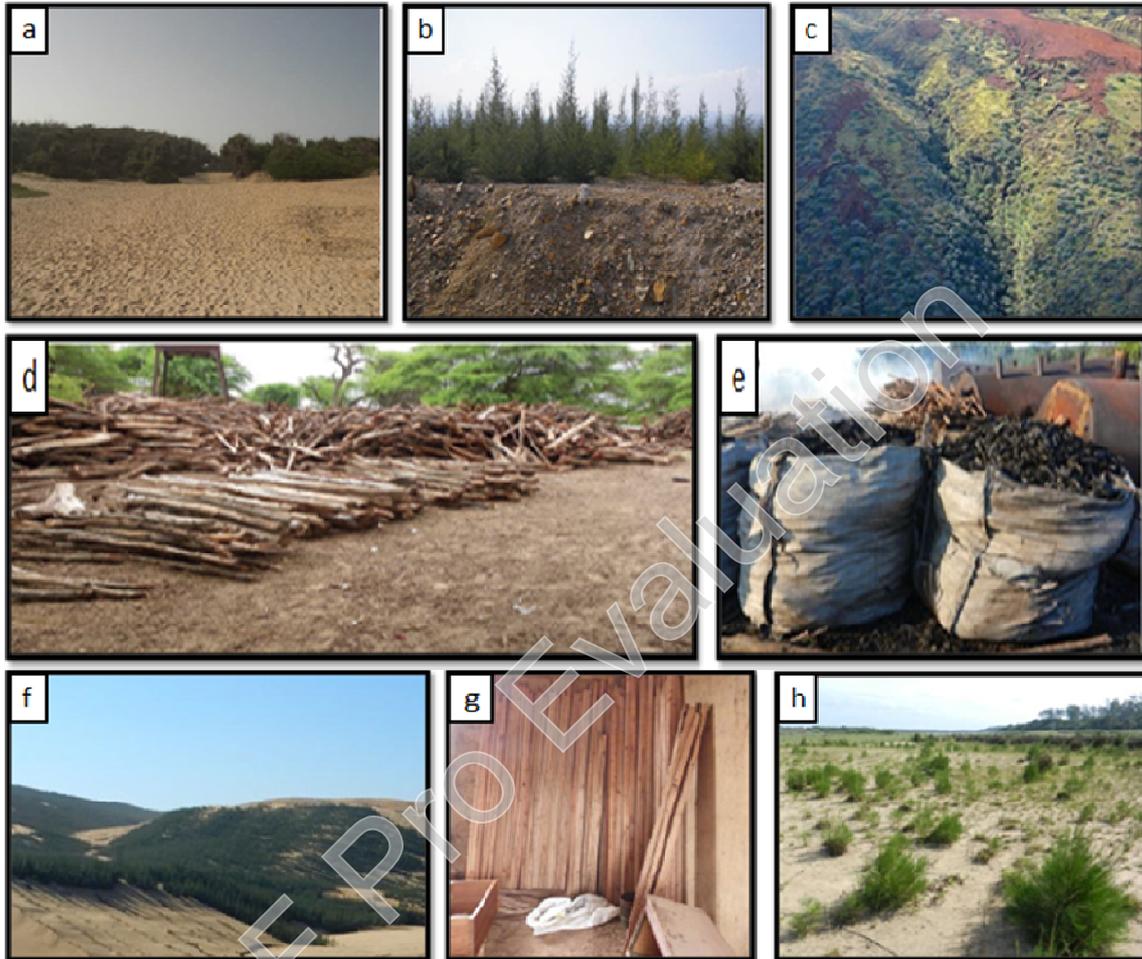


Figure 1. Exemples d'utilisation des espèces *casuarina* dans le monde. D'après : Potgieter et al., 2013 et Diagne et al., 2013.

- a.** Plantation de *Casuarina equisetifolia* dans la région des Niayes pour la fixation des dunes, Sénégal. **b.** Plantation de *C. equisetifolia* sur les terrains des miniers de magnésite, Inde **c.** *Casuarina glauca* envahit Kapapa, Oahu, Hawaii. **d, g.** utilisations de bois de *C. equisetifolia* bois comme bois de chauffage (d) ou de bois de construction (g), Mobro, Sénégal. **e.** Utilisation de *C. equisetifolia* pour la production de charbon de bois, la compagnie minière Richards Bay Minerals (RBM), Afrique du Sud. **f.** RBM utilise *C. equisetifolia* dans le cadre de leur programme de réhabilitation dans le KwaZulu-Natal, Afrique du Sud. **h.** *C. equisetifolia* envahit l'estuaire du Saint-Lucie dans le KwaZulu-Natal, Afrique du Sud.

II.2. Le partenaire bactérien : *Frankia*

II.2.1. Historique

Le microorganisme *Frankia* est initialement décrit dans les nodules racinaires de l'aulne par A. B. Frank, au cours de la deuxième moitié du XIX^e siècle. En raison de sa nature filamenteuse, *Frankia* a été longtemps assimilé à un champignon et dénommé *Schinzia alni*. En 1886, Brunchorst proposait le nom de *Frankia subtilis* en hommage à son mentor Frank (Nouioui, 2014). Classifiées plus tard comme actinomycètes filamenteux à croissance lente par Krebber en 1932 (Lechevalier, 1994).

Il a fallu attendre jusqu'en 1978 pour parvenir à isoler *Frankia* en culture pure et pour avoir la première conférence sur *Frankia* et les plantes actinorhiziennes. A cette conférence, on adopta le terme actinorhize signifiant la symbiose racinaire entre l'actinomycète fixateur d'azote, *Frankia*, et plus de 200 espèces d'angiospermes appartenant à huit familles de plantes comprenant 25 genres (Mallet, 2011). Ce n'est seulement qu'en 1982 que la première souche d'un *Frankia* de *Casuarina equisetifolia* fut isolée (Diem et al., 1982a). Elle a la particularité, bien que présentant les caractéristiques spécifiques au genre *Frankia*, de ne pouvoir réinfecter le *C. equisetifolia*, plante hôte d'origine (Maggia, 1991).

II.2.2. Taxonomie

Le genre *Frankia* est un actinomycète de la famille des *Frankiaceae*, de l'ordre des *actinomycétales*, du sous-ordre des *Frankineae*, et de la classe des *Actinobacteria*. Une des plus grandes unités taxonomiques parmi les 18 lignées reconnues à ce jour dans les bactéries.

Plus de 200 souches de *Frankia* ont été isolés à partir de 20 genres de plantes. Ils sont étroitement liés phylogénétiquement et il n'y a aucune preuve de la présence de la capacité de nodulation dans les actinobactéries. Les arbres générés à partir des alignements de séquences de l'ADNr 16S, les gènes de fixation de l'azote et de la glutamine synthétase donnent généralement trois clades majeurs étroitement liés à l'égard des plantes hôtes nodulées. Un quatrième clade contient "*Frankia-like*" actinomycètes, incapable de fixer l'azote ou d'induire des nodules (Franche et al., 2009).

Le clade 1 comprend les souches de *Frankia* conjoints avec des plantes chez *Betulaceae*, *Casuarinaceae*, (sauf *Gymnostoma*) et *Myricaceae* (Sellstedt et Richau, 2013), et sont caractérisées par un haut niveau de spécificité d'hôte (Franche et al., 2009). On cite

comme ex. la souche CcI3 symbionte du Filao qui ne peut infecter que le genre *Casuarina* (Benabdoun, 2012).

Tandis que le Clade II contient *Frankia* associée à *Ceanothus* du *Rhamnaceae*, les *Cucurbitales* (*Coriariaceae* et *Datisceae*) et les *Rosaceae* (Sellstedt et Richau, 2013). Ce clade se caractérise par une faible diversité, et soutient une origine récente de symbiose dans cette lignée (Franche et *al.*, 2009).

Le clade III se compose de bactéries qui nodulent efficacement les plantes des membres de *Elaeagnaceae*, *Gymnostoma* du *Casuarinaceae* et les membres de *Myricaceae* et *Rhamnaceae* (Sellstedt et Richau, 2013).

Frankia peut aussi être classée selon sa capacité à sporuler (sporange multiculaire) à l'intérieur du nodule soit spore + ou spore -. Les spores + ont tendance à être plus infectieuses que les spores- (Mallet, 2011).

II.2.3. Morphologie

La morphologie est toujours un des critères les plus importants pour déterminer le statut générique d'actinomycètes, et cela est vrai pour le genre *Frankia* (Lechevalier, 1994).

Les souches de *Frankia* sont facilement reconnaissables par leur apparence dans une culture liquide. Elles forment des hyphes extensifs et des sporangio spores dans des sporanges multiloculaires situés, soit à la fin ou dans une position intercalaire sur les hyphes (Figure 3 et 4). Certains membres du genre *Frankia* produisent des pigments dans la culture; rouge, jaune, orange, rose, brun, verdâtre, et des pigments noirs ont été également signalés, selon la souche, le support utilisé, et l'âge de la culture (Lechevalier et Lechevalier. 1990).

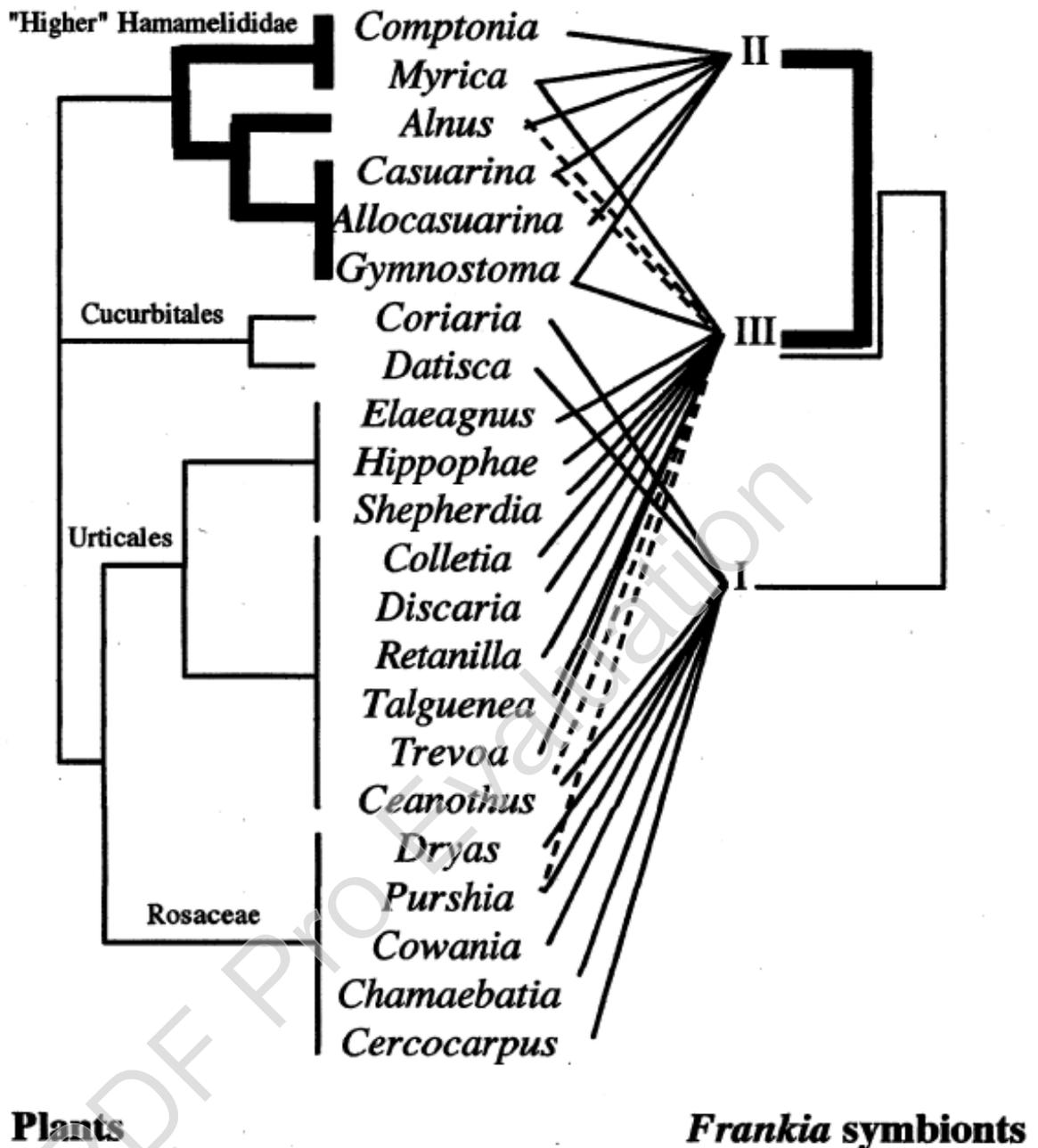


Figure 2. Les relations entre les clades de *Frankia* et le genre plantes actinorhiziennes depuis les dicotylédones vraies (Clawson et al., 2003).

Les groupes phylogénétiques des plantes sont indiqués sur la gauche, les clades *Frankia* sont affichés sur la droite. Les lignes continues indiquent la présence de souches de *Frankia* typique dans chaque genre végétal. Des lignes discontinues indiquent que le clade *Frankia* est seulement de temps en temps détecté dans le genre de la plante. Les lignes épaisses représentent l'infection des racines par les poils absorbants; les lignes fines représentent l'infection par pénétration intercellulaire de la surface radriculaire.

Les isolats de *Frankia* peuvent être cultivés en milieu liquide. Elle se développe au fond des flacons, sous la forme d'un voile composé de colonies hyphales (400-2000 J.Lm de diamètre), et présente un temps de génération de 36 à 48 heures, un maximum de biomasse après au moins 12 à 24 jours et un rendement limite (5-10 mg de protéines bactériennes par litre, etc.) (Rouvier et al., 1996). Ou sur milieu solide, où elles forment des colonies en forme d'étoile de mer, ou des colonies diffuses avec un réseau lâche d'hyphes, ou bien compactes avec des hyphes poussant profusément à la périphérie. Lorsqu'il est cultivé sur la plupart des milieux, *Frankia* sont caractérisées par trois formes structurelles, hyphes, sporanges et des vésicules (Benson et Silvester, 1993). Les hyphes sont des filaments peu ramifiés de 0,5-2 µm de diamètre (Svistoonoff, 2003), et entourés d'une gaine de polysaccharides synthétisée par le cytoplasme de l'hôte (Maggia, 1991), qui constituent la forme végétative et forment un mycélium (Benabdoun, 2012).

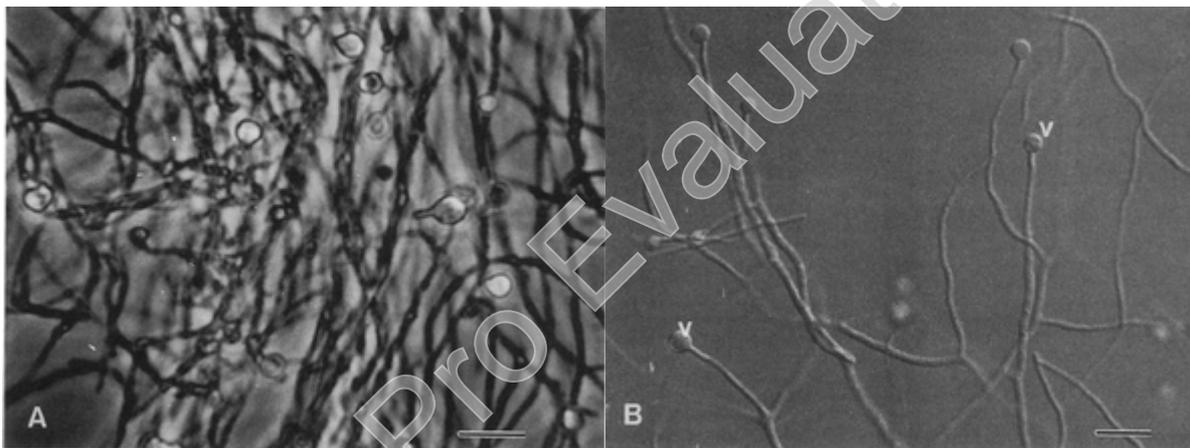


Figure 3. Vues microscopiques sous lumière blanche d'une culture de *Frankia* comme elle apparaît durant la fixation de N₂ (Benson et Silvester 1993).

(A) En microphotographie à contraste de phase *F. alni* HFPCpI1 en cours de la fixation de N₂. Les structures claires sont les vésicules. (B) Microphotographie optique Nomarski de *Frankia* sp. CcI3 de contrainte pendant la fixation de N₂. Notez les vésicules (v) formées sur l'extrémité des branches des hyphes. Echelle, 5µm.

Les hyphes aériens ne sont pas produits sur les milieux solides. Une caractéristique distinctive des souches de *Frankia* (à quelques exceptions près) est la différenciation des vésicules dans la culture et souvent en symbiose (Figure 3). Les vésicules sont des lipides encapsulés, plus ou moins en structures sphériques mesurant entre 2 et 6 µm de diamètre, soit attachées à la fin ou latéralement des hyphes par une courte tige de la vésicule qui est également encapsulée; elles sont généralement produites en réponse à la carence en azote (Benson et Silvester, 1993).

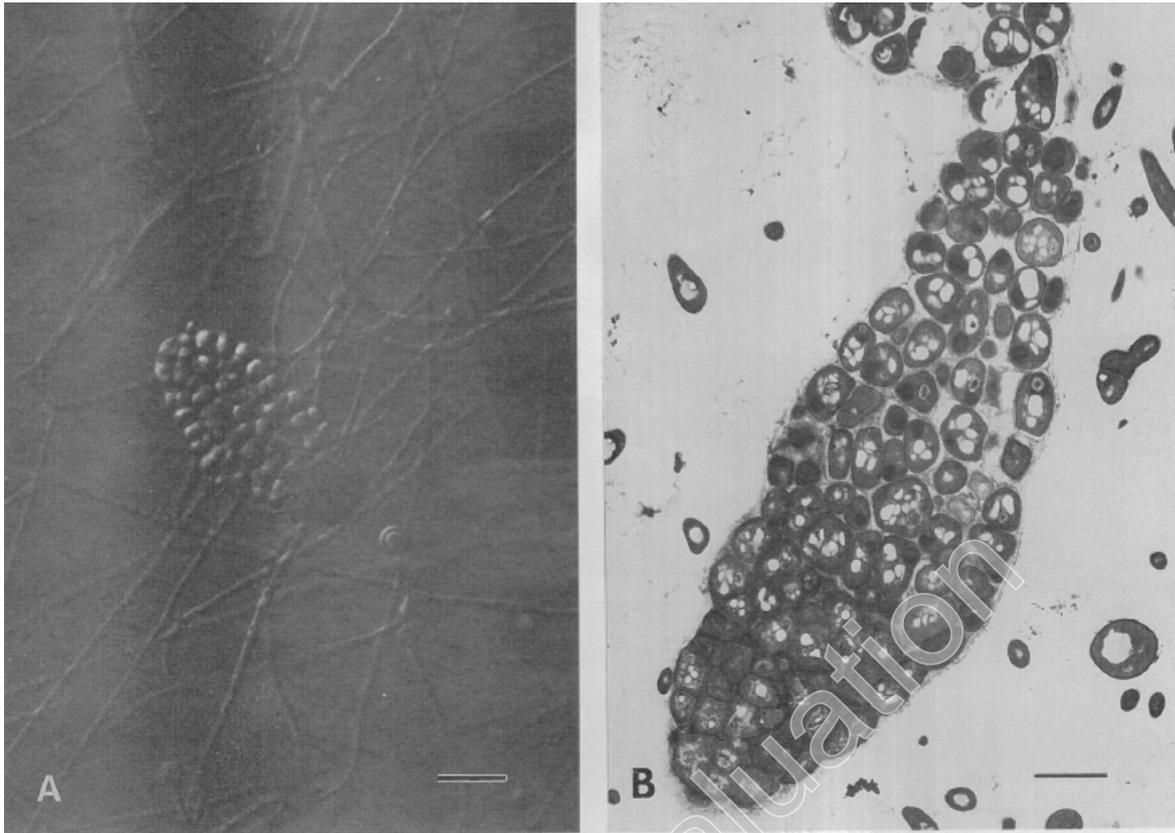


Figure 4. Photo micrographies Optique Nomarski (Benson et Silvester, 1993). (A) et Electronique à Transmission(B) de sporanges multiloculaire de la souche *Frankia*CcI3 de *Casuarina* (panneau A) et une souche non répertoriée de *C.equisetifolia* (panneau B). Dans les deux cas, les spores plus matures sont les spores en haut et les moins matures sont en bas. Echelles, 5 μ m (A) et 2 μ m (B).

Les sporanges sont des agglomérats de cellules de résistance, à position terminale ou intercalaire aux hyphes. Ils libèrent des spores immobiles à différents stades de maturité et à faible taux de germination. Les sporanges des *Frankia* sont dits multiloculaires, la compartimentation se faisant sur des plans différents (Nouioui, 2014). Les vésicules sont formées à l'intérieur des cellules végétales ou des nodules en culture dans des conditions de limitation d'azote et agissent comme des structures spécialisées pour les processus de fixation d'azote (Udwary et al., 2011). Les vésicules sont entourées par une enveloppe stratifiée composée de lipides hopanoïde qui fournissent la protection du complexe nitrogénase contre une inactivation par l'oxygène (Santi et al., 2013). Cependant, les vésicules ne sont pas trouvées dans les nodules racinaires de *Casuarina* et *Allocausuarina* (Verghese et Misra, 2002).

Comme critères minimaux applicables pour inclure des souches dans le genre, il est généralement admis que la combinaison de la morphologie dans la culture et l'isolement d'un nodule de racine actinorhizienne est suffisante (Lechevalier et Lechevalier. 1990). Une haute teneur en G + C, le type de paroi cellulaire III, un modèle en phospholipides de PI, et, de plus en plus, les séquences d'ARNr sont tous des critères supplémentaires utilisés pour placer de nouvelles souches dans le genre *Frankia*. L'analyse des séquences de nucléotides et des acides aminés *nifH*, *nifD*, et d'autres gènes *nif* confirmait la similitude des nitrogénase de *Frankia* avec les systèmes classique des complexes protéiques MoFe (Benson et Silvester 1993).

II.2.4. Structure génomique de *Frankia*

L'ADN des souches de *Frankia* est caractérisé par un pourcentage en GC élevé, compris entre 66 et 75 % et la taille du génome varie de 8,7 à 12 x 10⁶ paires de bases (pb). Des plasmides, dont la taille est comprise entre 7 à 190 kilobases (kb) ont été mis en évidence (Hocher et al., 2009).

L'étude de la structure du genre *Frankia* se focalise sur deux régions du génome qui sont d'une importance significative: la région ribosomal et la région de codage de la nitrogénase (Nalin et al., 1995).

II.2.4.1. La région ribosomal

Les gènes *rrn* sont évolutif et hautement conservés, ceci est la principale raison pour laquelle ils ont été choisis pour l'étude phylogénétique. Les approches moléculaires sont généralement basées sur les séquences d'ADN ribosomique parce que les gènes *rrn* contiennent deux régions conservées et variables, qui peuvent être utilisée pour définir des amorces et comparer des souches, respectivement. Cependant, cela implique un problème pour les études écologiques où il est nécessaire de distinguer *Frankia* d'autres actinomycètes on retrouve souvent dans actinorhizes qui peuvent être très étroitement liés et partager des séquences de gènes *rrn* avec *Frankia* (Nalin et al., 1995).

II.2.4.2. La région de codage de la nitrogénase

La nitrogénase, qui catalyse la réduction de diazote à l'ammoniac, est codée par les gènes de l'opéron *nifHDK* et universellement trouvé chez les diazotrophes (Valdés et al., 2004).

La structure des gènes qui codent pour la protéine Fe, et la protéine MOFE de la nitrogénase sont respectivement *nifH*, *nifD* et *nifK*. Les résultats d'hybridation ont indiqué que l'opéron *nifHDK* dans certaines souches de *Frankia* est regroupé sur le chromosome, comme c'est le cas chez la plupart des bactéries fixatrices d'azote (Benson et Silvester, 1993).

Ces séquences présentent deux régions conservées et variables et ont déjà été utilisés pour la détection spécifique par PCR des souches de *Frankia* (Nalin et al., 1995).

Parmi les gènes impliqués dans la symbiose, on peut citer les gènes codant la nitrogénase (*nif*), l'hydrogénase d'absorption (*hup*) et le squalène hopane cyclase (*SHC*) (biosynthèse de bactériohopane) (Santi et al., 2013).

Normand et al., (2007) ont séquencé les trois premiers génomes de *Frankia*. CcI3, ACN14a, et EAN1pec, respectivement symbiotes de *C. cunninghamiana*, *A. glutinosae* et *E. angustifolia*. La taille du génome circulaire de trois souches de *Frankia* varie de 9.0Mb pour EAN1pec à 7.50Mb pour ACN14a et à 5.43 Mb pour CcI3.

Il convient également de souligner que les tailles des génomes *Frankia* montrent une très grande variation (Sellstedt et Richau, 2013).

II.2.5. Caractéristiques de la souche CcI3

Au cours des dernières années, plusieurs génomes de *Frankia* ont été séquencés, y compris le génome de la souche CcI3, qui a été isolée à partir de nodules prélevés sur *Casuarina cunninghamiana*, et peuvent noduler *C. glauca*. Le génome est circulaire et ne contient pas de plasmides se répliquant. Comme d'autres souches de *Frankia*, CcI3 est caractérisé par une forte teneur en G + C (70,07%), mais une caractéristique frappante est qu'elle possède l'un des plus petits génomes de *Frankia* avec 5,43 Mbp et 4499 gènes codant pour des protéines (Zhong et al., 2013). Le génome de *Frankia* CcI3 représente une étroite gamme d'hôtes symbiote (Beauchemin et al., 2011) d'où notre choix de ce *Frankia* comme témoin positif de cette étude.

Tableau. 2 : Les souches de *Frankia* dont le génome a été séquencé (Tisa et al., 2013).

<i>Frankia</i>	Gr	Taille du génome (Pb)	% GC	Gènes	Opérons ribosomiques	Gène d'ARNt	Numéro d'accèsionNCBI	Références
ACN14a	1	7497934	72.83	6795	6	46	CT573213	Normand et al, 2007
CcI3	1	5433628	70.08	4621	6	46	CP000249.1	Normand et al, 2007
QA3	1	7590853	72.59	6546	4	46	CM001489.1	Sen et al, 2013
Dg1	2	5323336	70.04	4579	6	44	CP002801	Persson et al, 2011
EAN1pec	3	8982042	71.15	7250	9	47	CP000820.9	Normand et al, 2007
EUN1f	3	9322173	70.82	7833	9	47	NC014666	Beauchemin et al, 2012
BMG5.12	3	7589313	71.67	6342	5	51	ARFH0100000	Nouioui et al, 2013
BCU110501	3	7891711	72.39	6839	8	47	ARRDT0100000	Wall et al, 2013
EuI1c	4	8815781	72.31	7262	9	46	CP002299.1	Beauchemin et al, 2012
CN3	4	9978592	71.72	8412	5	68	AGJN0100000	Ghodhbane Gtari et al, 2013

III. Comparaison de quelques aspects caractérisant la symbiose actinorhizienne et la symbiose chez les légumineuses

La plupart des plantes actinorhiziennes sont capables de fixer l'azote à des taux élevés comparables à ceux trouvés dans les légumineuses (Franche et *al.*, 2011), qui sont les deux principaux groupes de plantes vasculaires qui forment des symbioses avec des bactéries fixatrices d'azote (Andrews et *al.*, 2011).

Les symbioses entre *Rhizobium*-légumineuses et les *Frankia*-actinorhizienne sont frappantes. *Rhizobium* est une bactérie gram-négative, qui vit seul et infecte seulement les légumineuses, Tandis *Frankia* est Gram-positif et filamenteuse, et peut noduler une gamme variée de genres actinorhiziens. Les deux bactéries *Rhizobium* et *Frankia* produisent des nodules racinaires dans lequel le diazote est converti en ammoniac (Verghese et Misra, 2002). Les nodosités induites par les *Frankia* sur les plantes actinorhiziennes sont essentiellement localisées sur les racines. Mais à la différence des légumineuses, ces nodosités sont toujours des racines déformées, constituées de lobes renfermant un faisceau vasculaire central entouré d'une zone corticale de cellules infectées (Franche et *al.*, 2009).

Tableau.3 : Comparaison des principales caractéristiques des symbioses actinorhiziennes et des symbioses rhizobiennes (Hoher et *al.*, 2009).

Caractéristiques		Plantes actinorhiziennes	Plantes Légumineuses
Plante-hôte		Huit familles principalement ligneuses	Une superfamille
Microsymbiote		<i>Frankia</i> , Gram +	<i>Rhizobium</i> , Gram –
Infection	Nature	Poil racinaire ou intercellulaire	Poil racinaire ou intercellulaire
	Signaux émis par le microsymbiote nodule	Inconnus	lipochito-oligosaccharides (LCO)
	Types	Avec racine nodulaire Sans racine nodulaire	Nodule indéterminé allongé (NI) Nodule déterminé sphérique (ND)
	Morphologie	Multilobé Groupe de racines adventives	Unilobé en général Excroissance du cortex de la racine
	Anatomie	Système vasculaire central Cellules corticales infectées	Vascularisation périphérique dans le cortex Zone centrale infectée
	Origine	Péricycle	Cortex interne (NI) Cortex externe (ND)

IV. Établissement de la symbiose actinorhizienne

IV.1. Le processus d'infection

Contrairement au processus de nodulation chez *Rhizobium*, qui est très bien caractérisé, plusieurs aspects au sujet du processus chez *Frankia* sont encore à explorer.

Deux voies d'infection de la racine ont été décrites dans les interactions *Frankia*- plante hôte: la voie de pénétration intracellulaire ou infection des poils absorbants, et la voie intercellulaire ou la pénétration entre les racines (Santi et al., 2013). Le type d'infection dépend de la plante hôte, une même souche de *Frankia* pouvant, selon l'espèce végétale, induire l'organogenèse nodulaire par un processus d'infection intra- ou intercellulaire (Berry et Sunnel, 1990).

IV.1.1. Infection intercellulaire

Chez *Eleagnus*, *Hippophae*, *Shepherdia*, *Ceanothus*, *Discaria* et *Cercocarpus* l'infection est de type intercellulaire (Svistoonoff, 2003).

Ce mode d'infection débute par la pénétration de *Frankia* à travers la lamelle moyenne entre deux cellules du rhizoderme de la racine et les hyphes progressent de façon intercellulaire dans l'apoplaste. Aucune déformation, ni ramification des poils racinaires, ni même formation de prénodule, n'est associée à ce type d'infection. Comme pour l'infection intracellulaire, des divisions sont induites au niveau du péricycle et donnent naissance à un primordium nodulaire. Les hyphes deviennent intracellulaires en pénétrant, après encapsulation, dans les cellules (Benabdoun, 2012).

IV.1.2. Infection intracellulaire

L'infection de type intracellulaire est caractéristique des genres *Myrica*, *Comptonia*, *Alnus*, *Casuarina* et *Allocasuarina* (Svistoonoff, 2003).

Lors d'une infection intracellulaire, les signaux de *Frankia* conduisent à la déformation racinaire, dont certains sont infectés. Dans le même temps, des divisions cellulaires spécifiques sont déclenchées dans le cortex, c'est la création d'un prénodule, sa fonction n'est pas connue, mais c'est une étape obligatoire de l'infection intracellulaire (Péret et al., 2007).

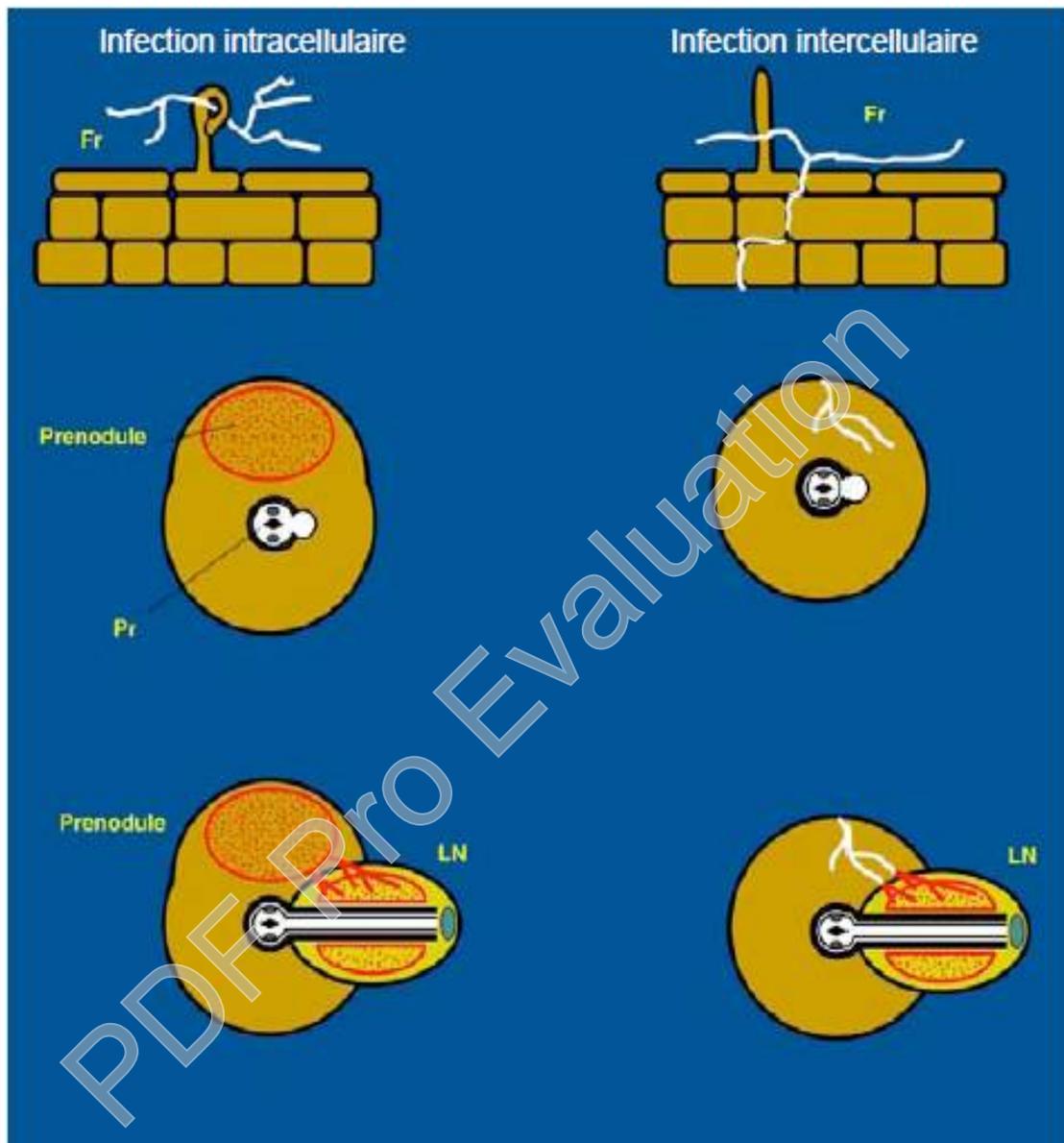


Figure 5. Représentation schématique des deux modes d'infection des plantes actinorhiziennes par *Frankia* (Franche et *al.*, 1998).

Fr : hyphes de *Frankia*, Pr : protoxylème, LN : lobe nodulaire.

IV.2.Morphologie et développement du nodule

La formation de l'actinorhizes est considérée comme le résultat d'un processus de différenciation cellulaire médiée par l'échange de signaux moléculaires, qui impliquent l'expression de gènes spécifiques dans les deux *Frankia* et la plante hôte (Echbab et al., 2007), ce nodule est formée sur le système racinaire de la plante (Hocher et al., 2009).

Les nodules actinorhiziens sont formés de plusieurs lobes qui apparaissent successivement à la base du premier lobe et se ramifient en formant une structure coralloïde. Leur nombre varie selon les espèces (Svistoonoff, 2003). Ils sont considérés comme des racines latérales modifiées parce qu'ils proviennent de divisions dans le péricycle en face d'un pôle de xylème; ils ont une structure latérale de la racine comme avec un système vasculaire central, les cellules infectées dans le cortex, et un méristème apical; et dans certaines espèces (par exemple *Casuarina sp.*) un soit-disant nodule de racine est produit à l'apex (Péret et al., 2007).

Le développement du primordium infecté donne naissance au lobe nodulaire qui se présente comme une structure oblongue avec un méristème apical, un cylindre central vascularisé non-infecté, et un cortex organisé en quatre zones qui correspondent aux différents stades du processus d'infection (Franche et al., 1998).

- La zone I correspond à la zone méristématique apicale et les cellules non-infectées et peu différenciées issues de ce méristème.
- La zone II adjacente au méristème apical est la zone d'infection dans laquelle des hyphes de *Frankia* infectent les cellules corticales nouvellement formées. À ce stade, les diazovésicules ne sont pas encore différenciées, ce qui indique que les bactéries ne fixent pas encore l'azote.
- La zone III appelée zone de fixation, est constituée de cellules non-infectées (riches en polyphénols chez certaines espèces comme *C. glauca*) et de cellules infectées hypertrophiées dans lesquelles *Frankia* fixe activement l'azote. Ces cellules sont caractérisées par une autofluorescence des parois (comme chez les *Casuarinacées*) en raison d'un dépôt de lignine et par la relocalisation des organites (réticulum endoplasmique, vacuoles et polyribosomes) en périphérie de la cellule, suite au développement des filaments de *Frankia*. Cette zone de fixation est caractérisée par une forte activité mitochondriale.
- La zone IV ou zone de sénescence chez les nodules âgés, dans laquelle les cellules végétales et bactériennes dégèrent et la fixation d'azote cesse. *Frankia* produit des sporanges à ce stade (Svistoonoff, 2003).

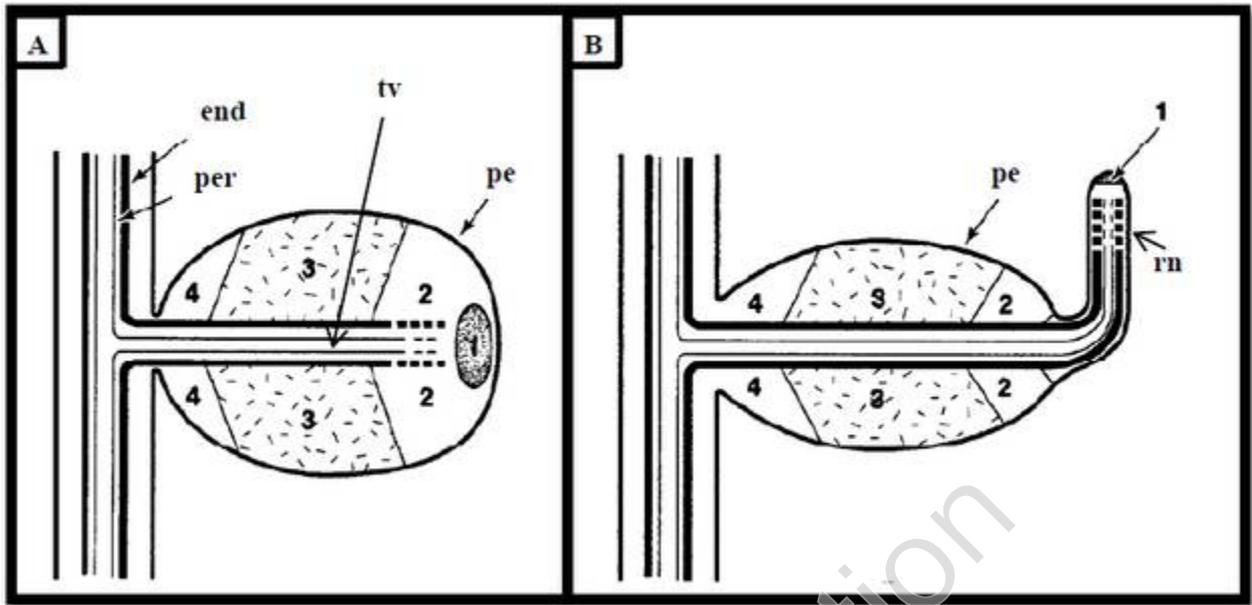


Figure 6. Coupe longitudinale d'un lobe nodulaire actinorhizien (Franche *et al.*, 1998).
A : Nodule dépourvu de racine nodulaire (*Alnus* sp.) ; **B :** Nodule avec racine nodulaire (*Casuarina* sp.). (end) : endoderme ; (pe) : périderme ; (per) : péricycle ; (rn) : racine nodulaire ; (tv) : tissu vasculaire central ; (1) : Zone méristématique ; (2) : Zone d'infection ; (3) : Zone de fixation ; (4) : Zone de sénescence.

Contrairement aux légumineuses qui constituent une seule famille, les plantes actinorhiziennes ont une large répartition taxonomique ; une seconde originalité réside dans la structure du nodule actinorhizien (ou actinorhize) qui s'apparente à celle d'une racine adventive induite en réponse aux signaux émis par le microorganisme *Frankia*.

Le nodule actinorhizien a en effet pour origine les cellules du péricycle de la racine et possède une vascularisation centrale. Ces nodules fixateurs d'azote constituent donc un modèle alternatif original, considéré comme moins complexe que les nodules des légumineuses (Pawlowski et Bisseling, 1996 ; Duhoux *et al.*, 1996)

IV.3. Valeur et intérêt de la symbiose actinorhizienne

C'est grâce à la fixation biologique de l'azote atmosphérique établie par l'actinobactérie *Frankia* que les plantes actinorhiziennes ont un avantage sélectif substantiel manifesté par leur aptitude à se développer sur des sols pauvres en azote et dégradés à l'extrême. Les plantes actinorhiziennes sont des espèces pionnières par excellence qui aménagent la succession d'autres communautés végétales et participent à la réhabilitation et la régénération des sols marginaux. Selon les données paléontologiques, ces plantes sont des colonisateurs

primaires communs aux sites endommagés par les catastrophes naturelles, telles que les glissements des terrains, éruptions volcaniques, les brûlis et l'érosion (Nouioui, 2014).

Le premier avantage que *Frankia* retire de la symbiose est une protection physique. Puisque la bactérie est à l'abri dans les cellules corticales du nodule, elle est davantage épargnée par les fluctuations des conditions environnementales, par exemple une période de sécheresse ou un excès d'humidité. De plus, dans le nodule, *Frankia* est protégée des microorganismes compétiteurs et, bien qu'elle y soit assez résistante, des antibiotiques qu'ils peuvent sécréter (Normand et al., 2006). L'hôte offre également une barrière supplémentaire face à l'oxygène, qui peut dénaturer la nitrogénase (Huss-Danell, 1997). L'approvisionnement en composés carbonés et en énergie pour soutenir la fixation d'azote constitue cependant la plus grande contribution de la plante envers *Frankia* (Valverde et Huss-Danell, 2008).

Les plantes actinorhiziennes constituent, après les légumineuses, le deuxième groupe de plantes capables de fixer biologiquement l'azote atmosphérique (Santi et al., 2001).

V. Les milieux de culture

Un milieu de culture est une préparation au sein de laquelle des micro-organismes peuvent se multiplier. Il doit donc satisfaire les exigences nutritives du micro-organisme étudié. Ce qui implique : couvrir les besoins en ions minéraux, en facteurs de croissance, apporter la source de carbone et d'énergie; présenter un pH voisin du pH optimal; et présenter une force ionique optimale (le milieu peut être isotonique mais ce n'est pas obligatoire).

Il existe une grande variété de milieux de culture en rapport avec la diversité des exigences nutritives des micro-organismes. On distingue généralement :

- **Les milieux synthétiques** : de composition exactement connue, qualitativement et quantitativement. Ces milieux sont surtout utilisés pour l'étude des bactéries autotrophes ou pour étudier les besoins nutritifs d'un germe. Ils sont rarement utilisés en routine à l'exception de quelques uns : Citrate de Simons, Citrate de Christensen, Urée-Tryptophane...
- **Les milieux empiriques** : de composition connue seulement avec approximation car dépendant des matières premières utilisées : extrait de viande ou de levure, peptones, sucres et éventuellement liquides biologiques (sérum, sang...) mais qui conviennent

aux micro-organismes étudiés. Ce sont les milieux les plus employés aujourd'hui. Exemple : LB, Columbia, Gassner, Trypticase soja, Chocolat, ...

Une autre distinction de milieu se fait par la consistance de ceux-ci. En effet, les micro-organismes se développent parfaitement dans les milieux liquides mais l'isolement bactérien nécessite des milieux solides afin de séparer les différents germes présents dans un prélèvement. On obtient les milieux solides en ajoutant un agent gélifiant à un milieu liquide. Le gélifiant le plus utilisé est l'agar-agar ou gélose, il s'agit d'un polygalactoside sulfaté présentant la propriété de former avec l'eau un gel solide à une température inférieure à environ 60 °C tout en étant liquéfiable par ébullition, auquel cas, il reste en surfusion (liquide) jusqu'aux environs de 45°C. D'autre part, très peu de micro-organismes sont capables d'hydrolyser l'agar. Il s'agit donc du procédé le plus utilisé pour fabriquer des milieux solides, l'addition de diverses autres molécules ne posant aucun problème particulier dans ce milieu aqueux. Les milieux solides destinés à être coulés en boîte de Pétri ou en tube ont une teneur en gélose assez élevée (15 g.L⁻¹) tandis que les géloses molles ou semi-solides sont peu gélosées (3 à 5 g.L⁻¹) et présentent une consistance intermédiaire.

V.1. Description de quelques milieux de culture

V.1.1. Les milieux non sélectifs

On regroupe sous ce vocable tous les milieux ne contenant aucune molécule inhibitrice. Ils sont en général de préparation assez simple et généralement peu coûteux. Ces milieux contiennent une base nutritive constituée de molécules azotées (acides aminés, facteurs de croissance diverses...) provenant de l'hydrolyse de produit d'origine vivante (animale, végétale, mycélienne) comme les peptones, les extraits de viande ou de levure.

Souvent, les milieux non sélectifs comportent une molécule et son système de révélation (sucre le plus souvent) ce qui permet une première discrimination des genres mais ce n'est pas obligatoire.

Exemple : *La gélose Mueller-Hinton*

Infusion de viande de bœuf	300 ml.L ⁻¹
Peptone de caséine	17.5 g.L ⁻¹
Amidon de maïs	1.5 g.L ⁻¹
Agar	17 g.L ⁻¹

V.1.2. Les milieux non sélectifs enrichis

Ils sont obtenus en incorporant à un milieu de base adéquat des liquides ou suspensions riches en molécules organiques diverses : du sang, du sérum, du liquide d'ascite, de l'extrait globulaire, des suppléments polyvitaminiques... Les qualités nutritives peuvent être améliorées par dénaturation thermique des constituants, en particulier pour le sang. Ils permettent la pousse de nombreux germes exigeants ou très exigeants. Les plus utilisées sont les géloses au sang frais ou au sang cuit, et la gélose chocolat.

V.1.3. Les milieux sélectifs

Les milieux sélectifs sont des milieux empêchant la culture de certains micro-organismes. Ils sont utilisés pour l'isolement bactérien dans des produits polymicrobiens. La sélection peut être chimique ou antibiotique. Ce sont des milieux riches ou non et donnant souvent un ou plusieurs caractères biochimiques d'orientations permettant une identification plus simple des germes.

Exemple : *La gélose Gassner*

La gélose de Gassner est une gélose sélective des germes Gram négatifs non exigeants (*Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Pseudomonaceae*, *Alcaligenaceae*) Son activité sélective est due au Jaune métachrome. Par ailleurs, il contient du lactose et du Bleu à l'eau (indicateur pH) qui permettent de différencier les germes LACTOSE + (bleu) des germes LACTOSE – (jaune).

Il existe de nombreux milieux ayant le même pouvoir sélectif que la Gélose de Gassner. Certain utilise les même indicateurs d'autre non. On peut citer la gélose rouge neutre/vert brillant, la gélose MacConkey, le milieu de Lévineect....

V.1.4. Les milieux d'enrichissement

La présence de certaines bactéries à pouvoir pathogène spécifique dans un prélèvement, a une signification pathologique indiscutable, même si elles sont peu représentées. C'est le cas par exemple des *Salmonella*, des biotypes entéropathogènes, de *Yersinia enterocolitica*, des vibrions cholériques ou encore des *Listeria* ou des *Enterocoques*. Quelques fois, leur proportion peut être minime par rapport à celle de la flore commensale et leur présence ne

peut être révélée par un isolement sélectif. L'absence de colonies suspectes sur l'isolement sélectif ne suffit pas pour affirmer l'absence de ces bactéries dans le prélèvement. C'est pourquoi un enrichissement est mis en route en même temps que l'isolement sélectif. Enrichir, c'est augmenter la représentation (proportion) d'un sous-groupe de micro-organismes dans un ensemble plus vaste.

Un milieu d'enrichissement réunit deux caractéristiques :

Il contient des molécules à action sélective inhibant totalement ou partiellement la culture des micro-organismes non recherchés ou utilise une température d'incubation particulière, ou encore une atmosphère particulière.

Il est liquide (bouillon) afin que son action sélective s'exerce sur une population importante et homogène.

V.2. Croissance et développement des actinomycètes

Il s'est écoulé plus d'un siècle entre l'observation de l'endophyte dans les nodules des plantes actinorhizienne et l'isolement de l'endophyte lui-même. Ce délai très long est attribué plus à la lenteur de la croissance de *Frankia* (temps de doublement de l'ordre de 14-15h) qu'à des exigences nutritionnelles spécifiques. Certains chercheurs ont réussi à isoler *Frankia* en utilisant des milieux complexes alors que d'autres ont obtenu le même résultat simplement en déposant un fragment de nodule (soigneusement stérilisé superficiellement) sur un milieu relativement simple. Pour obtenir une croissance uniforme et des cultures stables, les isolats obtenus devaient être repiqués plusieurs fois à des intervalles de 3 semaines.

Toutes les souches de *Frankia* poussent lentement d'après Benson (1988), le temps de génération est de 18h à 24h ou plus. Mais Schwencke (1991) a montré que ce temps n'excédait pas 16h si le milieu utilisé contenait de la phosphatidylcholine et était modérément agité et correctement tamponné. Les sources de carbone préférées sont constituées par les acides gras à chaîne courte comme l'acétate ou le propionate. On utilise fréquemment des milieux contenant du propionate pour isoler les *Frankia*, pour la conservation des souches et pour la culture de routine. Le propionate peut pratiquement être considéré comme une source universelle de carbone puisque virtuellement toutes les souches poussent sur les milieux avec propionate (Benson et Schultz, 1990).

Chapitre II :

Matériels et Méthodes

PDF Pro Evaluation

I. Matériels

I.1. Matériel bactérien

Frankia est une bactérie actinomycètes filamenteuse Gram positif, capable de fixer l'azote à l'état libre. En culture pure, l'actinomycète différencie des hyphes qui sont la forme végétative, et dans un milieu sans azote, des vésicules généralement sphériques sont observées en position terminale des hyphes. Ces cellules possèdent une enveloppe lipidique composée de multiples couches d'hopanoïdes qui assurent une protection du complexe nitrogénase contre une inactivation par l'oxygène, permettant ainsi la fixation de l'azote. La souche de *Frankia* Ccl3 isolée de nodules de *C. cunninghamiana*. Leur génome est circulaire, de petite taille (5,43 Mb), qu'il contient 4 499 séquences codantes et possède un GC% égal à 71%. Cette souche possède une spécificité d'hôte étroite, restreinte à quelques espèces du genre *Casuarina* (Benabdoun et al., 2012).

Dans ce travail on a essayé d'isoler des souches de *Frankia* à partir des nodules de *Casuarina equisetifolia* dans le but d'identifier de nouvelles souches et de les caractériser par une amplification de certaines parties du génome, plus ou moins conservées, à partir des extraits ADNg.

I.2. Matériel végétal

Les *Casuarinacées* sont des espèces de plantes actinorhiziennes qui provenaient d'Australie. Ces arbres sont largement établis dans le monde entier à l'exception de l'Antarctique. La famille comprend quatre genres (*Allocasuarina*, *Casuarina*, *Ceuthostoma* et *Gymnostoma*) et environ 86 espèces et sous-espèces. *Casuarina equisetifolia* est l'espèce la plus connue et la plus répandue (Diagne et al., 2013b).

Le genre *Casuarina* est de loin le plus largement utilisé comme stabilisateur de brise-vent et du sol, en particulier avec les espèces *C. equisetifolia*, *Casuarina glauca* et *Casuarina cunninghamiana* (Echbab et al., 2007) d'où l'intérêt qu'on porte pour *C. equisetifolia* dans ce genre d'études. Dans ce travail on a visé la prospection à la recherche de nodules chez des arbres plantés dans des régions à caractère dégradé où la symbiose actinorhizienne est susceptible d'exister à cause de la déficience du sol en azote.

II. Méthodes

II.1. Prospection et échantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé dans la rhizosphère de *Casuarina equisetifolia* à la recherche de nodules actinorhiziens. On a effectué une prospection sur quatre sites, le premier au campus universitaire des Frères Mentouri Constantine à côté du laboratoire de GBBV, le deuxième à Djebel el Ouahche, le troisième à Ain smara et le quatrième à El Khroub dans la commune de Constantine Wilaya de Constantine.

En l'absence de nodules sur ces sites, on a prélevé quelque gramme de sol dans la rhizosphère de l'arbre après avoir écarté les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol, et creuser à une profondeur de 30 cm, sachant que les actinomycètes vivent généralement dans la couche superficielle de la terre.

Tableau 4 : Localisation des sites d'échantillonnages pour l'isolement à la recherche de *Frankia*

Isolats	Wilaya	Origine	Latitude	Longitude	Altitude (m)
13Auto	Tlemcen	Sol	35° 0'35.29"N	1° 9'44.63"O	575
16	Alger	Sol	36°41'11.55"N	3° 4'28.60"E	23
BBA	Borj Bouaririj	Sol	36° 5'24.08"N	5° 4'33.95"E	962
BP	Constantine	Sol	36°20'23.37"N	6°37'22.20"E	593
CH	Constantine	Sol	36°17'43.07"N	6°31'54.11"E	587
CREPS	Constantine	Nodule	36°20'52.26"N	6°37'39.91"E	535
KHB	Constantine	Sol	36°17'42.99"N	6°42'10.55"E	616
LB	Constantine	Sol	36°20'30.84"N	6°37'29.65"E	565
MV	M'sila	Sol	35°43'1.97"N	4°32'17.74"E	484
ORF2	Skikda	Sol	36°38'3.54"N	6°43'51.01"E	240
RI	Constantine	Nodule	36°26'2.38"N	6°36'53.29"E	507
SAA	Jijel	Nodule	36°50'47.89"N	6° 6'35.01"E	6
SLH	Constantine	Sol	36°23'27.91"N	6°38'27.70"E	842
SM	M'sila	Sol	35°44'58.00"N	4°33'6.55"E	505
TMNRT	Skikda	Sol	37° 3'32.82"N	6°30'49.15"E	21
ZRLD	Alger	Nodule	/	/	/

Dans ce travail, nous avons utilisé dix autres souches qui ont été isolées par Mr. HAOUAM Seif-Eddine dans le cadre de la préparation de sa thèse de Doctorat. Ces isolats sont issus de différent endroit du Nord Algérien (Tableau 4).

II.2. Isolement des actinomycètes à partir du sol

On a réalisé l'isolement bactérien selon la méthode de dilution en série décrite par Diem et *al.*, 1982 (Annexe 2). Dans cette méthode d'isolement on a dilué 1g de sol dans une solution saline stérile et on dilue au dixième successivement à chaque fois. 100 µl de chaque dilution est étalé sur une boîte de Pétri contenant du milieu DPM N-Free gélosé décrit par Baker et O'keef, 1984. Aussi, 100µl sont déposés dans des tubes à essais stériles contenant du milieu DPM N-Free liquide (Annexe 3). Les tubes à essai et les boîtes de Pétri sont incubés à l'obscurité à 28°C (Figure 6).

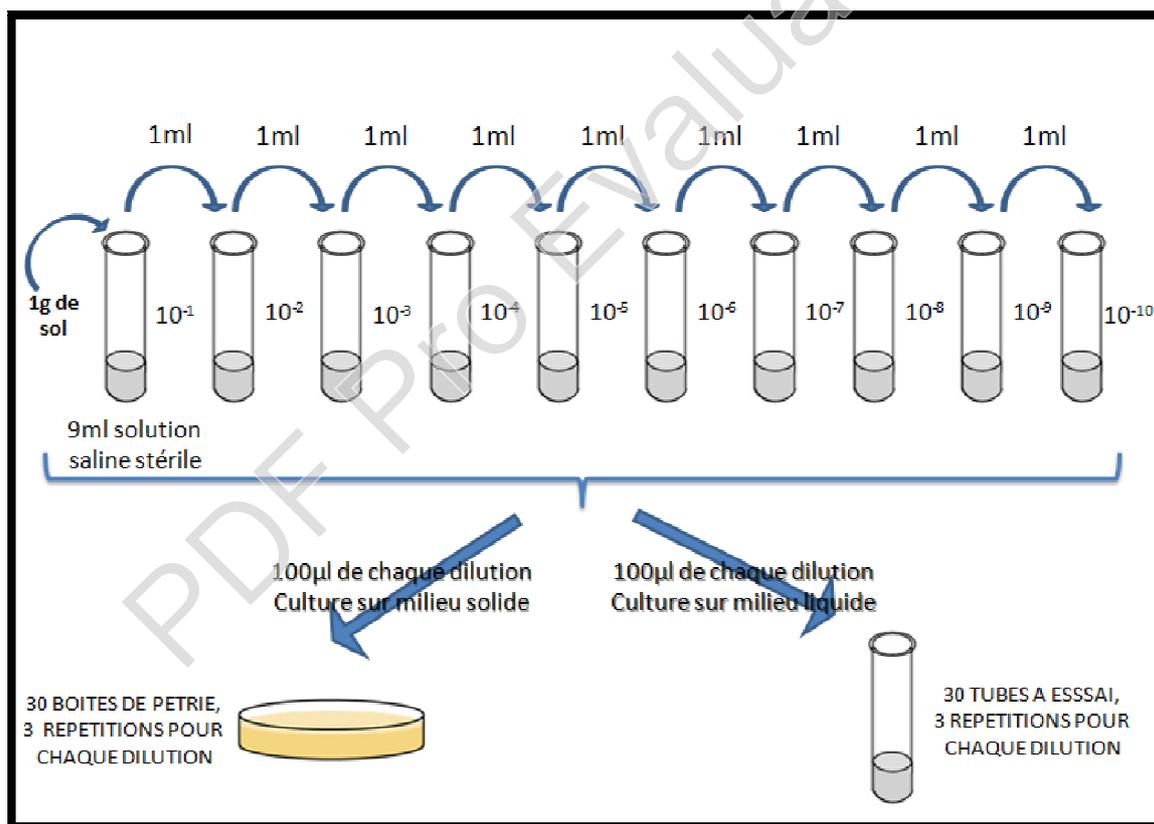


Figure 7. Schéma représentatif de la technique de dilution en série utilisée lors de l'isolement à partir du sol.

Cette technique consiste à isoler des actinobactéries fixatrices d'azote du genre *Frankia* dans un milieu N-déficient (DPM N-Free) en les discriminant des autres microorganismes non

fixateurs d'azote à l'état libre. Une dilution au dixième réduit la concentration d'une solution par un facteur de dix qui est à un dixième de la concentration originale. Une série de dilutions décimales est décrit comme dix dilutions successives.

II.3. Isolement des actinomycètes à partir de nodule

Les nodules prélevés ont été isolé selon la méthode décrite par Diem et *al.*, 1982 (Annexe 1) Dans cette méthode d'isolement on a disséqué les nodules prélevés sur Casuarina en lobes, puis on les a stérilisé et lavé dans de l'eau oxygéné et l'eau distillée stérile. Qui sont ensuite transféré dans des tubes Falcons de 50 ml contenant du milieu DPM N-Free liquide décrit par Baker et O'keef, 1984, et on a étalé 100 μ l sur des boites de Pétri contenant du milieu DPM N-Free gélosé. Les tubes Falcons et les boites de Pétri sont ensuite incubé à l'obscurité à 28°C.

II.4. Mise en culture des isolats obtenus

Les isolats obtenus ont été cultivée et entretenue par une série des repiquages hebdomadaires sur du milieu liquide BAP décrit par Fontaine 1986, en augmentant le volume de culture à chaque fois 50, 100, 250 puis 500 ml (Annexe 4). En cassant les hyphes à chaque repiquage avec une seringue stériles (Annexe 5). Les cultures sont mises sous agitation douce à l'obscurité à 28°C à fin d'avoir une quantité de culture importante pour l'extraction d'ADN.

II.5. Extraction d'ADN génomique à partir des souches des isolats

On a réalisé l'extraction de l'ADN génomique des isolats à partir de 500 ml de culture cultivées dans du milieu liquide BAP, qu'on a récupéré pour la suite dans plusieurs tube Falcon de 50 ml pour centrifuger 15 min à pleine vitesse (4000 rpm). Après la formation du culot de cellules bactériennes, le surnageant est éliminé et le culot de cellules est broyé dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon stériles (Annexe 6). On a utilisé par la suite fait Le Kit d'extraction d'ADN génomique « Promega, Wizard® Genomic DNA Purification Kit ».

Plusieurs méthodes d'extraction d'ADN ont été utilisées incluant différentes solution d'élution (certains avec H₂O milliQ stérile, d'autres avec de la solution d'élution du kit fourni) pour voir la différence de la pureté de l'ADNg extrait et déterminer la meilleur technique.

II.5. Dosage d'ADNg

Pour voir la pureté des ADNg extraits, sa qualité et sa quantité a été mesurée avec un Nanodrop spectrophotomètre. Les résultats obtenus sont noté dans les Tableaux 6.

II.5. Amplification par polymérisation en chaîne (PCR)

L'amplification par polymérisation en chaîne (PCR) a été réalisée pour deux régions d'ADN comme décrit dans l'article de Rouvier et *al.*, 1996. La première région comprenant l'extrémité 3' du gène *nifD*, l'IGS, et l'extrémité 5' du gène *nifK* (la région *nifD-K*). La deuxième comprenant l'extrémité 3' de l'ADNr 16S, l'IGS, et l'extrémité 5' de l'ADNr 23S (la région *rrn*). Cette amplification a été réalisée avec deux couple d'amorces FGPD807 (5'-CACTGCTACCGGTCGATGAA-3') FGPK7009 (5'-CGAGGTAGGTCTCGAAACCGG-3') Pour la région *nif*, et FGPS989ac (5'-GGGGTCCGTAAGGGTC-3') FGPL1329 (5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3') pour la région *rrn* les fragments attendus sont de environ de 1 kb pour la région IGS et 1,400 bp pour la région *nif*.

Les réactions d'amplification par PCR ont été réalisées dans un volume réactionnel de 50 µL à l'aide d'une ADN polymérase thermorésistante, et le programme utilisé suit le déroulement suivant : une première étape de dénaturation pendant 3 min à 95°C, puis 35 cycles comprenant : 1min à 95°C, 1min à 50°C pour l'amplification *rrn*, et 1min à 53°C pour l'amplification *nifD-K*, 2min à 72°C, et une dernière réaction d'élongation à 72°C pendant 3 min.

II.5. Electrophorèse

Les résultats des extractions d'ADN génomique des différents isolats et ceux de la PCR ont été visualisés par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% selon le principe de séparation de fragments d'ADN, chargées négativement avec différentes tailles, par migration sous l'effet d'un champ électrique. Deux marqueurs de tailles ont été utilisé pour réaliser ce travail : O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder et GeneRuler Express DNA Ladder (Annexe 7).

Chapitre III:

Résultats et Discussion

PDF Pro Evaluation

Pour atteindre notre objectif on a fait plusieurs échantillonnages sur différents types de sols dans le nord Algérien afin d'isoler de nouvelle souche de *Frankia* à partir du sol ou de nodule. Sur 16 isolats, quatre souches ont été isolées à partir de nodules formés sur *Casuarina equisetifolia* : CREPS, SAA, RI, ZRLD par Mr. HAOUAM Seif-Eddine. Les autres isolats ont été obtenus à partir du sol pris dans la rhizosphère de *C. equisetifolia*.

Après la mise en culture de ces isolats, on a pu faire l'extraction qu'à partir de dix isolats. Les six autres isolats restant, ont été perdus à cause de contaminations par d'autres microorganismes. L'une des caractéristique de la culture liquide en milieu BAP est que le surnageant reste très claire et la culture décante en bas de la bouteille quand on arrête l'agitation. *Frankia* pousse lentement et les cultures se contaminent très facilement, c'est l'inconvénient que présente le milieu BAP qui est très riche par rapport au milieu DPM pauvre qui est utilisé pour l'isolement. Les isolats obtenus sont mentionnées dans le Tableau 5 ci-dessous :

Tableau 5 : Isolats obtenus et analysés dans cette étude.

Isolats	Wilaya	Origine
13Auto	Tlemcen	Sol
16*	Alger	Sol
BBA	BorjBouaririj	Sol
BP	Constantine	Sol
CH	Constantine	Sol
CREPS	Constantine	Nodule
KHB*	Constantine	Sol
LB	Constantine	Sol
MV	M'sila	Sol
ORF2*	Skikda	Sol
RI	Constantine	Nodule
SAA	Jijel	Nodule
SLH	Constantine	Sol
SM*	M'sila	Sol
TMNRT*	Skikda	Sol
ZRLD**	Alger	Nodule

* : Les cultures de ces isolats ont été perdues à cause des contaminations
 ** : L'isolement de cet isolat a eu lieu en fin de stage, la culture n'a pas assez poussé pour pouvoir extraire l'ADN

I. Résultats d'extraction d'ADNg

Après avoir fait l'extraction d'ADNg des isolats, on a quantifié les leurs ADNg avec le Nanodro prélevant les concentrations exactes. Les concentrations, ont par la suite étaient diluées à 100ng/μl pour tous les échantillons.

260/280 est le rapport de l'absorbance à 260 nm et 280 nm est utilisé pour évaluer la pureté de l'ADN et de l'ARN. Un rapport d'environ 1,8 est généralement accepté comme indicateur de pureté de l'ADN; un ratio de 2.0 est généralement accepté comme indicateur de pureté pour l'ARN. Si le rapport est sensiblement plus faible dans les deux cas, cela peut indiquer la présence de protéines, de phénol ou d'autres contaminants qui sont fortement absorbé à 280 nm.

260/230 : Ce rapport est utilisé comme une mesure de la pureté secondaire d'acide nucléique. Les valeurs pour un acide nucléique «pure» 260/230 sont souvent plus élevés que les valeurs respectives 260/280. Les valeurs attendus 260/230 sont couramment de l'ordre de 2,0-2,2. Si le rapport est sensiblement plus faible que prévu, cela peut indiquer la présence de contaminants qui absorbent à 230 nm.

Les concentrations après l'extraction d'ADNg de tous les isolats et du témoin CcI3 sont présentées dans les Tableaux 6.

Tableau 6.a: Les résultats des dosages de l'ADNg extraits de l'isolat RI au Nanodrop.

RI 1			RI 2			RI 3		
ng/μL	260/280	260/230	ng/μL	260/280	260/230	ng/μL	260/280	260/230
297.8	1.87	2.30	351.4	2.07	2.39	486.7	1.87	2.22

RI 4			RI 5			RI 6		
ng/μL	260/280	260/230	ng/μL	260/280	260/230	ng/μL	260/280	260/230
386.7	2.08	2.41	930.1	1.84	1.98	329.4	2.05	2.38

RI 7			RI 8			RI 9		
ng/μL	260/280	260/230	ng/μL	260/280	260/230	ng/μL	260/280	260/230
447	2.15	1.97	1843.2	2.13	2.08	166.4	2.08	1.62

D'après le tableau 6.a, les concentrations des différentes extractions de l'ADNg de l'isolat RI varient de 166,4 ng/μl pour RI9 à 1843,2 ng/μl pour RI8 avec une pureté plus ou moins bonne (RI3 et RI5). Cet isolat se distingue des autres par sa vitesse et sa facilité à croître en milieu liquide (même sans agitation). Ceci pourrait éventuellement expliquer les grandes concentrations enregistrées lors de la quantification de l'ADNg par Nanodrop.

On a vérifié la qualité d'ADNg par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1%

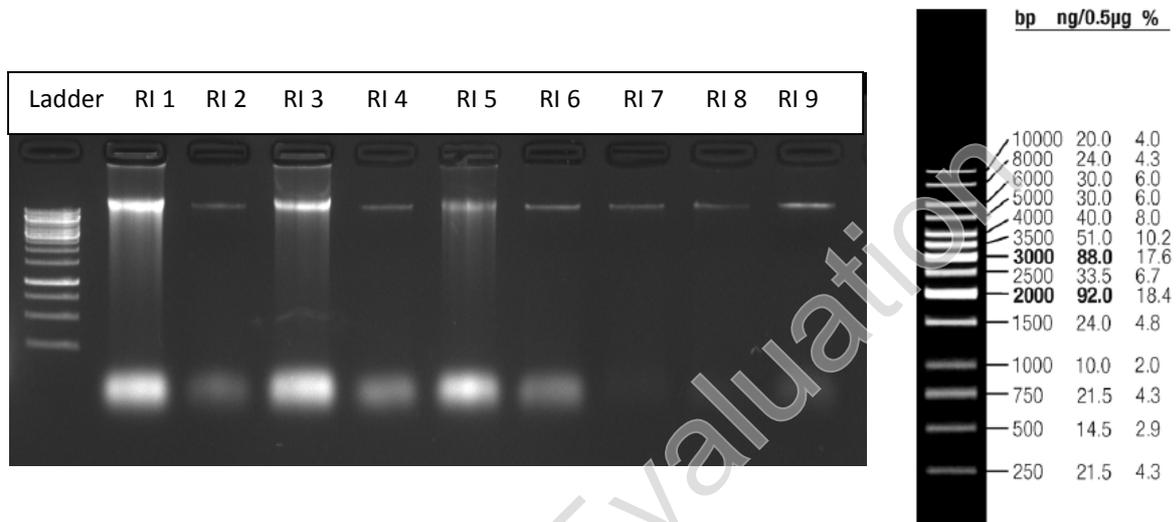


Figure 8. Profil électrophorétique démontrant la présence d'ADN génomique après extraction d'ADNg de l'isolat RI

D'après le gel (Figure 8), les extractions RI7 RI8 et RI9 sont les plus pures comparées au RI1, RI2, RI3 RI4, RI5 et RI6 qui présente une pureté moins importante par rapport aux 3 premiers. On remarque des smears sur le gel expliqué par un ADNg dégradé, et des fronts de migrations chez RI1, 2, 3, 4, 5 et 6 expliqués par la présence d'ARN dans le dépôt.

Ce profil électrophorétique va à l'encontre des observations relevées dans le tableau 6.a, surtout pour RI5 qui présentait les meilleurs ratios 260/280 : 1.84 et 260/230 : 1.98 et une bonne quantité d'ADNg extrait 930.1 ng/μL.

Tableau 6.b: Les résultats des dosages de l'ADNg extraits des isolats 13AUTO, CREPS et SAA et du témoin CcI3 au Nanodrop.

CcI3			13AUTO			CREPS 1		
ng/ μl	260/280	260/230	ng/ μl	260/280	260/230	ng/ μl	260/280	260/230
980.4	1.87	1.93	272.7	2.08	1.95	355.0	1.99	1.78

CREPS 2			CREPS 3			CREPS 4		
ng/ μ l	260/280	260/230	ng/ μ l	260/280	260/230	ng/ μ l	260/280	260/230
444.1	2.05	1.99	646.8	1.97	2.24	659.8	2.08	1.79

SAA 1			SAA 2			SAA 3		
ng/ μ l	260/280	260/230	ng/ μ l	260/280	260/230	ng/ μ l	260/280	260/230
1163.6	1.92	1.32	992.6	1.8	1.11	799.4	1.89	1.33

Selon le tableau 6.b, les concentrations des différentes extractions de l'ADNg des isolats 13AUTO, CREPS et SAA et du témoin CcI3, montre que les concentrations entre les différentes extractions de chaque isolat (CREPS et SAA) sont très proches.

SAA enregistre l'extraction la moins pure avec des ratios de 1,32, 1,11 et 1,33.

On a vérifié la qualité d'ADNg par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1%



Figure 9. Profil électrophorétique démontrant la présence d'ADN génomique après extraction d'ADNg des isolats, 13AUTO, SAA et CREPS et du témoin CcI3

D'après le gel (Figure 9), une quantité infime d'ADNg pour CcI3 et 13AUTO, complètement contradictoire avec les concentrations relevées par le Nanodrop (surtout pour CcI3 980.4ng/ μ l). SAA et CREPS présentent tous les deux une bonne quantité d'ADNg extrait, en terme de qualité ce sont des échantillons d'ADN purs.

Tableau 6.c: Les résultats des dosages de l'ADNg extraits de l'isolat MV et du témoin CcI3 au Nanodrop.

CcI3 1			CcI3 2			CcI3 3		
ng/ μ l	260/280	260/230	ng/ μ l	260/280	260/230	ng/ μ l	260/280	260/230
1120	1.88	1.56	478.9	1.93	1.92	893.8	1.94	1.80

CcI3 4			CcI3 5			CcI3 6		
ng/ μ l	260/280	260/230	ng/ μ l	260/280	260/230	ng/ μ l	260/280	260/230
278.5	1.78	1.74	994.1	2.05	2.09	602	1.89	1.86

MV 1			MV 2			MV 3		
ng/ μ l	260/280	260/230	ng/ μ l	260/280	260/230	ng/ μ l	260/280	260/230
215.1	1.79	1.60	296.7	1.83	1.71	251.5	1.88	1.68

MV4		
ng/ μ l	260/280	260/230
218.8	1.64	1.50

D'après le tableau 6.c, les concentrations de l'ADNg extrait pour le témoin CcI3 sont très variables (allant de 278.5 ng/ μ l à 1120 ng/ μ l), contrairement à MV qui sont quasi-similaires (environ 250 ng/ μ l). La qualité de l'extraction quant à elle est acceptable pour CcI3, tandis qu'elle est médiocre pour MV.

On a vérifié la qualité d'ADNg par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1%

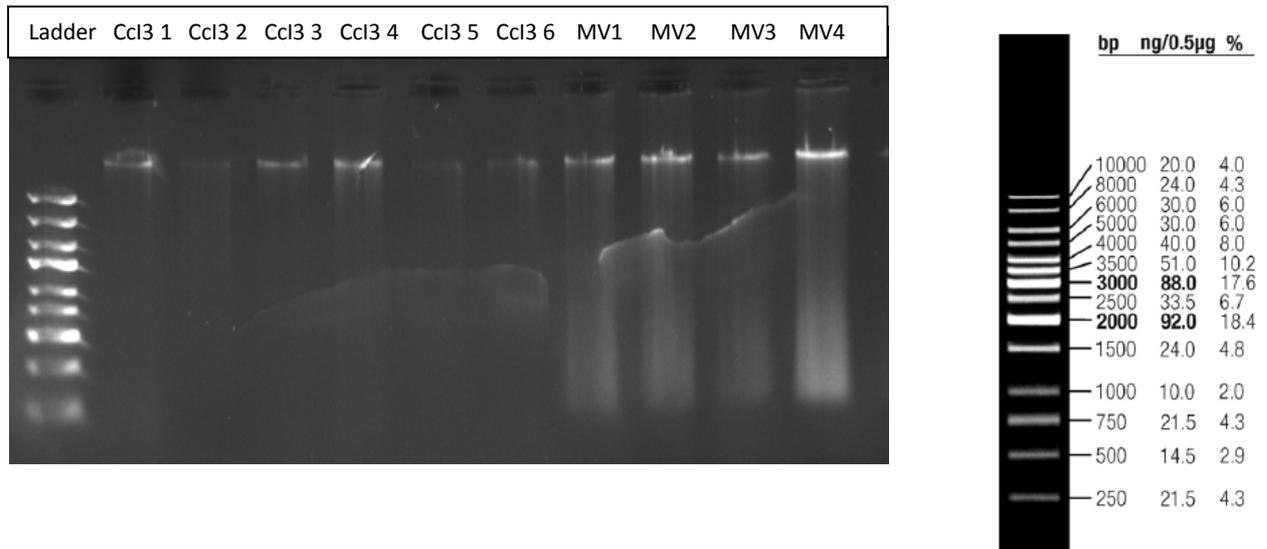


Figure 10. Profil électrophorétique démontrant la présence d'ADN génomique après extraction d'ADNg de l'isolat MV et du témoin Ccl3

D'après le gel (Figure 10), on relève une bonne quantité d'ADNg extrait pour Ccl3 1, Ccl3 3 et Ccl3 4, une bande quasi absente pour Ccl3 5 alors que la concentration relevée sur Nanodrop est de 994.1 ng/µl. MV présente quant à lui de belles bandes même si les échantillons sont moins purs que ceux de Ccl3, ceci confirme les résultats obtenus sur Nanodrop et présentés dans le tableau 6.c.

Tableau 6.d: Les résultats des dosages de l'ADNg extraits des isolats LB et SLH au Nanodrop.

LB 1			LB 2			LB 3		
ng/µL	260/280	260/230	ng/µL	260/280	260/230	ng/µL	260/280	260/230
1959.6	1.85	1.58	1087.9	2.19	2.76	1476.6	2.02	2.01

LB 4			LB 5		
ng/µL	260/280	260/230	ng/µL	260/280	260/230
2366.6	1.97	2.04	2959.1	2.04	1.94

SLH 1			SLH 2			SLH 3		
ng/µL	260/280	260/230	ng/µL	260/280	260/230	ng/µL	260/280	260/230
4741.2	2.08	2.00	8385.7	2.14	2.10	2737.0	2.16	2.09

SLH 4			SLH 5		
ng/µL	260/280	260/230	ng/µL	260/280	260/230
4186.1	2.13	2.04	4746.6	2.13	2.21

Selon le tableau, la quantité d'ADNg obtenue après extraction est énorme pour LB (Jusqu'à 2959,1 ng/μl) et l'ai plus pour SLH (Jusqu'à 8385.7 ng/μl). La qualité des extractions réalisées est très bonne, sauf pour LB1 avec un ratio 260/230 de 1.58.

On a vérifié la qualité d'ADNg par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1%

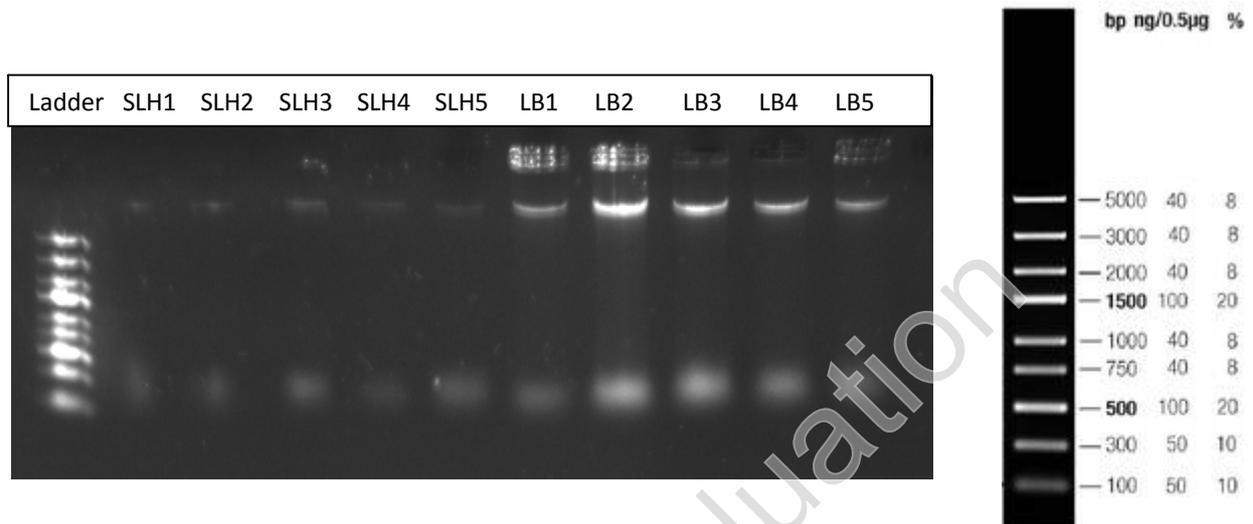


Figure 11. Profil électrophorétique démontrant la présence d'ADN génomique après extraction d'ADNg des isolats SLH et LB

D'après le gel (Figure 11), les très fines bandes chez SLH démontrent la présence d'une toute petite quantité d'ADNg extrait (complètement opposé aux données relevé sur Nandrop et présenté sur le tableau 6.d). Pour LB on distingue chez tous les isolats de belles bandes prouvant la présence d'ADNg extrait, mais moins que les données présentés sur le tableau 6.d.

Tableau 6.e: Les résultats des dosages de l'ADNg extraits des isolats CH, BP et BBA au Nanodrop.

CH 1			CH 2		
ng/μL	260/280	260/230	ng/μL	260/280	260/230
3732.6	1.96	1.77	1721.8	2.01	1.73

BP 1			BP 2		
ng/μL	260/280	260/230	ng/μL	260/280	260/230
344.1	1.81	1.26	160.1	1.89	1.38

BBA 1			BBA 2			BBA 3		
ng/μL	260/280	260/230	ng/μL	260/280	260/230	ng/μL	260/280	260/230
922.0	1.91	1.87	2041.2	1.99	1.94	2053.5	2.01	1.86

BBA 4			BBA 5		
ng/μL	260/280	260/230	ng/μL	260/280	260/230
1682.8	1.91	1.69	2361.4	1.97	1.84

D'après le tableau 6.e, l'isolat BP présente la plus faible quantité d'ADNg extraite avec les taux les plus bas de la pureté de l'échantillon. CH et BBA présente de grandes quantités d'ADNg obtenues après extraction avec une pureté moyenne.

On a vérifié la qualité d'ADNg par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1%

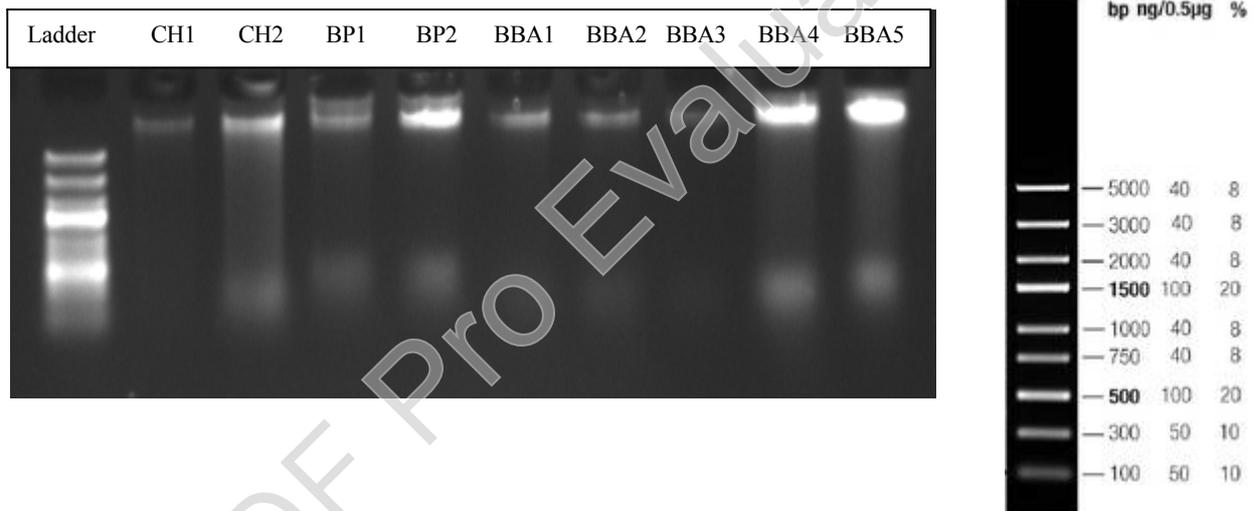


Figure 12. Profil électrophorétique démontrant la présence d'ADN génomique après extraction d'ADNg des isolats CH, BP et BBA

On remarque dès le début des puits de migration (Figure 12) des grosses bandes de forte intensité chez BBA4 et BBA5, ceci vient appuyer les données présentées dans le tableau 6.e. Ce qui n'est pas le cas pour BP2, même si la bande est large et très intense, ceci est complètement opposé à ce qui présenté dans le tableau 6.e.

D'une manière générale nous avons observé sur les gels électrophorétiques précédents, des bandes qui montrent la présence de l'ADNg avec différentes intensités. L'intensité de ses bandes se différencie par rapport à la quantité de l'ADNg extrait.

On observe aussi la présence des « smires » ainsi que des bandes sur le front de migration correspondants aux ARN, on peut en déduire que l'ARN n'a pas été complètement dégradé et cela est due aux erreurs pendant les manipulations, peut être que la concentration de l'ARNase était basse.

II. Résultats de PCR

On a réalisé deux amplification sur tous les d'ADNg extraits, par réactions PCR avec deux couples d'amorce différents ciblant les deux régions *nifD-K* et *rrn* afin d'identifier et discriminer les *Frankia* parmi nos isolats.

Le premier couple d'amorces *nifD-K* amplifie la une partie de la région génomique *nif* qui code pour le complexe protéique de la nitrogénase, enzyme responsable de la fixation de l'azote chez les bactéries fixatrices d'azote comme *Frankia*. Cette partie du génome est très conservée. Le seconde couple d'amorces amplifie l'espace inter génique (IGS) entre les ADNr 16S et 23S, ces deux gènes codent pour les sous-unités qui forment ribosome, l'IGS est une région génomique hypervariable.

On a fait migrer les produits des PCR en électrophorèses sur un gel d'agarose 1%, les résultats sont présentés ci-dessous :

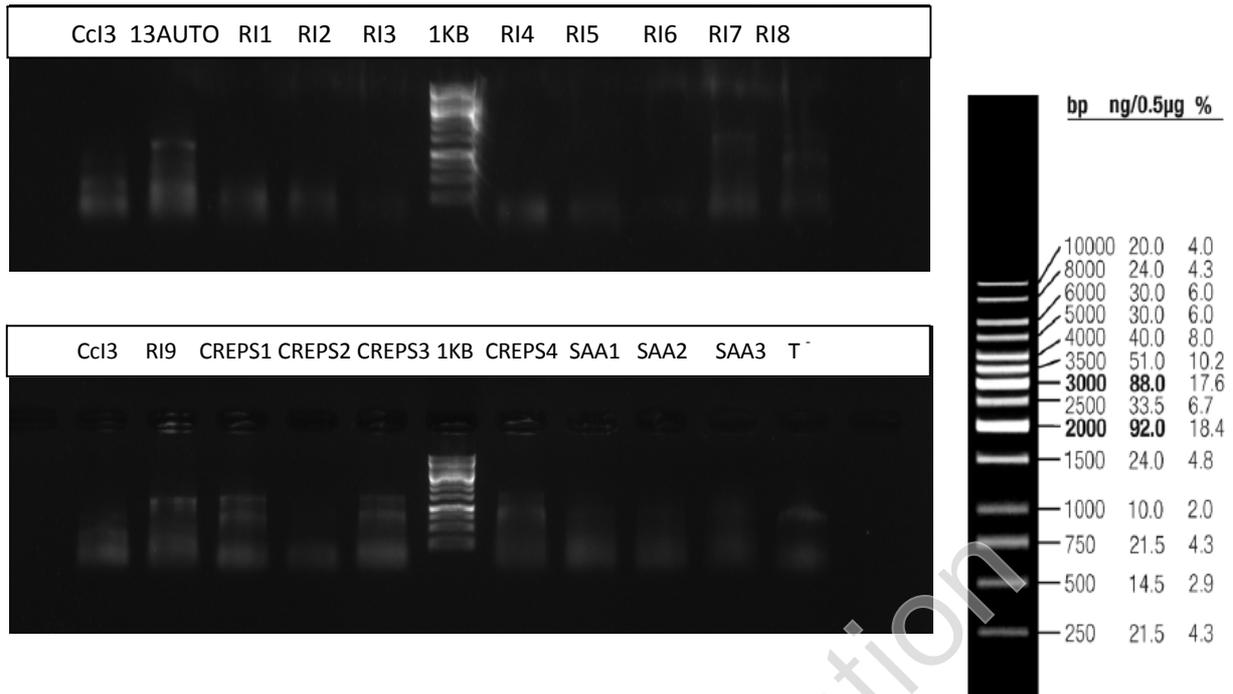


Figure 13. Profil électrophorétique des produits PCR des isolats 13AUTO, RI, CREPS et SAA et du témoin CcI3 amplifiés avec les amorces *nifD-K*

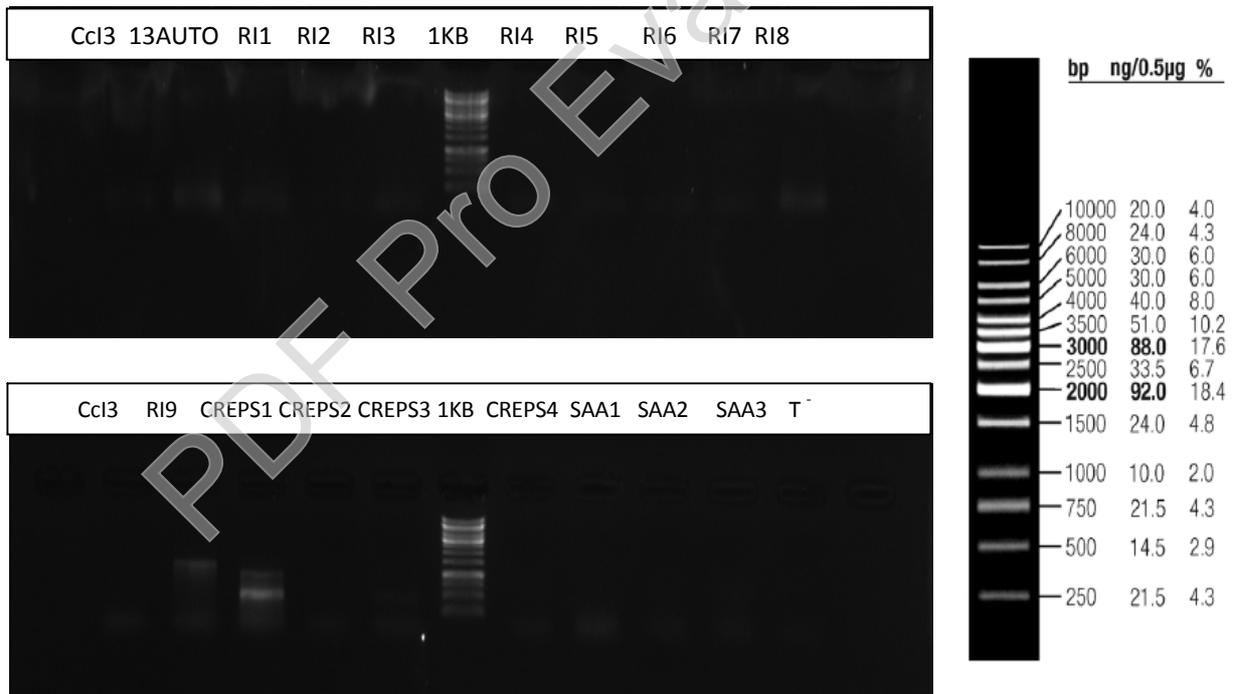


Figure 14. Profil électrophorétique des produits PCR des isolats 13AUTO, RI, CREPS et SAA et du témoin CcI3 amplifiés avec les amorces *rrn*

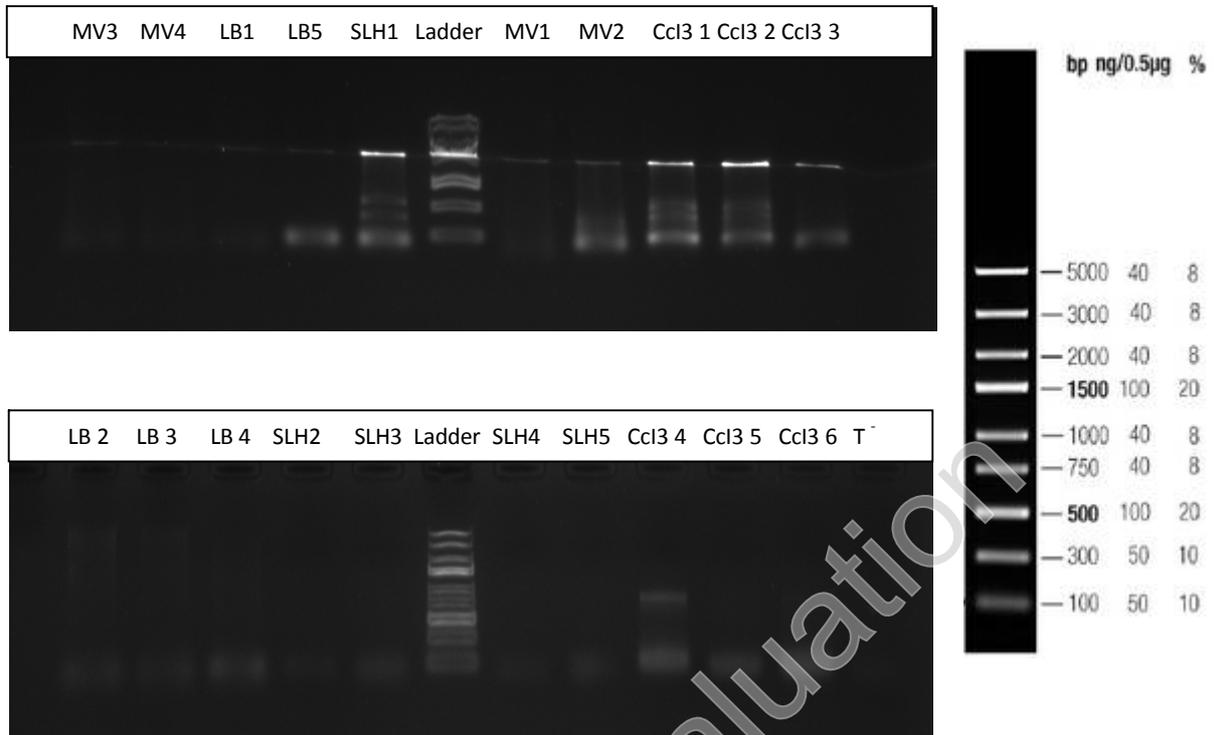


Figure 15. Profil électrophorétique des produits PCR des isolats MV, LB et SLHet du témoin Ccl3 amplifiés avec les amorces *nifD-K*



Figure 16. Profil électrophorétique des produits PCR des isolats MV, LB et SLH et du témoin Ccl3 amplifiés avec les amorces *rnn*

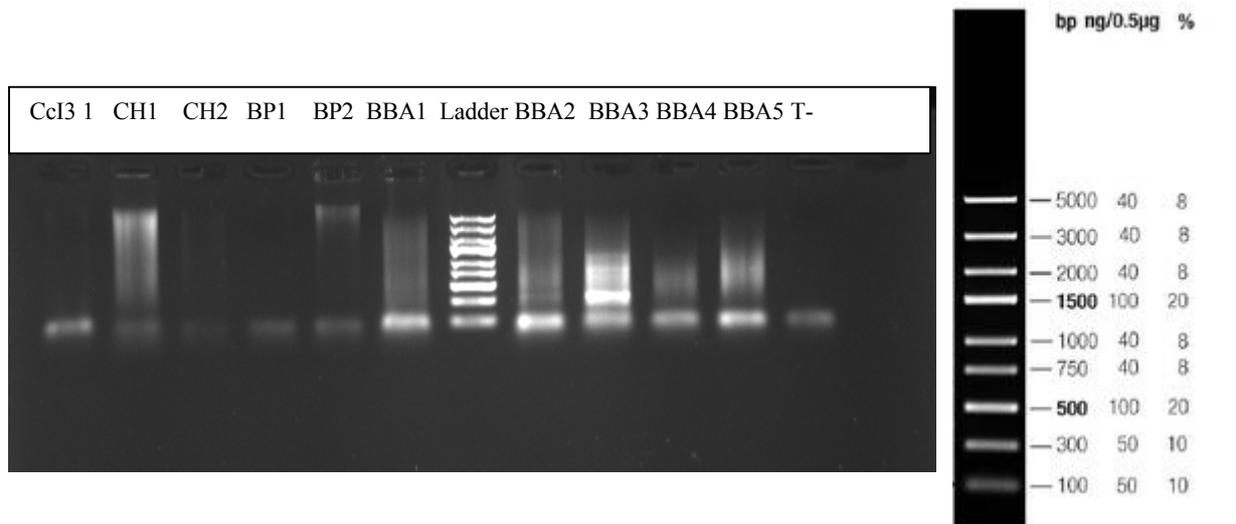


Figure 17. Profil électrophorétique des produits PCR des isolats CH, BP et BBA amplifiés avec les amorces *nifD-K*



Figure 18. Profil électrophorétique des produits PCR des isolats CH, BP et BBA amplifiés avec les amorces *rrn*

Vu le nombre de copies d'ADNg extrait qu'on avait pour chaque isolat (9 pour RI, 3 pour CREPS, 4 pour SAA, 4 pour MV, 5 pour SLH, 5 pour LB, 2 pour CH, 2 pour BP et 5 pour BBA), on a réalisé d'abord des amplifications à partir de tous les ADNg comme matrice de départ pour la PCR, ensuite on a choisi une le meilleur profil selon la meilleure intensité et les tailles des bandes pour faire les deux PCR finals qui regroupent tous les isolats ensembles,

une avec les ADNg dilués et l'autre avec les produits PCR précédents. Les produits d'amplification ont été analysés par une électrophorèse sur gel d'agarose.

II.1. La PCR à partir des ADNg dilué

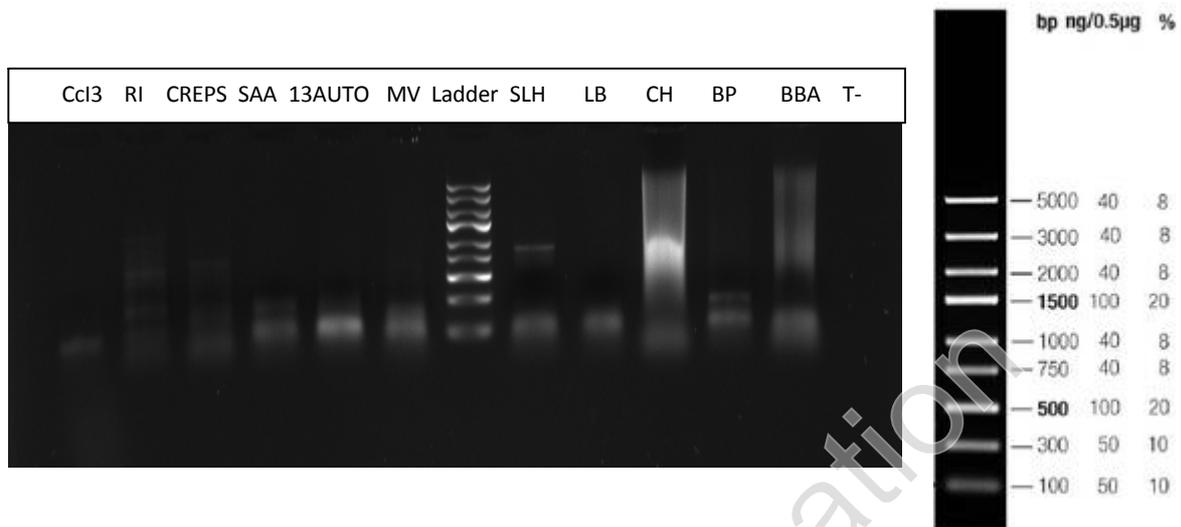


Figure 19. Profil électrophorétique des produits PCR des isolats à partir des ADNg dilué amplifiés avec les amorces *nifD-K*

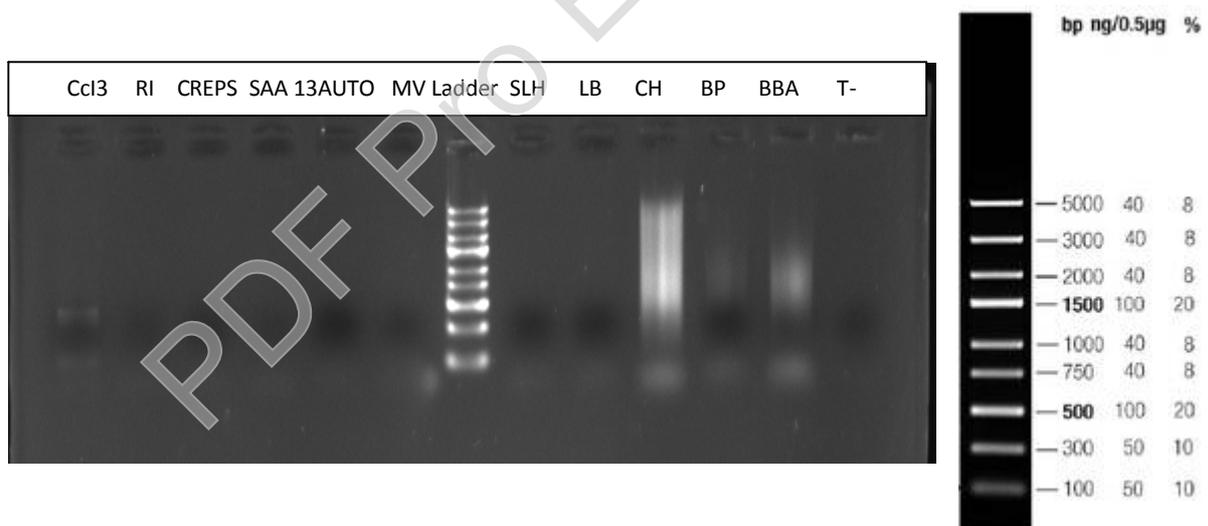


Figure 20. Profil électrophorétique des produits PCR des isolats à partir des ADNg dilué amplifiés avec les amorces *rrn*

II.2. La PCR à partir des produits PCR

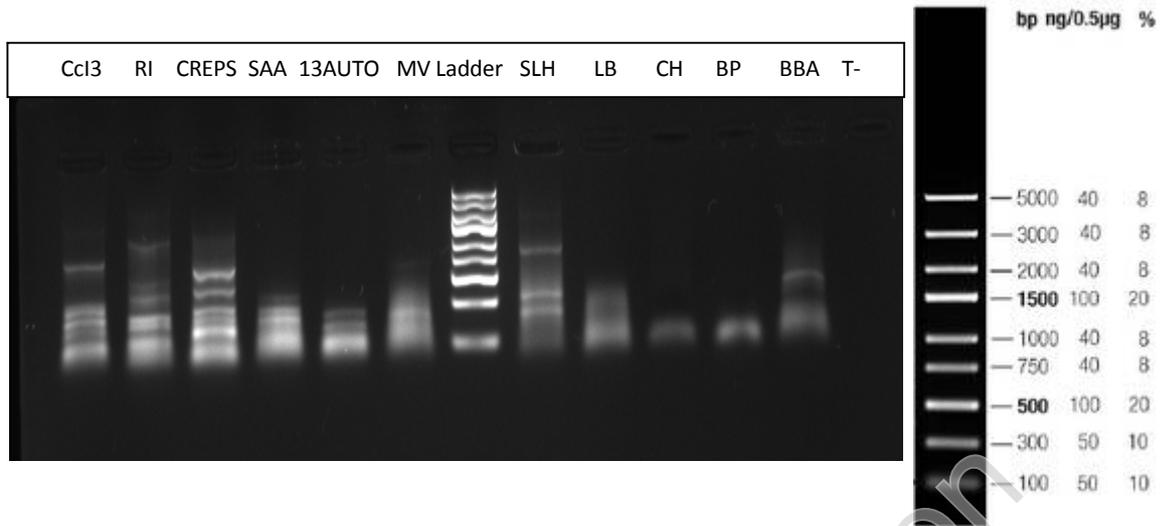


Figure 21. Profil électrophorétique des produits PCR des isolats à partir des produits PCR précédents amplifiés avec les amorces *nifD-K*

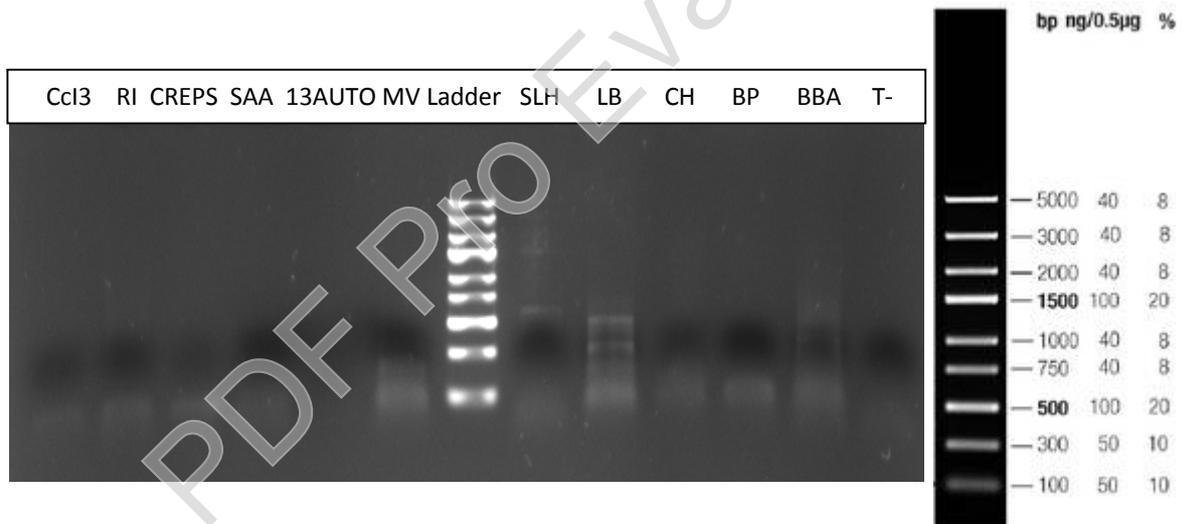


Figure 22. Profil électrophorétique des produits PCR des isolats à partir des produits PCR précédents amplifiés avec les amorces *rrn*

Interprétations des résultats de PCR

Pour la région *nif* D-K

Pour le témoin CcI3 on observe la présence de quatre bandes, en les comparant avec le Ladder leurs tailles sont environ de : 260, 300, 400 et 1000 pb (Figure 21).

Chez l'isolat RI on relève la présence de quatre bandes avec des tailles différentes environ de 200, 300, 600 et 1100 pb, en comparant avec CcI3 on remarque la présence d'une bande similaire de 1100 pb qui est très proche de celle de CcI3, ceci est différent des résultats présentés par Rouvier et *al.*, en 1996 qui indiquaient que la taille du fragment attendue est environ de 1400 pb. Donc ça pourrait être du *Frankia*.

Pour l'isolat CREPS on observe la présence de cinq bandes dont les tailles sont environ de 200, 300, 400, 500 et 800 pb (Figure. 21). On remarque la présence d'une bande d'environ 800 pb qui est adjacente à celle du témoin et puisque CcI3 et du *Frankia* donc ça pourrait être du *Frankia*.

Pour l'isolat SLH on observe la présence de trois bandes environ de 280, 300 et 1000 pb, (Figure. 21) mais en comparant avec notre témoin, la bande à 1000 pb correspond à la même bande du témoin, ces résultats suggèrent une forte probabilité que cet isolat soit du *Frankia*.

Pour les isolats SAA, 13AUTO, MV et LB on n'a pas pu interpréter les résultats du gel à cause des smears qui pourraient correspondre à des contaminations par les amorces ou aux ADN dégradés. On remarque pour les deux isolats MV et LB l'absence des bandes, il n'y a pas eu d'amplification. Par contre pour SAA et 13AUTO les bandes apparues sont trop proches ce qui rend l'interprétation difficile.

Pour l'isolat BBA on relève la présence d'une seule bande, en la comparant avec le Ladder, sa taille est d'environ 500 pb, et on remarque que notre témoin CcI3 ne possède pas une bande à cette taille. La bande correspond à une amplification, les amorces sont spécifiques d'une partie génomique dans l'opéron *nif*, on peut dire que cet isolat possède la région *nif* qui code pour l'enzyme nitrogénase, responsables de la fixation d'azote donc c'est possible que ça soit une autre bactérie fixatrice d'azote.

On observe l'absence de bandes chez les deux isolats CH et BP, il n'y a pas eu d'amplification. On peut expliquer ça par l'absence de la région responsable de la fixation d'azote ; la région *nif*, et en déduire qu'il ne s'agit pas de *Frankia*.

Les amorces utilisées pour l'amplification de la région *nif* sont très spécifiques. Vu la similarité des bandes présentes chez les isolats RI, CREPS, et SLH, on peut déduire en premier lieu que ces isolats pourraient bien être des actinomycètes du genre *Frankia*, pour confirmer cette hypothèse, il faudra faire d'autres études, comme les tests de nodulation sur *Casuarina equisetifolia*.

Pour la région *rrn*

Il nous semble un peu difficile d'interpréter les résultats du gel dans la (figure. 22) vue l'absence d'amplification chez tous les isolats. Ceci pourrait être expliqué par la dégradation des amorces. Même si on remarque deux bandes fines chez l'isolat LB correspondant à des tailles environ 300 et 500 pb, et une bande encore plus fine chez l'isolat SLH correspondant à une taille de 600 pb, l'interprétation de ce profil est impossible, le témoin CcI3 ne présentant pas d'amplification. La taille des bandes ne correspond pas à la taille des fragments attendus d'après ce qui a été publié par Rouvier et *al.*, en 1996 et qui était environ de 1Kb.

Conclusion et Perspective

PDF Pro Evaluation

La diversité génétique des isolats de *Frankia* infectieuse signalée à ce jour pour la famille des *Casuarinaceae* semble faible. Par exemple, un degré élevé de l'homologie ADN-ADN a été trouvé entre les souches de *Frankia* nodulant *Casuarinaceae* isolées des zones géographiquement éloignées, incluant le Sénégal, les Etats-Unis, le Brésil, la Thaïlande et Madagascar, et toutes les souches ont été regroupées en une seule espèce génomique, les espèces génomiques du groupe 9 (Fernandez et al., 1989).

En outre, l'utilisation de gènes symbiotiques comme sondes d'hybridation pour la PCR conduira à conclure l'existence d'une forte homogénéité génétique entre les souches isolées à partir de *C. equisetifolia* (d'après les résultats de Rouvier et al., 1996 et Nazaret et al., 1989).

Dans ce travail on s'est intéressé à isoler à partir des nodules ou de la rhizosphère de *Casuarina equisetifolia* un nouvel actinomycète du genre *Frankia* dans le territoire Algérien qui a la capacité d'infecter les *Casuarinacées* et plus compétent que CcI3 afin de réhabiliter et régénérer les sols dégradés. Au cours de nos travaux nous nous sommes basé sur l'utilisation des techniques de caractérisation qui permettent d'identifier nos isolats.

Pendant cette étude, la qualité de l'extraction d'ADNg qu'on a réalisé et la qualité des gels d'électrophorèse ont rendu l'interprétation et l'amplification par PCR plus difficiles, l'une des perspectives serait, d'utiliser de l'eau milliQ stérile à la place de la solution d'éluion fournie dans le kit d'extraction de l'ADN génomique. Aussi, le choix des amorces pourraient se porter sur de nouvelles amorces ciblant une région d'ADN plus conservée ADNr 16S au lieu de la région *nif*, car il a été démontré récemment que certaines *Frankia* dites *Frankia-Like* incapables de fixer l'azote ni d'induire des nodules présentaient des homologies dans les fragments amplifiés dans la région *nif*.

Les résultats préliminaires obtenus avec nos isolats RI, CREPS, SLH et BBA ne sont qu'une fine partie du travail qui reste à faire pour la caractérisation de ces isolats comme étant du *Frankia*. Un séquençage des amplifiât obtenus chez ces individus pourraient nous donner une idée plus précise de leur appartenance en les comparant sur les bases de données NCBI.

Ce travail ne représente qu'une partie de la caractérisation des isolats. Pour pouvoir confirmer que les isolats obtenus sont des *Frankia*, d'autres études pourraient être réalisées. En effet, l'observation microscopique des échantillons des cultures des isolats sur du milieu liquide N-Free, à la recherche de vésicules (cellules spécialises dans la fixation de l'azote) et de hyphes ramifiées. *Frankia* étant une bactérie fixatrice d'azote autotrophe contrairement au

Rhizobium. Aussi, des tests d'infectivité et d'effectivité des isolats obtenus sur de jeunes plantes *Casuarina equisetifolia*, permettraient de déterminer par la suite, à partir des plantes qui présentes des nodules, les *Frankia* spécifiques de l'hôte parmi nos isolats.

PDF Pro Evaluation

Liste de références bibliographiques

PDF Pro Evaluation

1. **Andrews M., James E.K., Sprent J.I., Boddey R.M., Gross E & Fabio Bueno dos Reis Jr., (2011).** Nitrogen fixation in legumes and actinorhizal plants in natural ecosystems: values obtained using ^{15}N natural abundance, *Plant Ecology & Diversity*, 4:2-3, 131-140, DOI: 10.1080/17550874.2011.644343.
2. **Badran D.A., El-Lakany M.H., El-Osta M.L and Abu Gazia H.A., (1979).** Breeding and improving *Casuarina* trees. 1. Taxonomy and morphological characteristics of *Casuarina spp.* growing in Egypt. *Alex. J. Agric. Res.* 24 603–684
3. **Benabdoun F.M., (2012).** Étude moléculaire des étapes précoces de la symbiose actinorhizienne *Casuarina-Frankia* : analyse fonctionnelle des gènes de la plante hôte contrôlant l'infection. Doctorat Biotechnologie et Génomique Végétales, Université Mentouri Constantine.
4. **Benabdoun M., Gherbi H., Djekoun A., Bogusz D., Franche C., Ykhlef N., (2012).** Fixation biologique de l'azote : la symbiose actinorhizienne *casuarina- frankia*. *Sciences& Technologie C – N°35* pp.15-19.
5. **Benson D. R., (1990).** Physiology and biochemistry of *Frankia* in culture. In : the biology of *Frankia* and actinorhizal plants. C. R. Schwintzer and J. D. Tjepkema (Eds). San Diego. Academic press. pp. 107-127.
6. **Benson D.R And Silvester W.B., (1993).** Biology of *Frankia* Strains, Actinomycete Symbionts of Actinorhizal Plants. *Microbiological reviews*, p. 293-319.
7. **Benson D.R., (1988).** The genus *Frankia*: actinomycete symbionts of plants. *Microbiological Sciences* [5(1):9-12].
8. **Berry A.L & Sunnel L.A., (1990).** The infection process and nodule development. In: *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants* (eds. Schwintzer, C. R. & TieDkema, D. J.), Academic Press, New York, pp. 83-106.
9. **Bissonnette D., (2012).** Etude de la symbiose actinorhizienne chez *l'aulne rugueux* et *l'alune crispe* colonisant les sites perturbés par l'industrie pétrolière albertaine. Maître es sciences (M.Sc.). Université de Sherbrooke.
10. **Clawson M.L., Bourret A and Benson D.R., (2004).** Assessing the phylogeny of *Frankia*-actinorhizal plant nitrogen-fixing root nodule symbioses with *Frankia* 16S rRNA and glutamine synthetase gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31 :131–138.
11. **Diagne N., Arumugam K., Ngom M., Nambiar-Veetil M., Franche V., Kumar K Narayanan., and Laplaze L., (2013a).** Use of *Frankia* and Actinorhizal Plants for Degraded Lands Reclamation. *BioMed Research International*.
12. **Diagne N., Diouf D., Svistoonoff S., Kane A., Noba K., Franche C., Bogusz D., Duponnois R., (2013b).** *Casuarina* in Africa: Distribution, role and importance of arbuscular mycorrhizal, ectomycorrhizal fungi and *Frankia* on plant development. *Journal of Environmental Management* 128 : 204-209.
13. **Diem H. G., Gauthier D and Dommergues Y. R., (1982).** Isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina equisetifolia*. *Cari J Microbiol* 28(5): 526-530.
14. **Diem H.G & Dommergues Y.R., (1990).** Current and potential uses and management of *Casuarinaceae* in the tropics and subtropics. In : *The biology of Frankia and actinorhizal plants*. Schwintzer C. R. & J. D. Tjepkema (eds), Academic Press, San Diego, 317-341.
15. **Diouf D., (1996).** La transformation génétique des *Casuarinaceae*: un outil pour l'étude moléculaire des symbioses actinorhiziennes. Doctorat Biologie, Physiologie Cellulaire et Moléculaire Végétales, Université Paris VII-Denis Diderot.
16. **Diouf D., Sy M.O., Gherbi H., Bogusz D and Franche C., (2008).** *Casuarinaceae*. *Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Forest Tree Species*. Edited by

- Chittaranjan Kole and Timothy C. Hall Blackwell Publishing Ltd. ISBN 978-1-405-16924-0.
17. **Domergue O., (2006).** Diversité des *rhizobia* associés à *ononis repens* : une légumineuse adaptée aux milieux méditerranéens. Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études.
 18. **Dommergues Y., Duhoux E & Diem H.G., (1988).** Les arbres fixateurs d'azote en foresterie et agroforesterie tropicales, Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques, 135:3, 49-64, DOI: 10.1080/01811789.1988.10826901
 19. **Downie J.A., (2005).** Legume Haemoglobins: Symbiotic Nitrogen Fixation Needs Bloody Nodules, Current Biology Vol 15 No 6.
 20. **Duhoux E., Diouf D., Gherbi H., Franche C., Ahée J & Bogusz D., (1996).** Le nodule actinorhizien, Acta Botanica Gallica:Botany Letters, 143:7, 593-608, DOI: 10.1080/12538078.1996.10515361
 21. **Echbab H., Arahou M., Ducouso M., Nourissier-Mountou S., Duponnois R., Lahlou H and Prin Y., (2007).** Successful nodulation of *Casuarina* by *Frankia* in axenic conditions. Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072.
 22. **El-Lakany M.H., (1983).** A review of breeding drought resistant *Casuarina* for shetelbed establishment in arid regions with special reference to Egypt. For. Ecol. Manag., 8, 129-137.
 23. **Fontaine M.S., Young P.H., and Torrey J.G., (1986).** Effects of Long-Term Preservation of *Frankia* Strains on Infectivity, Effectivity, and In Vitro Nitrogenase Activity. Applied and environmental microbiology, p. 694-698 Vol. 51, No. 4
 24. **Franche C., Gherbi H., Benabdoun M., Svistoonoff S., Hocher V., Bogusz D., (2011).** New insights in the molecular events underlying actinorhizal nodulation in the tropical tree *Casuarina glauca*. BMC Proceedings, 5(Suppl 7):O33.
 25. **Franche C., Laplaze L., Duhoux E & Bogusz D., (1998).** Actinorhizal symbioses: Recent advances in plant molecular and genetic transformation studies. *Crit Rev Plant Sci* 17(1): 1-28.
 26. **Franche C., Lindström K & Elmerich C., (2009).** Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants Plant Soil, 321:35–59, DOI 10.1007/s11104-008-9833-8.
 27. **Godfroy O., (2008).** Étude génétique et moléculaire de deux gènes de *Medicago truncatula*, DMI3 et RPG, contrôlant l'établissement de symbioses racinaires. Doctorat Biosciences Végétales, Université Toulouse III - Paul Sabatier, Toulouse.
 28. **Gtari M and Dawson J.O., (2011).** An overview of actinorhizal plants in Africa, *Functional Plant Biology* 38(9) : 653-661.
 29. **Hocher V., Auguy F., Bogusz D., Doumas P., Franche C., Gherbi H., Laplaze L., Obertello M., Svistoonoff S., (2009).** Les symbioses actinorhiziennes fixatrices d'azote : un exemple d'adaptation aux contraintes abiotiques du sol. CahAgric, vol. 18, n° 6.
 30. **Hocher V., Gherbi H., Svistoonoff S., Diagne N., Vayssaire V., Auguy F., Bonneau J., Laplaze L., Doumas P., Bogusz D & Franche C., (2010).** Les arbres actinorhiziens de la famille des *Casuarinaceae* : utilisations et étude de la plasticité racinaire face aux contraintes abiotiques. Le projet majeur africain de la Grande Muraille Verte.
 31. **Huss-Danell K., (1997).** Actinorhizal symbioses and their N₂ fixation. New Phytol. 136:375-405.
 32. **Huss-Danell K., and J.E. Lundmark., (1988).** Growth of nitrogen-fixing *Alnus incana* and *Lupinus* spp. for restoration of degenerated forest soil in northern Sweden. Studia Forestalia Suecica 181:1-20.

33. **Jamann S., Fernandez M. P., and Normand P., (1993).** Typing method for N₂-fixing bacteria based on PCR-RFLP-application to the characterization of *Frankia* strains. *Mol. Ecol.* 2:17–26.
34. **Le Guerhier F., (2013).** Des bactéries *Rhizobium* pour améliorer la productivité des cultures des légumineuses. <http://www.inra.fr/Entreprises-Monde-agricole/Offres-de-collaboration/Toutes-les-actualites/Rhizobium-surexprimant-la-flavohe moglobine>
35. **Lechevalier M.P., (1994).** Taxonomy of the Genus *Frankia* (Actinomycetales). *International journal of systematic bacteriology*, p. 1-8
36. **Lechevalier M.P., and Lechevalier H.A., (1990).** Systematics, isolation, and culture of *Frankia*, p. 35-60. In C. R. Schwintzer and J. D. Tjepkema (ed.), *The biology of Frankia and actinorhizal plants*. Academic Press, Inc., New York.
37. **Maggia L., (1991).** Diversité génétique de *Frankia*, symbiote de *Casuarina equestifolia* L. Johnson en Afrique de l'ouest (Sénégal et Gambie). Doctorat Génétique Quantitative et des Population. Université Paris VII.
38. **Mallet P.L., (2009).** Impact des contaminants des sables résiduels de l'industrie pétrolière albertaine sur *Frankia sp.* Et sa symbiose avec l'aulne. Maître es sciences (M.Sc.). Université de Sherbrooke.
39. **Mansour S.R and Megahed M., (2002).** Interaction of soil and different *Frankia* strains on nodulation and mass production of three *Casuarina* species. *Eg. J. Microbiol.* 37 323–342.
40. **Maunuksela L., (2001).** Molecular and physiological characterization of rhizosphere bacteria and *Frankia* in forest soils devoid of actinorhizal plants. Doctorat Microbiology. University of Helsinki
41. **Nalin R., Domenach A-M and Normand P., (1995).** Molecular structure of the *Frankia spp. nifD*-K intergenic spacer and design of *Frankia* genus compatible primer, *Molecular Ecology* 4, 483-491.
42. **Normand P., (2006).** The families *Frankiaceae*, *Geodennatophilaceae*, *Acidothermaceae* and *Sporichthyaceae*, p. 669-681.
43. **Normand P., Lapierre P., Tisa L S., Gogarten J.P., Alloisio N., Bagnarol E., Bassi C.A., Berry A.M., Bickhart D.M., Choisne N., Couloux A., Cournoyer B., Cruveiller S., Daubin V., Demange N., Francino M.P., Goltsman E., Huang Y., Kopp O.R., Labarre L., Lapidus A., Lavire C., Marechal J., Martinez M., Mastronunzio J.E., Mullin B.C., Niemann J., Pujic P., Rawnsley T., Rouy Z., Schenowitz C., Sellstedt A., Tavares F., Tomkins J.P., Vallenet D., Valverde C., Wall L.G., Wang Y., Medigue C., and Benson D.R., (2007).** Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia sp.* strains reflect host range and host plant biogeography. Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISSN 1088-9051/07;
44. **Nouioui I., (2014).** Phylogénie et Évolution du genre *Frankia*. Doctorat Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation. Université de Lyon 1.
45. **Pawlowski K and Bisseling T., (1996).** *Rhizobial* and Actinorhizal Symbioses: What Are the Shared Features?. *The Plant Cell*, Vol. 8, 1899-1913,
46. **Pawlowski K and Demchenko K.N., (2012).** The diversity of actinorhizal symbiosis. *Protoplasma* 249 :967–979
47. **Péret B., (2007).** Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*, Doctorat Physiologie végétale, Université Montpellier II, Montpellier.
48. **Péret B., Swarup R., Jansen L., Devos G., Auguy F., Collin M., Santi C., Hocher V., Franche C., Bogusz D., Bennett M., and Laplaze L., (2007).** Auxin

- Influx Activity Is Associated with *Frankia* Infection during Actinorhizal Nodule Formation in *Casuarina glauca*. Plant Physiology, Vol. 144, pp. 1852–1862.
49. **Popovici J., Comte G., Bagnarol E., Alloisio N., Fournier P., Bellvert F., Bertrand C., and Fernandez M.P., (2010).** Differential Effects of Rare Specific Flavonoids on Compatible and Incompatible Strains in the Myrica gale-*Frankia* Actinorhizal Symbiosis. Applied and environmental microbiology, p. 2451–2460 Vol. 76, No. 8.
 50. **Potgieter L.J., Richardson D.M., Wilson J.R.U., (2013).** *Casuarina*: biogeography and ecology of an important tree genus in a changing world. Biol Invasions (2014) 16:609–633 DOI 10.1007/s10530-013-0613-x.
 51. **Riah N., (2014).** Diversité et structure génétique des populations de *Rhizobium leguminosarum* symbiovar viciae isolées du pois (*Pisum sativum*) et de la lentille (*Lens culinaris*) cultivés dans deux zones éco-climatiques subhumide et semi-aride de l'est algérien. Doctorat Biochimie et Microbiologie Appliquée. Université Constantine 1.
 52. **Romain. F.K., (2011).** Diversité génétique des *rhizobia* associées à un champ de pois d'angole (*Cajanus cajan* L.) à Yamoussoukro (Centre de la cote d'ivoire), Doctorat Agronomie et Productions Végétales, Ecole Supérieure d'Agronomie (ESA), République de cote d'ivoire.
 53. **Rouvier C., Schwencke J., Prin Y., Navarro E., Benoist P., Müller G., Girgis M., Selim S., Reddell P., Gauthier D., Rinaudo G., Normand & Simonet P., (1996).** Biologie et diversité génétique des souches de *Frankia* associées aux *Casuarinacées*, Acta Botanica Gallica: Botany Letters, 143:7, 567-580, DOI: 10.1080/12538078.1996.10515359.
 54. **Rouvier C., Prin Y., Reddell P., Normand P., And Simoneti P., (1995).** Genetic Diversity among *Frankia* Strains Nodulating Members of the Family *Casuarinaceae* in Australia Revealed by PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis with Crushed Root Nodules. Vol. 62, No. 3.
 55. **Santi C., Bogusz D and Franche C., (2013).** Biological nitrogen fixation in non-legume plants, Annals of Botany 111 : 743-767.
 56. **Santi C., Guldner E., Bogusz D., Geney C., Auguy F., Franche C., Swistonoff S., Bourrie I., Constans L & Duhoux E., (2001).** Un modèle pour l'étude des symbioses fixatrices d'azote actinorhiziennes *Casuarina-Frankia*. Des modèles biologiques à l'amélioration des plantes. Paris (FRA) ; Montréal : IRD; AUF. P. 387-408.
 57. **Schwencke. J., (1991).** Rapid growth and increased biomass yield for some *Frankia* strains in buffered, stirred mineral medium (BAP) added of phosphatidylcholine. Plant and Soil 137 : 37-41
 58. **Sellstedt A. & Richau K.H., (2013).** Aspects of nitrogen-fixing Actinobacteria, in particular free-living and symbiotic *Frankia*. FEMS Microbiol Lett 342. 179–186.
 59. **Soualmia A., (2010).** Biodiversité et isolement des symbiotes mycorrhiziens et symbiotes fixateurs d'azote d'*Alnus glutinosa* (L.Gaertn) et d'*Acacia melanoxylon* (R.) de la station du lac Tonga (Nord-Est Algérien). Magister en écologie végétale et environnement, Université Badji Mokhtar-Annaba.
 60. **Sougoufara B., (1990).** La fixation de N₂ Par les *Casuarinas* : Amélioration par sélection clonale et quantification par différentes méthodes. Doctorat Biologie Végétale et Forestière Université de Nancy 1.
 61. **Svistoonoff S. (2003).** Implication d'une subtilase dans les étapes précoces des symbioses actinorhiziennes, Doctorat Physiologie végétale, Université Montpellier II, Montpellier.

62. **Tisa L.S., Beauchemin N., Gtari M., Sen A and Wall L.G., (2013).** What stories can the *Frankia* genomes start to tell us ?. *J. Biosci.* 38 719–726] DOI 10.1007/ s12038-013-9364-1
63. **Udwary D.W., Gontang E.A., Jones A.C., Jones C.S., Schultz A.W., Winter J.M., Yang J.Y., Beauchemin N., Capson T.L., Clark B.R., Esquenazi E., Eustaquio A.S., Freel K., Gerwick L., Gerwick W.H., Gonzalez D., Liu W-T., Malloy K.L., Maloney K.M., Nett M., Nunnery J.K., Penn K., Prieto-Davo A., Simmons T.L., Weitz S., Wilson M.C., Tisa L.S., Dorrestein P.C and Moore B.S., (2011).** Significant Natural Product Biosynthetic Potential of Actinorhizal Symbionts of the Genus *Frankia*, as Revealed by Comparative Genomic and Proteomic Analyses. *Applied and environmental microbiology*, p. 3617–3625 Vol. 77, No. 11
64. **Vergheze S et Misra A.K., (2002).** *Frankia*–actinorhizal symbiosis with special reference to host–microsymbiont relationship. Department of Botany, North-Eastern Hill University, Shillong 793 022, India, *Current science*, Vol. 83, NO. 4.
65. **Walker M.V., (2010).** Impact de l'inoculation de micro-organismes phyto-bénéfiques sur le métabolisme secondaire de *Zea mays L.* Ecole doctorale évolution, écosystèmes microbiologie modélisation, Université Claude Bernard Lyon 1.
66. **Willems A., (2006).** The taxonomy of *rhizobia*: an overview, *Plant and Soil*, 287:3–14.
67. **Wopereis M.C.S., Defoer T., Idinoba P., Diack S., et Dugué M-J., (2008).** Curriculum d'apprentissage participatif et recherche action (APRA) pour la gestion intégrée de la culture de riz de bas-fonds (GIR) en Afrique subsaharienne : Manuel technique. Cotonou, Bénin: le Centre du riz pour l'Afrique (ADRAO), vi + 128 pp.
68. **Zhong C., Zhang Y., Chen Y., Chen Z., Jiang Q., (2010).** Potential *Casuarina* species and suitable techniques for the GGW. Le projet majeur africain de la Grande Muraille Verte.
69. **Zhong C., Mansour S., Nambiar-Veetil M., Bogusz D and Franche C., (2013).** *Casuarina glauca*: A model tree for basic research in actinorhizal symbiosis. *J. Biosci.* 38 815–823] DOI10.1007/s12038-013-9370-3.

Annexes

PDF Pro Evaluation

Annexe 1. Protocole de l'isolement de *Frankia* à partir des nodules de *Casuarina equisetifolia*, Technique utilisée : Dilution en série (Diem et al., 1982).

- Les nodules prélevés sur *Casuarina* sont lavés avec l'eau de robinet.
- Dans une boîte de pétri contenant de l'eau distillé disséquer les nodules en lobes.
- Les lobes clairs ainsi obtenus sont stérilisés en surface (superficiellement) en agitant dans H₂O₂ 30 v pendant 20-30 min, puis lavés plusieurs fois (2-3 fois) avec de l'eau distillée stérile.
- Découper aseptiquement les lobes en fragments minuscules à l'aide de scalpel stérile dans une goutte d'eau distillé.
- Les lobes sont transférés dans des tubes Flacons de 50 ml contenant 30 mL de milieu liquide DPM-N (Baker et O'keef, 1984), puis incubés à l'obscurité à 28°C pendant 4-9 semaines
- Après la formation de mycélium autours des lobes, éliminer les lobes à l'aide de scalpel ou pince stérile, et les filaments sont centrifugés (4000 rpm, 10-15 min), puis homogénéisés à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille stérile.
- 50µL de cette suspension sera transférée à une boîte de pétri 90 mm contenant 20 mL de milieu DPM-N gélosé (12g/L) (Baker et O'keef, 1984), incubé à l'obscurité à 28°C les boîtes de Pétri jusqu'à la formation des colonies (environ 2 semaines).
- Seules les colonies isolées seront prises à partir des boîtes de Pétri et seront transférées dans 200µl d'eau distillée stérile et forcée par aiguille d'une seringue stérile pour casser les hyphes.
- La suspension obtenue est diluée en série dans de l'eau distillée stérile 1 : 100 (v/v), et les dilutions sont étalées sur le milieu gélosé.
- Après la croissance des colonies, cette procédure est répétée 2 autre fois.
- Les colonies finales sont prélevées, homogénéisées et transférées dans le milieu liquide DPM+N, sur un agitateur 100 rpm 28°C.
- Après 3 semaines, les colonies uniques pourraient être retirées à l'aide de pipette pasteur, homogénéisées et transférées dans le milieu DPM+N, 100 rpm 28°C (Voir protocole repiquage *Frankia*).

Annexe 2. Protocole de l'isolement de *Frankia* à partir du sol, Technique utilisée : Dilution en série (Diem et *al.*, 1982).

- Préparer une solution saline NaCl (9 g/100 mL H₂O) stérile.
- Aliquoter 9 mL d'eau physiologique sur 10 tubes à essai stériles.
- 1 g de terre prélevé dans la rhizosphère de *C. equisetifolia* et le mettre en suspension dans le premier tube, déposer 1 mL de cette suspension dans le second tube. Faire une dilution (1 : 10 (v/v), 1 mL de la suspension et le déposer dans le tube à essai suivant et ainsi de suite).
- 1 µL de chacune des 10 suspensions est transféré sur milieu DPM-N liquide (3 répétitions pour chaque dilution).
- Après formation de mycélium, faire une centrifugation 4000 rpm pendant 15 minutes.
- Eliminer le surnageant, et remettre le culot en suspension avec le peu de surnageant que l'on aura gardé ou dans un petit volume de H₂O stérile.
- Casser les hyphes de l'isolat en effectuant environ 4-5 aspirations avec une seringue stérile.
- Répartir également le volume de la culture sur le plus de boîtes de Pétri possible.
- Incuber les boîtes à l'obscurité à 28°C.
- Après 3 semaines, les colonies uniques pourraient être retirées à l'aide de pipette pasteur, homogénéisées et transférées dans le milieu DPM+N, incubé à 28°C (Voir protocole repiquage *Frankia*).

Annexe 3. Composition du milieu DPM (Baker et O'keef, 1984).

Le milieu DPM (Baker et O'keef, 1984) est utilisé d'abord comme un milieu N déficient (DPM-N) pour l'isolement de *Frankia* à partir des nodules ou à partir du sol. L'amoniunchloride (NH₄Cl) peut ensuite être ajouté (0,5 g/l) pour le rendre complet (DPM+N) pour la croissance des souches de *Frankia* dans une culture.

Composant / L	DPM-N	DPM+N
Na Propionate	1.2 g	1.2 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g	1.0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g	0.1 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.01 g	0.01 g
NH ₄ Cl	/	0,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O/EDTA stock	1.0 mL	1.0 mL
Hoagland's microelements	1.0 mL	1.0 mL
Agar	15 g	15 g

Annexe 4. Composition du milieu BAP (Fontaine 1986).

Le milieu BAP-PCM pour les souches CcI3 (souche de *Casuarina*)

Solutions mères	BAP_PCM (/L) pour CCI3
NH ₄ Cl	5 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	10 ml
Propionate de Na	5 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	5 ml
Fe.Na ₂ EDTA	1 ml
Oligoéléments	1 ml
Vitamines BAP	1 ml
Tampon BAP	10 ml

Pour la culture de *Frankia* On utilise le milieu BAP car il est plus riche que le milieu DPM

Ajuster le pH à 6,7

Mettre un agitateur (en croix) par bouteille

Répartir le milieu dans les bouteilles (à bouchon bleu)/ 100, 250 ou 500 mL

Autoclaver

Le milieu BAP-M est utilisé tel qu'il est, par contre il faut rajouter extemporanément au milieu BAP-PCM du MES-TRIS (2 mL/100 mL).

Ajouter du glucose après autoclavage

Annexe 5. Protocole repiquage *Frankia*

Arrêter l'agitation et laisser décanter 2h afin de bien voir les 2 phases, *Frankia* se trouve en bas et le surnageant doit être bien clair

Si le surnageant reste trouble, il faut jeter la culture car elle est contaminée et relancer une culture à partir de la réserve, s'il subsiste un doute sur la culture faire une observation microscopique

Frankia pousse lentement et les cultures se contaminent rapidement, il faut donc être très soigneux et faire très attention à toutes les étapes du repiquage.

Désinfecter soigneusement la hotte ainsi que tout ce qui y rentre...

Transférer de 20 à 30mL de dépôt dans un tube Falcon de 50mL stérile, selon le volume de repiquage, prélever :

- 20mL pour 100mL
- 25mL pour 250mL
- 30mL (ou plus) pour 500mL

Garder le reste de la culture en réserve dans des pots de 30mL (bouchon rouge).

Centrifuger 15minutes à 4000rpm (25°C).

Eliminer le surnageant.

Remettre le culot en suspension avec le peu de surnageant que l'on aura gardé.

Transvaser la suspension dans un tube (bouchon rouge) stérile.

Casser les hyphes de *Frankia* en effectuant environ 4-5 aspiration/refoulement avec une seringue de 10mL et une aiguille Terumo verte (se servir que d'une main afin d'éviter toutes contaminations).

Ensemencer le milieu BAP avec du MES TRIS, 2mL/100mL.

Mettre en culture sous agitation douce à l'obscurité à 28°C.

Tous les matins, arrêter l'agitation et laisser décanter pour vérifier l'état de la culture.

Repiquer toutes les semaines pour l'entretien et tous les 4 jours avant l'inoculation.

Annexe 6. Protocole d'extraction d'ADN avec le kit Promega

Promega, Wizard® Genomic DNA Purification Kit

Isolating Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria

Materials to Be Supplied by the User

- 1.5ml microcentrifuge tubes
- water bath, 80°C
- water bath, 37°C
- isopropanol, room temperature
- 70% ethanol, room temperature
- water bath, 65°C (optional; for rapid DNA rehydration)
- 50mM EDTA (pH 8.0) (for gram positive bacteria)
- 10mg/ml lysozyme (Sigma Cat.# L7651) (for gram positive bacteria)
- 10mg/ml lysostaphin (Sigma Cat.# L7386) (for gram positive bacteria)

1. Add 1ml of an overnight culture to a 1.5ml microcentrifuge tube.
2. Centrifuge at 13,000–16,000 × g for 2 minutes to pellet the cells. Remove the supernatant. For Gram Positive Bacteria, proceed to Step 3. **For Gram Negative Bacteria go directly to Step 6.**
3. Resuspend the cells thoroughly in 480µl of 50mM EDTA.
4. Add the appropriate lytic enzyme(s) to the resuspended cell pellet in a total volume of 120µl, and gently pipet to mix. The purpose of this pretreatment is to weaken the cell wall so that efficient cell lysis can take place.

Note: For certain *Staphylococcus* species, a mixture of 60µl of 10mg/ml lysozyme and 60µl of 10mg/ml lysostaphin is required for efficient lysis. However, many Gram Positive Bacterial Strains (e.g., *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Nocardia otitidiscaviarum*, *Rhodococcus rhodochrous*, and *Brevibacterium albidium*) lyse efficiently using lysozyme alone.

5. Incubate the sample at 37°C for 30–60 minutes. Centrifuge for 2 minutes at 13,000–16,000 × g and remove the supernatant.

6. Add 600µl of Nuclei Lysis Solution. Gently pipet until the cells are resuspended.
7. Incubate at 80°C for 5 minutes to lyse the cells; then cool to room temperature.
8. Add 3µl of RNase Solution to the cell lysate. Invert the tube 2–5 times to mix.
9. Incubate at 37°C for 15–60 minutes. Cool the sample to room temperature.
10. Add 200µl of Protein Precipitation Solution to the RNase-treated cell lysate. Vortex vigorously at high speed for 20 seconds to mix the Protein Precipitation Solution with the cell lysate.
11. Incubate the sample on ice for 5 minutes.
12. Centrifuge at 13,000–16,000 × g for 3 minutes.
13. Transfer the supernatant containing the DNA to a clean 1.5ml microcentrifuge tube containing 600µl of room temperature isopropanol.

Note: Some supernatant may remain in the original tube containing the protein pellet. Leave this residual liquid in the tube to avoid contaminating the DNA solution with the precipitated protein.

14. Gently mix by inversion until the thread-like strands of DNA form a visible mass.
15. Centrifuge at 13,000–16,000 × g for 2 minutes.
16. Carefully pour off the supernatant and drain the tube on clean absorbent paper. Add 600µl of room temperature 70% ethanol and gently invert the tube several times to wash the DNA pellet.
17. Centrifuge at 13,000–16,000 × g for 2 minutes. Carefully aspirate the ethanol.
18. Drain the tube on clean absorbent paper and allow the pellet to air-dry for 10–15 minutes.
19. Add 100µl of DNA Rehydration Solution to the tube and rehydrate the DNA by incubating at 65°C for 1 hour. Periodically mix the solution by gently tapping the tube. Alternatively, rehydrate the DNA by incubating the solution overnight at room temperature or at 4°C.
20. Store the DNA at 2–8°C.

Annexe 7. Marqueurs Moléculaire utilisé lors de l'électrophorèse

O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder



Description

O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder is premixed with Orange Loading Dye Solution at a total DNA concentration of 0.1µg/µl and can be directly applied onto an agarose gel. This DNA Ladder is prepared from six different plasmids, containing pUC, λ, phage and yeast genome sequences. The DNA Ladder contains the following 14 discrete fragments (in base pairs): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, **2000**, 1500, 1000, 750, 500, 250.

CERTIFICATE OF ANALYSIS

O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, ready-to-use

#SM1163 250(5x50)µg
(for 500 applications)

Lot:

Concentration: 0.1µg/µl
 Supplied with: 2x1ml 6X Orange Loading Dye Solution
Store: at room temperature or at +4°C for periods up to 6 months.
 For longer periods store at -20°C.

2

In total 7 vials.

Storage and Loading Buffer
 10mM Tris-HCl (pH 7.6), 10mM EDTA, 0.025% orange G, 0.005% xylene cyanol FF and 10% glycerol.

6X Orange Loading Dye Solution
 10mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.15% orange G, 0.03% xylene cyanol FF, 60% glycerol and 60mM EDTA.

Quality Control Assay Data
 Analysis of 0.5µg (5µl) of the DNA Ladder on agarose gel by ethidium bromide staining generates 14 discrete bands pattern.

Quality authorized by:



Jurgita Zilinskiene



www.fermentas.com

RECOMMENDATIONS FOR USE

- Vortex gently just prior to use.
- Do not heat before loading.
- Apply 0.1µg (1µl) of the DNA Ladder per 1mm of agarose gel lane width.
- Following electrophoretic separation on agarose gel, visualize the DNA bands by ethidium bromide staining.

PRODUCT USE LIMITATION.
 This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and *in vitro* use only. The product was not tested for use in diagnostics or for drug development, nor is it suitable for administration to humans or animals.
 Please refer to www.fermentas.com for Material Safety Data Sheet of the product.

Revised 06.04.2004

O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, ready-to-use

bp	ng/0.5µg	%
10000	20.0	4.0
8000	24.0	4.3
6000	30.0	6.0
5000	30.0	6.0
4000	40.0	8.0
3500	51.0	10.2
3000	88.0	17.6
2500	33.5	6.7
2000	92.0	18.4
1500	24.0	4.8
1000	10.0	2.0
750	21.5	4.3
500	14.5	2.9
250	21.5	4.3

1.0% agarose
 0.5µg/lane,
 8cm length gel,
 1X TAE, 7V/cm, 45min

GeneRuler Express DNA Ladder



PRODUCT INFORMATION

**Thermo Scientific
GeneRuler Express
DNA Ladder**

#SM1551 **50 µg**
(for 100_ applications)

Lot: —

Concentration: 0.5 µg/µL
Supplied with: 1 mL 6X DNA Loading Dye

Store at -20°C

In total 2 vials.

www.thermoscientific.com/onebio

Description

Thermo Scientific GeneRuler Express DNA Ladder is designed for fast sizing and quantification of DNA fragments under a wide range of electrophoresis conditions in agarose gels. The band pattern is not affected by the composition of electrophoresis buffer, voltage and gel percentage. The ladder bands are easily separated in 5-10 min at high voltage.

The ladder is a mixture of nine chromatography-purified individual DNA fragments (in base pairs): 5000, 3000, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 300, 100. It contains two reference bands (1500 and 500 bp) for easy orientation. The DNA ladder is dissolved in TE buffer.

Storage Buffer

10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA.

6X DNA Loading Dye

10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 60% glycerol and 60 mM EDTA.

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Well-defined bands are formed in 5-10 min during agarose gel electrophoresis.

The DNA concentration is determined spectrophotometrically. The absence of nucleases is confirmed by a direct nuclease activity assay.

Quality authorized by:



Jurgita Zilinskiene

Rev 4 III 53

Protocol for Loading

Loading mixture for the 5 mm agarose gel lane*:

DNA ladder	1 µL
6X DNA Loading Dye	1 µL
Deionized water	4 µL
	6 µL

Step 1: Mix gently

Step 2: Load on the gel

*For gels with other lane widths, the components of the mixture should be scaled either up or down. Use 0.2 µL (0.1 µg) of DNA ladder per 1 mm of lane.

Recommendations

- Do not heat before loading.
- Dilute your DNA sample with the 6X DNA Loading Dye (#R0611, supplied with the ladder): mix 1 volume of the dye with 5 volumes of the DNA sample;

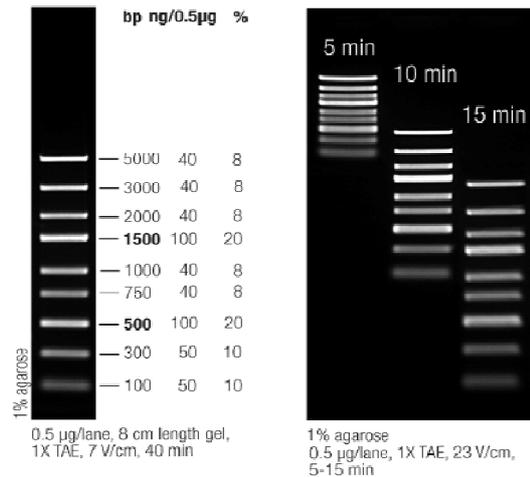
Important Note

For DNA band visualization with SYBR® Green, GelRed and other intercalating dyes, do not add the dyes into the sample, use gel staining after electrophoresis or include dyes into agarose gel to avoid aberrant DNA migration.

NOTICE TO PURCHASER- LIMITED LICENSE

This product or its use is covered by at least one claim of U.S. Patent Nos. 5,894,201, 6,680,378, and/or 7,132,520 owned by Invitrogen Corporation. The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product in internal research conducted by the buyer. The buyer cannot use this product or materials made by the employment of this product for Commercial Purposes. Commercial Purposes means any activity for consideration and may include, but is not limited to: (1) use of the product in manufacturing; (2) use of the product to provide a service, information, or data; (3) use of the product for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the product, whether or not the product is resold for use in research. Further information on purchasing licenses under the above patents may be obtained by contacting the Business Development Department, Invitrogen Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Email: outlicensing@invitrogen.com

GeneRuler Express DNA Ladder



PRODUCT USE LIMITATION

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and in vitro use only. The product was not tested for use in diagnostics or for drug development, nor is it suitable for administration to humans or animals. Please refer to www.thermoscientific.com/onebio for Material Safety Data Sheet of the product.

© 2012 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. SYBR is a registered trademark of Molecular Probes, Inc. All other trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.

Nom : KAHLOUCHE
Prénom : Imen

Nom : TABCHICHE
Prénom : Rima

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biotechnologie et Génomiques Végétales

Thème : Recherche des actinomycètes dans la rhizosphère de *Casuarina equisetifolia* en sol dégradé du Nord Algérien : Cas de *Frankia*

Résumé :

L'azote constitue l'un des facteurs limitant la croissance et le développement des végétaux pour son utilisation dans la synthèse de la chlorophylle et des protéines, il se trouve dans l'atmosphère sous forme non assimilable par la plante. Certaines bactéries du sol ont la capacité de transformer l'azote atmosphérique sous une forme assimilable par la plante et remédier ainsi à la carence azotée des sols.

Les plantes actinorhiziennes représentent le deuxième groupe de plantes fixatrices d'azote après les légumineuses, ils sont largement plantés sur des sols carencés en azote pour l'assainissement et la réhabilitation des terrains dégradés, la dépollution des sols de métaux lourds et la lutte contre l'érosion et la désertification.

Ces plantes ont la capacité de développer au niveau racinaire une symbiose avec l'actinobactérie fixatrice d'azote *Frankia*, cette association engendre la formation de nodules ou « actinorhizes », au sein desquels *Frankia* transforme l'azote atmosphérique en ammoniac assimilable par la plante hôte. Ces bactéries se caractérisent par les gènes *nif* organisés en opéron *nifHDK* codant pour la nitrogénase, l'enzyme responsable de la fixation d'azote.

Le but de cette étude est l'identification de nouvelles souches de *Frankia* parmi nos isolats, qui ont été isolés à partir de nodules ou du sol prélevés dans la rhizosphère de *Casuarina equisetifolia* plantés dans des zones à caractère dégradé en Algérie. Par une extraction de l'ADNg des isolats à partir des cultures sur milieu liquide BAP (Fontaine 1986) afin de l'utiliser comme matrice pour amplifier une partie de la région *nif*, qui est une région très conservée dans le génome, pour l'identification des *Frankia* parmi nos isolats, une autre amplification consiste à amplifier la région intergénique *rrn* pour la caractérisation des actinomycètes entre elles et par rapport au témoin CcI3.

Mots clés : *Casuarina*, *Frankia*, Symbiose fixatrice d'azote, Plantes actinorhiziennes, Actinomycètes, gène *nif*.

Jury d'évaluation

Présidente du jury :	BOUSBA. R	M.C.A. Université des frères MENTOURI Constantine 1,
Rapporteur :	YKHLEF. N	Pr. Université des frères MENTOURI Constantine 1,
Examineurs :	BENABDOUN. F.M	M.A.A. Université des frères MENTOURI Constantine 1,

Année universitaire : 2014/2015