

T D M

TRAVAUX ET DOCUMENTS
MICROFICHÉS

N° 80

F2

DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE
DE *FRANKIA*, SYMBIOTE
DE *CASUARINA EQUISETIFOLIA*
L. JOHNSON EN AFRIQUE
DE L'OUEST (SÉNÉGAL ET GAMBIE)

Laurent MAGGIA

ORSTOM
Editions

N° d'ordre :

THESE de DOCTORAT de L'UNIVERSITE PARIS VII

(Arrêté du 23 novembre 1988)

UFR : Biologie et Sciences de la Nature

Spécialité :

GENETIQUE QUANTITATIVE ET DES POPULATIONS

présentée par

Laurent MAGGIA

pour obtenir le titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS VII

Sujet de la thèse :

**DIVERSITE GENETIQUE DE *FRANKIA*,
SYMBIOTE DE *CASUARINA EQUISETIFOLIA* L. JOHNSON
EN AFRIQUE DE L'OUEST (SENEGAL ET GAMBIE).**

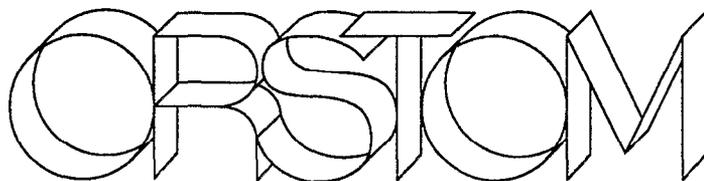
Soutenue le 15 Mai 1991 devant le jury composé de :

MM.	E. Duhoux	Président
	H.G. Diem	Directeur de thèse
	B. Dreyfus	Rapporteur
	P. Simonet	Rapporteur
	B. Picard	Examineur
	Y. Dommergues	Membre invité

13 AVR. 1992

ORSTOM Fonds Documentaire
N° : 35.141 ex 2
Cote : A

TDM 80



Editions de l'ORSTOM

INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE
POUR LE DÉVELOPPEMENT EN COOPÉRATION

Collection :

Travaux et Documents Microédités

PARIS 1992

ISBN : 2-7099-1084-5

© ORSTOM

F 2

«La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, que les «copies ou reproductions « strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective» et, d'autre part, que les « analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et « d'illustration, «toute représentation ou reproduction intégrale, « ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses « ayants droit ou ayants cause, est illicite» (alinéa 1er de l'article 40).

« Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par « les articles 425 et suivants du Code pénal.»

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Biologie des Sols au centre ORSTOM, à Dakar (Sénégal) et au laboratoire commun ORSTOM / CIRAD-CTFT de Biotechnologie des Symbioses Forestières Tropicales (BSFT) au Centre Technique Forestier Tropical, à Nogent-sur-Marne. J'exprime ici ma profonde reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont permis de mener à bien ce travail :

- à MM Dommergues et Diem, Directeurs de recherches au CNRS, qui m'ont accueilli au BSFT au sein de l'équipe qu'ils dirigent et qui sont à l'origine de ce sujet de thèse. Je les remercie particulièrement pour l'appui constant et la confiance qu'ils m'ont accordés. Je leur exprime ici toute ma reconnaissance pour avoir accepté de participer au jury de ma thèse.

- à M. Dreyfus, Directeur de Recherches à l'ORSTOM à Dakar, qui m'a accueilli au Laboratoire de Biologie des Sols à Dakar au sein de l'équipe qu'il dirige et m'avoir offert la possibilité d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions. Je le remercie particulièrement pour l'appui constant et la confiance qu'il m'a accordés, pour l'intérêt qu'il a manifesté pour le présent travail et de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ma thèse.

- à M. Simonet, Chargé de recherches au CNRS à Lyon, pour l'intérêt qu'il a manifesté pour le présent travail lors des nombreuses collaborations que nous avons eues, pour ses conseils experts notamment en ce qui concerne toute la partie où sont mis en œuvre des outils de biologie moléculaire et qui m'a fait l'honneur d'être rapporteur de ma thèse. Je le remercie particulièrement ainsi que le Pr Bardin et tous les chercheurs, techniciens et stagiaires du laboratoire d'Ecologie Microbienne de l'Université des Sciences Lyon I, pour l'accueil amical qui m'a toujours été réservé lors de mes nombreux déplacements dans leurs locaux.

- à M. Picard, Maître de conférences à la Faculté Bichat (Paris X), pour l'intérêt qu'il a manifesté pour le présent travail lors des nombreuses collaborations que nous avons eues, pour ses conseils experts notamment en ce qui concerne l'étude de marqueurs enzymatiques, pour avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie du jury de ma thèse. Je le remercie ainsi que M Gouillet, responsable du laboratoire de Microbiologie de la Faculté Bichat (Paris X), et les techniciennes de ce laboratoire pour l'accueil amical qui m'a toujours été réservé lors de mes nombreux déplacements dans leurs locaux.

- à M. Duhoux, Professeur à l'Université de Paris VII, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de ma thèse.

Je tiens également à exprimer mes plus vifs remerciements à toutes les personnes qui ont collaboré de façon étroite à mes travaux :

- à M. Bakhoum tout particulièrement, puisqu'il fut mon plus proche collaborateur au laboratoire de l'ORSTOM à Dakar, pour son sérieux, pour l'enthousiasme qu'il a manifesté dans ce travail et avec qui j'ai eu plaisir à travailler.

- à M. Sougoufara, chercheur des Eaux et Forêts du Sénégal, qui a été mon coéquipier au Sénégal aussi bien lors de travaux effectués au laboratoire que sur le terrain, pour sa disponibilité et pour l'enthousiasme qu'il a manifesté dans ce travail.

- à M. Prin, chercheur au BSFT, pour m'avoir fait bénéficier de ses compétences scientifiques et techniques pendant ces trois années de travail et pour avoir bien voulu répondre à mes trop nombreuses sollicitations aussi bien lors de la mise en place et du déroulement d'expérimentation que lors de la rédaction de ce manuscrit.

- à M. Burillon, biométricien au CTFT, pour l'aide qu'il m'a apporté dans l'exploitation statistique de mes résultats.

- à M. Pelletier, responsable des serres au BSFT, pour m'avoir permis de cultiver un matériel végétal de choix dans les meilleures conditions possibles.

- à Mme. Gaillard et Mme Hautier, du laboratoire de Microbiologie de la Faculté Bichat (Paris X), pour leur disponibilité et l'aide précieuse qu'elles m'ont apportées lors des manipulations concernant la partie plus biochimique de mon travail.

- à tous les amis et camarades des laboratoires BSFT (Nogent sur Marne) et de Biologie des Sols (Dakar).

Enfin, je dédie ce mémoire à mes parents ainsi qu'à Isabelle, qui ont partagé tous mes soucis pendant ces années de travail.

Résumé

Une prospection menée à travers les territoires sénégalais et gambien, nous a permis de récolter des nodules sur les racines de 91 plants de *Casuarina equisetifolia* implantés dans cette région. Cent sept souches de *Frankia* ont pu être isolées à partir des nodules de 22 plants. Seulement 80 souches ont pu être cultivées de manière constante et en assez grande quantité pour permettre les expérimentations entreprises dans ce travail.

L'étude de la diversité génétique existant au sein de cette collection de *Frankia*, a été faite en essayant de caractériser ces souches par différentes méthodes. Chacune des méthodes suivantes :

- évaluations du pouvoir d'infection et de l'effectivité de ces souches vis-à-vis de *Casuarina equisetifolia*,
 - hybridation d'une portion d'ADN extrait de ces souches et amplifiée par PCR ("Polymerase Chain Reaction") avec des sondes d'ADN choisies,
 - étude du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP) obtenus par clivage d'une portion d'ADN amplifié (PCR) par une endonucléase choisie,
 - étude des profils enzymatiques (estérases) de ces souches,
- nous a permis de caractériser ces souches et de les répartir en plusieurs groupes.

Les résultats que nous avons obtenus confirment les informations prises dans la littérature selon lesquelles il est parfois difficile d'isoler et de cultiver *Frankia*. Ils mettent tous aussi en évidence la présence d'une diversité génétique importante au sein de la population sénégalogambienne de souches de *Frankia* isolées de *Casuarina equisetifolia*. Cette population s'organise en différents groupes à partir des résultats de caractérisation obtenus pour chaque souche. Un nombre restreint de souches différentes les unes des autres (7/75), forment un groupe hétérogène encore mal défini qui se différencie nettement des autres groupes plus homogènes.

Des observations ponctuelles faisant apparaître l'infection de plants d'*Hippophæ rhamnoides* par des souches de *Frankia* de *Casuarina*, nous ont fait aborder le problème de la coinfection.

Abstract

To constitute a large collection of *Frankia* strains, root nodules were collected from 91 introduced trees of *Casuarina equisetifolia* throughout different areas of Senegal and Gambia. One hundred and seven *Frankia* strains have been isolated from 22 trees. Genetic diversity was analysed on 80 *Frankia* strains which proved successful growth in defined medium.

Genetic diversity of our *Frankia* collection was established using different methods of characterization as follows : infectivity and effectivity of these strains on selected clone of *C. equisetifolia* ; DNA hybridization with specific DNA probes, after amplification by the Polymerase Chain Reaction method (PCR) of the *nif* H-D gene ; Restriction Fragment Length Polymorphism analysis (RFLP) of an amplified (by PCR) DNA segment of the *rrn* gene ; enzymatic (esterases) patterns of these strains.

All these criteria allowed to differentiate *Frankia* strains from our collection and enabled us to separate these bacteria into several distinct groups. Although the isolation and the cultivation of *Frankia* constitute a limiting factor for obtaining a large and diversified collection of bacteria (as described in many studies), the studies of our *Frankia* strains as described above showed that *Frankia* strains from Senegal and Gambia are genetically heterogeneous. Several homogeneous groups were identified according to their genetic characteristics whereas 7 of the 75 strains could not be classified in homogeneous groups.

Different hypotheses related to the infection of *Hippophæ rhamnoides* by some strains of *Frankia* isolated from *C. equisetifolia* were also discussed in the present work.

Sommaire

Liste des annexes	10
Liste des illustrations.....	11
Introduction.....	13
Position du problème.....	15
1 - Aperçu sur des plantes actinorhiziennes :	
les Casuarinacées.....	16
2 - Le microorganisme symbiotique : <i>Frankia</i>	17
2.1 - Historique et généralités.....	17
2.2 - L'isolement de <i>Frankia</i>	17
2.3 - Morphologie de <i>Frankia</i> en culture pure.....	18
2.4 - Caractérisation des souches de <i>Frankia</i>	18
3 - Le microorganisme <i>Frankia</i> isolé de <i>Casuarina</i>	19
4 - Origine du <i>Frankia</i> de <i>Casuarina</i> au Sénégal	20
5 - Objectifs de notre étude	20
Partie 1 : Constitution d'une collection de <i>Frankia</i>	22
Introduction.....	23
Matériel et méthodes	25
1 - Prospections et récoltes sur le terrain.....	26
2 - Caractéristiques du sol utilisé au laboratoire.....	27
3 - Isolement :.....	28
3.1 - Isolement à partir de nodules frais prélevés au champ.....	28
3.2 - Piégeages :.....	28
3.2.1 - Traitement des graines.....	29
3.2.2 - Broyat de nodules.....	29
3.2.3 - Récolte des jeunes nodules obtenus	29
4 - Cultures et conservation des souches de <i>Frankia</i> :.....	29
4.1 - Culture des souches de <i>Frankia</i>	29
4.2 - Conservation des souches de <i>Frankia</i>	30
Résultats.....	31
1 - Prospection sur le terrain	32
2 - Isolement de <i>Frankia</i> à partir de nodules frais de <i>C. equisetifolia</i> :.....	34
2.1 - Isolement à partir de nodules frais	34
2.2 - Piégeage.....	39
↳ Synthèse des résultats concernant l'obtention d'isolats de <i>Frankia</i>	40
Discussion.....	41

Partie 2 : Caractérisation par test d'infectivité-effectivité et spectre d'hôte	45
Introduction.....	46
Matériel et méthodes	49
1 - Souches de <i>Frankia</i> utilisées dans ce travail :	50
1.1 - Souches de <i>Frankia</i> isolées au cours de ce travail.....	50
1.2 - Souches de <i>Frankia</i> préexistantes à notre étude et utilisées dans ce travail.....	50
2 - Matériel végétal	50
3 - Caractéristique du sol utilisé au laboratoire.....	50
4 - Infectivité et efficience des souches de <i>Frankia</i>	50
5 - Spectre d'hôte des souches de <i>Frankia</i>	53
6 - Outils statistiques	53
Résultats.....	54
1 - Infectivité et effectivité des souches de <i>Frankia</i> :	55
1.1 - Infectivité des souches de <i>Frankia</i> vis-à-vis du clone β de <i>Casuarina equisetifolia</i>	55
1.2 - Effectivité des souches de <i>Frankia</i> vis-à-vis du clone β de <i>Casuarina equisetifolia</i>	59
➤ Synthèse des résultats obtenus au test d'infectivité-effectivité.....	64
2 - Spectre d'hôte des souches de <i>Frankia</i>	65
Discussion.....	66
1 - Infectivité des souches de <i>Frankia</i>	67
2 - Effectivité des souches de <i>Frankia</i>	70
Partie 3 : Caractérisation de <i>Frankia</i> par des méthodes de biologie moléculaire	72
Introduction	73
Matériel et méthodes	76
1 - Souches de <i>Frankia</i> utilisées dans cette partie du travail	77
2 - Culture des souches de <i>Frankia</i>	77
3 - Caractérisation des souches de <i>Frankia</i> par des méthodes de biologie moléculaire :.....	77
3.1 - Extraction d'ADN :	77
3.1.1 - Protocole d'extraction de l'ADN par sonication d'1 ml de culture fraîche de <i>Frankia</i>	77
3.1.2 - Protocole d'extraction d'ADN par sonication à partir de nodules fraîchement récoltés	78
3.1.3 - Purification de l'ADN	78
3.2 - Amplification en chaîne par polymérase - PCR.....	79

3.3 - Emploi de sonde d'ADN :.....	80
3.3.1 - Dépôt de l'ADN sur membrane de nitrocellulose	80
3.3.2 - Sonde radioactive :.....	80
. 3.3.2.1 - Préparation de la sonde radioactive.....	80
. 3.3.2.2 - Hybridation sonde radioactive et fragment d'ADN amplifié.....	80
. 3.3.2.3 - Autoradiographie	81
3.3.3 - Sonde non radioactive :	81
. 3.3.3.1 - Préparation de la sonde non radioactive.....	81
. 3.3.3.2 - Hybridation sonde non radioactive et fragment d'ADN amplifié	82
3.4 - RFLP ("Polymorphisme de la Longueur des Fragments de Restriction") à partir d'un fragment d'ADN amplifié.....	83
3.4.1 - Protocole des gels d'électrophorèse	84
Résultats.....	85
1 - Hybridation avec les sondes d'ADN n° 27 et 28 :	86
1.1 - Amplification en chaîne par polymérase.....	86
1.2 - Hybridation de l'ADN amplifié de chaque souche avec les sondes n° 27 et 28	89
➡ Synthèse des résultats concernant l'étude d'hybridation	89
2 - Etude du Polymorphisme de la Longueur des Fragments de Restriction (RFLP) :.....	90
2.1 - Amplification en chaîne par polymérase.....	90
2.2 - Restrictions enzymatique-RFLP :	92
2.2.1 - Choix des matériels employés.....	92
2.2.2 - Résultats obtenus avec l'enzyme Nci I.....	94
➡ Synthèse des résultats concernant les RFLP.....	96
Discussion.....	97
1 - Amplification en chaîne par polymérase	98
2 - Hybridation avec les sondes n° 27 et 28	99
3 - Etude des profils de restriction.....	100
Partie 4 : Caractérisation de <i>Frankia</i> par des méthodes biochimiques.....	102
Introduction	103
Matériel et méthodes	106
1 - Souches de <i>Frankia</i> étudiées dans cette partie du travail	107
2.- Culture des souches de <i>Frankia</i>	107

3 - Caractérisation des souches de <i>Frankia</i> par analyse du polymorphisme électrophorétique des enzymes :	107
3.1 - Protocole d'extraction de protéines solubles de <i>Frankia</i>	107
3.2 - Dosage des protéines extraites des cultures de <i>Frankia</i>	107
3.3 - Electrophorèse en gel d'acrylamide-agarose	108
3.4 - Coloration des gels d'électrophorèse :.....	108
3.4.1 - Révélation des estérases.....	108
3.4.2 - Révélation des déshydrogénases.....	109
3.4.3 - Révélation des phosphatases acides	110
3.4.4 - Révélation des peroxydases	110
3.5 - Post-traitement des gels	110
Résultats.....	111
1 - Standardisation des dépôts d'extraits protéiques sur gel d'électrophorèse.....	112
2 - Recherche de marqueurs enzymatiques	112
3 - Etudes des types estérasiques	114
➔ Synthèse des résultats obtenus par analyses des profils estérasiques....	118
Discussion.....	119
Synthèse des résultats de caractérisation.....	122
Conclusion	127
Références bibliographiques.....	129
Annexes	142

Liste des annexes :

Annexe 1 : Caractéristiques physico-chimiques du sol de Bel Air.....	143
Annexe 2 : Milieu BAP	144
Annexe 3 : Origine des souches de collection utilisées dans notre travail.....	145
Annexe 4 : Milieu NGT.....	146
Annexe 5 : Milieu de Hoagland et Arnon, dilué au 1/4 et sans azote.....	147
Annexe 6 : Liste des amorces et sondes utilisées	148
Annexe 7 : Positions géographiques des différentes amorces et sondes d'ADN dans le génome de <i>Frankia</i>	149
Annexe 8 : Gels et solutions pour électrophorèses d'ADN.....	150
Annexe 9 : Extraction, amplification et profils d'hybridation de l'ADN des souches de <i>Frankia</i>	152
Annexe 10 : Récapitulatif des résultats obtenus à l'issue de chaque caractérisation	153

Liste des illustrations :

Fig. 1 : Zones de prospection et isohyètes.....	27
Tableau 1 : Liste des différents sites de prélèvement de nodules frais	33
Tableau 2 : Les isolats obtenus	34
Tableau 3 : Proportions par site des points de prélèvement dont <i>Frankia</i> a été isolé	37
Fig. 2 : Temps nécessaire à l'apparition d'isolats.....	38
Tableau 4 : Références des 80 isolats obtenus et étudiés	39
Tableau 5 : Résultats du test d'infectivité-effectivité des souches de <i>Frankia</i> vis-à-vis de l'hôte <i>Casuarina equisetifolia</i>	56
Tableau 6 : Infectivité-effectivité des souches de <i>Frankia</i> vis-à-vis du <i>C. equisetifolia</i>	58
Tableau 7 : Correspondances souches-numéros.....	59
Tableau 8 : Tableau des corrélations	60
Fig. 3 : Histogrammes des moyennes des variables de poids secs des parties aériennes et des quantités d'azote total contenues dans ces parties aériennes	61
Fig. 4 : Histogramme des moyennes d'ARA relevés à 60 min par traitement-souche.....	63
Fig. 5 : Histogramme des moyennes de poids secs de nodules obtenus par traitement- souche.....	64
Planche 1 :	
1 - Gel de contrôle d'extraction de l'ADN par sonication :.....	87
2 - Exemple de résultats obtenus sur un gel de contrôle d'amplification :.....	87
Tableau 9 : Hybridation de l'ADN des souches avec les sondes n° 28 et 27	88
Tableau 10 : Profils d'amplification et de restriction des souches de <i>Frankia</i>	91
Fig. 6 : Sites de clivage des endonucléases Hae III, Cfo I, Msp I et Nci I sur la portion amplifiée (51-38) du génome de la souche CeD	93

Fig. 7 : Schémas des différents profils de restriction obtenus avec l'endonucléase Nci I.....	94
Planche 2 :	
1 - Comparaison des profils des souches D 11, CeF, Cj et M 02, par types de déshydrogénases	113
2 - Comparaison entre les profils de deux types d'estérases, acétate et propionate de β naphtyl, pour les souches CeF, Cj et M 02	113
Tableau 11 : Description des types d'estérases	114
Fig. 8 : Schémas des types électrophorétiques répartis par zymotype	115
Fig. 9 : Différenciation des souches de <i>Frankia</i> suivant leur appartenance aux groupes d'infectivité-effectivité, d'hybridation, de restriction et leur zymotype	124
Tableau 12 : Groupes et sous-groupes de souches de <i>Frankia</i> d'origine sénégal- gambienne	125

Introduction

Une progression inquiétante de la désertification (due au climat) et de la désertisation (due à l'homme) est actuellement observée dans de nombreux pays des régions tropicales arides ou semi-arides. Ce phénomène se traduit par une réduction de la quantité et de la diversité des espèces animales et végétales, une diminution de la fertilité des sols et une érosion importante due au vent et à l'eau. Ces profonds bouleversements de l'environnement engendrent des processus de sélection qui à leur tour entraînent tôt ou tard, la disparition d'espèces natives devenues inadaptées. Il convient donc pour freiner ce processus, soit de favoriser la plantation et la croissance d'espèces natives particulières, soit de reboiser à l'aide d'essences dites pionnières, capables de vivre et croître en milieu aride. Pour réussir ce type de plantation, il faut bien entendu tenir compte de l'aptitude de ces essences à s'adapter à la sécheresse et à certains facteurs adverses du sol tels que l'acidité, la salinité.

Les besoins limités sur le plan nutritionnel des espèces fixatrices d'azote, légumineuses ou plantes actinorhiziennes, sont des critères qui en font des plantes de choix pour le reboisement des sols pauvres. L'association symbiotique avec un microorganisme, *Rhizobium* pour les légumineuses et *Frankia* pour les plantes actinorhiziennes, permet à ces espèces de fixer directement l'azote atmosphérique et donc de croître sur des sols déficients en azote.

Le microorganisme, après avoir infecté la plante hôte, se développe à l'intérieur des tissus végétaux entraînant rapidement la formation de nodules ou nodosités situés soit sur les racines souterraines, soit sur les primordium racinaires ou racines adventives au niveau de la tige. L'azote gazeux est transformé par le microorganisme en ammoniac NH_3 grâce à une enzyme, la nitrogénase. Cet ammoniac est ensuite cédé à la plante qui, en échange, fournit au microorganisme des substances énergétiques.

De telles plantes participent à la restauration de la fertilité des sols en leur apportant sous forme d'une couche d'humus (décomposition des racines, feuilles ou rameaux assimilateurs et branches mortes tombées à terre) de l'azote puisé dans l'atmosphère.

Les étapes essentielles à une meilleure connaissance de ces symbioses sont :

- l'étude de la diversité génétique des microorganismes symbiotiques fixateurs d'azote et de leurs plantes hôtes,
- l'étude des interactions existant entre les deux partenaires de la symbiose,
- et enfin, l'étude des interactions existant entre l'association symbiotique et son environnement.

Ces études permettraient d'identifier et exploiter avec le maximum d'efficacité les systèmes symbiotiques les mieux adaptés aux différentes conditions environnementales.

Position du problème

Dans notre travail, nous nous intéressons plus particulièrement à l'étude de l'un des microorganismes symbiotiques fixateurs d'azote, le *Frankia* de *Casuarina*.

1 - Aperçu sur des plantes actinorhiziennes : les Casuarinacées

L'utilisation en sylviculture des plantes actinorhiziennes n'est plus à démontrer. Ces plantes sont largement utilisées de par le monde pour reboiser, lutter contre l'érosion ou produire du bois de feu. Citons comme exemples récents les reboisements faits au Sénégal et en Chine :

- au Sénégal où 180 km de dunes côtières ont été fixées grâce à un reboisement à partir de *Casuarina equisetifolia* (filao) ;

- en Chine où plus d'un million d'hectares de *Casuarina equisetifolia* ont été plantés le long de la côte méridionale pour former une ceinture protectrice de 3 000 km de long et de 500 m à 5 km de large.

Il y a 8 familles et 24 genres de plantes actinorhiziennes. Parmi ces plantes, celles qui se rencontrent naturellement dans les régions tropicales et subtropicales appartiennent à la famille des Casuarinacées. Cette famille se subdivise en 4 genres et 96 espèces :

- le genre *Allocasuarina* comprenant 59 espèces
- le genre *Ceuthostoma* comprenant 2 espèces
- le genre *Casuarina* comprenant 17 espèces
- le genre *Gymnostoma* comprenant 18 espèces

La distribution géographique naturelle des Casuarinacées est *circum*-Pacifique, bien qu'actuellement cette famille soit représentée dans la plupart des écosystèmes s'étendant des formations désertiques à la forêt tropicale humide. Les Casuarinacées ont la capacité d'établir des doubles symbioses ou même triples symbioses pour le *Casuarina equisetifolia* (*Frankia*, champignons endomycorhizes et champignons ectomycorhizes) (Ba et al., 1987), leur permettant de coloniser des sols très pauvres et de pousser dans des conditions défavorables. Convenablement inoculé avec *Frankia* et des champignons mycorhiziens efficaces, leur productivité peut atteindre 6 à 15 m³.ha⁻¹ même sur des sols pauvres et leur pouvoir fixateur d'azote est très grand : de 40 à 100 kg d'azote fixé par ha et par an, d'où leur intérêt en agroforesterie (anon., 1984).

L'espèce la plus largement introduite hors de son aire géographique d'origine est le *Casuarina equisetifolia*. C'est une espèce côtière pouvant atteindre 10 à 30 m de hauteur. Elle se rencontre naturellement en Australie, dans le Sud-Est asiatique et dans les îles du Pacifique.

2 - Le microorganisme symbiotique : *Frankia*

2.1 - Historique et généralités :

C'est en 1866 que Woronin publia dans les Mémoires de l'Académie Impériale des Sciences de Saint-Petersbourg (Woronin, 1866), une étude mettant en évidence l'existence de microorganismes à l'intérieur des nodules racinaires présent sur quelques espèces végétales. Ce n'est que bien plus tard que le microorganisme fut identifié comme étant un actinomycète capable de fixer l'azote atmosphérique et de le transformer en azote ammoniacal directement utilisable par les plantes hôtes. Les plantes hôtes qui établissent une symbiose avec ces microorganismes sont appelées plantes actinorhiziennes.

L'actinomycète impliqué, a été défini comme appartenant à la famille des Frankiacées, avec un genre particulier, le genre *Frankia*. Il est présent dans le sol, comme nous avons pu le vérifier, à l'état de saprophyte sous forme de structures filamenteuses, hyphes, pouvant supporter des vésicules et probablement des sporanges. C'est à partir de ses hyphes que *Frankia* est capable d'infecter les racines de la plante hôte.

En tant qu'endophyte des plantes actinorhiziennes, il est présent dans les nodules de ces plantes sous forme d'amas d'hyphes intracellulaires. Ces hyphes sont septés, ramifiés et entourés d'une gaine de polysaccharides synthétisée par le cytoplasme de l'hôte (Newcomb et al., 1981). Des vésicules et ou des sporanges peuvent apparaître *in vivo* dans certains cas de symbiose suivant l'espèce végétale impliquée, mais pas dans le cas de symbiose avec des *Casuarina* (Tyson et Silver, 1979).

2.2 - L'isolement de *Frankia* :

Les nombreuses tentatives d'isolement de *Frankia* à partir de nodules de plantes actinorhiziennes, entreprises après 1866, ont d'abord échoué. De sorte que l'on a longtemps pensé de *Frankia* qu'il était un symbiote obligatoire des plantes actinorhiziennes. La cause elle-même de la difficulté d'isoler *Frankia* est encore inconnue ou sujette à des hypothèses :

- présence dans les extraits de nodules, de composés inhibiteurs de la croissance du *Frankia* (Baker et O'Keefe, 1984),
- absence de milieux efficaces d'isolement et de culture,
- croissance lente inhérente à cet organisme,
- passage pour le microorganisme d'un état symbiotique à un état saprophytique.

Ce n'est que depuis 1978 (Callaham et al., 1978) qu'une souche de *Frankia* a été isolée de nodule de *Comptonia peregrina* (*Myricaceae*) et est disponible en culture pure pour la première fois.

2.3 - Morphologie de *Frankia* en culture pure :

Dès l'isolement de la première souche de *Frankia* (Callaham et al., 1978), des travaux concernant la physiologie, la biochimie ainsi que la génétique de *Frankia* ont pu être abordés. C'est ainsi qu'il a pu être démontré qu'*in vitro* tous les *Frankia* se présentent sous forme d'hyphes à croissance indéterminée pouvant produire des vésicules, sites décrits comme le lieu de la fixation d'azote (Tjepkema et al., 1980, 1981 ; Gauthier et al., 1981a, 1983 ; Tisa et al., 1983) et des sporanges. Vésicules et sporanges n'apparaissent généralement qu'en milieu de culture pauvre. Dans le cas du *Frankia* de *C. equisetifolia* des structures particulières dites "hyphes toruleux", sont formées dans des milieux défavorables, ce sont des hyphes anormaux (Diem et al., 1985). En plus de cette morphologie commune, tous les *Frankia* possèdent des parois cellulaires de type III et phospholipides de type I (Lechevalier, 1984) ainsi qu'un pourcentage en GC de 66 à 72 (Fernandez, 1989).

2.4 - Caractérisation des souches de *Frankia* :

Parallèlement aux études concernant la physiologie, la biochimie ainsi que la génétique de *Frankia*, des études ayant pour but de structurer le genre *Frankia* ont pu être abordés à partir des souches pures nouvellement isolées. Plusieurs tentatives de regroupement des souches de *Frankia* isolées à partir de plantes hôtes d'espèces ou de genres différents, ont été faites. Les premières ont été basées sur le pouvoir infectif des *Frankia* (Becking, 1970 ; Baker, 1987). La classification fondée sur le spectre d'hôte des souches de *Frankia*, proposée par Baker en 1987, divise l'ensemble des *Frankia* en quatre groupes, les souches infectives sur :

- 1 - *Alnus* et *Myrica cerifera*,
- 2 - *Casuarina equisetifolia* et *Myrica cerifera*,
- 3 - Elaeagnaceae et *Myrica cerifera*,
- 4 - Elaeagnaceae.

Depuis d'autres méthodes permettant la différenciation de groupes de *Frankia*, ont été utilisées. Elles sont fondées sur l'étude :

- des compositions en sucres (St-Laurent et al., 1988),
- des compositions en lipides (Lalonde et al., 1988),
- des profils électrophorétiques de protéines (Benson et al., 1984),
- des profils électrophorétiques d'enzymes (Gardes et al., 1987),
- de l'homologie ADN-ADN (An et al., 1985a ; Fernandez et al., 1989).

De toutes les études qui ont été menées jusqu'à aujourd'hui, il ressort qu'une importante diversité génétique existe au sein du genre *Frankia*.

Les derniers travaux de Fernandez et al. (1989) ont permis de mettre en évidence l'existence de neuf espèces génomiques dans le genre *Frankia*, à l'aide de la technique d'hybridation ADN-ADN du génome total. Ces espèces regroupent chacune des souches appartenant à un des différents groupes de compatibilité :

- les espèces génomiques 1, 2 et 3 regroupent des souches infectives sur *Alnus*,
- les espèces génomiques 4, 5, 6, 7 et 8 regroupent des souches infectives sur *Elaeagnaceae*,
- l'espèce génomique 9 regroupe des souches infectives sur *Casuarinacées*.

L'espèce génomique 9 regroupe des souches de *Frankia* infectives sur *Casuarinaceae* et est considérée comme très homogène (Fernandez et al., 1989). Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à des souches de *Frankia* appartenant à cette espèce génomique, et qui ont été isolées de plants appartenant au genre *Casuarina*.

3 - Le microorganisme *Frankia* isolé de *Casuarina* :

Ce n'est seulement qu'en 1982 que la première souche d'un *Frankia* de *Casuarina equisetifolia* fut isolée (Diem et al., 1982a). Elle a la particularité, bien que présentant les caractéristiques spécifiques au genre *Frankia*, de ne pouvoir réinfecter le *C. equisetifolia*, plante hôte d'origine. C'est à partir de tests d'inoculations croisées, qu'il a été possible de prouver que cette souche est infective vis-à-vis d'une autre espèce végétale, *Hippophæ rhamnoides*, plante appartenant à la famille des *Elaeagnacées*.

Au cours d'autres travaux, Diem et al. (1983) ont isolé la première souche de *Casuarina equisetifolia* pouvant réinfecter son hôte d'origine. Elle s'est révélée être ininfective sur les *Elaeagnacées*. Il apparaît donc que deux types de souches sont présents au niveau des nodules de plantés du genre *Casuarina* :

- des souches dites "atypiques" (Nazaret et al., 1989) : souches isolées à partir de nodules récoltés sur un *Casuarina* par exemple *Casuarina equisetifolia* et ne pouvant à nouveau le réinfecter,
- et des souches dites "typiques" : souches isolées à partir de nodules récoltés sur *Casuarina equisetifolia* et qui peuvent à nouveau réinfecter cette espèce végétale.

On peut observer, *in vitro*, une coloration orangée à rouge sang pour les souches dites "atypiques" (Diem et al., 1982b ; Gauthier et al., 1981b, 1984), alors que les souches dites "typiques" sont apigmentées.

Actuellement, peu de souches de *Frankia* de *Casuarina*, "typiques" ont été isolées et sont entretenues dans les collections de différents laboratoires à travers le monde. Elles se sont toutes révélées être très semblables les unes aux autres suivant différents critères morphologiques, d'infectivité, d'homologie de séquence d'ADN. Cependant, Puppo et al.

en 1985, démontrent dans leurs travaux à partir de cinq souches de *Frankia* de *Casuarina* qu'il existe une possibilité de les différencier en analysant leurs profils électrophorétiques d'enzymes.

L'intérêt de mieux connaître *Frankia* dans le but de mieux comprendre et d'améliorer la symbiose *Frankia-Casuarina*, nous a amené à étudier ce microorganisme sur une région limitée géographiquement au Sénégal et à la Gambie.

4 - Origine du *Frankia* de *Casuarina* au Sénégal :

Aucune plante actinorhizienne n'existe naturellement au Sénégal. Le *Casuarina equisetifolia* y a probablement été introduit pour la première fois à la fin du XIX^{ème} siècle et aucune information quant à son inoculation avec du *Frankia* n'a pu être relevée. Dans ce pays, les conditions d'inoculation de *C. equisetifolia* avec du *Frankia* ont longtemps été méconnues. Ce n'est que depuis 1976 lors d'une campagne de reboisement effectuée sous l'égide de la FAO, que la première inoculation à l'aide de broyat de nodules a été faite sur le terrain au Sénégal (Andéké-Lengui et Dommergues, 1981). La première inoculation de *C. equisetifolia* avec des cultures pures de *Frankia* n'a été faite qu'en 1984 par Sougoufara et al. (1989).

Pourtant des *C. equisetifolia* plantés avant 1976, présentent des nodules sur leur racines. Ceci pose le problème de l'origine de *Frankia* dans cette région. Deux hypothèses peuvent être émises :

- il existe naturellement un actinomycète du genre *Frankia* dans le sol sénégalais,
- le *Frankia* aujourd'hui présent au Sénégal, est d'origine australienne et a été importé avec les premiers plants de *C. equisetifolia* dès la fin du XIX^{ème} siècle.

5 - Objectifs de notre étude :

Si l'on est sûr de l'origine australienne des *Casuarina* importés en Afrique de l'Ouest, en revanche, il n'existe aucune information précise sur l'origine et la variabilité des souches de *Frankia* symbiote du *C. equisetifolia* au Sénégal. Les premiers travaux sur la symbiose *Casuarina - Frankia* réalisés au Sénégal ont bien montré à partir de peu de souches isolées de cette région qu'il y existe au moins deux types de *Frankia* isolés de *Casuarina equisetifolia* (souches "typiques" et souches "atypiques") (Gauthier et al., 1984). Afin de pouvoir déterminer le degré de variabilité existante au sein des populations Ouest africaines de souches de *Frankia* de *Casuarina* "typiques", nous nous sommes proposé, dans ce travail, d'explorer la variabilité génétique de souches isolées de *C. equisetifolia* au niveau de l'aire Sénégal-gambienne, en nous appuyant sur leurs propriétés symbiotiques, biochimiques et génétiques.

Ceci nous a amené à :

- 1 - prospecter à travers le Sénégal et la Gambie les sites plantés en *C. equisetifolia* et isoler l'actinomycète *Frankia* à partir des nodules récoltés de ces sites,
- 2 - caractériser les souches obtenues en testant leur infectivité-effectivité vis-à-vis de plantes d'espèces différentes, dont l'espèce hôte d'origine,
- 3 - vérifier l'appartenance des souches obtenues à l'un des deux groupes de compatibilité : souches de Casuarinacées et souches d'Elaeagnacées, en étudiant les signaux d'hybridation de leur ADN avec d'une part, une sonde spécifique de la souche "atypique" de référence, D 11, d'autre part, une sonde spécifique de souches "typiques", chacune construite à partir de séquences nucléotidiques déterminées au niveau du gène *nif* (gène intervenant dans la fixation d'azote),
- 4 - caractériser les souches obtenues en étudiant leurs profils de restriction obtenus au niveau du gène *rrn* (gène codant pour les ARN ribosomiaux) avec différentes endonucléases,
- 5 - caractériser les souches obtenues en étudiant leurs profils électrophorétiques d'enzymes.

Dans la rédaction de notre travail, nous avons choisi de réunir en un seul chapitre ou partie, les travaux relatifs à la mise en oeuvre de techniques de biologie moléculaire (paragraphe 3 et 4 cités précédemment).

Partie 1

- **Constitution d'une collection
de *Frankia***

Introduction

L'isolement et la culture *in vitro* de l'actinomycète *Frankia*, est souvent problématique (Baker et Torrey, 1979c). Plusieurs raisons peuvent être invoquées, la vitesse de croissance relativement lente de *Frankia* par rapport aux autres actinomycètes et eubactéries du sol, la méconnaissance de milieux de culture favorables à *Frankia*, et la présence dans les extraits de nodules, de composés phénoliques inhibiteurs de la croissance de *Frankia* qui ont été libérés des cellules de la plantes lors de l'isolement. Cependant, différentes techniques de base peuvent être utilisées pour l'isolement de *Frankia* avec plus ou moins de succès. La digestion enzymatique des nodules (Callaham et al., 1978), la dilution de broyats de nodules et étalement sur milieu gélosé contenant des extraits lipidiques de racines (Quispel et al., 1978), le fractionnement sur colonne de Sephadex (Baker et al., 1979a), le fractionnement sur gradient de saccharose (Baker et al., 1979b), la stérilisation de morceaux de nodules par tétraxide d'Osmium (Lalonde et al., 1981) et la filtration sur tamis de 20 µm et 50 µm (Benson, 1982), sont les techniques d'isolement les plus communément employées pour l'isolement de *Frankia* à partir de nodules. Elles ont surtout été utilisées pour l'isolement de *Frankia* à partir de nodules de plantes hôte du genre *Alnus* et à un degré moindre à partir de nodules des plantes hôtes des genres *Comptonia*, *Myrica* et *Elaeagnus*.

La technique que nous avons choisie, dérive de celle proposée par Lalonde et al. (1981) et a déjà été utilisée par Diem et Dommergues (1983) pour l'isolement de *Frankia* de *Casuarina equisetifolia*. La stérilisation de lobes ou morceaux de nodules par tétraxide d'osmium, est suivie d'un découpage fin de ces lobes ou morceaux de nodules en environnement stérile et de leur inclusion en milieu gélosé. C'est grâce à cette technique qu'une souche de *Frankia* de *Casuarina* pouvant réinfecter son hôte d'origine, a été isolée pour la première fois (Diem et Dommergues, 1983 ; Diem et al., 1983).

Les souches de *Frankia* de *Casuarina* préexistantes à notre étude et disponibles dans les collections à travers le monde, sont peu nombreuses. De plus, elles n'ont pas toutes été isolées à partir de la même espèce végétale hôte et ont des origines géographiques différentes. Afin de constituer une collection de *Frankia* de *Casuarina* ciblée sur une seule espèce végétale hôte et limitée géographiquement, nous nous proposons d'isoler des souches de *Frankia* de *Casuarina equisetifolia* du Sénégal et de la Gambie.

Pour ce faire, nous projetons :

- de prospecter de manière systématique tous les sites où *C. equisetifolia* a été implanté au Sénégal et en Gambie,
- de collecter dans chacun de ces sites, des échantillons de nodules frais de plants choisis aléatoirement
- et enfin, une fois de retour au laboratoire, tenter d'isoler à partir de ces échantillons de nodules, des souches de *Frankia* relatives à ces différents sites de prospection.

Matériel et méthodes

1 - Prospections et récoltes sur le terrain :

Une prospection systématique des sites plantés en *C. equisetifolia* a été menée à travers le Sénégal et la Gambie. Par site, des nodules de *C. equisetifolia* ont été récoltés, référencés et conservés au frais jusqu'au retour au laboratoire, afin de pouvoir constituer après isolement, une collection de *Frankia*.

La Fig. 1 présente les différentes zones de prospection (concordantes avec les différentes zones d'implantation du *C. equisetifolia* dans ces pays) et les courbes de précipitations moyennes annuelles ou isohyètes de cette région. Six zones au total ont été explorées, elles se répartissent comme suit :

- zone n° 1 : la région du Djoudj, au Nord du Sénégal qui longe le fleuve Sénégal sur sa partie terminale jusqu'au littoral Atlantique. Cette région est inondable en période d'hivernage (de Juillet à Septembre), sans être totalement sèche le reste de l'année. Malgré des conditions d'humidité favorables, *Casuarina equisetifolia* n'y a été que peu introduit.

- zone n° 2 : la "Grande Côte". C'est le littoral Nord du Sénégal, 180 km de plages et de dunes reliant Saint-Louis au Cap Vert (Dakar). C'est à l'Est de ces dunes, dans des dépressions dunaires appelées Niayes que sont implantées les cultures maraîchères et fruitières qui fournissent en produits frais toute la grande moitié Nord du Sénégal. Jusqu'à une période récente les Niayes étaient menacées d'ensablement par les dunes maritimes et dunes "jaunes" (dunes jaunes : dunes semi-fixées situées entre les dunes maritimes vives du bord de mer et les Niayes) sous l'action du vent. Depuis les années 1940, la plantation sur une grande échelle de *C. equisetifolia* a permis de fixer les dunes et de protéger les Niayes de l'ensablement. Il existe aussi à l'Est de ces Niayes un autre type de dunes, les dunes "rouges" (présence de fer dans leur sable) et qui ont la particularité d'être fixées naturellement, par une végétation pauvre à base d'*Acacia* spp.

- zone n° 3 : la "Petite Côte" avec la région du Siné-Saloum au sud (deux rivières très peu alimentées en eau : le Siné et le Saloum, dont l'estuaire commun se situe dans une zone inondable salée). C'est le littoral entre le Cap Vert au Nord, et la Gambie au Sud. Tout au long du bord de mer de cette zone, de nombreuses et ponctuelles implantations à caractère privé d'essences végétales, principalement à base de *C. equisetifolia*, ont été faites.

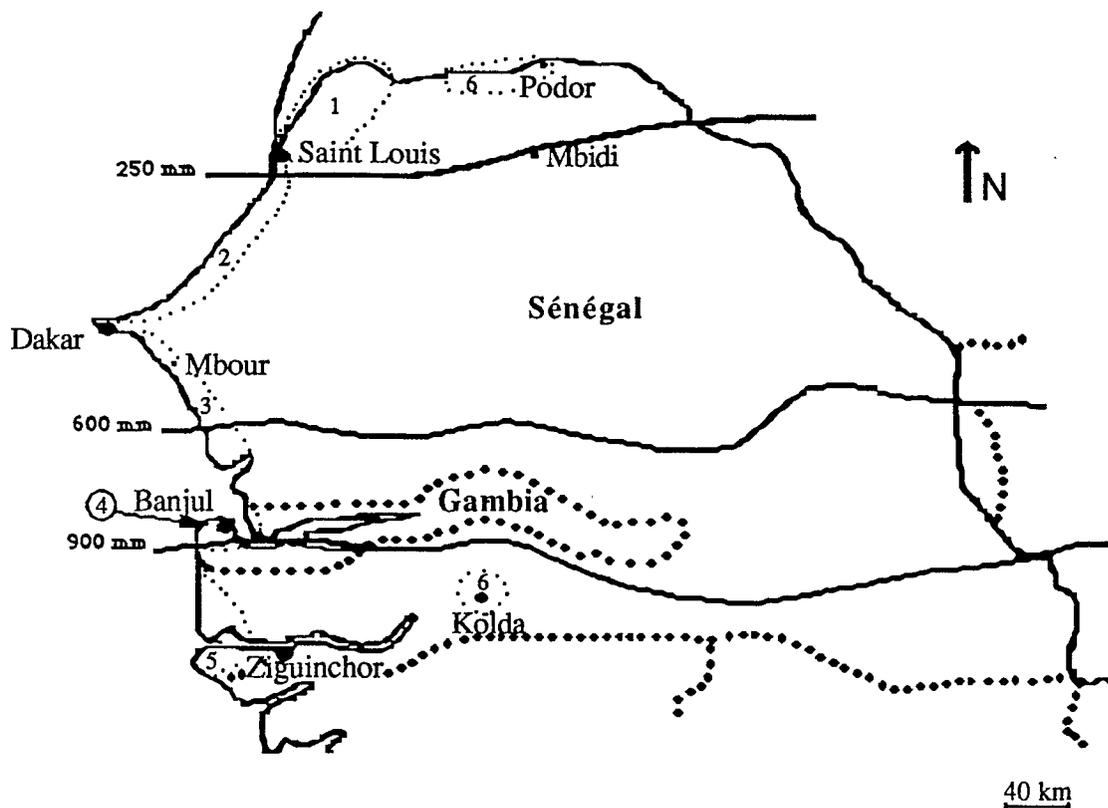
- zone n° 4 : cette zone comprend tout l'estuaire du fleuve Gambie, elle est le site d'implantations de *C. equisetifolia* très localisées et le plus souvent à caractère privé.

- zone n° 5 : il s'agit du littoral casamançais au Sud du Sénégal, avec l'estuaire du fleuve Casamance. On y trouve les terres les plus riches du pays, avec une forêt casamançaise de type humide encore bien représentée. On ne trouve des plantations de *C. equisetifolia* pratiquement que sur la côte, au niveau des plages et sites touristiques d'hébergement.

- zone n° 6 : c'est une zone constituée par des sites localisés à l'intérieur du pays et où *C. equisetifolia* a été repéré. Elle englobe en fait 2 sous-zones, l'une au Nord du pays

sur le fleuve Sénégal, région sèche, semi désertique et l'autre en Haute Casamance, région humide.

Fig. 1 : Zones de prospection et isohyètes



- Légende :
- Zone 1 : le Djoudj,
 - Zone 2 : "La Grande Côte",
 - Zone 3 : "La Petite Côte",
 - Zone 4 : l'estuaire du fleuve Gambie,
 - Zone 5 : le littoral casamançais,
 - Zone 6 : "intérieur du pays".

2 - Caractéristiques du sol utilisé au laboratoire :

Lors de nos expériences de piégeage du *Frankia*, d'évaluation de l'infectivité-effectivité et d'étude du spectre d'hôte des souches de *Frankia*, le sol utilisé était du sol de Bel Air (Dakar) (Annexe 1) préalablement stérilisé à l'autoclave (à 120°C durant 1 heure) et mélangé à des billes de polystyrène de 2 mm de diamètre (3/4 sol, 1/4 billes en volume). C'est un sol très pauvre en azote total (0,027 %).

3 - Isolement :

C'est la technique fondée sur la fragmentation de lobes frais de nodules superficiellement stérilisés au tétraoxyde d'osmium (OsO_4) (Lalonde et al., 1981) qui a été employée pour nos isolements. Dans un premier temps, il y a eu un essai d'isolement de *Frankia* directement à partir des nodules frais prélevés sur le terrain. Dans un deuxième temps, lorsque les premiers essais ont été infructueux, l'isolement a été tenté à partir de nodules frais issus de piégeages en pot.

3.1 - Isolement à partir de nodules frais prélevés au champ :

L'isolement est toujours fait à partir de lobes de nodules encore jeunes, de couleur blanchâtre, nacrée. Une fois les lobes prélevés sur le nodule et bien lavés, ils sont stérilisés superficiellement avec une solution aqueuse d' OsO_4 à 2 % pendant 2 à 3 minutes. Après plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile, ces lobes ont été découpés aseptiquement en minuscules fragments, mis dans une boîte de Petri stérile ($\phi 90$ mm), dans laquelle est coulée une mince couche (environ 1 ml) de milieu BAP gélosé (Murry et al., 1984) sans azote (Annexe 2) additionné de 10 g.l^{-1} de saccharose. Cette mince couche permet de fixer les morceaux de nodule sur un même plan au fond de la boîte de Petri, ce qui facilite l'observation ultérieure à la loupe binoculaire. Une fois cette première couche solidifiée, une deuxième couche du même milieu est coulée afin de bien recouvrir les morceaux de nodules (environ 2 ml).

Les boîtes de Petri ainsiensemencées, sont scellées avec du Parafilm et incubées à 28°C . Après 4 à 8 semaines d'incubation, des colonies de *Frankia* observables à la loupe, se développent sur des fragments de nodule. Chaque colonie, apparemment non contaminée, ainsi repérée, est prélevée à l'aide d'une aiguille stérile, broyée stérilement dans un microtube de 1,5 ml avec un piston Pellet (Polylabo, France), et isolée dans des piluliers en milieu BAP complet liquide (environ 20 ml). Au bout de 2 à 3 semaines, la culture de *Frankia* ainsi obtenue, est repiquée normalement en milieu liquide [BAP complet ou NGT (Annexe 4)], après avoir fait un contrôle de pureté de la culture au microscope. Si le contrôle révèle la présence d'un contaminant, le repiquage se fait alors en milieu BAP liquide sans azote et ces isolats sont mis en attente en vue d'une décontamination ultérieure.

3.2 - Piégeages :

Certains nodules récoltés sur le terrain ne sont pas assez frais pour permettre directement un isolement de *Frankia*. C'est pourquoi il est parfois nécessaire de passer par une étape

supplémentaire qui vise à obtenir de nouveaux nodules sur de jeunes plants de *C. equisetifolia* issus de semis, en les inoculant avec un broyat de nodules récoltés sur le terrain.

3.2.1 - Traitement des graines :

Les graines de *C. equisetifolia* sont stérilisées superficiellement par l'acide sulfurique concentré pendant 2 à 3 minutes, rincées abondamment à l'eau distillée stérile et séchées à l'air libre.

Cinq graines sont mises à germer dans des pots de 20 cl contenant chacun du sol de Bel-Air préalablement traité, comme décrit précédemment, mélangées à une solution de broyat de nodules.

Tout au long de l'expérience, les plants sont arrosés quotidiennement avec de l'eau stérile ; cet arrosage est remplacé hebdomadairement par un apport de 30 ml d'une solution nutritive de Hoagland (Hoagland et Arnon, 1938 ; Sougoufara, 1990) diluée au 1/4, sans azote (Annexe 5).

3.2.2 - Broyat de nodules :

La solution de broyat de nodules est obtenue en broyant 10 g de nodules, dans 50 ml d'eau distillée stérile à l'aide d'un Waring Blendor dont la cuve a été préalablement stérilisée à l'autoclave.

3.2.3 - Récolte des jeunes nodules obtenus :

Cinq à six mois après, les jeunes plants sont déterrés et les jeunes nodules traités comme précédemment décrit, afin d'isoler *Frankia*.

4 - Cultures et conservation des souches de *Frankia* :

4.1 - Culture des souches de *Frankia* :

Tout au long de ce travail, une seule méthode de repiquage des souches en milieu liquide est pratiquée. A partir d'1 ml d'une culture déjà existante, une série de 3 repiquages au moins est effectuée. Le premier est effectué dans 5 ml de milieu liquide et a pour but de rajeunir les cultures. Puis à partir de cette nouvelle culture, un second repiquage dans 20 ml du même milieu est effectué avec une quantité d'inoculum correspondant à un dosage de viabilité de 0,25 nmol d'INTFormazan (INT : 2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chlorure) par ml de milieu. Tous les autres repiquages ultérieurs possibles, se font de la

même manière : récolte de la totalité de la culture existante pour inoculer un volume de milieu 5 fois plus important.

Le temps d'incubation entre deux repiquages est de 12 jours, à 28 °C, à l'obscurité. Chaque repiquage est fait avec un inoculum homogénéisé au préalable par passages répétés dans une aiguille (23 G x 1") à l'aide d'une seringue (Lalonde et al., 1979).

Toutes les manipulations sont faites stérilement sous hotte stérile. Les milieux de base utilisés dans ce travail sont :

- le milieu BAP (annexe 2)
- le milieu NGT (annexe 4)

Le dosage de la viabilité des cultures de *Frankia* est exprimée en Activité Réductrice de l'INT (IRA) (Prin et al., 1990) s'effectue comme suit : dans un microtube à bouchon vissant, mettre 1 ml de culture pottérisée, ajouter 100 µl d'INT à 2% dans l'eau distillée, boucher, mélanger et incuber 60 min à l'obscurité avant de centrifuger 10 min à 13 500 rpm à 4°C. Après avoir éliminé le surnageant, rajouter 1 ml de méthanol RP, mélanger, incuber au bain-marie à 70°C jusqu'à décoloration complète des particules en suspension, laisser refroidir et centrifuger 3 min à 13 500 rpm, avant de lire la DO à 490 nm à température ambiante (blanc : eau ou méthanol RP).

Gamme étalon : à partir d'une solution stock d'INTF à 10^{-4} Mol/l dans du méthanol, préparer une gamme selon les dilutions : 1/9, 2/8, 3/7, 4/6, 5/5, 6/4, 7/3, 8/2, 9/1, 10/0 avec du méthanol et prendre la DO à 490 nm (blanc : méthanol RP)

4.2 - Conservation des souches de *Frankia* :

Les souches de *Frankia* sont conservées dans du milieu NGT liquide à température ambiante. Des repiquages sont effectués tous les 3 à 4 mois environ, et une culture intermédiaire de 12 jours est faite avant de repiquer les souches pour la mise en collection.

Résultats

1 - Prospection sur le terrain :

La prospection systématique des sites plantés en *C. equisetifolia*, menée sur tout le territoire sénégal-gambien a permis une récolte de nodules frais à partir de 91 points de prélèvement différents répartis en 41 sites sur les 6 zones géographiques de prospection. Un point de prélèvement équivaut à un arbre sur le terrain.

Le nombre de sites de prospection par zone, sites qui sont décrits dans le Tableau 1, est égal au nombre de sites plantés avec du *C. equisetifolia*, rencontrés lors des prospections menées sur le terrain.

La première observation que l'on peut faire après analyse du Tableau 1, est que la différence de distribution du nombre de sites prospectés par zones reflète l'importance qu'occupent les opérations de reboisement en *C. equisetifolia* dans chaque zone. En effet, les zones n° 2 ("La Grande Côte") et 5 (littoral casamançais) cumulent à elles deux plus de la moitié des sites de prospection (11/41 sites pour la zone n° 2 et 13/41 sites pour la zone n° 5) avec une répartition à peu près égale entre elles. Ce qui représente plus du 2/3 des arbres-points de prélèvements, avec là par contre un léger déséquilibre entre elles, puisqu'il y a eu plus de prélèvements dans la zone n° 2 (37/91 arbres) que dans la zone n° 5 (27/91 arbres). La différence d'importance des opérations de reboisement menées dans ces deux zones explique ce léger déséquilibre. C'est sur le littoral nord, zone n° 2, que les opérations de reboisement gouvernementales ont été menées avec la participation de différentes O.N.G. (Organisation Non Gouvernementale), 180 km de côte sur une profondeur de 300 à 400 m ont été plantés. Alors qu'en Casamance, zone n° 5, le *C. equisetifolia* qui s'y trouve est le fait d'actions particulières, ponctuelles et non coordonnées, non dans un but de reboisement, mais plutôt d'agrément des plages, d'aménagement de sites touristiques par les communes et grands hôtels. Le nombre de plants et la superficie plantée y sont moins importants.

La zone n° 3 ("La Petite Côte"), avec ses 7 sites de prospection et 15 points de prélèvement, représente une zone intermédiaire du point de vue importance de reboisement. Tous les plants de *C. equisetifolia* qui y ont été plantés, et ce exclusivement sur les plages, sont le fait d'entreprises privées menées soit par des particuliers, soit par les centres touristiques implantés localement.

En ce qui concerne les zones n° 1 (Djoudj) et 6 (intérieur du pays), le nombre de sites prospectés est très réduit (2 pour la zone n° 1 avec 3 points de prélèvement et 4 pour la zone n° 6 avec 5 points de prélèvement). Dans ces zones le *C. equisetifolia* n'est que très peu présent et il s'agit le plus souvent d'arbres isolés plantés par des particuliers.

Sur la totalité des sites de prospection, seuls 7/40 (celui de Joal (1) exclu), soit 20/88 points de prospection, appartenant tous aux zones n°1 et 2, ont été plantés avec des arbres inoculés en pépinière à l'aide de broyats de nodules.

Tableau 1 : Liste des différents sites de prélèvement de nodules frais

Zone	Site	Sol	Planté	* **	Observations
1	Diama	Argileux	1982-83	+ 2	Dans campement en bordure du fleuve Sénégal, plants provenant de la pépinière de Dakar-Bongo
1	Sawagle	Argileux	1963	0 1	Racines dans l'eau d'un ruisseau, plants provenant du jardin d'essai de St Louis
2	Dakar-Bango	Argileux	1973	0 1	Dans l'enceinte de la pépinière des Eaux et Forêt
2	Lac Retba	Calcaire	1973	0 1	Rejet d'arbre en milieu très salé et coquillageux
2	Lande de Barbarie	Sableux	1973	0 2	Fine lande de sable entre l'estuaire du fleuve Sénégal et l'océan
2	Lompoul	Sableux	1976-78	+ 2	Sur dune rouge recouverte par dune jaune
2	Mbao	Sableux	1979	+ 1	Plantation sur dune maritime
2	Mboro/mer (W)	Sableux	1981	+ 2	Plantation sur dune maritime
2	Mboro/mer (E)	Sableux	1981	+ 2	Sur dune rouge superficiellement recouverte par dune jaune
2	Mboubaye	Sableux	1973	0 2	Plantation sur dune maritime
2	de Malika à Kayar	Sableux	1948	0 13	Plantation en bordure de plage
2	de Diogo à Tare	Sableux	1980	+ 8	Sur dune maritime, en bordure de plage
2	Tiogoune	Sableux	1976	+ 3	Plantation en bordure de plage
3	Djiffer	Sableux	Avant 1968	0 2	Sur plage, près de l'usine de Djiffer
3	Fumela	Sablo-limoneux	1974	0 2	Terrain avec des remontées de sel, près d'un étang
3	Joal (1)	Sableux	1978	? 3	En bord de mer
3	Joal (2)	Sablo-limoneux	Avant 1978	0 1	Isolé dans propriété
3	Ngaparou	Sableux	1980	0 3	Plantation privée sur la plage
3	Nianing	Sableux	Avant 1978	0 2	Plantation privée sur la plage
3	Samba Dia	Sablo-limoneux	Avant 1963	0 2	Nodules petits et nombreux
4	Banjul (1)	Sablo-argileux	Avant 1963	0 1	Plantation du cimetière, sur côte
4	Banjul (2)	Sablo-argileux	Avant 1963	0 1	Arbre isolé dans la ville
4	Mile Tour	Sableux	Avant 1963	0 1	Estuaire du fleuve Gambie, coté mer
4	Sereounda	Sablo-limoneux	Avant 1968	0 1	Dans mangrove, en bordure de route
5	Cap Skiring (1)	Sableux	1973-78	0 2	Sur plage, plants provenant de pépinière
5	Cap Skiring (2)	Sableux	1973	0 1	Dans l'hôtel "La Paillote", plants provenant de pépinière
5	Cap Skiring (3)	Sableux	1973	0 2	Dans le Club Méditerranée, en bordure d'allée
5	Cap Skiring (4)	Sableux	1973	0 2	Dans le Club Méditerranée, sur plage
5	Cap Skiring (5)	Sableux	1986-87	0 1	Idem Cap Skiring (2)
5	Diembering	sableux	Avant 1968	0 2	Beaux arbres dans ferme privée
5	Diogué (1)	Sableux	Avant 1968	0 4	Sur plage à l'estuaire du fleuve Casamance
5	Diogué (2)	Sablo-argileux	Avant 1968	0 1	Dans le pré de l'ancien hôtel
5	Elinkine	Aluvion	1973	0 2	Dans village en zone de rizière et mangrove à l'estuaire du fleuve Casamance
5	Ile Karabane (1)	Sableux	Avant 1983	0 1	Sur plage (île sur le fleuve Casamance),
5	Ile Karabane (2)	Sablo-argileux	Avant 1968	0 5	Dans village (île sur le fleuve Casamance)
5	Kabrousse	Sableux	1978	0 2	Dans l'hôtel Méridien, provient de pépinière
5	Kafoutine	Sableux	1973-78	0 2	Sur plage, initiative de reboisement local
6	Kolda	Argileux	Avant 1968	0 1	Bel arbre dans la ville, aucun nodule trouvé, prélèvement de sol pour de piégeage
6	Nianga	Argileux	1983-84	0 1	Dans plantation d' <i>Eucalyptus</i> , pas de nodule trouvé, prélèvement de sol pour piégeage
6	Podor	Argileux	1986	0 1	Dans jardin privé, aucun nodule trouvé, prélèvement de sol pour piégeage
6	Thiago	Argileux	1986	0 2	Idem Nianga

* : Inoculation (faite en pépinière à partir de nodules broyés)

** : Nombre de points de prélèvement dans le site décrit.

Le site de Malika à Kayar comprend les plantations de Malika, Mbeubeuse, Retba et Kayar-Sud ; de même le site de Diogo à Taré comprend les plantations de Diogo, Sag, Gadar, Taré-Sud, Taré et Taré-Nord.

La présence de *Frankia* sur tous les autres sites, est due, soit à l'existence d'une espèce de *Frankia* native, soit à la contamination involontaire du site et/ou de la pépinière par du *Frankia* provenant des nodules de *Casuarina* planté antérieurement et non répertoriés comme infectés par l'actinomycète symbiote au moment de la plantation.

Pour le site de Joal (1), les plants proviennent tous de la même pépinière mais aucune information n'a permis de déterminer laquelle et s'il y a eu inoculation par broyat de nodules ou non, ce qui explique le point d'interrogation dans le tableau 1.

L'absence totale de nodules sur les racines des plants de *C. equisetifolia* de la zone n° 6, discrimine encore plus cette région des autres. Les deux sous-zones qu'elle englobe doivent donc être a priori, dépourvues de *Frankia* dans le sol comme 99 % de la surface du Sénégal et de La Gambie réunis, ou alors même s'il y en a, les conditions environnementales sont telles qu'elles ne permettent pas la nodulation.

2 - Isolement de *Frankia* à partir de nodules frais de *C. equisetifolia* :

2.1 - Isolement à partir de nodules frais :

La technique d'isolement utilisée, en milieu BAP gélosé sans azote et complétement en saccharose, a permis d'obtenir au cours de ce travail, un total de 107 isolats de *Frankia* tous originaires du Sénégal ou de la Gambie.

L'utilisation d'un milieu gélosé au cours de la phase d'isolement, permet de différencier chaque isolat issu d'un même nodule, voire d'un même lobe de nodule, de localiser et d'éliminer les éventuels contaminants, ce qui est impossible avec un milieu liquide.

La présence de microorganismes autres que *Frankia* (contaminants) est souvent difficilement décelable en milieu inorganique pauvre. La décontamination ultérieure des isolats obtenus, quand elle est possible, reste toujours une opération lourde et délicate. Il est donc préférable d'essayer de localiser au plus vite ces contaminants afin de les éliminer dans les meilleures conditions en sauvegardant le reste du contenu de la boîte de Petri. Ceci explique l'apport d'une source de carbone dans notre milieu d'isolement sous forme de saccharose, car il favorise la croissance des microorganismes en général, permettant de visualiser au plus vite les contaminants et d'intervenir immédiatement.

Après la phase d'isolement, les isolats sont cultivés en milieu liquide ce qui facilite la manipulation de la bactérie par rapport à l'emploi d'un milieu gélosé : récupération, homogénéisation à la seringue, quantification-mesure de viabilité. L'utilisation de milieu gélosé aurait rendu la culture moins disponible.

Le récapitulatif des isolats obtenus est présenté dans le tableau 2. Par point de prélèvement, les dates de récolte des nodules sur le terrain, de début de phase d'isolement (mise en milieu gélosé dans boîte de Pétri des fragments de nodule) et d'observation d'un isolat dans la boîte de Pétri suivi immédiatement de son transfert en milieu liquide, y sont mentionnées. Le nombre d'isolats révélés par jour d'observation et le nombre total d'isolats obtenus par point de prélèvement y figurent également.

Dans les 5 zones prospectées où des nodules ont pu être récoltés, 87 isolats de *Frankia* ont été obtenus, représentant seulement 15 % des points de prélèvement, soit 14/91 [représentant 1/4 (11/41) des sites de prospection]. Tous ces isolements ont été réalisés à partir de nodules frais récoltés sur le terrain, dans des conditions standart.

Tableau 2 : Les isolats obtenus

a - Isolats obtenus directement à partir des nodules prélevés sur le terrain

Zone	Point de prélèvement	Récolté le	Début d'isolement	Isolé le	*	**	Nom ⁽¹⁾ des isolats
1	Sawagle	01.11.88	24.11.88	06.03.89	1	1	Saw 01
2	Malika	15.02.89	23.02.89	06.03.89	4	6	Mal 01 à Mal 04
				18.05.89	2		Mal 05 et Mal 06
2	Tiougoune	15.02.89	24.02.89	18.05.89	2	2	Tio 01 et Tio 02
3	Djiffer	28.10.88	21.11.88	19.01.89	2	6	Dji 01 et Dji 02
				31.01.89	4		Dji 03 à Dji 06
3	Samba Dia	28.10.88	17.11.88	19.01.89	1	1	Sam 01
3	Samba Dia	28.10.88	17.11.88	19.01.89	2	2	Sam 02 et Sam 03
4	Banjul (2)	29.10.88	21.11.88	19.01.89	1	14	Ban 01
				20.01.89	5		Ban 02 à Ban 06
				02.02.89	4		Ban 07 à Ban 10
				06.03.89	4		Ban 11 à Ban 14
4	Mile Tour	29.10.88	22.11.88	20.01.89	5	13	Mil 01 à Mil 05
				02.02.89	6		Mil 06 à Mil 11
				06.03.89	2		Mil 12 et Mil 13
4	Serecounda	29.10.88	22.11.88	20.01.89	3	30	Ser 01 à Ser 03
				24.01.89	18		Ser 04 à Ser 21
				02.02.89	9		Ser 22 à Ser 30
5	Cap Skiring (3)	01.08.88	30.08.88	05.10.88	1	1	Cap 01
5	Diembering	31.07.88	31.08.88	06.10.88	1	2	Die 04
				25.10.88	1		Die 05
5	Diembering	31.07.88	31.08.88	30.11.88	1	4	Die 01
				19.01.89	3		Die 02, Die 03 et Die 06
5	Ile Karabane (2)	29.07.88	15.09.88	15.11.88	1	2	Kar 04
				31.01.89	1		Kar 05
5	Ile Karabane (2)	29.07.88	15.09.88	30.11.88	1	3	Kar 01
				31.01.89	2		Kar 02 et Kar 03

(1) : Par ordre de transfert du milieu gélosé en milieu liquide, un nom est donné à chaque isolat, il est constitué de trois lettres correspondantes aux trois premières lettres du site de prélèvement, suivies d'un chiffre correspondant au numéro d'ordre de transfert en milieu de culture liquide.

b - Isolats obtenus après être passé par l'étape supplémentaire de piégeage

Zone	Point de prélèvement	Récolté le	Début d'isolement	Isolé le	*	**
2	Lande de Barbarie	21.07.88	05.07.89	10.08.89	2	2
2	Lompoul	27.07.88	01.06.89	10.08.89	2	2
2	Mboro/mer (W)	20.07.88	01.06.89	10.08.89	3	3
2	Mboro/mer (E)	20.07.88	01.06.89	10.08.89	1	1
2	Retba	19.07.88	26.05.89	10.08.89	1	1
2	Tare (Nord)	20.07.88	07.06.89	10.08.89	2	2
5	Diogué (1)	30.07.88	05.07.89	10.08.89	8	8
5	Kabrousse	31.07.88	05.07.89	10.08.89	1	1

* : Nombre d'isolats obtenus

** : Nombre d'isolats obtenus par point de prélèvement

Les zones géographiques de prospection ayant été définies de façon arbitraire, il est difficile de pouvoir comparer les résultats obtenus entre chaque zone. C'est le pourcentage de points de prélèvements à partir desquels *Frankia* a pu être isolé, par site qui servira de valeur de comparaison entre les différents sites. Il est mentionné tableau 3 avec l'importance relative de chaque site en nombre d'isolats obtenus par rapport au nombre total de *Frankia* isolés (poids des sites en isolats).

Tableau 3 : Proportions par site des points de prélèvement dont *Frankia* a été isolé

Zone	Site	*	points de prélèvement dont on a isolé <i>Frankia</i>		Poids des sites en isolats	
			r	%	r'	%
1	Sawagle	0	1/1	100	1/87	1,2
	(+ 1 autre site : Diama, inoculé, comprenant 2 points de prélèvement, sans isolat)					
2	Malika à Kayar	0	1/13	7,7	6/87	6,9
	Tiogoune	+	1/3	33	2/87	2,3
	(+ 9 autres sites, dont 5 inoculés, comprenant 21 points de prélèvement, sans isolat)					
3	Djiffer	0	1/2	50	6/87	6,9
	Samba Dia	0	2/2	100	(1+2)/87	(1,1+2,3)=3,4
	(+ 5 autres sites non inoculés, comprenant 11 points de prélèvement, sans isolat)					
4	Banjul (2)	0	1/1	100	14/87	16,1
	Mile Tour	0	1/1	100	13/87	14,9
	Serecounda	0	1/1	100	30/87	34,5
	(+ 1 autre site : Banjul (1), non inoculé, comprenant 1 point de prélèvement, sans isolat)					
5	Cap Skiring (3)	0	1/2	50	1/87	1,2
	Diembering	0	2/2	100	(4+2)/87	(4,6+2,3)=6,9
	Ile Karabane (2)	0	2/5	40	(2+3)/87	(2,3+3,4)=5,7
	(+ 10 autres sites non inoculés, comprenant 18 points de prélèvement, sans isolat)					
6	(aucun)					

* : Inoculation (faite en pépinière à partir de nodules broyés)

r = nombre de points de prélèvement dont on a isolé *Frankia* / nombre total de points de prélèvement du site

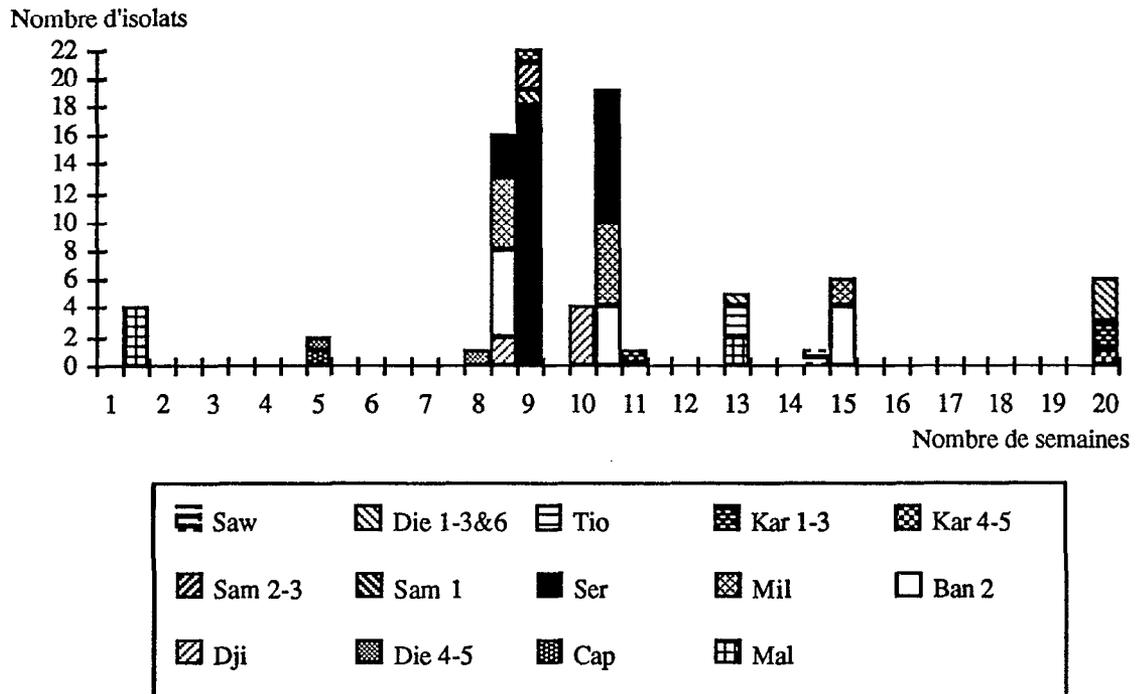
r' = nombre d'isolats de *Frankia* obtenus pour le site/ nombre total d'isolats obtenus à partir des nodules récoltés sur le terrain.

De l'examen du tableau 3, il ressort que les taux de réussite ne sont pas tous similaires entre les sites à partir desquels *Frankia* a pu être isolé.

La zone n° 4 apparaît par rapport aux autres très homogène et la méthode d'isolement utilisée ici semble tout à fait convenir à l'obtention d'isolats de *Frankia* de cette région. C'est en effet à partir de cette zone qu'a été obtenu proportionnellement le plus d'isolats avec aussi, un meilleur rendement au niveau du nombre de points prospectés à partir desquels *Frankia* a été isolé.

L'étude des temps nécessaires à l'apparition, toutes provenances confondues, de jeunes colonies de *Frankia* dans les boîtes de Pétri lors de la phase d'isolement est représentée sous forme d'histogramme à la Fig. 2. Il en ressort une période optimale d'incubation allant de 8 à 11 semaines, avant laquelle il n'est que très peu probable de pouvoir observer des colonies et après laquelle seulement quelques rares nouvelles colonies arrivent à pousser.

Fig. 2 : Temps nécessaire à l'apparition d'isolats



L'obtention de nouveaux isolats, à partir des nodules frais obtenus par piégeage, augmente le nombre de sites à partir desquels *Frankia* a pu être isolé. Dans chaque site où l'on n'a pu isoler directement *Frankia*, un point de prélèvement a été choisi au hasard pour un nouvel essai d'isolement après piégeage. Le tableau 2-b répertorie les résultats positifs obtenus. C'est à partir de très peu de sites encore une fois, 8 sur les 27 dont on n'avait pas de *Frankia*, que 20 nouveaux isolats ont pu être obtenus par cette technique. Les temps nécessaires à l'apparition des isolats de *Frankia* lors d'isolement après piégeage (indirects) ne sont pas différents des temps observés lors d'isolements directs.

Ces derniers isolats ayant été obtenus 6 à 9 mois après les autres, ils n'ont pu faire partie des séries d'analyses menées tout au long de ce travail.

Le tableau 4 répertorie les 80 isolats cultivés et conservés qui ont été étudiés lors des analyses menées tout au long de ce travail. Il donne aussi leur référence selon la nomenclature internationale proposée par Lechevalier (1983). Seuls ceux-ci ont été

disponibles en assez grande quantité de culture pure pour pouvoir être utilisés régulièrement dans ce travail. Un seul d'entre eux, Tio 02, est issu de nodules provenant d'un plant enregistré (Tableau 1) comme ayant poussé en pépinière dans un sol inoculé par un broyat de nodules de *C. equisetifolia*.

Notre étude en sera de ce fait limitée à 13 points de prélèvement répartis sur 11 sites de prospection appartenant aux 5 premières zones géographiques de prospection.

Tableau 4 : Références des 80 isolats obtenus et étudiés

Isolat	Référence	Isolat	Référence	Isolat	Référence	Isolat	Référence
Saw 01	ORS020647	Ban 06	ORS020615	Mil 13	ORS020645	Ser 21	ORS020684
Mal 01	ORS020675	Ban 07	ORS020616	Ser 01	ORS020648	Ser 22	ORS020685
Mal 02	ORS020676	Ban 08	ORS020617	Ser 02	ORS020680	Ser 23	ORS020663
Mal 03	ORS020677	Ban 09	ORS020618	Ser 03	ORS020649	Ser 24	ORS020664
Mal 04	ND	Ban 10	ORS020619	Ser 04	ORS020650	Ser 25	ND
Mal 05	ORS020633	Ban 11	ORS020620	Ser 05	ORS020651	Ser 26	ORS020665
Mal 06	ORS020678	Ban 12	ORS020621	Ser 06	ORS020652	Ser 27	ORS020666
Tio 02	ORS020686	Ban 13	ORS020622	Ser 07	ORS020653	Ser 28	ORS020667
Dji 01	ORS020624	Mil 01	ORS020634	Ser 09	ORS020654	Ser 29	ORS020668
Dji 02	ORS020625	Mil 02	ORS020635	Ser 10	ORS020655	Ser 30	ORS020669
Dji 03	ORS020626	Mil 03	ORS020636	Ser 11	ORS020656	Cap 01	ND
Dji 04	ORS020673	Mil 04	ORS020637	Ser 12	ORS020657	Die 01	ORS020670
Dji 05	ORS020627	Mil 05	ORS020638	Ser 13	ORS020681	Die 02	ORS020671
Dji 06	ORS020628	Mil 06	ORS020639	Ser 14	ORS020658	Die 03	ORS020623
Sam 01	ORS020646	Mil 07	ORS020640	Ser 15	ORS020659	Die 06	ORS020672
Ban 01	ORS020610	Mil 08	ORS020641	Ser 16	ORS020682	Kar 01	ORS020674
Ban 02	ORS020611	Mil 09	ORS020679	Ser 17	ORS020683	Kar 02	ORS020629
Ban 03	ORS020612	Mil 10	ORS020642	Ser 18	ORS020660	Kar 03	ORS020630
Ban 04	ORS020613	Mil 11	ORS020643	Ser 19	ORS020661	Kar 04	ORS020631
Ban 05	ORS020614	Mil 12	ORS020644	Ser 20	ORS020662	Kar 05	ORS020632

ND : Non Déterminé

2.2 - Piégeage :

Tous les essais de piégeage à partir d'une solution aqueuse de nodules broyés ont réussi, alors que ceux faits à partir des prélèvements de sol de tous les sites de la zone n° 6 : Kolda, Podor et Thiago n'ont pas abouti à l'obtention de nodules sur les racines des plants de *C. equisetifolia*.

Parallèlement, des essais de piégeage en milieu naturel (semis direct au champ) avec les mêmes conditions de traitement des graines que pour le piégeage en pot, ont été faits sur un seul site. Il pourrait appartenir à la zone n° 6, et se situe plus précisément dans les parcelles d'expérimentation de l'I.S.R.A. (Institut Sénégalais de Recherche Agronomique) à Mbidi, localisé dans la région de savane arbustive du Ferlo (Nord du Sénégal, voir Fig. 1). C'est une région naturellement dépourvue de plante actinorhizienne et où le *C. equisetifolia* n'avait

jamais été implanté avant cet essai de piégeage. L'expérience a duré 9 mois (d'Août à Mars) pendant lesquels l'essai a été arrosé chaque jour avec de l'eau de puits en période hors hivernage, sur 20 germinations seulement 2 avaient survécu aux conditions d'aridité environnementale et ils n'étaient pas nodulés au terme de l'expérience.

L'absence de nodulation peut s'expliquer soit par l'absence totale de *Frankia*, soit par l'existence de conditions environnementales défavorables à la symbiose sur les sites concernés.

➔ Synthèse des résultats concernant l'obtention d'isolats de *Frankia* :

- ☞ Au total, 107 isolats de *Frankia* ont pu être obtenus, 87 directement à partir des nodules récoltés sur le terrain et 20 à partir de nodules obtenus après piégeage en serre ;
- ☞ Ces isolats ont été obtenus à partir de 5 des 6 zones prospectées ;
- ☞ Ces isolats n'ont été obtenus qu'à partir de peu de points de prélèvement (22/91) ;
- ☞ Les nombres d'isolats obtenus par point de prélèvement varient de manière importante suivant le point considéré [exemple (confère tableau 11): 1 isolat originaire de Sawagle, et 30 isolats originaires de Serecounda] ;
- ☞ Le temps nécessaire à l'apparition d'isolats en boîtes de Pétri varie de 1,5 à 20 semaines, avec un maximum d'apparition d'isolats entre 8,5 et 10,5 semaines ;
- ☞ Les difficultés liées à la culture et l'entretien de *Frankia* ont été les causes entraînant la réduction du nombre de souches étudiées dans notre travail de 87 à 80 isolats ;
- ☞ Aucun isolat n'a été obtenu à partir de piégeage en zone non plantée en *Casuarina equisetifolia*.

Discussion

La stérilisation superficielle des nodules a pour but de limiter la contamination des milieux de culture par d'autres microorganismes externes ou liés intimement aux tissus superficiels de ces nodules. Elle apparaît comme une étape délicate mais essentielle à la bonne continuité de l'isolement de souche de *Frankia*, et ce pour la plupart des auteurs (voir par exemple Lechevalier et al., 1990). Les principales techniques proposées dans la littérature pour l'isolement proprement dit des souches de *Frankia*, sont :

- la dissection des nodules (Diem et Dommergues, 1983 ; Shipton et Burggraaf, 1983 ; Zhang et al., 1984),
- les séries de dilutions-suspensions de broyat de nodules (Diem et al., 1982a ; Gauthier et al., 1981a),
- la centrifugation en gradient de densité d'un broyat de nodules (Baker et O'Keefe, 1984),
- la filtration de broyats de nodules à l'aide de différents tamis (Benson, 1982 ; Rosbrook, 1989).

Ces techniques qui permettent l'isolement de souches de *Frankia* de *Casuarina* en milieu liquide ou gélosé, ont des degrés de complexité d'emploi différents.

Dans ce travail, la technique retenue pour l'isolement des souches de *Frankia* de *Casuarina equisetifolia* est celle faisant appel à l'inclusion en milieu gélosé de nodules disséqués, voire microdisséqués. Trois raisons motivent ce choix, même si cette technique n'est pas celle permettant l'obtention de souches de *Frankia* dans les meilleurs délais et avec le meilleur rendement journalier par rapport à la technique de filtration de broyat de nodules (Rosbrook et al., 1989). La première raison est que cette technique est la plus simple d'emploi. En raison du grand nombre d'isollements prévus à l'origine du travail, cela apparaissait être important d'avoir à limiter au strict minimum le nombre de manipulations à effectuer pour l'isolement d'une souche de *Frankia*. La seconde raison est que cette technique semble être la technique la moins "stressante", la moins sélective pour le passage d'une forme de vie symbiotique à une forme de vie libre en culture pure pour les souches de *Frankia*. (Lechevalier et al., 1990). La troisième raison est que cette technique respecte au mieux l'individualité de chaque amas de *Frankia* inclus dans une cellule de nodule puisqu'il n'y a pas broyage du nodule et mélange en milieu liquide du broyat obtenu. Ceci donne plus de crédibilité au "label" de pureté (issue d'une seule "pelote") de chaque souche de *Frankia* isolée à l'aide de cette technique et permet d'aborder plus sûrement les problèmes de coinfection d'un même nodule par plusieurs souches de *Frankia*.

Des substances phénoliques, libérées lors de la dissection des nodules ont une action inhibitrice sur la croissance du *Frankia* (Baker et O'Keefe, 1984), inhibition qui peut être réfrénée par l'addition au milieu d'isolement de charbon actif (Diem et Dommergues 1988) ou de polyvinylpyrrolidone (Lechevalier et al. 1990). Le fractionnement sur Séphadex est

une technique qui permet aussi d'éliminer ces substances phénoliques lorsque l'isolement se fait à partir d'un broyat de nodules (Baker et al., 1979a), ce qui n'est pas le cas ici.

Si l'isolement de *Frankia* est tenté à partir de très jeunes nodules ou parties très jeunes de nodules, comme cela a été fait dans ce travail, il ne semble pas être entravé par la présence de ces substances phénoliques, comme l'ont montré systématiquement tous les essais préliminaires que nous avons effectués. Peut-être, ces substances phénoliques n'existent-elles pas encore dans de telles parties très jeunes ou en trop faible quantité par rapport à une forte présence de *Frankia* en pleine activité dans ces mêmes parties. C'est pourquoi le milieu choisi pour nos isollements est exempt de charbon actif ou de PVP.

Le milieu gélosé choisi pour les isollements est constitué de BAP sans azote additionné de saccharose, aucune contrainte n'existant dans la composition du milieu d'isolement de *Frankia* de *Casuarina equisetifolia* (Diem et Dommergues, 1983) contrairement à d'autres *Frankia* comme celui d'*Alnus glutinosa* pour lequel la présence de lipide dans le milieu d'isolement est indispensable (Quispel, 1960 ; Quispel et al., 1983 ; Burggraaf, 1984 ; Quispel et al., 1989).

A *contrario* d'autres auteurs (Lechevalier et al., 1990), nous avons pensé qu'il valait mieux révéler au plus vite les contaminants possibles afin de les éliminer immédiatement par interventions manuelles, au lieu de risquer d'isoler des souches de *Frankia* contaminées par d'autres microorganismes encore non décelés. La présence de saccharose dans le milieu, favorisant en général la croissance des microorganismes, contribue à ce contrôle de pureté permanent tout au long de la phase d'isolement.

Les délais d'obtention de souches de *Frankia* observés dans ce travail, (une dizaine de jours à une vingtaine de semaines) avec un optimum à 9 semaines, sont comparables à ceux cités dans la littérature (Lechevalier, 1990).

Le nombre peu élevé de points de prélèvement à partir desquels des isolats ont été obtenus (22/91) est un résultat qui conforte l'idée selon laquelle l'isolement de *Frankia* est sujet à des déterminants génétiques qui lui sont propres, son stade physiologique ainsi que celui du nodule et à l'espèce végétale hôte d'origine (Diem et Dommergues, 1983 ; Lechevalier et al., 1990). Diem et al. (1982a) émettent l'hypothèse que les nodules de *Casuarina* ne renferment qu'une faible proportion d'Unités de *Frankia* capables de conduire à la Formation de colonies *in vitro* (UFF). La possibilité que les méthodes d'isolement elles-mêmes, puissent avoir une quelconque action sélective pour une classe particulière de *Frankia* ne peut être écartée (Bloom et al., 1989a). La plupart de ces techniques d'isolement ont été mises au point à partir de nodules prélevés sur des Aulnes et ensuite adaptées à l'isolement de *Frankia* de *Casuarina*, pourrait expliquer du moins en partie, le déséquilibre actuel existant dans les collections de cultures pures de *Fankia*. La proportion de souches provenant de nodules d'Aulnes est beaucoup plus importante que celles provenant de nodules de *Casuarina*. La

lourde proportion d'échecs observée lors de tentatives d'isolement de *Frankia* de nodules de *Casuarina* doit être liée à la non universalité de ces techniques d'isolement face à la variabilité naturelle du microorganisme. L'existence d'autres types de *Frankia* que ceux rencontrés dans les collections de cultures pures à travers le monde, et pour qui les techniques d'isolement aujourd'hui connues sont inadéquates, est à supposer.

Les récents travaux menés sur les nodules aériens de *Casuarina cunninghamiana* (Dommergues et al., 1990 ; Prin et al., 1991) permettent d'étayer cette thèse de la non universalité des techniques d'isolement. En effet, après plusieurs essais d'isolement effectués à partir de ce nouveau matériel biologique, aucune souche à l'heure actuelle n'a été isolée (Maggia, Prin et Sougoufara, résultats non encore publiés).

Partie 2

Caractérisations par :

- Test d'infectivité-effectivité**
- Spectre d'hôte**

Introduction

Les isolats bactériens obtenus à partir de nodules de plantes actinorhiziennes doivent faire l'objet de contrôles qui permettront de définir s'il s'agit bien de *Frankia*. En plus de l'aspect morphologique du microorganisme observable dès l'isolement et en culture pure, un des premiers tests à effectuer correspond à évaluer le pouvoir d'infection de chaque isolat vis-à-vis de sa plante hôte d'origine. C'est ainsi que pour les *Frankia* de Casuarina, Diem et al. (1982a, 1983) ont mis en évidence l'existence de souches dites "typiques" et de souches dites "atypiques" (terminologie de Nazaret, 1989). Les souches "typiques" peuvent réinfecter leur hôte d'origine, alors que les souches "atypiques" sont ininfectives vis-à-vis de cet hôte d'origine. En l'occurrence, la première souche de *Frankia* isolée à partir de nodules de Casuarina, est une souche "atypique" qui a la particularité d'être infective vis-à-vis de plantes du genre *Hippophäe* (Gauthier et al., 1981).

Les premières investigations concernant l'étude de la compatibilité entre la plante-hôte et le microorganisme *Frankia*, ont été basées sur la réalisation d'inoculations croisées avec des suspensions de nodules broyés (Coynes, 1983 ; Gauthier, 1984 ; Reddell et Bowen, 1986). Les résultats de ces investigations, souvent contradictoires, ont permis de mettre en évidence l'absence ou l'existence de spécificité pour un même broyat de nodules vis-à-vis de différentes espèces végétales hôtes (Coynes, 1983 ; Reddell et Bowen, 1985, 1986). La présence dans les nodules des Casuarinacées de plus d'une souche de *Frankia* (Reddell et Bowen, 1985) peut en être la cause. Toutefois, les différents travaux effectués sur les *Casuarina*, ont pu prouver que les plantes de ce genre avaient une spécificité leur permettant de tolérer de nombreuses souches de Casuarinacées, sans pour autant admettre de souches isolées d'autres familles. Concernant les souches de *Frankia* de Casuarinacées, une classification faisant apparaître 3 groupes, différencie les souches à spectre large, celles à spectre restreint et les souches à spectre aberrant (Sougoufara, 1990). Les souches à spectre large sont capables d'infecter certaines espèces des genres *Casuarina* et *Allocasuarina*, ainsi que les espèces *Gymnostoma papuanum* et *Myrica gale*. Ce sont essentiellement des souches de *Frankia* d'*Allocasuarina*. Alors que les souches à spectre restreint sont des souches isolées du genre *Casuarina* et qui n'infectent que des plants appartenant au genre *Casuarina*. Les souches à spectre aberrant correspondent aux souches dites "atypiques".

Les travaux sur l'évaluation du pouvoir de fixation de l'azote atmosphérique d'un isolat en état de symbiose, c'est-à-dire sur l'évaluation de l'effectivité d'un isolat, sont peu nombreux. L'effectivité d'une souche peut être mesurée à l'aide de différentes techniques. Les quantifications des biomasses produites par des plants infectés et comparées à des plants témoins ainsi que les mesures de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) et de quantification de l'azote fixé par la méthode de la différence sont les techniques les plus couramment utilisées pour évaluer cette effectivité. D'autres techniques plus contraignantes, sont basées

sur l'apport d'engrais marqué au ^{15}N et peuvent également permettre d'évaluer l'effectivité d'une souche de *Frankia*.

En ce qui concerne les souches de Casuarinacées, Sougoufara (1990) a mis en évidence l'existence de la spécificité de l'effectivité d'une souche. En effet certaines souches infectives à la fois sur *Casuarina* et sur *Allocasuarina*, ne sont effectives que sur *Casuarina*. Lors d'autres travaux, Sougoufara (1990) en utilisant des clones de *C. equisetifolia* dans des essais de comparaison d'effectivité de souches de *Frankia*, démontre qu'il existe un effet clone prédominant sur l'effet souche. Ceci justifie l'emploi de clone lors de tels essais par rapport à l'emploi des lots de semences, afin d'éliminer des résultats obtenus aux différentes mesures opérées, les effets dus à la variabilité génétique des plantes.

Tous ces travaux prouvent bien que les tests d'infectivité et d'effectivité contribuent à la caractérisation des souches de *Frankia*. C'est pourquoi nous nous proposons dans ce travail, d'étudier les réponses de chacune des souches de *Frankia* que nous venons d'isoler, aux différents tests d'infectivité vis-à-vis de plantes hôtes d'espèce ou de genre différents dont un clone de *Casuarina equisetifolia*, et d'effectivité.

Par mesure d'économie de temps et de moyens, nous avons choisi de mener deux tests dans la même expérimentation (infectivité et effectivité). L'utilisation d'un clone comme plante hôte améliore les conditions d'expérimentation du test d'effectivité au détriment du test d'infectivité. Nous avons choisi cette solution voulant privilégier le test d'effectivité par rapport à celui d'infectivité en ce qui concerne la plante hôte *Casuarina equisetifolia*.

Matériel et méthodes

1 - Souches de *Frankia* utilisées dans ce travail :

1 1 - Souches de *Frankia* isolées au cours de ce travail :

(Voir Partie 1)

1 2 - Souches de *Frankia* préexistantes à notre étude et utilisées dans ce travail :

L'annexe Mm1 donne la liste des souches préexistantes à notre étude et utilisées dans ce travail. Ces souches proviennent de la collection du BSFT de Nogent sur Marne.

2 - Matériel végétal :

Les graines et boutures des espèces végétales utilisées avec leur provenance sont les suivantes:

- graines :

- . *Alnus glutinosa* ; société Versepuy, 49800 Trélazé, France
- . *Allocasuarina verticillata* ; collection du Laboratoire de Biologie des Sols de l'ORSTOM à Dakar*
- . *Hippophæe rhamnoides* ; société Vilmorin, 75 Paris, France
- . *Casuarina equisetifolia* ; collection du Laboratoire de Biologie des Sols de l'ORSTOM à Dakar*

- boutures :

- . clone β de *Casuarina equisetifolia* (Sougoufara et al., 1987) ; collection du Laboratoire de Biologie des Sols de l'ORSTOM à Dakar*

* : collection commune aux Eaux et Forêts du Sénégal et à l'ORSTOM à Dakar.

3 - Caractéristique du sol utilisé au laboratoire :

(Voir Partie 1)

4 - Infectivité et effectivité des souches de *Frankia* :

L'infectivité (aptitude à noduler) des souches de *Frankia* vis-à-vis de l'espèce végétale d'origine ainsi que l'effectivité de ces souches (capacité de fixer l'azote atmosphérique en état de symbiose) sont déterminées au cours d'une seule et même expérience. Cette

expérience consiste à inoculer un jeune plant de *C. equisetifolia* sur sol stérilisé dépourvu d'azote avec une quantité connue de *Frankia*. Après plusieurs mois, on observe s'il y a eu nodulation et on quantifie l'Activité Réductrice de l'Acétylène (ARA) ainsi que certains autres facteurs directement liés à l'activité fixatrice de l'azote du *Frankia* dans les nodules de la plante. Ces facteurs sont :

- . poids de matière sèche des nodules par plant
- . poids de matière sèche des parties aériennes de chaque plante
- . dosage de l'azote total des parties aériennes de chaque plante

Ces résultats sont comparés à ceux obtenus dans les mêmes conditions avec de jeunes plants non inoculés.

□ Protocole :

- Standardisation de la quantification d'inoculum et inoculation :

La quantification de la viabilité des cultures de *Frankia* est faite par la méthode de l'IRA, l'inoculation est faite avec un inoculum correspondant à 80 nmol d'INTF pour chaque souche, ramené à un volume de 10 ml avec de l'eau physiologique. Ces 10 ml ont été apportés sur les racines d'un jeune plant de *C. equisetifolia* clone β planté en gaine de polyéthylène dans du sol de Bel-Air stérilisé et mélangé à des billes de polystyrène. Dix répétitions sont faites pour chaque souche inoculée.

- Durée de l'expérience et arrosage :

Durant toute la durée de l'expérience, 7 à 9 mois hors hivernage en extérieur (au Laboratoire de Microbiologie de l'ORSTOM à Dakar), les plants sont arrosés quotidiennement avec de l'eau stérile, cet arrosage est remplacé hebdomadairement par l'apport d'une solution nutritive de Hoagland diluée au 1/4, sans azote.

- La récolte des plants :

La récolte est faite plant par plant. Aussitôt le plant déterré les parties aériennes et racinaires sont séparées, et l'ARA mesurée à partir des racines.

- Mesure de l'activité nitrogénasique des plantes par la méthode de réduction de l'acétylène : (Hardy et al., 1968)

Les systèmes racinaires ont été dégagés de leur substrat puis introduits dans des flacons à serum de 120 ml. Les flacons ont été refermés hermétiquement avec des bouchons en caoutchouc avant d'y introduire 12 ml d'acétylène à l'aide d'une seringue, après équilibrage de la pression interne des flacons à 1 atmosphère. Les flacons ont été mis à incuber à 28°C pendant la durée de l'expérimentation. Des échantillons gazeux de 1 ml ont été prélevés à la seringue aux temps d'incubation T = 30 et 60 minutes, puis injectés aussitôt dans un chromatographe à phase gazeuse à ionisation de flamme (Varian Aerograph 1400) à travers une colonne de Spherosil de 1,2 m de longueur (température de la colonne : 75°C, température de l'injecteur: 120°C, température du détecteur: 150°C). Le gaz vecteur (azote) balaie la colonne avec

un débit de 40 ml/min. La quantité d'éthylène produite est évaluée en mesurant la hauteur du pic formé après l'injection de 0,5 ml du mélange gazeux à analyser et en la comparant à la hauteur du pic formé après l'injection de 0,5 ml d'un mélange standard d'éthylène-air à 1‰.

22400 ml de C_2H_4 correspond à 1 mole de C_2H_4

1 ml de C_2H_4 correspond à $10^6/(22,4 \cdot 10^3)$ μmol de C_2H_4

Soit H la hauteur du pic étalon en cm :

H correspond à $0,5 \cdot (1/1000) \cdot 10^3/22,4$ μmol de C_2H_4

Si X est le nombre de micromoles de C_2H_4 formées après incubation dans les flacons de volume V ml, le pic de hauteur h cm obtenu correspond à :

$$h=0,5 \cdot X/V \text{ } \mu\text{mol de } C_2H_4$$

En faisant le rapport des hauteurs on obtient :

$$H/h=(1/22,4) \cdot V/X \text{ soit } X=(h/H) \cdot (1/22,4) \cdot V$$

ARA (μmol de C_2H_4 /unité de temps)=(h/H).(Aéch/Astd).(1/22,4).V/unité de temps où Aéch représente le coefficient d'atténuation de l'échantillon et Astd le coefficient d'atténuation du mélange standard.

L'ARA spécifique est calculée en divisant l'ARA obtenue par le poids sec de nodules (g) récoltés pour un même plant.

- Le poids de matière sèche des nodules :

Le poids de matière sèche des nodules a été mesuré après séchage des échantillons à l'étuve à 70°C pendant 72 h (Dans le texte qui suit, l'expression "poids de matière sèche de nodules" sera remplacée par l'expression "poids sec de nodules").

- Le poids de matière sèche des parties aériennes :

Le poids de matière sèche des parties aériennes a été mesuré après séchage des échantillons à l'étuve à 70°C pendant 72 h (Dans le texte qui suit, l'expression "poids de matière sèche de parties aériennes" sera remplacée par l'expression "poids sec des parties aériennes").

- Dosage de l'azote total de la partie aérienne des plants :

Le dosage de l'azote total contenu dans les parties aériennes a été effectué en utilisant la méthode Kjeldahl à l'aide d'un système de dosage Büchi. Après séchage des parties aériennes à l'étuve à 70°C durant 72 heures, les échantillons ont été réduits en poudre fine par broyage (broyeur Arthur Thomas) avant d'être minéralisés. Une quantité de 50 à 100 mg de poudre par échantillon a été placée dans chaque tube contenant 1,5 ml de catalyseur (catalyseur à base de sels de sélénium : 1,6 g de sélénium anhydre, 1,6 g de sulfate de cuivre et 97 g de sulfate de sodium, le tout dissout dans 11 d'acide sulfurique concentré). Les tubes sont placés à 350°C dans un digesteur (Büchi 430) et la minéralisation est conduite jusqu'à disparition complète des vapeurs blanches (environ 2 à 3 heures). Après refroidissement, l'acide sulfurique excédentaire est neutralisé par adjonction de soude à 50% et l'azote minéralisé sous forme ammoniacale est ensuite

distillé (Büchi 322). Les vapeurs d'ammoniac sont captées par une solution d'acide borique dans un bécher. L'azote présent alors sous forme d'ions ammonium est dosé à l'aide d'un titrimètre à point final (Schott Geräte TR156) en ajoutant de l'acide chlorhydrique N/28 à l'aide d'une burette à piston (Schott Geräte T100), de telle sorte qu'à 2 ml d'acide chlorhydrique N/28 corresponde 1 mg d'azote.

La teneur des parties aériennes en azote correspond à la quantité d'azote dosée et rapportée au poids de poudre sèche minéralisée pour chaque échantillon. Le calcul de la quantité d'azote total contenue dans les parties aériennes d'un plant s'obtient en multipliant sa teneur en azote par le poids sec de ses parties aériennes. La fixation de l'azote est estimée par la méthode de la différence (Weber, 1966). Le calcul de la quantité d'azote fixé se fait en soustrayant de la quantité moyenne d'azote total des plants infectés par une même souche de *Frankia*, la quantité moyenne d'azote des plants témoins, les plants étant cultivés sur un milieu très pauvre en azote (cf Partie 1, Matériel et méthodes § 2).

5 - Spectre d'hôte des souches de *Frankia* :

Les graines des espèces de plantes actinorhiziennes testées ont été scarifiées par trempage dans l'acide sulfurique concentré (95%) pendant 3 à 5 minutes. Huit jours après la scarification, les jeunes plants germés, sont transplantés *in vitro* en conditions de culture. Par espèce végétale, cinq plants sont inoculés avec une même souche de *Frankia*. L'infectivité des différentes souches de *Frankia* vis-à-vis des espèces hôtes testées ont été déterminées après 7 à 9 mois de croissance des plantes. Les conditions d'entretien des plants durant l'expérience sont les mêmes que pour l'étude de l'infectivité et effectivité des souches de *Frankia* (cf paragraphe précédent).

6 - Outils statistiques :

Les résultats ont été traités statistiquement par une analyse de variance à un facteur (facteur "souche"). Pour chaque paramètre étudié, les moyennes des différents traitements "souche" non significativement différentes ont été classées en groupes homogènes en utilisant le test de Newman & Keul à $P = 0,05$ (Dagnélie, 1969).

Résultats

1 - Infectivité et effectivité des souches de *Frankia* :

L'étude de l'infectivité et de l'effectivité de 62 souches de *Frankia* vis-à-vis du clone β de *Casuarina equisetifolia*, clone appartenant à l'espèce hôte d'origine des souches testées, a été faite. Les moyennes et écarts types des variables mesurées ARA à 30 et 60 minutes, poids secs de nodules, poids secs des parties aériennes et azote total des parties aériennes figurent dans le Tableau 5 avec le nombre de répétitions et de plants nodulés pour chacune des souches testées. Y figurent aussi les moyennes et écarts types des ARA spécifiques qui ont été calculées en ne tenant compte que des résultats obtenus à partir de plants nodulés pour chacune de ces souches.

Trois séries d'inoculation réparties sur un mois, ont été nécessaires pour mettre en place l'expérimentation à partir des 62 souches étudiées. C'est pourquoi, dans le but d'avoir des références entre ces trois séries, les souches CeF, Dji 05, M 02, Mil 08 et Ser 30 sont répétées sur deux à trois séries ainsi que les témoins et un bloc moyen pour chacun d'eux est calculé. Les résultats de ces calculs sont représentés en italique dans le tableau 5.

Parmi les 19 plants témoins des 2 séries, un de la série "témoin b" a été infecté par un *Frankia* contaminant et présentait sur ses racines un nodule d'un poids sec de 31,7 mg. Les chiffres contenus dans le tableau 5 et la suite de l'étude ne tiennent pas compte de cette contamination.

1.1 - Infectivité des souches de *Frankia* vis-à-vis du clone β de *Casuarina equisetifolia* :

L'évaluation du pouvoir d'infection de chaque souche de *Frankia* testée vis-à-vis de l'hôte végétal considéré, est faite en étudiant par souche la proportion de plants nodulés. Une repartition en 3 classes de nodulation basée sur cette étude est faite suivant les résultats présentés dans le tableau 5 et figurent dans le tableau 6.

L'étude du nombre de points d'infection, nombre de nodules récoltés, par plant et pour une même souche, est aussi une indication pouvant contribuer à cette évaluation. Mais cette dernière n'a pas été faite ici car jugée trop contraignante à mener sur le grand nombre de plants mis en place dans cette expérimentation.

Tableau 5 : Résultats du test d'infectivité-effectivité des souches de *Frankia* vis-à-vis de l'hôte *Casuarina equisetifolia*

Souches			ARA* à 30 mn	ARA* à 60 mn	Poids secs de nodules (mg)	ARA spécifique**	Poids sec (g) des parties aériennes	Azote total (g) des parties aériennes
Témoins a	effectif : 9	moyennes	0,08	0,09	0	-	0,37	0,00452
	plants nodulés : 0	écarts types	0,076	0,068	0	-	0,190	0,00240
Témoins b	effectif : 9	moyennes	0,02	0,02	0	-	1,55	0,01424
	plant nodulé : 0	écarts types	0,018	0,018	0	-	0,655	0,00397
Témoins (moyen)	effectif : 18	moyennes	0,05	0,05	0	-	0,96	0,00938
	plants nodulés : 0	écarts types	0,063	0,059	0	-	0,769	0,00593
Ban 06	effectif : 10	moyennes	1,73	3,26	49,58	53,67	1,79	0,03421
	plants nodulés : 10	écarts types	1,699	2,965	30,382	28,319	0,839	0,01680
Ban 07	effectif : 10	moyennes	1,5	2,24	30,43	127,88	1,12	0,01399
	plants nodulés : 7	écarts types	1,175	1,330	22,373	153,353	0,259	0,00596
Ban 08	effectif : 10	moyennes	2,02	3,71	49,75	79,47	1,57	0,02985
	plants nodulés : 10	écarts types	1,247	2,270	28,710	38,529	0,689	0,01240
Ban 09	effectif : 10	moyennes	1,74	3,93	37,74	110,21	1,54	0,03406
	plants nodulés : 9	écarts types	0,737	2,378	14,322	61,474	0,772	0,01688
Ban 10	effectif : 10	moyennes	0,34	0,46	44,52	16,97	1,8	0,04003
	plants nodulés : 10	écarts types	0,460	0,666	28,214	23,000	0,851	0,01910
Ban 11	effectif : 10	moyennes	2,95	5,62	95,37	61,53	2,11	0,04151
	plants nodulés : 10	écarts types	1,581	2,196	33,612	24,172	0,507	0,00971
Ban 12	effectif : 10	moyennes	1,5	3,63	50,74	75,94	1,79	0,03697
	plants nodulés : 10	écarts types	1,220	2,306	27,327	26,410	0,723	0,01530
Ban 13	effectif : 10	moyennes	0,36	1,99	36,29	77,75	1,63	0,03645
	plants nodulés : 10	écarts types	0,275	2,758	23,754	103,086	0,725	0,01502
Cap 01	effectif : 10	moyennes	0,64	1,17	11,91	58,42	1,29	0,01422
	plants nodulés : 3	écarts types	0,961	1,427	8,995	59,093	0,232	0,00519
Cef a	effectif : 10	moyennes	1,56	3,67	36,29	112,87	0,93	0,01639
	plants nodulés : 10	écarts types	1,259	2,144	23,754	53,482	0,454	0,00870
Cef b	effectif : 10	moyennes	1,43	2,56	56,38	68,41	2,26	0,04709
	plants nodulés : 10	écarts types	1,400	2,155	27,731	89,124	0,744	0,01654
Cef (moyen)	effectif : 20	moyennes	1,5	3,12	46,34	90,64	1,6	0,03174
	plants nodulés : 20	écarts types	1,298	2,168	27,162	75,084	0,908	0,02033
Die 01	effectif : 10	moyennes	1,09	2,72	44,89	60,27	2,22	0,04498
	plants nodulés : 10	écarts types	0,681	1,879	14,760	29,761	0,837	0,01574
Die 02	effectif : 10	moyennes	0,11	0,45	30,93	25,15	0,8	0,01005
	plants nodulés : 2	écarts types	0,111	0,491	20,308	32,384	0,354	0,00439
Die 03	effectif : 10	moyennes	1,13	1,87	32,1	58,17	0,99	0,01452
	plant nodulé : 1	écarts types	-	-	-	-	-	-
Dji 02	effectif : 10	moyennes	0,83	2,07	53,48	42,67	1,43	0,02934
	plants nodulés : 10	écarts types	0,615	1,160	31,346	20,340	0,636	0,01265
Dji 04	effectif : 9	moyennes	0,21	0,9	40,28	43,25	0,92	0,02132
	plants nodulés : 4	écarts types	0,133	0,556	35,594	48,537	0,360	0,00530
Dji 05 a	effectif : 9	moyennes	1,35	2,74	103,99	41,02	1,5	0,03321
	plants nodulés : 9	écarts types	1,647	2,984	60,141	52,625	0,719	0,01685
Dji 05 b	effectif : 10	moyennes	0,56	1,36	49,79	19,21	1,7	0,03135
	plants nodulés : 9	écarts types	0,560	1,397	31,331	13,774	0,552	0,00904
Dji 05 (moyen)	effectif : 19	moyennes	0,94	2,09	78,22	30,11	1,56	0,03228
	plants nodulés : 18	écarts types	1,272	2,410	50,886	38,830	0,610	0,01316
Dji 06	effectif : 10	moyennes	0,66	1,33	89,58	19,74	1,4	0,02933
	plants nodulés : 10	écarts types	0,716	1,365	64,158	12,820	0,667	0,01301
Kar 02	effectif : 10	moyennes	0,38	0,7	9,07	53,67	0,85	0,01020
	plants nodulés : 2	écarts types	0,492	0,944	6,640	64,882	0,035	0,00104
Kar 05	effectif : 10	moyennes	0,02	0,04	28,75	7,8	0,47	0,00611
	plants nodulés : 4	écarts types	0,030	0,062	50,103	13,518	0,332	0,00374
M 02 a	effectif : 9	moyennes	1,28	2,74	71,28	44,64	1,33	0,02569
	plants nodulés : 9	écarts types	1,369	2,597	47,093	31,052	0,621	0,01384
M 02 b	effectif : 9	moyennes	1,18	2,49	43,51	59,37	1,74	0,03474
	plants nodulés : 8	écarts types	1,130	2,013	25,772	32,684	0,770	0,01268
M 02 c	effectif : 10	moyennes	1,04	1,91	53,96	44,41	1,64	0,02879
	plants nodulés : 10	écarts types	0,789	0,936	23,224	30,227	0,411	0,01147
M 02 (moyen)	effectif : 28	moyennes	1,18	2,37	57,11	49,09	1,58	0,02952
	plants nodulés : 27	écarts types	1,050	1,925	33,844	30,804	0,596	0,01271
Mal 03	effectif : 4	moyennes	0,15	0,87	4,64	622,2	1,24	0,01430
	plants nodulés : 2	écarts types	0,034	-	4,582	-	0,141	0,00131
Mal 05	effectif : 3	moyennes	0,56	1,04	35,2	38,31	0,55	0,01050
	plants nodulés : 3	écarts types	0,262	0,427	20,412	22,967	0,476	0,00960
Mil 01	effectif : 9	moyennes	1,42	3,25	71,06	50,05	2,23	0,04191
	plants nodulés : 9	écarts types	1,189	2,722	37,093	27,786	0,866	0,01636
Mil 03	effectif : 10	moyennes	1,23	2,78	24,24	130,87	1	0,02166
	plants nodulés : 10	écarts types	0,869	2,261	13,023	112,456	0,464	0,01011
Mil 04	effectif : 10	moyennes	0,99	2,33	38,51	80,82	2,2	0,04258
	plants nodulés : 10	écarts types	0,783	1,145	24,199	42,805	1,065	0,01919
Mil 05	effectif : 10	moyennes	1,01	1,87	38,8	39,92	1,51	0,02956
	plants nodulés : 10	écarts types	1,304	2,315	38,198	23,588	0,975	0,02109
Mil 06	effectif : 10	moyennes	1,42	2,56	30,57	78,15	2,82	0,04952
	plants nodulés : 10	écarts types	1,378	2,388	20,881	35,765	0,820	0,01417

(suite du tableau 5)

Souches			ARA* à 30 mn	ARA* à 60 mn	Poids secs de nodules (mg)	ARA spécifique**	Poids sec (g) des parties aériennes	Azote total (g) des parties aériennes
Mil 07	effectif : 10	moyennes	2,37	4,26	58,91	76,29	2,64	0,04812
	plants nodulés : 10	écarts types	2,710	4,816	34,929	71,021	1,166	0,01756
Mil 08 a	effectif : 7	moyennes	1,34	2,72	26,06	97,92	1,96	0,03119
	plants nodulés : 7	écarts types	1,127	2,653	7,377	79,916	0,661	0,00986
Mil 08 b	effectif : 10	moyennes	1,25	2,72	50,82	55,25	1,16	0,02317
	plants nodulés : 10	écarts types	0,566	1,626	24,722	30,741	0,362	0,00869
Mil 08 (moyen)	effectif : 17	moyennes	1,29	2,72	40,62	72,82	1,49	0,02647
	plants nodulés : 17	écarts types	0,811	2,031	22,847	58,268	0,636	0,00977
Mil 09	effectif : 6	moyennes	1,24	2,08	28,7	116,79	1,3	0,02882
	plants nodulés : 6	écarts types	0,580	0,832	24,680	76,307	0,472	0,01175
Mil 11	effectif : 9	moyennes	1,16	1,95	55,88	40,27	2,04	0,04441
	plants nodulés : 9	écarts types	0,729	1,262	28,205	24,501	0,703	0,01777
Mil 12	effectif : 9	moyennes	0,69	1,41	26,56	71,22	0,53	0,01131
	plants nodulés : 9	écarts types	0,812	1,665	31,670	72,559	0,285	0,00650
Mil 13	effectif : 10	moyennes	1,79	3,25	41,4	89,98	1,88	0,03779
	plants nodulés : 10	écarts types	0,856	1,511	18,358	49,956	0,372	0,00718
Saw 01	effectif : 10	moyennes	1,42	2,03	36,05	63,4	2,33	0,04941
	plants nodulés : 10	écarts types	1,344	1,670	15,664	62,061	0,627	0,01518
Ser 01	effectif : 10	moyennes	2,14	3,5	43,74	73,76	1,83	0,03771
	plants nodulés : 9	écarts types	1,403	2,689	25,892	30,596	0,713	0,01741
Ser 02	effectif : 9	moyennes	2,59	4,55	43,57	108	1,4	0,03185
	plants nodulés : 9	écarts types	2,158	3,223	30,457	58,127	0,598	0,01414
Ser 03	effectif : 10	moyennes	1,11	1,88	22,71	75,82	2,16	0,04059
	plants nodulés : 10	écarts types	1,162	1,880	10,304	43,825	1,079	0,01592
Ser 04	effectif : 9	moyennes	0,38	0,78	19,03	56,72	2,04	0,03989
	plants nodulés : 7	écarts types	0,472	0,726	12,900	41,282	0,996	0,01740
Ser 05	effectif : 10	moyennes	0,77	1,78	17,93	177,72	2,14	0,03858
	plants nodulés : 9	écarts types	1,668	3,391	13,697	283,432	1,677	0,02730
Ser 07	effectif : 10	moyennes	0,62	1,31	12,12	108,12	1,94	0,03243
	plants nodulés : 10	écarts types	0,927	1,793	8,641	78,540	1,388	0,02437
Ser 09	effectif : 10	moyennes	1,38	2,11	27,89	89,38	1,02	0,02387
	plants nodulés : 10	écarts types	1,146	1,799	27,377	43,572	0,624	0,01438
Ser 10	effectif : 10	moyennes	1,72	3,72	29,8	161,19	1,62	0,02007
	plants nodulés : 10	écarts types	1,403	2,992	25,843	132,007	0,367	0,00506
Ser 11	effectif : 10	moyennes	1,21	2,34	15,57	133,12	2,4	0,04350
	plants nodulés : 10	écarts types	1,987	3,369	18,678	93,555	1,773	0,02920
Ser 12	effectif : 10	moyennes	1,48	3,37	35,15	109,22	2,85	0,05140
	plants nodulés : 10	écarts types	0,785	1,712	17,984	60,888	0,775	0,01356
Ser 13	effectif : 10	moyennes	1,16	2,03	30,77	64,89	1,32	0,03017
	plants nodulés : 9	écarts types	1,103	1,664	15,135	42,292	0,476	0,00996
Ser 14	effectif : 10	moyennes	0,91	1,99	25,61	107,99	3,02	0,05078
	plants nodulés : 10	écarts types	1,046	2,464	9,970	148,182	0,782	0,01251
Ser 15	effectif : 10	moyennes	1,66	3,1	68,64	85,21	1,42	0,03055
	plants nodulés : 9	écarts types	0,998	2,381	55,217	103,602	0,767	0,01850
Ser 16	effectif : 10	moyennes	1,14	1,99	26,7	95,56	2,28	0,04938
	plants nodulés : 9	écarts types	0,966	1,524	19,358	60,065	0,622	0,01386
Ser 17	effectif : 10	moyennes	0,45	0,8	14,93	71,04	3,12	0,06032
	plants nodulés : 10	écarts types	0,315	0,489	13,264	29,627	5,811	0,11664
Ser 18	effectif : 10	moyennes	0,47	0,87	10,58	73,22	1,31	0,02732
	plants nodulés : 10	écarts types	0,485	0,818	3,519	55,364	0,390	0,00887
Ser 19	effectif : 10	moyennes	0,88	1,68	15,88	98,48	1,85	0,03412
	plants nodulés : 10	écarts types	0,771	1,443	10,503	49,369	0,797	0,01578
Ser 20	effectif : 10	moyennes	1,63	3,69	36,13	113,64	2,85	0,05066
	plants nodulés : 10	écarts types	1,279	2,169	31,445	93,913	1,745	0,02832
Ser 21	effectif : 10	moyennes	0,99	1,9	31,43	96,98	2,62	0,04303
	plants nodulés : 10	écarts types	0,613	1,108	19,924	90,590	1,066	0,01604
Ser 22	effectif : 10	moyennes	1,61	3,31	35,54	108,01	2,72	0,04765
	plants nodulés : 10	écarts types	1,083	2,475	19,205	68,111	1,027	0,01495
Ser 23	effectif : 10	moyennes	0,86	1,48	25,63	52,88	0,67	0,01323
	plants nodulés : 9	écarts types	0,870	1,440	13,240	31,373	0,248	0,00564
Ser 24	effectif : 10	moyennes	0,72	1,61	38,07	59,81	1,53	0,03543
	plants nodulés : 10	écarts types	0,632	1,720	25,506	63,444	0,351	0,00850
Ser 25	effectif : 9	moyennes	1,07	2,17	42,33	59,82	1,34	0,02733
	plants nodulés : 9	écarts types	1,137	2,560	29,494	61,450	0,834	0,01815
Ser 26	effectif : 9	moyennes	0,5	1	25,1	44,61	0,79	0,01514
	plants nodulés : 9	écarts types	0,548	0,965	19,050	41,512	0,554	0,01095
Ser 27	effectif : 10	moyennes	3,35	5,3	57,55	109,66	2,55	0,05777
	plants nodulés : 10	écarts types	2,008	4,119	30,062	96,019	1,115	0,02706
Ser 28	effectif : 10	moyennes	1,19	2,11	19,96	121,65	1,59	0,02900
	plants nodulés : 9	écarts types	1,204	2,121	22,887	47,395	0,904	0,01674
Ser 29	effectif : 4	moyennes	1,36	1,95	20,83	85,56	0,76	0,01462
	plants nodulés : 4	écarts types	1,327	1,762	15,735	33,514	0,227	0,00581
Ser 30 a	effectif : 6	moyennes	0,58	1,04	48,2	19,49	1,23	0,03013
	plants nodulés : 5	écarts types	0,615	1,195	11,787	19,226	0,293	0,00630
Ser 30 b	effectif : 10	moyennes	3,17	5,87	59,66	99,14	2,01	0,04292
	plants nodulés : 10	écarts types	2,064	4,369	29,176	60,965	0,650	0,01632
Ser 30 (moyen)	effectif : 16	moyennes	2,18	4,14	52,35	70,69	1,65	0,03866
	plants nodulés : 15	écarts types	2,106	4,239	27,782	63,004	0,749	0,01489

Toutes les moyennes et écarts types sont calculés à partir de plants non nodulés pour les témoins et des plants nodulés seulement pour les autres.

* : en μmol de C_2H_4

** : en μmol de C_2H_4 / 60 mn / g de nodules secs.

Tableau 6 : Infectivité-effectivité des souches de *Frankia* vis-à-vis du *C. equisetifolia*

Souches	Infectivité	Effectivité	Groupe	Souches	Infectivité	Effectivité	Groupe
Ban 06	++	++	3	Mil 12	++	-	2
Ban 07	++	-	2	Mil 13	++	++	3
Ban 08	++	++	3	Saw 01	++	++	3
Ban 09	++	++	3	Ser 01	++	++	3
Ban 10	++	++	3	Ser 02	++	++	3
Ban 11	++	++	3	Ser 03	++	++	3
Ban 12	++	++	3	Ser 04	++	++	3
Ban 13	++	++	3	Ser 05	++	++	3
Cap 01	+	+	3	Ser 07	++	++	3
Cef	++	++	3	Ser 09	++	++	3
Die 01	++	++	3	Ser 10	++	++	3
Die 02	+	-	2	Ser 11	++	++	3
Die 03	+	+	3	Ser 12	++	++	3
Dji 02	++	++	3	Ser 13	++	++	3
Dji 04	+	++	3	Ser 14	++	++	3
Dji 05	++	++	3	Ser 15	++	++	3
Dji 06	++	++	3	Ser 16	++	++	3
Kar 02	+	-	2	Ser 17	++	++	3
Kar 05	+	-	2	Ser 18	++	++	3
M 02	++	++	3	Ser 19	++	++	3
Mal 03	+	+	3	Ser 20	++	++	3
Mal 05	++	-	2	Ser 21	++	++	3
Mil 01	++	++	3	Ser 22	++	++	3
Mil 03	++	++	3	Ser 23	++	-	2
Mil 04	++	++	3	Ser 24	++	++	3
Mil 05	++	++	3	Ser 25	++	++	3
Mil 06	++	++	3	Ser 26	++	+	3
Mil 07	++	++	3	Ser 27	++	++	3
Mil 08	++	++	3	Ser 28	++	++	3
Mil 09	++	++	3	Ser 29	++	+	3
Mil 11	++	++	3	Ser 30	++	++	3

Légende :

- infectivité : (-, +, ++) est une notation relative aux pourcentages de plants nodulés pour chacune des souches testées, correspondant respectivement soit à des valeurs égales à 0 % (souches ininfectives), soit à des valeurs comprises dans]0%, 70%[(souches peu infectives), soit à des valeurs supérieures ou égales à 70% (souches infectives) ;

- effectivité : on admet que lorsque les plantes inoculées par une souche infective contiennent une quantité d'azote total au moins 2 fois plus élevée que celle des plantes témoins non inoculées, que cette souche est très effective (++) ; 1,5 fois plus élevée, la souche est peu effective (+) ; en dessous de 1,5 fois, la souche est inefficace (-) ;

- les groupes d'infectivité-effectivité sont faits en fonction des résultats obtenus dans chacun des deux tests, soit : groupe n° 1 : souches ininfectives, groupe n° 2 : souches infectives et inefficaces, groupe n° 3 : souches infectives et efficaces.

Remarque : seule la souche "atypique" de référence, D 11, fait partie du groupe d'infectivité-effectivité n° 1. Elle n'est pas représentée dans le tableau.

1.2 - Effectivité des souches de *Frankia* vis-à-vis du clone β de *Casuarina equisetifolia* :

De même, l'effectivité des souches vis-à-vis du clone β , est évaluée en étudiant principalement pour chacune d'elles, la quantité d'azote fixé dans les parties aériennes des plants infectés. Cette quantité est obtenue en faisant la différence entre les quantités moyennes d'azote total [Qmoy(N₂ total)] calculées pour chaque série de plants infectés et celle calculée à partir des séries de plants témoins. Une répartition en 3 classes d'efficience de ces quantités en azote fixé est faite et figure également dans le tableau 6.

Seules les souches classées effectives sont retenues pour une étude comparative de leur pouvoir de fixation de l'azote en état de symbiose avec le végétal *Casuarina equisetifolia*. Et seuls les traitements-souches dont il a été possible de comptabiliser au moins sept plants infectés, sont pris en considération dans la suite de l'étude, ceci en raison des contraintes liées aux méthodes de traitements statistiques de données utilisées dans ce travail.

Pour une plus grande commodité d'écriture des figures qui vont suivre, les noms des souches de *Frankia* testées sont remplacés par des numéros. Le tableau 7 présente les correspondances souches-numéros.

Tableau 7 : Correspondances souches-numéros

Souches	codes	Souches	codes	Souches	codes	Souches	codes	Souches	codes
Témoins a	1	Die 02	15	Mil 01	29	Ser 02	43	Ser 18	57
Témoins b	2	Die 03	16	Mil 03	30	Ser 03	44	Ser 19	58
Ban 06	3	Dji 02	17	Mil 04	31	Ser 04	45	Ser 20	59
Ban 07	4	Dji 04	18	Mil 05	32	Ser 05	46	Ser 21	60
Ban 08	5	Dji 05 a	19	Mil 06	33	Ser 07	47	Ser 22	61
Ban 09	6	Dji 05 b	20	Mil 07	34	Ser 09	48	Ser 23	62
Ban 10	7	Dji 06	21	Mil 08 a	35	Ser 10	49	Ser 24	63
Ban 11	8	Kar 02	22	Mil 08 b	36	Ser 11	50	Ser 25	64
Ban 12	9	Kar 05	23	Mil 09	37	Ser 12	51	Ser 26	65
Ban 13	10	M 02 a	24	Mil 11	38	Ser 13	52	Ser 27	66
Cap 01	11	M 02 b	25	Mil 12	39	Ser 14	53	Ser 28	67
Cef a	12	M 02 c	26	Mil 13	40	Ser 15	54	Ser 29	68
Cef b	13	Mal 03	27	Saw 01	41	Ser 16	55	Ser 30 a	69
Die 01	14	Mal 05	28	Ser 01	42	Ser 17	56	Ser 30 b	70

Codes : numéros donnés aux souches pour l'expérimentation.

Après avoir fait une analyse de variance à un facteur pour chaque variable présentée dans le tableau 5, il apparaît que toutes ces variables varient de manière significative (P=0,001) selon la souche de *Frankia* utilisée comme inoculum.

D'après les corrélations calculées entre les variables et qui sont présentées dans le tableau 8, il s'avère :

- qu'il y a une forte corrélation entre la quantité d'azote total contenue dans les parties aériennes et le poids sec des parties aériennes ;
- qu'il n'y a pas de corrélation entre la quantité d'azote total contenue dans les parties aériennes et l'ARA spécifique ;
- qu'il n'y a pas ou que très peu de corrélation entre les variables des autres combinaisons testées.

Tableau 8 : Tableau des corrélations

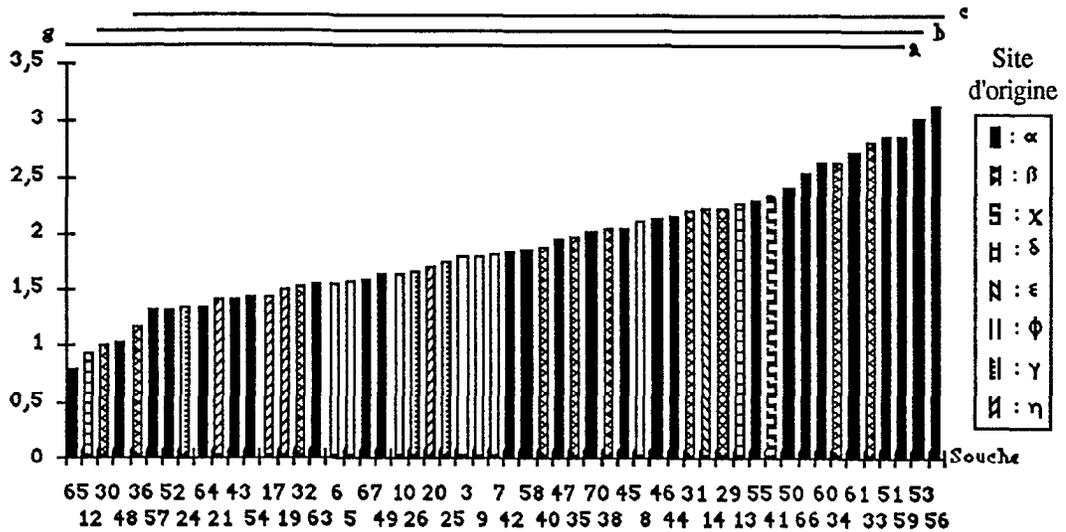
couples de variables	Coefficient de corrélation (R)
ARA à 60 min - poids secs de nodules	R = 0,449 à P < 0,001
ARA à 60 min - poids secs des parties aériennes	R = 0,299 à P < 0,001
ARA à 60 min - azote total	R = 0,300 à P < 0,001
Poids secs de nodules - poids secs des parties aériennes	R = 0,250 à P < 0,001
Poids secs de nodules - azote total	R = 0,291 à P < 0,001
Azote total - poids secs des parties aériennes	R = 0,971 à P < 0,001
Azote total - ARA spécifique	R = 0,023 à P = 0,601

La comparaison entre les classements et regroupements des traitements-souches, obtenus par le test de Newman et Keul pour chacune des quatre variables étudiées, confirme ces résultats

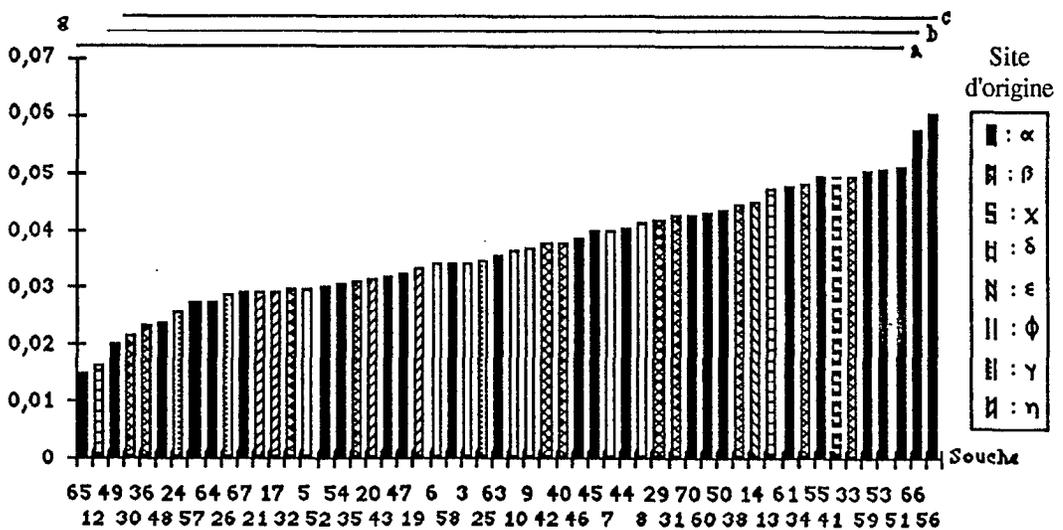
La Fig. 3 présente les deux histogrammes relatifs aux classements des moyennes des deux variables poids secs des parties aériennes des plants et azote total contenus dans ces parties aériennes. La similarité évidente existant entre ces deux études corrobore les résultats obtenus après analyse des corrélations.

Fig. 3 : Histogrammes des moyennes des poids secs des parties aériennes et des quantités d'azote total contenues dans ces parties aériennes

a : poids secs des parties aériennes des plants (variable mesurée)



b : quantités d'azote total contenues dans les parties aériennes des plants (variable calculée)



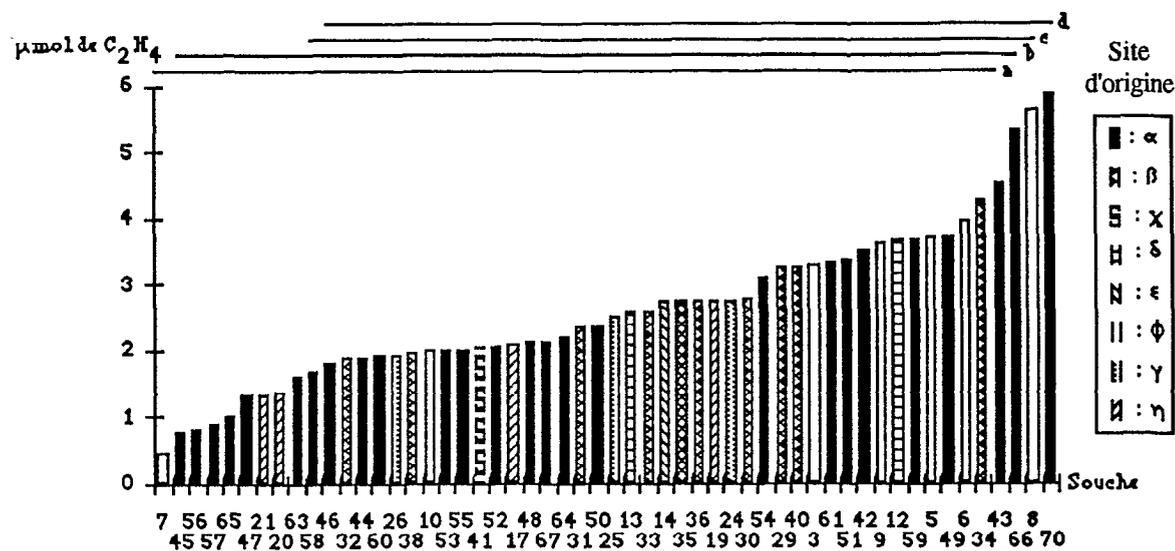
Légende :

- a, b et c sont, respectivement pour chacun des deux classements étudiés, les trois groupes de traitements-souches non significativement différents apparus après avoir effectué le test de Newman et Keul à $P = 0,05$;
- α , β , χ , ϵ , ϕ , η identifient par traitement-souche le site d'origine du *Frankia* utilisé comme inoculum, soit respectivement Serecounda, Mile Tour, Sawagle, Banjul (2), Diembering, Djiffer ;
- δ et γ identifient respectivement les souches de références CeF et M 02.

Par le calcul, la $Q_{moy}(N_2 \text{ total})$ est liée aux mesures du poids sec des parties aériennes des plants et du pourcentage d'azote qui y est contenu, puisque obtenue en multipliant les moyennes de ces deux dernières valeurs mesurées entre elles pour un même traitement-souches. Ceci justifie en partie l'existence de cette importante corrélation calculée entre le poids secs des parties aériennes et l'azote total qui y est contenu. Le nombre important de traitements-souches explique le fait que peu de différences nettes apparaissent entre chacun d'eux. Ce qui donne l'impression de l'existence d'un *continuum* croissant de moyennes sans différences notables de proche en proche au niveau représentation graphique et justifie les chevauchements importants entre les différents regroupements obtenus au test de Newman et Keul. Ces chevauchements existants entre les regroupements de traitements-souches non significativement différents sont si importants qu'il est impossible de classer clairement les ordonnancements proposés. Les seules indications que l'on puisse en déduire concernent les traitements-souches n° 65 et 12 (Ser 26 et CeFa) d'une part, et 56 (Ser 17) d'autre part. Les deux premiers apparaissent comme faisant partie du groupe des traitements-souches les moins effectifs et le dernier comme faisant partie du groupe des traitements-souches le plus effectif, aux vues des classifications proposées Fig. 3 (à $P=0,05$).

Les figures n° 4 et 5 présentent chacune respectivement un histogramme relatif au classement des moyennes des variables ARA à 60 min et poids secs de nodules. Les classifications proposées ici sont différentes entre elles et de celles proposées plus haut, aussi bien au niveau ordonnancement qu'au niveau regroupement en classe de traitements-souches non significativement différents entre eux. Les faibles corrélations calculées à partir de ces variables, entre elles et avec le poids secs des parties aériennes et l'azote total contenu dans les parties aériennes des plants, laissaient déjà à présager l'existence de ces différences. Là encore, les regroupements obtenus par le test de Newman et Keul (à $P=0,05$) se chevauchent de manière importante et il est difficile de faire ressortir des classes bien caractérisées. Cela malgré l'existence de différences plus marquées entre les moyennes étudiées pour la même variable dans ces deux derniers cas par rapport à ce qui a été observé lors de l'analyse des histogrammes concernant les moyennes de poids secs de parties aériennes et d'azote total contenu dans ces parties aériennes. L'existence de ces différences plus marquées a entraîné la génération d'un nombre plus important de groupes par le test de Newman et Keul au lieu de mieux différencier ceux qui existaient déjà. Ceci est dû à l'importance des valeurs prises par les écarts types de ces variables (Tableau 5).

Fig. 4 : Histogramme des moyennes d'ARA relevés à 60 min par traitement-souche

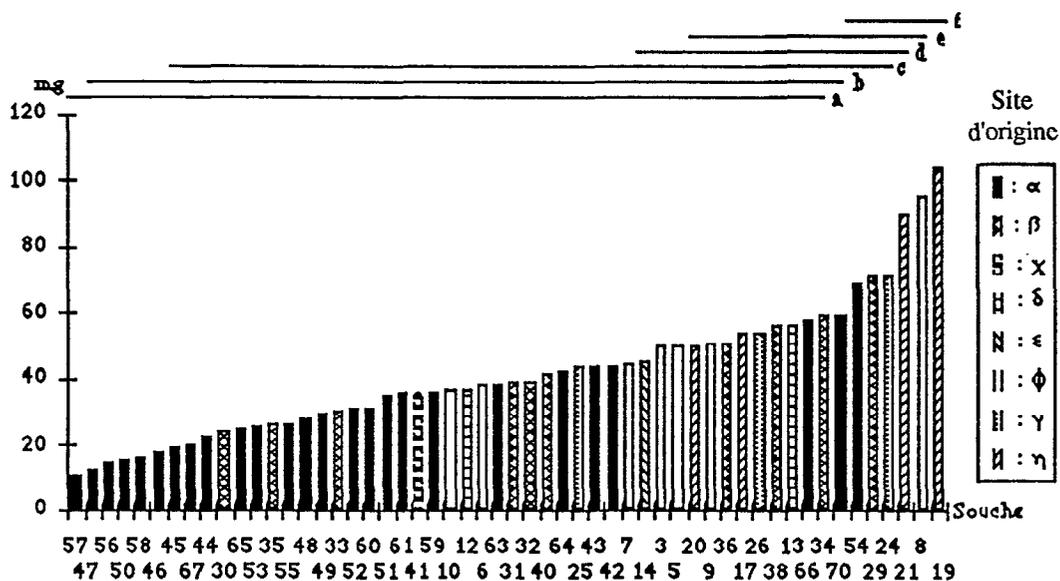


Légende :

- a, b, c et d sont les quatre groupes de traitements-souches non significativement différents apparues au test de Newman et Keul à $P = 0,05$;
- α , β , γ , ϵ , ϕ , η identifient par traitement-souche le site d'origine du *Frankia* utilisé comme inoculum, soit respectivement Serecounda, Mile Tour, Sawagle, Banjul (2), Diembering, Djiffer ;
- δ et γ identifient respectivement les souches de références CeF et M 02.

Un effet "provenance", par rapport au site géographique d'origine du *Frankia*, apparaît à travers l'analyse de la répartition de certains traitements-souches. Il s'avère en général (Fig. 5) que les plants inoculés avec les souches originaires des sites Serecounda et Sawagle produisent peu en poids de nodules et que ceux inoculés avec les souches originaires du site de Djiffer produisent d'assez grandes quantité de biomasse de nodules. Ce qui permet de mettre en évidence par rapport aux autres souches un meilleur pouvoir fixateur d'azote pour les souches originaires des sites de Serecounda et Sawagle, ainsi qu'un faible pouvoir fixateur d'azote pour les souches originaires du site de Djiffer. Ces résultats ne se retrouvent pas dans les autres histogrammes (figures n° 3 et 4).

Fig. 5 : Histogramme des moyennes de poids secs de nodules obtenus par traitements-souche



Légende :

- a, b, c, d, e et f sont les six groupes de traitements-souches non significativement différents apparues au test de Newman et Keul à $P = 0,05$;
- $\alpha, \beta, \chi, \epsilon, \phi, \eta$ identifient par traitement-souche le site d'origine du *Frankia* utilisé comme inoculum, soit respectivement Serecounda, Mile Tour, Sawagle, Banjul (2), Diembering, Djiffer ;
- δ et γ identifient respectivement les souches de références CeF et M 02.

➔ Synthèse des résultats obtenus au test d'infectivité-effectivité :

- ☞ toutes les souches de *Frankia* testées infectent le clone β de *Casuarina equisetifolia* et peuvent à ce titre être classées dans l'ensemble des souches dites typiques (réinfectantes vis-à-vis de leur hôte d'origine) ;
- ☞ les 7 souches Cap 01, Die 02, Die 03, Dji 04, Kar 02, Kar 05 et Mal 03 ont un pouvoir d'infection plus faible que celui des souches Cef ou M 02 (références de collection) ;
- ☞ parmi les souches infectives, les 7 souches Ban 07, Die 02, Kar 02, Kar 05, Mal 05, Mil 12 et Ser 23 sont inefficaces, suivant le critère retenu [$Q_{moy.}(N_2 \text{ total de la série de plants testés}) < 1,5 \text{ fois } Q_{moy.}(N_2 \text{ total de la série de plants témoins})$] ;
- ☞ toutes les souches infectives et effectives n'ont pas la même effectivité ;
- ☞ 3 groupes d'infectivité-effectivité sont faits à partir des résultats obtenus pour l'ensemble des souches testées (Tableau 6).

2 - Spectre d'hôte des souches de *Frankia* :

L'étude du spectre d'hôte des souches de *Frankia* faite en extérieur durant la période sèche à l'ORSTOM (Dakar), n'a pu être menée à son terme.

Les seuls résultats exploitables ayant pu être relevés, concernent certaines souches de *Frankia* qui apparaissent infectives vis-à-vis d'un des végétaux hôtes testés, *Hippophae rhamnoides*. Ces souches sont : Ban 08, Ban 12, Dji 04, M 02, Mil 11, Ser 01, Ser 10, Ser 11 et Ser 21. Les nodules observés sur les racines des plants d'*H. rhamnoides* infectés sont récoltés et un nom en rapport avec la souche qui a été utilisée comme inoculum, leur est donné, soit : Ban 08 no, Ban 12 no, Dji 04 no, M 02 no, Mil 11 no, Ser 01 no, Ser 10 no, Ser 11 no et Ser 21 no.

Une prochaine étude en serre du spectre d'hôte des souches de *Frankia* est envisagée.

Discussion

1 - Infectivité des souches de *Frankia* :

L'évaluation de l'infectivité des souches de *Frankia* vis-à-vis d'un ou de plusieurs plantes hôtes permettent d'aborder trois types de problèmes liés :

- aux contraintes environnementales régissant la nodulation,
- au pouvoir d'infection d'une souche vis-à-vis d'une plante choisie,
- à la coinfection d'un nodule par plus d'une souche de *Frankia*.

Le second et le troisième type de problème ne peuvent être abordés que si le premier est solutionné ou du moins bien maîtrisé, permettant ainsi une standardisation des facteurs non étudiés dans l'expérimentation en cours.

Dans notre travail, nous nous sommes attaché à l'étude de la spécificité d'hôte des souches de *Frankia* nouvellement isolées de nodules de *Casuarina equisetifolia* récoltés au Sénégal et en Gambie. Cette spécificité d'hôte s'évalue en étudiant le pouvoir d'infection de souches de *Frankia* ainsi que leur effectivité pour une plante hôte donnée.

Les conditions expérimentales (sol, inoculation, boutures) avec lesquelles nous avons travaillé permettent une bonne infection de plants de *Casuarina equisetifolia* par une souche de *Frankia* reconnue comme "typique" (Sougoufara, 1990). Le sol utilisé, même s'il est stérilisé en début d'expérimentation, est vite contaminé par la microflore et macrofaune environnantes, en conditions extérieures. Ces contaminants pourraient être à l'origine des causes permettant l'infection des racines d'un plant par un *Frankia* classé ininfectif vis-à-vis de l'espèce végétale considérée (Knowlton et al., 1980 ; Knowlton et al., 1983 ; Lechevalier et al., 1990), voire même la contamination de l'essai par un *Frankia* extérieur.

L'évaluation faite dans notre étude, du pouvoir d'infection des souches de *Frankia* vis-à-vis du clone β de *Casuarina equisetifolia*, permet d'établir que toutes les souches testées sont infectives pour ce végétal, donc toutes "typiques". Des différences apparaissent entre les pouvoirs d'infection de l'ensemble des souches testées. Si la majeure partie des souches testées (55/62) présentent un fort pouvoir infectant vis-à-vis du *C. equisetifolia*, 7 souches, Cap 01, Die 02, Die 03, Dji 04, Kar 02, Kar 05 et Mal 03, ont un pouvoir d'infection plus faible. Différentes hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces faibles réponses :

- les inoculum étaient de mauvaise qualité pour les souches considérées,
- b - les conditions de l'essai n'étaient pas favorables pour ces souches,
- c - ces souches ont réellement un faible pouvoir d'infection vis-à-vis de *C. equisetifolia*.

L'expérience n'ayant pas été répétée, nous ne pouvons juger s'il s'agit de résultats accidentels dus à la mauvaise qualité des cultures (a), ou si les causes de ces faibles réponses sont dues à des caractéristiques intrinsèques des souches en question (b et c).

L'évaluation du pouvoir d'infection des souches de *Frankia* vis-à-vis d'autres végétaux que *Casuarina equisetifolia*, a permis de mettre en évidence que les souches Ban 08, Ban 12, Dji 04, M 02, Mil 11, Ser 01, Ser 10, Ser 11 et Ser 21 infectent aussi *Hippophæ rhamnoides*, à moins qu'il n'y ait eu contamination des plants présentant des nodules par un *Frankia* extérieur à l'expérimentation.

Des travaux ultérieurs présentés dans la Partie 3 (paragraphe 2) de notre étude, ont permis de démontrer, dans le cas de Ser 21 no au moins, que le *Frankia* présent dans les nodules du plant d'*H. rhamnoides* est différent de la souche Ser 21. L'analyse du profil de restriction des fragments d'ADN extrait des nodules Ser 21 no et amplifiés puis clivés par l'endonucléase Nci I, permet d'assimiler le microorganisme infectant de ces nodules à un microorganisme semblable aux souches D 11 et G 02. Ce qui porte à croire qu'il s'agit bien d'un *Frankia* pouvant infecter de lui-même *Hippophæ rhamnoides*. Ceci permet d'éliminer de la discussion toute hypothèse mettant en avant le fait qu'il puisse y avoir nodulation par une souche de *Frankia* ininfective pour la plante hôte considérée, grâce à l'action de la microflore ou macrofaune de la rhizosphère de cette plante.

Quatre hypothèses peuvent alors être retenues pour expliquer l'infection de plants d'*H. rhamnoides* que nous avons observée :

- α - soit nous sommes en présence d'une souche à large spectre ayant subi une mutation sur la portion d'ADN étudiée,
- β - soit nous sommes en présence d'une souche "typique" de *Casuarina* ayant subi deux mutations, une sur la portion d'ADN étudiée et une au niveau de son gène *nod*,
- γ - soit nous sommes en présence d'une "multisouche", souches "typique" et "atypique" mélangées dans la même culture,
- δ - soit ces observations sont dues à la contamination de notre essai par une souche de *Frankia* extérieur à l'expérimentation, infectante vis-à-vis d'*H. rhamnoides*.

α - La capacité d'une souche de *Frankia* à noduler des plantes hôtes de genres différents, souches à large spectre, a déjà été décrite par plusieurs auteurs (Baker, 1987 ; Lalonde et al., 1981). L'observation faite dans notre travail concerne deux genres hôtes infectés par une même culture pure de *Frankia*, *Casuarina* et *Hippophæ*. Si ce résultat s'avérait exacte il contredirait la classification faite par Baker (1987), stipulant que ces deux genres de plante hôte appartiennent à des groupes d'inoculation différents.

De plus, s'il y avait eu mutation, nous aurions à faire depuis son apparition, à une culture "multisouches", ce qui n'a pas été confirmé par les expérimentations menées jusqu'à aujourd'hui. La mutation se serait donc produite au moment de l'infection du plant d'*Hippophæ rhamnoides* ou juste avant, de façon à ne concerner que l'inoculum qui a servi à l'expérience d'étude de spectre d'hôte.

Le fait même qu'il y ait eu mutations simultanées au niveau de plusieurs sites de coupure de l'endonucléase Nci I sur une portion réduite du génome, n'est que très peu probable. De plus, cette mutation transforme Ser 21 en une souche à profil de restriction "atypique", ce qui est aussi fort peu probable.

C'est pourquoi nous éliminons comme solution l'hypothèse de la possibilité d'être en présence de souches à large spectre ayant subi une mutation.

β - Des travaux de Gauthier et al. (1981b) prouvent l'existence de souches de *Frankia* (D11 et G 02) isolées à partir de nodules de *Casuarina equisetifolia* et qui infectent *Hippophæ rhamnoides* mais ne réinfectent pas leur plante hôte d'origine.

Diem et al. (1982) expliquent ce phénomène comme une modification des caractéristiques infectives des souches concernées, intervenue lors de leur isolement et culture. Cette thèse de l'altération des propriétés infectives d'une souche de *Frankia*, lors des phases d'isolement, de culture ou d'infection d'une plante hôte par cette souche, est évoquée dans la littérature (Burggraaf et al., 1981). L'observation de mutations spontanées de souches de *Frankia* en culture, confirme cette thèse (Burggraaf et Valstar, 1984 ; An et al., 1985b ; Parson et al., 1985 ; Lechevalier et al. ; 1987).

S'il y a eu mutation à un moment donné de la souche originelle "typique" en souche pouvant infecter le genre *Hippophæ*, cela voudrait dire qu'il y a eu mutation sur deux gènes différents en même temps, un gène lié au pouvoir d'infection, transformant la souche "typique" en souche "atypique", et le gène *rrn* au moins dans la portion étudiée dans ce travail. Ceci paraît encore moins probable que dans la première hypothèse discutée plus haut. C'est pourquoi nous ne retenons pas cette thèse comme solution du problème étudié ici.

γ - Une autre thèse basée sur la coinfection simultanée d'un même nodule par deux souches, dont l'une est réellement infective vis-à-vis de la plante hôte et permet le passage de l'autre souche ininfective vis-à-vis de cette même plante hôte, est aussi évoquée dans la littérature (Lechevalier et al., 1990) pour expliquer les résultats obtenus par Gauthier et al. (1981b). L'existence d'au moins deux souches différentes de *Frankia* au sein d'un même nodule a aussi été abordée par plusieurs auteurs (Benson et Hanna, 1983 ; Zhang et al., 1984 ; Reddell et Bowen, 1985 ; Normand et Lalonde, 1986 ; Baker, 1987 ; Lechevalier et al., 1990 ; Nazaret, 1991). Cette dernière thèse permet d'évoquer le fait que nous ayons à faire depuis l'isolement à une culture "multisouches".

Notre méthode d'isolement a été justement choisie afin d'éviter au maximum la possibilité d'isoler plusieurs souches en même temps. Et aucun signe dans les cultures ainsi que dans les résultats d'analyses de caractérisation de souches n'ont permis de supposer à quel moment que ce soit une coculture de souches de *Frankia*.

C'est pourquoi il nous est difficile de proposer comme solution ici, la thèse émettant la possibilité d'avoir isolé une "multisouches". A moins d'admettre que les méthodes de

dépistage que nous avons utilisées (essentiellement basée après amplification en chaîne par polymérase d'une portion choisie d'ADN, sur l'utilisation de sondes d'ADN spécifiques ou sur l'étude des profils de restriction de l'ADN, cf Partie 3) ne soient pas assez fines pour déceler au sein d'une culture de *Frankia* "typique", un *Frankia* "atypique".

δ - Reste l'hypothèse de la contamination de notre essai par une souche extérieure, semblable à la souche D 11. L'expérimentation ayant été menée en extérieur durant la saison humide, il est possible que certains sachets aient été contaminés par un *Frankia* "typique" d'*H. rhamnoides*.

L'étude sur le spectre d'hôte des souches de *Frankia* nouvellement isolées du Sénégal et de la Gambie, n'a pas été menée à terme, ce qui nous a mis dans l'impossibilité de classer ces souches, dans un des 3 groupes proposés par Sougoufara (1990) (souches à spectre large, souches à spectre restreint et souches à spectre aberrant).

2 - Effectivité des souches de *Frankia* :

Tjepkema et al. (1988) considère la mesure de l'ARA comme une bonne appréciation de l'évaluation du pouvoir fixateur d'azote chez les plantes actinorhiziennes et plus spécialement des *Casuarina*, même si elle est mesurée à partir de racines excisées. Alors que les résultats obtenus par Minchin et al. (1986) à partir d'études sur plantes légumineuses, laissent à supposer le contraire. La mesure de l'ARA n'étant représentative que d'un moment, mesures "flash" de l'activité de *Frankia* au sein de la symbiose, ils n'apportent d'informations que relatives à cet instant. C'est pourquoi, nous considérons dans ce travail que cette mesure n'a qu'une valeur indicative.

De plus, seuls des jeunes tissus de nodules sont capables d'une bonne activité réductrice de l'acétylène (Tyson et Silver, 1979). Ceci pose un problème relatif à la continuité et longévité de cette activité au sein d'un nodule. L'expérimentation menée en extérieur à Dakar, s'est terminée en fin d'hivernage, c'est-à-dire en fin de période d'intense activité végétale. Cette période critique n'est sans doute pas la plus intéressante pour effectuer une mesure d'ARA. L'importance des écarts types observés dans notre travail pour ce paramètre doit être lié au fait que l'état physiologique des échantillons végétaux testés n'était pas homogène.

C'est pourquoi notre analyse de l'effectivité des souches testées et leur classification sont essentiellement faites à partir de l'étude de la variable "azote total contenu dans les parties aériennes des plants". C'est une mesure comparée à celle de plants témoins non infectés (méthode de la différence), représentative de l'action fixatrice d'azote du microorganisme cumulée tout au long de la vie de la plante hôte.

L'importance des différences observables pour un même traitement-souche répété aux deux ou trois séries de mise en place de l'essai, pour les mêmes variables mesurées, sont liées aux

différences environnementales, plus particulièrement climatiques, existantes entre ces séries. Ceci rend par la suite l'interprétation des résultats réalisés plus délicate et plus difficile le choix des coefficients servant à classer dans une catégorie bien précise, les traitements-souches testés. C'est pourquoi nous n'avons choisi de faire que trois classes (infective, infective et ineffective, infective et effective) dans cette étude et de ne pas faire ressortir dans la récapitulation des résultats une gradation dans les effectivités relevées.

Le fait qu'il existe parmi les souches de *Casuarina* testées, des souches infectives et ineffectives vis-à-vis de leur plante hôte d'origine, n'est pas sans rappeler les résultats de Sougoufara (1990) sur la spécificité de l'expression de l'effectivité d'une souche. Ses résultats mettent en évidence l'existence de souches infectives-effectives vis-à-vis de *Casuarina* et infectives-ineffectives vis-à-vis d'*Allocasuarina*. Nos résultats, prouvent qu'il existe aussi des souches (Ban 07, Die 02, Kar 02, Kar 05, Mal 05, Mil 12 et Ser 23) infectives et ineffectives vis-à-vis de *Casuarina*. Malgré l'absence d'études permettant de déterminer si ces souches sont effectives sur d'autres espèces végétales, nous pouvons penser que nous sommes en présence de résultats liés à la spécificité de l'expression de l'effectivité de ces souches.

Le fait d'avoir utilisé un clone comme plante hôte pour cette expérience permet l'obtention de résultats exempts d'effets liés à la variabilité intra-spécifique de semis de *Casuarina equisetifolia*. Afin de se dégager aussi des effets dus aux conditions environnementales naturelles, ce type d'expérience doit être envisagé en conditions axéniques totalement contrôlées.

Partie 3

Caractérisation de *Frankia* par des méthodes de biologie moléculaire

Introduction

La technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) permet de lever le handicap des recherches liées au faible taux de croissance de la bactérie en culture pure ou à son difficile isolement des nodules de *Casuarina equisetifolia*. En effet, cette technique ne requiert pas, au préalable, des quantités importantes de cultures pures de *Frankia*, ni même son isolement (Simonet et al., 1990). La possibilité de réaliser une amplification avec théoriquement une seule séquence "ciblée" initiale, prouve la très bonne efficacité de cette technique (Agut et Huriaux, 1990 ; Arnheim et al., 1990).

La PCR permet d'obtenir sans clonage, de grandes quantités d'une séquence voulue d'ADN, à partir de très peu de matériel biologique de départ issu de culture pure ou de matériel prélevé sur le terrain (nodules). C'est à partir de ce matériel de génération artificielle que des études mettant en œuvre des sondes spécifiques ou des endonucléases choisies, ont pu être entreprises dans ce travail.

L'hybridation d'une portion d'ADN amplifié ou non amplifié, avec une sonde choisie, est une technique très intéressante pour le dépistage fin et rapide de la présence d'une séquence d'ADN ciblée (Simonet et al., 1988a, 1990 ; Hahn et al., 1990). L'emploi de sonde d'ADN pour la détection des différences pouvant exister dans un groupe même fermé de bactéries, est une méthode reconnue sensible par de nombreux auteurs (Hardley et al., 1983 ; Noel et Brill, 1980 ; Sadowsky et al., 1987 ; Simonet et al., 1988b, 1989).

Le gène *nif* est caractéristique des organismes fixateurs d'azote et son évolution est liée à celle de la bactérie qui le possède. Une mesure de la similarité des séquences de ce gène entre différents groupes bactériens, peut être utilisée comme un critère taxonomique au même titre que celle s'appuyant sur la mesure de similarité du 16S ARNr (Normand et Bousquet, 1989). En étudiant la conservation du gène *nif* de *Frankia*, Normand et al. (1988) le trouvent très conservé pour les deux souches du groupe de *Frankia* de *Casuarina* qu'ils ont testées. Depuis, il a été démontré qu'à travers l'étude de cette portion du génome deux groupes de souches différentes de *Frankia* isolées à partir de nodules de *Casuarina equisetifolia*, les unes dites "typiques" et l'autres "atypiques", peuvent être caractérisés (Nazaret et al., 1989). D'autres travaux ont permis à Nazaret et al. (1991) de confectionner à partir de cette même partie du génome de *Frankia*, deux sondes. L'une, la sonde FGPD 871 (n° 27), spécifique à l'ensemble des souches "typiques" de *Frankia*, isolées et infectives vis-à-vis de *Casuarina equisetifolia*, l'autre, la sonde FGPH 547 (n° 28), spécifique à la souche "atypique" D 11, isolée de *C. equisetifolia* et infective sur *Hippophæ rhamnoides*. La sonde n° 27 s'hybride avec une portion conservée de l'intergène *nif H-nif D* de l'ADN des souches de *Frankia* "typiques", cet intergène étant lui même très conservé (Nazaret, 1991). Alors que la sonde n° 28 s'hybride avec une portion du gène *nif H* qui permet de différencier la souche "atypique" D 11 des souches "typiques" (Nazaret, 1991).

En étudiant les signaux obtenus pour chacune de ces sondes, avec l'ADN des souches sénégalaises et gambiennes infectives sur *C. equisetifolia* (cf Partie 2, § 1), nous nous proposons de vérifier l'homogénéité du groupe des souches de *Frankia* "typiques".

Au cours de ces dernières années, l'étude du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction d'ADN hybridé ou non avec une sonde choisie, s'est révélée être une technique très intéressante pour caractériser un microorganisme et/ou l'identifier (Crameri et al., 1983 ; An et al., 1985b ; Dobristsa, 1985 ; Grimont et al., 1986 ; Normand et al., 1986, 1988 ; Simonet et al., 1988b ; Bloom et al., 1989a, 1989b). Cette technique à haut degré de résolution, est plus simple d'emploi que l'hybridation ADN-ADN. Elle peut servir à jeter rapidement les premières bases de l'évaluation de la diversité existant au sein d'un groupe de souches de *Frankia* (Bloom et al., 1989b).

De l'étude de la similarité (Fernandez et al. 1990) existante entre les séquences des ARNr d'une souche de *Frankia* (ORS020606) et ceux de *Streptomyces ambofaciens*, il ressort que la portion ITS comprise entre les portions 16S et 23S, est assez variable contrairement aux 16S et 23S qui l'encadrent. Cette portion ITS du gène *rrn* du génome de *Frankia* nous est apparue comme un matériel de base intéressant pour l'étude de variabilité des souches sénégalaises et gambiennes. Nous intéressant à un groupe de *Frankia* isolés à partir d'une seule espèce végétale hôte, *Casuarina equisetifolia*, nous avons préféré utiliser pour étudier la variabilité de ces souches, cette portion ITS à la portion 16S plus classiquement étudiée, mais aussi plus conservée.

Pour ces travaux concernant l'étude de signaux d'hybridation et l'étude de profils de restriction, menés à partir d'ADN extrait de souches de *Frankia*, nous avons développé une technique permettant d'extraire l'ADN des souches en les soumettant à sonication. Cette technique est aussi bien applicable à partir de souches issues de cultures pures que de souches contenues dans des nodules de *C. equisetifolia*. Elle a l'avantage d'être rapide et facile d'emploi par rapport aux extractions enzymatiques classiques qui sont couramment utilisées.

Matériel et méthodes

1 - Souches de *Frankia* utilisées dans cette partie du travail :

(Voir Parties 1 et 2)

2.- Culture des souches de *Frankia* :

(Voir Partie 1)

3 - Caractérisation des souches de *Frankia* par des méthodes de biologie moléculaire :

Les amorces et sondes d'ADN de *Frankia* utilisées proviennent du Laboratoire d'Ecologie Microbienne du Pr. Bardin, Université de Sciences Lyon I, leur position dans le génome de *Frankia* sont représentées annexe 7 et elles sont répertoriées dans l'annexe 6.

3.1 - Extraction d'ADN :

L'ADN des souches de référence utilisées dans notre étude comme ADN témoin, a été obtenu avec le protocole d'extraction établi par Fernandez et al. (1989).

Pour les ADN des souches à tester deux cas se présentent suivant le matériel de départ disponible :

- extraction d'ADN à partir d'une culture pure de *Frankia*
- extraction d'ADN à partir de nodules récoltés sur les racines du végétal hôte

3.1.1 - Protocole d'extraction de l'ADN par sonication d'1 ml de culture fraîche de *Frankia* :

L'ADN des souches isolées de *Casuarina equisetifolia* a été extrait suivant le protocole suivant. La culture est lavée 3 fois dans de l'eau distillée stérile par centrifugation (13 000 rpm - 15 minutes - 4 °C) en ayant soin de la remettre en suspension au début de chaque rinçage. Le dernier culot de centrifugation est repris dans 500 µl d'eau distillée stérile, remis en suspension et soniqué en ambiance froide à la fréquence de 60 % durant 50 secondes à 10 % de la puissance de l'appareil (Branson Sonifier 250). Après centrifugation, le surnageant dans lequel se trouve l'ADN du *Frankia* de la culture est récupéré. Un gel à 2 % d'agarose est utilisé pour le contrôle d'extraction de l'ADN.

Si nécessaire, l'ADN extrait est conservé à - 100 °C.

3.1.2 - Protocole d'extraction d'ADN par sonication à partir de nodules fraîchement récoltés :

Une technique comparable à celle décrite au-dessus, peut-être utilisée pour extraire l'ADN de souches de *Frankia* présentes dans des nodules. Les nodules fraîchement récoltés sont lavés à l'eau stérile et "épluchés" à l'aide d'une lame de scalpel stérile. Puis mis dans un microtube stérile contenant une solution [100 µl de TE au pH 8 (10 mM de Tris-Cl au pH 8 et 1 mM de EDTA au pH 8) NaCl 100 mM et PVPP (PolyVinylPolyPyrrolidone) en excès] dans laquelle ils seront "pottérisés" avant d'être soniqués en ambiance froide à la fréquence de 50 % durant 2 min à 10 % de la puissance de l'appareil (Branson Sonifier 250). Après centrifugation (13 000 rpm - 10 minutes - 4 °C) le surnageant est récupéré et dilué au 1/20 avec du TE au pH 7,5 (10 mM de Tris-Cl au pH 7,5 et 1 mM de EDTA au pH 8).

L'ADN ainsi extrait ne peut être conservé très longtemps, il doit être utilisé rapidement. Ceci est dû à la présence dans le surnageant de métabolites végétaux qui sont susceptibles d'endommager l'ADN libéré après sonication.

3.1.3 - Purification de l'ADN :

Si besoin est, l'ADN extrait des cultures pures ou broyat de nodules est purifié par une extraction phénolique suivie d'une extraction au chloroforme avant d'être précipité à l'éthanol et repris dans le tampon TE.

□ Protocole :

A 50 µl de solution d'ADN, 100 µl de TE (pH 7,5) sont rajoutés et mélangés avec 100 µl de chloroforme. Après centrifugation d'une minute, la phase supérieure ne contenant pas de chloroforme, est récupérée et additionnée de 15 µl de NaOAc (3 M, pH 5,2) avec 500 µl d'éthanol 100 (conservé à -20 °C), puis centrifugée à nouveau (13 000 rpm - 1/2 heure - 4 °C). L'éthanol 100 est alors éliminé et l'ADN est rincé avec 100 µl d'éthanol 80 (conservé à - 20 °C). Après centrifugation (13 000 rpm - 2 minutes - 4 °C), l'éthanol 80 est aussi éliminé et le contenu du microtube est séché dans un dessiccateur avant de le reprendre dans 20 µl de TE (pH 7,5).

La solution d'ADN ainsi purifiée peut être conservée dans le microtube à - 20 °C.

3.2 - Amplification en chaîne par polymérase - PCR ("Polymerase Chain Reaction") :

□ Principe :

La réaction d'amplification en chaîne par polymérase *in vitro* ou PCR est effectuée sur une portion d'ADN longue de quelques centaines de bases. La séquence nucléotidique de cette portion d'ADN est connue au moins partiellement en deux endroits correspondant aux débuts de lecture de la séquence à amplifier pour chacun des deux brins complémentaires. Sur ces séquences-sites vont s'apparier spécifiquement deux amorces (oligonucléotides synthétiques), une respectivement pour chaque brin. A partir des amorces, une enzyme ADN polymérase résistante à l'inactivation par la chaleur, la Taq polymérase (isolée à partir d'une eubactérie thermophile : *Thermus aquaticus*), fabrique une copie de chaque brin d'ADN. Les fragments nouvellement synthétisés sont séparés de la matrice d'ADN par chauffage et le cycle (appariement : amorces-ADN ; synthèse de copie d'ADN ; dénaturation) peut recommencer. A chaque cycle, le stock de la séquence double.

□ Protocole :

L'amplification en chaîne par polymérase a été réalisée suivant une modification du protocole écrit initialement par Mullis et Faloona (1987).

Le mélange réactionnel typique comprend 1 μM de chacune des 2 amorces utilisées, 200 μM de chaque déoxynucléoside triphosphate (dNTP), 0,5 unités de Taq I polymérase (Gibco BRL, Cergy Pontoise, France) en présence de 10 mM de Tris-HCL pH 8,3, 50 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl_2 , 0,01 % (poids/volume) de gélatine et la solution d'ADN (concentration comprise entre 1 μg à 5 μg d'ADN).

Au préalable à l'ajout de l'ADN et de l'enzyme polymérase, les échantillons sont irradiés sous UV afin d'éliminer toute trace d'ADN contaminant. Puis 50 μl d'huile de paraffine sont ajoutées afin de prévenir tout problème d'évaporation. Les échantillons sont alors soumis aux cycles d'amplification. De façon routinière 35 à 40 cycles sont effectués. Chaque cycle se divise en 3 parties :

- la dénaturation de l'ADN s'effectue à 93°C pendant 1 min,
- l'hybridation de l'ADN à l'amorce s'effectue à la température (T) adaptée à chaque paire d'amorce [T est calculé pour l'oligonucléotide ayant le plus bas GC %, $T = 4x(G+C) + 2x(A+T) - 5$] pendant 1 min,
- la synthèse du brin complémentaire à 72°C pendant 2 min.

Les cycles ont été effectués soit manuellement à l'aide de différents bains-marie, soit automatiquement à l'aide de l'amplificateur Techne PHC2 (Cambridge, Angleterre).

A la fin de l'amplification, un aliquot est soumis à électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % dans un tampon Tris-Borate-EDTA (TBE), pour visualiser l'efficacité de l'amplification.

L'ADN amplifié ainsi obtenu peut être conservé dans les microtubes à -20°C.

3.3 - Emploi de sonde d'ADN :

3.3.1 - Dépôt de l'ADN sur membrane de nitrocellulose :

Un aliquot (5 µl) d'ADN amplifié est dénaturé par addition d'un volume (5 µl) de NaOH (N) et déposé par aspiration sous vide (système Hybri-dot, Gibco BRL, Cergy Pontoise, France) sur filtre de nitrocellulose (Schleicher et Schuell, Dassel, Allemagne) préhumidifié à l'eau distillée, le filtre est déposé pendant 5 min sur papier Whatman imbibé de la solution suivante : [NaCl 3M, TRIS 0,5 M, ajuster au pH 8 à l'aide d'HCl concentré, compléter à 4 l avec de l'eau distillée stérile] neutralisant la dénaturation de l'ADN par NaOH. La neutralisation est complétée par immergeant le filtre 15 min dans une solution tampon 6x SSC [20x SSC : 175,3 g de NaCl, 88,2 g de citrate de sodium, 800 ml d'eau distillée, ajuster à pH 7 à l'aide de NaOH (10N), ajuster le volume à 1 l, stériliser en autoclavant ; diluer au 3/10^{ème}] et le laisser sécher à l'air libre avant de le passer à l'étuve (80°C) durant 2 heures entre 2 feuilles de papier Watman.

3.3.2 - Sonde radioactive :

. 3.3.2.1 - Préparation de la sonde radioactive :

Cette opération consiste à effectuer un marquage de l'oligonucléotide (sonde) avec du [γ -³²P] ATP à l'aide de la T4 polynucléotide kinase (Zeff and Geliebter, 1987). Pour cela mettre dans un microtube : 7 µl de [γ -³²P] ATP [$\geq 1,85 \cdot 10^{14}$ Bq/mmol (=5 000 Ci/mmol)], 1 µl de tampon kinase, 1 µl d'oligonucléotide à marquer (100 ng) et 1 µl de T4 polymérase kinase (7 unités/µl), avant de laisser incuber 30 min. à 37°C. Puis l'enzyme est inactivé en chauffant à 65°C durant 5 min.

(Il n'est pas besoin de purifier sur Sephadex G-50 pour séparer le [γ -³²P] ATP non incorporé, car celui-ci n'augmente pas le bruit de fond.)

. 3.3.2.2 - Hybridation sonde radioactive et fragment d'ADN amplifié :

- Préhybridation : le filtre, sur lequel l'ADN a été fixé, est trempé, sous agitation, durant 2 heures dans une solution de préhybridation [30 ml d'eau distillée, 50 ml de 20x SSC, 8 ml de phosphate de sodium (0,5 M), 40 ml de 50x Denhart (5 g de Ficoll, 5 g de polyvinylpyrrolidone, 5 g de BSA-Pentax Fraction V, ajuster à 500 ml à l'aide d'eau distillée), 70 ml de SDS à 20%, 2 ml à 10 mg/ml de sperme de saumon dénaturé par la

chaleur] aux températures prédéfinies suivant la teneur en différentes bases des sondes utilisées : $t^{\circ}\text{C}=2(\text{A}+\text{T})+4(\text{C}+\text{G})-5$.

- Hybridation : le filtre est immergé sous agitation, à la température définie plus haut suivant la sonde utilisée, durant une nuit dans une solution d'hybridation [20 ml de solution de préhybridation, 1,6 ml de la solution contenant la sonde radioactive et 4 ml de Dextrane sulfate à 50 %].

- Rinçage : le rinçage s'effectue sous agitation aux températures déjà définies plus haut, il comprend une première immersion du filtre dans une solution de préhybridation durant une heure, suivi de 3 à 4 autres bains d'une heure dans une solution de rinçage [10 ml de 1x SSC, 10 ml de SDS à 1%, 180 ml d'eau distillée].

Les températures des bains de préhybridation, rinçages et d'hybridation lors d'emploi de sondes radioactives, calculées pour chacune d'elle à l'aide de la formule : $t^{\circ}\text{C}=2(\text{A}+\text{T})+4(\text{C}+\text{G})-5$ et leur composition en différentes bases (Annexe 6), sont :

. sonde n° 27 : $2(1+4)+4(8+2)-5=45^{\circ}\text{C}$

. sonde n° 28 : $2(0+3)+4(7+5)-5=49^{\circ}\text{C}$.

En fait, la préhybridation ainsi que les deux rinçages qui suivirent furent fait à 45°C , seul le troisième rinçage après préhybridation a été fait à la température préconisée par le calcul pour chacune des deux sondes, ceci pour des raisons de commodité.

. 3.3.2.3 - Autoradiographie :

Les filtres d'hybridation sont mis dans des sachets plastiques que l'on soude, et au contact d'un film "Kodak X-Omat" durant une nuit à température choisie expérimentalement suivant la finesse de révélation désirée.

3.3.3 - Sonde non radioactive :

(Protocole de M.P. Labonne, L. Gebuhrer et H. Betuel du laboratoire d'histocompatibilité - CRTS de Lyon)

. 3.3.3.1 - Préparation de la sonde non radioactive :

□ Principe :

Cette opération consiste à effectuer un marquage de l'oligonucléotide (sonde) en lui incorporant en 3', grâce à l'enzyme terminale transférase, un déoxyuridine triphosphate relié à un haptène stéroïde lui-même marqué à la digoxigénine (dUTP-Dig). Après hybridation sur

l'ADN amplifié, les hybrides sont détectés par réaction enzymatique grâce à un anticorps conjugué (anti-digoxigénine marqué à la phosphatase alcaline). La réaction colorée catalysée par l'enzyme apparaît au lieu de l'hybridation en présence de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (X-phosphate) et de nitrobleu tétrazolium (NBT).

□ Protocole :

La quantité d'oligonucléotide marqué à la digoxigénine, nécessaire par cm^2 de filtre de nitrocellulose est de 7,5 ng.

Dans un volume final de 25 μl , 25 U de terminal transférase permettent de marquer jusqu'à 200 ng d'oligonucléotide.

Le marquage se fait par mélange dans un micro-tube de 200 ng d'oligonucléotide à marquer, 2,5 μl de tampon d'enzyme, 25 U de terminal transférase, 40 μM de dithiothreitol, 1 mM de dig.-11-dUTP (déoxyUridine TriPhosphate marqué à la digoxigénine), ajusté à 25 μl à l'aide d'eau distillée et incubé à 37°C pendant 2 heures.

L'oligonucléotide ainsi marqué est stable à -20°C.

. 3.3.3.2 - Hybridation sonde non radioactive et fragment d'ADN amplifié :

Les températures de préhybridation, hybridation et rinçage sont déterminées expérimentalement pour chaque oligo-sonde.

- Préhybridation : faire tremper, à la température choisie, le filtre sur lequel a été fixé l'ADN à tester, pendant 2 heures, sous agitation dans un bain (0,5 ml de tampon par cm^2 de filtre) de tampon d'hybridation {6x SSPE [20x SSPE : 175,3 g de NaCl, 27,6 g de NaH_2PO_4 H_2O , 7,4 g de EDTA , 800 ml d'eau distillée, ajuster le pH à 7,4 avec du NaOH (environ 6,5 ml d'une solution à 10 N), ajuster le volume à 1 l, stériliser en autoclavant ; diluer au 3/10^{ème}], 5x Denhardt, 0,1% de SDS}

- Hybridation : ajouter 15 ng d'oligo-sonde marquée à la digoxigénine, par ml de tampon de préhybridation. Homogénéiser et incubé toute une nuit, sous agitation à la température d'hybridation de l'oligo-sonde.

- Rinçage sous agitation : après avoir récupéré la solution d'hybridation qui conservée à -20°C pourra être réutilisée plusieurs fois, rincer le filtre 2 fois 10 min à température ambiante dans 100 ml de 2x SSPE contenant 0,1 % de SDS. Puis rincer 1 fois 20 min dans 0,2 x SSPE contenant 0,1 % de SDS à la température appropriée.

-Révélation : l'anticorps conjugué, les solutions de NBT et de X-Phosphate sont fournis dans le kit : DNA Labeling and Detection Kit nonradio-active, de chez Boehringer.

Toutes les étapes de la révélation se font à température ambiante et, excepté pour la coloration, sous agitation.

Le filtre est rincé 5 min dans le tampon I (100 mM de Tris-HCl au pH 7,2 et 150 mM de NaCl), incubé 30 min dans 100 ml de tampon II (tampon I et 0,5 à 2 % d'agent bloquant fourni dans le kit, dissout à 70 °C pendant 1 heure), puis rincer brièvement dans le tampon I, avant d'être incubé 30 min dans une solution contenant le tampon I additionné de 150 mU d'anticorps (fourni dans le kit) par ml de tampon (0,5 ml / cm²). Le filtre est ensuite lavé 2 fois dans 100 ml de tampon I pendant 15 min, mis en sac avec 10 ml de tampon III (100 mM de Tris-HCl au pH 9,5, 100mM de NaCl, 50mM de MgCl₂) et incubé 2 min.

La coloration se fait à l'obscurité, sans agitation après avoir remplacé la solution de tampon III par 10 ml de tampon III additionné de 45 µl de NBT et 35 µl de X-Phosphate. Les spots colorés apparaissent entre 10 min et 16 heures.

Dès que les spots sont apparus, stopper la réaction de coloration en lavant le filtre dans 50 ml de TE (pH 8).

Les filtres sont ensuite photographiés ou photocopiés et conservés en sac plastique dans du TE.

3.4 - RFLP ("Polymorphisme de la Longueur des Fragments de Restriction") à partir d'un fragment d'ADN amplifié :

□ Principe :

Cette opération consiste à faire agir une ou des endonucléases choisies, sur le fragment d'ADN amplifié. Les fragments d'ADN obtenus sont soumis à électrophorèse.

□ Protocole :

Par microtube de digestion 4 µl de solution d'ADN amplifié sont mélangés à 1 µl d'endonucléase choisie, 2 µl de tampon correspondant à l'enzyme (concentré 10 fois) et 14 µl d'eau stérile avant d'être incubés une heure à 37 °C. Puis, la totalité de la solution de chacun des microtubes est déposée dans un puits d'un gel à 4 % d'agarose NuSieve (Annexe 8), additionnée de 5 µl de bleu tampon. La migration se fait avec une différence de potentiel de 100 Volt durant 2 H 50 min.

Les endonucléases choisies sont :

- Cfo I : restriction endonucléase
1 000 U, 8-12 unités/ μ l (réf. n° 688 541, Boehringer)
employée avec le tampon : L
coupe en :GCG/C....
- Hae III : restriction endonucléase
1 000 U, 8-12 unités/ μ l (réf. n° 693 936, Boehringer)
employée avec le tampon : M
coupe en :GG/CC....
- Msp I : restriction endonucléase
1 000 U, 8-12 unités/ μ l (réf. n° 633 518, Boehringer)
employée avec le tampon : L
coupe en :C/CGG....
- Nci I : restriction endonucléase
500 U, 8-12 unités/ μ l (réf. n° 659 363, Boehringer)
employée avec le tampon : L
coupe en :CC/(G ou C)GG.....

3.4.1 - Protocole des gels d'électrophorèse :

(Voir annexe 8)

Résultats

Dans cette partie du travail, les différentes souches n'ont pas été cultivées dans le même milieu. Ceci n'a aucune conséquence sur les résultats et conclusions à tirer des expérimentations d'hybridation ou de restriction enzymatique d'ADN puisque la séquence de bases qui constitue cet ADN, ne dépend pas des conditions de croissance, de l'âge des cultures ou du stade morphogénétique du *Frankia* cultivé, contrairement aux profils de protéine (Dobritsa and Stupar, 1989). C'est le milieu liquide NGT qui a généralement été utilisé sauf pour les 4 souches : Die 01, Die 03, Dji 06 et Saw 01 qui ont été cultivées dans du milieu liquide BAP sans azote.

1 - Hybridation avec les sondes d'ADN n° 27 et 28 :

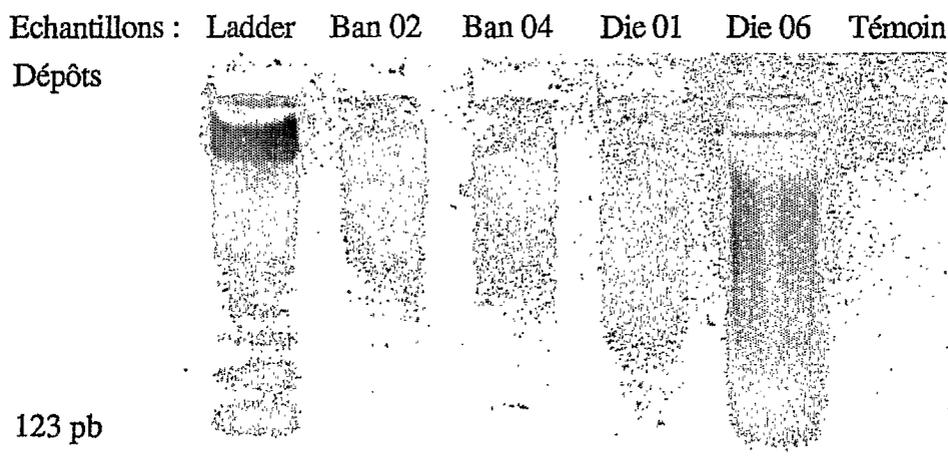
Les résultats concernant les extractions d'ADN faites à partir des cultures fraîches de *Frankia*, les amplifications en chaîne par polymérase qui ont suivi et les essais d'hybridation avec les sondes n° 27 et 28 en condition radioactives ou non radioactives, sont récapitulés dans l'annexe 9 et synthétisés dans le tableau 9.

1.1 - Amplification en chaîne par polymérase :

Les gels de contrôle de l'extraction par sonication de l'ADN des cellules de *Frankia* n'ont été effectués que sur quelques échantillons. Il apparaît sur les gels que l'ADN extrait s'étagé entre 123 pb et plusieurs kb. Cet étalement de l'ADN prouve qu'il a été morcelé en fragments de différentes tailles lors de la sonication (Planche 1, photo. 1). Seules les souches contrôlées Kar 02, Ser 20 et Ser 27 n'ont pas montré sur les gels de contrôle, de trace visible d'ADN extrait. Ce n'est qu'à partir de l'observation des gels de contrôle d'amplification des séries n° 1 (amorces n° 24 et 5) et 2 (amorces n° 6 et 5) qui ont suivi qu'il est possible de se rendre compte, pour presque la totalité des souches (70/75, soit plus de 93 % des souches), parmi lesquelles Ser 20 et Ser 27, que d'une part l'extraction de l'ADN des cellules de *Frankia* en culture a bien réussi et que d'autre part cet ADN extrait était dans un état permettant la poursuite du travail puisqu'en général, les amplifications menées ici manuellement (trois bains-marie : 1 min à 93 °C - 1 min à 55 °C - 1 min à 72 °C) avec 2,5 µl de solution d'ADN extrait, ont réussi (Tableau 9).

Parmi les 5 souches dont aucune amplification n'a été possible quel que soit le lot d'amorces utilisé, les gels des 3 souches Die 06, Mal 06 et Sam 01, présentent pourtant des traces d'ADN extrait.

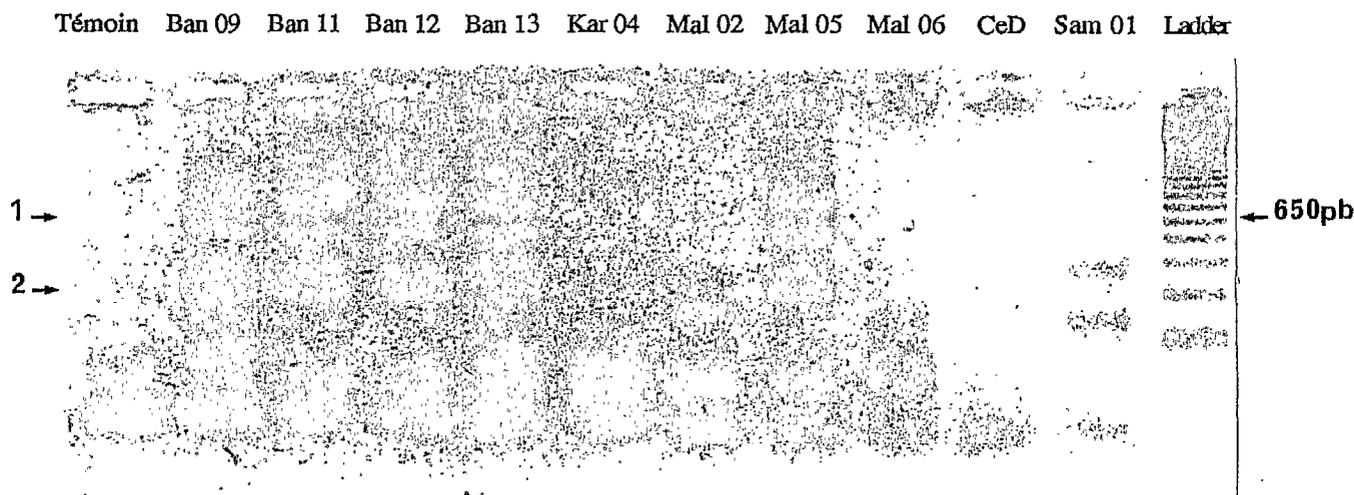
Pour les 2 souches CeD et Kar 02 aucune trace d'ADN extrait n'apparaît sur les gels de contrôle d'extraction ou d'amplification. L'absence d'ADN extrait explique le fait qu'aucune amplification n'ait été obtenue quels que soient les lots d'amorces utilisées.

Planche 1 :**1 - Gel de contrôle d'extraction de l'ADN par sonication :**

- L'ADN extrait par sonication des souches prises comme exemple, Ban 02, Ban 04, Die 01 et Die 06, s'étage de 123 pb à plusieurs kb.
- Le témoin est fait avec de l'eau distillée stérile.

2 - Exemple de résultats obtenus sur un gel de contrôle d'amplification :

Dépôts des échantillons testés :



- Le témoin est un témoin négatif.
- Le fragment d'amplification de 650 pb (1), visualisé sur le gel de contrôle pour les souches Ban 09, Ban 11, Ban 12, Ban 13 et Mal 05, est la preuve que l'ADN extrait de ces souches à été amplifié à l'aide des amorces n° 24 et 5. Le deuxième fragment (2), de taille sensiblement plus grande que 246 pb, est un sous produit d'amplification dont on ne tiendra pas compte.
- L'amplification a échoué pour les souches Kar 04, Mal 02, Mal 06, CeD et Sam 01.

Tableau 9 : Hybridation de l'ADN des souches avec les sondes n° 28 et 27

Souches testées	Amplification séquence <i>nif</i>	Profils d'hybridation		Souches testées	Amplification séquence <i>nif</i>	Profils d'hybridation	
		sonde n° 27	sonde n° 28			sonde n° 27	sonde n° 28
Témoins*	-	-	-	Mil 06	+	+	-
Ban 01	+	+	-	Mil 07	+	+	-
Ban 02	+	+	NT	Mil 08	+	+	-
Ban 03	+	+	-	Mil 09	+	+	-
Ban 04	+	+	NT	Mil 10	+	+	-
Ban 05	+	+	-	Mil 11	+	+	-
Ban 06	+	+	-	Mil 12	+	+	-
Ban 07	+	+	-	Mil 13	+	+	-
Ban 08	+	+	-	Sam 01	-	NT	NT
Ban 09	+	+	-	Saw 01	+	+	NT
Ban 10	+	+	-	Ser 01	+	+	-
Ban 11	+	+	-	Ser 02	+	+	-
Ban 12	+	+	-	Ser 03	+	+	-
Ban 13	+	+	-	Ser 04	+	+	-
CeD	-	NT	NT	Ser 05	+	+	-
D 11	+	-	+	Ser 06	+	+	-
Die 01	+	+	NT	Ser 07	+	+	-
Die 02	+	-	-	Ser 09	+	+	-
Die 03	+	+	-	Ser 10	+	+	-
Die 06	-	NT	NT	Ser 11	+	+	-
Dji 01	+	+	-	Ser 12	+	+	-
Dji 02	+	+	-	Ser 13	+	+	-
Dji 03	+	+	-	Ser 14	+	+	-
Dji 04	+	+	NT	Ser 15	+	+	-
Dji 05	+	+	-	Ser 16	+	+	NT
Kar 02	-	NT	NT	Ser 17	+	+	NT
Kar 03	+	-	NT	Ser 18	+	+	-
Kar 04	+	+	NT	Ser 19	+	+	-
Kar 05	+	-	NT	Ser 20	+	+	NT
Mal 02	+	+	NT	Ser 21	+	+	-
Mal 03	+	-	NT	Ser 22	+	+	-
Mal 05	+	+	-	Ser 23	+	+	-
Mal 06	-	NT	NT	Ser 24	+	+	-
Mil 01	+	+	-	Ser 26	+	+	-
Mil 02	+	+	-	Ser 27	+	+	NT
Mil 03	+	+	-	Ser 28	+	+	-
Mil 04	+	+	NT	Ser 29	+	+	-
Mil 05	+	+	-	Ser 30	+	+	-

* : témoins négatifs,
NT : non testés.

Parmi les 70 autres souches pour lesquelles l'amplification a réussi, 69 présentent un profil comprenant un fragment d'amplification d'une taille équivalente à 650 pb pour la série n° 1 et 160 pb pour la série n° 2. Ces tailles sont conformes, respectivement pour chacune des 2 amplifications, aux tailles calculées à partir de la séquence de la souche CeD de référence (Annexe 7). Il apparaît parfois sur les gel de contrôle d'amplification, un deuxième fragment de taille plus petite. Ce deuxième fragment inconstant, est un sous produit de l'amplification. La souche Die 02 est la seule souche de *Frankia* à présenter un profil d'amplification différent de ce qui est attendu pour la série n° 1 (amorces n° 24 et 5). En effet, la portion d'ADN de cette souche qu'il a été possible d'amplifier, a une taille de 300 pb (au lieu des 650 pb attendus). Pour la série n° 2 (amorces n° 6 et 5) le fragment obtenu après amplification avec l'ADN de la souche Die 02, est d'une taille identique au fragment calculé à partir de la séquence de la souche CeD de référence.

La planche 1, photo. 2, présente quelques exemples de profils d'amplification illustrant les résultats obtenus.

1.2 - Hybridation de l'ADN amplifié de chaque souche avec les sondes n° 27 et 28 :

En conditions non radioactives, trois températures de bain de préhybridation et d'hybridation furent testées : 37 °C, 40 °C et 45 °C. Après examen des filtres, il apparaît que la température des bains permettant la résolution la plus fine est 40 °C puisque les hybridations obtenues sont facilement observables sans avoir de "bruit de fond" comme à 37 °C et qu'à 45 °C aucune hybridation n'a été possible. Ce sont donc les résultats obtenus avec une température de bains de préhybridation et d'hybridation de 40 °C qui ont été reportés dans le Tableau 9.

Parmi les 70 souches dont l'ADN a pu être amplifié au niveau du gène *nif* (cf Tableau 9) :

- 1 présente un signal d'hybridation négatif avec la sonde n° 27 (radioactive ou non radioactive) et positif avec la sonde n° 28, c'est la souche "atypique" D 11 de référence,
- 65 présentent un signal d'hybridation positif avec la sonde n° 27 (radioactive ou non radioactive) et négatif avec la sonde n° 28,
- 4 présentent un signal d'hybridation négatif avec la sonde n° 27 (radioactive ou non radioactive) et négatif avec la sonde n° 28, ce sont les souches Die 02, Mal 03, Kar 03 et Kar 05.

➔ Synthèse des résultats concernant l'étude d'hybridation : (ADN des souches - sondes n° 27 et 28)

Pour toutes les souches dont l'ADN extrait a pu être amplifié, il ressort que :

- ☞ aucune des deux sondes n° 27 et 28 n'hybride avec l'ADN d'une même souche ;
- ☞ les seuls extraits d'ADN testés hybridant avec la sonde n° 28 sont ceux de la souche "atypique" de référence, D 11 ;
- ☞ dans chaque série, il n'y a pas de contradiction entre les résultats obtenus pour une même souche avec les sondes radioactive ou non radioactive ;
- ☞ la souche Die 02 présente un fragment d'ADN amplifié, avec le lot d'amorces n° 24 et 5, d'une taille différente de celle calculée avec la séquence de la souche CeD de référence,
- ☞ aucune hybridation n'a été possible avec l'ADN amplifié des 4 souches : Die 02, Mal 03, Kar 03 et Kar 05 ;
- ☞ l'ADN de la souche "atypique" de référence exclue, la presque totalité des ADN des souches testées (65/69), présentent un signal d'hybridation positif avec la sonde n° 27.

2 - Etude du Polymorphisme de la Longueur des Fragments de Restriction (RFLP) :

Pour cette expérimentation, deux lots de nodules obtenus lors de l'étude du spectre d'hôte des souches de *Frankia* (cf Partie n° 2, § 2 - Spectre d'hôte de souches de *Frankia*), ont été utilisés comme matériel de base en plus des cultures pures habituelles. Ces lots choisis pour leur état de fraîcheur apparent parmi les 9 récoltés, sont : Ser 10 no et Ser 21 no.

2.1 - Amplification en chaîne par polymérase :

L'ADN extrait des souches en culture pure ou nodules a été visualisé sur gel de contrôle et amplifié de façon standard (1 cycle d'amplification = 1 min à 93 °C + 1 min à 55 °C + 1 min à 72 °C, à l'aide de l'amplificateur Techne PHC2) avec les amorces n° 51 et 38.

Pour certaines souches de *Frankia*, les produits d'amplification obtenus ont été conformes à ceux attendus, à savoir : 1 fragment unique de 562 pb (déterminé d'après la séquence de la souche CeD, cf annexe 7 a).

Pour d'autres souches de *Frankia*, des sous-produits d'amplification sont également détectés lors de ces amplifications standards. Afin d'éliminer ces sous-produits, de nouvelles amplifications ont été réalisées en condition de stringence plus élevée, à savoir une température d'hybridation de 57 °C au lieu de 55 °C en présence de concentrations en dNTPs de 0,5 ou 0,1 µM. Le temps d'étirement, ou temps de synthèse, a aussi été doublé dans certain cas, passant de 1 à 2 min. Ces différentes conditions nous ont permis d'obtenir le fragment unique de 562 pb pour 63 souches de *Frankia* parmi les 84 souches testées.

Parmi les 21 autres souches, 16 souches continuent de présenter des profils d'amplification comprenant plusieurs fragments, ce malgré les différents essais d'amplification réalisés. Trois de ces 16 souches présentent un profil d'amplification comprenant 2 fragments dont l'un a une taille de 562 pb et l'autre une taille différente selon la souche considérée. Les 13 autres souches présentent un profil d'amplification comprenant plusieurs fragments dont les tailles sont toutes différents de 562 pb.

Enfin, aucune amplification n'a été possible à partir des extraits d'ADN des 6 souches Kar 02, Kar 03, Kar 04, Ser 23, Ser 28, Ser 30 et des nodules Ser 10 no. Ceci malgré plusieurs essais qui ont été effectués avec des quantités d'ADN extrait, purifié ou non, allant de 1 à 2,5 µl et sous différentes conditions d'expérimentation.

Les résultats des amplifications de l'ADN des souches de *Frankia*, sont récapitulés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Profils d'amplification et de restriction des souches de *Frankia*

Souches utilisées	Taille des fragments en nombre de paires de bases, obtenus après : amplification (51-38)	digestion par l'endonucléase Nci I	Groupe /Nci I
<i>A</i>	562	186 + 174 + 143 + 56 + 3 α	1
<i>B</i>	562	472 + 90	2
Ban 04	562 + 342	(profil de restriction identique à <i>A</i>) + 342	3
Ban 05	562 + 451	(profil de restriction identique à <i>A</i>) + 451	3
Ban 06	562 + 369	(profil de restriction identique à <i>A</i>) + 369	3
Ser 05	562	562	4
Ser 19	562	562	4
Tio 02 ^b	562	246 + 144	4
Ban 02	451 + 375*	451	4
Ban 03	369	369	4
Ban 07 ^a	603 + 492 + 369	677 + 603 + 492 + 474 + 381 + 369 + 349	4
Die 01	344	344	4
Die 02 ^b	700 + 600	(rien de visible n'apparaît sur le gel)	4
Kar 01	290**	1 bande à 310 + 1 bande à 290	4
Kar 05 ^a	410 + 342	700 + 615 + 410 + 342 + 276 + 228 + 146 + 123	4
Mal 01	469	469	4
Mal 02	469	469	4
Mal 03	800 + 469	800 + 469	4
Mal 06	600	310 + 290	4
Mil 05	402	402	4
Sam 01 ^a	369	451 + 410 + 369	4

Légende :

A : Ban 01, de Ban 08 à Ban 13, Die 03, Die 06, Dji 01 à Dji 04, Dji 06, Mal 05, Mil 01, Mil 03, Mil 04, de Mil 06 à Mil 13, Saw 01, de Ser 01 à Ser 04, Ser 06, Ser 07, de Ser 09 à Ser 22, Ser 24, Ser 26, Ser 27, Ser 29, E 03, M 02, Cj, CeF et CeD ;

B : D 11, G 02 et Ser 21 no ;

a : il y a eu 5 μ l de solution d'ADN amplifié déposée dans le puit du gel de contrôle d'amplification et 8 μ l pour le gel d'après digestion, ce qui peut expliquer la présence de fragments supplémentaires dans le 2^{ième} cas ;

b : la quantité d'ADN amplifié présente dans le dépôt pour le gel d'après digestion n'a pas été suffisante pour permettre une résolution parfaite du profil de restriction de la souche considérée ;

***** : l'absence de ce fragment sous quel que forme que ce soit sur le gel d'après digestion est due à une trop faible quantité d'ADN amplifié mis à migrer ;

****** : large bande s'étalant jusqu'à 310, l'échelle utilisée ne permet pas de meilleure résolution ;

α : impossible à visualiser sur le type de gel utilisé du fait de sa taille, l'analyse des profils se fait seulement à partir des 4 fragments les plus grands en taille ;

(1,2,3,4,ND) : groupes de profils de restriction obtenus après digestion par l'endonucléase Nci I :

1 : profil général le plus répandu correspondant à celui de la souche CeD,

2 : profil particulier conforme aux souches reconnues comme atypiques,

3 : profil de type groupe 1 avec une bande supplémentaire,

4 : profil différents de ceux des groupes n°1, 2 ou 3.

2.2 - Restrictions enzymatiques-RFLP :

2.2.1 - Choix des matériels employés :

C'est en fonction de la séquence de la zone ITS de la souche CeD que 4 endonucléases disponibles sur le marché ont été choisies pour leurs possibilités de clivage de cette partie de génome et les profils électrophorétiques qui en découlent (Fig. 6 a et b). Ces endonucléases sont : Cfo I, Hae III, Msp I et Nci I.

Des digestions à l'aide de chacune des endonucléases choisies ont été faites avec des souches de provenance géographique et de spectre d'hôte différents : Ban 01, Ban 08, Ban 13, Dji 03, Cj, CeF, D 11, Eu11b et ACN1^{AG} (cf Annexe 3), ceci dans le but de trouver celles qui permettraient leur meilleure différenciation. Deux catégories de réponses ont été observées sur gel d'agarose à 4 % suivant l'endonucléase utilisée :

- . Hae III et Cfo I : aucune différence n'apparaît entre les profils des souches testées

- . Msp I et Nci I : des différences apparaissent entre les profils des souches testées

Il apparaît donc que seuls les enzymes Msp I et Nci I parmi ceux choisis, sont intéressants pour la discrimination des souches étudiées et une étude plus approfondie des profils issus de ces clivages montra que ces deux endonucléases, même si elles ne génèrent pas les mêmes profils, avaient un pouvoir discriminatoire identique par rapport au fragment d'ADN amplifié étudié. L'endonucléase Nci I fut alors choisie comme enzyme de restriction pour la suite de l'étude, car elle génère moins de coupures sur la portion d'ADN amplifiée étudiée que Msp I, ce qui se traduit sur les profils par l'apparition d'un nombre de bandes inférieur et facilite donc l'interprétation des gels.

Deux types de gel, gel d'agarose à 4 % et gel de polyacrylamide à 8 %, ont été testés pour les électrophorèses après clivage du fragment d'ADN amplifié. Les résultats obtenus dans les deux cas étant similaires, c'est le gel d'agarose à 4 % qui a été retenu pour la suite du travail car moins contraignant dans sa fabrication et plus facile d'emploi que le gel de polyacrylamide à 8 %.

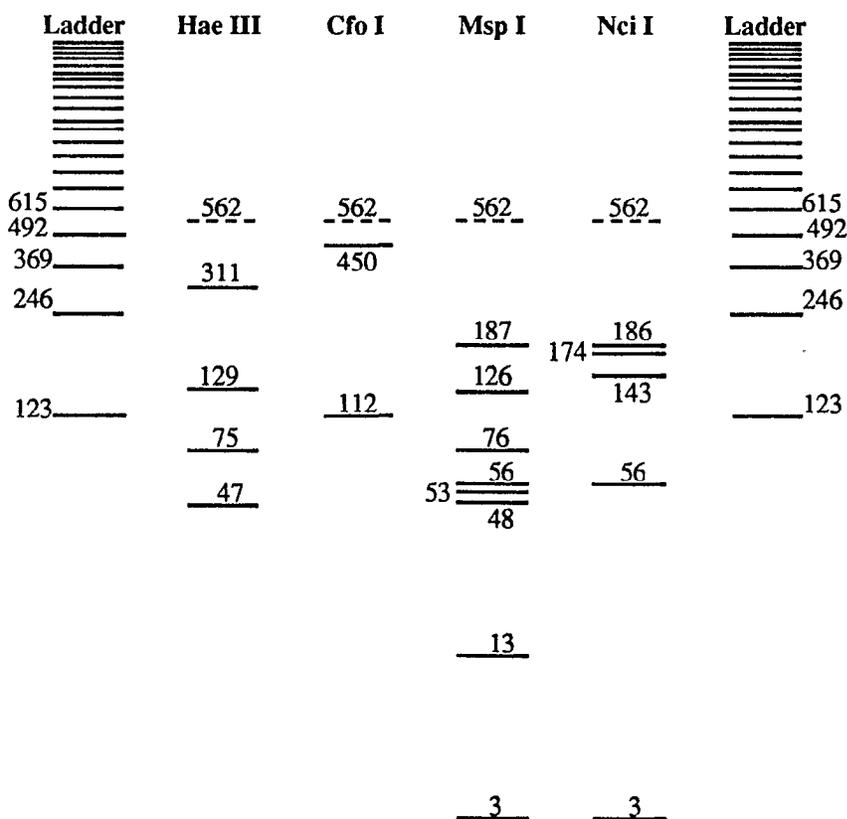
Fig. 6 : Sites de clivage des endonucléases Hae III, Cfo I, Msp I et Nci I sur la portion amplifiée (51-38) du génome de la souche CeD :

a - Les sites de coupure dans la portion amplifiée (51-38) suivant l'endonucléase employée :

2246*
 [GGCTGGATCACCTCCTTTCT)⁵¹]16S AAGGAGCGTCTGGCTGGTCTGTCTGTAGTGGGGTGGGCT
 GGTGCAGAGCCAGGG/¹C/³CGGCTGTGGATGC/³CGGTCTGGTTGCTCGTGGGTGGAACGCTGAC
 GATGGGGTTTCGGCTGGTTGTC/³C/⁴GGGGTCTAGTACTCCTCTGTCTTATCTTCGGGTGGGGTG
 GGGGTGGAACGGTC/³C/⁴GGGTGGGTGGCTGGGGTCCGTGGCACGCTGTTGGGTCTGAGGGAG
 TGAGGCTCTCTCGGCTGGTGGGTTCTGTGCTGTGGTCTGGTGGGGATCGTGGTGGGGGGTCTG
 CTGGTGGAAACGGAC/³CGGTCTGGTGGAGGACTGCCTTCCCGTTGGGTGGGGTGGGTTTCGC/³
 C/⁴GGGTCCGGCTGGGG/¹CCGTCCGTACGTTGAGAACTGCACAGTGGACGCGAGCATCTTTGT[^{23S}
 GG/¹CCAAGTTATTAAGGGCG/²CACGGTGGATGCCTTGGCACCAGGAGCCGATGAAGGACGTGG
 GAGGCTGCGATATGCCTCGGGGAGCTGTCAACCGAGCTGTGATCCGAGGATTT(CCGAATGGGAA
 ACC/^{3&4}CGG)³⁸
 2700*

Légende : . les positions des amorces et des gènes : 51 pour l'amorce n° 51 ; 16S pour la fin du gène 16S ; 23S pour le début du gène 23S ; 38 pour l'amorce n° 38,
 . les sites de clivage : 1 pour Hae III, 2 pour Cfo I, 3 pour Msp I et 4 pour Nci I,
 . * : position de la séquence décrite dans le génome de la souche ORS 020606.

b - Les différents profils de restriction selon l'endonucléase utilisée :

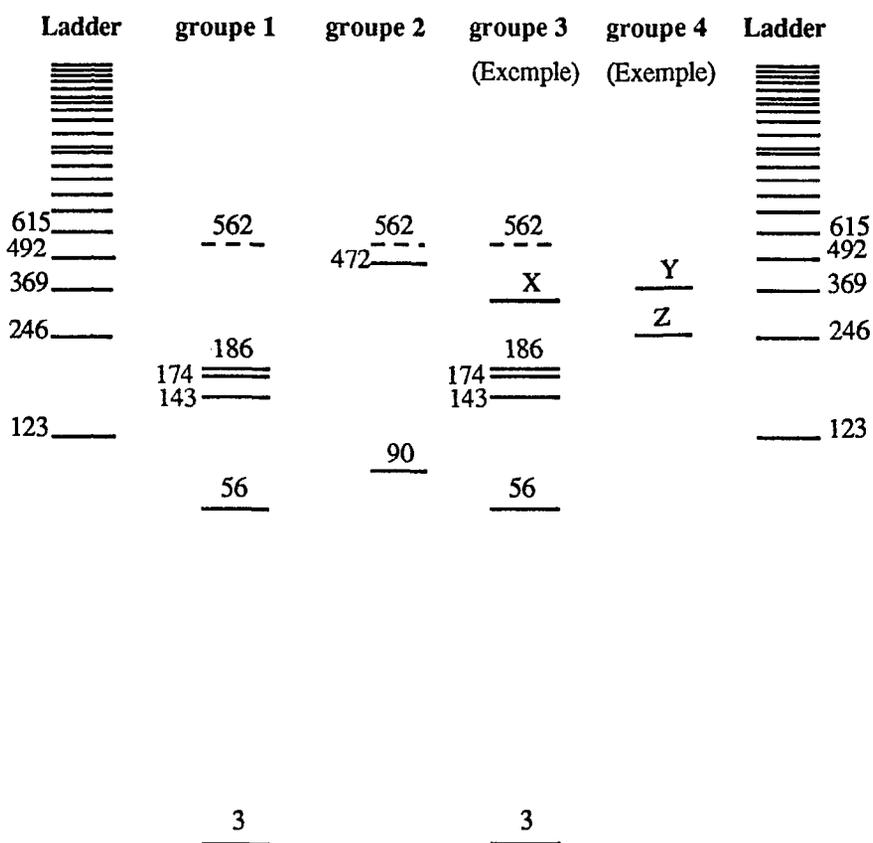


Légende : . les nombres indiqués correspondent à la taille en paire de bases (pb) des fragments de restriction obtenus,
 . la bande en pointillés de 562 pb indique la position correspondante au poids du fragment d'ADN amplifié initial (non digéré par l'endonucléase)

2.2.2 - Résultats obtenus avec l'enzyme Nci I :

Les résultats obtenus avec l'enzyme Nci I permettent de différencier en 4 groupes les profils de restriction de tous les extraits d'ADN des 78 souches de *Frankia* dont l'amplification avec le lot d'amorces (51-38) a été possible. Les profils de restriction sont par groupe, schématisés Fig. 7 et décrits dans le tableau 10.

Fig. 7 : Schémas des différents profils de restriction obtenus avec l'endonucléase Nci I



Légende :

- . les nombres indiqués correspondent au poids en paire de bases (pb) des bandes,
- . la bande en pointillés de 562 pb indique la position correspondante au poids du fragment d'ADN amplifié initial (non digéré par l'endonucléase),
- . X, Y et Z pouvant être différents en poids (pb) selon les souches considérées,
- . groupe n° 1 : profils identiques à celui de la souche de référence CeD, groupe n° 2 : profils des souches dites "atypiques", groupe n° 3 et 4 : exemples types de profils autres.

Les 4 groupes de restriction se répartissent comme suit :

- groupe n° 1 : constitué des profils de restriction tous identiques à celui de la souche CeD qui a servi de référence présentant 5 fragments,
- groupe n° 2 : constitué de profils de restriction tous identiques, présentant 2 fragments, comprenant les souches dites "atypiques",
- groupe n° 3 : constitué de profils de restriction comprenant 6 fragments dont 5 de la même taille (pb) que ceux trouvés dans le profil de la souche CeD et 1 supplémentaire de taille (pb) variable suivant la souche considérée,
- groupe n° 4 : constitué de profils de restriction tous non semblables à ceux des groupes n° 1, 2 ou 3, variant suivant la souche considérée. Ce groupe peut être lui même subdivisé en 2 sous-groupes : le sous-groupe de 2 souches dont l'ADN amplifié a bien été clivé sous l'action de l'endonucléase Nci I et le sous-groupe de 13 souches pour lesquelles la digestion enzymatique a été inefficace.

Pour chacune des 3 souches (Ban 04, Ban 05 et Ban 06) du groupe de restriction n° 3, la bande observée au gel de contrôle d'amplification, autre que celle équivalente à 562 pb n'a pas été digérée par l'enzyme Nci I et se retrouve intacte sur les gels d'après digestion enzymatique.

Il apparaît dans le tableau 10 que les ADN extraits et amplifiés de la souche Ser 21 en culture et des nodules Ser 21 n'ont pas les mêmes profils de restriction avec l'enzyme Nci I.

Exceptés les 7 souches Kar 02, Kar 03, Kar 04, Ser 23, Ser 28, Ser 30 et Ser 10 no, pour lesquelles l'amplification à l'aide du lot d'amorces (51-38) a été inefficace, ce qui a abouti à l'impossibilité de déterminer leur profil de restriction, il existe entre les résultats obtenus après amplification et les groupes de restriction enzymatique une certaine cohérence.

- La presque totalité des 63 souches dont le profil d'amplification comprend un fragment de 562 pb, sont réparties après action de l'endonucléase Nci I, dans les groupes de restriction n° 1 et 2. Seules 5 souches sur les 63 concernées, se retrouvent dans le groupe de restriction n° 4. Ces dernières sont :

- . Dji 05 et Mil 02 dont les profils n'ont pu être déterminés ;
- . Ser 05 et Ser 19 dont l'ADN amplifié n'a été clivé par l'enzyme Nci I ;
- . et Tio 02 dont le profil est différent de ceux des groupes de restriction n° 1 ou 2.

- Les 3 souches dont le profil d'amplification comprend 2 fragments dont un a une taille de 562 pb, se retrouvent toutes dans le groupe de restriction n° 3. Elles ne divergent de celles du groupe de restriction n° 1, respectivement pour chaque souche que par la réapparition sur leur profil de restriction du même fragment supplémentaire à celui de 562 pb déjà repérée sur profil d'amplification.

- Les 13 souches dont le profil d'amplification comprend un ou des fragments, tous différents de 562 pb, se retrouvent dans le groupe de restriction n° 4.

➔ Synthèse des résultats concernant les RFLP :

Cette étude nous a permis d'établir :

☞ 4 groupes de restriction :

- . groupe n° 1 : regroupant les souches dont les profils de restriction sont identiques à celui de la souche "typique" de référence CeD ;
- . groupe n° 2 : regroupant les souches dont les profils de restriction sont identiques à celui de la souche de référence "atypique" D 11 ;
- . groupe n° 3 : regroupant les souches dont les profils de restriction ne sont pas tous identiques entre eux, mais comportent tous en plus d'une bande qui leur est particulière, les bandes du profil de la souche de référence CeD ;
- . groupe n° 4 : regroupant les souches dont les profils de restriction sont différents de ceux des souches de référence CeD et D 11, et non tous identiques entre eux ;

☞ qu'à partir des ADN extraits des cultures pures, aucune souche nouvellement isolée n'a un profil de restriction identique à celui de la souche "atypique" de référence, D 11 ;

☞ que le profil de restriction obtenu à partir de l'ADN extrait des nodules Ser 21 no, est identique à celui de la souche "atypique" de référence, D 11, contrairement au profil obtenu à partir de l'ADN extrait de la souche en culture pure Ser 21 qui est identique à celui de la souche "typique" de référence, CeD.

Discussion

1 - Amplification en chaîne par polymérase :

La PCR comporte deux risques qui sont à prendre en considération dans l'analyse de résultats obtenus après une amplification en chaîne par polymérase.

a - Le premier est lié à la contamination de la solution d'ADN extrait par ne serait-ce qu'un fragment d'ADN étranger à la manipulation en cours, se traduisant par l'apparition de "faux positifs" ou amplification d'un fragment d'ADN non désiré (Agut et Huriaux, 1990 ; Kitchin et al., 1990). C'est pourquoi toutes les précautions ont été prises lors de la manipulation (port de gants, manipulation sous hotte avec stérilisation aux U.V. de l'atmosphère de la hotte et de tout l'outillage utilisé, cf Partie n° 3, Matériel et Méthodes, § n° 3.3), et l'amplification d'ADN extrait de nodules a été faite à partir d'extraits réalisés avec des nodules lavés et pelés. Ceci permet d'éviter une contamination de ces extraits par de l'ADN extérieur, accolé à la surface des nodules.

Sur les gels de contrôle des souches Ser 20 et Ser 27, aucune trace d'ADN extrait n'apparaît. Cette observation est en contradiction avec les résultats obtenus après amplifications avec le lot d'amorces (6-5) (cf annexe 9). Deux interprétations sont possibles. Le résultat d'amplification est soit un "vrai positif", soit un "faux positif".

. Dans le cas du "vrai positif", l'absence de trace visible d'ADN sur les gels de contrôle s'explique par un mauvais pouvoir de résolution de ceux-ci.

. Dans le cas du "faux positif", il y a du avoir contamination de l'échantillon par un ADN extérieur.

La non contamination des témoins négatifs donne de la crédibilité au choix que nous avons fait en considérant ces résultats comme de "vrais positifs".

b - Le deuxième risque évoque quant à lui, la présence dans les résultats de "faux négatifs" (Agut et Huriaux, 1990), constat d'échec de l'amplification alors que la séquence "ciblée" est présente dans le génome exploré. L'efficacité de la réaction d'amplification est sujette à de nombreuses variations en fonction de plusieurs facteurs comme la quantité d'ADN initialement présente, la concentration en dNTPs, la paire d'amorces utilisées ou la présence d'inhibiteurs non spécifiques dans les extraits. Ces variations peuvent altérer la reproductibilité de certains résultats. Nous avons pu le vérifier au cours de nos manipulations lors de l'apparition de multiples bandes ou fragments dans les profils d'amplification de certaines souches.

Les problèmes liés à la quantité insuffisante d'ADN initialement présent et à la présence d'inhibiteurs non spécifiques dans les extraits, peuvent être réglés par une étape supplémentaire de purification de la solution d'extraits. Ce qui n'a été en général pas nécessaire au cours de nos expérimentations.

Deux autres explications possibles de la présence de "faux négatif" sont liées à la variabilité génomique de *Frankia* ou à une altération de son ADN, survenue lors de la phase

d'extraction, pouvant conduire à l'absence d'amplification par défaut d'appariement amorce-ADN. Cette absence d'appariement ou la possibilité que la séquence recherchée ne soit pas présente dans l'ADN des souches testées, peuvent l'une ou l'autre expliquer les résultats négatifs observés.

Pour éviter les faux négatifs, nous avons procédé comme suit :

- Nous avons utilisé comme site-amorce des portions de génome stables. Les amorces utilisées pour l'étude concernant la région *nif* HD, correspondent à des portions de séquences conservées de cette région. Cette région du génome de *Frankia* est elle même reconnue comme conservée, particulièrement pour le *Frankia* isolé à partir de nodule de *Casuarina equisetifolia* (Simonet et Nazaret, communication personnelle). De même, les amorces utilisées pour l'amplification de la région ITS du génome de *Frankia*, appartenant l'une à la portion 16S et l'autre à la portion 23S du gène *rrn* de ce génome, correspondent à des portions de séquences conservées pour le *Frankia* de *Casuarina* (Fernandez et al., 1990)

- L'extraction de l'ADN de *Frankia*, tout en restant simple d'emploi et rapide, doit cependant ne pas être trop brutale et être ménagée. Les différentes techniques, enzymatiques ou mécaniques qui permettent d'extraire de l'ADN soit de cultures pures de *Frankia*, soit de nodules de plantes actinorhiziennes, sont sujettes à des contraintes (précautions à prendre et des délais de réalisation assez importants). La technique d'extraction par sonication que nous avons mis au point pour nos travaux, n'est sujette à aucune précaution particulière et permet rapidement l'extraction d'ADN de *Frankia* aussi bien à partir de cultures pures que de nodules. De plus, dans l'ensemble les résultats obtenus aux différentes amplifications que nous avons tentées, permettent d'affirmer que la technique d'extraction de l'ADN par sonication, rapide et facile d'emploi, est assez ménagée pour garantir à cet ADN une qualité suffisante. La notion de qualité des ADN extraits qui apparaît là, est relative à l'amplification en chaîne par polymérase qui suit, la portion d'ADN intéressée par l'amplification devant être non détériorée ou endommagée par l'extraction.

La reproductibilité de l'amplification et le fait que les témoins négatifs ou positifs, soient négatifs ou positifs en fin d'expérimentation, assurent une relative fiabilité aux résultats vis-à-vis de cette technique.

2 - Hybridation avec les sondes n° 27 et 28 :

Le résultat indiquant que la quasi totalité de l'ADN des souches testées (65/69) hybrident avec la sonde n° 27 (cf Tableau 9), conforte l'idée qu'il existe une homologie importante entre les ADN de *Frankia* de *Casuarina* (Normand et al., 1988 ; Fernandez et al., 1989) et ce plus particulièrement au niveau de la séquence intergène *nif* H-*nif* D des souches dites "typiques" (Nazaret, 1991). Les trois autres signaux d'hybridation négatifs obtenus avec

cette sonde n° 27 et l'ADN amplifié de chacune des souches Die 02, Kar 05 et Mal 03, toutes reconnues infectives sur *C.equisetifolia* (cf Partie 2, § 1), permettent de mettre en évidence l'existence de souches différentes des autres "typiques" par rapport à cette portion d'ADN (début intergène *nif H-nif D*) et donc une hétérogénéité au sein des souches de *Frankia* infectives sur *Casuarina*. Le caractère exceptionnel de ces résultats négatifs par rapport à l'ensemble des résultats obtenus à la fin de cette expérimentation et par rapport à d'autres travaux mettant en évidence une grande conservation de la séquence de l'intergène *nif H-nif D* pour les souches de *Frankia* "typiques" de *Casuarina* (Nazaret, 1991), nous permet d'émettre l'hypothèse qu'il s'agit peut-être là, de 3 souches qui ne seraient pas rattachables à l'espèce génomique de *Frankia* n° 9 (Fernandez et al., 1989). D'autres travaux sont à entreprendre afin de mieux déterminer la place de ces 3 souches dans la classification des actinomycètes.

La souche Kar 03 qui a aussi un signal d'hybridation négatif avec la sonde n° 27, n'est pas prise en compte dans cette discussion car son infectivité vis-à-vis de plants de *C.equisetifolia* n'a pas été testée.

La cohérence entre les résultats du test d'infectivité (Partie 2, § 1) et ceux obtenus ici, démontre bien la spécificité de la sonde n° 27 vis-à-vis des souches de *Frankia* de *Casuarina* "typiques".

Le fait qu'il soit impossible pour l'ADN d'une souche, de s'hybrider avec chacune des deux sondes n° 27 et 28, prouve qu'il y a bien au moins deux types distincts de souches de *Frankia* au sein du groupe des *Frankia* isolés de nodules de *Casuarina equisetifolia*. Ce résultat démontre aussi la spécificité de ces 2 sondes, la sonde n° 27 spécifique des souches "typiques" et la sonde n° 28 spécifique de la souche "atypique" D 11.

Pour cette expérimentation, nous avons mis en œuvre deux techniques de marquage des sondes (cf Matériel et méthodes, Partie 3, § 3.4). Les résultats obtenus avec des sondes marquées de manière non radioactive et ceux obtenus plus classiquement, avec des sondes marquées de manière radioactive, concordent parfaitement. Ceci prouve la fiabilité de la technique mettant en œuvre les sondes non radioactives. Cette technique étant moins contraignante que celle mettant en œuvre les sondes radioactives, elle est préconisée pour tous les tests de type épidémiologique.

3 - Etude des profils de restriction :

Excepté le groupe de souches dont le profil d'amplification comporte un seul fragment équivalent à 562 pb, il y a une parfaite corrélation dans les résultats obtenus de la phase d'amplification à la phase de restriction enzymatique, suivant les conditions déterminées

pour l'expérience. L'analyse préalable des profils d'amplification se révèle donc être là un précieux travail d'approche.

L'apport supplémentaire d'informations par l'action de l'endonucléase Nci I sur le fragment amplifié (51-38), permet de caractériser les souches des groupes de restriction n° 3 et 4 et de distinguer les souches dites "typiques" des souches dites "atypiques".

Cette étude étant faite à partir d'un groupe de *Frankia* reconnu très homogène du point de vue génomique (hybridation ADN-ADN) (Fernandez et al., 1990), la variabilité atteinte ici doit concerner un niveau de variabilité infra-spécifique, voir de type individuelle.

Le pouvoir discriminant de la technique préconisée ici, peut être considérablement amélioré soit par l'emploi de sondes spécifiques, soit par l'emploi de plusieurs endonucléases. L'utilisation d'un jeu d'endonucléases, choisies de manière à générer un nombre de coupures le plus élevé possible sur la portion de séquence étudiée, pouvant être à l'extrême assimilable à une technique de séquençage.

Les résultats obtenus à partir de l'ADN amplifié extrait d'une culture de la souche Ser 21 et ceux obtenus à partir de l'ADN amplifié extrait de nodules obtenus sur des racines d'*Hippophæ rhamnoides* après inoculation avec cette même souche sont contradictoires. Le profil de la souche Ser 21 (culture pure) est identique à celui de la souche CeD, "typique" (groupe de restriction n° 1) alors que le profil Ser 21 no (ADN extrait de nodules d'*H. rhamnoides*) est identique à un profil "atypique" (groupe de restriction n° 2). Ces profils sont différents au niveau d'au moins trois sites de clivage, puisque pour le groupe de restriction n° 1 nous avons un profil à 5 fragments, alors que pour le groupe de restriction n° 2 il n'y en a que 2. Ceci implique qu'il y ait eu au moins donc, trois mutations simultanées sur cette courte portion de génome étudiée, ce qui est peu probable. Nous sommes donc en présence de 2 souches de *Frankia* différentes. Ceci pose les problèmes de pureté des cultures, de co-infection ou contamination de l'expérience par un *Frankia* externe infectif vis-à-vis d'*H. rhamnoides* (sujet déjà traité dans la discussion de la Partie 2).

La combinaison amplification par PCR d'un fragment ciblé d'ADN et étude du profil de restriction de ce fragment amplifié après digestion enzymatique, se révèle être un très bon outil de dépistage et caractérisation de microorganismes issus de cultures pures ou "pêchés" en milieu naturel. Le dépistage se fait en choisissant une amplification spécifique et la caractérisation, par l'étude des profils de restriction obtenus avec une ou des endonucléases choisies.

Partie 4
Caractérisation de *Frankia*
par des méthodes biochimiques

Introduction

L'exploration de la diversité génétique des souches de *Frankia*, peut être envisagée par une approche plus biochimique. Les résultats déjà acquis à l'issue des caractérisations faites par test d'infectivité-effectivité et par analyse des fragments de restriction, peuvent être confirmés ou complétés par cette autre voie d'approche et c'est ce que nous nous proposons de faire ici.

Il existe aujourd'hui différentes méthodes biochimiques de caractérisation de souches bactériennes. Ces méthodes consistent à étudier les glucides, lipides ou protéines, membranaires ou cytoplasmiques, de ces microorganismes. Ces composés correspondent à l'expression des gènes structuraux et régulateurs du génome de l'organisme étudié et peuvent donner des informations plus précises que celles obtenues par l'hybridation ADN-ADN (Selander et al., 1986).

L'étude de profils électrophorétiques des protéines cellulaires est reconnue depuis longtemps comme un outil fiable et fin en systématique microbienne ou épidémiologie (Garber et Ribbon, 1968 ; Kersters et De Ley, 1980 ; Jackman, 1985). La quantité considérable d'informations qu'il est possible d'atteindre par cette voie d'étude, permet de classer les microorganismes entre eux jusqu'à des niveaux infra-spécifiques. En outre, les classifications d'espèces obtenues par cette méthode sont conformes avec celles basées sur l'homologie des séquences d'ADN entre microorganismes qui sert de référence pour la définition d'espèces génomiques (Kersters, 1985).

Deux différentes approches d'études électrophorétiques de protéines sont employées en taxonomie bactérienne (Kersters, 1985) :

- approche par étude des protéines dites "totales" : électrophorèse en gel de polyacrylamide d'un extrait cellulaire de protéines solubles ou solubilisées par traitement au SDS (Sodium DodecylSulfate), avec une coloration permettant de faire apparaître toutes les protéines contenues dans l'extrait, sans autre distinction possible que celles du pouvoir relatif de migration et intensité relative d'expression pour chacune d'elle ;

- approche par étude particulière d'un ou plusieurs enzymes : électrophorèse en gel d'amidon ou d'agarose ou de polyacrylamide ou de polyacrylamide-agarose, d'un extrait cellulaire de protéines, soumis à une coloration spécifique d'un enzyme choisi.

Si l'analyse des profils électrophorétiques est plus simple dans la deuxième approche du fait de l'expression de moins de bandes sur un même gel, elle n'a de valeur taxonomique que si un grand nombre d'enzymes spécifiques et différents sont étudiés (Baptist et al., 1969, 1971).

Les études d'estimation de la diversité génétique et de la structure de populations naturelles d'une espèce bactérienne, peuvent être abordées en utilisant comme technique de base les électrophorèses d'enzymes multiples (Selander et al., 1986). Les estimations de distances génétiques basées sur les électrophorèses d'enzyme multiples sont étroitement corrélées avec les estimations de divergences mesurées par hybridation, existantes dans les séquences nucléotidiques (Ochman et al., 1983 ; Selander et al., 1985). Les études électrophorétiques

d'enzymes présentent l'avantage de pouvoir directement corréler les variations de mobilité observées sur un gel, aux variations alléliques d'un gène spécifique codant spécifiquement pour une protéine (Selander et al., 1986).

Les oxydoréductases (dont les déshydrogénases), les transférases, les hydrolases (dont les estérases et phosphatases), les lyases et les isomérases sont les systèmes enzymatiques couramment utilisés dans les études de systématique ou d'épidémiologie bactérienne (Selander et al., 1986).

Le choix que nous avons fait dans notre travail, consiste à étudier les profils électrophorétiques d'estérases, de déshydrogénases, d'une phosphatase et de peroxydases. Il se justifie d'une part, par la facilité de lecture des gels électrophorétiques d'enzymes et d'autre part, par le nombre déjà conséquent d'enzymes que cela représente (12 au total), tous ayant une valeur de marqueur biochimique reconnue (Goulet, P., 1973 ; Goulet et Picard, 1980a, 1980b, 1981, 1984, 1985, 1986a, 1986b, 1987a, 1987b, 1988, 1989 ; Selander et al., 1986 ; Szécsi et Toth, 1986 ; Gardes et al., 1987 ; Engvild et al., 1990).

Matériel et méthodes

1 - Souches de *Frankia* étudiées dans cette partie du travail :

(Voir Parties 1 et 2)

2.- Culture des souches de *Frankia* :

(Voir Partie 1)

3 - Caractérisation des souches de *Frankia* par analyse du polymorphisme électrophorétique des enzymes :

3.1 - Protocole d'extraction de protéines solubles de *Frankia* :

Après rinçage abondant avec de l'eau distillée stérile, la culture est récupérée par filtration sur papier Whatman GF/F et séchée sur papier buvard avant d'être pesée. La matière fraîche de culture ainsi obtenue est récupérée dans un microtube, 1,5 ml de tampon de lyse/g de poids frais (tampon de lyse : 20 mM TRIS-HCl pH 7,5, 100 mM KCl, 5 % glycérol) y sont rajoutés. Le tout est soniqué en ambiance froide à une fréquence de 60 % durant 8 minutes à 10 % de la puissance de l'appareil (Branson Sonifier 250) puis centrifugé (Beckman J2 21 ME, rotor : JA 18-1) à 30 000 G durant 1 heure à 4 °C. Les protéines cellulaires de la culture de *Frankia* se trouvent dans le surnageant.

La conservation à -80 °C se fait après addition de 5 % de glycérol au volume de surnageant.

3.2 - Dosage des protéines extraites des cultures de *Frankia* :

Le titre des protéines est déterminé en utilisant la technique de Bradford (1976) : la prise d'essai d'échantillon (5 µl) est complétée avec 600 µl de tampon TRIS salin (0,05 M, NaCl 0,15, M pH 7) et 200 µl de réactif de Bradford (Bio-Rad, USA). Après agitation, la densité optique à 595 nm de la solution est lue et la concentration en protéines déduite de la courbe tracée pour une gamme étalon 12,5-50 µg de protéines (albumine de sérum de bœuf, Sigma).

3.3 - Electrophorèse en gel d'acrylamide-agarose :

Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel d'acrylamide-agarose (7 % d'acrylamide w/v) en plaque (200x150x3 mm³), à une dimension en conditions non dénaturantes et en position horizontale (Uriel, 1966).

Composition du gel :

Une solution d'agarose (1,2 g d'agarose, qsp 75 ml avec de l'eau distillée, autoclavage à 115 °C durant 15 min) et une solution d'acrylamide (10,5 g d'acrylamide, 0,273 g de bisacrylamide, qsp 75 ml avec de l'eau distillée) sont mises au bain-marie à 50 °C jusqu'à ce qu'elles soient claires. A la solution d'agarose sont rajoutés 0,09 ml de tétraméthyle éthylène et 0,03 g de persulfate d'ammonium, avant d'être mélangée à la solution d'acrylamide. Le gel est immédiatement coulé entre deux plaques de verre et mis à 60 °C dans une étuve durant 35 min. Après avoir refroidi pendant au moins 45 min, le gel est mis à tremper durant 13 jours dans un tampon TRIS-glycocolle (9 g de TRIS, 4,68 g de glycocolle, 900 ml d'eau distillée, le pH est ajusté à 8,7 avec HCl N).

Les gels ainsi préparés peuvent se conserver à 5 °C durant 1,5 mois, enveloppé de Cel-O-Frais pour éviter la déshydratation. Avant de s'en servir, il suffit de refaire un bain de tampon TRIS-glycocolle durant une nuit.

Dépôt de l'échantillon :

Par gel 10 puits d'environ 400 µl sont creusés à l'emporte-pièce, 300 µl d'échantillon se dépose mélangé à 100 µl d'agar (1,6 %), maintenu liquide au bain-marie à 40 °C et une goutte de bleu de bromophénol.

Les conditions de migration sont les suivantes : 7 V.cm⁻¹, 3 heures, en position horizontale avec du Cel-O-Frais sur le gel pour éviter qu'il ne se dessèche, les deux bords du gel trempant dans le tampon de migration (1,2 g de TRIS, 25 g de glycocol, 900 ml d'eau distillée, amener le pH à 8,7 avec du NaOH lessive)

3.4 - Coloration des gels d'électrophorèse :

Après migration par électrophorèse en gel d'agarose-acrylamide, les enzymes étudiés sont révélés.

3.4.1 - Révélation des estérases : (Lund B. M., 1963)

Six substrats différents ont été utilisés (acétate d'α ou β naphtyl, propionate de β naphtyl et butyrate d'α ou β naphtyl, et acétate d'indoxyl) et la sensibilité au diisopropylfluorophosphate (DFP) 10⁻³ M (Uriel, 1966 ; Goulet, 1973) testée. Les enzymes sont révélés en immergeant le gel 45 min dans une solution correspondant au

substrat à étudier (0,03 g de substrat choisi dissout dans 1,5 ml d'acétone, 150 ml de tampon phosphate 0,15 M pH 7,4, 0,06 g de diazo-bleu B) sous agitation. Les gels sont ensuite lavés à l'eau du robinet et la coloration est stopée à l'eau acétique.

Les substrats :

- acétate d' α naphthyl,
- butyrate d' α naphthyl,
- acétate de β naphthyl,
- propionate de β naphthyl,
- butyrate de β naphthyl,
- acétate d'indoxyl.

Le tampon phosphate est constitué de 19,6 % de PO_4KH_2 à 20,41 g/l et de 80,4 % de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}_2$ à 53,72 g/l.

Pour différencier certains profils électrophorétiques en inhibant l'expression de certaines estérases ayant des résidus sérines, 10^{-3} M de DFP sont additionnés à l'extrait à déposer, 30 min avant la mise en puits à température ambiante.

3.4.2 - Révélation des déshydrogénases : (Selander R. K., 1986)

Quatre types plus particuliers de déshydrogénase sont étudiés dans ce travail : alcool, malate, lactate et glutamate déshydrogénases. Comme précédemment le gel est immergé dans une solution correspondant à la déshydrogénase étudiée (préparation A et 70 ml d'eau distillée, 30 mg de NBT (Nitro Blue Tetrazolium), 2 mg de PMS (Phenazine Methosulfate)) jusqu'à apparition de bandes.

Composition de la préparation A suivant le type de déshydrogénase :

- alcool déshydrogénase : 2 ml d'éthanol dans 30 ml d'eau distillée, 10 ml de tampon TRIS-HCl 0,5 M à pH 8,5 et 20 mg de NAD. La cuve est couverte pour éviter l'évaporation de l'alcool ;
- glutamate déshydrogénase : 0,845 g de glutamate de sodium pH 7, 1 M dans 5 ml d'eau distillée, 25 ml de tampon phosphate pH 8, 0,5 M et 20 mg de NADP
- lactate déshydrogénase : 0,6 g de CO_3Na_2 dans 5 ml d'eau distillée, 0,85 g de lactate dans 5 ml d'eau distillée, 20 ml de tampon TRIS 0,2 M-HCl pH 8 et 50 mg de NAD ;
- malate déshydrogénase : 1,2 g de CO_3Na_2 dans 5 ml d'eau distillée versé en tournant dans un bain glacé de 1,34 g d'acide malique complété à 10 ml avec de l'eau distillée, 20 ml de tampon TRIS 0,2 M-HCl pH 8 et 50 mg de NAD.

3.4.3 - Révélation des phosphatases acides : (Uriel J., 1961)

La révélation de l'activité phosphatasique acide se fait par immersion, de 30 min à plusieurs heures, suivant l'intensité de l'activité phosphatasique des extraits cellulaires étudiés, du gel dans un bain contenant 20 mg de naphтол AS-phosphate dissout dans 0,12 ml de diéthyl formamide, 25 ml de tampon acétate de sodium-acide acétique 1 M pH 5,2, 0,1 ml de Cl_2Mn et 15 mg de 5-benzamido-4-chloro-2-toluidine diazoté (cristal violet RED B salt).

3.4.4 - Révélation des peroxydases :

Deux bains successifs pour la révélation des peroxydases sont nécessaires, contenant chacun 30 mg de 3-amino-9-éthyl-carbazol dissous dans du diméthyl-formamide, 5 ml de tampon acétate 0,5M à pH 5, 0,5 ml de CaCl_2 1M (remué et filtré s'il y a des précipités) et additionné de 100 μl de H_2O_2 à 3 %.

3.5 - Post-traitement des gels :

Les gels sont lavés à l'eau du robinet, puis mis une nuit à tremper dans un bain d'eau additionnée d'acide acétique, suivie d'un bain d'une nuit dans une solution de séchage (200 ml de méthanol, 50 ml d'acide acétique, 25 ml de glycocolle, eau distillée qsp 1 l). Le séchage est effectué pendant une huitaine de jours à l'air libre entre deux feuilles de cellophane.

Résultats

Pour cette partie du travail, toutes les cultures des différentes souches testées ont été faites dans le milieu BAP liquide. Il y a eu pour chaque souche, trois repiquages successifs après une culture préliminaire dans 5 ml de milieu. Les biomasses des cultures fraîches finales devant être suffisamment importantes pour garantir l'obtention de quantités minimales d'extraits cellulaires, nécessaires à la poursuite de l'expérience.

1 - Standardisation des dépôts d'extraits protéiques sur gel d'électrophorèse :

Après obtention des extraits cellulaires, un essai ayant pour but d'optimiser la quantité de protéines nécessaires à une bonne résolution des profils électrophorétiques, a permis de déterminer que par puits, un dépôt équivalent à 230 μg de protéine était suffisant.

La quantité de protéines totales, présente dans chaque extrait de cultures fraîches de *Frankia* a été dosée afin que chaque dépôt puissent être standardisé à 230 μg de protéine.

2 - Recherche de marqueurs enzymatiques :

Dans un premier temps, les extraits cellulaires des souches Cj, M 02, CeF et D 11 ont servi de modèles à la recherche d'un ensemble de marqueurs permettant leur différenciation.

Les estérases actives sur l'acétate d' α ou β naphtyl, le butyrate d' α ou β naphtyl, le propionate de β naphtyl et l'acétate d'indoxyl, les alcool, glutamate, malate et lactate déshydrogénases, les phosphatases acides ainsi que les peroxydases sont les 12 révélations d'enzyme testées dans cette première partie.

Après analyse des types électrophorétiques obtenus, il s'avère que dans les conditions de l'expérience :

- aucune bande de phosphatase acide ou de peroxydase n'apparaît sur les gels quelle que soit la souche de *Frankia* étudiée ;
- l'étude des déshydrogénases ne permet de différencier que D 11 et M 02 des autres souches étudiées ;
- l'étude du système estérasique permet de discriminer chacune des 4 souches étudiées par rapport aux 3 autres.

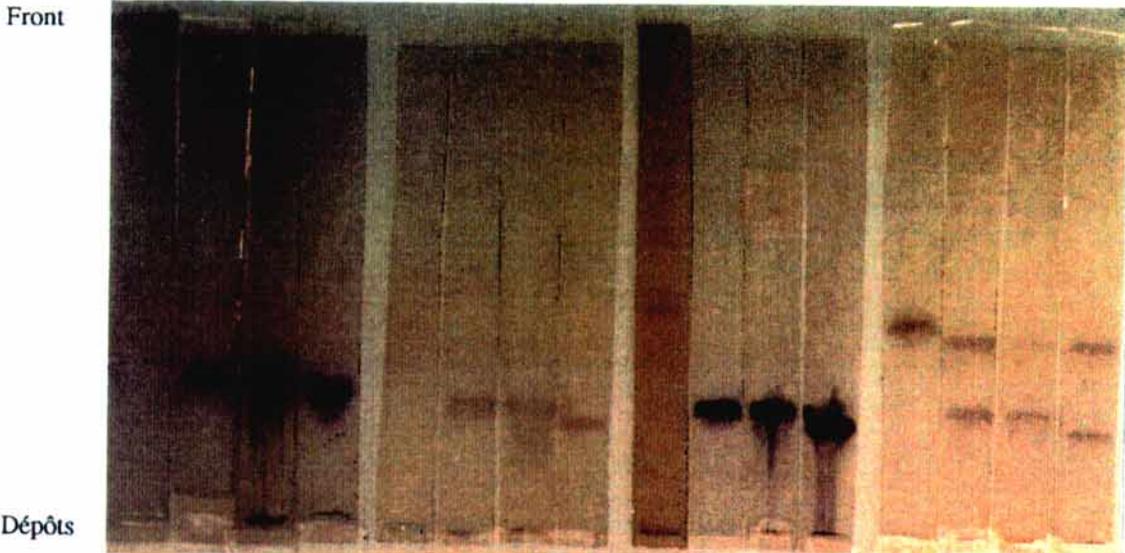
La planche 2, photo. 1, illustre les résultats concernant l'étude des déshydrogénases à partir des types électrophorétiques des quatre souches CeF, Cj, D 11 et M 02.

De toutes les révélations faites, le système estérasique apparaît ici comme un moyen de différenciation des souches testées efficace et suffisant. C'est pourquoi, dans la suite du travail seul ce système est étudié.

Planche 2 :

1 - Comparaison des profils des souches D 11, CeF, Cj et M 02, par types de déshydrogénases :

Souches : D 11 CeF Cj M 02 D 11 CeF Cj M 02 D 11 CeF Cj M 02 D 11 CeF Cj M 02

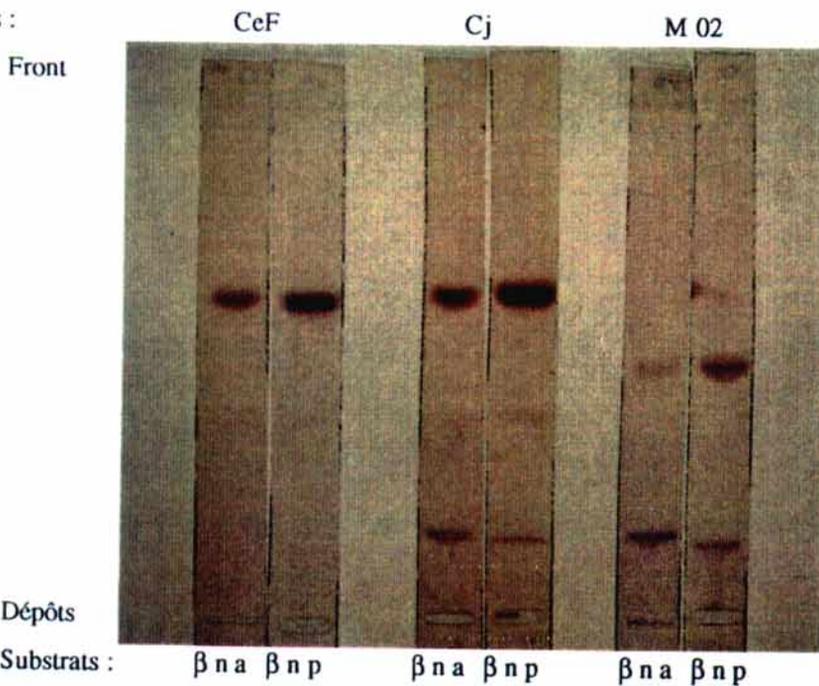


Types : Alcool déshydrogénase Glutamate déshydrogénase Lactate déshydrogénase Malate déshydrogénase

L'étude des profils déshydrogénasiques des souches D 11, CeF, Cj et M 02, ne permet pas de différencier entre elles, les deux souches "typiques" CeF et Cj.

2 - Comparaison entre les profils de deux types d'estérases, acétate et propionate de β naphthyl, pour les souches CeF, Cj et M 02 :

Souches :



Les profils d'estérases actives sur acétate de β naphthyl (β n a) et sur propionate de β naphthyl (β n p) sont indifférenciables pour chacune des trois souches, CeF, Cj et M 02.

3 - Etudes des types estérasiques :

Par la suite, pour toutes les souches de *Frankia* étudiées dans ce travail, ce sont les estérases actives sur l'acétate d' α ou β naphtyl, le butyrate d' α ou β naphtyl et l'acétate d'indoxyl qui ont été révélées.

Les profils électrophorétiques obtenus en révélant les estérases par le propionate de β naphtyl étant redondants avec ceux obtenus en révélant les estérases par l'acétate de β naphtyl, le substrat propionate de β naphtyl, est abandonné pour la suite de l'étude.

La planche 2, photo. 2, illustre ce résultat à partir des profils électrophorétiques des souches dites typiques Cj, CeF et M 02.

Il ressort de l'analyse des résultats électrophorétiques que 12 types différents d'estérases peuvent être différenciés par leur spectre d'activité sur les 5 substrats testés (Tableau 11). Un des types présentant un variant sensible et un variant résistant au diisopropylfluorophosphate (DFP) (Tableau 11). La combinaison des profils estérasiques (définis par la composition d'un extrait bactérien en type d'estérase) et de la variation électrophorétique des différents types d'estérase de ces profils permet de distinguer 20 types électrophorétiques parmi les 63 souches étudiées (Fig. 8). Ces types électrophorétiques, lorsqu'ils sont représentatifs de plusieurs souches, portent le nom abrégé d'une des souches de *Frankia* dont ils sont caractéristiques.

Tableau 11 : Description des types d'estérases

n°	α NA	α NB	IA	β NA	β NB	DFP	n°	α NA	α NB	IA	β NA	β NB	DFP
1	-	-	-	+	-	R ou S	7	++	+	+	++	-	R
2	+	+	-	+	+	R	8	+	-	+	-	-	ND
3	++	+	++	++	+	S	9	+	++	-	-	-	ND
4	+	-	-	+	-	S	10	-	+	-	-	-	ND
5	+	-	+	+	-	S	11	+	-	-	-	-	S
6	-	+	-	-	+	S	12	++	++	++	++	++	ND

Légende :

α NA : α naphtyle acétate estérase

β NA : β naphtyle acétate estérase

α NB : α naphtyle butyrate estérase

β NA : β naphtyle butyrate estérase

IA : indoxyle acétate estérase

DFP : diisopropylfluorophosphate

R : résistant au DFP

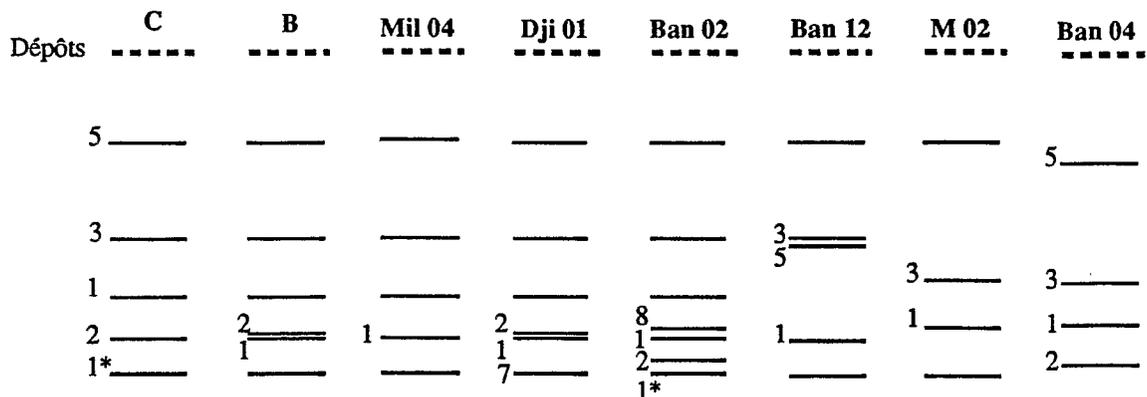
S : sensible au DFP

ND : non déterminé

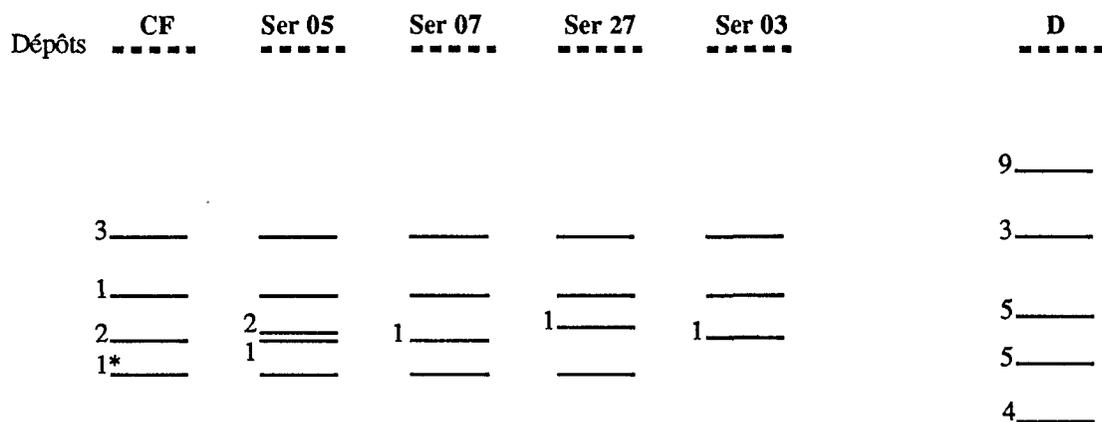
Chaque type électrophorétique de souches étudiées se rattache à un type électrophorétique de référence. Des similarités plus ou moins importantes concernant principalement leur profils estérasiques, apparaissent entre les types électrophorétiques de références. Ceci permet de classer l'ensemble des souches étudiées ici en 4 groupes de similarité ou zymotypes.

Fig. 8 : Schémas des types électrophorétiques répartis par zymotype

a - Zymotype n° 1 :

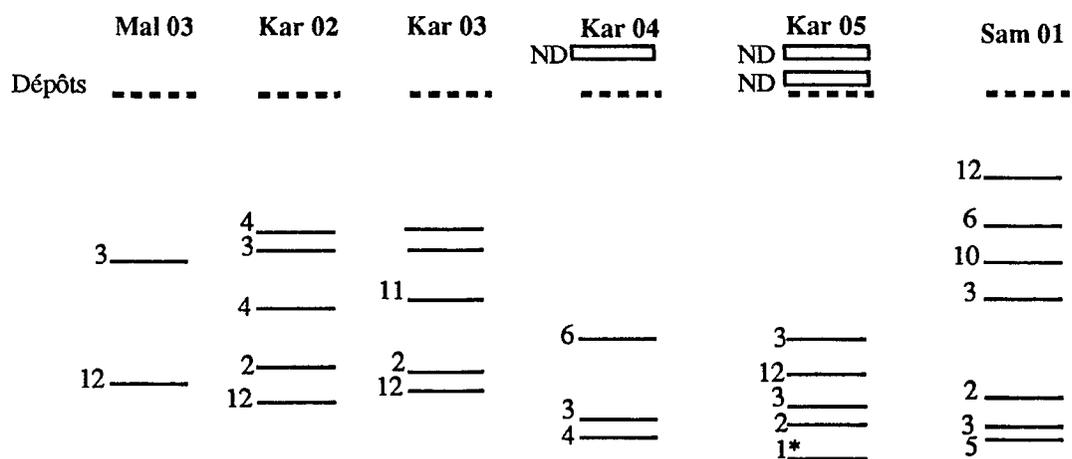


b - Zymotype n° 2 :



c - Zymotype n° 3 :

d - Zymotype n° 4 :



Chaque numéro figurant à gauche d'une bande correspond à un type d'estérase déterminée (Tableau 11). Par zymotype, il apparaît dans le premier type électrophorétique décrit et pour chaque expression estérasique différente à un même niveau de migration dans les suivants.

* : indique la forme résistante au DFP du type d'estérase n° 1 ;

ND : Non Déterminé.

Les types électrophorétiques de références avec le nom des souches de *Frankia* qui s'y rattachent, classés par zymotype, sont :

- zymotype n° 1 : (Fig. 8-a)

C	:	Cj, Ban 01, Ban 03, Ban 06, Ban 08, Ban 09, Die 03, Dji 04, E 03, Mal 05, Mil 01, Mil 02, Mil 03, Mil 05, Mil 06, Mil 07, Mil 08, Mil 10 et Mil 11
B	:	Ban 05, Ban 07, Ban 10, Ban 13, Mil 12 et Mil 13
Mil 04	:	Mil 04
Dji 01	:	Dji 01
Ban 02	:	Ban 02
Ban 12	:	Ban 12
M 02	:	M 02
Ban 04	:	Ban 04

Ces types électrophorétiques sont essentiellement caractérisés par l'existence pour chaque souche, des types d'estérases n° 1S, 3 et 5 (Tableau 11). Ce dernier type, type d'estérase n° 5, ayant une expression remarquable au plus faible niveau de migration sur les gels pour toutes les souches de ce zymotype. Cette position est caractéristique du zymotype n° 1 et peut à ce titre définir à elle seule l'appartenance ou non d'une souche à ce zymotype.

D'autres types d'estérases apparaissent dans certains profils de ce zymotype, ce sont les types d'estérases n° 1R, 2, 7 et 8 (Tableau 11).

Les souches Die 01 et Dji 06 sont à rattacher à ce zymotype, bien que leur profil estérasique n'ait pu entièrement être déterminé.

- zymotype n° 2 : (Fig. 8-b)

CF	:	CeF, Dji 02, Dji 03, Dji 05, Ser 04, Ser 06, Ser 09, Ser 10, Ser 11, Ser 12, Ser 15, Ser 19, Ser 23, Ser 24, Ser 26 et Ser 28
Ser 05	:	Ser 05
Ser 07	:	Ser 07
Ser 27	:	Ser 27
Ser 03	:	Ser 03

Ces types électrophorétiques très semblables à ceux du zymotype n° 1, ne s'en différencient que par l'absence constante du type d'estérase n° 5. Alors que les types d'estérases n° 1S et 3 (Tableau 11) apparaissent aussi constamment sur ces types électrophorétiques à des niveaux de migration comparables à ceux du premier zymotype.

Les types d'estérases n° 1R et 2 se retrouvent aussi sur certains profils de ce zymotype à des niveaux de migration déjà repérés sur des types électrophorétiques du zymotype n° 1.

Les souches Ser 29 et Ser 30 dont les types électrophorétiques sont identiques, sont aussi à rattacher à ce zymotype. L'apparition de bandes inconstantes dans leur profil les fait différencier du type électrophorétique CF et ne permet pas de les définir entièrement.

- zymotype n° 3 : (Fig. 8-c)

D : D 11 et G 02

Un seul type électrophorétique représente ce zymotype qui n'est constitué que de souches dites "atypiques". Les types d'estérase n° 3, 4 et 5 y apparaissent ainsi que le type n° 9 (Tableau 11) dont la présence est caractéristique de ce zymotype.

- zymotype n° 4 : (Fig. 8-d)

Mal 03 : Mal 03

Kar 02 : Kar 02

Kar 03 : Kar 03

Kar 04 : Kar 04

Kar 05 : Kar 05

Sam 01 : Sam 01

Ce zymotype est constitué de 6 types électrophorétiques différents caractérisant chacun une seule souche de *Frankia* et ne pouvant être rattachés individuellement à aucun des autres zymotypes déjà décrits.

Parmi ces 4 zymotypes, les zymotypes n° 1 et 2 peuvent être rassemblés en un supra-groupe caractérisé par la présence simultanée dans leurs profils des types d'estérase n° 1S et 3. Tout en notant que l'existence du type d'estérase n° 1S est déjà à elle seule une caractéristique exclusive de ce supra-groupe. La ressemblance est telle entre certains profils types de ces deux zymotypes que seule la présence du type d'estérase n° 5 les différencie (figures n° E1-a : C, B et Mil 04 avec respectivement en E1-b : CF, Ser 05 et Ser 07).

En comparant la provenance des souches de *Frankia* avec leur classification en types électrophorétiques, on s'aperçoit que des souches ayant des types électrophorétiques différents cohabitent dans un même point de prélèvement de nodules. C'est ainsi que les souches d'une même série Ban, Dji, Mil ou Ser sont isolées à partir d'un même point de prélèvement (Banjul (2), Djiffer, Mile Tour ou Serecounda) et n'ont pourtant pas toutes le même type électrophorétique. Les profils des souches originaires de Djiffer n'appartiennent

pas toutes au même zymotypes (zymotype n° 1 : Dji 01, Dji 04 et Dji 06 ; zymotype n° 2 : Dji 02, Dji 03 et Dji 05).

Les boîtes d'isolement n'ayant pas été numérotées par nodule mais en fonction des points de prélèvement, aucune affirmation n'est possible en ce qui concerne l'isolement de plusieurs souches à partir d'un même nodule.

Aucune distribution géographique particulière des souches n'apparaît. Il y a des représentants de chacun des zymotypes n° 1 et 2 dans chaque zone de prélèvement. Les souches du zymotype n° 4 ne se retrouvent que dans les zones de prélèvement n° 2, 3 et 5, cela peut-être expliqué par le fait qu'elles soient peu nombreuses.

Aucune nouvelle souche de type électrophorétique appartenant au zymotype n° 3 n'a été isolée au cours de notre travail.

➔ Synthèse des résultats obtenus par analyses des profils estérasiques :

Ce travail nous a permis :

- ☞ de mettre en évidence 20 types électrophorétiques d'estérases différents au sein des 63 souches de *Frankia* étudiées ;
- ☞ de regrouper en 4 zymotypes les 20 types électrophorétiques décrits (les zymotypes n° 1 et 2 : comprenant des souches dites "typiques", le zymotype n° 3 : comprenant les souches dites "atypiques" et le zymotype n° 4 : comprenant 6 souches à type électrophorétique tous différents entre eux et de ceux des autres zymotypes) ;
- ☞ il n'apparaît pas de distribution géographique particulière des souches en fonction de leur type électrophorétique ou zymotype, plusieurs souches de type électrophorétique ou zymotype différent pouvant coexister en un même point de prélèvement ;
- ☞ aucune nouvelle souche de type électrophorétique semblable à celui d'une souche "atypique" n'a été isolée.

Discussion

La recherche de marqueurs diagnostiques fiables permettant de différencier des groupes de souches ou souches de microorganismes par l'étude de leurs profils enzymatiques, requiert l'obtention de cultures pures en conditions standardisées et en assez grande quantité pour chaque souche. L'âge des cultures et le nombre de subcultures n'ont en général pas d'effet sur les profils polypeptidiques des *Frankia* (Benson et Hanna, 1983 ; Benson et al., 1984 ; Gardes et al., 1987 ; Gardes et Lalondes, 1987). Cependant l'état physiologique des cultures de *Frankia* avant extraction des protéines et la quantité d'extrait protéique à déposer par puits d'électrophorèse, ont une importance considérable pour la bonne reproductibilité des profils estérasiques (Gardes et al., 1987 ; Maggia et al., 1990 ; Prin et al., 1990). Notre travail de caractérisation de souches par voie biochimique reposant essentiellement sur l'étude de ces derniers, nous nous sommes donc contraints à des règles de culture particulièrement strictes (milieu de culture unique, nombre de subcultures bien défini et concentration des dépôts en protéines standardisés).

L'absence d'activité peroxydasique décrite par Puppo et al. (1985) pour les souches de *Frankia* de *Casuarina* et *Allocasuarina*, se trouve confirmée par nos résultats en ce qui concerne le *Frankia* de *Casuarina*. De même, la faible diversité que nous avons relevée dans les profils de déshydrogénases, est en parfait accord avec les résultats de Gardes et al. (1987) concernant des souches de *Frankia* de plantes hôtes de genre ou d'espèce différents. Ces observations avec l'absence d'activité phosphatasique acide aussi relevée à partir de nos gels, nous ont amené à concentrer nos efforts sur l'étude des profils estérasiques des souches de *Frankia*.

En épidémiologie, l'identification d'une souche ou d'un groupe de souches bactériennes est souvent obtenue en étudiant leur système estérasique (Goullet et Picard, 1984, 1985, 1986, 1987a, 1987b, 1989). Gardes et al. (1987) ont défini parmi les 8 systèmes enzymatiques qu'ils ont étudiés, les estérases ainsi que les diaphorases et phosphoglucomutases (non étudiés ici), comme ceux permettant de mieux mettre en évidence la diversité génétique de 40 souches de *Frankia*.

Plusieurs études, basées sur l'analyse de profils enzymatiques dont ceux des estérases, ont déjà mis en évidence la diversité génétique des souches de *Frankia* isolées à partir de différents genres ou espèces végétales (Puppo et al., 1985 ; Gardes et al., 1987 ; Benoist et Schwencke, 1990 ; Maggia et al., 1990 ; Prin et al., 1990). Un des intérêts de notre travail est d'être restreint aux souches de *Frankia* sénégal-gambiennes isolées de *Casuarina equisetifolia*. L'analyse de leurs profils estérasiques a permis de décrire 20 types électrophorétiques différents. Ceci met en évidence l'existence d'une diversité génétique au sein d'une population restreinte de *Frankia* appartenant au groupe des *Frankia* de *Casuarina* considéré comme très homogène (Fernandez et al., 1989). Les travaux de Puppo et al. (1985) ainsi que ceux de Benoist et Schwencke (1990) prouvent aussi à partir d'un nombre

très limité de souches (2 et 4), l'existence d'une diversité au sein des *Frankia* de *Casuarina equisetifolia*.

La classification faite en quatre zymotypes : deux zymotypes très proches (n° 1 et 2), un zymotype des souches "atypiques" (n° 3) et un zymotype "hétéroclite" (n° 4) confirme le fait qu'il existe des différences entre les *Frankia* testés. La diversité observée au sein de la population des souches testées permet de définir deux niveaux de variabilité :

- un niveau de variabilité de type l'individuel, du fait que l'on puisse identifier individuellement des souches de *Frankia*,

- et un niveau de variabilité supérieur dû à l'existence de zymotypes. Ce niveau supérieur est intermédiaire entre l'espèce génomique défini par l'hybridation ADN-ADN (Fernandez et al., 1989), espèce génomique des *Frankia* de *Casuarina*, et le niveau de variabilité de type individuel.

Le zymotype n° 4 ne comporte que peu de souches dont les types électrophorétiques sont tous différents et non ressemblants à ceux des zymotypes n° 1 et 2. Ceci augmente la diversité au sein des souches de *Frankia* de *Casuarina equisetifolia* déjà observée dans les zymotypes n° 1, 2 et 3.

La finesse de définition obtenue par l'étude des profils estérasiqes des souches de *Frankia*, a permis de prouver qu'il existe une variabilité au sein des populations de *Frankia* de *Casuarina equisetifolia*. De plus, nous avons pu montrer que cette variabilité est présente sur tout le territoire prospecté du Sénégal et de la Gambie et qu'il est possible d'isoler à partir des nodules d'un même arbre différentes souches de *Frankia*.

**Synthèse générale des résultats
de caractérisation**

Dans chacune des parties 2, 3 et 4 de notre travail, différents groupes de souches homogènes ont pu être définis. Afin d'avoir une vue d'ensemble sur la répartition de la population de *Frankia* du Sénégal et de la Gambie par rapport à toutes les caractérisations faites, il convient de récapituler pour chacune des souches testées les résultats obtenus, et de synthétiser ces résultats en essayant de définir de nouvelles formations : groupes et sous-groupes. Ces nouvelles formations seraient basées non plus sur les résultats d'une seule caractérisation, mais sur les résultats de l'ensemble des caractérisations qui ont été faites au cours de ce travail.

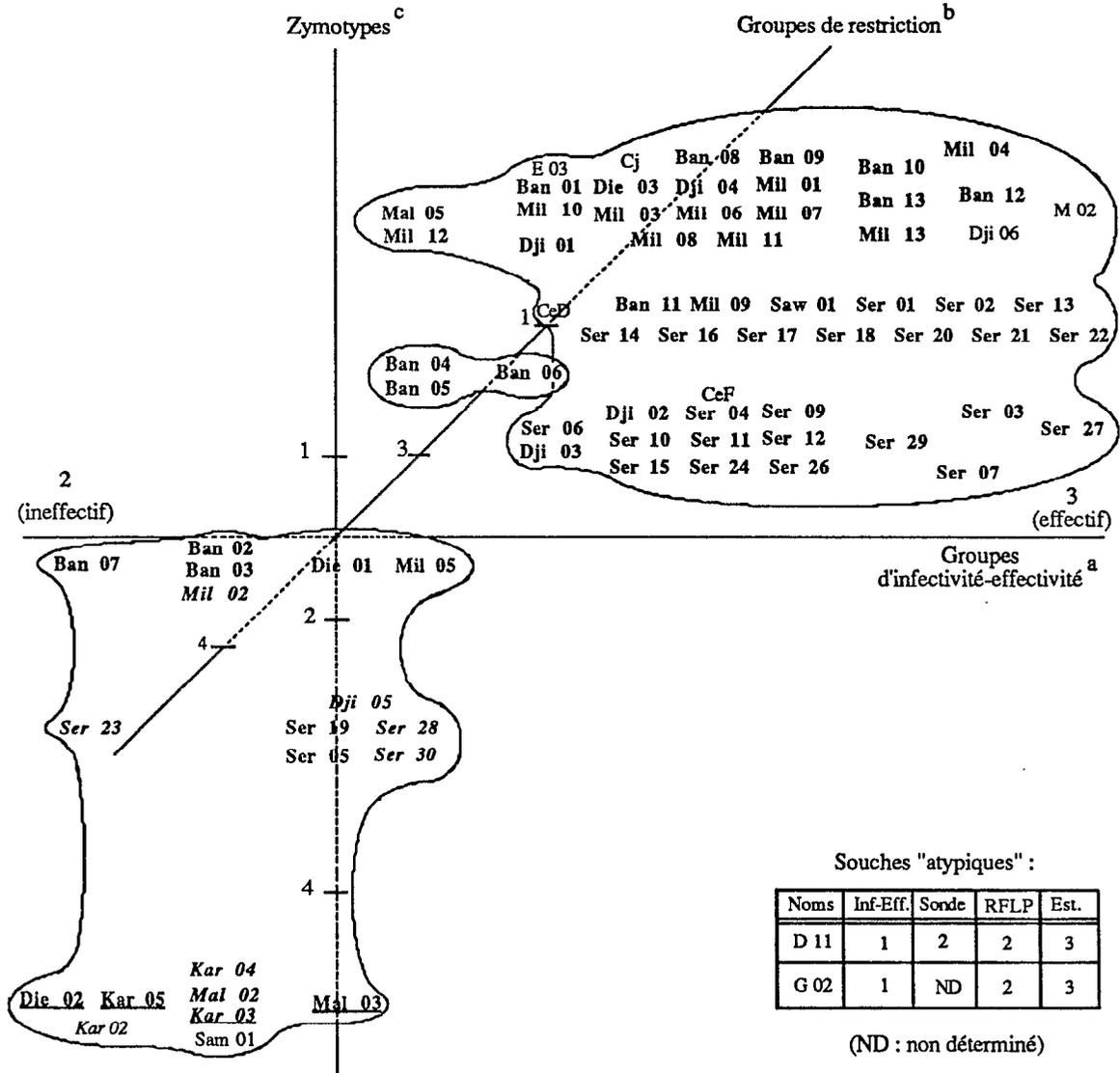
Pour ce faire un récapitulatif des résultats obtenus par chaque technique de caractérisation, est présenté dans l'annexe 10, et c'est d'après ces résultats que la Fig. 9 a été faite. Cette figure représente la distribution des souches de *Frankia* de *Casuarina equisetifolia* que nous avons isolées du Sénégal et de la Gambie, selon les groupes d'infectivité-effectivité, d'hybridation, de restriction et les zymotypes auxquels elles appartiennent. Les souches de référence de *Frankia* de *Casuarina* utilisées dans ce travail, figurent aussi dans cette représentation en quatre dimensions. La représentation graphique de cette synthèse (Fig. 9) permet de visualiser les groupes définis antérieurement en fonction de chaque critère de caractérisation ainsi que les groupes et sous-groupes nouvellement définis en combinant ces différents critères. Les huit souches (Cap 01, Ser 25, Die 06, Kar 01, Mal 01, Mal 04, Mal 06 et Tio 02) pour lesquelles trop peu d'informations sont connues ne sont pas représentées dans cette figure.

De l'analyse de la Fig. 9, il ressort que parmi les 80 souches de *Frankia* étudiées, 40 souches bien caractérisées se répartissent en 11 groupes, un groupe étant défini comme un ensemble de souches ayant les mêmes caractéristiques en ce qui concerne leur effectivité, leur aptitude à hybrider avec la sonde n° 27, leur profil de restriction et leur zymotype d'appartenance. Ces groupes sont eux mêmes subdivisibles en 22 sous-groupes si l'on prend en compte les différents types électrophorétiques d'estérases présents dans chaque zymotype. Les 11 groupes et 22 sous-groupes sont décrits dans le tableau 12.

En plus de ces 22 sous-groupes, chacune des 5 souches Ban 02, Dji 01, Kar 02, Kar 03 et Sam 01, ayant un type électrophorétique particulier (cf Partie 4), constituent un sous-groupe propre portant ainsi le nombre total de sous-groupes à 27. Ces 5 autres sous-groupes ne peuvent être rattachés à aucun des 11 groupes existant car les souches qui les constituent n'ont pu être entièrement caractérisées.

Une des souches "typiques" de *Frankia* que nous avons utilisées comme référence dans notre travail, M 02, s'avère avoir elle aussi un type électrophorétique particulier (cf Partie 4). Ceci porte le nombre de sous-groupes de 27 à 28, hors mis le sous-groupe des souches "atypiques" de référence D 11 et G 02.

Fig. 9 : Différenciation des souches de *Frankia* suivant leur appartenance aux groupes d'infectivité-effectivité, d'hybridation, de restriction et leur zymotype



- ^agroupes d'infectivité-effectivité :**
- . 1 : ininfectif,
 - . 2 : infectif-ineffectif,
 - . 3 : infectif-effectif ;
- ^bgroupes de restriction :**
- . 1 : conforme à la souche de référence CeD ("typique"),
 - . 2 : conforme à la souche de référence D 11 ("atypique"),
 - . 3 : souche dont le profil diffère de celui de CeD par l'apparition d'une bande supplémentaire,
 - . 4 : souche à profil différent de celui de CeD et D 11 ;
- ^czymotypes :**
- . 1 : conforme à la souche de référence Cj,
 - . 2 : conforme à la souche de référence CeF,
 - . 3 : conforme à la souche "atypique" de référence, D 11,
 - . 4 : souche à profil différent de celui de CeD et D 11 ;
- les noms des souches dont l'ADN s'apparie avec la sonde n° 27, apparaissent en gras, ceux des souches dont l'ADN n'a pu être appareillé avec aucune des deux sondes (n° 27 et 28), apparaissent en gras souligné et ceux des souches qui n'ont pu être testées, en caractères non gras ;
 - les souches dont les noms apparaissent en italique, sont des souches pour lesquelles il manque de l'information, bien qu'elles soient positionnées dans la représentation graphique ;
 - les souches "atypiques" de référence ne sont pas représentées dans la figure (voir encart).

Tableau 12 : Groupes et sous-groupes de souches de *Frankia* d'origine sénégal-gambienne

groupe	caractéristiques				type électroph. ^e	sous-groupe	souches
	effectivité / <i>C. eq.</i> ^a	signal / 27 ^b	profil / Nci I ^c	zymotype / estérases ^d			
A	-	+		2	CF	A.1	Ser 23
B	-	+	(autre)	1	B	B.1	Ban 07
C	-	+	CeD	1	C B	C.1 C.2	Mal 05 Mil 12
D	+	+	CeD	1	C B Mil 04 Ban 12	D.1 D.2 D.3 D.4	Ban 08, Ban 09, Die 03, Mil 01, Mil 03, Mil 06, Mil 07, Mil 08 et Mil 11 Ban 10, Ban 13 et Mil 13 Mil 04 Ban 12
E	+	+	CeD	2	CF Ser 03 Ser 07 Ser 27	E.1 E.2 E.3 E.4	Dji 02, Ser 04, Ser 09, Ser 10, Ser 11, Ser 12, Ser 15, Ser 24 et Ser 26 Ser 03 Ser 07 Ser 27
F		+	CeD+1	1	C Ban 04 Ban 05	F.1 F.2 F.3	Ban 06 Ban 04 Ban 05
G	+	+	(autre)	1	C	G.1	Mil 05
H	+	+	(autre)	2	CF Ser 05	H.1 H.2	Ser 19 Ser 05
I	+	-	(autre)	4	Mal 03	I.1	Mal 03
J	-	-			Kar 05 Die 02	J.1 J.2	Kar 05 Die 02
K		+		4	Kar 04	K.1	Kar 04

^aeffectivité / *C. eq.* : effectivité vis-à-vis de *C. equisetifolia*,

^bsignal / 27 : signal de réponse au test d'hybridation avec la sonde n° 27,

^cprofil / Nci I : profil de restriction obtenu avec l'endonucléase Nci I :

. identique à la souche de référence CeD,

. comprenant un segment de plus que celui de la souche CeD (CeD+1),

. autre,

^dzymotype / estérases : zymotype obtenu après analyse des types électrophorétiques d'estérases,

^etype électroph. : type électrophorétique d'estérases (n'intervient que dans la définition des sous-groupes).

Les trois voies d'approche que nous avons utilisées pour étudier cette population de *Frankia*, qu'elles soient biologique (tests d'infectivité-effectivité), moléculaire (sondes d'ADN spécifiques, RFLP) ou biochimique (polymorphisme enzymatique), se sont toutes révélées efficaces pour la différenciation de nos souches.

Parmi les techniques que nous avons employées, certaines plus récentes apparaissent mieux adaptées aux études de biologie et génétique des populations de *Frankia* en raison des difficultés qu'il y a à isoler et cultiver ce microorganisme. En effet, l'utilisation conjuguée de techniques de biologie moléculaire, à partir d'ADN extrait par sonication soit de cultures pures, soit de nodules, consistant en une amplification en chaîne par polymérase (PCR) d'un fragment d'ADN choisi suivie de sa restriction enzymatique (RFLP), permet une caractérisation rapide du microorganisme étudié sans passer par sa culture en grande quantité ou même son isolement. Toutefois, il reste à perfectionner ces nouvelles techniques et à rechercher les portions d'ADN les plus intéressantes, dont l'étude permettra de mieux dépister et caractériser une souche de *Frankia in vitro* comme *in situ*. Pour cela, dans un premier temps au moins, une étude parallèle réalisée avec les techniques plus classiques, basées sur l'étude de la biologie de *Frankia* et de sa composition biochimique, est nécessaire. L'importante somme d'informations récoltée par l'analyse des profils électrophorétiques d'estérases démontre ici l'intérêt qu'il y a à utiliser ce genre d'analyse et prouve la finesse de résolution de cette technique puisque cette technique avaient déjà permis la différenciation de 19 types électrophorétiques, hormis l'étude des souches "atypiques" (cf Partie 4).

Conclusion

Les techniques de caractérisation utilisées dans ce travail ont toutes contribué isolément et de façon complémentaire à la constitution des 28 sous-groupes que nous avons décrits, mettant ainsi en évidence une importante diversité génétique au sein de l'ensemble des 80 souches de *Frankia* isolées à partir de nodules de *Casuarina equisetifolia*. Ces souches, toutes isolées selon la même technique, ne proviennent que d'un nombre limité de sites de prospection (22) par rapport au nombre total de sites prospectés (91). La lourde proportion d'échecs observée ici peut être expliquée par le fait que la technique d'isolement utilisée soit sélective vis-à-vis de certains types de souches non encore connus. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en s'attachant à l'étude du microorganisme directement dans les nodules ou à partir de prélèvements de sol.

Au cours de nos travaux nous n'avons isolé aucune souche de *Frankia* "atypique". La technique d'isolement que nous avons utilisée préconise, dans une première étape, l'enlèvement de l'épiderme des nodules avant stérilisation, ce qui n'avait pas été fait lors de l'isolement de souches "atypiques" (Diem et al., 1982a). On peut supposer que les souches "atypiques" qui ont été isolées, étaient présentes dans les couches cellulaires superficielles des nodules en tant qu'organisme saprophytique. L'enlèvement de l'épiderme nodulaire que nous avons effectué aurait alors éliminé ces *Frankia* "atypiques", ce qui expliquerait l'absence de ce type de souches dans notre collection malgré le grand nombre d'isollements effectués et l'étendue de l'aire prospectée.

La présence, dans la population sénégalo-gambienne de *Frankia*, de souches infectives et ineffectives vis-à-vis de leur plante hôte d'origine oblige désormais à faire une distinction importante parmi les souches dites "typiques" de *Casuarina*. De même, la mise en évidence dans nos résultats de souches "typiques" de *Frankia* présentant un signal d'hybridation négatif avec la sonde d'ADN n° 27, reconnue comme spécifique des souches "typiques" de *Frankia* de *Casuarina* (Nazaret, 1991), laisse à supposer qu'il pourrait exister une autre espèce génomique de *Frankia* que celle décrite par Fernandez et al. (1989) capable d'infecter aussi le *Casuarina equisetifolia*. Ceci nous incite à faire une deuxième distinction importante parmi ces souches "typiques".

L'existence de *Frankia* dans les sols sénégalais et gambien semble liée à l'implantation de *C. equisetifolia* dans cette région puisqu'aucune trace de ce microorganisme n'a été décelée en dehors des zones reboisées avec ce végétal. On peut penser qu'il y ait eu une co-dissémination du microorganisme symbiotique et de son hôte, *C. equisetifolia*, depuis leur aire d'origine naturelle (Australie et îles du Pacifique Sud). Les souches de *Frankia* du Sénégal et de la Gambie sont alors toutes descendantes de souches importées et leur diversité actuelle dérive de celle qui caractérisait la population de *Frankia* introduite à l'origine. Une étude similaire à celle que nous venons de faire au Sénégal et qui serait menée dans l'aire de répartition naturelle de *Frankia* devrait permettre de compléter nos résultats et de mieux définir la diversité des souches de *Casuarina* en particulier et de *Casuarinacées* en général.

**Références
bibliographiques**

- ANDEKE-LENGUI, M. A. and DOMMERGUES, Y. R. 1981. Coastal Sand Dune Stabilization in Senegal. In : *Casuarina Ecology Management and Utilization. Proceedings of an International Workshop* (Eds. : S. J. Midgley, J. W. Turnbull and R. D. Johnston). CSIRO, Melbourne, Australia, pp. 158-166.
- AGUT, H. and HURAU, J. M. 1990. La place de l'amplification génique (PCR) en microbiologie. *Bulletin de la société française de microbiologie*, **5**, 7-9.
- AN, C. S., RIGGSBY, W. S. and MULLIN, B. C. 1985a. Relationships of *Frankia* isolates based on deoxyribonucleic acid homology studies. *Int. Syst. Bacteriol.*, **35**, 140-146.
- AN, C. S., RIGGSBY, W. S. and MULLIN, B. C. 1985b. Restriction pattern analysis of genomic DNA of *Frankia* isolates. *Plant and Soil*, **87**, 43-48.
- anon., 1984. *Casuarinas : Nitrogen-Fixing Trees for Adverse Sites*. National Academy Press, Washington, D. C., 118p.
- ARNHEIM, N., WHITE, T. and RAINEY, W. 1990. Application of PCR : Organismal and Population Biology. *BioScience*, **40**, 174-182.
- BA, A.M., SOUGOUFARA, B. AND THOEN, D. 1987. The triple symbiosis of *Casuarina equisetifolia* in Sénégal. In : *Mycorrhizas in the next decade* (Ed. by D.M. Sylvia, L.L. Hung and J.H. Graham) p 121. University of Florida, Gainesville, Florida.
- BAKER, D. and O'KEEFE, D. 1984. A modified sucrose fractionation procedure for the isolation of frankiae from actinorhizal root nodules and soil samples. *Plant and soil*, **78**, 23-28.
- BAKER, D. and TORREY, J. G. 1979c. The isolation and cultivation of actinomycetes root nodule endophytes. In *Symbiotic Nitrogen Fixation in Management of Temperate Forests*. Eds. J. C. Gordon, C. T. WHEELER and D. A. Perry. Oregon State University Press, Corvallis, OR pp 38-56.
- BAKER, D. D. 1987. Relationships among pure cultured strains of *Frankia* based on host specificity. *Physiol. Plantarum*, **70**, 245-248.
- BAKER, D., KIDD, G. H. and TORREY, J. G. 1979a. Separation of actinomycete nodule endophytes from crushed nodule suspensions by Sephadex fractionation. *Bot. Gaz. (Chicago)*, **140**, S49-S51.

BAKER, D., TORREY, J. G. and KIDD, G. H. 1979b. Isolation by sucrose-density fraction and cultivation *in vitro* of actinomycetes from nitrogen-fixing root nodules. *Nature* (London), **281**, 76-78.

BAPTIST, J. N., SHAW, C. R. and MANDEL, M. 1969. Zone electrophoresis of enzymes in bacterial taxonomy. *J. of Bact.*, **99**, 180-188.

BAPTIST, J. N., SHAW, C. R. and MANDEL, M. 1971. Comparative zone electrophoresis of enzymes of *Pseudomonas solanacearum* and *Pseudomonas cepacia*. *J. Bact.*, **108**, 799-803.

BECKING, J. H. 1970. Frankiaceae *fam. nov.* (Actinomycetales) with one new combination and six new species of the genus *Frankia* Brunchorst 1886, 174. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**, 201-220

BENOIST, P. and SCHWENCKE, J. 1990. Native Agarose-Polyacrylamide Gel Electrophoresis Allowing the Detection of Aminopeptidase, Dehydrogenase, and Esterase Activities at the Nanogram Level : Enzymatic Patterns in Some *Frankia* Strains. *Anal. Biochem.*, **187**, 337-344.

BENSON, D. R. 1982. Isolation of *Frankia* strains from Alder actinorhizal root nodules. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 461-465.

BENSON, D. R. and HANNA, D. 1983. *Frankia* diversity in alder stand as estimated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of whole-cell proteins. *Can. J. Bot.*, **61**, 2919-2923.

BENSON, D. R., BUCHHOLZ, S. E. and HANNA, D. G. 1984. Identification of *Frankia* strains by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 489-494.

BLOOM, R. A., LECHEVALIER, M. P. and TATE III, R. L. 1989a. Physiological, Chemical, Morphological, and Plant Infectivity Characteristics of *Frankia* Isolates from *Myrica pensylvania* : Correlation to DNA Restriction Patterns. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2161-2166.

BLOOM, R. A., MULLIN, B. C. and TATE, R. L. III. 1989b. DNA restriction patterns and solution hybridization studies of *Frankia* isolates from *Myrica pensylvania* (bayberry). *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2155-2160.

- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- BURGGRAAF, A. J. P. 1984. Isolation, Cultivation and Characterization of *Frankia* Strains from Actinorhizal Root Nodules. PhD Thesis. University of Leiden, The Netherlands.
- BURGGRAAF, A. J. P. and VALSTAR, J. 1984. Heterogeneity within *Frankia* sp. LDAg1 studied among clones and reisolates. *Plant and Soil*, **78**, 29-43.
- BURGGRAAF, A. J. P., QUISPÉL, A., Tak, T. and VALSTAR, J. 1981. Methodes of isolation and cultivation of *Frankia* species from actinorhizas. *Plant and Soil*, **61**, 157-168.
- CALLAHAM, D., DEL TREDICI, P. and TORREY, J.G., 1978. Isolation and cultivation *in vitro* of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*. *Science*, **199**, 899-902.
- COYNES, P. D. 1983. Specificity between *Casuarina* species and root nodule organisms. In : *Casuarina* ecology, management and utilization. Eds : S. Midgley, J. W. Turnbull, and R. D. Johnston. pp 205-210. CSIRO, Melbourne, Australia.
- CRAMERI, R., HINTERMANN, G. and HUTTER, R. 1983. Deoxyribonucleic acid restriction endonuclease fingerprint characterization of actinomycete strain. *Int. Syst. Bacteriol.*, **33**, 652-655.
- DIEM, H.G. and DOMMERGUES, Y.R. 1983. The isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina equisetifolia*. *Can. J. Microbiol.*, **61** (11), 2822-2825.
- DIEM, H. D. and DOMMERGUES, Y. R. 1985. *In vitro* production of specialized reproductive torulose hyphae by *Frankia* strain ORS021001 isolated from *Casuarina junghuhniana* root nodules. *Plant Soil*, **87**, 17-29.
- DIEM, H. D. and DOMMERGUES, Y. R. 1988. Isolation, characterization and cultivation of *Frankia*. In "Biological Nitrogen Fixation, Recent Developments" (N. S. Subba Rao, ed.), pp. 227-254. Gordon and Breach Science Publishers, New York.
- DIEM, H.G., GAUTHIER, D. and DOMMERGUES, Y.R. 1982a. Isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina equisetifolia*. *Can. J. Microbiol.*, **28** (5), 526-530.
- DIEM, H.G., GAUTHIER, D. and DOMMERGUES, Y.R. 1982b. Isolement et culture *in vitro* d'une souche infective et effective de *Frankia* isolée de nodules de *Casuarina* sp. *C.R. Acad. SC. Paris*, t., **295**, Ser. III, 759-763.

DIEM, H.G., GAUTHIER, D. and DOMMERGUES, Y.R. 1983. An effective strain of *Frankia* from *Casuarina* sp. Can. J. Bot., **61**, 2815-2821.

DOBRITSA, S. V. 1985. Restriction analysis of the *Frankia* spp. genome. FEMS Microbiol. Lett., **29**, 123-128.

DOBRITSA, S.V. and STUPAR, O.S. 1989. Genetic heterogeneity among *Frankia* isolates from root nodules of individual actinorhizal plants. FEMS Microbiology Letters, **58**, 287-292.

DOMMERGUES, Y. R., DIEM, H. G. and SOUGOUFARA, B. 1990. Nitrogen fixation in Casuarinaceae : quantification and improvement through different approaches including aerial nodulation. In : Advances in Casuarina Research and Utilisation. p : 110-121 (Ed. M. H. El-Lakany, J. W. Turnbull, J. L. Brewbaker). Proceedings of the Second International Casuarina Workshop, Cairo, Egypt.

ENGVILD, K. C., JENSEN, E. S. and SKØT, L. 1990. Parallel variation in isoenzyme and nitrogen fixation markers in a Rhizobium population. Plant Soil, **128**, 283-286.

FERNANDEZ, M., MEUGNIER, H., GRIMONT, P. A. D. and BARDIN, R. 1989. Deoxyribonucleic Acid Relatedness among Members of the Genus *Frankia*. Int. J. Syst. Bacteriol., **35**, 140-146.

FERNANDEZ, M. P., NAZARET, S., SIMONET, P., COURNOYER, B. and NORMAND, P. 1990. Structure of the genus *Frankia*. In : Fifth international symposium on nitrogen fixation with non-legumes. Florence, Italy, in press.

GARBER, E. D. and RIBBON, J. W. 1968. Proteins and enzymes as taxonomic tools. Advances in Applied Microbiology, **10**, 137-154.

GARDES, M. and LALONDE, M. 1987. Identification and subgrouping of *Frankia* strains using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Physiol. Plantarum, **70**, 237-244.

GARDES, M., BOUSQUET, J. and LALONDE, M. 1987. Isoenzyme variation among 40 *Frankia* strains. Appl. Environ. Microbiol., **53**, 1596-1603.

GAUTHIER, D. 1984. La symbiose *Frankia-Casuarina equisetifolia*. Thèse de doctorat d'état, Université Paris VII.

- GAUTHIER, D., DIEM, H.G. and DOMMARGUES Y.R. 1981a. *In vitro* nitrogen fixation by two actinomycete strains isolated from *Casuarina* nodules. Appl. Environ. Microbiol., **41**, 306-308.
- GAUTHIER, D., DIEM, H.G. and DOMMARGUES, Y.R. 1981b. Infectivité et effectivité de souches de *Frankia* isolées de nodules de *Casuarina equisetifolia* et *Hippophaë rhamnoides*. C. R. Acad. Sc. Paris, **293**, Ser. C, 489-491.
- GAUTHIER, D., DIEM, H.G. and DOMMARGUES Y.R. 1983. Preliminary results of research on *Frankia* and endomycorrhizae associated with *Casuarina equisetifolia*. In *Casuarina* ecology Management and Utilisation. (Midgley, S.J., Turnbull, J.W. and Johnston, R.D., Eds). Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Melbourne. pp. 211-217.
- GAUTHIER, D., FRIONI, L., DIEM, H.G. and DOMMARGUES, Y.R. 1984. The *Colletia spinosissima*-*Frankia* symbiosis. *Oecologia Plantarum* vol. 5 (19) N° 3, 231-239.
- GOULLET, P. 1973. An esterase zymogram of *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. **77**, 27-35.
- GOULLET, PH. 1980a. Distinctive electrophoretic patterns of esterases from *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter aerogenes* and *E. gergoviae*. Journal of General Microbiology, **117**, 483-491.
- GOULLET, PH. 1980b. Esterase electrophoretic pattern relatedness between *Shigella* species and *Escherichia coli*. Journal of General Microbiology, **117**, 493-500.
- GOULLET, PH. 1981. Characterization of *Serratia odorifera*, *S. fonticola* and *S. ficaria* by the electrophoretic patterns of their esterases. Journal of General Microbiology, **127**, 161-167.
- GOULLET, PH. and PICARD, B. 1984. Distinctive Electrophoretic and Isoelectric Focusing Patterns of Esterases from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. Journal of General Microbiology, **130**, 1471-1480.
- GOULLET, PH. and PICARD, B. 1985. A two dimensional electrophoretic profile for bacterial esterases. Electrophoresis, **6**, 132-135.
- GOULLET, PH. and PICARD, B. 1986a. Comparative Esterase Electrophoretic Polymorphism of *Escherichia coli* Isolates Obtained from Animal and Human Sources. Journal of General Microbiology, **132**, 1843-1851.

GOULLET, PH. and PICARD, B. 1986b. Characterization of *Enterobacter cloacae* and *E. sakazakii* by Electrophoretic Polymorphism of Acid Phosphatase, Esterases, and Glutamate, Lactate and Malate Dehydrogenases. *Journal of General Microbiology*, **132**, 3105-3112.

GOULLET, PH. and PICARD, B. 1987a. Epidemiological complexity of hospital aeromonas infections revealed by electrophoretic typing of esterases. *Epidem. Inf.*, **98**, 5-14.

GOULLET, PH. and PICARD, B. 1987b. Differentiation of *Shigella* by Esterase Electrophoretic Polymorphism. *Journal of General Microbiology*, **133**, 1005-1017.

GOULLET, PH. and PICARD, B. 1988. Characterization of *Yersinia enterocolitica*, *Y. aldovae*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii* and *Y. pseudotuberculosis* by Electrophoretic Polymorphism of Acid Phosphatase, Esterases, and Glutamate and Malate Dehydrogenases. *Journal of General Microbiology*, **134**, 317-325.

GOULLET, PH. and PICARD, B. 1989. Comparative Electrophoretic Polymorphism of Esterases and Other Enzymes in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, **135**, 135-143.

GRIMONT, F and GRIMONT, P. A. D. 1986. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur*, **137 B**, 165-175.

HAHN, D., LECHEVALIER, M. P., FISCHER, A. and STACKERBRANDT, E. 1989. Evidence for a close phylogenetic relationship between members of the genera *Frankia*, *Geodermatophilus*, and "*Blastococcus*" and emendation of the family *Frankiaceae*. *System. Appl. Microbiol.*, **11**, 236-242.

HAHN, D., STARRENBURG, M. J. C. and AKKERMANS, A. D. L. 1990. Oligonucleotide Probes That Hybridize with rRNA as a Tool To Study *Frankia* Strains in Root Nodules. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1342-1346.

HARDLEY, R. G., EAGLESHAM, A. R. and SZALAY, A. A. 1983. Conservation of DNA regions adjacent to *nif* KDH homologous sequences in diverse slow-growing *Rhizobium* strains. *J. Mol. Appl. Genet.*, **2**, 225-236.

HARDY, R.W.F. and HAVELKA U.D. 1968. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation : Laboratory and field evaluation. *Plant. Physiol.*, **43**, 1185-1207..

HOAGLAND, D.R. and ARNON, D.I. 1938. The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Stn. Circ.* 347.

JACKMAN, P. J. H. 1985. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In "Chemical Methods in Bacterial Systematics" (Eds. M. Goodfellow and D. E. Minnikin), pp. 115-128. Academic Press, London.

KERSTERS, K. 1985. Numerical Methods in the Classification of Bacteria by Protein Electrophoresis. In : Computer-assisted bacterial systematics, chap. 13. Eds. M. Goodefellow, D. Jones et F. G. Priest. Academic Press, London, pp. 337-368.

KERSTERS, K. and DE LEY, J. 1980. Classification and identification of bacteria by electrophoresis of their proteins. In "Microbiological Classification and Identification" (Eds. M. Goodfellow and R. G. Board), pp. 273-297. Academic Press, London.

KITCHIN, P. A., SZOTYORI, Z., FROMHOLC, C. and ALMOND, N. 1990. Avoidance of false positives. *Nature*, **344**, 201.

KNOWLTON, S. and DAWSON, J. O. 1983. Effects of *Pseudomonas cepacia* and cultural factors on the nodulation of *Alnus rubra* roots by *Frankia*. *Can. J. Bot.*, **61**, 2877-2882.

KNOWLTON, S., BERRY, A. and TORREY, J. G. 1980. Evidence that associated soil bacteria may influence root hair infection of actinorhizal plants by *Frankia*. *Can. J. Microbiol.*, **26**, 971-977.

LALONDE, M. 1979. Techniques and observations of the nitrogen-fixing *Alnus* root nodule symbiosis. In N. S. SubbaRao (ed.), Recent advances in biological nitrogen fixation. Oxford and IDH Publications, New Delhi, India, pp.421-434.

LALONDE, M. and CALVERT, H.E. 1979. Production of *Frankia* hyphae and spores as an infective inoculant for *Alnus* species. In : Symbiotic nitrogen in management of temperate forests. Eds. Gordon J.C., Wheeler C.T. and Perry D.A., Oregon state University, Corvallis, OR., pp. 95-110.

LALONDE, M., CALVERT, H.E. AND PINE, S. 1981. Isolation and use of *Frankia* strains in actinorhizae formation. In : Current perspectives in nitrogen fixation (A.H., Gibson and W.E., Newton, Eds). Australian Academy of Science, Canberra. 296-299.

LALONDE, M., SIMON, L., BOUSQUET, J. and SEGUIN, A. 1988. Advances in the taxonomy of *Frankia* : recognition of species *alni* and *elaeagni* and novel subspecies *pommerii* and *vandijkii*, p. 671-680. In Progress in Nitrogen Fixation. Eds. H. Bothe and W. E. Newton. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

LECHEVALIER, M. P. 1983. Cataloging *Frankia* strains. *Can. J. Bot.* **61**, 2964-2967.

- LECHEVALIER, M. P. 1984. The taxonomy of the genus *Frankia*. *Plant Soil*, **78**, 1-6.
- LECHEVALIER, M. P. and LECHEVALIER, H. A. 1990. Systematics, Isolation, and Culture of *Frankia*. In : *The Biologie of Frankia and Actinorhizal PLants*. (Ed. by J. D. Tjepkema and C. Schwintzer) p 35-60. Academic Press, Inc.
- LECHEVALIER, M. P., LABEDA, D. P. and RUAN, J. S. 1987. Studies on *Frankia* sp. LLR 02022 from *Casuarina cunninghamiana* and its mutant LLR 02023. *Physiol. Plant.*, **70**, 249-254.
- LUND, B.M. 1963. Comparison by the use of gel electrophoresis of soluble protein components and esterase enzymes of some groups *D. Streptococci*. *J. Gen. Microbiolo*, **40**, 413-419.
- MAGGIA, L., PRIN, Y., PICARD, B. and GOULLET, P.. 1990. Esterase patterns of 60 isolates of *Frankia* from *Casuarina equisetifolia* grown in Senegambia. In : *Advances in Casuarina Research and Utilization. Proceedings of the Second International Casuarina Workshop* (Eds. : M. H. El-Lakany, J. W. Turnbull and J. L. Brewbaker). Desert Development Center, A. U. C., Cairo, Egypt, pp. 141-148.
- MINCHIN, F. R., SHEEHY, J. E. and WITTY, J. F. 1986. Further Errors in the Acetylene Reduction Assay : Effects of Plant Disturbance. *J. Exper. Bot.*, **37**, 1581-1591.
- MULLIS, K. B. and FALOONA, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalized chain reaction. *Methods Enzymol.*, **155**, 335-350.
- MURRY, M.A., FONTAINEM, S. and TORRYE, J.G. 1984. Growth kinetics and nitrogenase induction in *Frankia* sp. HFP Ar I3 grown in batch culture. *Plant and Soil*, **78**, 61-78.
- NAZARET, S. 1991. Caractérisation des souches de *Frankia* isolées des nodules de *Casuarina*. Mise au point de marqueurs génétiques. Thèse de doctorat, Université de Lyon I.
- NAZARET, S., SIMONET, P., NORMAND, P. and BARDIN, R. 1989. Genetic diversity among *Frankia* isolated from *Casuarina* nodules. *Plant and soil*, **118**, 241-247.
- NEWCOMB, W., PANKHURST, C.E. and TORREY, J.G. 1981. *Casuarina montana* *Coriara arborera*. *Discaria toumaton* and *Dryias drummondii*. Abstract, IV Internat. Symp. N Fixation, Canberra, Australia.
- NOEL, K. D. and BRILL, W. J. 1980. Diversity and dynamics of indigenous *Rhizobium japonicum* populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 931-938.

- NORMAND, P. and BOUSQUET, J. 1989. Phylogeny of Nitrogenase Sequences in *Frankia* and Other Nitrogen-Fixing Microorganisms. *J. Mol. Evol.*, **29**, 436-447.
- NORMAND, P. and LALONDE, M. 1986. The genetics of actinorhizal *Frankia* : a review. *Plant Soil*, **90**, 429-453.
- NORMAND, P., SIMONET, P. and BARDIN, R. 1988. Conservation of *nif* sequences in *Frankia*. *Mol. Gen. Genet.*, **213**, 238-246.
- OCHMAN, H., WHITTAM, T. S., CAUGANT, D. A. and SELANDER, R. K. 1983. Enzyme polymorphism and genetic population structure in *Escherichia coli* and *Shigella*. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 2715-2726.
- OLSEN S.R., COLE L.V., WATANABE F.S. and DEAN L.A. 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. *Circ. U.S. Dep. Agric.*, 939.
- PARSON, W. L., ROBERTSON, L. R. and CARPENTER, C. V. 1985. Characterisation and infectivity of a spontaneous variant isolated from *Frankia* sp. WEY 0131391. *Plant and Soil*, **87**, 31-42.
- PRIN, Y., DUHOUX, E., DIEM, H. G. and DOMMERGUES, Y. R. 1991. Aerial nodulation in *Casuarina cunninghamiana*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 871-874.
- PRIN, Y., MAGGIA, L., PICARD, B., DIEM, H. G. and GOULLET, PH. 1990. Electrophoretic comparison of enzymes from 22 single-spore cultures obtained from *Frankia* strain ORS 140102. *FEMS Microbiol. Lett.*, **77**, 223-228.
- PRIN, Y., NEYRA, M. and DIEM, H.G. 1990. Estimation of *Frankia* growth using Bradford protein and INT reduction activity estimations : application to inoculum standardization. *FEMS Microbiology Letters*, **69**, 91-96.
- PUPPO, A., DIMITRIJEVIC, L., DIEM, H. G. and DOMMERGUES, Y. R. 1985. Homogeneity of superoxide dismutase patterns in *Frankia* strains from Casuarinaceae. *FEMS Microbiol. Lett.*, **30**, 43-46.
- QUISPTEL, A., SVENDENSEN, A. B., SCHRIPEMA, J., BAAS, W. J., ERKELENS, C. and LUGTENBURG, J. 1989. Identification of diptocarpol as isolation factor for the induction of primary isolation of *Frankia* from root nodules of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertner. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2**, 107-112.

- QUISPEL, A. 1960. Symbiotic nitrogen fixation in non-leguminous plants. V. The growth requirements of the endophyte of *Alnus glutinosa*. Act. Bot. Neerl. **9**, 380-396.
- QUISPEL, A. and TAK, T. 1978. Studies on the growth of the endophyte of *Alnus glutinosa* (L.) Vill. in nutrient solutions. New Phytol., **81**, 587-600.
- QUISPEL, A., BURGGRAAF, A. J. P., BORSJE, H. and TAK, T. 1983. The role of lipids in the growth of *Frankia* isolates. Can. J. Bot. **61**, 2801-2806.
- REDDELL, P. and BOWEN, G. D. 1986. Host-*Frankia* specificity within the Casuarinaceae. Plant Soil, **93**, 293-298.
- REDDELL, P. and BOWEN, G. D. 1985. Do nodules of Casuarinaceae contain more than one *Frankia* strain ? Plant Soil, **88**, 275-279
- ROSBROOK, P. A., BURGGRAAF, A. J. P. and REDDELL, P. 1989. A comparison of two methods and different media for isolating *Frankia* from Casuarina root nodules. Plant and soil, **120**, 187-193.
- SADOWSKY, M. J., TULLY, R. E., CREGAN, P. B. and KEYSER, H. H. 1987. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* serogroup 123 and its relation to genotype-specific nodulation of soybean. Appl. Environ. Microbiol., **53**, 2624-2630.
- SAINT-LAURENT, L., BOUSQUET, J., SIMON, L. and LALONDE, M. 1988. Separation of various *Frankia* strains in the *Alnus* and *Elaeagnus* host specificity groups using sugar analysis. Can. J. Microbiol., **33**, 764-772.
- SELANDER, R. K., CAUGANT, D. A., OCHMAN, H., MUSSER, J. M., GILMOUR, M. N. and WHITTAM, T. S. 1986. Methods of Multilocus Enzyme Electrophoresis for Bacterial Population Genetics and Systematics. Appl. Environ. Microbiol., **51**, 873-884.
- SELANDER, R. K., COUGANT, D. A., OCHMAN, H., MUSSER, J. M., GILMOUR, M. N. and WHITTAM, T. S. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Applied and Environmental Microbiology, **51**, 873-884.
- SELANDER, R. K., MCKINNEY, R. M., WHITTAM, T. S., BIBB, W. F., BRENNER, D. J., NOLTE, F. S. and PATTISON, P. E. 1985. Genetic structure of populations *Legionella pneumophila*. J. Bacteriol., **163**, 1021-1037.
- SHIPTON, W. A. and BURGGRAAF, A. J. P. 1983. Aspects of the cultural behaviour of *Frankia* and possible ecological implications. Can. J. Bot. **61**, 2783-2792.

SICILIANO, M and SHAW, C.R. 1976. In Chromatographic and Electrophoretic Techniques (B.L. Smith, Ed.) p. 185, Yearbook Medical Publ., Chicago, IL.

SIMONET, P., THI LE, N., TEISSIER DU CROS, E. and BARDIN, R. 1988a. Identification of *Frankia* Strains by Direct DNA Hybridation of Crushed Nodules. Appl. Environ. Microbiol., **54**, 2500-2503.

SIMONET, P., NORMAND, P. and BARDIN, R. 1988b. Heterologus hybridation of *Frankia* DNA to *Rhizobium meliloti* and *Klebsiella pneumoniae nif* genes. FEMS Microbiol. Lett., **55**, 141-146.

SIMONET, P., NORMAND, P., MOIROUD, A. and BARDIN, R. 1990. Identification of *Frankia* strains in nodules by hybridization of polymerase chain reaction products with strain-specific oligonucleotide probes. Arch. Microbiol., **153**, 235-240.

SIMONET, P., NORMAND, P., MOIROUD, A. and LALONDE, M. 1985. Restriction enzyme digestion patterns of *Frankia* plasmids. Plant and soil, **87**, 49-60.

SIMONET, P., THI LE, N., MOIROUD, A. and BARDIN, R. 1989. Diversity of *Frankia* strains isoled from a single alder stand. Plant Soil, **118**, 13-22.

SOUGOUFARA, B. 1990. La fixation d'azote chez les Casuarinas : amélioration par sélection clonale et quantification par différentes méthodes. Thèse de doctorat, Université de Nancy 1.

SOUGOUFARA, B., DIEM, H. G. and DOMMERGUES, Y. R. 1989. Response of field-grown *Casuarina equisetifolia* to inoculation with *Frankia* strain ORS 021001 entrapped in alginate beads. Plant Soil, **118**, 133-137.

SOUGOUFARA, B., DUHOUX, E., CORBASSON, M. and DOMMERGUES, Y.R. 1987. Improvement of nitrogen fixation by *Casuarina equisetifolia* through clonal selection : a research note. Arid Soil Research and Rehabilitation, **1**, 129-132.

SZECSI, A. and TOTH, S. 1986. Comparison of isolates in the *Chaetomium aureum* species group by esterase isoenzyme analysis. Can. J. Bot., **65**, 198-201.

TISA, L., Mc BRIDE, M. and ENSIGN, J.C. 1983. Studies of growth and morphology of *Frankia* strains EANI pec, EU11c, CpI1 and ACN1AG. Can. J. Bot., **61**, 2768-2773.

TJEPKEMA, J. D., SCHWINTZER, C. R. and MONZ, C. A. 1988. Time Course of Acetylene Reduction in Nodules of Five Actinorhizal Genera. Plant Physiol., **88**, 581-583.

TJEPKEMA, J.D., ORMEROD, W. and TORREY, J.G. 1980. Vesicle formation and acetylene reduction activity in *Frankia* sp. Cp11 cultured in defined nutrient media. *Nature*, London, **287**, 633-635.

TJEPKEMA, J.D., ORMEROD, W. and TORREY, J.G. 1981. Factors affecting vesicle formation and acetylene reduction (nitrogenase activity) in *Frankia* sp. Cp11. *Can. J. Microbiol.*, **27**, 815-823.

TYSON, J. H. and SILVER, W. S. 1979. Relationship of ultrastructure to acetylene reduction (N₂ fixation) in root nodules of *Casuarina*. *Bot. Gaz. (suppl.)*, **140**, S44-S48.

URIEL, J. 1961. Caractérisation des cholinestérases et autres estérases carboxyliques après électrophorèse et immuno-électrophorèse en gélose (application à l'étude des estérases du sérum humain normal). *Ann. Inst. Pasteur*, **101**, 104-119.

URIEL. 1966. Méthode d'électrophorèse dans des gels d'acrylamide-agarose. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **48**, 969-982.

WEBER, C.R. 1966. Nodulating and non-nodulating soybean isolines. In : *Agronomic and chemical attributes*. *Agron. J.*, **58**, 43-46.

WORONIN, M., 1866. Über die bei der Schwarzerle (*Alnus glutinosa*) und der gewöhnlichen Garten-Lupine (*Lupinus mutabilis*) auftretenden Wurzelanschwellungen. *Mém. Acad. Imp. Sci. St. Pétersbourg* 7, 10, 1-13.

ZEFF, R.A. and GELIEBTER, J. 1987. Oligonucleotide probes for genomic DNA blots. *Focus* vol. 9, N° 2, pp. 1-2.

ZHANG, Z., LOPEZ, M. F. and TORREY, J. G. 1984. A comparison of cultural characteristics and infectivity of *Frankia* isolates from root nodules of *Casuarina* species. *Plant and Soil*, **78**, 79-90.

Annexes

Annexe 1 : Caractéristiques physico-chimiques du sol de Bel Air

Composants	Teneur
Argile	4,40 %
Limon fin	0,90 %
Sable fin	92,70 %
Carbone	0,30 %
Azote	0,027 %
P assimilable	105 ppm
P total	276 ppm
pH	7,0

NB : - le sol de Bel Air est un sol peu évolué issu d'une roche mère constituée de sable dunaire quaternaire ;
 - l'azote total a été dosé après minéralisation à l'acide sulfurique concentré ;
 - le P assimilable a été dosé après extraction à NaHCO_3 0,5 M selon la méthode Olsen (Jackson, 1958) ;
 - le P total a été dosé après minéralisation à HNO_3 ;
 - le pH a été mesuré dans un mélange sol-solution de KCl 1N (1/2,5 ; V/V).
 Toutes ces analyses ont été effectuées au laboratoire de chimie de l'ORSTOM de Dakar (Sénégal).

Annexe 2 : Milieu BAP (Murry et al., 1984)

Produit	Quantité
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,05 g/l
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,01 g/l
NH ₄ Cl *	0,267 g/l
propionate de Na	0,48 g/l
FeNaEDTA	0,01 g/l
H ₃ BO ₃	2,86 mg/l
MnCl ₂ , 4H ₂ O	1,81 mg/l
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,22 mg/l
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,08 mg/l
Na ₂ O ₄ Mo, 2H ₂ O	0,025 mg/l
CoSO ₄ , 7H ₂ O	0,001 mg/l
thiamine	10 µg/l
acide nicotinique	50 µg/l
pyridoxine	50 µg/l
biotine	22,5 µg/l
acide folique	50 µg/l
pantothénate de Ca	50 µg/l
agar **	7 g/l
solution tampon	10 ml

Solution tampon	Quantité
(1) KH ₂ PO ₄ à 136,09 g/l	560 ml
(2) K ₂ HPO ₄ à 174,18 g/l	320 ml
ajuster le pH à 6,7 à l'aide des solutions (1) et (2)	

* : non présent dans la solution pour avoir du BAP sans azote

** : seulement pour milieu gélosé

Stérilisé à 120°C durant 20 mn, l'addition du tampon au reste de la solution se fait après stérilisation.

Vérifier que le pH soit à 6,7-6,8

Annexe 3 : Origine des souches de collection utilisées dans notre travail

Souches		Isolée à partir de nodules de	Origine géographique	B.
Références	Noms			
CFN020607	E 03	<i>Casuarina equisetifolia</i>	Dakar, Sénégal	NP
ORS020602	D 11	<i>Casuarina equisetifolia</i>	Dakar, Sénégal	1
ORS020604	G 02	<i>Casuarina equisetifolia</i>	Guadeloupe	1
ORS020606	CeD	<i>Casuarina equisetifolia</i>	Sénégal	2
ORS020607	CeF	<i>Casuarina equisetifolia</i>	FL, USA	2
ORS020609	M 02	<i>Casuarina equisetifolia</i>	Madagascar	3
ORS021007	Cj	hybride : <i>C. equisetifolia</i> x <i>C. junghuhniana</i>	Bangkok	2
ULQ0102001007	AcN1Ag	<i>Alnus crispa</i>	Québec, Canada	4
DDB 13250120	EuI1b	<i>Elaeagnus umbellata</i>	-	5

B : références bibliographiques 1 : Gauthier et al. 1981a ; 2 : Diem et al. 1983 ;
 3 : Nazaret et al. 1989 ; 4 : Lalonde 1979 ; 5 : Baker et al. 1987 ;
 NP : souche isolée par M. Cayon et H.G. Diem, non publié.

Annexe 4 : Milieu NGT

Produit	Quantité	
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,05	g/l
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,01	g/l
NH ₄ Cl	0,267	g/l
propionate de Na	1,5	g/l
FeNaEDTA	0,01	g/l
extrait de levure (Difco)	1	g/l
casamino acide (Difco)	1	g/l
glucose	0,5	g/l
saccharose	0,5	g/l
H ₃ BO ₃	2,86	mg/l
MnCl ₂ , 4H ₂ O	1,81	mg/l
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,22	mg/l
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,08	mg/l
Na ₂ O ₄ Mo, 2H ₂ O	0,025	mg/l
CoSO ₄ , 7H ₂ O	0,001	mg/l
thiamine	10	µg/l
acide nicotinique	50	µg/l
pyridoxine	50	µg/l
biotine	22,5	µg/l
acide folique	50	µg/l
pantothénate de Ca	50	µg/l
solution tampon	10	ml

Solution tampon identique à celle du milieu BAP.

Ajuster le pH à 6,7-6,8.

Stériliser à 120°C durant 20 mn.

Ce milieu a été mis au point à partir du milieu BAP au BSFT par L. Maggia et Y. Prin (non publié).

Annexe 5 : Milieu de Hoagland et Arnon, dilué au 1/4 et sans azote, d'après Sougoufara (1990)

Produit	Quantité	
K ₂ SO ₄	0,109	g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,123	g
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	0,029	g
CaSO ₄ , 2H ₂ O	0,086	g
FeNa EDTA 0,2%	2	ml
H ₃ BO ₃	0,715	mg
Mn Cl ₂ , 4H ₂ O	0,4525	mg
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,055	mg
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,02	mg
Na ₂ O ₄ Mo, 2H ₂ O	6,25	mg
CoSO ₄ , 7H ₂ O	0,25	mg
Eau distillée	1	l

Ajuster le pH à 6,8

Stériliser à 120°C pendant 20 minutes.

Annexe 6 : Liste des amorces et sondes utilisées

N°	Nom	Position dans le génomme de <i>Frankia</i>	Séquence : 5'-3'	Taille (bases)
5	FGPD 913'	<i>nifD</i> : 912-893	GGTCGGGACCTCATCCTCGA	20
6	FGPH 750	<i>nifH</i> : 750-769	GAAGACGATCCCGACCCCGA	20
24	FGPH 256	<i>nifH</i> : 256-275	GAGTCCGGTGGCCCCGGAGCC	20
27*	FGPD 871	<i>nif</i> : 869-894	CCTGTCACCTGCTCC	15
28**	FGPH 547	<i>nifH</i> : 528-543	CGCCTCGGTGGCCTC	15
38	FGPL 2054'	23S : 2683-2700	CCGGGTTTCCCCATTTCGG	18
51	FGPS 1493	16S : 2246-2265	GGCTGGATCACCTCCTTTCT	20

* : oligonucléotide-sonde conforme à la souche CcI3.

** : oligonucléotide-sonde spécifique à la souche D11.

Les positions dans le génome de *Frankia* sont données selon la numérotation attribuée à la séquence de la souche ArI3 (Normand et Bousquet, 1989) pour celles correspondant au gène *nif* et selon la numérotation attribuée à la séquence de la souche CeD (Normand et al., communication personnelle).

Annexe 7 : Positions géographiques des différentes amorces et sondes d'ADN dans le génome de *Frankia* :

a - ITS : extrait de séquence du génome de la souche ORS020606 (CeD), compris entre le gène 16S et le gène 23S (Normand et al., communication personnelle)

2227*

TAGCCGTACCGGAAGGTGC(GGCTGGATCACCTCCTTCT)⁵¹16S AAGGAGCGTCTGGCTGGTCT
 GTCCTGTAGTGGGGTGGGCTGGTGCAGAGCCAGGGCCGGCTGTGGATGCCGGTCTGGTTGCTCG
 TGGGTGGAACGCTGACGATGGGGTTTCGGCTGGTTGTCCGGGTCTAGTACTCCTCTGTCTTAT
 CTTCCGGTGGGGTGGGGGGTGAACGGTCCGGGTGGGTGGCTGGGGTCCGTGGCACGCTGTTGG
 GTCTGAGGGAGTGAGGCTCTCTCGGCTGGTGGGTTCCGTGTGCTGTGGTCTGGTGGGGATCGT
 GTGGGGGGTCTGCTGGTGAACGGACCGGTGCTGGTGGAGGACTGCC^{23S}TCCCCTGGGTGGGGG
 TGGGTTTCGCCGGTTCGGCTGGGGCCGTCCGTACGTTGAGAAGTGCACAGTGGACGCGAGCATC
 TTTGT^{23S}GGCCAAGTTATTAAGGGCGCACGGTGGATGCCTTGGCACCAGGAGCCGATGAAGGA
 CGTGGGAGGCTGCGATATGCCTCGGGGAGCTGTCAACCGAGCTGTGATCCGAGGATTT(CCGAAT
 GGGAAACCCGG)³⁸CAGGGCTTTAAATCCTGTC
 2719*

51 : position de l'amorce n° 51 ; 16S : fin du gène 16S ; 23S : début du gène 23S ; 38 : position de l'amorce n° 38, * : position de la séquence décrite dans le génome de la souche ORS 020606.

b - *nif* : extrait de séquence du gène *nifH* de la souche ArI3 (Normand et al., 1988)

1*

ATGCGCCAGATCGCCTTCTACGGCAAGGGTGGTATTGGCAAGTCCACCACCCAGCAGAACACCA
 TGGCGGCCATGGCCGAGATGGGCCAGCGGGTCATGATCGTCCGGTGTGACCCGAAGGCTGACTC
 GACCCGCTGATCCTGCACTCGAAGGCGCAGACCTCCGTCATCCAGCTCGCGGCCGAGAAGGG
 TTCGGTCGAGGACCTGGAGCTCGACGAGGTGCTCGTCGAGGGCCAGTGGGGCATCAAGTGCCTC
 (GAGTCCGGTGGCCCGGAGCC)²⁴GGGCGTCGGCTGCGCCGGCCGTGGCGTCATCACCTCCATCA
 CCTACCTGGAGGAGGCCGGCGCGTACGAGAACCTCGACTTCGTGACCTACGACGTCCTCGGTGA
 CGTTGTGTGGTGGCTTCGCGATGCCGATCCGCCAGGGCAAGGCGCAGGAGATCTACATCGTC
 ACCTCCGGCGAGATGATGGCGATGTACGCGCGCAACAACATCGCCCAGGCATCCTGAAGTAC
 GCGCACTCCGGCGGGCTCCG(GCTCGGCGGGCTCAT)²⁸CTGCAACAGCCGCAAGACCGACGGCG
 AGGACGAGCTGATCATGGAGCTCGCCCCCGCCTCAACACCCAGATGATCCACTTCATCCCGCG
 TAACAACGTCGTGCAGCAGGCCGAGCTGCGCCGGATGACGGTCATCGAGTACGACCCGAAGAA
 CAGCCAGGCCGACGAGTACCGCCAGCTCGCCAACAAGATCGTCAACAACGACAT(GAAGACGAT
 CCCGACCCGA)⁶TCACAATGGACGAGCTCGAGGAGCTCCTCATCGACTTCGGGATCATGGCGC
 AGGAGGACGAGAGCGTGATCGGCAAGGCCCGCGGGTCGCCTGACGATCCC(ACGCCACCTGC
 ACC)²⁷GACACC(GTCGAGGATGAGGTCCCGAC)⁵CATGACGACGACACCGGCACCC
 933*

24 : position de l'amorce n° 24 ; 28 : zone correspondante à la sonde n° 28 pour la souche ArI3 ; 6 : position des amorces n° 6 ; 27 : zone correspondante à la sonde n° 27 pour la souche ArI3 ; 5 : position de l'amorce n° 5, * : position de la séquence décrite dans le génome de la souche ArI3.

Annexe 8 : Gels et solutions pour électrophorèses d'ADN

1 - Gel d'agarose à 2% :

- 4 g d'agarose
- 200 ml de TBE 1x
- Faire chauffer au microonde : 3 min. à 100% de puissance
- Couler le gel
- Laisser refroidir avant emploi

- Dépôt par puits : 5 µl de la solution à contrôler mélangée à 5 µl de bleu tampon.

Dans ce travail, tous les gels de contrôle d'extraction d'ADN ou d'amplification d'un fragment d'ADN sont faits à 2% d'agarose.

Les gels d'étude du polymorphisme des fragments de restriction sont des gels à 4 % d'agarose NuSieve, il faut donc remplacer les 4 g d'agarose par 8 g d'agarose NuSieve.

2 - Electrophorèse en gel de polyacrylamide :

- Gel à 8% :
 - . acrylamide : 1,9 g
 - . bisacrylamide : 0,1 g
 - . urée : 10,5 g
 - . TBE 5x : 5 ml
 - . persulfate à 10% : 0,175 ml
 - . TEMED : 5 µl
 - . eau distillée stérile : qsp à 25 ml

- Polymérisation du gel : une demie journée au froid
- Tampon de migration : TEB 1x
- Dépôts : 10 ml = 5 ml d'ADN digéré + 5 ml de bleu tampon
- Migration à 350 Volt durant 1 heure 30 min.

Remarques : . acrylamide et bisacrylamide sont à mettre juste avant de couler le gel, car le polymérise.

. Consiels avant de couler le gel : celler les plaques avec de l'agarose à 7% afin d'empêcher les fuites par la suite. Mettre les plaques un moment à l'étuve à 80°C pour les chauffer et éviter, lors du coulage de l'agarose, qu'il ne prenne tout au même endroit et ne s'étale pas le long des jointures.

3.- Tampon de migration des gels d'ADN : 1 x TBE

- Diluer au 5^{ième} du 5 x TBE,

- 5 x TBE :

- . 54 g de Tris base,
- . 27,5 g d'acide borique,
- . 20 ml d'EDTA 0,5 M au pH 8,
- . 1 l d'eau distillée.

4 - Coloration du gel d'ADN :

La coloration est obtenue en immergeant le gel après migration, environ 20 mn dans un bain de bromure d'éthidium (Bet) à 0,5 µg/ml.

5 - Lecture des gel d'ADN :

La lecture des gels d'ADN se fait sous éclairage U.V. (302 nm). Une photographie du gel peut alors être faite.

6 - Tampon bleu :

- Bleu de bromophénol

7 - Solution de Ladder :

- 10 µl de 123 pb DNA Ladder (Boehringer, réf. : 5 613 SA/SB),
- 40 µl de TE (pH = 7,5),
- 50 µl de tampon bleu,
- conservée à +4 °C.

Annexe 9 : Extraction, amplification et profils d'hybridation de l'ADN des souches de *Frankia*

Souches testées	Gel :			Série n° 1 (amorces : 24-5)			Série n° 2 (amorces : 6-5)		
	extraction d'ADN	Amplification amorces : 24-5	sonde n° 27 "froide"	sonde n° 27 "chaude"	sonde n° 28 "chaude"	Amplification amorces : 6-5	sonde n° 27 "froide"	sonde n° 27 "chaude"	
Ténoim	0	0	0	0	0	NT	NT	NT	
Ténoim	0	NT	NT	NT	NT	0	0	0	
Ban 01	+	2	+	+	0	1	+	+	
Ban 02	+	NT	NT	NT	NT	1	+	+	
Ban 03	+	2	+	+	0	1	+	+	
Ban 04	+	NT	NT	NT	NT	1	+	+	
Ban 05	+	2	+	+	0	1	+	+	
Ban 06	+	2	+	+	0	1	+	+	
Ban 07	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ban 08	NT	2	+	0	0	1	+	+	
Ban 09	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ban 10	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ban 11	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ban 12	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ban 13	NT	2	+	+	0	1	+	+	
CeD	NT	ND	ND	ND	ND	0	ND	ND	
D 11	NT	1	0	0	+	1	0	0	
Die 01	+	NT	NT	NT	NT	1	+	+	
Die 02	NT	1*	0	0	0	1	0	0	
Die 03	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Die 06	+	NT	NT	NT	NT	0	ND	ND	
Dji 01	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Dji 02	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Dji 03	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Dji 04	+	NT	NT	NT	NT	1	+	+	
Dji 05	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Kar 02	0	NT	NT	NT	NT	0	ND	ND	
Kar 03	+	NT	NT	NT	NT	2	0	0	
Kar 04	NT	0	ND	ND	ND	1	+	+	
Kar 05	+	NT	NT	NT	NT	2	0	0	
Mal 02	NT	0	ND	ND	ND	1	+	+	
Mal 03	+	NT	NT	NT	NT	1	0	0	
Mal 05	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Mal 06	NT	0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
Mil 01	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Mil 02	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Mil 03	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Mil 04	+	NT	NT	NT	NT	1	+	+	
Mil 05	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Mil 06	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Mil 07	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Mil 08	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Mil 09	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Mil 10	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Mil 11	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Mil 12	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Mil 13	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Sam 01	NT	0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
Saw 01	+	NT	NT	NT	NT	1	+	+	
Ser 01	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ser 02	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ser 03	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ser 04	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ser 05	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ser 06	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ser 07	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ser 09	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ser 10	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ser 11	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ser 12	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ser 13	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ser 14	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ser 15	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ser 16	+	NT	NT	NT	NT	1	+	+	
Ser 17	+	NT	NT	NT	NT	1	+	+	
Ser 18	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ser 19	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ser 20	0	NT	NT	NT	NT	1	+	+	
Ser 21	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ser 22	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ser 23	NT	2	+	+	0	1	0	+	
Ser 24	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ser 26	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ser 27	0	NT	NT	NT	NT	1	+	+	
Ser 28	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ser 29	NT	2	+	+	0	1	+	+	
Ser 30	NT	2	+	0	0	1	+	+	

NT : non testés

ND : non déterminé faute d'amplification réussie

Amplifications : 0, 1 ou 2 bandes apparaissent sur le gel de contrôle

* : pouvoir de migration différent par rapport aux bandes des autres profils de la même série.

Annexe 10 : Récapitulatif des résultats obtenus à l'issue de chaque caractérisation

Souches	Groupes : d'infectivité de RFLP estérasique -effectivité sonde				Souches	Groupes : d'infectivité- effectivité de RFLP estérasique sonde			
Ban 01	NT	1	1	1	Mil 03	3	1	1	1
Ban 02	NT	1	4	1	Mil 04	3	1	1	1
Ban 03	NT	1	4	1	Mil 05	3	1	4	1
Ban 04	NT	1	3	1	Mil 06	3	1	1	1
Ban 05	NT	1	3	1	Mil 07	3	1	1	1
Ban 06	3	1	3	1	Mil 08	3	1	1	1
Ban 07	2	1	4	1	Mil 09	3	1	1	NT
Ban 08	3	1	1	1	Mil 10	NT	1	1	1
Ban 09	3	1	1	1	Mil 11	3	1	1	1
Ban 10	3	1	1	1	Mil 12	2	1	1	1
Ban 11	3	1	1	NT	Mil 13	3	1	1	1
Ban 12	3	1	1	1	Sam 01	NT	ND	4	4
Ban 13	3	1	1	1	Saw 01	3	1	1	NT
Cap 01	3	NT	NT	NT	Ser 01	3	1	1	NT
CeD	NT	ND	1	NT	Ser 02	3	1	1	NT
CeF	3	NT	1	2	Ser 03	3	1	1	2
Cj	(3) ¹	NT	1	1	Ser 04	3	1	1	2
D 11	(1) ²	2	2	3	Ser 05	3	1	4	2
Die 01	3	1	4	1	Ser 06	NT	1	1	2
Die 02	2	0	ND*	NT	Ser 07	3	1	1	2
Die 03	3	1	1	1	Ser 09	3	1	1	2
Die 06	NT	ND	1	NT	Ser 10	3	1	1	2
Dji 01	NT	1	1	1	Ser 11	3	1	1	2
Dji 02	3	1	1	2	Ser 12	3	1	1	2
Dji 03	NT	1	1	2	Ser 13	3	1	1	NT
Dji 04	3	1	1	1	Ser 14	3	1	1	NT
Dji 05	3	1	ND*	2	Ser 15	3	1	1	2
Dji 06	3	NT	1	1	Ser 16	3	1	1	NT
E 03	NT	NT	1	1	Ser 17	3	1	1	NT
G 02	(1) ²	NT	2	3	Ser 18	3	1	1	NT
Kar 01	NT	NT	4	NT	Ser 19	3	1	4	2
Kar 02	2	ND	ND	4	Ser 20	3	1	1	NT
Kar 03	NT	0	ND	4	Ser 21	3	1	1	NT
Kar 04	NT	1	ND	4	Ser 21 no (<i>H. rhamnoides</i>)	NT	2	2	NT
Kar 05	2	0	4	4	Ser 22	3	1	1	NT
M 02	3	NT	1	1	Ser 23	2	1	ND	2
Mal 01	NT	NT	4	NT	Ser 24	3	1	1	2
Mal 02	NT	1	4	NT	Ser 25	3	NT	NT	NT
Mal 03	3	0	4	4	Ser 26	3	1	1	2
Mal 04	NT	NT	4	NT	Ser 27	3	1	1	2
Mal 05	2	1	1	1	Ser 28	3	1	ND	2
Mal 06	NT	ND	4	NT	Ser 29	3	1	1	2
Mil 01	3	1	1	1	Ser 30	3	1	ND	2
Mil 02	NT	1	ND*	1	Tio 02	NT	NT	4	NT

NT : non testée ;

ND : non déterminé par faute d'amplification réussie ou matériel obtenu trop peu important (*) ;

()^x : x=1 : Diem et al. 1983, x=2 : Gauthier et al. 1981b et Diem et al. 1982 ;

groupes de sonde : 0 pour les souches n'ayant eu que des réponses négatives au test d'hybridation avec l'une ou l'autre des 2 sondes ; 1 pour celles ayant eu une réponse positive au test d'hybridation avec la sonde n° 27 ; 2 pour celles ayant eu une réponse positive au test d'hybridation avec la sonde n° 28.

ISBN : 2-7099-1084-5
Éditions de l'ORSTOM
72, route d'Aulnay
93143 BONDY Cedex