



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences
de la terre et l'univers
Département des sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques

Référence / 2025

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté et soutenu par :
BERBACHI Manar /BELAID Khaoula

Le : mercredi 18 juin 2025

Synthèse **Etude de la symbiose actinorhizienne du sol de l'Algérie**

Jury :

Dr.	GAOUAOUI Randa	MCB	Université de Biskra	Président
Dr.	BABA ARBI Souad	MCB	Université de Biskra	Rapporteur
Dr.	RADOUANE SALAH Sara	Pr	Université de Biskra	Examinateur

Remerciements

Nous exprimons notre gratitude à Allah, tout-puissant, pour la santé, le courage et la patience qu'il nous a offerts pour mener à bien ce modeste travail.

*Nous tenons également à remercier notre encadrante, **Mme BABA ARBI Souad**, Maître de conférences à la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université de Biskra, pour son aide précieuse, ses conseils avisés, ses observations pertinentes et sa disponibilité, qui ont été d'une grande valeur tout au long de notre projet. Nous lui témoignons notre sincère reconnaissance.*

Nous souhaitons aussi remercier les membres du jury, le président et l'examinateur, pour l'attention qu'ils ont portée à notre étude modeste, ainsi que pour leur acceptation d'examiner, d'évaluer et d'enrichir notre travail par leurs suggestions.

Dédicaces

*Je tiens à dédier ce travail : A mon très CHÈR PÈRE : **Berbachi Djamel** qui est toujours été là pour moi, m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance.*

*A ma très CHÈR MÈRE : **Meziani Zeulikha**.*

*A la lumière de mon cœur et l'éclairage de mes yeux, à la source de la tendresse.
Maman, je te remercie pour tes sacrifices et pour m'avoir soutenu jusqu'au bout. Je vous souhaite Bonheur et tranquillité d'esprit.*

J'adresse mes remerciements A mes chers frères : Meriem. Ahmed Aux grandes familles Berbachi.Belaid A mes amies : Mohammadi Ikram et Soltane Fahima, Abida Sourour, Bettira Nadia, Ben Mohamed Maria, Djemaoui Karima A mon cher binôme : Belaid khaoula

Berbachi manar

Tout d'abord et avant tout, je rends grâce à Allah, car sans Lui, aucune réussite n'aurait été possible. Sa sagesse et Sa bienveillance ont illuminé mon chemin.

*Je dédie ce travail à CHÈR PÈRE : **Belaid Massoud** Qui m'a appris, par ses efforts, sa patience et ses sacrifices, la valeur du travail et de la persévérance.*

*À, CHÈR MÈRE : **Boudjmaa Ahlam** qui m'a nourri avec tendresse et dévouement.*

À mes frères Ramzi et Khairi, et à ma sœur Djouhaina, pour leur amour et leur soutien constant.

Je tiens également à remercier toute ma famille, en particulier mon grand-père Nasser, ma grand-mère Saliha, ainsi que mes tantes Basma, Yasmine, chaima, et Fatima, pour leur amour, leurs soins et leur soutien indéfectible.

À mes fidèles amies Nadia et Maria, pour leur présence réconfortante et à ma chère binôme, Manar, pour sa coopération, son sérieux et son soutien tout au long de ce parcours.

Cette œuvre est le fruit de vos encouragements, de votre amour et de ma foi en Dieu et pour Conclure, louange à Dieu, Seigneur des mondes

Belaid khaoula

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....1

Première Partie : Synthèse Bibliographique

Chapitre 1. Généralités sur la symbiose actinorhizien

1.1. Symbiose actinorhizienne	3
1.1.1. Partenaire végétale : les plantes Actinorhiziennes	3
1.1.1.1. Généralités.....	3
1.1.1.2. Classification des plantes Actinorhiziennes	3
1.1.1.3. Distribution géo -écologique	4
1.1.2. Partenaire Bactérienne : Actinomycète <i>Frankia</i>	5
1.1.2.1. Généralités.....	5
1.1.2.2. Diversité taxonomique de <i>Frankia</i>	5
1.1.2.3. Variété morphologique de <i>Frankia</i>	6
1.1.2.4. Croissance de <i>Frankia</i>	7
1.2. développement du nodule actinorhizien	7
1.3. Intérêt de la symbiose actinorhizienne	8

Deuxième Partie : Partie Experimentale

Chapitre 2. Matériels et Méthodes

1.1. Matériel bactérien	9
1.2. Matériel végétale	9

2.1. Méthodes Isolement <i>Frankia</i> à partir de nodules racinaires	10
2.4. Étude phénotypique	11
2.4.1. Test d'infectivité	11
2.4.2. Effets des températures	12
2.4.3. Effets de pH	12
2.4.4. Tolérance de salinité.....	12
2.4.5. Test de sensibilité aux métaux lourds	12
2.5. Étude génotypique	12
2.5.1. Extraction l'ADNg	12
2.5.2. Amplification du ARNr16s	13
2.5.3. Séquençage d'ARNr16s	13
2.5.4. Analyse phylogénétique de ARNr16s	13

Chapitre 3. Resultats et Discussions

3.1. Caractérisation morphologique des souches isolées de <i>Frankia</i> sur différents milieux de culture	14
3.2. Étude phénotypique	15
3.2.1. Test d'infectivité	15
3.2.2. Effets des températures	17
3.2.3. Effets de pH	17
3.2.4. Tolérance de salinité.....	17
3.2.5. Test de sensibilité aux métaux lourds	17
3.3. Étude génotypique	18
3.3.1. Séquençage de l'ARNr16s des souches <i>Frankia</i>	18

Conclusion..........22

La bibliographie..........23

Annexes

Les résumés

Liste des tableaux

Tableau 1. Ordres, familles et genres d'Angiospermes comprenant des plantas actinorhiziennes	4
Tableau 2. Classification des actinomycètes	6
Tableau 3. Résume les sites d'échantillonnage des articles étudiés en vue de l'isolement des souches de <i>frankia</i>	9
Tableau 4. Localisation des amorce spécifique dans le génome ARNr16S.....	13
Tableau 5. Caractéristiques du génome des différents souches <i>Frankia</i>	20

Liste des figures

Figure 1. Culture pure de l'actinomycète <i>Frankia</i> .H. Hyphe, V : vésicule ; S : sporange.	6
Figure 2. Processus d'infection intracellulaire du système racinaire de <i>Casuarina glauca</i> par <i>Frankia</i>	8
Figure 3. Microscopie à contraste de phase de la souche CpI1T montrant des hyphes végétatifs ramifiés (h), une vésicule (v) (a) et une sporulation importante (s) (b). Les barres indiquent 10 ml.....	15

Liste des abréviations

ADNg : ADN génomique

ARNr 16S : ARN ribosomique 16S

BAP : Basal Propionate Medium

Cu²⁺ / Co²⁺ / Zn²⁺ / Pb²⁺ : Ions métalliques de cuivre, cobalt, zinc et plomb

Mbp : million de paires de bases

DPM : Defined Propionate minimal Medium

glnA1 : Glutamine synthetase gene 1

GS : Glutamine synthétase

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

Mb : Mégabase (millions de paires de bases)

MEGA6 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 6

NaCl : Chlorure de sodium

NH₄Cl : Chlorure d'ammonium

nifH : Nitrogenase iron protein gene

pH : potentiel hydrogène

PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

Qmod : Milieu organique modifié Q

tr/min : Tours par minute

UPGMA : Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

v/v : Volume par volume

% : Pourcentage

Introduction

Les plantes actinorhiziennes démontrent une remarquable capacité à croître dans des environnements inhospitaliers, grâce en grande partie à leur symbiose racinaire avec les bactéries *Frankiaceae* fixatrices d'azote (Thompson *et al.*, 2024).

Ces plantes, considérées comme des espèces pionnières, sont bien adaptées aux sols pauvres et perturbés grâce à cette association symbiotique des *Frankiaceae* fixatrices d'azote (N), cet élément est essentiel à la productivité des cultures et considéré comme le nutriment le plus limitant pour la production agricole et la croissance végétale dans de nombreuses régions du monde (Sun *et al.*, 2021).

L'environnement nodulaire contribue également à créer des conditions micro-oxiques et à fournir du carbone aux *Frankiaceae*, favorisant ainsi leur croissance et la fonction de la nitrogénase responsable de la fixation de l'azote (Thompson *et al.*, 2024).

Les plantes actinorhiziennes présentent plusieurs caractéristiques remarquables, notamment leur capacité à revégétaliser les sols salins et dégradés, ainsi qu'à séquestrer les métaux lourds avec une translocation foliaire limitée de plus, lorsqu'elles sont cultivées en association avec des endophytes de la famille des *Frankiaceae*, ces capacités sont renforcées et étendues à la dégradation des polluants anthropiques et à la restauration de la fertilité des sols (Thompson *et al.*, 2024).

En Algérie, où les conditions édaphiques et climatiques varient fortement entre les régions nordiques tempérées et humides et les zones sud-occidentales plus arides, l'introduction et l'adaptation des plantes actinorhiziennes revêtent un intérêt particulier parmi celles-ci, les espèces du genre *Casuarina* ont été largement utilisées dans les programmes de reboisement, de stabilisation des sols et de réhabilitation des terres dégradées (Belaid *et al.* 2023).

L'objectif principale de cette étude étant de contribuer à une meilleure compréhension des caractères et de la diversité des *Frankia* en fonction de leur origine géographique particulièrement en Algérie.

Cette étude se compose de deux sections :

- Une partie bibliographique qui comprend un chapitre présentant des généralités sur les plantes actinorhiziennes, la bactérie *Frankia* et leur interaction symbiotique.
- Une partie expérimentale, divisée en deux chapitres :

Le premier chapitre aborde une synthèse du « matériel et les méthodes » appliqués dans différents travaux, en présentant des détails sur les études phylogénétique, phénotypique et

portant sur la symbiose actinorhizienne des plantes à travers diverses régions parmi lesquelles l'Algérie.

La section « résultats et discussion » constitue une synthèse des recherches, examinant et commentant les résultats des publications scientifiques relatives à ce sujet.

Partie bibliographique

Chapitre 1

Généralités sur la symbiose actinorhizien

1.1. Symbiose actinorhizienne

La symbiose actinorhizienne est une coopération bénéfique entre des plantes dicotylédones et des bactéries filamenteuses du genre *Frankia*, qui se trouvent dans le sol. Cette relation entraîne la création de nodules racinaires où *Frankia* convertit l'azote de l'atmosphère en une forme assimilable pour la plante (Chaia *et al.* 2010).

L'établissement de la symbiose actinorhizienne a lieu selon deux principales méthodes d'infection : une voie intracellulaire à travers les poils absorbants et une voie intercellulaire. Cette dernière se déroule par pénétration intercellulaire dans les espaces cellulaires du rhizoderme (Duhoux *et al.*, 2013).

1.1.1. Partenaire végétale : les plantes Actinorhiziennes

1.1.1.1. Généralités

Depuis 1978, le terme « plantes actinorhiziennes », dérivé de « *actino* » signifiant rayon, en référence aux Actinomycètes, et de « *rhiza* » pour racine, est employé à la place de l'appellation non-Légumineuses fixatrices. Ainsi, les plantes actinorhiziennes sont celles qui possèdent sur leur système racinaire des structures spécifiques appelées actinorhizes, où des cellules végétales abritent des bactéries filamenteuses du genre *Frankia* (Moiroud, 2013).

Les plantes actinorhiziennes sont principalement des végétaux ligneux. Elles prennent la forme d'arbres, d'arbustes ou de petits arbrisseaux de taille variable. (Moiroud, 2013).

1.1.1.2. Classification des plantes Actinorhiziennes

À présent, entre 260 et 280 espèces sont reconnues comme actinorhiziennes. Ces espèces se divisent en 24 genres qui sont regroupés en 8 familles, elles-mêmes réparties dans 8 ordres différents (Moiroud ,2013) (Tableau 1).

Tableau 1. Ordres, familles et genres d'Angiospermes comprenant des plantas actinorhiziennes (Moiroud, 2013).

Familles des plantes Actinorhizienne	Ordres	Genres des plantes Actinorhizienne
<i>Myricaceae</i>	<i>Myrales</i>	<i>Myrica – Comptonia</i>
<i>Betulaceae</i>	<i>Fagales</i>	<i>Alnus</i>
<i>Casuarinaceae</i>	<i>Casuarinales</i>	<i>Allocasuarina, Casuarina, Gymnostoma, Ceuthorstoma</i>
<i>Datiscaceae</i>	<i>Violales</i>	<i>Datisca</i>
<i>Rosales</i>	<i>Rosales</i>	<i>Ceanothus, Chamaebatia, Cowania, Dryas, Purshia</i>
<i>Elaeagnaceae</i>	<i>Proteales</i>	<i>Elaeagnus, Hippophaë, Shepherdia</i>
<i>Rhamnaceae</i>	<i>Elaeagnus, Hippophaë, Shepherdia</i>	<i>Ceanothus, Colletia, Discaria, Kentrothamnus, Retanilla, Talguenea, Trevoa</i>
<i>Coriariaceae</i>	<i>Sapindales</i>	<i>Coriaria</i>

1.1.1.3. Distribution géo -écologique

L'écologie des plantes actinorhiziennes se résume à deux caractéristiques principales :

- Elles sont des « plantes pionnières » qui colonisent en premier les milieux perturbés ou nouveaux.
- Elles peuvent être qualifiées « d'édificatrices », car elles jouent un rôle important dans les premières phases de transformation de la roche-mère en sol véritable (Moiroud, 2013).

Aujourd'hui, ces plantes se trouvent dans des milieux perturbés comme les sols volcaniques ou miniers, ainsi que sur des terrains pauvres en azote tels que les moraines ou les sols sableux. Parmi les actinorhiziennes les plus connues dans les régions tempérées, on peut mentionner l'aulne et l'olivier de Bohême (Duhoux et Franche, 2003).

1.1.2. Partenaire Bactérienne : Actinomycète *Frankia*

1.1.2.1. Généralités

Frankia est une bactérie filamenteuse de type Gram positif, capable de fixer l'azote de manière libre. Elle a été identifiée pour la première fois à la fin du 19 siècle, mais la première culture pure de *Frankia* symbiotique associée au *Casuarina* n'a été réalisée qu'en 1982. Actuellement, certaines souches de *Frankia* restent introuvables en culture libre (Benabdoun, Gherbi *et al.*, 2012).

Les souches de *Frankia* sont naturellement présentes dans les écosystèmes terrestres et sont principalement connues pour leur capacité à former des nodules racinaires fixateurs d'azote avec des plantes dicotylédones de différentes familles d'angiospermes (Benson et Silvester, 1993).

1.1.2.2. Diversité taxonomique de *Frankia*

Le genre d'actinomycètes *Frankia* sert de type nomenclatural à la famille monogénétique des *Frankiaceae* (Brunchorst, 1886 ; Becking, 1970), qui appartient à l'ordre des *Frankiales* (Sen *et al.*, 2014). Ce genre possède un historique taxinomique long et complexe (Goodfellow et Williams, 1983). Cette situation a considérablement changé avec des méthodes basées sur le génome, qui ont permis l'identification de plusieurs espèces de *Frankia* (Gtari *et al.*, 2019). Son génome varie entre 4,9 et 10,49 Mbp, tandis que les valeurs G + C de l'ADN numérique varient de 69,3 à 72,4 % (Gtari *et al.*, 2019 ; Normand et Benson, 2012).

Le genre comprend 12 espèces qui ont été officiellement nommées, dont l'espèce type *Frankia alni* (Tubeuf, 1895). Une combinaison de caractéristiques génotypiques et phénotypiques a été utilisée pour différencier les différentes espèces de *Frankia* (Gtari *et al.*, 2019) (Tableau 2).

Tableau 2.Classification des actinomycètes (Salam *et al.*,2020)

Unité de catégorisation	Noms scientifiques
Embranchement	<i>Actinobacteria</i>
Classe	<i>Actinomycetia</i>
Ordre	<i>Actinomycetales</i>
Sous ordre	<i>Frankineae</i>

1.1.2.3. Variété morphologique de *Frankia*

Les actinomycètes se divisent en trois types de cellules (Duhoux et Franche,2003), des filaments ou hyphes qui représentent la forme végétative, des vésicules, qui sont des structures sphériques impliquées dans la fixation biologique de l'azote, et enfin des sporanges, qui servent de forme de résistance en conditions de culture difficiles. (Mullin, 1996).

En milieu de culture pure et dans un environnement aqueux, *Frankia* se manifestent sous la forme de colonies filamenteuses de forme ovale ou ronde, s'agrémentant en amas duveteux. Certaines souches sont dépourvues de pigments, tandis que d'autres produisent des pigments solubles aux teintes jaunes, orangées, rouges ou noires (Nouioui, 2014) (Figure1).

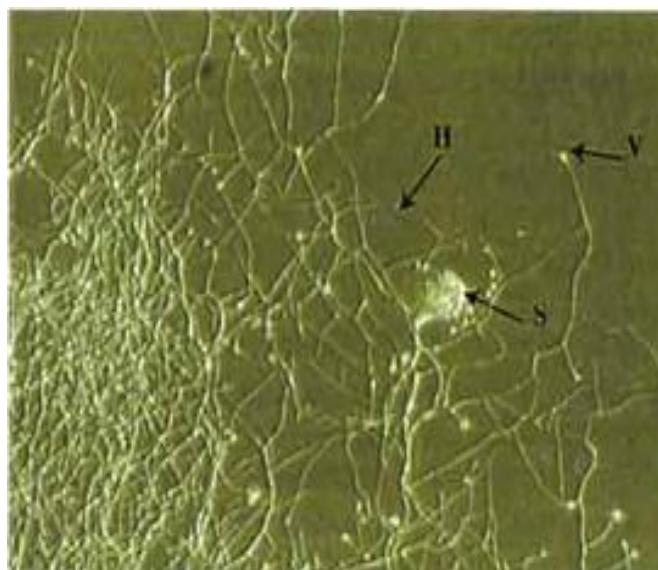


Figure 1.Culture pure de l'actinomycète *Frankia*.H. Hyphe, V : vésicule ; S : sporange.

(Duhoux et Franche,2003)

1.1.2.4. La Croissance de *Frankia*

Les *Frankia* sont des bactéries microaérophiles et peuvent être des aérobies. En raison de la difficulté de maintenir de nombreuses souches sur des milieux solides, elles sont généralement cultivées dans des milieux liquides. Leur taux de croissance est assez lent, de nombreux isolats présentant des temps de doublement de 2 à 3 jours ou plus. Cependant, quelques souches ont un temps de doublement plus court, d'environ 1 jour, se rapprochant du taux de croissance de certains saprophytes actinomycètes à croissance lente. Malgré leurs besoins de croissance spécifiques, *Frankia* n'ont pas besoin de milieux complexes pour prospérer. Une solution de sels basiques enrichie d'un acide organique comme le pyruvate ou le propionate comme source de carbone est souvent adéquate (Lechevalier, 1990).

1.2. Le développement du nodule actinorhizien

Le processus d'infection de *Casuarina* par *Frankia* est qualifié « d'intracellulaire », car il commence par l'infection des poils racinaires. Le premier indice de cette symbiose est une déformation des poils absorbants, causée par des molécules encore inconnues que *Frankia* libère au contact des racines de la plante hôte. Les hyphes pénètrent ensuite dans la partie courbée d'un poil racinaire, où ils sont enfermés dans une structure semblable au cordon d'infection des légumineuses. Suite à des divisions cellulaires au sein du cortex de la racine infectée, une structure appelée pré nodule apparaît (Laplaze *et al.*, 2000).

Ce pré nodule contient de grandes cellules corticales infectées par *Frankia*, responsables de la fixation de l'azote. Par la suite, un primordium nodulaire se forme à partir de divisions dans le pérycycle de la racine, en face d'un pôle de protoxylème, à proximité du pré nodule (Benabdoun *et al.*, 2012) (Figure 2).

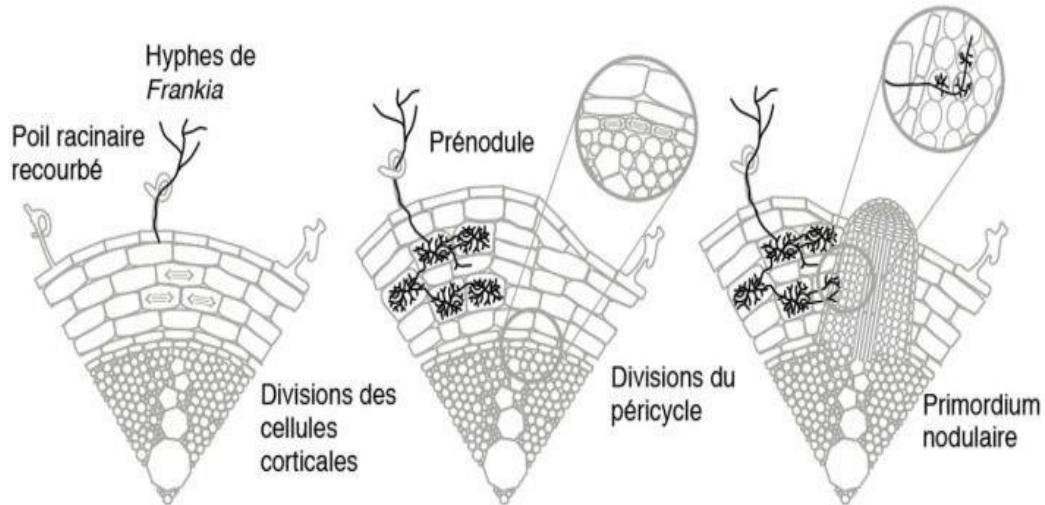


Figure 2. Processus d'infection intracellulaire du système racinaire de *Casuarina glauca* par *Frankia* (Benabdoun *et al.*, 2012)

1.3. Intérêt de la symbiose actinorhizienne

Les taux élevés de fixation d'azote chez les plantes actinorhiziennes leur confèrent un avantage compétitif pour coloniser les zones dégradées, les sols pauvres en nutriments et les environnements contaminés (Gtari et Dawson, 2011 ; Diagne *et al.*, 2013).

De ce fait, des arbres actinorhiziens sont utilisés pour restaurer des sols dégradés dans les régions tropicales arides et semi-arides, les espérances de la famille des Casuarinacées jouent un rôle environnemental significatif. *C. equisetifolia*, *C. cunninghamiana* et *C. glauca* sont fréquemment plantées le long des côtes pour stabiliser les dunes, protéger les cultures contre le vent et le sable, ainsi que pour enrichir les sols en matière organique dans le cadre d'activités agroforestières, où des rangées de *Casuarinas* sont cultivées au sein des parcelles agricoles (Diem *et al.*, 1990, Zhong *et al.*, 2010).

Partie expérimentale

Chapitre 2

Matériel et méthodes

1.Matériel

1.1. Matériel bactérien

Les isolats bactériens étudiés, dans les 11articles de google scolaire, ont été obtenus à partir de nodules racinaires collectés dans diverses régions géographiques. Pour une identification phénotypique ainsi qu'une caractérisation génétique rigoureuse de ces souches.

1.2. Matériel végétale

Des investigations ont été conduites dans la rhizosphère de plusieurs espèces végétales reconnues pour leur capacité à établir des symbioses actinorhiziennes, notamment *Casaurina*, *Coriaria myrtifolié*, *Casaurina cunninghamiana*, *Alnus glutinos*, *Casaurina glauca* des campagnes de prospection ont été réalisées sur des sites géographiquement répartis de l'Algérie (Tableau 3).

Tableau 3. Résume les sites d'échantillonnage des articles étudiés en vue de l'isolement des souches de *frankia*

Auteur	Plante hôte	Origine	Région
Belaïd <i>et al.</i> (2022)	<i>Casaurina cunninghamiana</i> et <i>Casaurina glauca</i>	Nodules	Le nord de l'Algérie (Béjaïa, El Kala, Baïnem et Beni Aknoune) le sud de l'Algérie (Adrar, Biskra, Djebel, Laghouat, Tamanrasset et Tindouf),
Gueddou <i>et al.</i> (2022)	<i>Coriaria myrtifolia</i>	Nodules	Algérie
Belaïd <i>et al.</i> (2020)	<i>Casaurina cunninghamiana</i>	Nodules	Béjaïa

2. Méthodes

2.1. Méthodes Isolement *Frankia* à partir des nodules racinaires

Généralement, la recherche et l'isolement des bactéries *Frankia* commence toujours par la collecte des nodules racinaires à partir des plantes ou des arbres étudiés.

La deuxième étape consiste à la séparation des bactéries à partir des nodules, cette étape peut être réalisée selon différents protocole nécessitant obligatoirement le passage par une étape de stérilisation de la surface des nodules :

Pour la stérilisation des nodules racinaires, Gueddou *et al.* (2022) a suivi la méthode de Ghodhbane *et al.* (2010) : il a lavé soigneusement les nodules à l'eau stérile, les a désinfectés avec du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 30 % pendant 30 minutes, puis les a rincés plusieurs fois à l'eau distillée stérile.

Selon la méthodologie d'isolement décrite par Gueddou *et al.* (2022), les lobes stériles des nodules sont écrasés puis ensemencés dans un milieu BAP ajusté à un pH variant de 6,8 à 9, enrichi en différentes sources de carbone organique.

Pour Belaid *et al.* (2020), les fragments issus des nodules ont été cultivés sur différents milieux solides sans azote (BAP, DPM et Qmod modifié sans levure ni extrait de peptone), les boîtes par la suite ont incubées à 28 °C dans l'obscurité pendant 4 à 6 semaines.

Les recherches de Nouiouï *et al.* (2018) rapportent la réalisation d'une étape de broyage pour les nodules, puis à partir du broyat obtenu une culture, sur un milieu propionate basique (BAP) supplémenté en NH_4Cl , est réalisée et incubée pendant 4 semaines à 28 °C.

2.2. Purification et conservation des souches

Les suspensions bactériennes des souches ont été préparées dans du glycérol à 35 % (v/v) et conservées à -80 °C.

Tandis que la biomasse qui a été récoltée à partir des bouillons liquides de milieu BAP, incubés sous agitation à 200 tr/min pendant quatre semaines à 28 °C, a été lavée à l'eau distillée stérile puis lyophilisée. Ces procédures ont été réalisées conformément à Nouiouï *et al.* (2023).

2.3. Effets milieux de culture sur la formation de vésiculaire et sporangium

Selon Abdel-Lateif *et al.* (2018), des souches de *Frankia* isolées ont été cultivées sur différents milieux nutritifs (M6B modifié, Qmod, DPM, BAP et B), en utilisant le pyruvate ou

le propionate comme principale source de carbone. Les cultures ont été incubées dans des conditions contrôlées (28 ± 2 °C). Après 25 jours de culture, un examen microscopique a été réalisé après un traitement des cellules au glutaraldéhyde à 3 % pendant 3 heures.

La fréquence de la formation des vésicules et des sporanges a été calculée et notée pour chaque souche de *Frankia* pour chaque type de milieu.

2.4. Étude phénotypique

2.4.1. Test d'infectivité

L'étude de Belaid *et al.* (2022), consiste à un test de piégeage des *Frankia* à partir des sols étudiés. Ils ont d'abord stérilisé les graines de *Casuarina cunninghamiana* et *C. glauca* à l'hypochlorite de calcium 5 % pendant 10 min, puis les ont semées dans un substrat composé de terreau et de sable de rivière lavé (2 :1, v/v) placé dans des sacs en polyéthylène perforés pour assurer une bonne aération des et limiter les risques de contamination. Après un an, 24 plantules ont été prélevées au hasard et leurs systèmes racinaires ont été extraits, lavés et examinés pour détecter les nodules actinorhiziens. Les nodules ont été excisés, séchés à 80 °C et leur poids sec a été déterminé.

Abdel-Lateif *et al.* (2018) ont réalisé un test de nodulation suivant la méthode décrite par Mansour *et al.* (1990) pour tester la capacité des souches de *Frankia* à réinfecter les plantes de *Casuarina* (*C. glauca* et *C. cunninghamiana*). Ils ont cultivé les plantules dans du sable stérile (sable sol limoneux et sableux) ayant déjà servi à la culture de *Casuarina* pendant 2 à 3 mois, puis les ont transférées dans des flacons contenant une solution de Hoagland diluée au 1/4 sans azote.

Les plantules ont été inoculées avec des souches de *Frankia* préalablement cultivées sur un milieu BAP, et l'évolution de la nodulation racinaire a été suivie à travers le taux de nodulation et le nombre des nodules. Des flacons non inoculés ont servi de témoins négatifs pour chaque espèce de *Casuarina*.

D'un autre part, Gueddou *et al.* (2022) ont réalisé une inoculation expérimentale en suivant les postulats de Koch. Des plantules de *Coriaria myrtifolia*, issues de graines stérilisées et germées, ont été cultivées dans du sable stérile et inoculées avec des cellules de *Frankia* (cultures de 4 semaines). La nodulation a été observée chaque semaine pendant 3 mois.

2.4.2. Effets des températures

Afin de tester la tolérance des isolats à différentes températures, ces derniers sont cultivés sur un milieu BAP sans azote et incubés aux températures (10 °C, 15 °C, 25 °C, 28 °C, 37 °C, 40 °C, 42 °C et 45 °C) pendant quatre semaines (Nouioui *et al.* 2023).

2.4.3. Effets de pH

La culture des isolats a été menée sur le milieu BAP sans azote ajusté à plusieurs valeurs de pH (5,0 ; 5,5 ; 6,0 ; 7,5 ; 8,0 ; 8,5 ; 10,0 ; 12,0) suivie d'incubation à 28°C pendant 4 semaines (Nouioui *et al.* 2023).

2.4.4. Tolérance de salinité

Nouioui *et al.* (2023) ont réalisé le test sur un milieux BAP sans azote contient diverses concentrations de Nacl (2 %, 4 %, 8 %, 10 %, 12 % et 15 %), les isolats sont incubés à 28°C pendant 4 semaines.

2.4.5. Test de sensibilité aux métaux lourds

Abdel-Lateif *et al.* (2018) ont exposé les souches de *Frankia* aux métaux lourds en les cultivant sur un milieu BAP enrichi en biotine, auquel ils ont incorporé différentes concentrations (0,1 ; 0,5 ; 5,0 et 10,0 mM) de Cu²⁺, Co²⁺, Zn²⁺ et Pb²⁺, La croissance a été évaluée de manière visuelle.

2.5. Étude génotypique

2.5.1. Extraction l'ADNg

L'extraction de l'ADN a été conduite à partir de nodules soigneusement conservés dans de l'azote liquide, dans le but de préserver l'intégrité structurale des acides nucléiques selon décrit par Gueddou *et al.* (2020) ; Belaid *et al.* (2020) ; Nououi *et al.* (2023) ; Belaroussi *et al.* (2020). L'isolement de l'ADN est réalisé en utilisant le kit GeneJET™ (Abdel-Lateif *et al.* 2018).

Plusieurs approches méthodologiques ont été mises à l'épreuve, intégrant l'utilisation de différents tampons de rinçage (allant de l'eau ultrapure à des tampons spécifiques fournis par les kits commerciaux), pour d'apprécier les variations de pureté des extraits obtenus.

2.5.2. Amplification du ARNr16s

Gueddou *et al.* (2020) ; Nouiouï *et al.* (2023) ; Abdel-Lateif *et al.* (2018) ont utilisés des amorces procaryotes spécifique pour l'implification du ARNr16s par PCR (tableau 4).

Tableau 4.localisation des amorces spécifique dans le génome ARNr16S

Article	Cible	Amorce	Séquence Nucléotidique
Gueddou <i>et al.</i> (2022)	ARNr 16s	S-DBact0008-A-20 S-DBact-1495-A-20 DB41 DB44	5'AGAGTTGATCCTGGCT3' 5'CTACGGCTACCTTGTAA3' 5'TTCTTCATCCACGACCC3' 5'GGCTTCGGCATGAAGGT3'
Nouiouï <i>et al.</i> (2023)	ARNr 16s	7F 1492R	5'AGAGTTGATC(AC)TGGCTC AG3' 5'ACGG(CT)TAC CTT GTT ACG ACTT3'
Abdel-Lateif <i>et al.</i> (2018)	ARNr 16s	R1 F1	5'TTGATGGAGAGTTGATCCTGG-3' 5'AGAAAGGAGGTGATCCAGC-3'

Selon le protocole montré par Ghodhbane *et al.* (2010), les réactions de PCR ont été effectuées dans un volume total de 50 µl, en recourant à une ADN polymérase à haute-fidélité assurant une homogénéisation optimale du mélange réactionnel. Autres chercheurs, Abdel-Lateif *et al.* (2018) ; Nouiouï *et al* (2023), n'ont pas bien détaillé ce protocole.

2.5.3. Séquençage d'ARNr16s

Après amplification, les ADN obtenus ont passé par une étape de séquençage et les séquences générées ont été soumises à un alignement multiple par logiciel comme ClustalW, puis confrontées aux bases de données de référence (Abdel-Lateif *et al.* 2018).

2.5.4. Analyse phylogénétique d'ARNr16s

La reconstruction des arbres phylogénétiques des isolats a été réalisée à partir de l'alignement et de la comparaison des séquences de l'ARNr 16S, dans le but d'établir avec précision les proximités évolutives entre les souches (Nouiouï *et al.* 2023 ; Belaroussi *et al.* 2020).

Chapitre 3

Résultats et discussions

Dans ce chapitre nous abordons une synthèse et une discussion des résultats obtenus dans les travaux de recherches traitant le sujet de cette étude : la symbiose actinorhizienne (nodulation), phylogénique et les différents caractères phénotypiques de genre *Frankia*.

3.1. Caractérisation morphologique des souches isolées de *Frankia* sur différents milieux de culture

La *Frankiaceae* représentent une famille d'actinobactéries à Gram positif encore peu explorée et difficiles à cultiver. Elles se propagent principalement à travers des hyphes végétatifs filamenteuses, formant des vésicules et des sporanges intercalaires ou multiloculaires comme rapportent Thompson *et al.* (2024).

L'analyse morphologique des souches isolées de *Frankia* selon Abdel-Lateif *et al.* (2018) ont révélé une variabilité notable dans la formation des vésicules et des sporanges selon le type de milieu de culture utilisé.

Ils rapportent que sur milieux inorganiques sans azote (tels que BAPpyr, BAPprop, Bprop, Bpyr), la culture de *Frankia* montre une fréquence plus élevée des vésicules associées à des hyphes ramifiés sains. La formation de sporanges a été observée à la fin de la croissance, où l'épuisement des nutriments s'est produit, avec un taux de formation modéré à éléver entre les différentes souches.

De plus, rapportent Abdel-Lateif *et al.* (2018), le nombre de vésicules formées variait pour toutes les souches de *Frankia* examinées selon la source de carbone utilisée dans le milieu de culture.

À l'inverse, sur milieux riches en matières organiques (tels que M6B, DPM et Qmod), une faible fréquence de formation de vésicules et sporanges a été enregistrée.

D'après Abdel-Lateif *et al.* (2018), la variation morphologique des souches est observée en fonction des conditions de culture, notamment la composition du milieu et la source de carbone. Dans les milieux sans azote, *Frankia* se différencie rapidement pour former des vésicules et fixer l'azote atmosphérique pour soutenir sa croissance.

Conformément, Nouiou et *al.* (2018), indiquent que l'examen microscopique de *Frankia* après une incubation de 3 à 4 semaines dans un bouillon BAP à 28 °C a montré qu'elle adopte l'aspect microscopique systématique de ces bactéries présentées dans la figure 03.

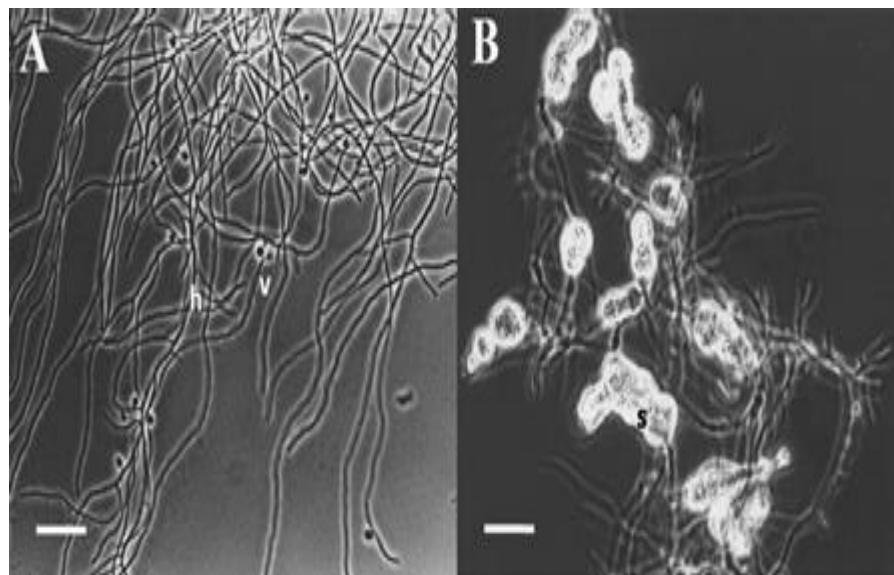


Figure 3. Microscopie à contraste de phase de la souche *CpIIT* montrant des hyphes végétatifs ramifiés (h), une vésicule (v) (a) et une sporulation importante (s) (b). Les barres indiquent 10 ml (Nouiouï *et al.* 2018)

3.2. Étude phénotypique

3.2.1. Test d'infectivité

Abdel-Lateif *et al.* (2018) ont montré qu'*in vitro*, toutes les souches de *Frankia* testées ont infecté avec succès les racines des plantules de *Casuarina cunninghamiana* et *Casuarina glauca* cultivées dans du sable stérile (sable sol limoneux et sableux), en formant des nodules remarquables. Cependant, le délai d'apparition des premiers nodules variait selon les souches.

Abdel-Lateif *et al.* (2018) ont observé que deux souches ont été les plus rapides à former des nodules après 11 et 13 jours respectivement, le nombre moyen de nodules par plante varie entre 5,00 et 7,00 respectivement chez les plantules *Casuarina glauca* et *Casuarina cunninghamiana* avec un taux de nodulation 100 %.

Ils ont rapporté que la variation dans le délai d'apparition des nodules entre les souches indique une différence dans l'efficacité symbiotique ou dans la compatibilité génétique entre les différentes souches de *Frankia* et les deux espèces de *Casuarina*.

La nodulation rapide, selon Abdel-Lateif *et al.* (2018), et la plus élevée, observée chez autres quatre souches reflètent la grande capacité des souches d'infection et de formation de nodules, ce qui suggère une bonne adaptation aux deux hôtes. En revanche, le retard dans la

formation des nodules chez les autres pourrait indiquer une faible efficacité symbiotique ou un retard dans l'interaction avec les racines.

Par ailleurs, Gueddou *et al.* (2022) ont rapporté des résultats faibles suite à une inoculation expérimentale réalisée selon les postulats de Koch permettent de démontrer qu'un micro-organisme est responsable d'un symptôme ou d'une infection. Dans le cas des plantes actinorhiziennes, on peut appliquer ces postulats pour prouver que c'est le micro-organisme *Frankia* qui infecte les racines et forme les nodules.

Gueddou *et al.* (2022) ils n'ont pu isoler que trois souches de *Frankia* à partir de nodules racinaires de *Coriaria myrtifolia* collectés sur le site de La Grotte Merveilleuse à Jijel. Ces isolats présentaient uniquement des hyphes et des sporanges, sans formation de vésicules, et n'ont pas induit la nodulation chez les plantules hôtes.

Ainsi, Gueddou *et al.* (2022) ont lié ces résultats à la possibilité que ces isolats appartiennent à un groupe génétique incapable de fixer l'azote et d'établir une symbiose efficace avec ce type de plante. De plus, le pH relativement élevé du milieu expérimental (compris entre 6,8 et 9) pourrait inhiber l'expression des gènes impliqués dans la fixation de l'azote, ce qui entraverait la formation des vésicules et des nodules racinaires.

En outre, Belaid *et al.* (2022) ont appliqué le test de piégeage dans douze pépinières algériennes aux différentes régions afin de mettre en évidence les variations des taux de nodulation, du nombre de nodules et du poids sec des nodules selon les espèces végétales en fonction des natures des régions d'étude.

Ils ont observé que dans les pépinières situées au nord du pays (telles que Béjaïa, El Kala, Baïnem et Beni Aknoun) les taux de nodulation varient entre 41 % et 46,5 %, le nombre moyen de nodules par plante est situé entre 3 et 3,6, alors que le poids sec des nodules par plante présente des valeurs relativement élevées varie entre 1671 mg et 2181 mg.

D'un autre part, en comparaison avec les résultats obtenus dans le sud du pays (Adrar, Biskra, Djebel, Laghouat, Tamanrasset et Tindouf) les taux de nodulation enregistrés (dans ces régions) étaient très faibles, variant entre 11,1 % et 11,8 %, avec un nombre moyen de nodules par plante de 0,2 à 0,4 et un poids sec des nodules par plante de 4,71 à 6,6 mg. Ils ont trouvé des valeurs relativement faibles.

D'après ces résultats, nous pouvons indiquer que la formation des nodules, chez les plantes actinorhiziennes, est fortement influencée par les conditions environnementales, notamment l'humidité, la localisation géographique, la composition chimique du sol (comme

une carence en phosphore ou une teneur élevée en azote), ainsi que par la présence ou l'absence de *Frankia* dans le sol.

3.2.2. Effets des températures

En 2023, Nouiouï *et al.* ont étudié la tolérance de différentes souches de *Frankia* (isolées à partir des nodules d'*Alnus glutinosa*) en les exposant à plusieurs températures. Ils ont constaté que la température optimale était de 28 °C pour l'ensemble des isolats. En outre, seules deux souches ont montré une capacité de croissance à 25 °C. La plage thermique effective de ces bactéries s'étendait de 25 à 37 °C. La totalité des souches étudiées n'avaient pas la capacité de se multiplier en dehors de cet intervalle, supérieur à 37 °C (40 °C, 42 °C et 45 °C) ou inférieur à 25 °C (10 °C, 15 °C).

3.2.3. Effets de pH

Le pH optimal pour la croissance des souches de *Frankia* se situe entre 6,3 et 8,5, comme rapporté par Nouiouï *et al.* (2023), avec une croissance notable observée dans cette plage. En revanche, aucune croissance n'a été détectée à des valeurs de pH plus acides (5,0–5,5) ou plus alcalines (9,0–12,0), ce qui reflète une sensibilité remarquable de ces souches aux conditions extrêmes.

3.2.4. Tolérance de salinité

Nouiouï *et al.* (2023) rapportent que la concentration maximale de sel tolérée par les souches de *Frankia* était de 8 % de NaCl, à laquelle une croissance notable a été observée. Par contre, aucune croissance n'a été enregistrée aux concentrations supérieures ou inférieures à cette valeur, ce qui indique une plage de salinité étroite favorable à la croissance de ces souches, ce résultat témoigne aussi une capacité notable à résister au stress salin.

3.2.5. Test de sensibilité aux métaux lourds

Toutes les souches de *Frankia* testées par Abdel-Lateif *et al.* (2018) ont montré une capacité de croissance sur le milieu BAP supplémenté en Cu, Co et Zn aux concentrations de 0,1, 0,5 et 5 mM. En revanche, aucune croissance n'a été observée à la concentration maximale de 10 mM pour ces métaux. Concernant le plomb (Pb^{2+}), aucune des souches de *Frankia* n'a présenté de croissance ni d'interaction apparente aux concentrations les plus élevées. Seules trois souches ont toléré et pu croître à la plus faible concentration testée de Pb^{2+} . À l'inverse, une souche isolée de Taïf (Arabie saoudite), s'est révélée incapable de croître, quelle que soit la concentration de plomb utilisée.

D'après Thompson *et al.* (2024) la tolérance des souches aux métaux lourds repose sur plusieurs mécanismes clés : transformation des métaux en formes moins toxiques, extrusion hors de la cellule, précipitation à la surface cellulaire, mobilisation de transporteurs spécialisés, et production de métallophores empêchant leur entrée intracellulaire.

D'après ces résultats, on peut constater que les souches étudiées présentent une résistance élevée aux des métaux lourds (Cu, Co, Zn), ce qui constitue un avantage adaptatif important dans les environnements potentiellement contaminés.

Cependant, elles présentent une sensibilité remarquable au plomb (Pb), nécessitant des concentrations plus faibles pour leur croissance.

3.3. Étude génotypique

3.3.1. Séquençage de l'ARNr16s des souches *Frankia*

L'analyse génotypique des souches de *Frankia* constitue une approche fondamentale pour comprendre la diversité phylogénétique et taxonomique de ces actinobactéries symbiotiques fixatrices d'azote. Cette caractérisation moléculaire, basée sur le séquençage de marqueurs génétiques spécifiques, permet non seulement d'identifier précisément les différentes souches isolées, mais aussi de déterminer leurs relations évolutives et leur appartenance aux différents groupes d'infectiosité.

Le séquençage de l'ARN ribosomique 16S, reconnu comme l'outil de référence en taxonomie bactérienne, offre une base solide pour l'identification et la classification des isolats de *Frankia*. Complété par l'analyse d'autres marqueurs génétiques tels que les gènes *nifH* et *glnA1*.

Le gène *glnA1* joue un rôle essentiel chez les bactéries fixatrices d'azote, ce gène code pour une glutamine synthétase, une enzyme clé dans l'assimilation de l'ammonium (NH_4^+) produit lors de la fixation de l'azote (N \square) par la nitrogénase (Kundu *et al.* 2011).

Ainsi, le gène *nifH* joue un rôle essentiel dans le processus de fixation biologique de l'azote. La présence de ce gène est un indicateur biologique de la capacité d'un organisme à fixer l'azote (Sun *et al.* 2021).

Le gène de l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S) est présent chez la plupart des bactéries, ce qui le rend essentiel pour l'identification bactérienne et les études taxonomiques. Il est composé de régions conservées permettant son amplification par PCR, ainsi que de neuf régions

hypervariables qui varient selon les espèces. Ces régions variables permettent de différencier les espèces bactériennes avec précision (Chakravorty *et al.* 2007)

Cette partie présente les résultats du séquençage de l'ARNr 16S des différentes souches de *Frankia* isolées à partir des différentes régions d'étude, ainsi que l'analyse comparative de leurs caractéristiques génomiques. L'objectif est de positionner phylogénétiquement ces isolats par rapport aux souches de référence et d'évaluer leur diversité génétique en fonction de leur origine géographique et de leur plante hôte.

Les résultats de Belaid *et al.* (2020) ont révélé que les caractéristiques du génome de la souche *Frankia B2*, isolée à partir des nodules racinaires de *Casuarina cunninghamiana* prélevés dans la région de Béjaïa (Algérie), sont similaires à celles du génome de la souche de référence *Frankia casuarina CcI3* (tableau 5).

Dans une autre étude, Abdel-Lateif *et al.* (2018) ont isolé neuf souches de *Frankia* à partir des nodules de *Casuarina glauca* et *Casuarina cunninghamiana*, prélevés en Arabie saoudite et à Egypt. En utilisant la méthode UPGMA et le programme MEGA6, ils ont distingué deux sous-groupes principaux. Huit souches appartiennent au sous-groupe 1, tandis que l'isolat *CgIS3N1* a été classé dans le sous-groupe 2, formant ainsi un groupe distinct par rapport à l'isolat de référence *Frankia CcI3*, et la souche de Béjaïa. Toutes ces souches de *Frankia* appartiennent au groupe d'infectiosité de *Casuarina*.

Les résultats de Belaid *et al.* (2020) ainsi qu'Abdel-Lateif *et al.* (2018) montrent que toutes les souches isolées à partir des mêmes plantes de *Casuarina*, mais provenant de régions différentes (Arabie Saoudite, Egypt et Algérie), sont proches de la souche *Frankia CcI3*.

Nouioui *et al.* (2023) ont isolé quatre souches à partir des nodules racinaires de *Alnus glutinosa* collectés dans différentes régions du Royaume-Uni. Ils ont montré que 2 souches présentent des caractéristiques génomiques identiques à celles de la souche *Frankia alni ACNI4a^T*, avec un pourcentage de similarité de 99,6 %.

En revanche, les 2 autres souches partagent des caractéristiques génomiques identiques avec *Frankia torreyi CpI1^T*, avec un taux de similarité de 97,4% (tableau 5).

Selon une étude différente, dans des régions de France et en Suède, sur les mêmes plantes *Alnus glutinosa*, Belaroussi *et al.* (2020) ont montré que trois souches isolées sont très proches à 100 % de la souche *Frankia nodulispurulans*.

Tableau 5.les caractéristiques du génome des différents souches *Frankia*

Souche	Région	Les souches de références similaires	Auteur
<i>B2</i>	Algérie	<i>F. Casuarina CcI3</i>	Belaid <i>et al.</i> (2020)
<i>AgncI-4^T</i> <i>AgncI-10</i>	Royaume-Uni	<i>F. alni ACN14a^T</i>	Nouioui <i>et al.</i> (2023)
<i>AgncI-8^T</i> <i>AgncI-18</i>		<i>F. torreyi CpIIT</i>	
<i>AgTrST</i>	France et Suède		
<i>AgUmASH1</i>		<i>Frankia nodulisporulans</i>	Belaroussi <i>et al.</i> (2020)
<i>AgUmAST1</i>			
<i>Frankia BMG5.1</i>	Algérie	<i>Frankia Coriaria BMG5.1T</i>	Gueddou <i>et al.</i> (2022)

Des résultats différents de Gueddou *et al.* (2022) révèlent, à travers une analyse partielle des gènes *nifH* et ARNr16S, que les trois souches de *Frankia BMG5.1* isolées à partir des nodules de *Coriaria myrtifolia* en Algérie, appartiennent vraisemblablement au cluster 4, lequel regroupe notamment les espèces *Frankia inefficax*, *Frankia asymbiotica* et *Frankia saprophytica*.

Par ailleurs, Gueddou *et al.* (2022) ont choisi le gène *GlnA1* en raison de sa plus grande variabilité par rapport à d'autres marqueurs génétiques comme l'ARNr16S ou *nifH*, ce qui en fait un outil plus pertinent pour l'analyse de la diversité des microsymbiotes de *Coriaria myrtifolia*.

D'après les différents résultats, le gène *glnA1* s'avère plus discriminant que les marqueurs traditionnels (ARNr16S, *nifH*) pour l'analyse de la diversité, particulièrement pour les microsymbiotes *Frankia*.

L'analyse de ces résultats permet de constater que les isolats de l'Algérie, l'Arabie Saoudite, et d'Égypte, appartiennent majoritairement à l'espèce *Frankia casuarinae CcI3*, suggérant une adaptation commune aux conditions climatiques arides.

Par contre, les souches du Royaume-Uni, de France et de Suède se répartissent entre plusieurs autres espèces (*F. alni*, *F. nodulisporylans*, *F. torreyi*), reflétant une plus grande diversité taxonomique dans les climats tempérés.

Ces résultats révèlent que les souches de *Frankia* possèdent des moyens physiologiques d'adaptation à leur environnement, avec une distribution taxonomique qui semble corrélée aux conditions géographiques et climatiques régionales.

Conclusion

Notre travail est réalisé par la mise en place d'une étude de synthèse des publications scientifiques traitant le sujet concernant la symbiose actinorhizienne, dans l'objectif à étudier les variations dans l'établissement de cette symbiose, l'influence des conditions de culture sur la croissance des isolats *Frankia* et la diversité phylogénique des souches des actinomycètes *Frankia* isolées des différentes régions d'étude.

On peut affirmer que les bactéries étudiées du genre *Frankia* sont capables d'établir une symbiose efficace avec les plantes actinorhiziennes *Casuarina cunninghamiana* et *Casuarina glauca* en Algérie et Egypt et dans l'Arabie saoudite.

Par contre, la souche *Frankia BMG5.1* n'est pas capable d'établir une symbiose avec les plantes actinorhiziennes *Coriaria myrtifolia* dans l'Algérie.

Les souches de *Frankia* présentent une capacité d'adaptation remarquable aux conditions nutritionnelles limitantes. La formation de vésicules et sporanges est stimulée dans les milieux inorganiques pauvres en azote, suggérant une stratégie de survie face à la carence nutritionnelle.

À l'inverse, dans les milieux riches en matière organique, la formation de ces structures de résistance diminue, indiquant que les conditions favorables réduisent le besoin de structures de survie.

Les souches *Frankia* isolées sont mésophiles avec une température optimale de croissance de 28°C, ce qui correspond aux conditions tempérées de leur environnement naturel.

Elles sont neutrophiles, tolérant un pH entre 6,3 et 8,5 démontrant leur adaptation aux sols à pH neutre à légèrement alcalin.

Les souches montrent une résistance élevée vis-à-vis des métaux lourds (Cu, Co, Zn), cependant, elles présentent une sensibilité plus marquée au plomb (Pb), nécessitant des concentrations plus faibles pour leur croissance.

Les souches isolées de l'Algérie (ainsi que de l'Arabie Saouditeet d'Egypte) appartiennent majoritairement à l'espèce *Frankia casuarinae CcI3*, suggérant une adaptation commune aux conditions climatiques arides. Cette répartition suggère une adaptation évolutive aux conditions climatiques régionales et à la spécificité des plantes hôtes locales.

À la fin de cette étude, il serait pertinent de continuer en explorant les comportements et les capacités des différentes propriétés de la symbiose actinorhizienne pour l'utilisation à l'avenir dans la bioremédiation du sol.

La bibliographie

- 1) Abdel-lateif, K. S. E., Mansour, S. R., El-Badawy, M. F., & Shohayeb, M. M. (2018). Isolation and molecular characterization of Frankia strains resistant to some heavy metals, 1–10.
- 2) Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1–43.
- 3) Becking, J. H. (1970). Frankiaceae fam. nov. (Actinomycetales) with one new combination and six new species of the genus *Frankia* Brunchorst 1886, 174. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 20(2), 201–220.
- 4) Belaid, K., Potgieter, L. J., Amrani, S., Zizi, M., & Gherbi, H. (2022). Casuarina species in Algeria: Reviewing identity, distribution and symbiotic status. *Bois et Forêts des Tropiques*, 351(1), 15–28.
- 5) Belaid, K., Swanson, E., Carré-Mlouka, A., Hocher, V., Svistoonoff, S., Gully, D., Simpson, S., Morris, K., Thomas, W. K., Amrani, S., Tisa, L. S., & Gherbi, H. (2020). Draft genome sequence of the symbiotic *Frankia* sp. strain B2 isolated from root nodules of *Casuarina cunninghamiana* found in Algeria. *Journal of Genomics*, 8, 11–15.
- 6) Benabdoun, M., Gherbi, H., Djekoun, A., Bogusz, D., Franche, C., & Ykhlef, N. (2012). Fixation biologique de l'azote : La symbiose actinorhizienne Casuarina-Frankia. *Sciences & Technologie C*, 35, 15–19.
- 7) Benson, D. R., & Silvester, W. B. (1993). Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiological Reviews*, 57(2), 293–319.
- 8) Brunchorst, J. (1886). Über einige Wurzelanschwellungen, besonders diejenigen von *Alnus* und den *Elaeagnaceen*. Untersuchungen aus dem botanischen Institut in Tübingen, 2, 151–177.
- 9) Chakravorty, S., Helba, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2), 330–339.
- 10) Chaia, E. E., Wall, L. G., & Huss-Danell, K. (2010). Life in soil by the actinorhizal root nodule endophyte *Frankia*: A review. *Symbiosis*, 51, 201–226.

- 11) Diagne, N., Arumugam, K., Ngom, M., Nambiar-Veetil, M., Franche, C., et al. (2013). Use of Frankia and actinorhizal plants for degraded lands reclamation. BioMed Research International, 2013, Article ID 948258.
- 12) Diem, H. G., & Dommergues, Y. R. (1990). Current and potential uses and management of Casuarinaceae in the tropics and subtropics. In R. Schwintzer & J. D. Tjepkema (Eds.), *The biology of Frankia and actinorhizal plants* (pp. 317–342). Academic Press Inc.
- 13) Duhoux, É., & Franche, C. (2003). Parmi les plantes supérieures, l'association Rhizobium-légumineuses n'a pas l'exclusivité de la symbiose fixatrice d'azote. Biofutur, 235(juillet/août), 45–46.
- 14) Duhoux, E., Diouf, D., Gherbi, H., Franche, C., Ahée, J., & Bogusz, D. (2013). Le nodule actinorhizien. *Acta Botanica Gallica*, 143(7), 593–608.
- 15) Ghodhbane-Gtari, F., Nouiouï, I., Chair, M., Boudabous, A., & Gtari, M. (2010). 16S–23S rRNA intergenic spacer region variability in the genus *Frankia*. *Microbial Ecology*, 60, 487–495.
- 16) Goodfellow, M., & Williams, S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, 37, 189–216.
- 17) Gtari, M., & Dawson, J. O. (2011). An overview of actinorhizal plants in Africa. *Functional Plant Biology*, 38, 653–661.
- 18) Gtari, M., Nouiouï, I., Sarkar, I., Ghodhbane-Gtari, F., Tisa, L. S., et al. (2019). An update on the taxonomy of the genus *Frankia* Brunchorst, 1886, 174AL. *Antonie van Leeuwenhoek*, 112(1), 5–21.
- 19) Gueddou, A., Sbissi, I., Louati, M., Ghodhbane-Gtari, F., Cherif-Silini, H., & Gtari, M. (2022). Root nodule microsymbionts of native *Coriaria myrtifolia* in Algeria. *Microbiology Insights*, 15, 1–7.
- 20) Herrera-Belaroussi, A., Normand, P., Pawłowski, K., Fernandez, M. P., Wibberg, D., Kalinowski, J., Brachmann, A., Berckx, F., Lee, N., Blom, J., Pozzi, A. C., Fournier, P., Bethencourt, L., Dubost, A., Abrouk, D., & Sellstedt, A. (2020). *Candidatus Frankia noduliporulans* sp. nov., an *Alnus glutinosa*-infective *Frankia* species unable to grow in pure culture and able to sporulate in-planta, 1–8.

- 21) Kundu, D., et al. (2011). Functional characterization of glutamine synthetase in *Bradyrhizobium japonicum*: importance in nitrogen fixation. *Microbiology*, 157(Pt 4), 1129–1139.
- 22) Laplaze, L., Duhoux, E., Franche, C., Frutz, T., Svistoonoff, S., Bisseling, T., Bogusz, D., & Pawłowski, K. (2000). Casuarina glauca prenodule cells display the same differentiation as the corresponding nodule cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(2), 107–112.
- 23) Lechevalier, M. P., & Lechevalier, H. A. (1990). Systematics, isolation and culture of Frankia. In C. R. Schwintzer & J. D. Tjepkema (Eds.), *The biology of Frankia* (pp. 35–60).
- 24) Moiroud, A. (2013). Diversité et écologie des plantes actinorhiziennes. *Acta Botanica Gallica*, 143(7), 651–661.
- 25) Mullin, B., & Dobritsa, S. V. (1996). *Plant Sail*, 186, 9–20.
- 26) Normand, P., & Benson, D. R. (2012). Order XVI Frankiales. In M. Goodfellow (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Actinobacteria*, Part A (2nd ed., pp. 508–510). Springer.
- 27) Normand, P., Orso, S., Cournoyer, B., Jeannin, P., Chapelon, C., et al. (1996). Molecular phylogeny of the genus Frankia and related genera and emendation of family Frankiaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 1–9.
- 28) Nouiou, I. (2014). Phylogénie et évolution du genre Frankia (Doctoral dissertation, Université Claude Bernard Lyon 1), pp. 19–20.
- 29) Nouiou, I., Ghodbane-Gtari, F., Pötter, G., Klenk, H.-P., & Goodfellow, M. (2023). Novel species of Frankia, *Frankia gtarii* sp. nov. and *Frankia tisai* sp. nov., isolated from a root nodule of *Alnus glutinosa*, 1–8.
- 30) Salam, N., Jiao, J.-Y., Zhang, X.-T., & Li, W.-J. (2020). Update on the classification of higher ranks in the phylum Actinobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(3), 1331–1355.
- 31) Sen, A., Daubin, V., Abrouk, D., Gifford, I., Berry, A. M., & Normand, P. (2014). Phylogeny of the class Actinobacteria revisited in the light of complete genomes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 3821–3832.

- 32) Sun, W., Shahrajabian, M. H., & Cheng, Q. (2021). Nitrogen fixation and diazotrophs – A review. *Romanian Biotechnology Letters*, 26(4), 2834–2845.
- 33) Thompson, R. M., George, D., & Montero-Calasanz, M. del C. (2024). Actinorhizal plants and Frankiaceae: The overlooked future of phytoremediation, 1–27.
- 34) Von Tubeuf, K. (1895). *Pflanzenkrankheiten durch Kryptogame Parasiten verursacht*. Verlag J Springer, Berlin.
- 35) Zhong, C., Zhang, Y., Chen, Y., Jiang, Q., Chen, Z., Liang, J., Pinyopusarek, K., Franche, C., & Bogusz, D. (2010). Casuarina research and applications in China. *Symbiosis*, 50, 107–114.

Annexes

Annexes 1 : la composition de milieu BAP

Composants g/L	BAP
Na-propionate	1,20 g
KH ₂ PO ₄	1,00 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,10 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,01 g
Solution de fer chélaté	1,80 mL
Solution d'oligoéléments	1mL
Eau distillée	1000 mL
PH = 6,8	

Composition de Solution de fer chélaté :

FeSO₄ · 7H₂O 7,5 g
 Na₂EDTA.2H₂O 7,56 g
 Eau distillée.....1000 mL

Composition de solution d'oligoéléments :

CoCl₂.....0,025 g
 CuSO₄.....0,080 g
 H₃BO₃.....2.860 g
 MnCl₂ · 4H₂O.....0,025 g
 ZnSO₄ · 7H₂O.....0,220 g
 Eau distillée.....1000 mL

Annexes 2 : Milieu DPM (Defined Propionate Minimal Medium)

Composants g / L	DPM
Acétate de sodium	0,6 g/L
Na-propionate	1g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,01g/L
NH ₄ Cl	0.5 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1g/L
Solution stock de FeSO ₄ /EDTA	1mL
Solution stock de Hoagland's microéléments	1mL
PH = 6,8	

Solution stock de FeSO₄/EDTA:

Composition de la solution mère : 0,75 g Na₂EDTA·2H₂O + 0,56 g FeSO₄·7H₂O pour 100 ml

Solution de Hoagland's microéléments :

H ₃ BO ₃	2,8 g/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O.....	1,8 g/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O.....	1,8 g/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,1 g/L
Na ₂ MoO ₄	0,02 g/L

Les résumés

ملخص

تُقدم هذه الدراسة التحليلية مقارنة بين سلالات *Frankia* المعزولة من العقد الجذرية لنباتات الأكتينوريزا التي تم جمعها من مناطق جغرافية مختلفة. تُظهر البكتيريا الشعاعية من جنس *Frankia* قدرة ملحوظة على إقامة علاقات تكافلية فعالة مع نباتاتها المضيفة، وخاصة *Casuarina glauca* و *Casuarina cunninghamiana* في المملكة العربية السعودية ومصر والجزائر. ومع ذلك، فإن بعض السلالات مثل *Frankia BMG5.1* تُظهر تخصصاً محدوداً في استضافة النباتات، إذ تبيّن أنها غير قادرة على تشكيل عقد جذرية مع *Coriaria myrtifolia* في الجزائر. تكشف التقييمات الفسيولوجية للسلالات عن قدرتها على التكيف مع الظروف البيئية المختلفة، حيث يتراوح الرقم الهيدروجيني الأمثل للنمو بين 6.3 و 8.5، ودرجة الحرارة المثلى عند 28 درجة مئوية. كما تُظهر هذه السلالات تحملًا عاليًا للمعادن الثقيلة مثل النحاس والكوبالت والزنك، في حين أنها أكثر حساسية للرصاص. وُتُظهر التحاليل الغذائية أن تكون الحويصلات والأبوااغ يزداد في البيئات القفيرة بالنيتروجين، مما يدل على استراتيجية تكيفية في مواجهة الضغوط الغذائية. أما التوصيف الجزيئي، والذي أُنجز أساساً عبر تسلسل الحمض النووي الريبوزي 16S RNA واستكمال بتحليل الجينات *nifH* و *glnA1*، فيُظهر توزيعاً تصنيفياً منظماً جغرافياً. إذ تتميّز السلالات الأوروبيّة (فرنسا، السويد، المملكة المتحدة) إلى الأنواع أوسطية (الجزائر، مصر، السعودية) في الغالب إلى الأنواع *F. casuarinae* و *F. coriariae*.

الكلمات المفتاحية: نباتات شعاعية الجذور، *Frankia*، عقادات الجذر، 16S rRNA.

Résumé

Cette étude synthétique présente une analyse comparative des souches de *Frankia* isolées à partir des nodules racinaires de plantes actinorhiziennes collectées dans différentes régions géographiques. Les actinomycètes du genre *Frankia* démontrent une capacité remarquable à établir des symbioses fonctionnelles avec leurs plantes hôtes, notamment *Casuarina cunninghamiana* et *Casuarina glauca* en Arabie Saoudite, en Égypte et en Algérie. Cependant, certaines souches comme *Frankia BMG5.1* présentent une spécificité d'hôte limitée, s'avérant incapables de noduler *Coriaria myrtifolia* en Algérie. L'évaluation physiologique des souches révèle leur adaptation aux conditions environnementales tempérées, avec un pH optimal de croissance compris entre 6,3 et 8,5 et une température optimale de 28°C. Ces souches manifestent une tolérance élevée aux métaux lourds (Cu, Co, Zn) mais une sensibilité accrue au plomb. L'analyse nutritionnelle démontre que la formation de vésicules et sporanges est favorisée dans les milieux carencés en azote, témoignant d'une stratégie adaptative face aux stress nutritionnels. La caractérisation moléculaire, réalisée principalement par séquençage de l'ARNr 16S et complétée par l'analyse des gènes *nifH* et *glnA1*, révèle une distribution taxonomique géographiquement structurée. Les souches européennes (France, Suède, Royaume-Uni) se répartissent entre les espèces *Frankia alni ACN14a^T*, *F. nodulisporellans* et *F. torreyi CpII^T*, tandis que les isolats méditerranéens et moyen-orientaux (Arabie Saoudite, Égypte, Algérie) appartiennent majoritairement aux espèces *F. casuarinae* et *F. coriariae*.

Mots clés : plantes actinorhizienne, *Frankia*, nodules racinaires, ARNr 16S.

Abstract

This synthetic study presents a comparative analysis of *Frankia* strains isolated from root nodules of actinorhizal plants collected in various geographical regions. Actinomycetes of the genus *Frankia* demonstrate a remarkable ability to establish functional symbioses with their host plants, notably *Casuarina cunninghamiana* and *Casuarina glauca* in Saudi Arabia, Egypt, and Algeria. However, certain strains such as *Frankia BMG5.1* exhibit limited host specificity, proving incapable of nodulating *Coriaria myrtifolia* in Algeria. The physiological evaluation of the strains reveals their adaptation to temperate environmental conditions, with an optimal growth pH between 6.3 and 8.5 and an optimal temperature of 28°C. These strains show high tolerance to heavy metals (Cu, Co, Zn) but increased sensitivity to lead. Nutritional analysis shows that the formation of vesicles and sporangia is favored in nitrogen-deficient media, indicating an adaptive strategy to nutritional stress. Molecular characterization, conducted mainly through 16S rRNA sequencing and complemented by analysis of the *nifH* and *glnA1* genes, reveals a geographically structured taxonomic distribution. European strains (France, Sweden, United Kingdom) are distributed among the species *Frankia alni ACN14a^T*, *F. nodulisporellans*, and *F. torreyi CpII^T*, while Mediterranean and Middle Eastern isolates (Saudi Arabia, Egypt, Algeria) mostly belong to the species *F. casuarinae* and *F. coriariae*.

Keywords : actinorhizal plants, *Frankia*, root nodules, ARNr 16S.



Déclaration de correction de mémoire de master 2025

Référence du mémoire N°: 2..... / 2025

PV de soutenance N°: / 2025

Nom et prénom(en majuscule) de l'étudiant (e) : BELAÏD KHAGUHA, BenBachir HANAR	لقب و إسم الطالب(ة) : مليح الدين بن بachi هنار	
La mention التقدير جيد جدا	العلامة Note(./20)	عنوان المذكرة L'intitulé de mémoire - Etude de la Symbiose actinorhizienne du Sol de l'Algérie

تصريح وقرار الأستاذ المشرف : **Déclaration et décision de l'enseignant promoteur :**

Décision :		قرار :					
Sur la base du contenu scientifique, de degré de conformité et de pourcentage des fautes linguistiques, Je décide que ce mémoire doit être classé sous la catégorie		اعتمادا على درجة مطابقتها للنموذج ، على نسبة الأخطاء اللغوية وعلى المحتوى العلمي أقرر أن تصنف هذه المذكورة في الدرجة :					
acceptable مقبول	ordinaire عادي	bien حسن	très bien جيد جدا	excellent ممتاز	exceptionnel متميز		
E	D	C	X B	A		A+	



الأستاذ المشرف

التاريخ

2025 / 06 / 25

NB : Cette fiche doit être collée d'une façon permanente derrière la page de garde sur les copies de mémoire déposées au niveau de la bibliothèque universitaire