



Université Mohamed Khider de Biskra  
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie  
Département des sciences de la nature et de la vie

Référence ..... / 2021

# MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie  
Filière : Sciences biologiques  
Spécialité : microbiologie appliquée

---

Présenté et soutenu par :

**\*Lebbal Fatma      \* Bahaz Nesrine**

Le : lundi 28 juin 2021

## Thème

# Etude de la symbiose des actinorhiziennes en région aride

---

### Jury :

Titre	<b>Baba Arbi Souad</b>	M.C.B	Biskra	Rapporteur
Titre	<b>Fathi BENBELAID</b>	M.C.B	Université	Rapporteur
Titre	<b>Kenza MOHAMMEDI</b>	M.A.B	Université	Examineur

Année universitaire : 2020-2021

## Remerciement

Nous remercions **Allah** tout **puissant** qui nous a donné la santé, le courage et la patience afin de  
Pouvoir accomplir ce modeste travail.

Nous remercions notre encadreur **Mme BABA ARBI Souad**, Maitre de conférence à la faculté  
des sciences de la nature et de la vie, l'Université de Biskra pour son aide précieuse et ses  
conseils judicieux, ses observations et sa disponibilité qui nous ont été d'une grande utilité tout  
au long de ce travail nous lui assure le témoignage de mes profonde reconnaissance.

Des remerciements également aux **Membres du Jury**, président et examinateur, pour l'intérêt  
qu'ils ont porté à notre modique étude et pour avoir accepté d'examiner, d'évaluer et d'enrichir  
par leurs propositions, cette recherche.

Enfin, Nous tenons à exprimer notre sentiment de reconnaissance à toutes les personnes qui ont  
participé à ce Travail, qui nous avons appris une infinité de choses et qui nous avons aidé,  
conseillé et soutenu à tout Moment afin de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

## Dédicace

Je dédie humblement ce modeste travail

A mes très chers **Parents**

Qui ont toujours été là pour moi, m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance et qu'ils sont très fiers de ce que je suis aujourd'hui.

Qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude et mon amour pour leur soutien tout au long de mes études.

A la lumière de mon cœur et l'éclairage de mes yeux, à la source de la tendresse, à ma mère (Hazmani Cherifa ) Que Dieu le tout puissant te protège de tout mal, te préserve, t'accorde santé, bonheur au long de ta vie.

A mes chères sœurs **Fatiha** et **Habiba** pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.

A mes chers frères **Mourad, Nabil, Abd allatif, Ali, Mohammad** et ses épouses Salima, Sabrina, Sohaila, Khawla, Ikram et mes proches frères **Hamza et Abd al-Hadi** pour leur soutien, leurs encouragements à chaque instant .

Et toute les petites de ma famille: **Adam, Jaber, chaker, Mouadh, Meriem, Abd Raouf, Amine, Asma, Anise, Malak, Jalile, Salah Adine , Mohemmed** et surtout le petite garçons **Bilal**.

A mes adorable sœurs que j'aime de tout mon cœur : **Iman** et **Wafa**

Aux grandes familles: **Lebbal et Hazmani**

A mes très chères amies : **Imen, Rokia, khansa, Abir, Sozi, Besma, Manel, Aya, Sonia, Hana, Samia, Chaima, Asma, Amal, Rima, Mona, Sawsan, Zanoba, Safia**.

A ma chère binôme : **Nesrine**

A l'ensemble des **professeurs** qui m'ont suivi durant mes années d'études, de primaire jusqu'à l'université.

**LEBBAL FATMA**

## Dédicace

Je tiens à dédier ce travail :

A mon très **CHER PÈRE**

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquents soit-elles ne sauraient exprimer ma gratitude . Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, qui étudie de l'esprit et te protège de tout mal.

A ma très **CHÈRE MÈRE** :

Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes cotés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

A ma sœur : **Djihane**, et mes frères **Issam, Nessime, Farouk** .

A mes potes : **Mouna, Hafssa, Asma, Zanoobia, Aya, Romaisa** :Qui étaient toujours là pour moi

A ma TRÈS chère binôme : **Lebbal Fatma**.

A toute la famille de **Bahaz et Hachani**

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce mémoire soit possible, je vous dis merci.

**BAHAZ NESRINE .**

# Table des matières

Liste des figures.....	I
Liste des tableaux.....	II
Liste des abréviations .....	III
Introduction.....	1

## Première partie : Synthèse bibliographique

### Chapitre 01 : Généralités sur les Actinorhiziennes

1.1. La fixation symbiotique d'azote .....	3
1.2. Différents types des bactéries fixatrices d'azote.....	3
1.2.1. Les fixateurs symbiotiques.....	3
1.2.2. Les fixateurs libres .....	3
1.3. Symbiose <i>Frankia</i> – plant actinorhizienne .....	3
1.4. Généralité sur actinobactérie <i>Frankia</i> .....	4
1.4.1. Caractéristiques morphologiques de <i>Frankia spp</i> .....	4
1.4.2. Classification des <i>Frankia</i> .....	4
1.5. Définition et caractères généraux des plants actinorhiziennes .....	5
1.5.1. Morphologie des plants actinorhiziennes .....	5
1.5.2. Classification des actinorhiziennes .....	6
1.5.3. Rôle des plants actinorhiziennes .....	7
1.6. Physiologie de développement .....	7

## Chapitre 02 : La symbiose actinorhizienne

<b>2.1.</b> Établissement de la symbiose actinorhizienne.....	8
2.1.1. Pré-infection .....	8
2.1.2. Infection intracellulaire .....	8
<b>2.2.</b> Les facteurs influençant la nodulation .....	9
2.2.1. Les facteurs biotiques.....	9
2.2.2. Les facteurs abiotiques.....	9
<b>2.3.</b> Processus de fixation d'azote par la symbiose actinorhizienne.....	9
<b>2.4.</b> Intérêt de la symbiose actinorhizienne.....	10
2.4.1. Sur le plan symbiotique de l'azote .....	10
2.4.2. Sur le plan biotechnologique.....	10

## Deuxième partie : Partie expérimentale

### Chapitre 03 : Matériel et méthodes

<b>3.1.</b> Matériel.....	11
3.1.1. Matériel bactérienne .....	11
3.1.2. Matériel végétal .....	11
<b>3.2.</b> Méthodes.....	12
3.2.1. Méthode d'isolement des <i>Actinobactéries</i> à partir de sol.....	12
3.2.1.1. Purification et Conservation des <i>actinobacteries</i> .....	12
3.2.2. Méthode d'isolement des <i>Actinobactéries</i> à partir des nodules .....	12
<b>3.3.</b> Observation microscopique .....	13
<b>3.4.</b> Etude phénotypique .....	13

3.4.1. Teste d 'inefectivité.....	13
3.4.2. Teste d 'effectivité .....	14
3.4.3. les Tests physiologiques.....	14
3.4.3.1. Effet du pH.....	14
3.4.3.2. Effet de la température .....	14
3.4.3.3 . Tolérance au chlorure de sodium (NaCl) .....	14
3.4.4. Les testes biochimiques.....	15
3.4.4.1. L'activité chitinolytique.....	15
3.4.4.2. Activité cellulolytique.....	15
3.4.4.3. Activité antifongique.....	15
3.4.4.4. Activité antibactérienne.....	16
<b>3.5. Etude génotypique .....</b>	<b>16</b>
3.5.1. Extraction d'ADN génomique.....	16
3.5.2. Amplification du ADN <sub>r</sub> 16S .....	16
3.5.3. Séquençage d'ADN <sub>r</sub> 16S d'isolats d' <i>Actinobactéries</i> .....	18
3.5.4. Analyse phylogénétique d'ADN <sub>r</sub> 16S d'isolats d' <i>Actinobactéries</i> .....	18

## **Chapitre 04 : Résultats et discussion**

<b>4.1. Isolement des nodules .....</b>	<b>19</b>
<b>4.2. Isolement des souches de <i>Frankia</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>4.3. Identification des isolats .....</b>	<b>20</b>
<b>4.4. Etude morphologique.....</b>	<b>20</b>
4.4.1. Macromorphologique .....	20
4.4.2 Micro morphologique.....	21

<b>4.5.</b>	Etude phénotypique .....	24
4.5.1.	Teste d 'ineffectivite .....	24
4.5.2.	Teste d 'effectivité .....	25
4.5.3.	Les Tests physiologique .....	27
4.5.3.1.	Tolérance au pH .....	28
4.5.3.2.	Tolérance au température .....	29
4.5.3.3.	Tolérance au salinité.....	30
4.5.4.	Tests biochimiques .....	31
4.5.4.1.	L'activité chitinolytique :.....	31
4.5.4.2.	Activité cellulolytique .....	31
<b>4.6.</b>	Antagoniste contrée les agent pathogène.....	32
4.6.1.	Activité antagoniste contre les champignons phytopathogènes .....	32
4.6.2.	Activité antagoniste contre les Bactéries phytopathogènes.....	32
<b>4.7.</b>	Etude génotypique .....	33
4.7.1	Séquençage d'ADNr 16S d'isolats d' <i>Actinobactéries</i> .....	33
<b>Conclusion</b>	.....	37
<b>Références Bibliographiques</b>	.....	39

**Annexes**

**Résumés**

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Les nodules racinaires ramifiés de plant <i>casuarina equistifolia</i> (Marappa <i>et al.</i> ,2020). .....	19
<b>Figure 2:</b> la morphologie de <i>Frankia sp</i> avec microscopie inversé ( Marappa <i>et al.</i> ,2020). ...	22
<b>Figure 3:</b> Microphotographies des structures spécialisées de <i>Frankia</i> dans les souches AacI et AacIII cultivées dans un BAP sans azote (Caru' <i>et al.</i> ,2000).....	23
<b>Figure 4 :</b> Activité antibactérienne de la CgCHI3 recombinante (Graça <i>et al.</i> , 2016). .....	33

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Classification des actinomycètes selon (Marappa <i>et al.</i> (2020). .....	5
<b>Tableau 2:</b> taxonomie et répartition géographique des plants actinorhiziennes (Benabdoun, 2012). .....	6
<b>Tableau 3:</b> localisation des sites d'échantillonnages pour l'isolement a la recherche de <i>Frankia</i> . .....	11
<b>Tableau 4 :</b> la liste des amorces utilisé pour l'amplification .....	17
<b>Tableau 5:</b> programmes d'amplification par PCR . .....	17
<b>Tableau 6:</b> isolement d'actinobactéries par différents auteurs .....	20
<b>Tableau 7:</b> Pourcentage de plants nodulés après inoculation par des souches de <i>Frankia</i> . .....	24
<b>Tableau 8 .</b> Ineffectivité et efficacité des souches <i>Frankia</i> sur <i>A.glutineux</i> et <i>E.angustifolia</i> (Caru' <i>et al.</i> 2003). .....	26
<b>Tableau 10:</b> Croissance des souches de <i>Frakia</i> isolées à partire des plants actinorhiziennes. ....	27

## Liste des abréviations

<b>%GC</b>	Pourcentage En Guanine Et Cytosine.
<b>°C</b>	Degré Celsius.
<b>Abs550 nm/min</b>	L'absorbance Eté Mesurée Dans Un Spectrophotomètre A 550 Nm .
<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique.
<b>ADNr</b>	Acide Désoxyribonucléique Ribosomal.
<b>ARN</b>	Acid Ribonucléique.
<b>ARNr</b>	Acid Ribonucléique Ribosomal.
<b>ATB</b>	Antibiotique.
<b>BAP</b>	Buffered Mineral Medium Added Of Phosphatidylcholine.
<b>CMC</b>	La Carboxyle-Méthyle-Cellulose.
<b>CM Case</b>	L'enzyme Carboxyle-Méthyle-Cellulase.
<b>CM-chitine-RBV</b>	La Carboxyméthyl Chitine Remazol Brillant violet.
<b>DPM</b>	<i>Frankia</i> Defined Propionate Minimal Medium.
<b>EDTA</b>	Acide Ethylène Diamine Tétra acétique.
<b>FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>	Sulfate De Fer Sept Fois Hydraté.
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Mono potassium Phosphate.
<b>MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>	Sulfate De Magnésium Sept Fois Hydraté.
<b>NCBI</b>	National Centre For Biotechnology Information .
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Chlorure D'ammonium.
<b>PCA</b>	Phosphate De Potassium-Acide Citrique.

<b>PCR</b>	Polymérase Chaîne Réaction.
<b>PH</b>	Potentiel D'hydrogène.
<b>SARA</b>	l'activité de réduction de l'acétylène spécifique.
<b>SD</b>	standard déviation .
<b>T°</b>	Température.
<b>Tab</b>	Tableau.
<b>UFC</b>	Unité Formant Colonies.
<b>V/V</b>	Volume par Volume.

# **Introduction**

## Introduction

Pour faire face aux limitations d'azote, certaines plantes ont développé la capacité de fixer l'azote atmosphérique grâce à une interaction symbiotique avec les bactéries du sol. L'association la plus efficace et la plus intime conduit à la formation de nouveaux organes racinaires appelés nodules où les bactéries sont hébergées intracellulairement et fixent l'azote atmosphérique. Dans des conditions optimales (Varma *et al.*, 2013).

Les plantes fixatrices d'azote comme les espèces actinorhiziennes capables de pousser dans des sols pauvres et perturbés, sont largement utilisées 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).

Quant à *Frankia* l'actinobactérie à fixatrice d'azote qui forme une association symbiotique avec des plantes actinorhiziennes trouvées dans les nodules des racines ou à l'état libre dans le sol avec une croissance lente (Diagne *et al.*, 2013a).

Il faut également mentionner que cette forme de symbiose est bénéfique pour les plantes actinorhiziennes car il reçoit de *Frankia* l'azote qu'il ne peut pas fixer lui-même.

L'objectif de ce travail est l'isolement et la caractérisation des *actinomycètes* de genre *Frankia* non répertoriés isolés à partir des nodules des plantes actinorhiziennes ou à partir du sol pris dans la rhizosphère de l'arbre.

La présente étude, comporte :

Une partie bibliographique englobant les généralités sur les plantes actinorhiziennes et les actinobactéries fixatrices d'azote ; dans un premier chapitre et celles sur la symbiose actinorhizienne-*Frankia* et leur processus dans un deuxième chapitre.

Une partie expérimentale subdivisée en deux chapitres :

L'un présentant la rubrique « matériel et méthodes » apportant les détails sur la mise en place d'une étude phylogénétique et phénotypique de la symbiose actinorhizienne des plantes au région aride.

L'autre est basé sur le travail en laboratoire qui n'a malheureusement pas pu être effectué en raison de la crise sanitaire, provoquée par la pandémie virale « Covid-19 ». La rubrique « résultats et discussion » est donc une synthèse de recherche fondamentale arborant et discutant les résultats des publications scientifiques traitant d'un ou de plusieurs paramètres faisant l'objet de cette étude.

**Première partie :**  
**Synthèse bibliographique**

**Chapitre 01 :Généralité**  
**sur les plants**  
**actinorhiziennes**

## Chapitre 01 : Généralité sur les plants actinorhiziennes

### 1.1 La fixation symbiotique d'azote

A l'échelle mondiale le reste de l'azote fixé, environ 60% de 150 à 190 million de tonnes par an est représentée par la réduction de l'azote en ammoniac par des organismes vivant. Ce processus est connue sous le terme fixation biologique de l'azote. (Hopkins, 2003).

Les procaryotes qui fixent l'azote, nommés fixateurs d'azote : comprennent à la fois des organismes libres et des organismes qui forment des associations symbiotiques avec d'autres organismes.(Hopkins, 2003).

### 1.2 Différents types des bactéries fixatrices d'azote

#### 1.2.1 Les fixateurs symbiotiques

La fixation symbiotique d'azote implique des interactions anatomiques, morphologique et biochimiques importantes entre la plante hôte et les microorganismes qui l'envahissent (Weyens *et al.*, 2010).

- *Rhizobium* (bactérie) : chez légumineuses.
- *Frankia* (actinomycète) : chez l'aulne.
- Algues : chez les champignons (lichens) (Ndoye, 1990)

#### 1.2.2 Les fixateurs libres

Les microorganismes libres fixateurs d'azote sont assez nombreux (*Azotobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Methanomonadaceae*...). (Hopkins, 2003).

### 1.3 Symbiose *Frankia* –plant actinorhizienne

Symbiontes microbiens fixant l'azote atmosphérique et appartenant au genre *actinomycète Frankia* habitent des nodules racinaires de plantes ligneuses de huit familles d'*angiospermes non légumineuses* (Benson et Silvestre,1993 ; Benson et Clawson, 2000). Plantes capables de former une association symbiotique avec *Frankia* sont appelées plantes actinorhiziennes. Ils ont souvent un rôle important en tant que plantes pionnières dans la colonisation des sols pauvres en azote ou des sites perturbés l'entrée de nouvelles espèces après avoir augmenté la teneur en azote du sol (Baker et Schwintzer, 1990 ; Dawson ,1990).

#### 1.4. Généralités sur actinobactérie *Frankia*

Le genre d'actinobactérie *Frankia* appartient à la famille récemment modifiée des *Frankiaceae* (Taveres et Sellstedt, 2000). ces membres sont des actinobactérie du sol à Gram positif et fixatrices d'azote. Capable de former une symbiose actinorhizienne (Verghese *et al.*, 2002). Ceux qui nodulent sont environ huit familles de plantes représentant environ 25 genres de ligneux, dicotylédones, angiospermes vivaces appelés collectivement plantes actinorhiziennes. Le terme *actinorhizal* est donné aux nodules racinaires formés par *Frankia* (Verghese et Misra, 2000).

##### 1.4.1. Caractéristiques morphologiques de *Frankia spp*

Selon Huang et Benson (2012) Les colonies de *Frankia* sont différenciées en trois types cellulaires différents via (1) les hyphes, (2) les spores, et (3) des vésicules. *Frankia* est un actinobactérie de Gram positif à croissance lente (4 à 8 semaines). Les colonies sont incolores ou pigmentées selon le milieu et montrent une grande diversité de pigmentation. Les cellules peuvent être blanches, rouge foncé, grises, noires, vertes, marron ou jaune. Ils présentent un polymorphisme des colonies dans des milieux solides allant des étoiles de mer, formes diffuses ou compactes.

Les colonies sont mucilagineuses au centre, et en liquide moyen, sont ellipsoïdales ou sphériques.

La majorité des hyphes sont minces, mal ramifiés et forment des thalles denses compacts ou filamenteux minces. (Haansuu *et al.*, 2001).

Les sporanges sont ronds, cylindriques ou très irréguliers, compartimentés, vus par voie intrahyphale (Gtari *et al.*, 2013).

La présence de vésicules sous la forme d'hyphes gonflés est une caractéristique unique de genre *Frankia*. (Lee *et al.*, 2012).

##### 1.4.2 Classification des *Frankia*

La taxonomie des *Frankia* est basés sur l'ensemble des caractères morphologiques, physiologiques, chimio-taxonomiques, et moléculaire. (tab 1)

Morphologiques: selon le type de paroi cellulaire, *Frankia* a été placé sous le taxon Actinobactérie avec sporanges multiloculaires avec *Dermatophilus* et *Geodermatophilus*.

Physiologiquement: sont classés en deux groupes. Le groupe A comprend des groupes hétérogènes et divers et le groupe B contient des souches micro-aérophiles homogènes (Yamanaka et Mansour, 2013).

Les études cytochimies: L'analyse quantitative<sup>10</sup> de la composition totale des acides gras (Marappa *et al.*, 2020)

Moléculaire : détermination du (G+C) %, séquençage des gènes de l'ARN 16S....etc.

**Tableau 1:** Classification des actinomycètes selon (Marappa *et al.* (2020).

Unité de Classification	Appellation latine
Phylum	<i>Actinobacteria</i>
Ordre	<i>Actinomycetales</i>
Sous-ordre	<i>Frankineae</i>
Famille	<i>Frankiaceae</i>
Genre	<i>Frankia</i>

### 1.5 Définition et caractères généraux des plants actinorhiziennes

Le nom de plantes « actinorhiziennes » a été introduit en 1978, lors d'un symposium à l'Université de Harvard dans le Massachusetts Benabdoun, F. M. (2012).

Les plantes actinorhiziennes sont des plantes ligneuses dicotylédone, vivaient dans divers milieux aux premiers stades de la succession végétale et sont devenues des espèces pionnières.

Ces plantes ont colonisé les sols à faible teneur en azote (tels que les sols minéraux sableux, érodés et rugueux et les zones humides) (Carú *et al.*, 2002), elles ont la capacité de développer une symbiose au niveau de la racine avec des *actinobactérie* d'azote *Frankiae* (Benabdoun *et al.*, 2012).

#### 1.5.1. Morphologie des plants actinorhiziennes

Toutes les plantes actinorhiziennes sont des arbres ou des arbustes, sauf pour le genre *Datisca*, qui est herbacé Certaines espèces, comme *Dryasdrummondii* ou *Discarianana* affectent

même des formes prostrées, constituant des « assiettes » ou des « carpettes » appliquées fortement sur la surface du sol (wall, 2000) . D'autres, comme *Ceanothus prostratus* ont simplement un port rampant sous la forme arborescente. Les plantes actinorhiziennes peuvent atteindre la taille imposante. Il s'agit d'un cas de *casuarina (sensu lato)* ou de diverses espèces d'*aulne*. L'exemple de *Casuarina Cunninghamiana* présente souvent un arbre supérieur à 35 m du haut (Moiroud, 1996).

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 *ceanothe (Ceanothus dentatus)* (Benabdoun *et al.*, 2012).

### 1.5.2. Classification des plants actinorhiziennes

On distingue environ 200 espèces des plants actinorhiziennes regroupées en 8 familles : *Betulaceae*, *Casuarinaceae*, *Myricaceae*, *Elaeagnaceae*, *Rhamnaceae*, *Rosaceae*, *Coriariaceae* et *Datisceae*, et comprenant 25 genres (Carú *et al.*, 2002) (voir tableau 2).

**Tableau 2:** taxonomie et répartition géographique des plants actinorhiziennes (Benabdoun,2012).

Famille	Genre	Nombre Total d'espèces	Nombre D'espèces nodulantes	Origine géographique
<i>Betulaceae</i>	<i>Alnus</i>	47	47	Europe, Asie, Amérique du Nord, Les Andes
<i>Casuarinaceae</i>	<i>Allocasuarina</i> <i>Casuarina</i>	59 18	54 18	Australie Australie, Asie Tropicale, Pacifique Sud-ouest
<i>Datisceae</i>	<i>Datisca</i>	2	2	Asie, Amérique du Nord, Europe
<i>Rhamnaceae</i>	<i>Adolphia</i>	1	1	Amérique du Nord

Parmi les espèces à port d'arbrisseau celles vivant dans les zones semi-désertiques (par exemple diverses *Rhamnaceae* d'Amérique du Sud) sont pratiquement aphyllées et couvertes d'épines vigoureuses. À l'exception, Les deux espèces herbacées appartiennent au même genre *Datisca*. Ces deux espèces ont des aires très disjointes l'une *D. glomerata*, se rencontre en Californie alors que l'autre, *D. cannabina* a une aire plus vaste et se rencontre en abondance dans la région Himalayenne du Pakistan (Moiroud, 1996).

### 1.5.3. Rôle des plants actinorhiziennes

Jouent un rôle environnemental très important dans les régions arides et semi-arides, en particulier les *Casuarinacées equisetifolia*, *C. Cunninghamiana* et, *C. glauca* sont largement utilisées sous forme de barrières arbustives pour préserver les cultures vivrières du vent et de l'ensablement, et pour protéger les zones côtières des typhons et des tsunamis (Burleigh et Dawson, 1991; Moiroud, 1996 ) et enrichir les sols en éléments organiques dans des activités d'agroforesterie (Benabdoun *et al.*, 2012). Certaines espèces sont également résistantes à certains stress abiotiques comme les métaux lourds, la sécheresse (*Allocauarina decaisneana*), ou la salinité (*C. Glauca* et *C. Obesa*). (Benabdoun, F. M. 2012).

### 1.6. Physiologie de développement

Toutes les souches de *Frankia* ont une croissance lente avec un temps de génération allant de 20h à plusieurs journées. Ils sont mésophiles et poussent à une température de 28 à 37 ° C. Ils sont catalase positif et chimio-organotrophe (Zaïd *et al.*, 2003). Ils sont aérobies ou micro aérophiles (Lechevalier, 1994). Physiologiquement, *Frankia* est classée en deux groupes :

Le groupe A est une collection hétérogène de souches morphologiquement et chimiquement diverses. Ce sont pour la plupart des saprophytes aérobies du sol (Obertello *et al.*, 2003). Et Le groupe B est plus homogène. Ce sont pour la plupart des cellules incolores, micro aérophiles et ne peuvent pas être maintenu sur des inclinaisons.

La plupart de ces souches peuvent induire des nodules efficaces (fixateurs de N<sub>2</sub>) sur le racines de leur plante hôte d'origine. *Frankia* est souvent trouvé dans un sol dépourvu d'espèces végétales hôtes. On observe également une corrélation positive entre le pH et la population de *Frankia*. Il a été rapporté qu'un pH bas inhibe la nodulation. Une différence dans le métabolisme du carbone a été trouvé chez les membres de *Frankia*. L'acide propionique et le succinate sont de bonnes sources de carbone pour la croissance de *Frankia*. La Capacité à grandir en présence des sources d'azote organiques et inorganiques varient selon les souches de *Frankia* (Imanishil *et al.*, 2014). Le charbon actif est efficace pour augmenter le nombre de colonies avec des cultures plus anciennes.

# **Chapitre 02 : La symbiose actinorhizienne**

## Chapitre 2 : la symbiose actinorhizienne

### 2.1 Établissement de la symbiose actinorhizienne

#### 2.1.1 Pré-infection

La première étape vers la symbiose est la reconnaissance des symbiotes compatibles. La spécificité de l'hôte provient des deux partenaires (Varma *et al.*, 2013), commence par engendrant une courbure ou déformation des poils absorbants des racines (Annexe 5A) induit par un signal inconnue produit par *Frankia* (Obertello *et al.*, 2003). Certains sous-groupes de *Frankia* comme les souches « *Casuarina* » ont développé des niveaux élevés de spécificité et sont capables de nodulés seulement deux genres *Casuarinaceae*, et *Allocasuarina*. Côté plante, certains genres comme *Gymnostoma* (*Casuarinaceae*) acceptent une large gamme de souches de *Frankia*. La spécificité de l'hôte découle de la coévolution de la molécule signal bactérienne et du récepteur végétal (Varma *et al.*, 2013).

#### 2.1.2 Infection intracellulaire

Le processus d'infection de *Casuarina* et *Alnus* impliquant l'infection de poils racinaires (PERET, 2007), Les hyphes bactériens pénètrent ensuite dans la zone de courbure d'un poil racinaire, Suite à des divisions cellules corticales infectées par *Frankia* dans le cortex de la racine infectée, une structure appelée prénodule (Annexe 3A) est observée. (Obertello *et al.*, 2003). Le primordium nodulaire est ensuite initié à partir de divisions observées dans le péricycle de la racine dans une zone proche du prénodule (Annexe 3C) (perèt,2007).

Les hyphes vont ensuite progresser du prénodule vers les cellules corticales du lobe nodulaire (Annexe 3D) en formation Un nodule mature (Annexe 3E) est constitué de plusieurs lobes nodulaires, chacun possédant une vascularisation centrale, et un cortex organisé en plusieurs zones : zone méristématique, zone d'infection, et zone de fixation d'azote ; dans les nodules âgés, une zone de sénescence est observée (annexes 3 ). Des couches de cellules non infectées, riches en poly phénols, séparent les files de cellules infectées et induisent une compartimentation du lobe nodulaire chez *C. glauca* (Laplaze *et al.*, 1999).

## 2.2 Les facteurs influençant la nodulation

Bien que la plante ait un certain contrôle sur l'établissement de la symbiose et développement des nodules, il ne faut pas oublier que plusieurs facteurs abiotiques et biotiques peuvent influencer la nodulation chez les plantes actinorhiziennes.

### 2.2.1 Les facteurs biotiques

D'autres micro-organismes du sol semblent avoir un effet souvent positif sur la symbiose entre l'aulne et la *Frankia*. Par exemple, selon une étude sur *Alnus rubra*, la symbiose avec le champignon *ectomycorhiziens* augmenté le taux de nodulation de 30%. Plusieurs autres études sont parvenues à des conclusions similaires, sans surprise, car la symbiose fongique facilite l'approvisionnement en eau et en phosphore, protège la plante d'un certain stress et produit des phytohormones (Roy *et al.*, 2007; Bissonnette, 2011).

Il a également été démontré que certaines bactéries du sol, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Actinoplanes*, *Micromonospora*, et *Bacillus*, favorisent la nodulation chez les plantes actinorhiziennes, entre autres chez *Alnus rubra* et *Alnus glutinosa* (Knowlton et Dawson, 1983 ;Bissonnette, 2011). La présence des plantes non hôtes a proximité des plantes actinorhiziennes accroît aussi l'étendue de la nodulation (Chaia *et al.*, 2010).

### 2.2.2 Les facteurs abiotiques

Ils affectent également l'étendue de la nodulation actinorhizienne. Par exemple, si les conditions du sol sont acides, il existe une corrélation positive entre le nombre de nodules d'arbre par *Alnus* et le pH (Knowlton, 1983; Smolander, 1987). Le pourcentage d'humidité du sol est un facteur important. En effet, études récentes démontrent qu'en fonction du pourcentage d'humidité l'efficacité de la nodulation augmente, mais que les sols constamment inondés ne démontrent aucun signe d'ineffectivité (Bissonnette, 2011). Les sol riche en oxygène et Azote limité favorisent la nodulation (Burris *et al.*, 1991 ;Pawlowski *et al.*, 2007) .

## 2.3 Processus de fixation d'azote par la symbiose actinorhizienne

*Frankia* peut former trois types de cellules : les hyphes, les sporanges et les vésicules. Dans des conditions aérobies et une limitation de l'azote, des vésicules qui sont la zone de fixation de

l'azote produites aux extrémités des hyphes végétatifs en croissance ou des hyphes à côté court. Dans ces vésicules, le complexe enzymatique nitrogénase sensible à l'oxygène est formé et la fixation de l'azote a lieu (Lechevalier, 1994). Dans des conditions micro aérobie et une limitation de l'azote, *Frankia* exprime la nitrogénase dans les hyphes (Murry *et al.*, 1985).

Le processus de fixation d'azote est sensible à l'oxygène dans la mesure où la nitrogénase est rapidement irréversiblement dénaturée par l'oxygène (Gallon, 1981). Cependant, le processus de fixation de l'azote nécessite de grandes quantités d'énergie sous forme d'ATP, de préférence fournie par la respiration aérobie. *Frankia* peut fixer l'azote dans des conditions micro aérobie à l'état libre en exprimant la nitrogénase dans des vésicules (Parsons *et al.*, 1987).

Les vésicules sont entourées d'enveloppes constituées de plusieurs couches d'hypnoïdes, des lipides stéroïdes bactériens (Berry *et al.*, 1993). Comme le nombre de couches de l'enveloppe de la vésicule augmente avec la tension externe en oxygène, il a été conclu que l'enveloppe de la vésicule forme une barrière de diffusion de l'oxygène (Parsons *et al.*, 1987).

## **2.4 Intérêt de la symbiose actinorhizienne**

### **2.4.1 Sur le plan symbiotique de l'azote**

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 (Burleigh et Dawson, 1991).

### **2.4.2 Sur le plan biotechnologique**

L'extension de la capacité à établir des symbioses fixatrices d'azote en dehors des partenaires classiques par l'obtention de symbioses artificielles, serait une perspective relativement fondée dans le cas de *Frankia*. En effet cette dernière dispose en effet de mécanismes intrinsèques de protection de la nitrogénase grâce à la localisation de l'enzyme dans les diazo-vésicules (Harris et Silvestre, 1992) contrairement aux *Rhizobia*. D'autant plus que parmi les plantes hôtes naturellement associées avec *Frankia* figurent des Rosaceae, or cette famille comprend la majorité des arbres fruitiers (exemples : pomme, abricot, cerise, prune, pêche, poire).

# **Deuxième partie : Partie expérimentale**

# **Chapitre 03 :**

## **Matériel et Méthodes**

## Chapitre 3 : Matériel et méthodes

### 3.1 Matériel

#### 3.1.1 Matériel bactérienne

Les souche isolé à partir des nodules de Différent région dans le but d'identifier des souches et de les caractériser par une amplification de certaines parties du génome, plus ou moins conservées, à partir des extraits ADNg.

#### 3.1.2 Matériel végétal

L'échantillonnage a été réalisé dans la rhizosphère des plants suivant *Casuarina equisetifolia*, *Casuarina cunninghamiana*, *Casuarina spp*, *Colletia hystrix*, *Alnus glutinosa*, *Elaeagus angustifolia*, a la recherche des nodules actinorhiziennes. Des prospections sont effectuées sur cinq sites, le premier dans la région semi-aride in Australie, le deuxième au chine, ainsi que le troisième est à India et le quatrième a Centre chile, cinquième site USA (tableau 2).

**Tableau 3:** localisation des sites d'échantillonnages pour l'isolement a la recherche de *Frankia* .

Auteur	Plant Hot	Origine	Région	Méthode
Chaia <i>et al.</i> (2010)	<i>Casuarina equisetifolia</i> ,	Sol	Australie	Rouvier <i>et al.</i> (1996)
Marappa <i>et al.</i> (2020)	<i>Casuarinia spp</i>	Nodule	India	Gtari <i>et al.</i> (2015).
Zhang <i>et al.</i> (2012)	<i>Casuarina equisetifolia</i>	Nodule	Chine	Zhang <i>et al.</i> (2012)
	<i>Casuarina cunninghamiana</i>			
Chávez, M., &Carú, M. (2006)	<i>Colletia hystrix</i>	Nodule	Centre chile	Carú' ( 1993)
Carú' <i>et al.</i> (2002)	<i>Alnus glutinosa</i>	Nodule	Centre chile	Murry <i>et al.</i> (1984)
Carú' <i>et al.</i> (2003)	<i>Elaeagus angustifolia</i>	Nodule	USA	Baker (1987)

## 3.2 Méthodes

### 3.2.1 Méthode d'isolement des *Actinobactéries* à partir de sol

Pochon *et al.* (1962) et Chaia *et al.* (2010) pris 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 a une profondeur de 30 cm, sachant que les actinomycètes vivent généralement dans la couche superficiel de la terre.

Un gramme d'échantillon de sol séché à l'air est mélangé avec 0,1 gramme de carbonate de calcium 3 puis incubé à 28 ° C pendant 7 jours utilisés le milieu d'isolement des actinobactéries : Bennett (Boudemagh *et al.*, 2005). Des papiers filtres imbibé d'eau sont utilisées pour maintenir une humidité relative élevée (El-Nakeeb et Lechevalier, 1963). Ce sol est soumis à des températures élevées (jusqu'à 43 ° C) (Pochon *et al.*, 1962).

#### 3.2.1.1 Purification et conservation des *Frankia*

les plaques sont incubées à 28 ° C pendant 1 mois, Les colonies isolées ont été purifiées par repiquage successive et conservées à - 80 ° C à 20% v / v stocks de glycérol (conservation de longue durée).(Kieser *et al.*, 2000 ; Bentley et coll., 2002).

### 3.2.2 Méthode d'isolement des Actinobactéries à partir des nodules

L'isolement de *Frankia* a été effectué suivant la technique de Marappa *et al.* (2020) basé sur le principe de yamanaka et Mansour (2013) ; d'Gtari *et al.* (2015). Sitôt prélevés, les lobes des nodules de chaque plante hôte ont été lavés puis stérilisés superficiellement avec une solution aqueuse, Après stérilisation ces lobes ont été découpés aseptiquement en fragments minuscules. On a ensuite fait une suspension de ces fragments dans d'eau distillée stérile que l'on a étalée sur deux boîtes de Pétri chacun contient un milieu de croissance des *Frankia* l'une BAP (Murry *et al.*, 1984) et l'autre DPM (Baker et O'keef, 1984). (Annexe 2).

il a incubé des plaques inoculées à 28 ° C pendant 12 à 15 jours (Zhang *et al.*, 2012 ; Mansour *et al.*, 2017 ).

Parmi les chercheures, Carú' *et al.* (2002); Chávez, M. Carú, M. (2006) utilisé la même méthode pour l'isolement de *Frankia* à partir des nodule racinaires *Colletia hystrix* et *Alnus glutinosa* (*Betulaceae*) successivement.

Ils ont utilisé la méthode de Caru' (1993) qui lavé les nodule avec l'eau froid du robinet puis à l'eau distillé stérile ,et les lobes individuels lavé avec tween 80 stérilisé à l'éthanol et conservé à 20 ° C.

### 3.3 Observation microscopique

Selon le travail de *Gasmi et al.* (2019) Une observation microscopique après coloration différentielle au vert de malachite et à la safranine (méthode Schaeffer-Fulton) à été fait pour les colonies qui se rapprochent par leur aspect aux *Actinobactéries* ( la taille, la forme, la couleur, aspect ...etc.). Et observée avec un objectif × 100 sur des colonies en suspension dans l'eau de souches cultivées sur ISP-2 (*Kieser et al.* 2000) plaques d'agar pendant 7 jours.

### 3.4 Etude phénotypique

les isolats ont subi quelques Teste d'ineffectivité, d'effectivité et des tests phénotypiques, dans le but d'évaluer leurs caractères physiologiques et biochimiques.

#### 3.4.1 Teste d 'ineffectivité

Les graines utilisées dans le test est proviennent de différentes sources ; Car *Caru' et al.* (2003) utilisé des graines des plants actinorhiziennes diffèrent tandis que *Caru' et al.* (2000) a utilisé graines d'*Alnus glutinosa* de régions diffèrent en Frutillar, Région X, Chili .

Ces grains ont germé dans sable humide stérile. Les semis de 4 à 5 cm de hauteur ont été transférés individuellement dans un mélange stérile. Les semis ont reçu chaque semaine une solution de Hoagland sans azote à 1/4 de concentration pendant 3 semaines avant l'inoculation. Lorsque les plantes étaient âgées de 3 mois, et inoculées avec 5 ml d'une suspension de mycélium bactérienne homogénéisé contenant 3 g / ml de protéine totale dans même solution de Hoagland (*Selim et Schwencke*, 1995). Les plantes inoculées et non inoculés (témoins) ont été cultivées en pépinière avec des condition de cultivation qui été mentionnée par (*Caru' et al.*, 2003).

A la fin de cette période, le pourcentage de plantes nodulés a été déterminé avec divers autres paramètres tels que : le nombre de plantes nodulés, les nodules par plante, le poids sec des nodules, l'activité nitrogénase et le poids sec total des plantes *Caru' et al.* (2000)

### 3.4.2 Teste d 'effectivité

L'activité nitrogénase des nodules a été déterminée par le test de réduction d'acétylène suivant la méthode de Postgate (1972). En bref, les nodules de chaque plante ont été excisés et immédiatement exposés à un mélange air-acétylène à 10% dans des flacons scellés et incubés à 28 ° C pendant 20 h . La production d'éthylène a été mesurée dans un chromatographe en phase gazeuse (Caru' *et al.*, 2003).

L'activité nitrogénase spécifique dans la plante a été exprimée en nmol de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> produit par heure et par mg de poids sec de nodules (Caru' *et al.*, 2003).

### 3.4.3 les Tests physiologiques

#### 3.4.3.1 Effet du pH

Afin d'évaluer le pH optimal de croissance, les isolats à partir de *Alnus incana* (Smolander *et al.* 1988), de *Casuarina cunninghamiana* (Mansour, 2003) et à partir d'*Alnus glutinosa* sont cultivés sur milieu préparé avec la méthode de (Burggraaf et Shipton, 1982) avec différents pH (4- 6,5- 7- 8- 9.5) (Ngom *et al.*, 2016).

#### 3.4.3.2 Effet de la température

Dans le but de déterminer la température maximale de croissance, les isolats à partir des plants actinorhiziennes (Miettinen, 1993) les isolats ont été cultivés sur milieu liquide et effectués dans l'obscurité dans des conditions sans agitation et ont été poursuivis pendant 13 jours (Burggraaf et Shipton, 1982) à différentes températures (15- 25- 28- 30- 32- 35- 40 )°C (Ngom *et al.*,2016).

#### 3.4.3.3 Tolérance au chlorure de sodium (NaCl)

les isolats à partir de *Casuarina equisetifolia* (Dawson et Gibson, 1987) et de *Casuarina cunninghamiana* (Fouzia,1999) ont été cultivées dans un milieu de croissance basal propionate contenant différentes concentrations de NaCl (1%, 2%, 3%, 5%, 10%) pendant 14 jours et la croissance a été mesurée par la teneur totale en protéines cellulaires comme décrit ci-dessous. Le rendement de croissance a été déterminé en soustrayant la teneur en protéines de l'inoculum. (Oshone *et al.*, 2013).

### 3.4.4 Les testes biochimiques

Le but des tests biochimiques est de rechercher la présence de certaines enzymes qui jouent un rôle lors du processus d'infection des racines par les bactéries.

#### 3.4.4.1 L'activité chitinolytique

L'activité chitinase a été testée en utilisant un milieu gélosé synthétique (SM) avec 0,2 % de chitine colloïdale. Les plaques ont été incubées à 28°C et les zones d'éclaircissement de la chitine ont été enregistrées après 7 à 14 jours (Chernin *et al.*, 1995).

L'activité chitinolytique de la souche CgCHI<sub>3</sub> a été testée en utilisant le substrat (chitine) polymère, la CM-chitine-RBV, comme décrit par Wirth et Wolf (1992). L'activité spécifique a été définie en U/mg, avec l'unité d'activité (U) en Abs550 nm/min, calculée comme la vitesse initiale conformément à une augmentation exponentielle du premier ordre (Graça *et al.*, 2016).

#### 3.4.4.2 Activité cellulolytique

L'activité de la carboxyle-méthyle-cellulase (CMC) a été détectée selon Ghose (1987).

L'activité  $\beta$ -1,4-endoglucanase (cellulase) a été analysée en utilisant des sels de sodium de (CMC) dans de 50 mM (PCA) PH 5,2 comme substrat enzymatique, selon Chen *et al.* (2004) : incubation à 30 °C pour différents temps de réaction. Pour mesurer la production d'unités de sucre réducteur, 0,8 ml d'eau distillée et 1 ml de réactif BCA ont été ajoutés du mélange réactionnel précédent à 100 °C pendant 15 min (Waffenschmidt et Jaenicke. 1987). Les échantillons ont ensuite été refroidis à température ambiante pendant 10 min et l'absorbance a été mesurée à 570 nm (Graça *et al.*, 2016).

#### 3.4.4.3 Activité antifongique

L'activité antagoniste des souches *Frankia* contre la croissance des hyphes des champignons phytopathogènes été teste par deux méthode différent.

Méthode de Gtari *et al.* (2010) : a été réalisée sur un milieu de gélose dextrose de pomme de terre à un cinquième (PH 7 ; 0) en utilisant la méthode de diffusion par puits, la méthode de Jack *et al.* (1995), les diamètres de la zone d'inhibition ont été mesurés, après croissance suffisante de la souche indicatrice, comme décrit dans Ouzari *et al.* (2008).

Méthode de Graça *et al.* (2016): l'activité antifongique de l'enzyme chitinase extracellulaire contre Le mycélium de plusieurs champignons filamenteux phytopathogènes, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* et *Trichoderma viride* a été testé en mesurant le diamètre des zones dégagées sur des plaques de gélose à la chitine CCM.

#### **3.4.4.4 Activité antibactérienne**

L'activité des souches bactériennes vis-à-vis de la croissance des hyphes de *Fusarium sp a* été effectuée sur une pomme de terre d'un cinquième de concentration milieu gélosé dextrose (PH 7 ;0). Le criblage des activités croisées entre les isolats *actinobactériens*, *Pseudomonas*, *chromobacterium violaceum* et les souches *Frankia* ACN14a, CcI3 et EAN1 a été réalisé en utilisant la méthode de diffusion par puits (Jack *et al.*, 1995).

Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés, après croissance suffisante de la souche indicatrice, comme décrit dans Ouzari *et al.* (2008).

### **3.5 Etude génotypique**

#### **3.5.1 Extraction d'ADN génomique**

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir des lobes nodulaires broyés dans l'azote liquide en suivant le protocole de Bosco *et al.* (1996) ; Pearson *et al.* (2011).

Plusieurs méthodes d'extraction d'ADN ont été utilisées, y compris diverses solutions Rincer (certains avec de l'eau stérile, d'autres avec la solution de rinçage du kit Introduction) pour connaître la différence de pureté de notre extrait et déterminer le meilleur Technique.

#### **3.5.2 Amplification du ADN<sub>r</sub>16S**

Des amorces procaryotes spécifiques sont utilisés pour l'amplification ADN<sub>r</sub> 16S par PCR, c'est une technique de transcription ciblée qui permet une amplification Avec des amorces spécifiques. Les amorces utilisées pour amplifier l'ADN<sub>r</sub> 16S sont incluses dans le tableau 4.

**Tableau 4 :** la liste des amorces utilisé pour l'amplification .

Article	Cible	Amorce	Séquence nucléotidique
Marappa <i>et al.</i> (2020)	ARNr 16s	16.F27 R.765	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' 5'- CTG TTT GCT CCC CAC GCT TTC-3'
Chávez, M., et Carú, M. (2006)	ADNr 16s	FD 1 FGPL2054	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTCAG-3' 5'-CCG GGT TTC CCC ATT CGG-3'
Zhang <i>et al.</i> (2012)	ADNr 16s	27 f 1492 r	5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3' 5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'

Dans l'étude de Marappa *et al.* (2020); Chávez et Carú, (2006); Zhang *et al.* (2012) a amplifié le gène de l'ADNr 16S des isolats dans un cycle thermique en utilisant les amorces spécifiques pour chaque gène (tab 4).

Les réactions de PCR ont été réalisées avec un volume total de 50 µl à l'aide d'une ADN polymérase et homorésistante qui est basée sur le protocole proposé par Clawson *et al.* (1998) ; Chávez et Carú, (2006); ainsi que Mansour *et al.* (2017). et le programme utilise suit le déroulement suivant dans le tableau 5.

**Tableau 5:** programmes d'amplification par PCR .

PCR	35 cycle				1 Cycle
	Dénaturation initiale	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Elongation finale
Marappa <i>et al.</i> (2020)	94C°- 8min	94C°-1 min	65C°-1 min	72 C°-2 min	72 C°-10 min
Chávez et Carú, (2006)	95C°- 3min	94C°-1 min	50 C°-1 min	72 C°-1 min	72 C°-5 min
Zhang <i>et al.</i> (2012)	95 C°- 45 s	95 C°-30 s	55 C° -30 s	72 C°-2 min	72 C°- 7 min

A la fin de la PCR, les produits ont été soumis à une électrophorèse grâce à un gel d'agarose à 1% pour assurer la qualité ainsi pureté de que la amplicons (Zhang *et al.*, 2012 ; Marappa *et al.*, 2020).

Et pour le travail de Chávez et Carú. (2006) les produits sont Visualisé par électrophorèse à 1,2% (p / volume) d'agarose. Gels en TAE (Tris - acétate 40 mM, EDTA 1 mM) Tampon, suivi de bromure d'éthidium (0,5 lg / ml).

### **3.5.3 Séquençage d'ADNr 16S d'isolats d'*Actinobactéries***

D'après Chávez et Carú, (2006); Zhang *et al.* (2012); Marappa *et al.* (2020) Les amplicons ont été purifiés à l'aide de la boîte à outils PCR et séquençage, utilisé des séquenceur différent selon la méthode .

Les séquences obtenues ont été alignés et comparés en utilisant le multi-alignement par Logiciel Clustal W (Chávez et Carú, 2006; Marappa *et al.*, 2020).

### **3.5.4 Analyse phylogénétique d'ADNr 16S d'isolats d'*Actinobactéries***

Pour la détermination de l'arbre phylogénétiques d'isolats d'*Actinobactéries* basée sur la comparaison des séquences de l'ADNr16S Kumar *et al.* (2004).

# **Chapitre 04 :**

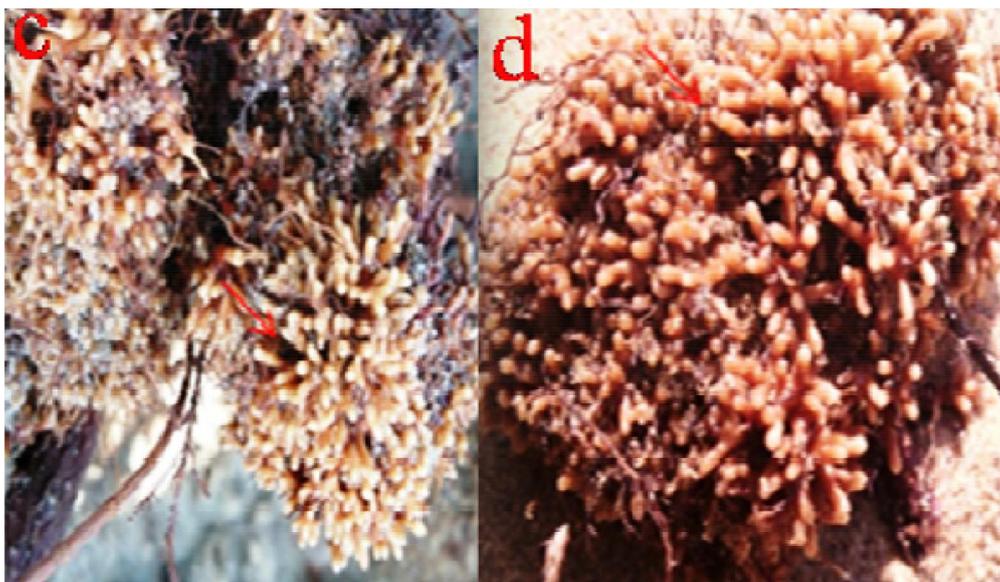
## **Résultats et discussion**

## Chapitre 4 : Résultats et discussion

Des ensembles des résultats sont obtenus à partir divers travaux choisis dans le but d'isoler et identifier des *actinobactéries* de différentes régions semi arides .

### 4.1 Isolement des nodules

Concernant Marappa *et al.* (2020), il a constaté que les nodules racinaires des sites d'échantillonnage de saumure que couleur brun à blanc d'une taille de 0,1 à 1,3 cm plus grande que les habitats d'échantillonnage terrestres brun foncé 0,5 à 1,5 cm. Les principales raisons de la différence de taille des nodules racinaires dans les zones hautement salines sont la salinité, le pH élevé, le type de sol et la valeur nutritionnelle effets. Ainsi, les résultats comparables actuels ont été rapportés par Karthikeyan *et al.* (2013).



**Figure 1:** Les nodules racinaires ramifiés de plant *casuarina equisetifolia* (Marappa *et al.*,2020).

### 4.2 Isolement des souches de *Frankia*

Au cours de l'étude de Zhang *et al.* (2012), 37 souches de *Frankia* sont isolées à partir des nodules de *C. Equisetifolia* et *C. Cunninghamiana* de la région de Chine dans le milieu de culture BAP, ce dernier est utilisé aussi par Carú *et al.* (2002) pour isoler 2 souches actinobactériennes à partir des nodules de la région de Chili des plantes hôtes *Colletia hystrix* et *Alnus glutinosa*, les

mêmes chercheurs en 2000 ont isolé deux souches à partir de plant hôte *Alnus acuminata* cultivé dans le milieu BAP.

Alors que Marappa *et al.* (2020) ont isolées 11 souches de la région de India en utilisant un autre milieu de culture appelé DPM (voir Tab 6).

**Tableau 6:** isolement d'actinobactéries par différents auteurs .

Article	Espèce de plant	Région Semi- aride	Milieu d'isolement	N° total d'isolats
Zhang <i>et al.</i> (2012)	<i>Casuarinia equisetifolia</i>	China	BAP	37
	<i>C. cunninghamiana</i>			
Carú <i>et al.</i> (2002)	<i>Colletia hystrix</i>	Chili	BAP	88
	<i>Alnus glutinosa</i>		BAP	2
Marappa <i>et al.</i> (2020)	<i>Casuarinia spp</i>	India	DPM	11
Caru <i>et al.</i> (2000)	<i>Alnus acuminata</i>	Argentine	BAP	2

### 4.3 Identification des isolats

Les différents auteurs ont passé pour identifier leurs isolats, par deux étapes principales, à savoir, une identification phénotypique qui regroupe l'identification morphologique, chimio taxonomique, qui est indispensable pour compléter l'identification des isolats au niveau du genre en plus des analyses morphologique et physiologique suivi par une identification moléculaire qui permette une connaissance plus précise de l'espèce étudiée.

### 4.4 Etude morphologique

#### 4.4.1 Macromorphologique

Les caractéristiques culturales des *actinobactéries* sont déterminées sur différents milieux de culture. observer à l'œil nu (Bouras *et al.*, 2008) .

Selon Marappa *et al.* (2020), Après 12 jours d'incubation, le transparent ou incolore à croissance rapide des colonies nuageuses blanches duveteuses en forme de fil sont apparues sur le

DPM plaques et flacons de culture. Une turbidité est apparue dans le milieu dans certains flacons, ce qui est indicatif de la présence d'autres contaminations microbiennes.

D'après Zhang *et al.* (2012), les souches étudiées se sont développées lentement et la croissance des hyphes a été observée après 4 semaines de culture statique en milieu non azoté milieu de croissance BAP. Les colonies étaient pour la plupart cotonneux et granuleux, Blanc.

#### 4.4.2 Micro morphologique

La micromorphologie des *actinobactéries* est réalisée par observation au microscope optique et parfois électronique des colonies poussant sur milieux de culture (Saker, 2015).

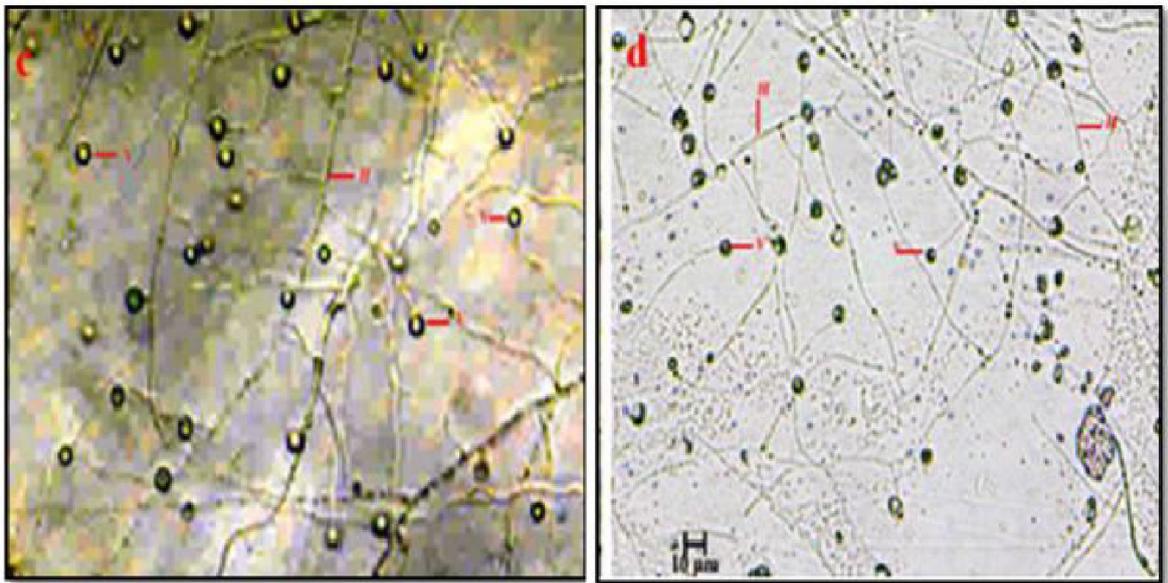
La description des résultats de l'étude micro morphologique des souches de *Frankia spp* isolé à partir des nodule de *casuarina spp* et *Alnus acuminata* après la coloration de Gram par Marappa *et al.* (2020); Caru' *et al.*(2000) dans le tableau 6 .

**Tableau 7:** Aspect microscopique des isolats de *Frankia* .

Auteur	Marappa <i>et al.</i> (2020)		Caru' <i>et al.</i> (2000)
colonies	filiformes blanches et nuageuses		
Observation	microscope à contraste de phase inversé		Microphotographies
l'habitat	hyper-salin	terrestres	Semi aride
hyphes et des vésicules	- cloisonnés plus ramifiés - taille : largeur de 0,5 à 1,5 mm	- cloisonnés moins ramifiés. - taille :très petits.	- ramifiés 0,9±1,5 Um - diamètre de vésicule 2,5 ± 3 Um.

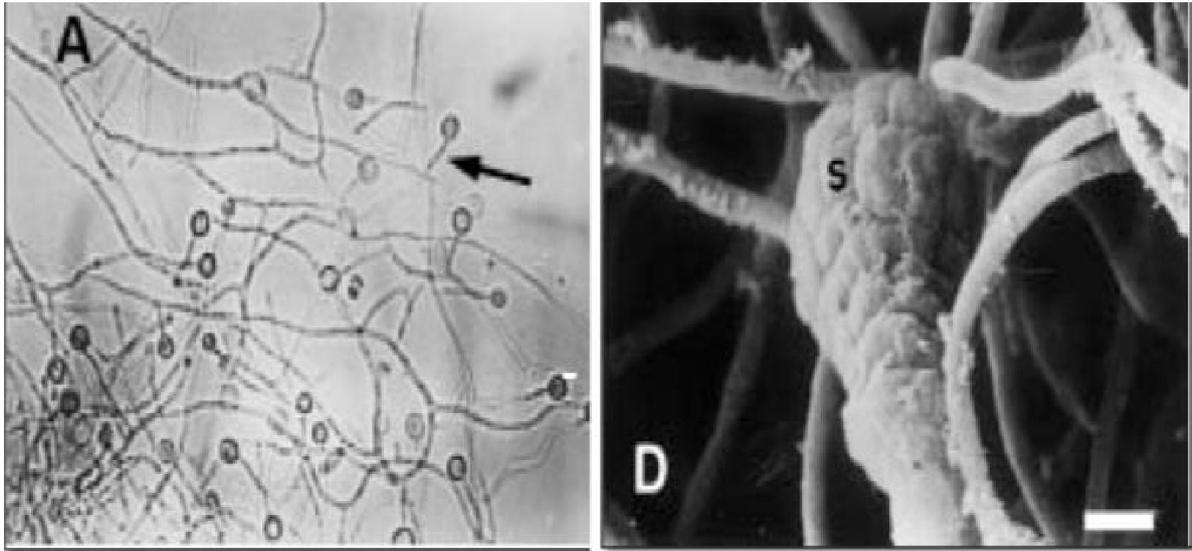
sporanges	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Forme irrégulière : sphériques, ovoïdes, cylindrique et en forme d'étoile de mer.</li> <li>- le plus grand nombre.</li> <li>- La gamme de diamètre était de 1,3 à 3.2 <math>\mu\text{m}</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Forme : moins irrégulière.</li> <li>- le plus petite nombre.</li> <li>- La gamme de diamètre était de 1,3 à 3.2 <math>\mu\text{m}</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Forme et taille variables sphériques moyennes</li> </ul>
-----------	--	--	---

Les caractéristiques morphologiques ont toujours été la base principale pour identifier *Frankia*. La présente étude de Lechevalier *et al.* (1983); Ganesh *et al.* (1994); Caru' *et al.* (2000); Marappa *et al.* (2020) ont observés diverses souches en microscopie et trouvé que les souches des actinobactéries présentaient structures typiques, y compris la ramification des hyphes, des sporanges et des vésicules ce qui confirme l'appartenance de ces isolats au groupe du genre *Frankia*. (Fig. 2 et Fig. 3).



**Figure 2:** la morphologie de *Frankia sp* avec microscopie inversée ( Marappa *et al.*,2020).

C / Hyphes septés matures avec vésicules. D / Structure claire des hyphes et des vésicules cloisonnés ramifiés dans culture sur lame (H-Hyphe, V-Vésicule, S-Sporanges).



**Figure 3:** Microphotographies des structures spécialisées de *Frankia* dans les souches AacI et AacIII cultivées dans un BAP sans azote (Caru' *et al.*,2000).

A / mycélium produit par AacI avec de nombreuses vésicules sur une tige d'hyphe (flèche), x400.

D / Gros sporange présentant le développement des spores x2439. La barre représente 3 Um.

Les résultats présentent une nette différence selon différents région semi aride , concernant Marappa *et al.* (2020) que les isolats indigènes de *Frankia* provenant d'un habitat hyper-salin ont un niveau élevé des vésicules que des habitats terrestres.

En outre, les isolats obtenus par Caru' *et al.*,(2000) ont montré une morphologie similaire à d'autres souches précédemment isolées de l'aulne (Lechevalier *et al.* 1983; Ganesh *et al.* 1994) et ont obtenu un niveau plus élevé de vésicules que Marappa *et al.* (2020), en raison à l'effet d'une forte concentration d'azote dans leur habitat naturel.

Les résultats présentent une nette différence selon différents région semi aride , concernant Marappa *et al.* (2020) que les isolats indigènes de *Frankia* provenant d'un habitat hyper-salin ont un niveau élevé des vésicules que des habitats terrestres.

En outre, l'isolats obtenus par Caru' *et al.* (2000) ont montré une morphologie similaire à d'autres souches précédemment isolées de l'aulne (Lechevalier *et al.* 1983; Ganesh *et al.* 1994) et

ont obtenu un niveau plus élevé de vésicules que Marappa *et al.* (2020), en raison à l'effet d'une forte concentration d'azote dans leur habitat naturel.

#### 4.5 Etude phénotypique

##### 4.5.1 Test d'ineffectivité

Afin de déterminer la gamme d'hôtes des souches indigènes de *Rhamnaceae*, ils ont utilisé une plante hôte des différentes familles d'actinorhiziens : *Alnus glutinosa* (*Betulaceae*), *Casuarina cunninghamiana* (*Casuarinaceae*), *Elaeagnus angustifolia* (*Eleagnaceae*) et *Alnus acuminata* (*Betulaceae*).

**Tableau 7:** Pourcentage de plants nodulés après inoculation par des souches de *Frankia* .

Auteur	Plantes Actinorhizienne	controle <sup>b</sup>	inoculum <sup>a</sup> souches					
			AacI II	ArI3	Allo2	Eu1b	ChI4	TqI15
Russo (1989)	<i>Alnus acuminata</i>	0	100	15	0	87	0	0
Caru' <i>et al.</i> (2000)	<i>A. glutinosa</i>	0	80	15	0	0	40	0
Caru' <i>et al.</i> (2003)	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	0	0	ND	0	100	100	100
Caru' <i>et al.</i> (2003)	<i>Casuarinia cunninghamiana</i>	0	0	0	100	0	0	ND

inoculum<sup>a</sup> : 5 ml de suspension bactérienne dans du Hoagland 1/4 concentré sans azote.

controle<sup>b</sup> : non inoculé. ND = Non déterminé. Nombre de plantes inoculées dans chaque essai = 20.

Le pourcentage de nodulation par les souches *Frankia* dans les essais d'inoculation croisée sur les quatre hôtes testés est dans le tableau 8. Les résultats de Caru' *et al.* (2003) ont montré que les souches Eu1b, ChI4 et TqI15 isolées de la famille des *Rhamnaceae* étaient capables

d'infecter *E. angustifolia* et présentaient un pourcentage élevé de nodulation (100%), ce pourcentage de nodulation étaient présentés lors l'inoculation de *C. cunninghamiana* par la souche Allo2 (Caru' *et al.*, 2003).

Tandis que Russo (1989) ; Caru' *et al.* (2000) ont montré que *A. glutinosa* et *Alnus acuminata* présentent différents pourcentages de nodulation étaient de (80 %) et (100%) successivement produit par la souche AacIII.

Le fait que même souche ait infecté des espèces de plantes différentes, valide la compatibilité entre le micro symbionte et l'hôte, et suggère que ces souches pourraient être de promiscuité dans leur infection. Une observation similaire a été faite par Russo (1989) qui a étudié l'interaction entre *Alnus acuminata*–*Frankia* souche ArI3 isolée à l'origine d'*Alnus rubra* et a montré que l'actinomycète était capable d'induire la formation normale de nodules sur cet hôte (Caru' *et al.*, 2003).

#### 4.5.2 Teste d'effectivité

Le potentiel de fixation d'azote *in planta* de la symbiose actinorhizienne a été évalué en termes d'activité de réduction de l'acétylène exprimée par heure et par poids sec de nodules. Les systèmes racinaires nodulés ont réduit l'acétylène, alors qu'aucune activité n'a été observée dans les plantes non inoculées, ce qui indique que les souches décrites ici sont efficaces avec degré différent (tableau 9). Cependant, des différences d'activité spécifique de la nitrogénase ont été observées entre les nodules obtenus à partir des cinq souches Caru' *et al.* (2000) .

Caru' *et al.* (2003) a confirmé les résultats de tableau 8 ; ils ont montré que la souche AacIII isolée d'*Alnus acuminata* pu établir une symbiose plus effective avec *A. glutinosa* , De même, la souche Eu1b isolée d'*Elaeagnus umbellata* et ChI4 isolée de *Colletia hystrix* formé une symbiose efficace avec *E. angustifolia* .

Les données de tableau 9 montrent également que l'interaction entre la souche isolée- *E. angustifolia* a induit un nombre plus élevé de nodules et une biomasse de nodules plus élevée par rapport aux paires souche isolée et *A. glutinosa* indiquant que les souches de *Rhamnaceae* semblent être plus infectantes sur l'hôte hétérologue que sur la plante hôte de *Rhamnaceae*.

**Tableau 8 .** Ineffectivité et efficacité des souches *Frankia* sur *A.glutineux* et *E.angustifolia* (Caru' et al. 2003).

Inoculum		Controle <sup>d</sup>	ChI4	TqI15	Eu1b	AacIII	ArI3
<i>Elaeagnus. angustifolia</i> <sup>a</sup>	N <sup>0</sup> nodules /plante	00	4.5±1.1	2.7±0.8	6.4±2.3	0.0	0.0
	PS nodules /plante (mg)	00	15.4±5.2	5.2±1.5	27.6±7.3	0.0	0.0
	SARA <sup>b</sup>	00	4±1.5	35.7±9.5	5.9±2.4	0.0	0.0
	Biomasse <sup>c</sup> végétale (mg)	293±47	452±70	342±70	384±68	ND	ND
<i>Alnus glutinosa</i> <sup>a</sup>	nodules /plante	0.0	0.0	0.0	0.0	14.9 ±3.7	1 ±0
	PS nodules /plante (mg)	0.0	0.0	0.0	0.0	26 ±4.7	6.3 ±1.1
	SARA <sup>b</sup>	0.0	0.0	0.0	0.0	9.8 ±1.8	3.8 ±0.9
	Biomasse <sup>b</sup> végétale (mg)	293 ±73	ND	ND	ND	311 ±64	235 ±91

Les plantules ont été inoculées avec une suspension bactérienne de 5 ml contenant 3 µg ml<sup>-1</sup> de protéines totales dans 1/4 Hoagland sans azote ± SD.

SARA<sup>b</sup> : SARA a été exprimée en nmol de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> poids sec par nodule ± SD.

Biomasse<sup>c</sup> végétale (mg) : Poids sec total de la plante.

Controle<sup>d</sup> : Le témoin correspond à des plantules non ensemencées.

Des Résultats similaire a été observé avec la capacité de fixation de l'azote (efficacité) . La seul souche qui induits la production des nodules sur les deux plantes hôtes est ChI4 où les nodules induits sur *E. angustifolia* présentaient en général une activité de réduction spécifique de l'éthylène (SARA) plus faible que les nodules d' *A. glutinosa* Caru' et al. (2003).

La souche ChI4 sur *A. glutinosa* a induit un faible nombre de nodules par plante mais le SARA le plus élevé par rapport *E. angustifolia* et aux souches témoins (AacIII et ArI3). Cependant, son SARA ne s'est pas directement répercuté sur la croissance de la plante (tab 9) Caru' *et al.* (2003).

Bien que la biomasse atteinte pour chaque groupe de plantes puisse être une conséquence directe des valeurs SARA (efficacité), cette corrélation n'est pas évidente. En effet, certaines plantes à biomasse élevée par rapport aux plantes témoins présentaient des nodules à faible SARA (par exemple ChI4 et sur *E. angustifolia*). Le fait que *Frankia* soit capable de fixer l'azote soit en symbiose soit à l'état libre, pourrait expliquer ces incohérences, donc à l'état non symbiotique la fixation d'azote pourrait également contribuer en partie à la croissance de la plante. En fait, *Frankia* pourrait être considérée comme une *rhizobactérie* favorisant la croissance des plantes actinorhiziennes (Mulongoy *et al.*, 1992).

#### 4.5.3 Les Tests physiologique

Plusieurs études se sont concentrées sur la survie des souches de *Frankia* sous divers pH et température d'après (Burggraaf et Shipton ,1982; Smolander *et al.*, 1988 ; Mansour ,2003 ; Gtari *et al.*, 2015 )(tab 10 ).

**Tableau 9:** Croissance des souches de *Frakia* isolées à partir des plants actinorhiziennes.

		Les plants hôte		
		<i>Alnus .incana</i>	<i>Casuarina equisetifolia</i> <i>C.cunninghamiana</i>	<i>Alnus .glutinosa</i>
PH	4	-	-	-
	6.5	++	-	+++
	7	++	++	+++
	7.5	-	+	+
	8	-	-	-
	9.5	+	-	-
T <sup>0</sup>	15	+	++	+
	25	+	+++	+
	28	+	+++	+
	30	+++	+++	+++
	35	-	++	++
	40	-	++	+

(-) : pas de croissance , (+) : croissance faible, (++) croissance modérée , (+++) croissance abondante.

#### 4.5.3 .1 Tolérance au pH

Concernant l'étude de Burggraaf et Shipton (1982) que la croissance des trois isolats de *Frankia* dans différentes conditions de pH à 28,5 °C a montré que la réponse du pH dépendait du tampon utilisé. Par exemple, le pH optimal pour la croissance était entre 6,5 et 7 pour les souches de *Frankia* isolées de nodules racinaires d'*Alnus glutinosa*. Au-dessus d'un pH de 7.5 et au dessous d'un pH de 6.5, aucune croissance n'a été observée pour la plupart des souches de *Frankia*.

En outre, les souches de *Frankia* isolées par Smolander *et al.* (1988) des nodules racinaires d'*Alnus incana* ont montré que le pH optimal pour la croissance était de 6,2 et 6,7 en culture pure et supérieur à 6 dans le sol.

Les souches de *Frankia* isolées se sont bien développées à un pH d'environ 7 à 7,5 contrairement à l'isolat. Il a montré un rendement de croissance optimal à pH 9,5 sans croissance à un pH inférieur à 6,5 selon l'étude de Gtari *et al.* (2015).

En ce qui concerne les recherches de Mansour (2003) sur l'effet des divers niveaux de pH sur la survie de six souches de *Frankia* en se basant sur la persistance de la capacité de nodulation chez *Casuarina*. La plupart des souches de *Frankia* avaient une capacité de nodulation plus élevée à pH neutre (7 - 7,5) dans les sols stériles et non stériles, et une capacité de nodulation plus élevée à pH 8 dans les sols sableux autoclaves et non autoclaves. La souche *Frankia* isolée à partir de nodules racinaires de *C. cunninghamiana* était significativement plus résistante au sol alcalin à pH 8,5 que les autres souches dans un sol autoclave. Un résultat similaire a été observé dans un sol non autoclave pour la souche *Frankia*, isolée de la même plante hôte.

Ensemble, ces études montrent que la réponse du pH pour *Frankia* dépendait de la souche et variait selon les conditions de culture. Néanmoins, la plage de pH pour une croissance optimale de la plupart des isolats de *Frankia* se situe entre 6 et 8, à l'exception de la souche isolée de *C. equisetifolia* récemment isolée, dont le pH optimal s'est avéré être de 9,5 (Gtari *et al.*, 2015).

#### 4.5.3.2 Tolérance au température

La température est l'un des facteurs les plus importants affectant survie bactérienne. En conséquence, il est crucial de cribler les isolats pour sélectionner les souches qui seront utilisées comme inoculum dans les climats tempérés (Sayed *et al.* 1997). La réponse de croissance des isolats de *Frankia* à différents régimes de température est bien documentée (tab10).

Burggraaf et Shipton, (1982) en déduire que : En culture liquide, la température optimale de croissance pour les isolats de *Frankia a partir d'Alnus glutinosa* été entre 30 et 35 °C. a également pu croître à plus basse température (entre 4 et 18 °C) contrairement aux deux autres isolats, une souche d'*Alnus glutinosa* a perdu son infection situé à 35 °C et à 40 °C en culture liquide.

Alors que l'isolats de Sayed *et al.* (1997) à partir de *Casuarina* ont présenté une croissance maximale entre 25 °C et 37 °C. Aucune croissance n'a été observée à 55 °C pour toutes les souches de *Frankia* testées alors que seulement trois souches ont montré une très faible croissance à 15 °C. Ces souches de *Casuarina* ont conservé leur ineffectivité à tous les régimes de température testés (25, 30, 35 et 40 °C) .

les souches qui tolèrent des températures plus élevées ont pu induire la formation de nodules dans les plantes même après avoir été conservées en gel à 40 °C pendant trois mois. Quelle que soit la souche *Frankia* utilisée, des nodules ne se sont pas formés sur les plantes inoculées avec *Frankia* conservées à 40 °C pendant six mois. Sous des températures élevées (50 °C) et basses (30 °C), la survie de six autres isolats de *Casuarina* a été déterminée par la persistance de leur capacité de nodulation (Mansour, 2003).

La plupart des souches de *Frankia* avaient une plus grande capacité de nodulation lorsqu'elles étaient stockées à des températures plus élevées. La formation et la germination des spores de *Frankia* peuvent aider à la survie de Les souches *Casuarina* à des températures plus élevées (Sayed *et al.*, 1997; Mansour , 2003).

La croissance d'un autre isolat d'*Alnus*, a été considérablement affecté à 32 °C avec une température optimale à 28 °C (Smolander et Sarsa,1990).

En général, les isolats de *Frankia* variaient dans leur tolérance à la température. Cependant, les souches *Casuarina* semblent être plus tolérantes aux températures élevées que les autres souches *Frankia*. Contrairement aux souches d'*Alnus*, les souches de *Casuarina* n'ont pas été affectées de manière significative en termes de croissance, d'inactivité et d'efficacité des plantes. La température de croissance optimale dépend de la souche et est également influencée selon les conditions de culture et de stockage (Ngom *et al.*,2016).

#### 4.5.3.3 Tolérance à la salinité

Les effets du stress salin sur la croissance et la physiologie des souches de *Frankia* isolées de plante actinorhizienne ont été rapportés par (Ngom *et al.* 2016).

La plus part d'isolats de Dawson et Gibson, (1987) de *Casuarina* sont capables de bien se développer dans un milieu contenant jusqu'à 200 mM de NaCl, mais n'ont pas poussé à 500 mM. La souche isolée de *C. equisetifolia* se développe dans un milieu contenant plus de 200 mM de NaCl (Tani et Sasakawa, 2003) qui a provoqué une augmentation des niveaux de sodium à l'intérieur des cellules de *Frankia* entraînant une déformation des hyphes (caractérisée par des hyphes plus épais et plus courts). À 500 mM de NaCl, la croissance est supprimée et accompagnée d'une désintégration des hyphes .

De côté opposé Une souche isolée de *C. cunninghamiana* semblent être plus tolérants au stress salin in vitro jusqu'à 500 mM de NaCl par (Fauzia, 1999) , présentant une valeur MIC de 1000 mM dans des conditions suffisantes d'azote (Oshone *et al.* 2013). Il était plus sensible au stress salin dans des conditions de carence en azote, avec une valeur MIC pour NaCl à 300 mM (Tani et Sasakawa, 2000).

La régulation de l'afflux de Na dans les hyphes courts et épais peut permettre aux cellules de résister aux environnements salins (Tani et Sasakawa, 2000). Plusieurs autres souches de *Frankia* isolées des plante proche d'*Alnus glutinosa* (Srivastava *et al.* 2013) ont montré cet effet. Ici, la régulation de l'absorption/efflux de Na et de la teneur en macronutriments intracellulaires était l'un des mécanismes permettant à ces souches sensibles au stress salin de se développer dans des conditions salines. (Tani et Sasakawa ,2000).

Bien que les isolats de *Frankia* aient présenté une diversité dans leur réponse au stress salin, les souches de *Casuarina* semblent être plus tolérantes aux souches de sel que les autres souches de *Frankia* étudiées (Ngom *et al.*, 2016).

#### 4.5.4 Tests biochimiques

##### 4.5.4.1 L'activité chitinolytique

La souche CgCHI3 isolée de *Casuarina glauca* par Graça *et al.* (2016) et la souche CgChi1 isolée de même plante ont montré une activité chitinolytique pour le substrat CM-Chitine-RBV à pH 5,4 et 37°C. De plus, la souche CgCHI3 a un profil cinétique similaire à celui obtenu par Saborowski *et al.* (1993) dans l'optimisation du test d'activité utilisé pour évaluer l'activité de la chitinase. En effet, l'évolution de l'absorbance à 550 nm en fonction du temps de réaction est linéaire jusqu'à 0,5 unité d'absorbance à un taux de  $7,3 \times 10^{-3}$  U contre  $4,8 \times 10^{-3}$  U pour la souche CgCHI3.

Dans ce étude ,le gène de la souche CgChI3 codant pour une chitinase de classe III et le gène de souche CgChi1 codant pour une chitinase de classe I Graça *et al.* (2016) , ont été isolé à partir de nodules racinaires de *Casuarina glauca* induits par des souches de *Frankia* fixatrice d'azot. au contraire, les souche isolée d'*alnus glutinosa*, aucun activité chitinolytique observé pour le substrat CM- Chitine-RBV.

##### 4.5.4.2 Activité cellulolytique

L'enzyme  $\beta$ -1,4-D-glucanase ou CMCCase est une enzyme qui joue un rôle dans la nodulation et la phase initiale du processus d'infection, (Marappa *et al.*, 2020); car cellulose est le principal composant des parois cellulaires végétales (Gtari *et al.*, 2010) .

L'activité de CgCHI3 et CgChi1 isolé de *Casuarina glauca* par Graça *et al.* (2016) vis-à-vis du substrat carboxyle-méthyle-cellulose pour évaluer l'activité 4-1,4-endoglucanase (cellulase) a également été testée. Une activité spécifique de  $73 \pm 18$  U/mg a été déterminée; ainsi que activité spécifique cellulolytique d'*Alnus glutinosa* indéterminé au cours de travail .

#### 4.6 Antagoniste contre les agents pathogènes

Les gènes des souches CgCHI3 ou CgChi1 présentant une activité de chitinase et cellulase sont unique et peut correspondre à une défense plus efficace contre les agents pathogènes ou dans un système optimisé impliqué dans le processus de symbiose. La plasticité enzymatique est souvent associée à la promiscuité des enzymes, malgré leur spécificité. La capacité à reconnaître et à métaboliser divers substrats peut représenter une évolution vers une meilleure efficacité catalytique d'après Graça *et al.* (2016).

##### 4.6.1 Activité antagoniste contre les champignons phytopathogènes

Les métabolites de *Frankia* isolée de *casuarinae* (1 mg/ml) par Marappa *et al.* (2020) ont été utilisés pour le test de concentration minimale inhibitrice contre champignons phytopathogènes *Candidia*, *Furasium* oxysporum et autres agents pathogènes. À mesure que des métabolites de *F. casuarinae* augmente progressivement, la croissance des agents pathogènes diminue. Par la suite, en atteignant le point cible de la CMI, la croissance de l'agent pathogène a été instantanément réduite. Compte tenu des valeurs de CMI de 62,5, les déterminations de 125 mg/ml ont révélé l'activité antimicrobienne in vitro efficace de *F. casuarinae* contre les deux agents pathogènes (Marappa *et al.*, 2020).

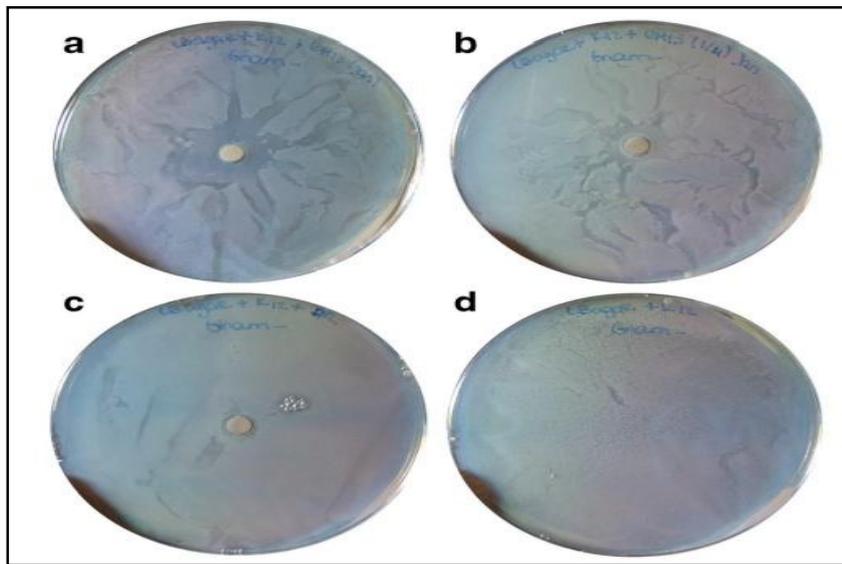
Autre auteurs comme Graça *et al.* (2016) ont testé l'activité antifongique de l'enzyme chitinase. L'importance des chitinases en tant que composants d'un mécanisme de défense des plantes a fait l'objet de plusieurs études (Graham et Sticklen 1994 ; Carstens *et al.*, 2003). La chitine, le substrat naturel de la chitinase, n'a pas été trouvée dans les plantes, mais est synthétisée par des organismes associés aux plantes, en particulier des champignons. En effet, comme discuté ci-dessus, la protéine recombinante décrite dans ce travail présente une activité chitinolytique.

Par conséquent, ils ont évalué plus avant son potentiel antifongique. Aucune inhibition de la croissance des hyphes fongique n'a été observée chez aucun des champignons phytopathogènes testés (données non présentées). L'absence d'activité antifongique a également été observée dans la chitinase acide de classe III (Rao et Gowda, 2008), démontrant que les champignons phytopathogènes testés résistent à cette enzyme (Graça *et al.*, 2016).

##### 4.6.2 Activité antagoniste contre les bactéries phytopathogènes

Certaines chitinases ont une activité plus élevée pour les peptidoglycanes bactériens que pour la chitine, et sont donc également classées comme lysozymes (Brunner *et al.*, 1998).

Ainsi, l'activité antimicrobienne de la souche CgCHI3 a été évaluée par Graça *et al.*(2016). Une inhibition de la croissance bactérienne a été observée, démontrant que les bactéries espèces sont sensibles à cette enzyme . Ces résultats sont en accord avec l'activité du lysozyme en suspension de la souche CgCHI3 a démontré ci- dessus (figure 4).



**Figure 4.** Activité antibactérienne de la CgCHI3 recombinante (Graça *et al.*, 2016).

Plaques contenant de la gélose LBensemencées avec l'espèce bactérienne en présence de CgCHI3 à 37°C. Un essai représentatif avec des cellules *E. coli* K12 est présenté. (a) : Enzyme pure ; (b) : Enzyme diluée 1:4 ; (c) et(d) :Contrôles de croissance positifs dans lesquels la solution enzymatique a été remplacée par du tampon et de l'eau, respectivement.

#### 4.7 Etude génotypique

Les analyses moléculaires sont très importantes pour retracer les parentés phylogénétiques des souches et pour la détermination des espèces. Ces analyses ont permis de regrouper ou de séparer ces espèces entre elles (Lamari, 2006).

##### 4.7.1 Séquençage d'ADNr 16S d'isolats d'Actinobactéries

D'après Zhang *et al.* (2012) ; Marappa *et al.* (2020) l'Amplification par PCR du gène ARNr 16S du représentant *Frankia spp.* a donné des amplicons d'une taille divers .

Néanmoins, le début de l'amplification de l'ADN et méthodes de séquençage, en particulier de l'ARNr 16S, matériel signifiait les normes fondamentales pour former la taxonomie position des *actinobactéries*.

La recherche d'homologie BLAST de séquences partielles de gènes d'ARNr 16S de l'isolat DDNSF-01 présentait une similarité de 95 %, l'isolat DDNSF-02 a montré une similitude plus élevée de 98% avec la référence existante *Frankia sp.*, qui exprime que deux isolats appartiennent au genre *Frankia* (Marappa *et al.*, 2020).

Marappa *et al.* (2020), en particulier l'isolat DDNSF-02 était étroitement apparenté à *Frankia casuarinae.*, alors que l'isolat DDNSF-02 partageait un relation phylogénétique avec l'isolat DDNSF-01 étroitement lié à *Actinobacterium* et *Frankia sp.*

ont été déposés dans GenBank dans la base de données NCBI avec l'accession numéros MH797558 et MH797559 respectivement.

Alors que Zhang *et al.* (2012) ont réalisé Une comparaison homologue des souches de *Frankia* avec les souches GenBank (par exemple, souche AcoN24d, FCg07, AVN17s, Cea5.1, Ea1-2, Sn4-3, FrCth, dont Genbank le numéro est L40610.1, AY502037.1, L40613.1, U72718.1, L40618.1, AJ408874.1, AF050759.1, respectivement) ont confirmé que les souches *Frankia* partageaient la plus grande homologie, avec un niveau de similitude supérieur à 97 %.

De plus, les arbres phylogénétiques du maximum de vrai semblance Les données de séquence du matériel génétique de l'ARNr 16S de 2 *Frankia spp.* séparément

Un certain nombre de chercheurs ont décrit l'efficacité de l'évaluation de la séquence du gène de l'ARNr 16S (en plus de classification phénotypique et chimio taxonomique) comme moyen de approuver le caractère unique des *actinobactéries* (Pawlowski et Demchenko, 2012 ; Sharma, 2014).

Le Tisa *et al.* (2016) enquête a utilisé des amorces bactériennes universelles sélectionné pour amplifier les séquences d'ADNr 16S de toutes les souches, et les séquences ont été comparées pour confirmer leur taxonomie. Souvent diverses enquêtes sur des souches de *Frankia* provenant de différents hôtes usines et différentes régions ont indiqué qu'il existe une variété de

génotypes au sein des groupes *Frankia* (Tomas *et al.*, 2012 ; Ngom *et al.*, 2016 ; Mansour *et al.*, 2017) respectivement.

Ainsi que Zhang *et al.*,(2012) Analyse phylogénétique utilisant étroitement souches apparentées et le logiciel DNASTAR ont révélé que la variation au niveau de la séquence d'ADN était suffisante pour faire la distinction entre différentes souches et groupes sous le genre *Frankia*.

d'autre part, les souches obtenues à partir de la même plante hôte et réparties dans la même région avaient la propension à grouper. Par exemple, ZCN55 et ZCN90 de *C. cunninghamiana* à Ningbo comprenait un monophylétique clade au sein de la phylogénie, tout comme ZCN1, ZCN7 et ZCN19 de *C. equisetifolia* à Wenzhou in china. Baker et Schwintzer (1990).

ont confirmé que l'actinomycète *Frankia* est capable de fixer l'azote atmosphérique et s'associe en symbiose au sein des nodules racinaires des plantes actinorhiziennes appartenant à huit familles de dicotylédones. Cela témoignait que *Frankia* possède une large gamme d'hôtes .

Des amorces Universel bactériennes ont été sélectionnées pour amplifier les 16S séquences d'ADNr de toutes les souches, et séquences ont été comparées pour confirmer leur taxonomie. les résultats montrent que le niveau de similarité génétique entre les souches de *Frankia* publiées était supérieur à 97 %, les confirmant comme *Frankia spp.* Études précédentes sur des souches de *Frankia* de différentes plantes hôtes et différentes régions ont indiqué qu'il existe une variété de génotypes au sein des groupes *Frankia* Clawson *et al.*, (2003) ; Gtari *et al.*, (2007) ; Mirza *et al.*, (2009). Cela a été confirmé dans ce présent étude, même au sein d'un même genre dans la région de la province du Zhejiang in china.

# **Conclusion**

## Conclusion

Dans notre travail nous sommes proposés d'étudier la forme de symbiose actinorhizienne chez quelque espèces dans des région aride et semi aride diverses . Les objectifs que nous étions fixés se résument comme suit : l'isolement des actinobactéries à partir des nodules actinorhiziennes d'une région aride et semi aride, identification morphologique y'a compris les caractères micro et macroscopique des actinobactéries, mise en évidence la nodulation et les facteur qui influence la croissance de *Frankia* nodulant et à la fin ont déterminé la phylogénie des souches des actinobactéries de genre *Frankia* isolée par la méthode de l'ARNr16s .

Les souches des auteurs suivant : Chaia *et al.* (2010); Zhang *et al.* (2012) ; Marappa *et al.* (2020) a été isolée et purifiée, les résultats d'isolement basée sur des caractéristiques morphologique des bactéries obtenues confirment que les actinobactéries isolées de différents échantillons de sols et nodules appartiennent au genre *Frankia*.

D'après les résultats de Russo (1989) ; Becerra *et al.* (2000) ; Caru' *et al.* (2003) on observe que la souche AacIII isolée d'*Alnus acuminata* a établie une symbiose plus effective avec *Alnus glutinosa* , De même, la souche Eu1b isolée d'*Elaeagnus umbellata* et ChI4 isolée de *Colletia hystrix* forment une symbiose efficace avec *Elaeagnus angustifolia* .

Mulongoy *et al.* (1992) ont confirmé qu'il n'y a pas une corrélation évidente entre la biomasse atteinte pour chaque groupe de plantes après la nodulation de *Frankia* et l'efficacité de nodulation (SARA) car *Frankia* soit capable de fixer l'azote soit en symbiose soit à l'état libre.

Sayed *et al.* (1997); Mansour(2003) ont trouvé que la température et le pH d'une croissance optimale dépend de la souche de *Frankia* isolée et de source d'isolement car la plus part des souche sont mésophile a croissance optimale a température moyenne et à pH neutre (6 - 8) sauf les souche isole de plante de genre *casuarina* peut survie à des températures plus élevées et à pH alcaline (9,5).

Tani et Sasakawa (2000) ; Ngom *et al.* (2016) ont convenu que les isolats de *Frankia* aient présenté une diversité dans leur réponse au stress salin, les souches de *Casuarina* semblent être plus tolérantes aux souches de sel que les autres souches de *Frankia* étudiées .

L'étude de (Gtari *et al.*, 2010 ; Graça *et al.*, 2016) donne des résultats que l'activité cellulolytique et chitinolytique sont bien déterminé pour les souche isole de *Casuarina glauca* plus que autre plante hôte actinorhizienne.

Après la comparaison des résultats de Marappa *et al.* (2020) l'analyse phylogénique avec des séquences de BLAST ils ont trouvé que le pourcentage de la similarité des souches DDNSF-01 est 95 % apparenté à *Frankia* sp ainsi que la souche DDNSF-02 à une similarité de 98% référé au *Frankia casuarinae* .

D'autre part Zhang *et al.*,(2012) ont réalisé Une comparaison des souches isolées avec les Souches de GenBank confirmé que la similarité est d'une grand niveau de similitude supérieur à 97 %.

Comme un conclusion générale de notre étude synthétique on peut dire que études précédentes sur les souches de *Frankia* isolée à partir différentes plantes hôtes actinorhiziennes et différentes régions mondial ont indiqué qu'il existe un variété de phénotypes et génotypes au sein des groupes *Frankia*. Ces résultats été confirmé par les travaux de Clawson *et al.* (2003) ; Gtari *et al.* (2007) ; Mirza *et al.* (2009).

# **Références bibliographiques**

## Références Bibliographiques

1. Ack R. W., Tagg J. R., Ray B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological reviews*, 59(2) : 171–200.
2. Baker D. 1987. Relationships among pure cultured strains of *Frankia* basé sur la spécification de l'hôte. *Physiol. Plante* 70 : 245–248.
3. Belanger P.A., Bissonnette C., Berndche-D'Amours A., Bellenger JP., Roy S. 2011. Assessing the adaptability of the actinorhizal symbiosis in the face of environmental change. *Environ Exp Bot* 74: 98-105 .
4. 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 : Biotechnologie, Biologie et Environnement. Thèse de l'obtention du Grade de Doctorat, Université MENTOURI, Constantine, 237 p.
5. Benson D. R., Silvester W. B. 1993. Biology of *Frankia* strains, *actinomycete* symbionts of actinorhizal plants. *Microbiological reviews* 57(2) : 293–319.
6. Benson D.R., Stephens D.W., Clawson M., Silvester W. 1996. Amplification of 16S rRNA genes from *Frankia* strains in root nodules of *Ceanothus griseus*, *Coriaria arborea*, *Coriaria plumosa*, *Discaria toumatou*, and *Purshia tridentata*. *Applied and environmental microbiology* 62 (8) : 2904-9 .
7. Bentley S. D., Chater K. F., Cerdeño-Tárraga A.-M., Challis G. L., Thomson N. R., James, K. D., ... Hopwood D. A. 2002. Complete genome sequence of the model *actinomycete* *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417(6885) : 141–147.
8. Boudemagh A., Kitouni M., Boughachiche F., Hamdiken H., Oulmi L., Reghioua S., ... Boiron P. 2005. Isolation and molecular identification of *actinomycete* microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, EL-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *Journal de Mycologie Médicale* 15(1) : 39–44.
9. Brunner F., Stintzi A., Fritting B., Legrand M. 1998. Substrate specificities of tobacco chitinases. *Plant J* 14: 225 – 234.
10. Burggraaf AJP., Shipton WA. 1982. Estimates of *Frankia* growth under various pH and temperature regimes. *Plant Soil* 69:135 – 147.
11. Burleigh S. H., Dawson J. O. 1994. Desiccation tolerance and trehalose production in *Frankia* hyphae. *Soil Biology and Biochemistry* 26(5) : 593–598.

12. Caré M., Mosquera G., Bravo L., Guevara R., Sepúlveda D., Cabello A. 2003. Infectivity and effectivity of *Frankia* strains from the *Rhamnaceae* family on different actinorhizal plants. *Plant and Soil* 251(2) : 219-225.
13. Carstens M., Vivier MA., Pretorius IS. 2003. The *Saccharomyces cerevisiae* chitinase, encoded by the CTS1-2 gene, confers antifungal activity against *Botrytis cinerea* to transgenic tobacco. *Transgenic Res* 12: 497 – 508 .
14. Carú M. 1993. Caractérisation du natif *Frankia* souches isolées d'arbustes chiliens (*Rhamnaceae*). *Plant Soil* 157 : 137–145.
15. Carú M., Becerra A., Sepúlveda D., Cabello A. 2000. Isolation of infective and effective *Frankia* strains from root nodules of *Alnus acuminata* (*Betulaceae*). *World J. Microbiol. Biotechnol* 13 : 219–224.
16. Chaia E., Wall L.G., Huss-Danell K. 2010. Life in soil by the actinorhizal root nodule endophyte *Frankia*. *Symbiosis* 51 : 201 - 226.
17. Chen P.J., Wei T.C., Chang Y.T., Lin L.P. 2004. Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from *Sinorhizobium fredii*. *Bot Bull Acad Sinica* 45:111 – 118.
18. Chernin L., Ismailov Z., Haran S., Chet I. 1995. Chitinolytic *Enterobacter* agglomerans antagonistic to fungal plant pathogens. *Appl Environ Microbiol* 61:1720 – 1726.
19. Clawson M., Carú M., Benson D.R. 1998 . Diversity of *Frankia* Strains in Root Nodules of Plants from the Families *Elaeagnaceae* and *Rhamnaceae*. *Applied and Environmental Microbiology* 64 : 3539 - 3543.
20. Dawson J. O., Gibson A. H. 1987. Sensitivity of selected *Frankia* isolates from *Casuarina*, *Allocasuarina* and North American host plants to sodium chloride. *Physiologia Plant* 70(2) : 272–278.
21. Dawson J. O., Gibson A. H. 1987. Sensitivity of selected *Frankia* isolates from *Casuarina*, *Allocasuarina* and North American host plants to sodium chloride. *Physiologia Plantarum* 70(2 ) : 272–278.
22. Diem H.G., Duhoux E., Zaid H., Arahou M. 2000. Cluster roots in *Casuarinaceae*: role and relationship to soils nutrient factors. *Ann. Bot* 85 : 929 - 936.
23. Diem H.G., Gauthier D., Dommergues Y.R. 1982. Extranodular growth of *Frankia* on *Casuarina equisetifolia*. *FEMS Microbiol Lett* 15:181–184.

24. EL-NAKEEB M. A., LECHEVALIER H. A. 1963. Selective isolation of aerobic *Actinomycetes*. *Applied microbiology* 11(2) : 75–77.
25. Fauzia H.Y., Hameed S., Malik., Kauser. 1999. *Frankia* and Rhizobium strains as inoculum for east growing trees in saline environment. *Pakistan Journal of Botany* 31 : 173-182.
26. Furnholm T., Beauchemin N., Tisa L. S. 2011. Development of a semi-high-throughput growth assay for the filamentous actinobacteria *Frankia*. *Archives of Microbiology* 194(1) : 13–20.
27. Ganesh G., Misra A.K., Chapelon C., Normand P.1994. Morphological and molecular characterization of *Frankia sp.* isolates from nodules of *Alnus nepalensis* Don. *Archives of Microbiology* 161 :152-155.
28. Ghodhbane-Gtari F., Beauchemin N., Louati M., Nouioui I., Ktari A., Hezbri,K., Kyrpides N. 2016. Permanent improved high-quality draft genome sequence of *Nocardia casuarinae* strain BMG51109, an endophyte of actinorhizal root nodules of *Casuarina glauca*. *Genome Announc* 4 (4) : 799 - 816.
29. Ghodhbane-Gtari F., Essoussi I., Chattaoui M., Chouaia B., Jaouani A., Daffonchio D., Boudabous A., Gtari M .2010. Isolation and characterization of non-*Frankia* actinobacteria from root nodules of *Alnus glutinosa*, *Casuarina glauca* and *Elaeagnus angustifolia*. *Symbiosis* 50:51–57.
30. Ghose T.K .1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem* 59: 257 – 268.
31. Graça I., Liang J., Guilherme M., Tavares P., Ferreira-Pinto M. M., Melo A. M. P., ... Pereira A. S. 2016. Cloning, over expression and functional characterization of a class III chitinase from *Casuarina glauca* nodules. *Symbiosis* 70(1-3) : 139–148.
32. Graham L.S., Sticklen M.B . 1994. Plant chitinases. *Can J Bot* 72: 1057 – 1083.
33. Gtari M., Tisa L.S., Normand P. 2013. Diversity of *Frankia* strains, actinobacterial symbionts of actinorhizal plants. *Symbiotic Endophytes* 123 - 148.
34. Gtari M., Brusetti L0, Hassen A., Mora D., Daffonchio D., Boudabous A. 2007a. Genetic diversity among *Elaeagnus* compatible *Frankia* strains and sympatric-related nitrogen-fixing *actinobacteria* revealed by *nifH* sequence analysis. *Soil Biol Biochem* 39: 372– 377.
35. Haansuu J.P., Klikak D., Soderholm P.P., Oberharinto V.V., Pihluja K., Haatela K.K., Vuorela P.M. 2001. Isolation and biological activity of *Frankia* mide. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* 27 : 62 - 66.

36. Hopkins L. D. 2003. Book Reviews. *Planning Theory*, vol .2(2). London, Thousand Oaks, CA and New Delhi . 153–157.
37. Huang Y., Benson D.R. 2012. Growth and development of *Frankia* spp. strain CcI3 at the single-hypha level in liquid culture. *Arch. Microbiol* 194 : 21- 28.
38. Imanishi L., Perrine-Walker F.M., Ndour A., Vayssières A., Conejero G., Lucas M. 2014. Role of auxin during intercellular infection of *Discaria trinervis* by *Frankia*. *Front. Plant Sci* 5 .
39. Karthikeyan A., Chandrasekaran K., Geetha M., Kalaiselvi R. 2013. Growth response of *Casuarina equisetifolia* Forst. Rooted stem cuttings of *Frankia* in nursery and field conditions. *J. Biosci* 38 : 741- 747.
40. Knowlton S., Dawson J. O. 1983. Effects of *Pseudomonas cepacia* and cultural factors on the nodulation of *Alnus rubra* roots by *Frankia*. *Canadian Journal of Botany* 61(11): 2877–2882.
41. Laplaze L., Gherbi H., Frutz T., Pawloski K., Franche C., Macheix J.J., Auguy F., Bogusz D., Duhoux E., Flavan –containing cells delimit *Frankia* –infected compartments in *Casuarina glauca* nodules ,*plant physiologie.*, Vol.121(1999),pp.113122.
42. Lee J., Postmaster A., Soon H.P., Keast D., Carson K.C. 2012. Siderophore production by *actinomycetes* isolates from two soil sites in Western Australia. *Biometals* 25 : 285 - 296.
43. Mansour S., Swanson E., McNutt Z., Pesce C., Harrington K., Abebe-Alele F., Tisa L.S. 2017. Permanent draft genome sequence for *Frankia* sp. strain CcI49, a nitrogen-fixing bacterium isolated from *Casuarina cunninghamiana* that infects Elaeagnaceae. *J. Genomics* 5 : 119 -127.
44. Mansour S.R . 2003. Survival of *Frankia* strains under different soil conditions. *Online J Biol Sci* 3:618 – 626.
45. Marappa N., Dharumadurai D., Nooruddin T., Mohammad Abdulkader A. 2020. Morphological, molecular characterization and biofilm inhibition effect of endophytic *Frankia* sp. from root nodules of Actinorhizal plant *Casuarina* sp. *South African Journal of Botany* 72-83.
46. Marappa N., Ramachandran L., Dharumadurai D. 2020. Plant Growth-Promoting Active Metabolites from *Frankia* spp. of Actinorhizal *Casuarina* spp. *Appl Biochem Biotechnol* 191 : 74–91 .

47. Miettinen P. 1993. The response of a free-living and an endophytic *Frankia* to extreme environmental conditions. *Symbiosis* 15:121 – 134.
48. Mirza B.S., Welsh A., Rieder J.P., Paschke M.W., Hahn D. 2009. Diversity of *Frankiae* in soils from five continents. *Syst Appl Microbiol* 32: 558–570.
49. Moiroud A. 1996. Diversité et écologie des plantes actinorhiziennes. *Acta Botanica Gallica* 143(7) : 651– 661.
50. Mulongoy K., Gianinazzi S., Roger P.A., Dommergues Y. 1992. Biofertilisants: impacts agronomiques et environnementaux et économie. Dans *Biotechnologie: aspects économiques et sociaux. Questions pour les pays en développement* Eds. EJ Da Silva, C Ratledge et A Sasson 55–69.
51. Murry M.A., Fontaine M.S., Torrey J.G. 1984. Growth kinetics and nitrogenase induction in *Frankia* sp. HFPArI.3 grown in batch culture. *Plant and Soil* 78(1-2) : 61- 78.
52. Ngom M., Diagne N., Laplaze L., Champion A., Sy M.O. 2016. Symbiotic ability of diverse *Frankia* strains on *Casuarina glauca* plants in hydroponic conditions. *Symbiosis* 70 (1-3) :79 - 86.
53. Ngom M., Oshone R., Diagne N., Cissoko M., Svistoonoff S., Tisa L. S., Champion A. 2016. Tolerance to environmental stress by the nitrogen-fixing actinobacterium *Frankia* and its role in actinorhizal plants adaptation. *Symbiosis* 70(1-3) : 17–29.
54. Nouioui I., Ghodhbane-Gtari F., Beauchemin N.J., Tisa L.S., Gtari M. 2011. Phylogeny of members of the *Frankia* genus based on gyrB, nifH and glnII sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 100 (4) : 579 - 589.
55. Nouioui I., Ghodhbane-Gtari F., Carmen Montero-Calasanz M., Rohde M., Tisa L.S., Gtari M., Klenk H.P. 2017. *Frankia inefficax* sp. nov., an *actinobacterial* endophyte inducing ineffective, non-nitrogen-fixing, root nodules on its actinorhizal host plants. *Antonie Van Leeuwenhoek* 110 (3) : 313 - 320.
56. Obertello M., Say M.O., Laplaze L. 2003. Actinorhizal nitrogen fixing nodules: infection process, molecular biology and genomics. *Afr. J. Biotechnol* 2 : 528 - 538.
57. Oshone R., Mansour S.R., Tisa L.S. 2013. Effect of salt stress on the physiology of *Frankia* sp strain CcI6. *J Biosci* 38: 699 – 702.

58. Ouzari H., Khsairi A., Raddadi N., Jaoua L., Hassen A., Zarrouk M., Daffonchio D., Boudabous A. 2008. Diversity of auxin producing bacteria associated to *Pseudomonas savastanoi*-induced olive knots. *J Basic Microbiol* 48: 370 – 377.
59. Pawalowski K., Sirrenberg A. 2003. Symbiosis between *Frankia* and actinorhizal plants: root nodules of non legumes. *Indian J. Exp. Biol* 4 : 1165- 1183.
60. Pawlowski K., Demchenko K.N. 2012. The diversity of actinorhizal symbiosis. *Protoplasma* 249 (4) : 967 - 979.
61. Pawlowski K., Bergman B. 2007. Plant Symbioses with *Frankia* and *Cyanobacteria*, *Biology of the Nitrogen Cycle* 165-178.
62. Péret B. 2007. transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *casuarina glauca* : physiologie végétale. thèse de doctora Discipline Université Montpellier II ,Constantine , 77 p .
63. Persson T., Benson D.R., Normand P. 2011. Genome sequence of candidatus *Frankia daticae* Dg1, the uncultured microsymbiont from nitrogen-fixing root nodules of the dicot *Datisca glomerata*. *J. Bacteriol* 193 : 7017 :7018.
64. Pochon J. 1962. Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Saint-Mandé: Editions de la Tourelle.
65. Postgate J.R. 1972. The acetylene reduction test for nitrogen fixation. In *Methods in Microbiology*, eds. Norris J.R. Ribbons D.W 6(B): 343– 356.
66. Ricardo A. 2013. Symbiotic Endophytes, Vol. 37, *Soil Biology* . Granada, Spain.pp. 90-93.
67. Rouvier C., Prin Y., Reddell P., Normand P., Simonet P. 1996 . 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. *Applied and environmental microbiology* 62(3) : 979–985.
68. Rouvier C., Schwencke J., Prin Y., Navarro E., Benoist P., Müller, A., ... Simonet P. 1996. Biologie et diversité génétique des souches de *Frankia associées aux Casuarinacées*. *Acta Botanica Gallica*143(7) : 567–580.
69. Roy S., Khasa D. P., Greer C. W. 2007. Combining alders, *Frankiae*, and mycorrhizae for the revegetation and remediation of contaminated ecosystems. *Canadian Journal of Botany* 85(3): 237–251.

70. Russo R.O. 1989. Evaluation alder-endophyte (*Alnus acuminata*–*Frankia*–*Mycorrhizae*) interactions. *Plant and Soil* 118 : 151–155.
71. Saborowski R., Buchholz F., Vetter RAH., Wirth SJ., Wolf GA. 1993. A soluble, dye-labelled chitin derivative adapted for the assay of krill chitinase. *Comp Biochem Physiol* 105: 673 – 678.
72. Sayed W. F. 2011. Improving *Casuarina* growth and symbiosis with *Frankia* under different soil and environmental conditions—review. *Folia Microbiologica* 56(1) : 1–9.
73. Sayed W. F., Wheeler C. T., Zahran H. H., Shoreit A. A. M. 1997. Effect of temperature and soil moisture on the survival and symbiotic effectiveness of *Frankia spp.* *Biology and Fertility of Soils* 25(4) : 349–353.
74. Selim S.H.,Schwencke J. 1995. Simple and reproducible nodulation test for *Casuarina*-compatible *Frankia* strains: Inhibition of nodulation and plant performance by some cations. *Arid Soil Res. Rehab* 9 : 25–37.
75. Smolander A., Sarsa M-L . 1990. *Frankia* strains of soil under *Betula pendula*: behaviour in soil and in pure culture. *Plant Soil* 122:129 – 136.
76. Smolander A., Sundman V. 1987. *Frankia* in acid soils of forests devoid of actinorhizal plants. *Physiol Plant* 70: 297–303.
77. Smolander A., Van Dijk C., Sundman V. 1988. Survival of *Frankia* strains introduced into soil. *Plant Soil* 106: 65 – 72.
78. Srivastava A., Singh S.S., Mishra A.K. 2013. Sodium transport and mechanism (s) of sodium tolerance in *Frankia* strains. *J Basic Microbiol* 53:163 – 174.
79. Tani C, Sasakawa H. 2000. Salt tolerance of *Elaeagnus macrophylla* and *Frankia* Emal strain isolated from the root nodules of *E. macrophylla*. *Soil Sci Plant Nutr* 46:927 – 937.
80. Tani C., Sasakawa H., Takenouchi K., Abe M., Uchiumi T., Suzuki A., Higashi S. 2003. Isolation of endophytic *Frankia* from root nodules of *Casuarina equisetifolia* and infectivity of the isolate to host plants. *Soil Science and Plant Nutrition* 49(1) : 137–142.
81. Tani C., Sasakawa H. 2003. Salt tolerance of *Casuarina equisetifolia* and *Frankia* Ceq1 strain isolated from the root nodules of *C. equisetifolia*. *Soil Sci Plant Nutr* 49:215 – 222.
82. Tavares F., Bernardo L., Sellstedt A. 2003. Identification and expression studies of a catalase and a bifunctional catalase-peroxidase in *Frankia* strain R43. *Plant and Soil* 254(1) : 75–81.

83. Tisa L.S., Oshone, R., Sarkar, I., Ktari, A., Sen, A., Gtari, M. 2016. Genomic approaches toward understanding the actinorhizal symbiosis: an update on the status of the *Frankia* genomes. *Symbiosis* 70 (1-3) : 5 -16.
84. Tiveness of *Frankia spp.* *Biol Fertil Soils* 25: 349 – 353.
85. Tromas A., Parizot B., Diagne N. 2012. Heart of endosymbioses: transcriptome analysis reveals conserved genetic programme between arbuscular *mycorrhizal*, *actinorhizal* and *legume-rhizobial* symbioses. *PLoS* 7, 44 - 42.
86. Varghese R., Chauhan V. S., Misra A. K. 2003. Hypervariable spacer regions are good sites for developing specific PCR-RFLP markers and PCR primers for screening actinorhizal symbionts. *Journal of Biosciences* 28(4) : 437–442.
87. Verma R., Oania R. S., Kolawa N. J., Deshaies R. J. 2013. Cdc48/p97 promotes degradation of aberrant nascent polypeptides bound to the ribosome. *eLife* 2- 308.
88. Waffenschmidt S., Jaenicke L. 1987. Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2,2'-bichinoninate. *Anal Biochem* 165: 337 – 340.
89. Wall L.G. 2000. The actinorhizal symbiosis. *Plant Growth Regul* 19 : 25 - 26.
90. Wirth S. J., Wolf G. A. 1992. Micro-plate colourimetric assay for Endo -acting cellulase, xylanase, chitinase, 1,3- $\beta$ -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. *Soil Biology and Biochemistry* 24(6) : 511–519.
91. Yamanaka T., Mansour S.R. 2013. Nodulation of *Alnus japonica* and *Casuarina equisetifolia* in liquid culture after inoculation with *Frankia*. *Bull. FFPRI* 12 : 97 – 103.
92. Zaid E.H., Arahou M., Diem H.G., Morabet R. 2003. Is Fe deficiency rather than P deficiency the cause of cluster root formation in *Casuarina* species. *Plant Soil* 248 : 229 - 235.
93. Zhang X., Shen A., Wang Q., Chen Y. 2012. Identification and nitrogen fixation effects of symbiotic *Frankia* isolated from *Casuarina spp.* in Zhejiang. China. *African Journal of Biotechnology* 11 (17) : 4022–4029.

# **Annexes**

## Annexes

**Annexe 1 .** Tableau présentant les articles scientifiques servant de support à la réalisation de la partie expérimentale de la présente étude (par ordre chronologique ).

N°	Titre	Auteurs
1	Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Editions de la Tourelle	Pochon <i>et al.</i> (1962)
2	Estimates of <i>Frankia</i> growth under various pH and temperature regimes.	Burggraaf et Shipton (1982)
3	Cinétique de croissance et induction de la nitrogénase dans <i>Frankia sp.</i> HFPArI.3 cultivé en culture par lots	Murry <i>et al.</i> (1984)
4	Survival of <i>Frankia</i> strains introduced into soil.	Smolander <i>et al.</i> (1988)
5	Relationships among pure cultured strains of <i>Frankia</i> basé sur la spécification de l'hôte.	Baker (1987)
6	Tolerance to environmental stress by the nitrogen-fixing actinobacterium <i>Frankia</i> and its role in actinorhizal plants adaptation	Baker et o'keef (1987)
7	Measurement of cellulase activités	Ghose <i>et al.</i> (1987)
8	Sensitivity of selected <i>Frankia</i> isolates from <i>Casuarina</i> , <i>Allocasuarina</i> and North American host plants to sodium chloride	Dawson et Gibson (1987)
9	Effect of temperature and soil moisture on the survival and symbiotic effectiveness of <i>Frankia</i> spp.	Sayed <i>et al.</i> (1997)
10	Evaluation alder-endophyte ( <i>Alnus acuminata</i> – <i>Frankia</i> – <i>Mycorrhizae</i> ) interactions.	Russo (1989)
11	Bio fertilisants: impacts agronomiques et environnementaux et économie. Dans Biotechnologie: aspects économiques et sociaux. Questions pour les pays en développement Eds. EJ Da Silva, C Ratledge et A Sasson	Mulongoy <i>et al.</i> (1992)
12	Micro-plate colorimetric assay for Endo-acting cellulase, xylanase, chitinase, 1,3- $\beta$ -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons.	Wirth et Wolf (1992)

13	Characterization of native <i>Frankia</i> strains isolated from Chilean shrubs ( <i>Rhamnaceae</i> ).	Caru'(1993)
14	The response of a free-living and an endophytic <i>Frankia</i> to extreme environmental conditions.	Miettinen (1993)
15	Chitinolytic <i>Enterobacter agglomerans</i> antagonistic to fungal plant pathogens.	Chernin <i>et al.</i> (1995)
16	Bacteriocins of gram-positive bacteria.	Jack <i>et al.</i> (1995)
17	PCR-RFLP fingerprint of uncultured <i>Frankia</i> Microsymbiotes from <i>Dryas Drummondii</i> nodules.	Bosco <i>et al.</i> (1996)
18	Genetic diversity among <i>Frankia</i> strains nodulating members of the family <i>Casuarinaceae</i> in Australia revealed by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis with crushed root nodules	Rouvier <i>et al.</i> (1996)
19	<i>Frankia</i> and <i>Rhizobium</i> strains as inoculum for fast growing trees in saline environment.	Fauzia (1999)
20	Flavan –containing cells delimit <i>Frankia</i> –infected compartments in <i>Casuarina gluca</i> nodules .	Laplaze <i>et al.</i> (1999)
21	Salt tolerance of <i>Elaeagnus macrophylla</i> and <i>Frankia</i> Emal strain isolated from the root nodules of <i>E. macrophylla</i> .	Tani et Sasakawa (2000)
22	Ineffectivité et efficacité de <i>Frankia</i> souches de la famille des <i>Rhamnaceae</i> sur différentes plantes actinorhiziennes	Carú' <i>et al.</i> (2002)
23	Infectivity and effectivity of <i>Frankia</i> strains from the <i>Rhamnaceae</i> family on different actinorhizal plants.	Caru' <i>et al.</i> (2003)
24	Salt tolerance of <i>Casuarina equisetifolia</i> and <i>Frankia</i> Ceq1 strain isolated from the root nodules of <i>C. equisetifolia</i>	Tani et Sasakawa (2003)
25	Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from <i>Sinorhizobium fredii</i> .	Chen <i>et al.</i> (2004)
26	Isolation and molecular identification of <i>actinomycete</i> microflora, of some Saharian soils of south east Algeria (Biskra, EL-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains.	Boudemagh <i>et al.</i> (2005)

27	Genetic diversity of <i>Frankia</i> microsymbionts in root nodules from <i>Colletia hystrix</i> (Clos.) plants by sampling at a small-scale.	Chávez et Carú (2006).
28	. Plant Symbioses with <i>Frankia</i> and <i>Cyanobacteria</i>	Pawłowski et Bergman(2007)
29	transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical <i>casuarina glauca</i> .	Péret (2007)
30	Life in soil by the actinorhizal root nodule endophyte <i>Frankia</i> . A review.	Chaia <i>et al.</i> (2010)
31	Identification and nitrogen fixation effects of symbiotic <i>Frankia</i> isolated from <i>Casuarina spp.</i> in Zhejiang, China.	Zhang <i>et al.</i> (2012)
32	Nodulation of <i>Alnus japonica</i> and <i>Casuarina equisetifolia</i> in liquid culture after inoculation with <i>Frankia</i> .	Yamanaka et Mansour (2013).
33	Cultivating the uncultured: growing the recalcitrant cluster-2 <i>Frankia</i> strains.	Gtari' <i>et al.</i> (2015)
34	Cloning, over expression and functional characterization of a class III chitinase from <i>Casuarina glauca</i> nodules	Graça <i>et al.</i> (2016)
35	Symbiotic ability of diverse <i>Frankia</i> strains on <i>Casuarina glauca</i> plants in hydroponic conditions.	Ngom <i>et al.</i> (2016)
36	Tolerance to environmental stress by the nitrogen-fixing <i>actinobacterium Frankia</i> and its role in actinorhizal plants adaptation.	Ngom <i>et al.</i> (2016)
37	Permanent draft genome sequence for <i>Frankia sp.</i> strain CcI49, a nitrogen-fixing bacterium isolated from <i>Casuarina cunninghamiana</i> that infects <i>Elaeagnaceae</i> .	Mansour <i>et al.</i> , 2017
38	Chitinolytic <i>actinobacteria</i> isolated from an Algerian semi-arid soil: development of an antifungal chitinase-dependent assay and GH18 chitinase gene identification.	Gasmi <i>et al.</i> (2019)
39	<i>Frankia</i> . Beneficial Microbes in Agro-Ecology.	Narayanasamy <i>et al.</i> (2020 )
40	Plant growth promoting active metabolites from <i>Frankia spp.</i> of actinorhizal <i>Casuarina spp.</i>	Narayanasamy <i>et al.</i> (2020 )
41	Morphological, molecular characterization and biofilm inhibition effect of endophytic <i>Frankia sp.</i> from root nodules of Actinorhizal plant <i>Casuarina sp.</i>	Marappa <i>et al.</i> (2020)

**Annexe 2 . les milieux d'isolement utilisé**

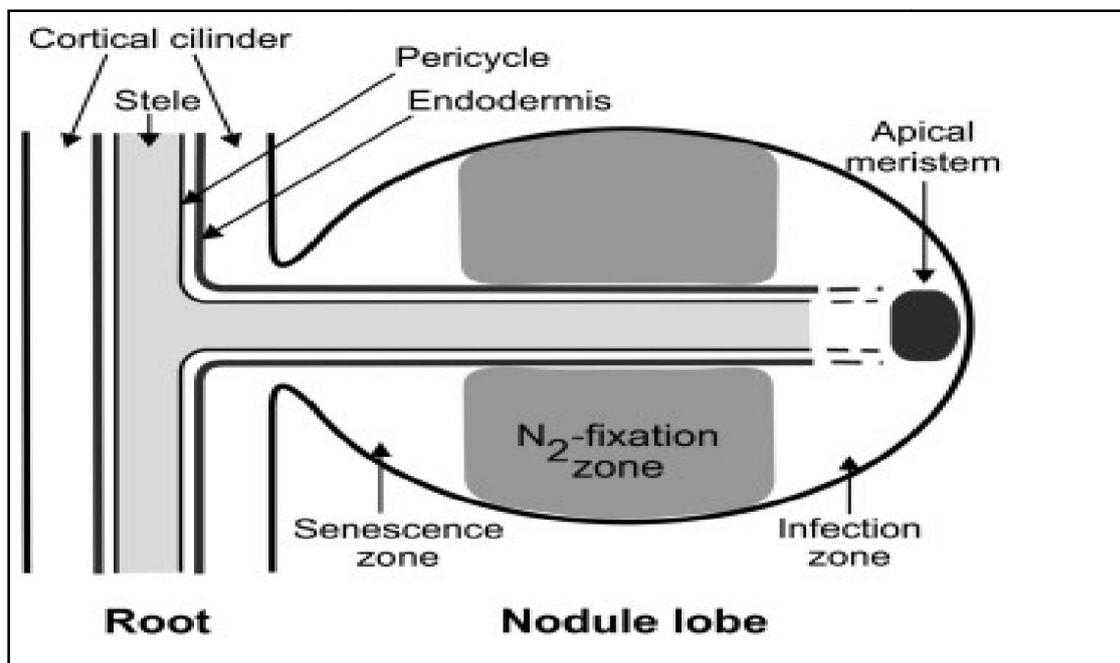
## 1. Composition du milieu DPM ( baker et O'keef,1984).

<b>Composant / L</b>	<b>DPM-N</b>	<b>DPM+N</b>
Na Propionate	1.2 g	1.2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 g	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.1 g	0.1 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.01 g	0.01 g
NH <sub>4</sub> Cl	/	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/EDTA stock	1.0 ml	1.0 ml
Micro-éléments	1.0 ml	1.0 ml
Agar	15 g	15 g

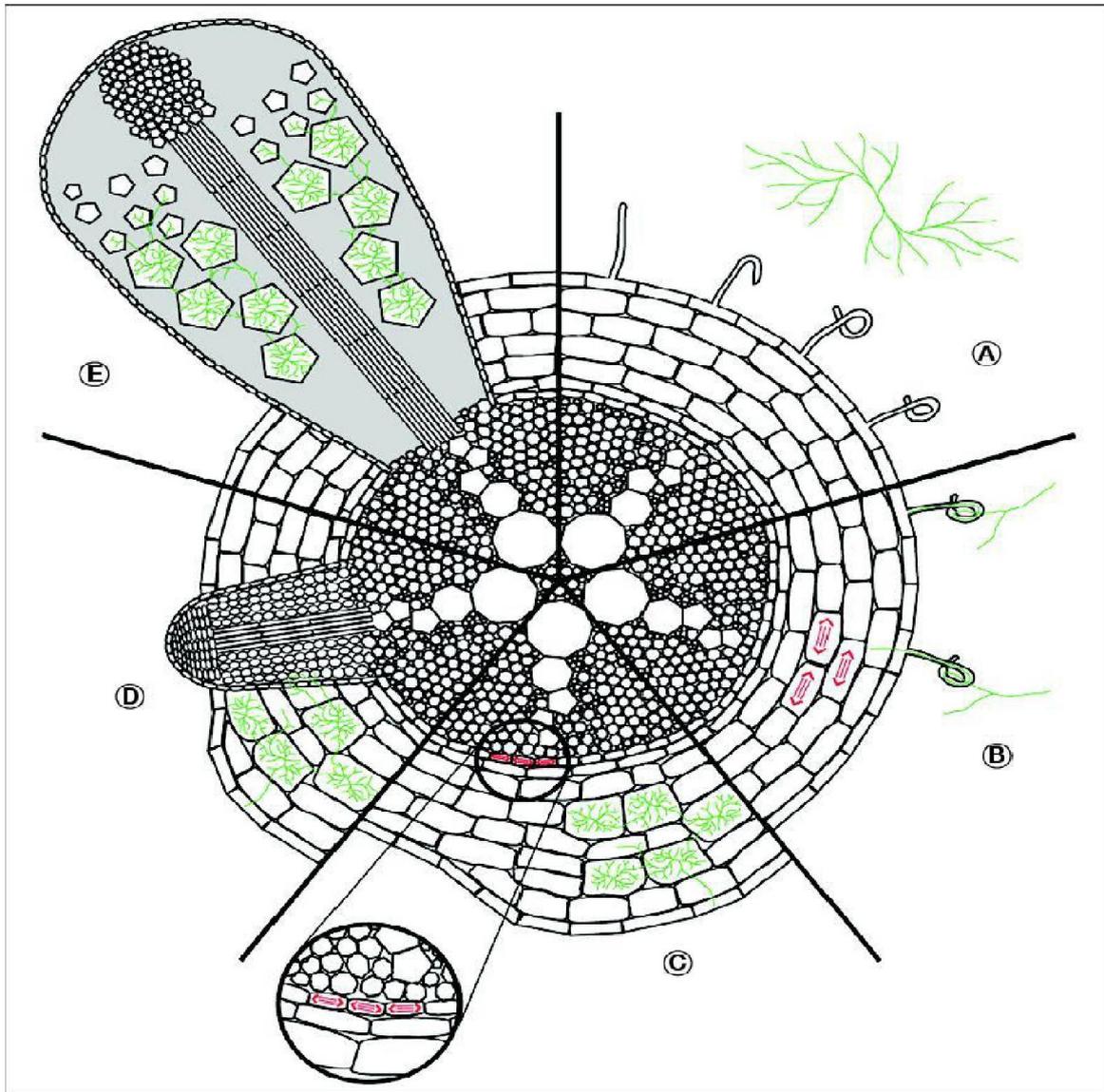
2. Composition du milieu BAP préparé par Murry *et al.* (1984 ).

Solutions mères	BAP
NH <sub>4</sub> Cl	5 ml
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	10 ml
Propionate de Na	5 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5 ml
Fe. Na 2EDTA	1 ml
Oligoéléments	1 ml
Vitamines BAP	1 ml
Tampon BAP	10 ml
pH a 6,7	

Annexe 2. les schémas.



1. Coupe longitudinale d'un lobe nodulaire actinorhizien (Rascio, 2013)



2. Processus d'infection intracellulaire et organogénèse d'un lobe nodulaire chez les plants actinorhiziennes (Peret,2007).

**(A)**: échange de signaux et déformation du poil racinaire, **(B)**: Naissance du pré nodule, **(C)**: Formation du primordium nodulaire , **(D)**:Envahissement des cellules corticales du nodule, **(E)** : Nodule mature

# Résumés

## الملخص

تستند هذه الدراسة التحليلية على اختبار سلالات فرانكيا المعزولة من العقيدات الجذرية لنباتات الشعاعية من عائلة Rhamnaceae المضيفة في تجارب التلقيح المتبادل. تم اختبارها على نباتات مضيضة تنتمي إلى أربع عائلات شعاعية. من أجل تأكيد إيماء النباتات المختبرة باختبار العدوى وتأكيد تثبيت النيتروجين بواسطة هذه السلالات باختبار الفعالية، استخدم المؤلفون طرق النمط الظاهري. بما في ذلك الاختبارات الكيميائية الحيوية، واستجابة سلالات مختلفة من فرانكيا إلى الضغوط البيئية مثل درجة الحموضة والملوحة ودرجة الحرارة، وفي النهاية العداء ضد البكتيريا والفطريات الممرضة للنبات؛ وهذا يعني جميع العوامل التي يمكن أن تؤثر على نمو البكتيريا التكافلية (فرانكيا) أو أداء عوامل إيماء فرانكيا. من ناحية أخرى، فإن الاستخدام المتزايد للطرق الجزيئية بما في ذلك RNAr 16s قد وسع المعرفة حول خصائص مضيف النبات الداخلي وتطور فرانكيا.

**الكلمات المفتاحية:** فرانكيا، النباتات الشعاعية، المثبتة للنيتروجين، الإيماء.

## Résumé

Cette étude synthétique est basé sur des travaux publiés sur l'étude des souches de *Frankia* isolées de nodules racinaires des plantes actinorhiziennes de la famille d'hôtes *Rhamnaceae* ont été testées dans des essais d'inoculation croisée. Ils ont été testés sur des plantes hôtes appartenant à quatre familles actinorhiziennes A fin de confirmé la nodulation des plante teste par test d'ineffectivité et confirmé la fixation d'azote par ces souche par teste d'effectivité ,les auteur a utilisée des méthodes phénotypique y compris des teste biochimique, la réponse de différentes souches de *Frankia* aux stress environnementaux tell que le pH, salinité et Température et a la fin l'antagonisme contre les bactérie et champignons phytopathogene ;c'est a dire tous les facteur qui peut affecté la croissance des bactéries symbiotiques (*Frankia*) ou la performance des facteurs de nodulation de *Frankia*. d'autre cote L'utilisation accrue des méthodes moléculaires y compris L'ARNr 16s a affiné et élargi les connaissances sur les spécificités endophyte-hôte et la phylogénie de *Frankia*.

**Mots clés :** *Frankia*, plantes actinorhiziennes, bactéries fixatrices d'azote, nodulation

## Abstract

This synthetic study is based on published works relates to the study of *Frankia* strains isolated from root nodules of actinorrhizal plants of the *Rhamnaceae* host family were tested in cross-inoculation trials. They were tested on host plants belonging to four actinorrhizal families. In order to confirm the nodulation of the plants tested by infectivity test and to confirme the nitrogen fixation by these strains by effectiveness test, the authors used phenotypic methods including biochemical tests, the response of different strains of *Frankia* to environmental stresses such as pH, salinity and temperature and at last the antagonism against bacteria and phytopathogenic fungi ; wich leads to all the factors that can affect the growth of symbiotic bacteria (*Frankia*) or the performance of *Frankia* nodulation factors. On the other hand The increased use of molecular methods including LARNr 16s has refined and expanded knowledge about the endophyte-host specificities and phylogeny of *Frankia*.

**Key words:** *Frankia*, actinorrhizal plants, nitrogen-fixing bacteria, nodulation.