



Phylogénie et évolution du genre Frankia

Imen Nouioui

► To cite this version:

Imen Nouioui. Phylogénie et évolution du genre Frankia. Biologie végétale. Université Claude Bernard - Lyon I; Université de Tunis. Faculté des sciences de Tunis, 2014. Français. NNT : 2014LYO10087 . tel-01089349

HAL Id: tel-01089349

<https://theses.hal.science/tel-01089349>

Submitted on 1 Dec 2014

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

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

N° d'ordre 87 – 2014

Année 2014

THÈSE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE : Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 Août 2006)

Soutenue publiquement le 23 juin 2014 par

M^{elle} Imen NOUIOUI

Phylogénie et Évolution du genre *Frankia*

Directeurs de thèse : Maria P. FERNANDEZ & Maher GTARI

Jury :

M. Abdellatif Boudabous	Professeur à l'Université Tunis El Manar	Président
M. Ridha Mhamdi	Professeur au Centre de Biotechnologie de Borj Cédria	Rapporteur
M. Sergio Svistoonoff	Chargé de recherche à l'IRD, Montpellier	Rapporteur
M. Maher Gtari	Professeur à l'Université de Carthage	Examineur
Mme. Maria P. Fernandez	Professeur à l'Université Lyon 1	Examineur
M. Philippe Normand	Directeur de Recherche CNRS à l'Université Lyon 1	Examineur

Dédicaces

Je tiens à dédier ce travail :

A mes parents

*Qui m'ont permis de faire les études et qui m'ont toujours soutenue moralement
et financièrement*

*Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma grande affection et mon éternelle
reconnaissance pour leur soutien constant, leur dévouement et leur confiance,*

Je leurs dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain

A mes sœurs et mes frères

*Pour leurs encouragements tout au long de ces années et pour tous nos bons
moments passés ensemble et pour les liens solides qui nous unissent.*

A toute la famille NOUIOUI et GUEHIOUECHE

Enfin à tous ceux qui m'ont aidé à devenir ce que je suis.

REMERCIEMENT

Ce travail de thèse a été réalisé en cotutelle au sein du Laboratoire Microorganismes et Biomolécules Actives de la Faculté des Sciences de Tunis (LMBA-FST), Université Tunis El Manar et le Laboratoire d'Ecologie Microbienne UMR557 CNRS, à la Faculté des Sciences et Technologies à Lyon, Université Claude Bernard Lyon1, France. J'exprime ici ma profonde reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont guidée et soutenue avec amabilité tout au long de ce travail.

Je n'oublierai pas de remercier très cordialement les responsables de la coopération universitaire franco-tunisienne aussi bien au niveau du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique à Tunis qu'au niveau de l'Institut Français de Coopération pour avoir financier mes séjours à Lyon durant mon parcours de thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier trois personnes : Monsieur **Abdellatif Boudabous**, Professeur à la Faculté des Sciences Tunis et directeur du Laboratoire Microorganismes et Biomolécules Actives (MBA), Monsieur **Philippe Normand**, Directeur de recherche CNRS à l'Université Lyon 1 et Monsieur **Yvan Moëgne-Loccoz**, directeur de l'UMR CNRS 5557 d'Ecologie Microbienne, de m'avoir accueilli dans leur équipe de recherche. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je suis profondément reconnaissante à Monsieur **Maher Gtari**, Professeur à l'Institut Nationale des Sciences Appliquées et de Technologie et directeur de cette thèse, pour m'avoir plus qu'aider et soutenue au-delà de toute espérance tout au long de mon travail, depuis mon master. Merci de m'avoir fait confiance dès le début. Grâce à vous j'ai appris à aimer ce métier. Merci pour vos conseils judicieux, vos qualités humaines et vos encouragements qui m'ont permis de conduire ce travail jusqu'à son terme. Que vous trouviez ici toute l'expression de mes remerciements et de mon profond respect.

Mes sincères remerciements à Madame **Maria P. Fernandez**, Professeur à l'Université Lyon 1, d'avoir acceptée de co-diriger ce travail, de m'avoir toujours soutenue et de m'avoir fait partager ses nombreuses connaissances.

Je remercie vivement Monsieur **Abdellatif Boudabous**, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis d'avoir accepté de présider le jury d'évaluation.

Toute ma reconnaissance va également à Monsieur **Ridha Mhamdi**, Professeur au Centre de Biotechnologie de Borj Cédria (CBBC) à Tunis et Monsieur **Sergio Svistoonoff**, chargé de recherche à l'IRD de Montpellier, rapporteurs de cette thèse, pour leurs conseils précieux. Qu'ils trouvent ici le témoignage de mes sincères remerciements.

J'adresse aussi mes vifs remerciements à Monsieur **Philippe Normand**, Directeur de recherche CNRS à l'Université Lyon 1, d'avoir accepté de juger ce travail.

Mes plus vifs remerciements à Mr Atef Jaouani, Mr Ameer Chérif, Mme Imen Ouzari, Mr Karim Ben Slama, Mr. Skander Gharbi et Mme Naouel Klibi du laboratoire de Microorganismes et Biomolécules Actives de Tunis (LMBA) pour leur sympathie et leur soutien.

Je remercie également tous mes collègues et les techniciens (es) de LMBA de Tunis sans exception pour la belle ambiance du laboratoire qui restera gravée dans ma mémoire.

J'adresse aussi mes remerciements à tous les membres du laboratoire d'Ecologie Microbienne UMR5557 à Lyon sans exception et plus particulièrement à tous mes compagnons de l'équipe symbiose actinorhizienne pour les discussions fructueuses que j'ai eu avec eux durant mes séjours à Lyon et l'ambiance chaleureuse assez particulière.

Un grand Merci à Faten, Imen, Imed, Haithem, Mohamed, Olfa, Lorena, Adrien, Aude, Laetitia, Hugo, Hasna, Clément et Pierre pour leur soutien et pour tous les moments de franche insouciance.

Enfin je remercie tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à l'élaboration de cette thèse. Qu'ils trouvent tous les termes de remerciement et de gratitude.

Ce travail a été financé dans le cadre de programme PHC-Utique CMCU n°09G0916.

Sommaire

Résumé.....	1
Abstract.....	2
Liste des figures.....	3
Liste des tableaux.....	4
Abréviations.....	5
Introduction générale.....	6
I. Le genre <i>Frankia</i>	7
1. Taxonomie du genre <i>Frankia</i>	7
2. Plante hôte.....	8
3. Morphologie.....	9
4. Physiologie.....	11
5. Chimiotaxonomie.....	13
6. Génétique et génomique.....	14
6.1. Hybridation ADN/ADN.....	15
6.2. Phylogénie moléculaire.....	18
6.2.1. Gènes ribosomiques.....	19
6.2.2. Gènes de la nitrogénase.....	21
6.2.3. Gènes de la glutamine synthétase.....	23
II. Intérêt du genre <i>Frankia</i>	23
1. Fixation symbiotique de l'azote.....	23
2. Métabolites et activités enzymatiques.....	25
Matériel et méthodes	
I. Origine, culture et conservation des souches de <i>Frankia</i>	27
II. Origine des nodules de <i>Coriaria</i> utilisés.....	27
III. Piégeage.....	27
IV. Manipulation de l'ADN.....	28
1. Extraction d'ADN génomique à partir des souches de <i>Frankia</i>	28
2. Extraction d'ADN à partir des nodules.....	28

3. Dosage d'ADN.....	29
4. Amplification par polymérisation en chaîne (PCR).....	29
5. Electrophorèse.....	29
5.1. Electrophorèse classique.....	29
5.2. Electrophorèse capillaire.....	29
6. Purification des fragments d'ADN.....	31
7. Clonage des produits PCR.....	32
8. Séquençage.....	32
V. Traitement des résultats	32

Résultats et discussion

Chapitre I. Phylogénie et diversité du genre *Frankia*

A. Etude de la variabilité des ITS 16S-23S de l'ADNr du genre <i>Frankia</i>	34
1. Résultats.....	34
2. Discussion.....	37
3. Publication	38
B. Etude phylogénétique du genre <i>Frankia</i> basée sur le séquençage des trois loci <i>gyrB</i> , <i>nifH</i> et <i>glnII</i>	39
1. Résultats.....	39
1.1. Diversité et phylogénie du genre <i>Frankia</i> basée sur le gène <i>gyrB</i>	39
1.2. Diversité et phylogénie du genre <i>Frankia</i> basée sur le gène <i>nifH</i>	40
1.3. Diversité et phylogénie du genre <i>Frankia</i> basée sur le gène <i>glnII</i>	40
1.4. Phylogénie des souches de <i>Frankia</i> basée sur les séquencesconcaténées des trois loci <i>gyrB</i> , <i>glnII</i> et <i>nifH</i>	42
2. Discussion.....	42
3. Publication	44

Chapitre II. Ecologie évolutive du groupe 2 de *Frankia* non cultivable

A. Etude de la cospéciation chez la symbiose <i>Frankia-Coriaria</i>	45
1. Résultats.....	45
2. Discussion.....	47
3. Publication.....	51

B. Détection des <i>Frankia</i> du groupe 2 dans des sols dépourvus de plantes hôtes	
Compatibles.....	52
1. Résultats.....	53
2. Discussion.....	54
3. Publication.....	55
Conclusion générale et perspectives.....	56
Références bibliographiques.....	59
Annexes.....	77
Autres publications	

Résumé

Frankia est une actinobactérie symbiotique de 8 familles de plantes actinorhiziennes. Elle est connue par sa capacité à fixer l'azote moléculaire. La taxonomie et la phylogénie du genre *Frankia* reste incomplète et à explorer. Les objectifs de cette thèse sont d'apporter des connaissances supplémentaires sur la position phylogénétique et l'évolution des différents groupes d'infectivité du genre *Frankia*. Dans un premier temps, une phylogénie moléculaire basée sur les gènes *glnII*, *nifH*, *gyrB* et des ITS 16S-23S de l'ADNr a été réalisée. Le résultat de cette étude souligne la présence de quatre groupes de *Frankia* : (i) le groupe 1 associe les souches infectives des Betulaceae, Myricaceae et Casuarinaceae ; (ii) le groupe 2 des microsymbiotes obligatoires associés aux Coriariaceae, Datisceae, Rosaceae et *Ceanothus* (Rhamnaceae); (iii) le groupe 3 de souches d'Elaeagnaceae, Rhamnaceae, Myricaceae et *Gymnostoma* (Casuarinaceae) et (iv) le groupe 4, à position ancestrale, renferme les souches atypiques non fixatrices d'azote et/ou non infectives. Le groupe 3 aurait émergé à partir du groupe 4, alors que les groupes 1 et 2 sont les groupes qui ont émergé plus récemment. Dans cette thèse, nous avons montré que la concaténation des séquences des trois gènes (*glnII*, *nifH* et *gyrB*) semble être un outil puissant pour une meilleure étude évolutive afin de contourner l'influence du phénomène de transfert horizontal des gènes sur la phylogénie du genre *Frankia*. Par ailleurs, nous avons remarqué que la faible variabilité génétique est associée à la régression de taille des génomes de *Frankia* et coïncide avec des transitions de mode de vie symbiotique et une répartition géographique restreinte (le cas des *Frankia*-*Casuarina* et des *Frankia* non cultivables du groupe 2). Dans un second temps, nous avons focalisé nos recherches sur le modèle *Frankia*-*Coriaria*. Nous avons défini quatre groupes de *Frankia* endosymbiotes et deux groupes pour les *Coriaria* en se basant sur les séquences de trois marqueurs, *glnA* (glutamine synthétase), *dnaA* (amorceur de réplication des chromosomes) et l'IGS *nifD*-K (l'espace intergénique entre les gènes *nifD* et *nifK* codant pour les sous-unités alpha et beta de la protéine molybdène-fer) pour les *Frankia* microsymbiotes et deux régions d'ADN, *matK* (maturase chloroplastique) et ITS1- 2 (ARNr 18S - ITS1 - ARNr 5.8S - ITS2 - ARNr 28S) pour la plante hôte. L'analyse phylogénétique de deux partenaires symbiotiques, *Frankia* et son hôte respectif, montre l'absence de cospéciation. Ce résultat est cohérent avec celui de dernier chapitre dont nous avons montré, pour la première fois, l'occurrence de *Frankia* compatibles avec *Coriaria* dans un sol tunisien, dépourvu de la plante hôte depuis plus de deux siècles. Ce résultat est un bon argument de l'indépendance de *Frankia* microsymbiote de la plante hôte *Coriaria* et met en question la non cultivabilité des *Frankia* du groupe 2.

Mots clés : *Frankia*, plantes actinorhiziennes, phylogénie, *glnA*, *gyrB*, *glnII*, *glnA*, IGS *nifD*-K, ITS 16S-23S, ITS1-2, *matK*, évolution, approche moléculaire.

Abstract

Frankia is an actinobacterium best known for its ability to fix molecular nitrogen and infect the roots of 8 actinorhizal plant families. The Taxonomy and the phylogeny of the *Frankia* genus remain incomplete and have to be more explored. The objective of this thesis is to provide additional knowledge on the phylogeny and evolution of different *Frankia* groups. Firstly, the molecular phylogeny based on the analysis of *glnII*, *gyrB*, *nifH* genes, and 16S–23S rRNA internally transcribed spacer (ITS) sequences was carried out. The result of this study emphasized the presence of four *Frankia* clusters: (i) cluster 1 for *Frankia* associated with Betulaceae, Myricaceae and Casuarinaceae (ii) cluster 2 contains *Frankia* microsymbionts associated with Coriariaceae, Datisceae, Rosaceae and *Ceanothus* (Rhamnaceae), (iii) cluster 3 for *Frankia* of Elaeagnaceae, Rhamnaceae, Myricaceae and *Gymnostoma* (Casuarinaceae) and (iv) cluster 4 including atypical *Frankia* strains that are non-infective and/or non-nitrogen-fixing was positioned at a deeper branch followed by group 3. While clusters 1 and 2 appeared to have diverged more recently. The present study demonstrates the utility of phylogenetic analyses based upon concatenated *gyrB*, *nifH* and *glnII* sequences to resolve previously unresolved or poorly resolved nodes and will help describing species among the genus *Frankia*. The variation of the average pairwise distance within and between the clusters allows us to suggest a gradual erosion of *Frankia* diversity concomitantly with a shift from saprophytic non infective/non-effective to facultative and symbiotic lifestyle. Then, we focused on the cluster 2 of non-culturable *Frankia* in general and special focus on *Frankia* associated with *Coriaria*. The absence of cospeciation between the uncultured *Frankia* microsymbionts and the disjunct actinorhizal *Coriaria* species has been shown. These results were obtained following analysis of three bacterial genes; *glnA* (glutamine synthetase), *dnaA* (chromosome replication initiator) and the *nifD-K* IGS (intergenic spacer between genes coding respectively for nitrogenase molybdenum-iron alpha and beta subunits) and two DNA regions of the host plants; *matK* (chloroplast-encoded maturase K) and the intergenic transcribed spacers (nuclear-encoded 18S rRNA-ITS1-5.8S rRNA-ITS2-28S rRNA). This result is consistent with the last chapter in which we showed, for the first time, the occurrence of compatible *Frankia* with *Coriaria* in a Tunisian soil, devoid of the host plant for more than two centuries. This represents a first argument for the independence of *Frankia* nodulating *Coriaria* to their host plants.

Key words: *Frankia*, actinorhizal plant, phylogeny, molecular approach, evolution, *glnA*, *gyrB*, *glnII*, *glnA*, IGS *nifD-K*, ITS 16S-23S rDNA, ITS1-2, *matK*.

Liste des figures

Figure 1	Phylogénies comparées des plantes actinorhiziennes et leur partenaire symbiotique <i>Frankia</i>	10
Figure 2	Morphologie de <i>Frankia</i> .	13
Figure 3	Dendrogramme des actinobactéries basé sur la comparaison des séquences de l'ADNr 16S.	21
Figure 4	Arbre de Maximum de vraisemblance basé sur les séquences de gène <i>nifH</i> des actinobactéries non <i>Frankia</i> .	24
Figure 5	Arbre Neighbor-Joining basé sur les séquences des acides aminés de glutamate synthétase codé par le gène <i>glnII</i> .	26
Figure 6	Arbre des relations phylogénétiques entre les souches du genre <i>Frankia</i> , établi par Neighbor-Joining sur la base des séquences intergéniques ITS 16S-23S	38
Figure 7	Arbre des relations phylogénétiques entre les souches du genre <i>Frankia</i> , construit par Maximum de vraisemblance, sur la base des séquences <i>gyrB</i> , <i>nifH</i> et <i>glnII</i>	43
Figure 8	Arbre des relations phylogénétiques entre les souches du genre <i>Frankia</i> , construit par Maximum de Vraisemblance sur la base des séquences concaténées, de <i>gyrB</i> , <i>nifH</i> et <i>glnII</i> (a). Arbre phylogénétique basé sur les séquences de l'ADNr 16S (b)	45
Figure 9	Arbres des relations phylogénétiques entre les souches du genre <i>Frankia</i> (à gauche) et les espèces du genre <i>Coriaria</i> (à droite), construits par Maximum de vraisemblance et basés sur les séquences concaténées de <i>glnA</i> , <i>dnaA</i> et l'IGS <i>nifD-K</i> pour <i>Frankia</i> ainsi que <i>matK</i> et ITS1-ITS2 pour <i>Coriaria</i> (dénomination des groupes 1 et 2 de <i>Coriaria</i> selon Yokoyama et al, 2000)	50
Figure 10	Répartition géographique des espèces de <i>Coriaria</i>	51
Figure 11	Piégeage de <i>Frankia</i> endosymbiote de <i>C. myrtifolia</i>	55
Figure 12	Arbres des relations phylogénétiques entre les souches du genre <i>Frankia</i> piégées, construit par Neighbor-Joining basée sur des séquences de <i>glnA</i>	56

Liste des tableaux

Tableau 1	Les plantes actinorhiziennes	11
Tableau 2	Les groupes physiologiques du genre <i>Frankia</i>	14
Tableau 3	Caractéristiques des genres apparentés au genre <i>Frankia</i>	16
Tableau 4	Les souches de <i>Frankia</i> à génome séquencé	18
Tableau 5	Intérêt de différentes espèces des plantes actinorhiziennes	28
Tableau 6	Liste des amorces utilisées	32
Tableau 7	Composition du mélange réactionnel des PCR	33
Tableau 8	Programme d'amplification par PCR	33

Abréviations

ADN Acide désoxyribonucléique

AFLP Polymorphisme de Longueur des Fragments Amplifiés

ARISA Analyse automatique de l'espaceur intergénique ribosomal

ARN Acide ribonucléique

ARNr Acide ribonucléique ribosomique

BET Bromure d'éthidium

CTAB Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

DDH Hybridation ADN/ADN

EDTA Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid

GC Guanine cytosine

IGS Intergenic spacer

ITS Inter transcribed spacer

Mpb Méga paire de base

Myr Million years

nt nucléotide

Pb paire de bases

PCR Polymerase Chain Reaction

RFLP Restriction Fragment Length Polymorphism

TBE Tris-borate-EDTA buffer

TE Tris-EDTA buffer

Tris Tris hydroxy méthyl amino méthane

16S Petite sous unité de l'ADNr des procaryotes

23S Grande sous-unité de l'ADNr des procaryotes

18S Petite sous unité de l'ADNr des eucaryotes

28S Grande sous-unité de l'ADNr des eucaryotes

INTRODUCTION

Introduction Générale

Frankia est le genre type de la famille des Frankiaceae (Normand et Benson, 2012), connu pour sa capacité à fixer l'azote moléculaire et à établir une symbiose avec 8 familles de plantes actinorhiziennes (tableau 1) (Lechevalier et Lechevalier, 1984; 1989). Cette symbiose a un grand intérêt écologique et environnemental. Ce genre unique constitue un assemblage monophylétique d'actinobactéries du sol (Gtari et al, 2013). Il est classé avec les familles des Geodermatophilaceae, Nakamurellaceae, Sporichthyaceae, Cryptosporangiaceae et Acidothermaceae dans l'Ordre des Frankiales au sein du phylum des Actinobacteria. Le genre *Frankia* est représenté par des bactéries filamenteuses à morphologie unique parmi l'ordre des Actinomycétales : hyphes abondamment ramifiés, sporanges multiloculaires et structures spécialisées de la fixation d'azote appelées diazovésicules.

Selon la nomenclature binaire, aucune espèce au sein du genre *Frankia* n'a été validée, (excepté *Frankia alni*) malgré les différentes études basées sur des critères : chimiotaxonomiques (Lechevalier, 1994), physiologiques, métaboliques et sérologiques (Lechevalier, 1984; Dobritsa, 1998), la spécificité d'hôte (Baker, 1987), et l'hybridation ADN-ADN (Fernandez et al, 1989; Akimov et Dobritsa, 1992; Lumini et al, 1996).

La phylogénie moléculaire basée sur les séquences du gène d'ARNr 16S a toutefois permis de définir 4 groupes de souches associées respectivement avec les familles de plantes (i) Betulaceae, Casuarinaceae et Myricaceae, (ii) Elaeagnaceae, Rhamnaceae, Myricaceae et *Gymnostoma* (Casuarinaceae), (iii) Coriariaceae, Datisceae, Rosaceae et *Ceanothus* (Rhamnaceae) et (iv) un quatrième groupe renferme des souches atypiques non infectives et/ou non fixatrices d'azote (Normand et al, 1996).

Les objectifs des travaux de cette thèse se relient à l'approfondissement de la phylogénie et l'évolution du genre *Frankia*. Dans une première partie, la reconstitution de la phylogénie du genre *Frankia* a été réalisée en utilisant d'une part les séquençages des gènes *nifH*, *gyrB* et *glnII* et d'autre part les séquences des espaces intergéniques ITS de l'ADNr 16S-23S. Dans une deuxième partie, l'hypothèse de la cospéciation de deux partenaires de la symbiose actinorhizienne a été évaluée en utilisant le modèle *Frankia-Coriaria*. Trois régions d'ADN pour les microsymbiotes du genre *Frankia* (*glnA*, *dnaA* et IGS *nifD-K*) et deux régions pour les espèces de plantes hôtes du genre *Coriaria* (ITS1-2 et *matK*), collectées sur cinq aires de

répartition géographique très éloignées, ont été séquencées et analysées. En outre, une étude de détection de *Frankia* ayant un spectre d'infectivité vis-à-vis de *Coriaria myrtifolia* dans un sol dépourvu de la plante hôte depuis plus de deux siècles a été effectuée. Une caractérisation phénotypique (observation microscopique d'une coupe histologique) et moléculaire (amplification du gène *glnA*) des *Frankia* endosymbiotes piégés ont été réalisées.

I. Le genre *Frankia*

1. Taxonomie du genre *Frankia*

Le microorganisme *Frankia* est initialement décrit dans les nodules racinaires de l'aulne par A. B. Frank, au cours de la deuxième moitié du XIX^e siècle. En raison de sa nature filamenteuse, *Frankia* a été longtemps assimilé à un champignon et dénommé *Schinzia alni* (Woronin, 1866). En 1886, Brunchorst proposait le nom de *Frankia subtilis* en hommage à son mentor Frank (1839-1900). Les observations des nodules d'*Elaeagnus* et de *Myrica* ont permis de mettre en évidence la différence entre les hyphes et les "bactéroïdes-likes" (actuellement dénommés diazovésicules et sporanges) de l'endosymbiote d'une part et les structures des champignons d'autre part. En 1902, Shibata rapprochait les structures de l'endosymbiote de celles des Actinomycètes et assignait *Frankia* au groupe des mycobactéries.

Les expériences d'inoculations croisées avec des broyats nodulaires et les études morphologiques (Becking, 1970) ont abouti à la définition de 10 espèces au sein du genre : *Frankia. alni*, *F. elaeagni*, *F. brunchorstii*, *F. discariae*, *F. casuarinae*, *F. coriariae*, *F. dryadis*, *F. purshiae*, *F. ceanothi* et *F. cercocarpi* respectivement associées à *Alnus*, *Elaeagnus*, *Myrica*, *Discaria*, *Casuarina*, *Coriaria*, *Dryas*, *Purshia*, *Ceanothus* et à *Cercocarpus*. Cependant en l'absence d'isolats valides selon les postulats préconisés par Koch et de la possibilité d'avoir plusieurs souches de *Frankia* dans un nodule, cette classification a été largement critiquée.

Pendant plus qu'un siècle (1866 à 1978) *Frankia* a été considéré comme un assemblage de «symbiotes obligatoires» présentant un statut taxonomique incertain. Ce n'est qu'en 1978 que Callaham et al (1978) obtiennent le premier isolat de *Frankia* en culture pure. A partir des années 80, l'accroissement des études sur ce genre d'actinobactéries, dû à la disponibilité d'autres isolats de *Frankia* de 17 genres de plantes hôtes, a justifié la redéfinition du taxon.

Cependant le taux de croissance très lent (temps de génération de 1 à 7 jours (Benson et Silvester, 1993) et la quasi-impossibilité d'isoler la souche à partir de certaines plantes actinorhiziennes, notamment les Rosaceae, Datisceae, Coriariaceae, *Ceanothus* et certaines Casuarinaceae, ont amplement limité la progression des études sur ce genre. Ainsi, les souches de *Frankia* qui ne croissent qu'en symbiose, sont qualifiées de symbiotes obligatoires. C'est le cas des souches associées aux Rosaceae, Datisceae, Coriariaceae, *Ceanothus* mais également de certaines *Frankia* qui sporulent abondamment dans le tissu végétal (VanDijk, 1979 ; Torrey, 1987; Schwintzer, 1990) et qualifiées de souche à spore positive.

2. Plante hôte

La spécificité d'hôte est l'un des critères les plus étudiés et qui a permis de grandes avancées dans la taxonomie de microorganismes pathogènes et symbiotiques. Les tests d'inoculation croisée de Baker (1987) portant sur 50 cultures pures de *Frankia*, disponibles dans les différentes collections internationales, ont permis de définir quatre groupes d'infectivité ; (i) souches infectives des *Alnus*, *Comptonia* et des *Myrica* (ii) souches infectives des *Casuarina* et des *Myrica* (iii) souches infectives des *Elaeagnus* et des *Myrica* et (iv) souches infectives seulement sur l'*Elaeagnus*. Cependant, ce regroupement n'est pas strict du fait que les souches présentent différents degrés de spécificité vis à vis des plantes hôtes allant d'une spécificité stricte (souches d'*Alnus rubra*), à une spécificité relative (souches des Elaeagnaceae) ou à une absence totale de spécificité (souches des *Myrica*).

La phylogénie des plantes hôtes basée sur les séquences du gène *rbcL* (rubisco) a suggéré une seule origine des familles angiospermes prédisposées à établir des symbioses fixatrices d'azote avec des bactéries (Soltis et al, 1995; Swensen et al, 1994). Maggia et Bousquet (1994) ont suggéré un degré de coévolution entre les plantes actinorhiziennes et leurs partenaires du genre *Frankia*. Toutefois, Jeong et al (1999) ont démontré que la phylogénie moléculaire des deux partenaires supporte des origines multiples et que les groupes de *Frankia* ont divergé plusieurs fois et plus tardivement que leurs plantes hôtes respectives (Figure1). Les critères relatifs à l'hôte seraient par conséquent des critères informatifs qui sont peu déterminatifs en taxonomie des microsymbiotes *Frankia*.

D'après Berry et Sunell (1990), deux voies d'infection sont impliquées dans le mécanisme d'établissement de la symbiose et les souches de *Frankia* ont été subdivisées en 2 types : (i) le type RHI (pour *root hair infection*) est caractérisé par une pénétration du microsymbiote par

les poils absorbants, cas observé chez les *Frankia* infectant les Betulaceae, les Myricaceae et les Casuarinaceae (Bond, 1983), (ii) le type EI (pour *epidermic infection*) est caractérisé par une pénétration épidermique, à travers la cuticule végétale, c'est le cas des *Frankia* infectant les Elaeagnaceae et les Rhamnaceae (Miller et Baker, 1985). Cependant des *Frankia* à spectre d'infectivité large utilisent les deux voies démontrant ainsi que le déterminisme de la voie d'infection est sous le contrôle de la plante hôte. A titre d'exemple les souches isolées d'Elaeagnaceae sont infectives sur leurs hôtes d'origine par voie épidermique et elles sont aussi capables d'infecter l'*Alnus* par la voie des poils absorbants (Bosco et al, 1992).

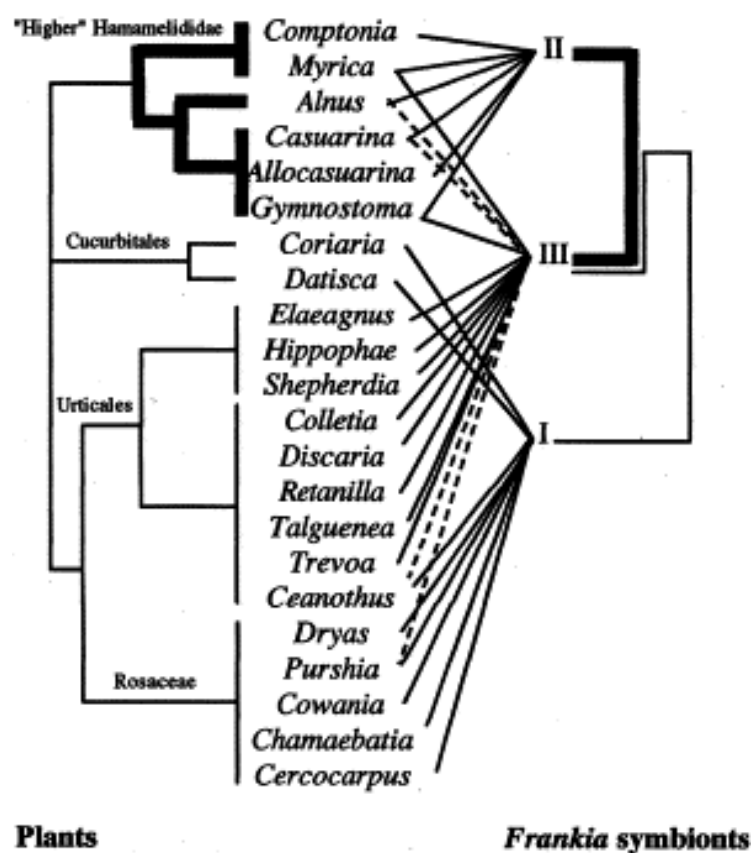


Figure 1. Phylogénies comparées des plantes actinorhiziennes et leur partenaire symbiotique *Frankia* (Clawson et al, 2004). Les lignes continues indiquent les *Frankia* typiques et leur partenaire végétal. les lignes brisées montrent les *Frankia* associés à d'autres plantes (en dehors de leur groupe d'infectivité). Les lignes épaisses représentent le mode d'infection racinaire par les poils absorbants; les lignes minces indiquent un mode d'infection racinaire par pénétration intercellulaire.

3. Morphologie

En culture pure et dans un milieu liquide les *Frankia* apparaissent sous forme de colonies hyphales ovoïdes ou circulaires, organisés en amas floconneux. Certaines souches sont non pigmentées et d'autres produisent des pigments solubles jaunes, orangés, rouges ou noirs (Lechevalier et Lechevalier, 1990). Sur milieu solide, les *Frankia* croissent sous forme de

colonies en étoile de mer ou diffuses avec un réseau lâche d'hyphes ou bien compactes avec des hyphes poussant profusément à la périphérie. Les *Frankia* se présentent sous trois types morphologiques (Figure 2) aussi bien *in vitro*, en culture pure, qu'*in vivo*, dans les tissus nodulaires : les hyphes, cellules végétatives, formant un mycélium, non aérien en culture, septé et abondamment ramifié, sur lequel peuvent se développer deux autres structures, les sporanges et les vésicules (Figure 2e).

Tableau 1 : Les plantes actinorhiziennes (Normand et al, 2006; Dawson 2008)

Ordre	Famille	Genre	Nombre d'espèce	Isolement	Répartition géographique
Casuarinales	Casuarinaceae	<i>Allocasuarina</i>	58	+, I, E	Aust, Af.*
		<i>Casuarina</i>	17	+, I, E	Aust, Af.*, Am.*, As.S*
		<i>Ceutostoma</i>	2	-	Aust.
		<i>Gymnostoma</i>	18	+, I, E	Aust.
Coriariales	Coriariaceae	<i>Coriaria</i>	17	+, N	Aust, Am, Eur.
Cucurbitales	Datisceae	<i>Datisca</i>	2	+, I, E	Am.N, As.S.
Fagales	Bétulaceae	<i>Alnus</i>	47	+, I, E	Am, Eur, As, Aust.
Myricales	Myricaceae	<i>Comptonia</i>	1	+, I, E	Am.N.
		<i>Myrica</i>	28	+, I, E	Af.S, Aust, As.
Rhamnales	Elaeagnaceae	<i>Elaeagnus</i>	38	+, I, E	Am. N, Eur, Aust, As.
		<i>Hippophaë</i>	2	+, I, E	Eur, As.N.
		<i>Shepherdia</i>	2	+, I, E	Am.N.
		<i>Ceanothus</i>	55	+, N	Am.N.
		<i>Colletia</i>	17	+, N	Af.N, Am.S, Eur.
		<i>Discaria</i>	15	+, N	Am.S, Eur.
	Rhamnaceae	<i>Kentrothamnus</i>	1	-	Am.S.
		<i>Retinella</i>	4	+, N	Am.S.
		<i>Talguena</i>	1	+, NT	Am.S.
Rosales	Rosaceae	<i>Trevoa</i>	2	+, N	Am.S.
		<i>Cercocarpus</i>	6-10	+, N	Am.N.
		<i>Chamaebatia</i>	2	-	Am.N.
		<i>Cowania</i>	1	+, NT	Am.N.
		<i>Dryas</i>	3	-	Am.N, Eur.
		<i>Purshia</i>	8	+, NT	Am.N, Aust.

Isolement (+) : réussi, (-) non réussi, (I) : infectieux, (N) non infectieux, (E) : efficient, (NT) : non testé. (Af.) : Afrique, (Am) : Amérique, (As) : Asie, (Aust) : Australie, (Eur.) : Europe, (*) : Espèce d'introduction

Les sporanges sont des agglomérats de cellules de résistance, à position terminale ou intercalaire aux hyphes. Ils libèrent des spores immobiles à différents stades de maturité et à faible taux de germination (Lechevalier et Lechevalier, 1989). Les sporanges des *Frankia* sont dits multiloculaires (la compartimentation se faisant sur des plans différents) (Figure 2c) et permettent de regrouper les genres *Frankia*, *Geodermatophilus* et *Dermatophilus* dans la section des "actinobactéries à sporanges multiloculaires".

Les vésicules représentent les sites de l'activité fixatrice d'azote et jouent un rôle analogue à celui des hétérocystes des Cyanobactéries dans la protection de la nitrogénase contre l'oxygène. Pour cela, elles sont dénommées diazovésicules (Meesters et al, 1987; Benson et Silvester, 1993). Elles sont caractérisées par une forme sphérique à paroi épaisse dont l'épaississement dépend de la pression d'oxygène (Harris et Silvester, 1992) et protègent l'enzyme contre la toxicité de l'oxygène. Ces vésicules se développent à l'extrémité ou au niveau des branchements des hyphes (Figure 2d). Ces structures spécialisées sont typiques du genre *Frankia*.

4. Physiologie

Les études physiologiques réalisées par l'équipe de M.P. Lechevalier (Lechevalier, 1994) montrent que les souches de *Frankia* sont hétérotrophes, chimioorganotrophes, aérobies à microaérophiles, mésophiles et neutrophiles. Benson et Schultz (1990) prouvent sur un nombre restreint de souches que *Frankia* est prototrophe. Très peu de souches sont capables de croître sur milieu solide, la culture pure des isolats du genre *Frankia* est donc généralement réalisée en milieu liquide. Ce dernier renferme une solution minérale additionnée d'une source adéquate de carbone (Benson et Schultz, 1990). Les sources carbonées utilisées varient selon la souche; elles peuvent correspondre à des acides organiques à courte chaîne comme l'acétate et le propionate soit des intermédiaires du cycle de Krebs comme le succinate, pyruvate, lactate, malate et fumarate (Akkermans et al, 1983; Burggraaf et Shipton, 1983; Tzean et Torrey, 1989; Benson et Schultz, 1990). Les surfactants comme le Tween 20 ou 80, des polyalcools comme le mannitol et le sorbitol ainsi que des sucres mono ou disaccharidiques tels que le glucose, mannose, xylose, galactose, cellobiose, fructose, arabinose, tréhalose, maltose et saccharose peuvent être assimilés par les *Frankia* (Akkermans et al, 1983; Lechevalier et al, 1983; Tisa et al, 1983; Burggraaf et Shipton, 1983). Certaines souches utilisent aussi des polysaccharides comme la pectine et la cellulose qui permettent une faible

croissance (Séguin et Lalonde, 1989; Igual et *al*, 2001). *Frankia* peut assimiler en culture l'azote minéral (NH_4^+ , NO_3^-) ou l'azote organique (aminoacides) (Shipton et Burgraaf, 1982), sachant que la plupart des souches sont capables de fixer l'azote atmosphérique en culture pure grâce à la localisation de l'enzyme dans les diazovésicules.

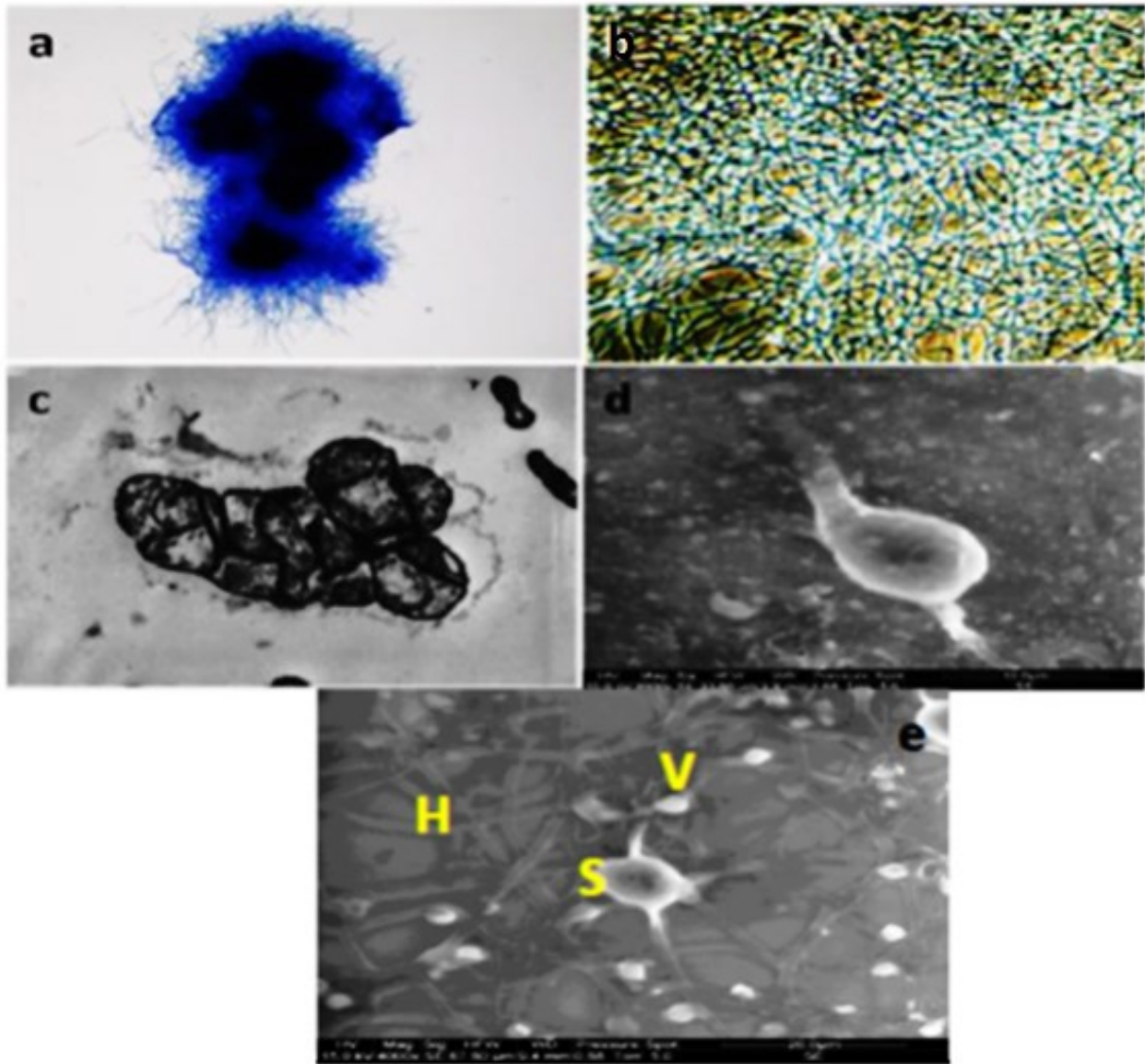


Figure 2. Morphologie de *Frankia* : a,b) Morphologie type de *Frankia* (Groupe de Frankineae, MBA), c) Sporangium Multiloculaire au microscope électronique, d) Vésicule de *Frankia* observé au microscope électronique, e) Les structures de *Frankia* (H : Hyphe, V : vésicule et S :sporangium) (Groupe de Frankineae, MBA)

En se basant sur les critères physiologiques, généralement très peu variables, l'équipe de Lechevalier (Lechevalier et *al*, 1983; Lechevalier et Ruan, 1984; Lechevalier et

Lechevalier, 1989; Lechevalier, 1994) a proposé deux groupes physiologiques de *Frankia*. Le premier groupe (A) renferme des souches plus hétérogènes et physiologiquement plus actives que celles du groupe (B) (Tableau 2). Ces dernières suivent le postulat de Koch contrairement à celles du groupe physiologique A.

En 1998, Dobritsa a classé les souches de *Frankia*, en trois groupes; A (*Frankia* infectant l'*Alnus*), C (*Frankia* infectant le *Casuarina*) et E (*Frankia* infectant *Elaeagnus*), en se basant sur la sensibilité aux antibiotiques, la production de pigments et la spécificité d'hôte. Elle a montré que ces critères phénotypiques pourraient être utiles pour valider certaines espèces génomiques du groupe *Frankia*–*Elaeagnus*.

Tableau 2 : Les groupes physiologiques du genre *Frankia* (Lechevalier et Lechevalier, 1984)

Caractéristiques	Groupe A	Groupe B
Pigmentation	+	-
Vésicule	Sur milieu complexe	Sur milieu dépourvu d'azote combiné
Synergie sur Tween plus carbohydrate	-	+
Croissance sur tween plus carbohydrate	+	-
Utilisation de carbohydrate à 0.5%	+	-
Maintien sur gélose inclinée	+	-
Sucres de la paroi cellulaire	Variables : fucose, xylose, madurose, glucose, galactose	Xylose

(+) : réaction positive, (-) : réaction négative.

5. Chimiotaxonomie

La chimiotaxonomie, ou la chimie cellulaire, classe les organismes selon les constituants cellulaires. Les plus utilisés sont le peptidoglycane (Schleifer et Kandler, 1972), les quinones (présence de ménaquinones ou d'ubiquinones), les lipides polaires (utilisés pour le classement des actinobactéries) et les acides mycoliques (Euzéby, 1998). Cette approche distingue difficilement le genre *Frankia* des autres actinobactéries. La paroi de type III commune à toutes les actinobactéries aérobies. Elle renferme de l'acide méso-diaminopimélique, l'alanine, l'acide glutamique, l'acide muramique et le glucosamine.

L'analyse des phospholipides place le genre *Frankia* dans le groupe I dont la composition est la suivante : phosphatidylinositol, mannoside et diphosphatidylglycérol. La composition en sucres est très variée : xylose (type D), madurose (type B), fucose, galactose, glucose, toutefois le 2-O-méthyl D mannose semble être un bon marqueur du genre *Frankia* (Tableau 3) (Mort et al, 1983; St Laurent et al, 1987).

L'analyse des ménaquinones d'un nombre limité de souches de *Frankia* a montré la prédominance de motif MK9(H₄) (ménaquinone à 9 unités d'isoprène dont quatre sont hydrogénées) et une faible quantité de MK9 (H₆) et MK9 (H₈) ce qui est commun aux actinobactéries aérobies (Lechevalier et al, 1987). Les lipides hopanoïdes, à structure amphiphile, impliqués dans la stabilisation membranaire des procaryotes extrémophiles (Rohmer et al, 1984; Hermans et al, 1991; Schulenberg-Schell et al, 1989; Poralla et al, 1984) ont été trouvés en grandes quantités chez les *Frankia* (Berry et Kleemann, 1994; Berry et al, 1991).

Les résultats des études protéiques en 1-D SDS-PAGE ont permis à Garde et Lalonde (1987) de subdiviser une collection de 35 souches de *Frankia*, provenant de plusieurs plantes hôtes et d'origines géographiques, en deux grands groupes : (i) un premier groupe englobant les souches infectives d'*Alnus* et des Myricaceae et (ii) un deuxième regroupant les souches infectives d'Elaeagnaceae, d'*Alnus* et de *Myrica*. Ces deux dernières (*Frankia-Alnus* et *Frankia-Myrica*) sont susceptibles d'infecter les Elaeagnaceae (Saint-Laurent et Lalonde, 1987).

6. Génétique et génomique

Selon la théorie «polyphasique» de Colwell (1970) la taxonomie, basée sur des critères phénotypiques et chimiotaxonomiques, devrait rejoindre le plus possible les données phylogénétiques fournies par des critères génotypiques qui sont plus reproductibles et plus indépendants de l'âge physiologique et des fluctuations des conditions de culture des bactéries.

La lenteur de croissance à laquelle s'ajoutent le faible taux de germination des spores, la non-fiabilité des protocoles de mutagenèse connus (Normand et Lalonde, 1986; Mullin et An 1990; Simonet et al, 1990) ainsi que l'absence de vecteur de transformation (phage, plasmide

conjugatif ou R-plasmide) et d'éléments transposables (Cournoyer et Normand, 1992a; Cournoyer et Normand, 1992b) entravent les avancées des études génétiques du genre *Frankia*. Le poids moléculaire du génome de *Frankia* estimé par la cinétique de réassociation d'ADN, varie de 12 000 à 8 000 kpb (An et al, 1985) avec un pourcentage de Guanine et Cytosine de l'ordre de 66 à 75% (An et al, 1983; Fernandez et al, 1989).

Chez certaines souches de *Frankia*, des plasmides de 8 à 190kb ont été détectés (Lavire et al, 2001). Excepté les plasmides symbiotiques présentant une hybridation avec des sondes de l'opéron *nif* (Dorbrits et Tomashevsky, 1989; Simonet et al, 1984) les autres sont de fonction inconnue. L'analyse de génome par séquençage total de trois souches de *Frankia*, EAN1pec (groupe 3), ACN14a (groupe 1) et CcI3 (groupe 1b) montre la présence d'un seul gène de nodulation similaire à ceux de *Rhizobium* (Normand et al, 2007), mais avec une similarité très faible et une fonction à vérifier. Un nombre très restreint de gènes a pu être détecté par hybridation hétérologue sur le génome de *Frankia*. Parmi des gènes impliqués dans la symbiose, on peut citer les gènes codant la nitrogénase (*nif*), l'hydrogénase d'absorption (hup) et le squalène hopane cyclase (SHC) (biosynthèse de bactériohopane).

La taille du génome circulaire de trois souches de *Frankia* varie de 9Mb pour EAN1pec (*Frankia-Elaeagnus*; groupe 3) à 7.50Mb pour ACN14a (*Frankia-Alnus*; groupe 1) et à 5.43 Mb pour CcI3 (*Frankia-Casuarina*; groupe 1) (Normand et al, 2006). La souche CcI3 présente une densité moyenne en éléments mobiles (34 par Mb) similaire à celle d'EAN1pec (30/Mb) et plus élevée que celle d'ACN14a (6/Mb). Ces éléments génétiques mobiles ont été détectés dans des régions d'ADN où on note une perte de synténie entre les 3 génomes. Ils peuvent être à l'origine de l'adaptation de *Frankia* à des nouvelles conditions écologiques. Cette idée a été prouvée dans le cas d'*Enterococcus faecium* qui, grâce aux séquences d'insertion (IS) a développé de nouvelles sous-espèces mieux adaptées aux environnements cliniques (Leavis et al, 2007). Depuis ce premier rapport, huit autres génomes de *Frankia* ont été séquencés (tableau 4), le choix des souches a été basé sur la position phylogénétique et les propriétés physiologiques.

6.1. Hybridations ADN/ADN

Le critère de définition d'espèce le plus communément admis par le Comité International sur la Systématique Bactériologique (C.I.S.B) est l'hybridation ADN/ADN (Wayne et al, 1987). Ce critère repose sur une définition plus ou moins précise : deux souches appartenant à la

Tableau 3 : Caractéristiques des genres apparentés au genre *Frankia* (Lechevalier et Lechevalier, 1989; Normand et al, 1996; Yoshimi et al, 1996; Normand et Benson, 2012)

	<i>Frankia</i>	<i>Geodermatophilus</i>	<i>Blastococcus</i>	<i>Sporichtya</i>	<i>Acidothermus</i>	<i>Nakamurella</i>	<i>Cryptosporangium</i>
Hyphe	Extensive	Rudimentaire	Rudimentaire	Courte, raide	Mince	Rudimentaire	-
Ramification	++	+/-	+/-	Eparses	-	-	+
Sporange	Multiloculaires	Multiloculaire	Multiloculaire	Fragmentation d'hyphes	-	-	+/-
Mobilité	-	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-
Flagelle	-	Polaire	Latérale	Polaire	-	-	-
Vésicules	+	-	-	-	-	-	-
Oxygène	A, MA	A	A, MA	A, AN	A	A	A
Température	Mésophile	Mésophile	Mésophile	Mésophile	Thermophile	Mésophile	Mésophile
Croissance	Très lente (10 à 60j)	Rapide (2-7j)	Rapide (2-7j)	Rapide	Rapide	Lente (10j)	Lente (>14j)
Nitrogénase	+	-	NT	NT	NT	NT	NT
Cellulase	+	NT	-	NT	++	+	NT
Réaction de Gram	+, variable	+, variable	+	+, variable	-, variable	+	+
Paroi cellulaire	III	III	NT	I	(Serine)	II	III
Sucres cellulaires	D, E, ou B	C	NT	C	NT	G, M, X, R, Rh	G, A
Cellulase	+	NT	-	NT	++	+	NT
Phospholipides	PI	PII	NT	NT	NT	PII	PII
G+C%	66-71	72.9-74.6	NT	70	60.7	67.5	70
Habitat	Sol, racine	Sol, mer	Mer	Sol, composte	Source thermique	Boues activées	Sol

(+) : positive, (++) très positive, (-) : négative, (+/-) plus ou moins, (A) : aérobie, (AN) : anaérobie, (MA) : microaéroophile, (NT) : non testés. Toutes les parois des actinobactéries contiennent : l'acide glutamique, alanine, glucosamine et l'acide muramique. Le type I contient en plus l'acide LL-diaminopimelique. Le type II contient en plus l'acide meso-diapimelique et le type III, l'acide meso-diapimelique et glycine. Les sucres cellulaires caractéristiques sont pour (B) : madurose, (C) : aucun sucre caractéristique, (D) : xylose plus arabinose, (E) : fructose, G : Glucose ; A : Acétylglucosamine (3-O-méthyl-rhamnose). Le type I se caractérise par l'absence de phospholipides azotés et le type II se reconnaît par les phosphatidylethanoamine et/ou méthylethamine.

Tableau 4 : Les souches de *Frankia* à génome séquencé (Tisa et al, 2013)

<i>Frankia</i>	Gr	Taille du génome (Pb)	% GC	gènes	Opérons ribosomiques	Gène d'ARNt	Numéro d'accension	Référence
ACN14a	1	7497934	72.83	6795	6	46	CT573213	Normand et al, 2007
CcI3	1	5433628	70.08	4621	6	46	CP000249.1	Normand et al, 2007
QA3	1	7590853	72.59	6546	4	46	CM001489.1	Sen et al, 2013
Dg1	2	5323336	70.04	4579	6	44	CP002801	Persson et al, 2011
EAN1pec	3	8982042	71.15	7250	9	47	CP000820.1	Normand et al, 2007
EUN1f	3	9322173	70.82	7833	9	47	NC014666	Beauchemin et al, 2012
BMG5 .12	3	7589 313	71.67	6342	5	51	ARFH0100000	Nouioui et al, 2013
BCU110501	3	7891711	72.39	6839	8	47	ARRDT0100000	Wall et al, 2013
EuI1c	4	8815781	72.31	7262	9	46	CP002299.1	Beauchemin et al, 2012
CN3	4	9978592	71.72	8412	5	68	AGJN0100000	Ghodhbane Gtari et al, 2013
DC12	4	6884336	71.92	5858	9	46	En cours	non publié

Gr : groupes

même espèce doivent posséder un taux d'homologie ADN/ADN supérieur à 70%, avec un δT_m de moins de 5°C.

Les études d'hybridation ADN/ADN chez *Frankia* ont abouti à la définition de 19 espèces génomiques (Fernandez et al, 1989; Akimov et Dobritsa, 1992; Lumini et al, 1996). Sept espèces parmi les souches infectives d'*Alnus*, 11 parmi celles infectives d'Elaeagnaceae et une seule espèce nodulant les Casuarinaceae. Ces espèces génomiques ne sont pas validées en nomenclature binaire puisque aucun critère phénotypique n'a pu supporter leur assignation selon la proposition de Wayne et al (1987). En plus, plusieurs espèces devraient être décrites au sein des souches disponibles et qui n'ont pas fait l'objet d'étude (Dobritsa, 1998).

Bautista et al (2011) ont utilisé la technique AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) comme une alternative de la technique d'hybridation ADN/ADN afin de surmonter les inconvénients de cette dernière pour une meilleure réévaluation des espèces génomiques et restructuration phylogénétique du genre *Frankia*. Des souches de *Frankia* couvrant les quatre groupes phylogénétiques du genre, et des souches représentatives de sept espèces génomiques, ont été analysées. Les résultats étaient en concordance avec les données d'hybridation ADN/ADN confirmant l'intérêt de la méthode pour définir des espèces génomiques. En outre ces auteurs ont démontré la faisabilité de la méthode sur de petite quantité d'ADN pour des souches à croissance très lente ou directement sur des nodules pour des souches non cultivables.

6.2. Phylogénie moléculaire

L'étude de la phylogénie et de la taxonomie des bactéries se fait grâce à des molécules dont la vitesse d'évolution est constante au cours du temps, ces molécules, qui doivent être ubiquiste, sont dites «horloges moléculaires». Par conséquent, la variation lente de ces molécules permet d'établir les relations phylogénétiques et taxonomiques entre organismes plus ou moins éloignés (Woese, 1987). Ces horloges moléculaires sont généralement des macromolécules telles ADN, ARN et protéines qui selon la théorie de Zuckerkandl et Pauling (1965), peuvent être considérées comme des témoins (sémantides) de l'évolution. A cette notion d'horloge moléculaire s'impose une deuxième théorie «la théorie neutraliste de l'évolution», selon laquelle les variations d'acides aminées et des nucléotides se produisent à un taux constant, au hasard, et sont pour la plupart sélectivement neutres (Kimura, 1983).

A partir des années 80, les études moléculaires ont connu une progression exponentielle suite à l'apparition de technique d'amplification in vitro de l'ADN (Faloona et Mullis, 1987; Saiki et al, 1988). Chez *Frankia*, les analyses moléculaires sont restreintes à des régions présentant des contraintes évolutives particulièrement fortes telles l'ADNr, *nif* et *gln*.

6.2.1. Gènes ribosomiques

La phylogénie moléculaire fondée sur des séquences de l'ADNr 16S a permis la restructuration hiérarchique des Actinobactéries en montrant que *Frankia* serait le seul genre des Frankiaceae représentant la famille type du sous-ordre des Frankineae (Stackbrandt et al, 1997). Ce dernier englobe en plus les familles des Geodermatophilaceae, Nakamurellaceae, Sporichthyaceae, Cryptosporangiaceae et Acidothermaceae. Les mêmes auteurs ont validé les actinobactéries en tant que cinquième classe du domaine *Bacteria*, qui est subdivisée en 5 sous-classes, 6 ordres, 10 sous-ordres et 35 familles. L'analyse de l'ARNr 16S par Hahn et al (1989) a permis le regroupement des genres *Frankia*, *Geodermatophilus* et *Blastococcus* dans la famille des Frankiaceae et en excluant le genre *Dermatophilus*. Alors que l'analyse de la totalité du gène de l'ARNr 16S par Normand et al (1996) a présenté le genre *Frankia* comme le seul représentant de la famille tout en écartant les genres *Dermatophilus* (Dermatophilaceae), *Geodermatophilus* et *Blastococcus* (Geodermatophilaceae) (Figure 3).

Les similitudes morphologiques ne reflètent jamais le degré de parenté entre deux souches bactérienne à titre d'exemple, l'*Acidothermus cellulolyticus* et probablement *Sporichthya* (Hahn et al, 1999) sont les plus apparentées au genre *Frankia*. Toutefois ni *Acidothermus* ni *Sporichthya* ne présentent des similitudes morphologiques avec le genre *Frankia* (Tableau 2). Cette conclusion est déduite suite à l'analyse de l'ADNr 16S et *recA* ainsi que d'autres critères chimiotaxonomiques (lipides hopanoïdes) (Maréchal et al, 2000).

L'analyse des séquences d'ADNr 16S chez d'autres bactéries, peut prédire parfois l'appartenance de deux souches à la même espèce toutefois les propriétés phénotypiques et l'homologie ADN/ADN les placent dans deux espèces différentes (Fox et al, 1992). De façon similaire les séquences d'ADNr 16S manquent de pouvoir discriminant chez *Frankia* comme le suggèrent Nazaret et al (1991) qui montrent que les neuf espèces génomiques définies par Fernandez et al (1987), ont des séquences partielles de 16S identiques, excepté les espèces génomiques 4 et 5.

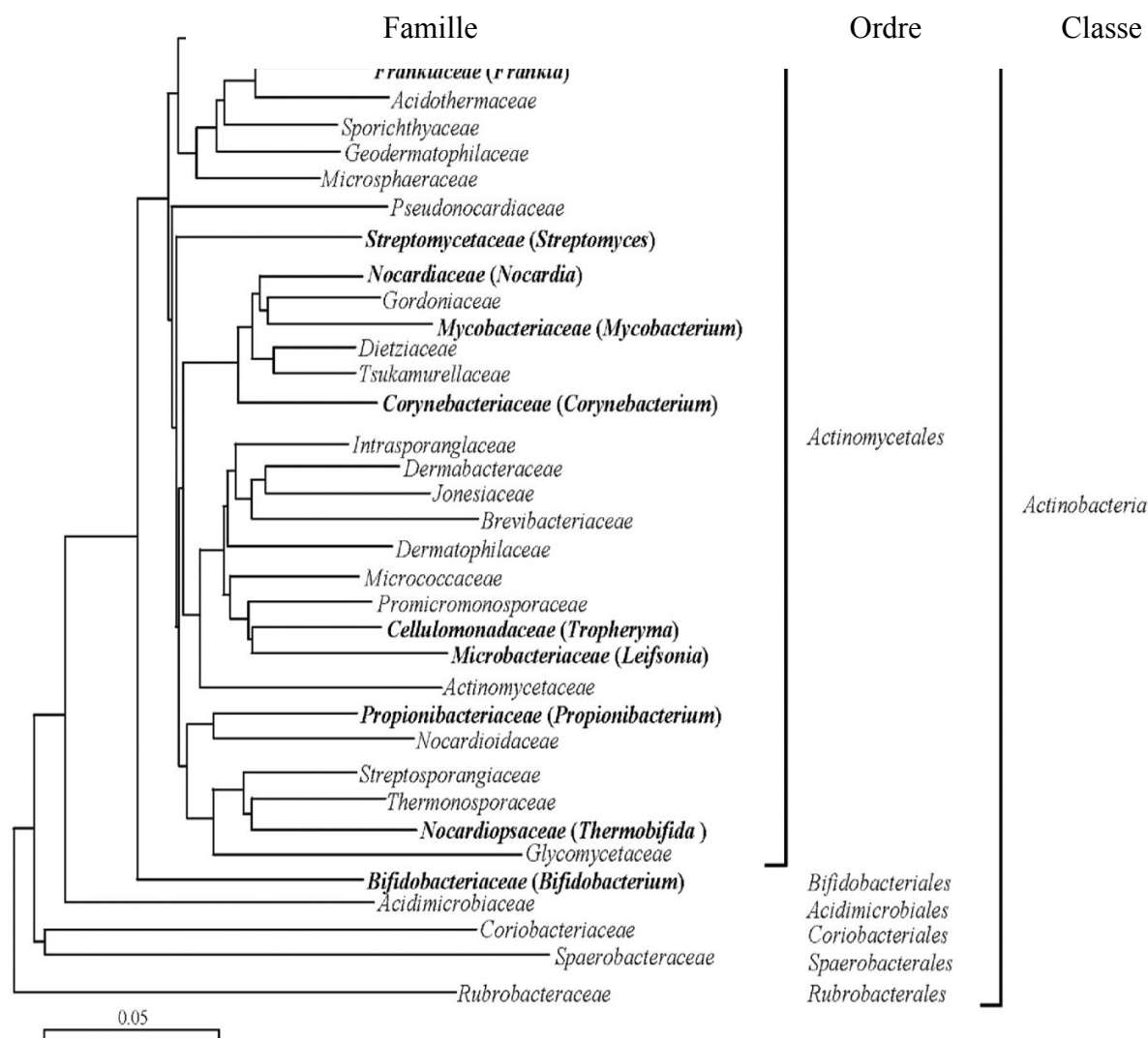


Figure 3. Phylogénie des actinobactéries basée sur la comparaison des séquences de l'ADNr 16S (Stackebrandt et al, 1997).

L'analyse d'une séquence partielle de l'ADNr 16S ne reflète donc pas systématiquement les résultats obtenus par l'homologie ADN/ADN (Fox et al, 1992). La phylogénie basée sur le séquençage de la totalité du gène ribosomique 16S par Normand et al (1996) est en concordance avec celle issue de l'analyse comparative des séquences partielles des ADNr 23S par Honerlage et al. (1994). Quatre groupes du genre *Frankia* ont été défini : (i) un large groupe comprenant *Frankia alni* et souches apparentées (souches sp+ d'*Alnus rugosa*, microsymbiotes de *Myrica nagi* et souches infectives de *Casuarina* (ii) souches non cultivables de *Dryas*, *Coriaria* et *Datisca*, (iii) souches infectives d'*Elaeagnus* et (iv) souches atypiques comprenant des souches non fixatrices mais infectives d'*Alnus* sp.

6.2.2. Gènes de la nitrogénase

Des analyses phylogénétiques des gènes *nif* ont apporté des renseignements quant à l'évolution des organismes fixateurs d'azote. Selon Henneke et al (1985), les arbres phylogénétiques de l'ARNr 16S et des gènes *nif* suivent le même schéma évolutif ce qui montrerait que les bactéries fixatrices d'azote auraient évolué à partir d'un ancêtre commun (Achouak et al, 1999). La congruence de la phylogénie fondée sur l'ARNr 16S et celle des gènes *nifH* et *nifD* n'est respectée qu'après avoir exclu le genre *Clostridium*. Chez ce dernier, la fixation d'azote pourrait résulter d'une ancienne duplication de gènes ou de paralogie (Normand et Bousquet, 1989). Le séquençage des gènes *nif* du genre *Bacillus*, qui fait partie avec *Clostridium* des Eubactéries Gram positif à bas G+C%, mais comprend des bactéries aérobies a montré que les thèses des transferts horizontaux des gènes *nif* entre les phyllums semblent toutes les deux plausibles (Achouak et al, 1999). Une étude des gènes *nifH* et analogues réalisée par Gtari et al (2012) a renforcé cette théorie et a souligné les perspectives de fixation d'azote par les actinobactéries n'appartenant pas au genre *Frankia* (Figure 4).

Les regroupements obtenus par les analyses PCR/RFLP des IGS *nifD-K* sont en concordance avec ceux générés par hybridations ADN/ADN (Jamann et al, 1992; Lumini et al, 1996; Lumini et Bosco, 1996) et ils se sont montrés plus discriminatifs que les ITS 16S-23S (Lumini et Bosco, 1999). Des nouvelles espèces génomiques parmi les souches isolées d'Elaeagnaceae ont été définies. Deux blocs phylogénétiquement distincts des souches infectives d'*Alnus* et des Casuarinaceae et des souches d'Elaeagnaceae (Cournoyer et al, 1993) ont été démontrés suite aux séquençages de l'intergène *nifH-D* et du début du gène *nifD*. Cette répartition confirme les résultats obtenus par Nazaret et al (1991).

La combinaison des données sur l'ARNr 16S et les gènes *nif* engendre un regroupement des souches de *Frankia* selon leur mode d'infection. Deux groupes phylogénétiques ont été montrés (i) un premier groupe renfermant les souches d'*Alnus* et des Casuarinaceae (RHI); (ii) un deuxième groupe incluant les souches d'Elaeagnaceae (EI). Cependant, les souches flexibles capables d'infecter selon les deux processus restent non classées (Bosco et al, 1992).

Bosco et al, (1992) ont apporté un fait nouveau quant à la compréhension de l'évolution des espèces au sein du genre *Frankia*. Il semble, en effet que les souches de l'espèce génomique 9 de Fernandez et al (1989) (nodulant les Casuarinaceae) ont divergé à partir de la 1^{ère} espèce génomique (nodulant *Alnus*, Betulaceae).

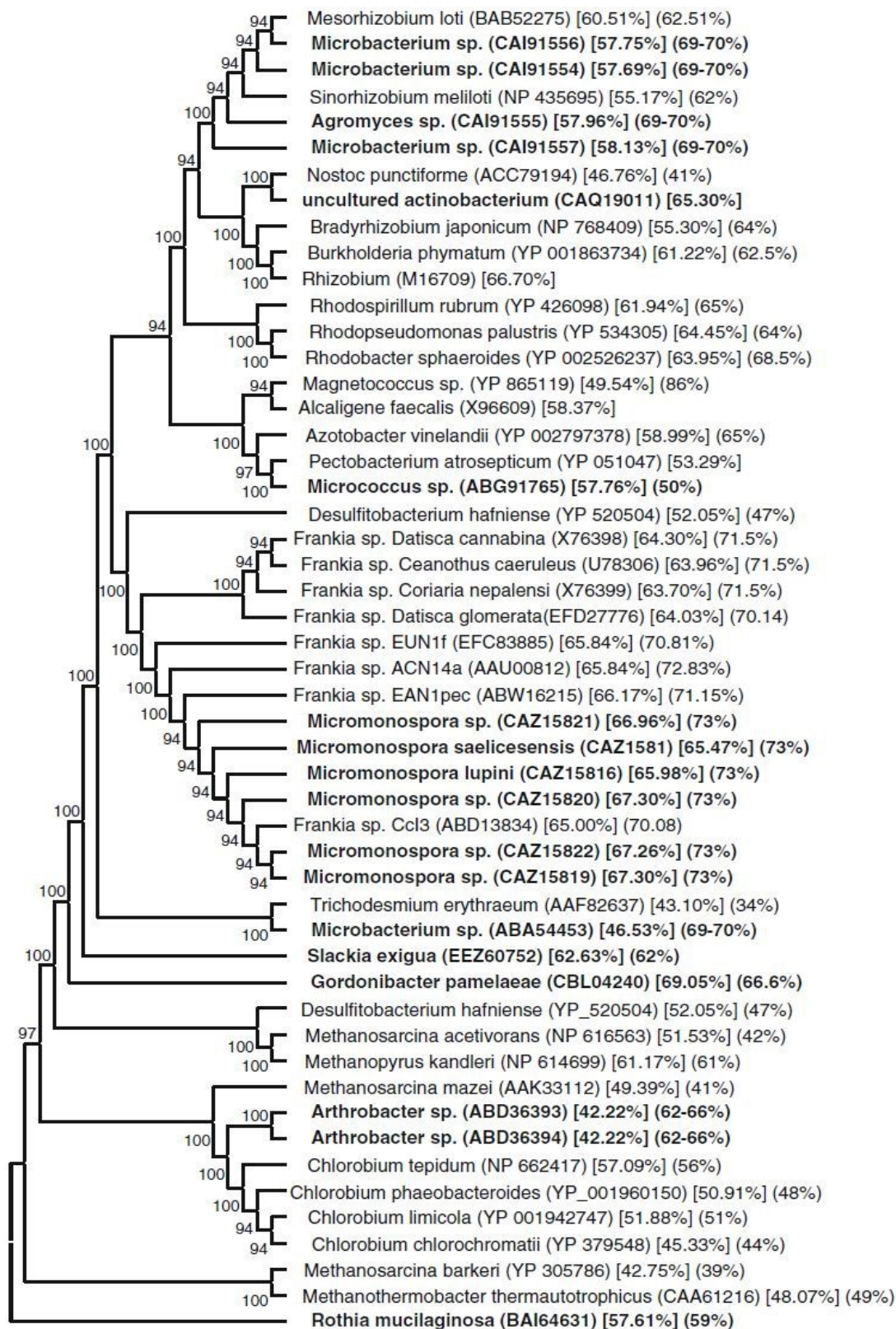


Figure 4. Phylogénie basé sur les séquences de gène *nifH* des actinobactéries non *Frankia* (Gtari et al, 2012).

6.2.3. Gènes de la glutamine synthétase

L'étude de l'histoire évolutive de *glnII* a montré que le gène de la glutamine synthétase est apparu et s'est dupliqué il y a environ 3.5 milliards d'années, bien avant la séparation des Eucaryotes et des Procaryotes. La phylogénie des *Frankia* et *Streptomyces* basée sur le séquençage de *glnA* (codant pour la GSI) a montré que les actinobactéries étaient plus proches des cyanobactéries que ne le laissait supposer le séquençage de l'ARNr 16S (Kumada et al, 1993). Le clonage et le séquençage des gènes *glnA* et *glnII* chez les deux souches de *Frankia* HFPCpII (Rocheffort et Benson, 1990; Kumada et al, 1993) et ACN18a (Cournoyer et al, 1999) montre qu'ils sont séparés par 449pb. Le séquençage du gène *glnII* a permis des regroupements des souches de *Frankia* selon leur mode d'infection envers leur hôte respectif (Cournoyer et al, 1999). Alors que les souches non infectives du genre appartiennent à un groupe homogène et phylogénétiquement apparenté.

L'analyse des séquences des gènes *glnII* et ADNr 16S de souches de *Frankia* isolées d'un sol tunisien par Gtari et al (2004) a montré que la diversité des souches de *Frankia* associées aux Elaeagnaceae et Rhamnaceae est plus large que celle auparavant décrite (Clawson et al, 1998) (Figure 5).

II. Intérêt du genre *Frankia*

1. Fixation symbiotique de l'azote

C'est grâce à la fixation biologique de l'azote atmosphérique établie par l'actinobactérie *Frankia* que les plantes actinorhiziennes ont un avantage sélectif substantiel manifesté par leur aptitude à se développer sur des sols pauvres en azote et dégradés à l'extrême (Burleigh et Dawson, 1991). Les plantes actinorhiziennes sont des espèces pionnières par excellence qui aménagent la succession d'autres communautés végétales et participent à la réhabilitation et la régénération des sols marginaux (Tableau 5). Selon les données paléontologiques, ces plantes sont des colonisateurs primaires communs aux sites endommagés par les catastrophes naturelles, telles que les glissements des terrains, éruptions volcaniques, les brûlis et l'érosion (Burleigh et Dawson, 1991).

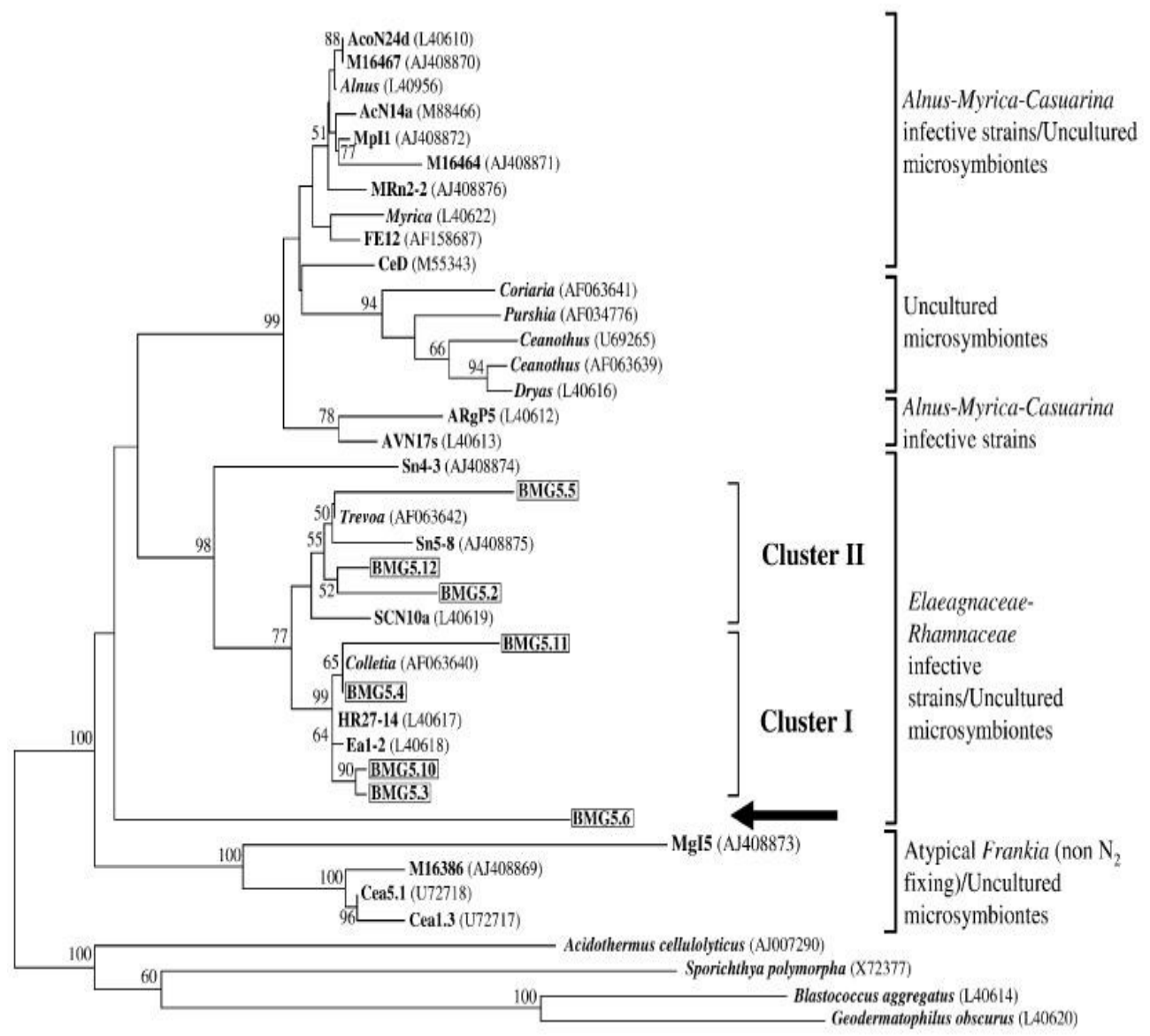


Figure 5. Phylogénie basé sur les séquences des acides aminés de glutamate synthétase codé par le gène *glnII* (Gtari et al, 2004). Les souches de *Frankia* isolées d'un sol tunisien sont encadrées.

La présence de pollen dans les sédiments marins a attiré l'intérêt de Heusser et Shackleton (1979), qui ont montré que ces plantes ont été les premières à coloniser les terrains délaissés par les glaciers et les océans lors des changements climatiques majeurs.

Sur le plan biotechnologique, l'extension de la capacité à établir des symbioses fixatrices d'azote en dehors des partenaires classiques par l'obtention de symbioses artificielles, serait une perspective relativement fondée dans le cas de *Frankia*. En effet cette dernière dispose en effet de mécanismes intrinsèques de protection de la nitrogénase grâce à la localisation de l'enzyme dans les diazovésicules (Harris et Silvester, 1992) contrairement aux rhizobia. D'autant plus que parmi les plantes hôtes naturellement associées avec *Frankia* figurent des

Rosaceae, or cette famille comprend la majorité des arbres fruitiers (exemples : pomme, abricot, cerise, prune, pêche, poire).

2. Métabolites et activités enzymatiques

En biotechnologie microbienne, les actinobactéries sont particulièrement intéressantes tant dans le domaine agronomique, alimentaire, environnemental (Lechevalier et *al*, 1988; Crawford et Mille, 1988; Crawford et *al*, 1993; Elliott-Juhnke et *al*, 1987 ; Rothrock et Gottlieb, 1984) que médical et pharmacologique. (Ortiz-Ortiz et *al*, 1984; Goodfellow, 1988). Elles sont connues pour la production d'antibiotiques, de substances probiotiques, toxiques, enzymatiques ainsi que d'autres produits bioactifs. Chez *Frankia*, des antibiotiques actifs aussi bien contre des bactéries Gram positives (*Brevibacillus laterosporus*) que des Gram négatives (*Pseudomonas solacearum*) (Haansuu et *al*, 1999; Haansuu et *al*, 2001) ont été détectés. Certaines souches de *Frankia* produisent de la quinone benzonaphthacene, métabolite apparenté du point de vue structural aux antibiotiques produits par *Streptomyces* sp. Deux de ces quinones se sont montrées actives vis à vis de *Candida lipolytica*, *Paracoccus denitrificans*, *Fusarium decellulare* et d'*Artrobacter globiformis*. Un de ces antibiotiques, le Frankiamide, a été purifié. Il est caractérisé par des propriétés structurales et fonctionnelles inhabituelles parmi les antibiotiques connus jusqu'à présent (Klika et *al*, 2001; Haansuu et *al*, 2001). Les travaux de Haansuu et *al* (1999; 2001) mettent en évidence chez *Frankia*, une activité inhibitrice de l'influx de Ca^{2+} chez des cellules GH₄C₁ du rat ce qui représente une importance considérable en thérapie des maladies cardiovasculaires. Aucune activité enzymatique de *Frankia* n'a fait l'objet d'étude approfondie, exceptée une activité protéolytique de type multi-catalytique (Benoist et *al*, 1992). Ce protéasome compte parmi les rares caractérisés dans le monde des Procaryotes. Il est composé de deux sous-unités alpha et beta assemblées en structure conique de quatre rangées chacune (Pouch et *al*, 2000).

L'analyse bioinformatique du génome des trois souches de *Frankia* ACN14a, CcI3 et EAN1pec a révélé un nombre inattendu de groupes de gènes codant pour des métabolites secondaires (65 groupes de gènes de biosynthèse). Plus de 25 structures de métabolites secondaires ont été identifiées (peptides cycliques, sidérophores, pigments, molécules de signalisation et lipides spécialisés). Les analyses protéomiques de la souche CcI3 (*Frankia-Casuarina*) et EAN1pec (*Frankia-Elaeagnaceae*) ont montré une diversité de voies de biosynthèse qui pourrait s'avérer être une spécificité des *Frankia* (Udworthy et *al*, 2011).

Tableau 5 : Intérêt de différentes espèces des plantes actinorhiziennes (Paschke MW, 1997)

Taxons	localisation	Habitat	Usage
<i>Alnus rubra</i>	Nord-Ouest de Pacifique, Nord d'Idaho	Les Berges, les pentes humides et des plaines inondables	Bois de construction, stabilisation et amélioration des sols
<i>Alnusviridis sinuata</i>	Les Côtes d'Alaska à Cascades	Les Berges et des pentes rocheuses humides, les forêts	Stabilisation et réhabilitation des sols pollués
<i>Elaeagnus commutata</i>	Nord de Rockies à Minnesota	Pentes rocheuses sèches, les cours d'eau rocheux	Réhabilitation des sites perturbés, décoratif
<i>Shepherdia canadensis</i>	Ouest de Cascades à Rockies	Les forêts, des pentes rocheuses sèches	Stabilisation et réhabilitation des sols pollués
<i>Shepherdia argentea</i>	Haut Midwest de Californie	Berges, les sols alcalins, prairies	Décoratif
<i>Myrica</i> spp.	Les régions côtières	Les Berges, les rives, les pentes humides et plaines inondables	Stabilisation des sols, et réhabilitation des sols pollués
<i>Ceanothus cordulatus</i>	Sud d'Oregon à Baja Californie	Les forêts, les sites perturbés	Broussaille
<i>Ceanothus cuneatus</i>	Californie à Oregon	Chaparral, les forêts sèches	Broussaille
<i>Ceanothus diversifolius</i>	Californie	Forêt sous-bois	Stabilisation des sites perturbés
<i>Ceanothus gloriosus</i>	Les côtes de Californie	Les falaises côtières	Décoratif, stabilisation sites perturbés
<i>Ceanothus griseus</i>	Californie	Les falaises, des pistes ouvertes	Décoratif
<i>Ceanothus integerrimus</i>	Oregon au Sud de Rockies	Chaparral, des forêts, des forêts riveraines	Broussaille
<i>Ceanothus prostratus</i>	Sierra Nevada au Sud de Cascades	Sites perturbés secs, les forêts	Stabilisation des sols, décoratif
<i>Ceanothus sanguineus</i>	Cascades au Nord Rockies	Montagne arbustes, des clairières forestières	Réhabilitation des sols
<i>Ceanothus velutinus</i>	Cascades, Sierra Nevada, Rockies	Forêt de sous-bois et des sites perturbés	Décoratif, réhabilitation des sols
<i>Cercocarpus</i> spp.	Ouest de l'Amérique	Les pentes et les crêtes sèches, chaparral	Broussaille, stabilisation des sites perturbés, décoratifs
<i>Cowania</i> spp.	Du Grand Bassin à Ouest de Texas	Sols secs	Décoratifs, broussaille
<i>Dryas drummondii</i>	Alaska au Sud de Rockies	Toundra, terrasses caillouteuses polaires	Réhabilitation des sols perturbés
<i>Purshia tridentata</i>	Ouest de Cascades à Rockies	Chaparral, les forêts et les pentes sèches	Broussaille, stabilisation des sols, réhabilitation des sols perturbés

MATERIEL ET METHODES

Matériel et Méthodes

I. Origine, culture et conservation des souches de *Frankia* étudiées

Une collection de souches couvrant la biodiversité génétique du genre *Frankia* disponible au laboratoire Microorganismes et Biomolécules Actives, a été utilisée (annexe 1). La pureté et l'absence de contamination fongique ou bactérienne ont été vérifiées par des analyses macroscopiques et microscopiques des cultures. Une croissance optimale de *Frankia* est observée après 3-4 semaines à 30°C, sans agitation et dans un milieu DPM modifié (annexe 2). La conservation des souches de *Frankia* a été assurée par des subcultures des souches cultivées dans un milieu DPM liquide à une température ambiante, ou bien par conservation à -80 °C et à 30% glycérol.

II. Origine des nodules utilisés

Des nodules de *Ceanothus* ont été donnés par Prof John D Tjepkema (university of Maine, USA). Cinq espèces de *Coriaria*, couvrant la répartition géographique du genre, ont été fournies par Dr María Valdés (Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México DF, Mexique), Mr. Sajjad Mirza (Institut National de Biotechnologie et Génie Génétique, Faisalabad, Pakistan), Dr. Warwick Silvester (Université de Waikato, Waikato, Nouvelle-Zélande), Dr. Kawther Benbrahim (Université de Fès, Fès, Maroc), Dr. Takashi Yamanaka (Institut de Recherche et de la Foresterie et Sylviculture, Ibaraki, Japon) et Dr Jean-Claude Cleyet-Marel (INRA-IRD, Montpellier, France). Les sites de prélèvement et la dénomination des nodules utilisés sont mentionnés dans l'annexe 3.

III. Piégeage

La principale plante-piège étant *Coriaria myrtifolia*, les semences de cette dernière, utilisées au cours de cette étude, ont été fournies par Dr. Kawther Benbrahim (Université de Fès, Fès, Maroc). Des échantillons des rhizosphères d'*Alnus glutinosa*, *Casuarina glauca* et *Elaeagnus angustifolia* ont été prélevés respectivement de Tamra (37 ° 3 'N, 9 ° 7' E, à 150 m d'altitude), Zerniza (37 ° 9'N, 9 ° 7'E, 60 m d'altitude) et Ghar Elmeh (37 ° 10 'N 10 ° 11' E, 10 mètres d'altitude). Des graines de *C. myrtifolia* ont été stérilisées superficiellement par l'acide sulfurique concentré pendant 5 min, rincées plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile et mises en germination dans des pots remplis de vermiculite. Après germination, trois plantules ont été transférées dans des pots en plastiques contenant 2kg de chaque échantillon

de rhizosphère. Les pots ont été arrosés tous les jours avec de l'eau du robinet et maintenus dans des conditions naturelles. Les plantules ont été examinées avec soin pour la formation des nodules. Elles ont été contrôlées chaque 1, 6, 12, 18, et 24 mois.

IV. Manipulation de l'ADN

1. Extraction d'ADN génomique à partir des souches de *Frankia*

L'extraction d'ADN génomique a été effectuée à partir de culture liquide âgée d'un mois en utilisant le protocole décrit par Kalman et *al*, (1993). Une culture de 1-5ml est centrifugée à 4000 g pendant 5 min. La biomasse récoltée est reprise dans 567µl de TE (10mM Tris HCl, 1mM EDTA-Na₂, [pH = 8]) et traitée 30 min à 37°C successivement par 30µl de lysozyme (35mg/ml), 3µl de protéinase K (20mg/ml) et 40µl de SDS (10%). On ajoute par la suite 100µl de NaCl 5M et on homogénéise la solution. Après incubation de 10 min à 65°C en présence de 80µl de CTAB (CTAB 10%-NaCl 0.7M), les débris pariétaux, les protéines dénaturées et les polysaccharides sont éliminés par deux extractions successives au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25v/24v/1v) et au chloroforme/alcool isoamylique (24v/1v). La séparation des phases aqueuse et organique se fait par centrifugation pendant 20 min à 16000 g et à 4°C. La phase aqueuse additionnée de 2.5 volumes d'éthanol absolu est laissée à -20°C pendant une nuit puis centrifugée 30 min à 16000 g. Le précipité d'ADN est séché, repris dans 50µl de la solution TE [pH8] et conservé à -20°C .

2. Extraction d'ADN à partir des nodules

Les nodules ont été stérilisés superficiellement à l'eau oxygénée 30% pendant 10 min puis lavés 3 fois à l'eau distillée stérile. L'extraction d'ADN a été réalisée à partir des lobes nodulaires broyés dans l'azote liquide en suivant le protocole de Bosco et *al* (1996). Une lyse chimique est effectuée par une incubation dans un tampon de lyse (annexe 2) pendant 1heure à 65°C. Les débris cellulaires sont éliminés par une extraction au chloroforme/alcool isoamylique (24/1). La séparation des phases aqueuse et organique se fait par centrifugation pendant 10 min à 18000 g et à 4°C. La phase supérieure contenant les acides nucléiques est récupérée. L'ADN est précipité par 1/10 volume d'acétate de sodium (3M, pH 5.2) et d'éthanol absolu glacé (2 volumes). Le mélange est incubé pendant une heure dans la glace avant d'être centrifugé à 18000 g, à 4°C et pendant 30 min. Un volume égal de polyéthylène glycol-NaCl (20% PEG8000, 2.5 NaCl) est ajouté à la pelote d'ADN reprise dans 50µl de TE. Le tout est incubé pendant 15 min à 37°C puis centrifugé (30 min, 18000 g). Enfin l'ADN

est partiellement réhydraté par l'éthanol 70%, centrifugé (10 min, 18000 g et 4°C) puis séché et conservé à -20°C. Le même ADN extrait à partir d'un lobe nodulaire a été utilisé pour une amplification des régions d'ADN bactérien et végétal. Toutes les amorces utilisées sont citées dans le tableau 6.

3. Dosage d'ADN

La qualité et la quantité des ADN extraits de culture pure de *Frankia* ou d'un lobe nodulaire ont été évaluées au Nanodrop (Thermo Scientific Nanodrop 2000).

4. Amplification par polymérisation en chaîne (PCR)

Les amplifications par PCR ont été effectuées sur un appareil (Perkin Elmer 480) dans un volume final de 50µl. Les amorces utilisées, le mélange réactionnel, les concentrations des réactifs ainsi que les cycles d'amplification sont indiqués sur les tableaux 6, 7 et 8.

Pour l'extraction à partir des nodules racinaires, l'ADN étant de moins bonne qualité que ceux obtenus à partir de cultures pures, une dilution de 10 à 100 fois a parfois été nécessaire pour réussir l'amplification. Une optimisation des conditions d'amplification s'est avérée nécessaire : dilution de l'ADN de 10 à 100 fois, concentration de 5 à 10% de DMSO, concentration finale en amorces jusqu'à 0.3µM et températures d'hybridation réduites de 5°C

5. Electrophorèses

5.1. Electrophorèse classique

Les électrophorèses ont été effectuées sur des gels horizontaux en agarose dont la concentration a été ajustée selon la taille des fragments d'ADN et la précision de la séparation souhaitée (de 0.8 à 2.5%) dans le tampon TBE (89 mM Tris, 89 mM borate, 2 mM EDTA). Les gels sont ensuite colorés au bromure d'éthidium (BET) (Sambrook et *al*, 1989) .

5.2. Electrophorèse capillaire

Le polymorphisme des fragments d'amplification des ITS 16S-23S de l'ADNr a été détecté par une électrophorèse automatique en condition dénaturante ou ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) (Gtari et *al*, 2007).

L'amorce sens est marquée du côté 5' au phosphoramidite Dye 6-carboxyfluoresceine. Une aliquote (1-5µl) du produit PCR est ajoutée à 20 µl de formamide désionisé et 1 µl de ROX

Dye 1000 pb comme standard interne de poids moléculaire. Le mélange est dénaturé 5 min à 95°C puis plongé dans un bain de glace. Les échantillons sont ensuite résolus en utilisant le programme «Gene Scan analysis» sur un ABI Prism 3730 (Perkin Elmer Applied Biosystems).

Tableau 6 : Liste des amorces utilisées

Cible	Amorces	Séquence nucléotidique (5'-3')	Taille d'amplifiat (pb)	Références
Culture Pure de <i>Frankia</i>				
<i>gyrB</i>	FragyrBF FragyrBR	3'GTTCGATCAAGGTTCTC-5' 3'GCCTGGACCTCGGTG-5'	1400	Cette étude
<i>nifH</i>	nifHF nifHR	GAGGARTTCACCAACGACTTCATCR GAAGTGCTGGCCGATCTT	700	Normand et al. 1988
<i>nifH</i>	IGK NDR-1	TACGGYAARGCBGGYATCGG TTG GAG CCG GCR TAN GCR CA	360	Valdès et al, 2005
<i>nifH</i>	PolF PolR	TGCGAYCCSARRGCBGGYATCGATS GCCATCATY TCRCCGGA	360	Valdès et al, 2005
<i>glnII</i>	FGgs19 FGgs417	TTCTTCATCCACGACCCG GGCTTCGGCATGAAGGT	700	Cournoyer et Normand, 1994
ITS16S-23S	FGPS958 FGPL132'	CTTGACATGCAGGGAAATC CCGGGTTTCCCCATTCGG	1100	Simonet et al, 1991 Ponsonnet et al, 1994
<i>Frankia</i> endophyte des nodules				
<i>glnA</i>	glnA DB41 glnA DB44	TTCTTCATCCACGACCCG GGCTTCGGCATGAAGGT	500	Clawson et al, 2004
<i>dnaA</i>	F7154 dnaAF F7155 dnaAR	GAGGARTTCACCAACGACTTCA TCRGAAGTGCTGGCCGATCTT	700	Bautista et al. Non publié
IGS <i>nifD</i> -K	F9372 nifD1 5 F9374 nifK1 5	GTCATGCTCGCCGTCGGNG GTTCTTCTCCCGGTATCCCA	700	Cette étude
IGS <i>nifD</i> -K	F9373nifD25 F9375nifK25	ACCGGCTACGAGTTCGCNCA TGCGAGCCGTGCACCAGNG	700	Cette étude
<i>Coriaria</i>				
ITS1-2	ITS1 ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	700	White et al, 1990
ITSj	F9030-CJ-ITSF F9031-CJ-ITSR	AGCCGGACCCGCGACGAGTTT CGACGTTGCGTGACGACGCCCA	400	Cette étude
<i>matK</i>	9249-matKF F9250-matKR	ACATTTAAATTATGTGTGTCAG TGCATATACGCACAAATC	700	Cette étude

Tableau 7 : Composition du mélange des réactions PCR

Réactifs	ITS 16S-23S	<i>glnII</i>	<i>gyrB</i>	<i>nifH</i>	IGS <i>nifD-K</i> <i>nifH</i>	<i>glnA</i>	TS1-2 ITSj	<i>matK</i>
Tampon 10X	1	1	1	1	1	1	1	1
MgCl ₂ mM	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	2	2
Amorce F μM	0,6	0.4	0.2	0.5	0.1	0.5	0.3	0.5
Amorce R μM	0,6	0.4	0.2	0.5	0.1	0.5	0.3	0.5
DMSO %	5	5	5	5	0	7.5	10	5
DNTP μM	20	20	20	20	200	20	20	20
TaqDNA polymérase U	1	1	2	2	2	1	1	1

Tableau 8 : Programmes d'amplification par PCR

PCR	cycle	35 cycles			1 cycle
	Dénaturation Initiale	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Elongation Finale
ITS 16S-23S	4 min à 95°C	45 s à 94°C	45 s à 55°C	1 min à 72°C	7min à 72°C
<i>GyrB</i>	3 min à 95°C	30s à 94°C	30s à 60°C	45s à 72°C	7 min à 72°C
<i>NifH</i>	3 min à 95°C	1min à 94°C	1 min à 56°C	2 min à 72°C	7 min à 72°C
<i>GlnII</i>	5 min à 95°C	1 min à 95°C	1 min à 57°C	1 min à 72°C	7 min à 72°C
<i>GlnA</i>	3 min à 95°C	1 min à 94°C	1 min à 55°C	2 min à 72°C	7 min à 72°C
<i>dnaA</i> et IGS <i>nifD-K</i>	3min à 95°C	45 s à 94°C	45 s à 55°C	1.30min à 72°C	7 min à 72°C
<i>matK</i> et ITSj	3min à 95°C	30s à 94°C	45s à 58°C°	2 min à 72°C°	10min à 72°C°
ITS 1-4	3 min à 95°C	30s à 94°C	30s à 55°C°	45s à 72°C	7 min à 72°C
Big-Dye séquence	96°C / 1min	96°C / 10 s 50°C / 5min 60°C / 4min			
Nombre de cycle	1	25			

6. Purification des fragments d'ADN

Les produits d'amplification par PCR ne sont pas suffisamment purs pour être utilisés directement dans les réactions enzymatiques telles que le séquençage ou clonage, et nécessitent une purification préalable. L'excès d'oligonucléotides et de dNTP non-incorporés a été éliminé par le Kit «QIAquick PCR Purification Kit» (QIAGENTM GmbH, Hilden, Germany). Les amplifias montrant des bandes aspécifiques ont été purifiés après électrophorèse et excision de la bande correspondante à partir du gel d'agarose et traitement avec le kit «QIAquick Gel Extraction Kit».

7. Clonage des produits PCR

Les amplifiats ITS avec plusieurs pics par électrophorèse capillaire ont été clonés dans le vecteur pMOSblue (2887 pb) à l'aide du Kit pMOSBlue Blunt Ended Cloning Kit (Amersham Pharmacia Biotech) selon les instructions du fournisseur. Le plasmide a été extrait en utilisant le kit Hi-Speed Plasmid Purification (Qiagen). L'amplification de l'insert a été effectuée par PCR nichée en utilisant les amorces T7 et U19 du vecteur pMOS. Les amplifiats ayant la tailles attendues de l'insert sont purifiés à partir du gel d'agarose par le kit «QIAquick Gel Extraction Kit».

8. Séquençage

Le séquençage enzymatique des fragments d'ADN a été effectué selon la méthode d'incorporation de didésoxynucléotides terminateurs de chaîne, de Sanger et *al* (1977). Après purification et quantification, une aliquote précise d'ADN a été utilisée comme matrice d'une réaction d'amplification enzymatique en présence de didésoxynucléotides (ddNTP) marqués au *Big-Dye*. La réaction s'est déroulée dans un volume final de 20µl, contenant 4µl du mélange Big-Dye contenant l'AmpliTaQ DNA polymérase FS, 4µl du tampon de réaction 2.5X (5X : 400 mM TrisHCl [pH 9], 10 mM MgCl₂) et 3.2 pmol de l'amorce choisie. Les produits de marquage par la Big-Dye ont ensuite été précipités avec de l'isopropanol 75%, séchés et repris dans 18µl du tampon *TSR* (template suppression reagent). Après dénaturation les fragments d'ADN ont été résolus par séquenceur automatique "ABI Prism™ 310" et le programme "Sequence Analysis" (Perkin Elmer Applied Biosystems). Le programme et le cycle d'amplification de la réaction de marquage sont indiqués dans le tableau 9. Les numéros d'accension des séquences nucléotidiques utilisées sont donnés dans les tableaux 6 et 7.

V. Traitement des résultats

Après analyse par BLAST (Altschul et *al*, 1990), les séquences sont alignées et corrigées en utilisant ClustalW (Thompson et *al*, 1997). Les distances entre les séquences ont été calculées par l'indice de Kimura (Kimura, 1980). Les arbres phylogénétiques basés sur l'analyse individuelle ou concaténée des différents gènes ont été construits par la méthode de Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987) et la méthode de Maximum de vraisemblance utilisant le modèle de substitution GTR + G et le programme MEGA version 5.1 (Tamura et *al*, 2011). Parallèlement des arbres ont été tracés par la méthode Bayésienne utilisant le programme Mrbayes (Ronquist et Huelsenbeck, 2003) et le modèle de substitution GTR + G et 1,000,000 generations. Les valeurs de bootstrap ont été déterminées à partir de 1000 répliques (Felsenstein 1989).

Pour étudier la congruence entre les phylogénies de deux partenaires symbiotiques, le logiciel CopyCat (Meier-Kolthoff et *al*, 2007) et le programme ParaFit (Legendre et *al*, 2002) ont été utilisés. La corrélation entre la distance géographique et génétique de *Frankia* et sa plante hôte a été évaluée (<http://www.daftlogic.com/projects-google-maps-distance-calculator.htm>) par le logiciel R (Ihaka and Gentleman, 1996) en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson's r .

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre I

Phylogénie et diversité du genre *Frankia*

Chapitre I

Phylogénie et diversité du genre *Frankia*

A. Etude de la variabilité des ITS 16S-23S de l'ADNr du genre *Frankia*

En se basant sur le séquençage de l'ADNr 16S (Normand et *al*, 1996; huguet et *al*, 2001) et le gène *glnII* (Cournoyer et Lavire, 1999; Gtari et *al*, 2004), les souches du genre *Frankia* ont été groupées dans quatre différents groupes. Le groupe 1 comprend les souches de *Frankia* qui nodulent les Betulaceae, *Myrica* et *Comptonia* (Myricaceae) et Casuarinaceae. Le groupe 2 renferme les souches infectant les Coriariaceae, Dastiscaceae, Rosaceae et les *Ceanothus* (Rhamnaceae). Les membres des familles Elaeagnaceae, Rhamnaceae, *Morella* (Myricaceae) et les *Gymnostoma* (Casuarinaceae) sont nodulés par les *Frankia* du groupe 3. Finalement, le groupe 4 comprend les souches de *Frankia* atypiques (non infectives et/ou non fixatrices d'azote) isolées à partir des nodules de plusieurs plantes actinorhiziennes telles que *Ceanothus*, *Coriaria*, *Datisca* et *Purshia*. Afin de définir les relations phylogénétiques entre les différentes souches de *Frankia*, le séquençage de l'ADNr 16S n'a pas donné de grandes précisions vue que la variabilité de ce gène pour les souches de *Frankia* est faible et les relations phylogénétiques sont parfois ambiguës. Les espaces intertranscrits 16S-23S de l'ADNr (ITS) ont subi moins de contraintes évolutives et sont plus informatifs que les régions adjacentes. Dans ce chapitre, une étude du polymorphisme des ITS d'une collection de 53 souches de *Frankia* a été abordée.

1. Résultats

Dans les conditions de la PCR déjà décrites, un fragment d'environ 1100 pb a été obtenu pour toutes les souches testées. L'amplifiat comprend la partie distale de l'ADNr 16S (540 pb) la partie proximale de l'ADNr 23S (130 pb) et la partie entière de la région ITS 16S-23S. Les électrophorégrammes obtenus suite à la migration des ITS dans des conditions dénaturantes ont permis de détecter la présence ou l'absence de plus qu' une bande. Les résultats montrent que la totalité des souches présente une bande unique à l'exception des sept souches qui sont: BMG5.14, BCU110601, NRRLB16458, Cg70.4, ArI3, ArI4 et ArI5.

Les amplifiats des ITS, présentant une seule bande, ont été directement séquencés tandis ceux présentant plus qu'une bande ont été clonés et puis séquencés. Les séquences ont fait aussi l'objet d'un screening de la présence des ARNt à l'aide du logiciel "scan-SE program version 1.21". (Lowe et Eddy, 1997). Les résultats montrent l'absence totale des ARNt dans les séquences de toutes les

souches. En éliminant les régions flanquantes; 16S et 23S de l'ADNr, la longueur des ITS varie entre 369 pb et 450 pb. En ce qui concerne les souches provenant des *Alnus/Casuarina/Myrica*, elle varie entre 402 et 452 pb tandis que celles des Rhamnaceae et Elaeagnaceae, la longueur varie entre 369 et 425 pb. Pour les souches atypiques et les microsymbiotes obligatoires, elle varie entre 369 et 389 p (annexe 4).

La meilleure résolution des arbres phylogénétiques a été obtenue en incluant la partie distale de l'ADNr 16S, la partie proximale de l'ADNr 23S et la région intergénique du 16S-23S. L'arbre phylogénétique ainsi obtenu est similaire à ceux obtenus pour les gènes de l'ADNr 16S, *nifH* et *glnII*. Quatre groupes ont été regroupés comme suit : (i) Le groupe 1 renferme les souches de *Frankia* isolées et infectives d' *Alnus* et de *Myrica*: ACN14a, ACN1, Ar2402, ACoN24d, ArI3, AvcI1, ArI4, ArI5, NRRLB16406, NRRLB16315, NRRLB16410, CpI1, NRRLB16458, NRRLB16459, NRRLB16464, NRRLB16466, BMG5.40 et NRRLB16467 avec un pourcentage de similarité variant de 74% à 99% et aussi les souches infectives de *Casuarina*: CcI3, Cjl-82, KB5, BR, Cg70.4, CeD, Cg70.9 et BMG5.23 (99–100% de similarité). (ii) Le groupe 2 associe les microsymbiotes obligatoires de *Ceanothus* (CeaLb1, CeaLb2, CeaLb3, FrCveliz et HG1), de *Chamaebatia* (FC2), de *Purshia* (SV2), de *Cercocarpus* (LP1 et EL2) et de *Datisca* (VM1) (98–100% de similarité). (iii) Le groupe 3 comprend des isolats d' Elaeagnaceae (EAN1pec, Ea1-12, CH37, EI5c, EUN1f, BMG5.3, BMG5.5, BMG5.10, BMG5.11, BMG5.12, BMG5.14, BMG5.15, BMG5.16, BMG5.17, BMG5.18 et la souche non cultivable H1S2Hp), les isolats de Rhamnaceae (BCU1110345, BCU1110501, BCU1110601, NRRLB16219, NRRLB16322 et NRRLB16316), et des isolats de *Casuarina* (NRRLB16306, NRRLB16412 et NRRLB16414) présentant 77% à 98% de similarité. Toutes les souches du groupe 3 sont infectives et effectives des plantes actinorhiziennes appartenant aux familles des Elaeagnaceae/ Rhamnaceae à l'exception des espèces de *Ceanothus*. (iv) Finalement le groupe 4 (55-90% de similarité) associe les souches de *Frankia* atypiques: DC12, CN3, NRRLB16512, NRRLB16386 et EuI1c isolées respectivement de *Datisca cannabina*, *Coriaria nepalensis*, *Purshia tridentate*, *Morella californica* et *Elaeagnus umbellata*. Ce groupe comprend aussi la souche NRRLB16323 isolée de *Comptonia peregrina* (Figure 6).

La grande variabilité des séquences ITS observée entre les souches appartenant aux différents groupes pourrait être expliquée par la faible pression de sélection amenant aux phénomènes de mutations et d'insertion/déletion d'où l'information phylogénétique déduite de cette région est inconsistente. La probabilité de gérer des alignements non fiables est assez importante à cause des instabilités des gaps entre les séquences. Ceci devient particulièrement problématique dans le cas où

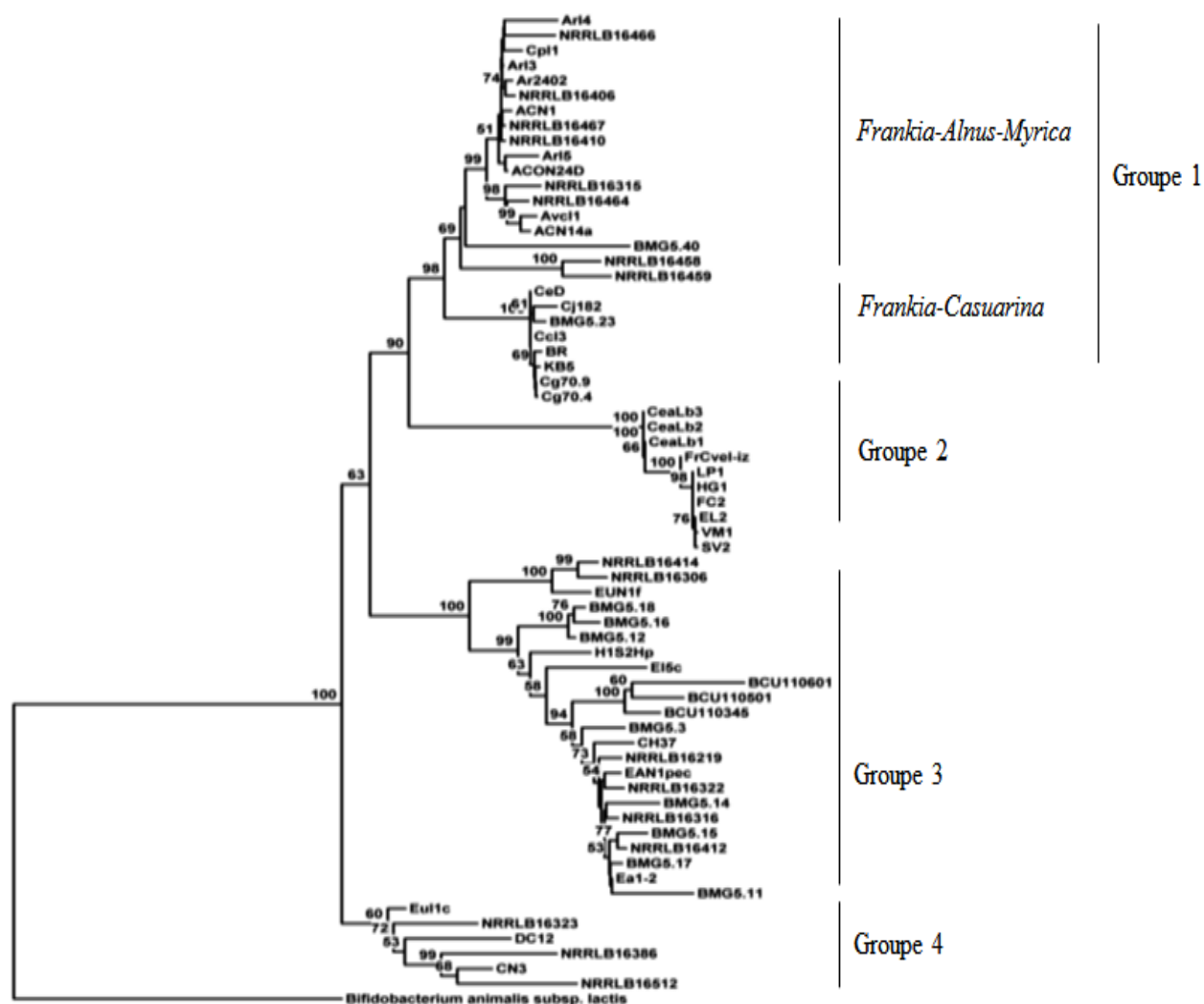


Figure 6. Arbre des relations phylogénétiques entre les souches du genre *Frankia*, établi par Neighbor-Joining sur la base des séquences intergéniques ITS 16S-23S. Seulement les valeurs de bootstraps qui sont supérieur à 50 sont affichées aux dessus des branches. Ces valeurs ont été déterminées à partir de 1000 répliques. Les valeurs de probabilité postérieure supérieure à 50 sont présentées aux dessous des branches.

Les séquences sont de tailles différentes et/ou ayant un GC% assez élevé (le cas de *Frankia*). En ajoutant les régions adjacentes du 16S (334 pb) et du 23S (20 pb) aux séquences des ITS, on a remarqué que la topologie de l'arbre phylogénétique retraçant les relations entre les différents groupes de *Frankia* est devenue cohérente et ressemble énormément aux arbres phylogénétiques basées sur le 16S, le *nifH* et le *glnII*. La taille des génomes de *Frankia* varie énormément : 9.04 Mpb pour EANpec (groupe 3), 7. 50 Mpb pour ACN14a (groupe 1), 5.43 Mpb en ce qui concerne Ccl3 (Groupe 1) (Normand et *al*, 2007) et 5 Mpb pour *Datisca glomerata* (symbiote obligatoire). Ceci suggère que les réarrangements des génomes par des expansions majeurs ou des réductions survenaient en réponses d'adaptation biogéographique de leurs plantes hôtes. Par ailleurs cette étude a montré une diversité assez importante pour les souches cultivables du groupe 1 (à l'exception des

souches de *Casuarina*), groupe 3 et groupe 4 tandis que peu de diversité a été observée pour les souches appartenant au groupe 2. Ceci est en concordance avec les résultats expliquant la variation des tailles des génomes de *Frankia*. En effet, pour les souches de *Casuarina* ainsi que celles du groupe 2, elles ont une distribution géographique assez restreinte qui dépend énormément de la distribution de leurs plantes hôtes (Benson et al, 2004). De plus, les souches de *Casuarina* sont très difficilement isolées. Les souches du groupe 2 aussi n'ont pas pu être isolées jusqu'à présent malgré plusieurs tentatives et elles ont été considérées comme des symbiotes obligatoires (Clawson et al, 2004; Vanden Heuvel et al, 2004). La variabilité au niveau des séquences ITS est en étroite relation avec les modes de vie des souches allant d'une vie saprophytique non infective et/ou non effective à une vie symbiotique facultative ou obligatoire.

2. Discussion

Pour la phylogénie des souches de *Frankia* basé sur le marqueur ribosomique ITS, nous avons remarqué que l'alignement et la comparaison des séquences des ITS sont difficiles à réaliser pour des souches génétiquement éloignées à cause de l'extrême diversité de *Frankia*. La diversité des séquences ITS est large pour les *Frankia* cultivables appartenant aux groupes 1 (à l'exception des souches de *Casuarina*), 3 et 4, mais elle est limitée pour les symbiotes obligatoires du groupe 2. La topologie de l'arbre phylogénétique basée sur les ITS est cohérente et en concordance avec celle issue de l'analyse des gènes *nifH*, *glnA* et de l'ADNr 16S, (Cournoyer et Lavire, 1999; Gtari et al, 2004). Le résultat de cette étude confirme l'idée d'une altération de la diversité génétique de *Frankia* parallèlement à un changement du mode de vie avec transition de l'état saprophyte non infectif et/ou non effectif, symbiote facultative et puis à l'état de symbiote obligatoire. Les souches de *Frankia* appartenant au groupe 1 (à l'exception des souches de *Casuarina*) et au groupe 3 sont généralement distribuées dans le sol indépendamment de la plante hôte appropriée suggérant ainsi une possibilité d'un mode de vie relativement très saprophytes (Benson et al, 2004). Au contraire, les souches de *Casuarina* (un sous-groupe du groupe 1) ainsi que les symbiotes obligatoires de groupe 2 ont une distribution géographique restreinte et dépendante de leur hôte (Benson et al, 2004). Ce phénomène a été prouvée chez les endosymbiotes des insectes (Moran et al, 2003).

L'extrême diversité des ITS (seulement 4.2% des sites constants) entre les groupes de *Frankia* est expliquée par des duplications ou des délétions des séquences nucléotidiques de l'espace intergénique 16S-23S en respectant les gènes adjacents (97% à 99% de l'ARN 16S). De plus, la variation de taille de chromosome de *Frankia* entre 9.04 Mpb pour le groupe d'*Elaeagnus* présentant la plus grande hétérogénéité, 7.5 Mpb pour les *Frankia* d'aulne de moyenne diversité, 5.43 Mpb pour les symbiotes ayant un spectre d'infectivité restreint pour *Casuarina* (Normand et al, 2007), et à 5 Mpb pour les endosymbiotes obligatoires, nous permet de dire que cette diminution

de la taille et de la variabilité des génomes coïncide avec l'extension du mode de vie symbiotique de *Frankia*. La régression de taille des génomes chez *Frankia* pourrait être due à l'absence de recombinaison et à un transfert horizontal des gènes accompagné d'une perte de matériel génétique, par des délétions des régions non sélectives, comme par exemple les pseudo-gènes.

3. Publication

La première partie de ce chapitre a fait l'objet d'un article publié dans le journal Microbial Ecology (IF : 3.251).

Article 1 : Faten Ghodhbane-Gtari, **Imen Nouioui**, Mohamed Chair, Abdellatif Boudabous, Maher Gtari. 16S–23S rRNA Intergenic Spacer Region Variability in the Genus *Frankia*. 2010. Microbial Ecol. 60 : 487–495.

Chapitre I

Phylogénie et diversité du genre *Frankia*

B. Etude phylogénétique du genre *Frankia* basée sur le séquençage des trois loci *gyrB*, *nifH* et *glnII*

Malgré plusieurs essais ayant utilisés une panoplie de méthodes phénotypiques incluant la morphologie, la chimiotaxonomie, l'infectivité et la physiologie pour définir des espèces du genre *Frankia* (Lechevalier, 1994), *F. alni* est la seule espèce reconnue (Lalonde et al, 1988). Un problème majeur s'est posé pour ces études est le nombre limité des souches et qui diffèrent d'une étude à une autre. Quatre groupes ont été définis sur la base du séquençage de l'ADNr 16S (Normand et al, 1996). Les trois premiers groupes ont été aussi définis sur la base du séquençage des gènes *nifH* (Jeong et al, 1999; Gtari et al, 2007) et *glnA* (Clawson et al, 2004). En ce qui concerne le groupe 4, il a été aussi décrit par le biais du séquençage du gène *glnII* (Cournoyer et Lavire 1999; Gtari et al, 2004) et plus récemment par le séquençage des ITS 16S-23S de l'ADNr (Ghodhbane-Gtari et al, 2010).

L'objectif de cette étude est de retracer les relations phylogénétiques entre les souches du genre *Frankia* en utilisant le séquençage de trois loci, *gyrB*, *nifH* et *glnII*.

1. Résultats

1.1. Diversité et phylogénie du genre *Frankia* basée sur le gène *gyrB*

A partir d'un amplicon de 1400 à 1500 pb, un fragment de 1020 pb (représentant la partie interne du gène *gyrB*) a été séquençé pour un total de 34 souches de *Frankia* testées. Une région (position 658 au niveau de la séquence de la souche ACN14a) renfermant d'importantes délétions/insertions allant de trois nucléotides pour la souche BMG5.7 jusqu'à 164 nucléotides pour la souche BMG5.12 a été détectée par l'alignement des séquences *gyrB*. Aucune homologie de cette région avec des séquences connues dans les banques de données n'a été révélée. La présence ou l'absence de cette région n'a aucun effet sur la topologie des arbres phylogénétiques. Ces derniers ont été construits en se basant sur les méthodes Maximum de vraisemblance, Maximum de parcimonie et Neighbor-Joining : ils sont similaires entre eux et présentent une topologie en concordance avec celle de l'ADNr 16S. Les quatre groupes du genre *Frankia* ont été bien résolus (Figure 7). Le groupe 4 est à la base de

l'arbre phylogénétique. L'alignement des séquences *gyrB* a permis de calculer un pourcentage de similarité intragroupe qui varie de 89-100%, 97-99%, 86-100% et 86-100% pour les groupes 1, 2, 3 et 4, respectivement.

1.2. Diversité et phylogénie du genre *Frankia* basée sur le gène *nifH*

Un fragment de 700 pb a été obtenu pour un total de 19 souches de *Frankia* testées. Environ 500 nucléotides ont été séquencés dans les deux sens. Quinze séquences partielles du gène *nifH* ont été obtenues à partir des bases de données GenBank (tableau 6). L'amplification du gène *nifH* a été impossible pour certaines souches atypiques (à l'exception de la souche NRRLB-16386), la souche BMG5.23 (infective de *Casuarina glauca*) et plusieurs microsymbiotes de nodules de *Coriaria myrtifolia* originaires du Maroc. L'alignement des séquences du gène *nifH* nous a permis d'estimer la variabilité génétique entre les groupes. En effet le pourcentage de similarité est de 92-100%, 92- 99%, 89-100% et 86-100% pour les groupes 1, 2, 3 et 4, respectivement. Trois méthodes (Maximum de vraisemblance, Maximum de parcimonie et Neighbor-Joining) ont été utilisées pour la construction de l'arbre phylogénétique. Cependant, la topologie des arbres phylogénétiques n'est pas en concordance avec celle de l'ADNr 16S (Figure 7) : sur trois plans (i) La ségrégation du groupe 1 en deux sous-groupes (a) le premier renfermant les souches infectives d'*Alnus-Myrica* et (b) le second associant les *Frankia* infectives de *Casuarina*. Ce dernier présente une parenté génétique avec le groupe 3, (ii) Le groupe 2 (*Frankia* non-cultivables) est basal et (iii) Le groupe 3 réunit les souches infectives des Elaeagnaceae et Rhamnaceae avec la souche atypique NRRLB-16386.

1.3. Diversité et phylogénie du genre *Frankia* basée sur le gène *glnII*

Un fragment de 400 pb a été amplifié et séquencé pour 27 souches de *Frankia* testées. Onze séquences *glnII* ont été obtenues à partir des bases de données Genbank (tableau 6). L'alignement de l'ensemble des séquences a permis de calculer un pourcentage de similarité qui varie de 73 à 100 % entre les différents groupes à 85-100%, 93-99%, 82-98% et 88-97% au sein des groupes 1, 2, 3 et 4, respectivement. La topologie de l'arbre phylogénétique n'est pas en concordance avec celle de l'ADNr 16S. Les valeurs de bootstraps, 81–96% ne supportent que les groupes 1 et 2. En effet, plusieurs souches se trouvent dans une position phylogénétique aberrante telle que le cas de la souche Thr (infective de *Casuarina*) et NRRLB-16412 (infective d'*Elaeagnus*). Elles sont associées dans le groupe 1 (Thr) et 4

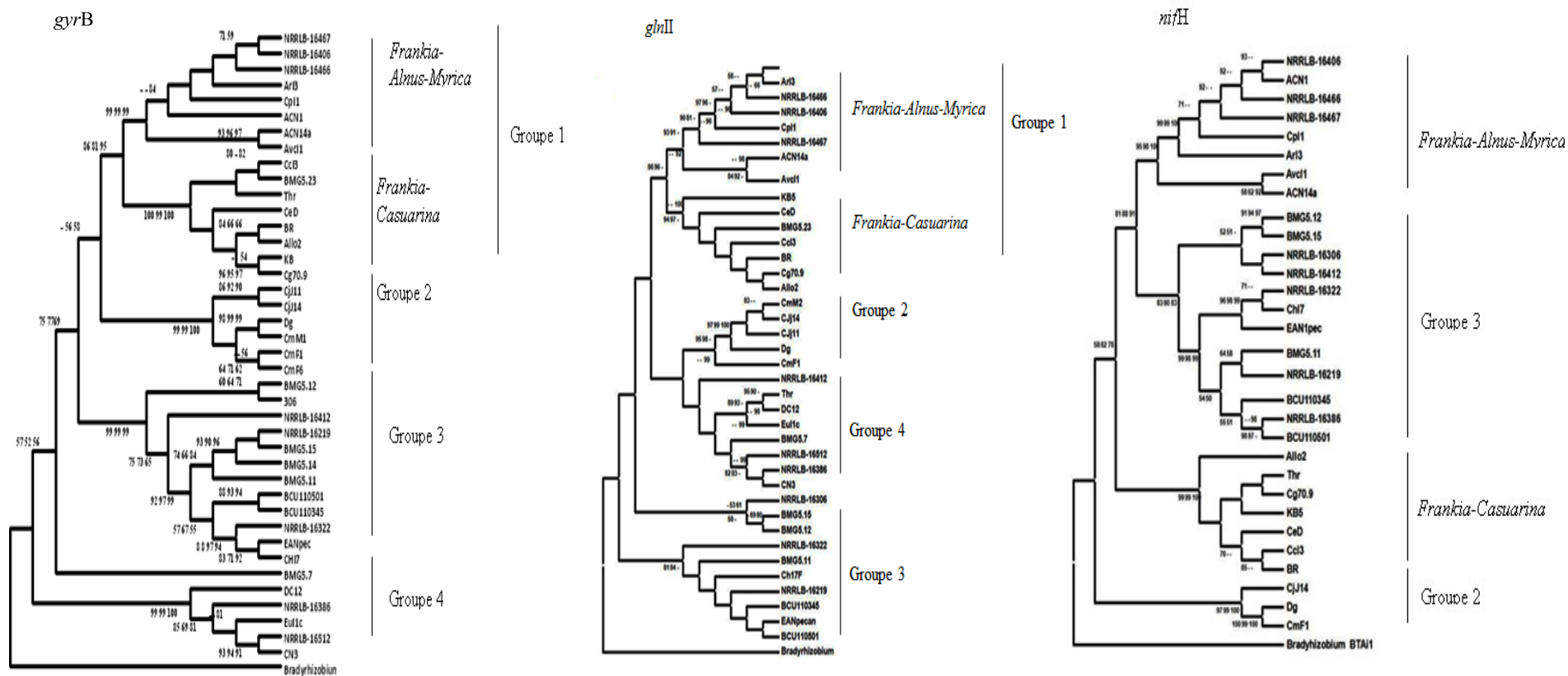


Figure 7. Arbre des relations phylogénétiques entre les souches du genre *Frankia*, construit par Maximum de Vraisemblance sur la base des séquences *gyrB*, *nifH* et *glnII*. Les Valeurs de bootstrap supérieures à 50 sont présentées ci-dessus des branches. Ces valeurs ont été déterminées à partir de 1000 répliques. Les Valeurs de probabilité postérieure de plus de 50 sont présentées ci-dessous des branches. Les arbres phylogénétiques construits par Maximum de parcimonie et Neighbour-Joining étaient topologiquement similaires.

(NRRLB-16412). Le groupe d'Elaeagnaceae-Rhamnaceae occupe une position basale dans l'arbre phylogénétique (Figure 7).

1.4. Phylogénie des souches de *Frankia* basée sur les séquences concaténées des trois loci *gyrB*, *glnII* et *nifH*.

La topologie des arbres phylogénétiques basée sur les séquences concaténées des trois loci *gyrB*, *nifH* et *glnII*, (construits selon trois méthodes : Maximum de vraisemblance, Maximum de parcimonie et Neighbor-Joining) est similaire à celle issue de l'analyse de l'ADNr 16S (Figure 8b). Les quatre groupes sont bien soutenus avec des valeurs de bootstraps de 87-100% (Figure 8a). Le groupe 1 contient les souches de *Frankia* infectives d'*Alnus-Myrica* (ACN14a, ACN1, ArI3, AvcI1, NRRLB16406, CpI1, NRRLB16466.40 et NRRLB16467) et de *Casuarina* (CcI3, KB5, BR, CeD, Cg70.9 et BMG5.23). Le groupe 2 englobe les microsymbiotes obligatoires associés à *Datisca glomerata*, *Coriaria myrtifolia* et *Coriaria japonica*. Le groupe 3 renferme les souches infectives d'*Elaeagnus* (EAN1pec, BMG5.11, BMG5.12 and BMG5.15), de Rhamnaceae (BCU1110345, BCU1110501, Chi7, NRRLB-16219, and NRRLB-16322) et de *Casuarina* (NRRLB16306 et NRRLB16412). Le groupe 4, à position basale, associe les souches de *Frankia* suivantes : DC12, CN3, NRRLB16512, NRRLB16386 et EuI1c isolées respectivement de *Datisca cannabina*, *Coriaria nepalensis*, *Purshia tridentata*, *Myrica californica* et *Elaeagnus umbellata*.

2. Discussion

L'analyse des séquences des gènes individuels *gyrB*, *nifH* et *glnII*, engendre des arbres phylogénétiques en congruence avec celui basé sur l'ADNr 16S de Normand et *al*, (1996). Cependant, cette analyse ne reflète qu'en partie l'évolution des différents groupes. En effet, des différences majeures dans l'embranchement des groupes ont été observées. Ainsi, le groupe basal a été représenté une fois par le groupe 4 en se basant sur les gènes *gyrB* conformément à des études précédentes sur l'ADNr16S (Normand et *al*, 1996) et l'ITS 16S-23S (Ghodhbane-Gtari et *al*, 2010), par le groupe 3 en analysant le gène *glnII*, et enfin par le groupe 2 en s'appuyant sur le gène *nifH*. Ce phénomène pourrait être expliqué un transfert horizontal des gènes (Lawrence, 1999; Lawrence et Retchless, 2009). Cette idée pourrait être vérifiée et confirmée par des études moléculaires sur la souche NRRLB-16386 (Fix+/Nod-), vu qu'elle est l'unique souche du groupe 4 qui renferme le gène *nifH*.

a) Phylogénie basée sur les séquences concaténées des trois loci *gyrB*, *glnII* et *nifH*

b) Phylogénie basée que les séquences de l'ADNr 16S

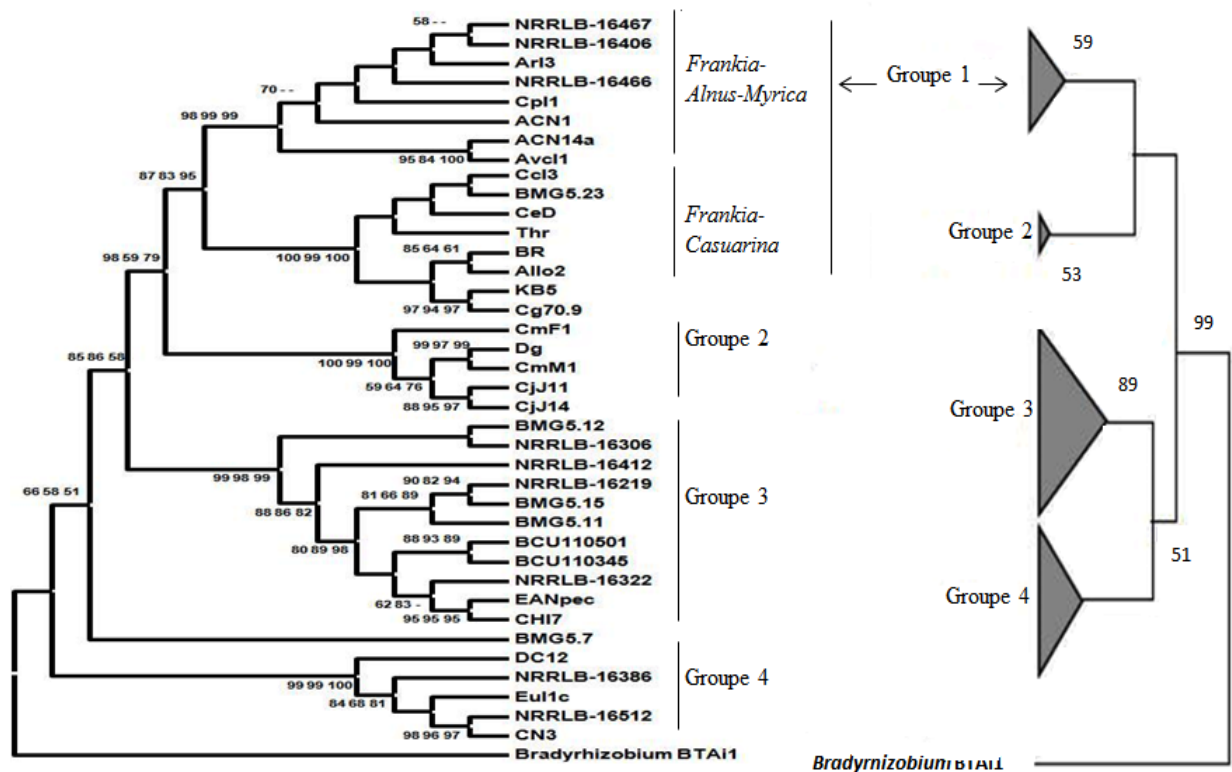


Figure 8. Arbre des relations phylogénétiques entre les souches du genre *Frankia*, construit par Maximum de Vraisemblance sur la base des séquences concaténées, de *gyrB*, *nifH* et *glnII* (a). Les valeurs de bootstraps supérieur à 50 sont affichées aux dessus des branches. Ces valeurs ont été déterminées à partir de 1000 répliques. Les valeurs de probabilité postérieure supérieure à 50 sont présentées aux dessous des branches. Arbre phylogénétique basé sur les séquences de l'ADNr 16S (b).

Cette souche a été étudiée auparavant et son incapacité à infecter différentes plantes hôtes a été prouvée (Huguet et al, 2005). Son caractère atypique a été aussi confirmé par des études moléculaires portant sur le séquençage de l'ADNr16S et des ITS 16S-23S (Normand et al, 1996; Ghodhbane-Gtari et al, 2010). L'analyse du gène *glnII* a donné le même emplacement de cette souche dans l'arbre phylogénétique que celui obtenu par le *nifH* (au niveau du groupe 3 renfermant les souches infectives des Elaeagnaceae-Rhamnaceae). Ces arguments sont en faveur du transfert horizontal du gène *nifH*. Un autre exemple qui renforce notre interprétation, est illustré dans l'emplacement de la souche Thr isolée de *Casuarina* (Girgis et al, 1990) dans le groupe 4 de *Frankia* atypique d'après l'analyse du gène *glnII*. Pour une meilleure phylogénie qui reflète la relation génétique entre les souches de *Frankia* testées, une concaténation des séquences de trois gènes a été réalisée et un arbre phylogénétique a été reconstruit selon les trois méthodes précédemment citées. Il en est déduit

que le groupe 4 est le groupe basal à partir duquel on note l'émergence de groupe 3 (*Frankia* infectives de Myricaceae, Rhamnaceae, Elaeagnaceae, *Gymnostoma* et des Casuarinaceae). Le groupe 2 des *Frankia* non cultivables est le groupe-frère du groupe 1 (*Frankia Alnus-Casuarina*). Les groupes 1 et 2 sont les derniers groupes qui ont émergé. Enfin, les résultats de notre analyse suggèrent que le choix des gènes pour l'analyse phylogénétique est crucial et ne peut pas être universel. Bien que les gènes *nifH* et *glnII* aient été largement utilisés, leur analyse individuelle peut poser un problème. La concaténation des séquences des gènes semble être un outil puissant pour contourner ce problème et affiner l'étude évolutive.

3. Publication

Cette partie B du premier chapitre a fait l'objet d'un article publié dans le journal Antonie Van Leeuwenhoek (IF : 2.07).

Article 2 : Imen Nouioui, Faten Ghodhbane-Gtari, Nicholas J. Beauchemin, Louis S. Tisa, Maher Gtari. Phylogeny of members of the *Frankia* genus based on *gyr B*, *nifH* and *glnII* sequences. 2011. Antonie Van Leeuwenhoek. 100 (4) : 579-87.

Chapitre II

Ecologie évolutive du groupe 2 des *Frankia* non cultivables

Chapitre II

Ecologie évolutive du groupe 2 de *Frankia* non-cultivable

A. Etude de la cospéciation chez la symbiose *Frankia-Coriaria*

Le groupe 2 du genre *Frankia* renferme des souches génétiquement très peu variables et associées avec les Coriariaceae, Dastiscaceae, Rosaceae et les *Ceanothus* (Rhamnaceae) (Vanden Heuvel et al, 2004; Nouioui et al, 2011; Ghodhbane-Gtari et al, 2010). Aucune souche de ce groupe n'a pu être isolée jusqu'à présent malgré plusieurs tentatives et elles ont été considérées comme des symbiotes obligatoires (Clawson et al, 2004; Vanden Heuvel et al, 2004). D'autant plus que des études antérieures d'inoculation croisées ont montré l'appartenance de ces souches à un seul groupe d'infectivité et se distingue des autres souches cultivables du genre *Frankia* (Torrey, 1990; Kohls et al, 1994; Mirza et al, 1994). Parmi les plantes actinorhiziennes associées à ce groupe de *Frankia* la famille des Coriariaceae avec un seul genre et 17 espèces (Kubitzkik, 2011; Yokoyama et al, 2000) se distingue par une répartition géographique très particulière. En effet les *Coriaria* spp sont réparties dans quatre zones distinctes et dispersées dans le monde : Méditerranée, Sud-Est de l'Asie, Amérique Centrale et du Sud, Nouvelle-Zélande, les îles du Pacifique et Papouasie-Nouvelle-Guinée (Good, 1930; Allan, 1961; Melville, 1966 et 1981; Skog, 1972).

L'association *Frankia-Coriaria* représente par conséquent un modèle pertinent pour tester l'hypothèse de cospéciation entre les deux partenaires de la symbiose actinorhizienne. Pour cela, des nodules de *Coriaria* de 5 différentes espèces couvrant la diversité géographique du genre ont été utilisés : *C. myrtifolia* (Maroc et France), *C. nepalensis* (Pakistan), *C. arborea* (Nouvelle-Zélande), *C. japonica* (Japon), et *C. microphylla* (Mexique). Trois marqueurs génétiques pour *Frankia* (*glnA*, *dnaA*, et l'IGS *nifD-K*) et 2 régions d'ADN pour *Coriaria* (*matK* et l'ITS de l'ARNr 18S-28S) ont été utilisés pour des analyses phylogénétiques comparatives.

1. Résultats

Pour éviter toute ambiguïté taxonomique, le même ADN extrait des nodules a été utilisé pour caractériser *Frankia* et son hôte *Coriaria*. Des amplifications des 3 marqueurs bactériens et de 2 régions d'ADN végétal ont été effectuées à partir du même échantillon.

Cependant, dans plusieurs cas il était plus facile d'amplifier *Frankia* que *Coriaria*. Ceci peut être expliqué par la spécificité des amorces utilisées. Pour les *Frankia*, une moyenne des distances génétiques a été calculée pour chaque marqueur et s'est montré relativement faible pour le gène *dnaA* ($p=0.0378$), intermédiaire pour *glnA* ($p=0.0625$) et élevée pour l'IGS *nifD-K* ($p=0.0833$). Le blast a assigné les séquences des différents gènes dans le groupe 2 de *Frankia*. La concaténation des séquences des trois régions d'ADN a engendré environ 3000 nucléotides. Pour les différentes espèces de *Coriaria*, la moyenne des distances génétiques était faible pour le gène *matK* ($p=0.0205$) par rapport à la région ITS1-2 ($p=0.0423$). La concaténation des séquences de *matK* et ITS1-2 a fourni une séquence de 1500 nucléotides utilisée pour la construction de l'arbre phylogénétique. Une topologie similaire a été observée entre les arbres phylogénétiques basée sur l'analyse des gènes *dnaA*, *glnA* et *nifD-K* pour *Frankia* et *matK* et ITS pour *Coriaria*, quelle que soit la méthode utilisée. Dans cette étude, la souche CcI3 (infective de *Casuarina*) et *Casuarina equisetifolia* ont été utilisées comme groupes phylogénétiques externes. Le groupe A renferme les *Frankia* endophytes de Nouvelle-Zélande. Trois autres groupes émergent à partir du groupe A à position phylogénétique basale : (i) le groupe B englobe les *Frankia* endophytes du Pakistan, Mexique et de France, (ii) le groupe C renferme les *Frankia* associés à *Coriaria* du Maroc, et (iii) le groupe D inclut les *Frankia-Coriaria* de France, du Japon ainsi que la souche séquencée Dg (microsymbiote de *Datisca glomerata*) (tableau 7). En ce qui concerne la plante hôte, seulement deux groupes ont été obtenus : le groupe 1 basal pour les *Coriaria* de Nouvelle Zélande et d'Amérique du Sud, et le groupe 2 pour les *Coriaria* du Japon, des régions méditerranéennes et du Pakistan.

La congruence entre les deux arbres phylogénétiques de *Frankia* et de *Coriaria* a été évaluée par les programmes Copicat et ParaFit (Legendre et al 2002). La distance globale entre *Frankia* et sa plante hôte est importante ($p = 0,33$), ce qui permet de rejeter l'hypothèse de cospéciation. Concernant *Frankia*, quatre groupes phylogénétiques sont ressortis de cette étude. Des corrélations positives ont été obtenues entre les distances géographiques et les distances génétiques. Toutefois, ces corrélations ne sont pas significatives pour les *Frankia* symbiotes ($r^2 = 0,772$; $F_{geneticdist} = (geogdist \times 5.830e^{-06}) + 2.541e^{-02}$), ni pour les plantes hôtes *Coriaria* ($r^2 = 0,883$; $F_{geneticdist} = (geogdist \times 2.023e^{-06}) + 6.460e^{-03}$).

2. Discussion

Les différentes études paléontologiques basées sur les macro-fossiles et les fossiles de pollen (Gladkova, 1962; Doyle, 1969; Raven et Axelrod, 1974; Muller, 1981; Eriksson et Bremer, 1992) indiquent que la famille des Coriariaceae a une origine Laurasienne (l'Amérique du Nord et l'Eurasie). Par contre, les études réalisées par Croizat (1952) et Schuster (1976) montrent que les Coriariaceae sont d'origine Gondwanienne et qu'elles ont ensuite migré vers l'hémisphère Nord. Les résultats contradictoires de ces études n'étant pas convaincants (difficulté d'attribuer des fossiles à une famille ou genre donné), il est nécessaire de faire appel à d'autres approches. La phylogénie moléculaire positionne la famille des Coriariaceae près des Datisceae et elle est plus en accord avec une origine Gondwanienne. Yokoyama et *al* (2000) indique que *Coriaria* a émergé depuis 59-63 Millions d'années, ce qui est cohérent avec la date de 70 Millions d'années annoncée par Bell et *al* (2010). Cependant, les mêmes chercheurs proposent une émergence de la famille de Casuarinaceae depuis environ 30 Millions d'années.

Le regroupement et la topologie de l'arbre phylogénétique des espèces de *Coriaria* incluses dans cette étude sont en concordance avec celle proposée par Yokoyama et *al* (2000). Cependant la position phylogénétique basale de *C. arborea* (Nouvelle-Zélande), de *C. microphylla* et de *C. ruscifolia* (Amérique de Sud) contredit les résultats de Yokoyama et *al* (2000). Ces derniers ont trouvé que les espèces Eurasiennes occupent la position basale d'après le résultat d'analyse des gènes *rbcL* (a large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) et *matK* (maturase K).

Le résultat de cette étude suggère que l'ancêtre des *Coriaria* pourrait avoir émergé entre l'Asie et la Nouvelle-Zélande et se serait ensuite dispersé dans le monde, et que la lignée des *Coriaria* asiatiques pourrait avoir donné naissance à la lignée méditerranéenne. La lignée de *Coriaria* de Nouvelle-Zélande a probablement donné naissance aux espèces de l'Amérique du Nord (figure 10). Des études antérieures ont montré une faible variabilité génétique des *Frankia* du groupe 2 (Vanden Heuvel et *al*, 2004; Nouioui et *al*, 2011; Ghodhbane-Gtari et *al*, 2010). Cependant, ces travaux ont été focalisés sur une partie seulement de la diversité du symbiote *Frankia-Coriaria* en Amérique du Nord et Méditerranée. Dans ce travail, nous avons élargi la diversité biogéographique des deux partenaires symbiotiques pour en étudier leurs phylogénies et leur évolution. En effet, quatre sous-groupes de *Frankia* endophytes ont été identifiés mais qui ne montrent aucune correspondance avec la phylogénie de leur plante-

hôte (Figure 9). La position ancestrale du groupe A, qui associe les microsymbiotes de *C. arborea* (Nouvelle-Zélande) est en accord avec le travail de Vanden Heuvel et *al* (2004). En revanche, la variabilité génétique des séquences des *Frankia* endophytes est relativement élevée ($p=0.0625$) par rapport à celle basée sur le gène *glnA* ($p= 0.00454$) rapportée par Vanden Heuvel et *al* (2004).

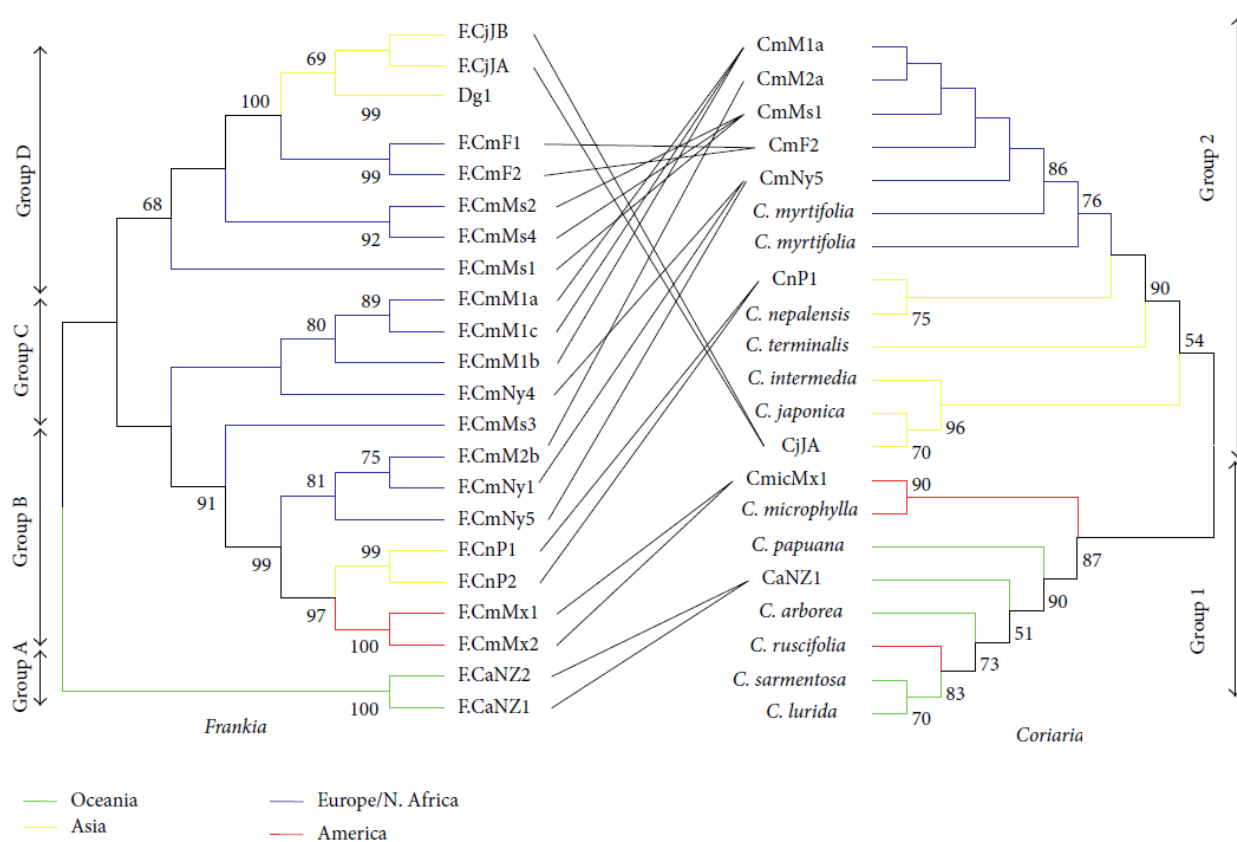


Figure 9. Arbres des relations phylogénétiques entre les souches du genre *Frankia* (à gauche) et les espèces du genre *Coriaria* (à droite), construits par Maximum de vraisemblance et basés sur les séquences concaténées de *glnA*, *dnaA* et l'IGS *nifD-K* pour *Frankia* ainsi que *matK* et ITS1-2 pour *Coriaria* (dénomination des groupes 1 et 2 de *Coriaria* selon Yokoyama et *al*, 2000).

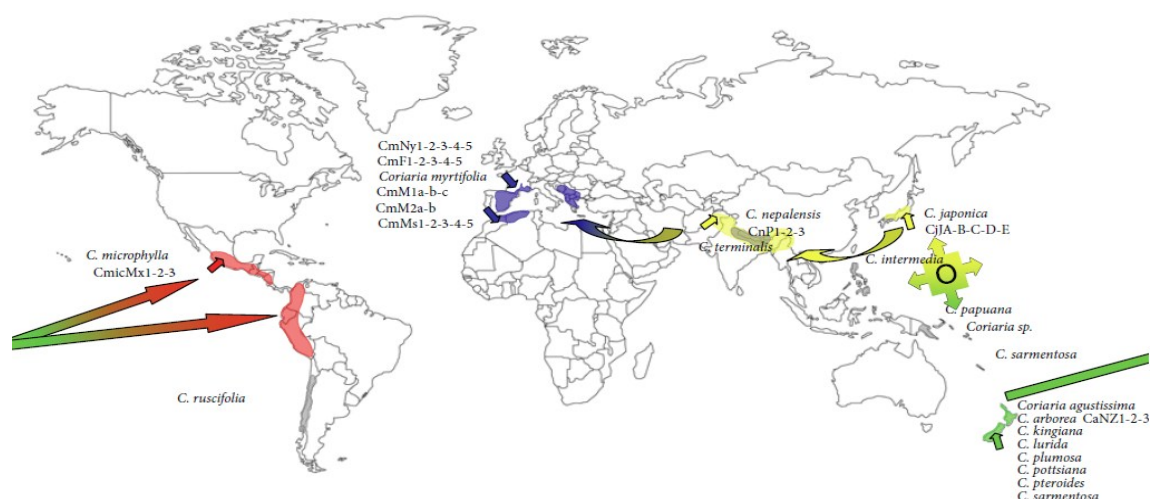


Figure 10. Répartition géographique des espèces de *Coriaria*. Les nodules racinaires de *C. myrtifolia*, *C. arborea*, *C. nepalensis*, *C. japonica* et *C. microphylla* ont été échantillonnés dans les régions méditerranéennes du Maroc et de France, en Nouvelle-Zélande, au Pakistan, au Japon et au Mexique, respectivement. Les petites flèches : sites d'échantillonnage. ➡ Voies possibles de dispersion.

La datation fondée sur l'horloge moléculaire suggère que *Frankia* a émergé depuis 125 Millions d'années avant même l'apparition des fossiles d'angiospermes au Crétacé et l'expansion des plantes actinorhiziennes. Normand et *al*, 1996 ont calculé un pourcentage de 4% de divergence entre le groupe 2 et les autres groupes du genre *Frankia*, ce qui correspond à un temps d'apparition de *Frankia* de 200 Millions d'années en se basant sur l'équivalence proposée par Ochman et Wilson (1987) (1% de divergence égale 50 Millions d'années). Ces chercheurs ont conclu que le genre *Frankia* a émergé avant l'apparition des différentes lignées des dicotylédones et que les *Frankia* du groupe 2 forment le groupe natif. Ce dernier aurait émergé d'un ancêtre non symbiotique, proto-*Frankia*, qui daterait de 62-130 Millions d'années selon Jeong et *al* (1999) ou de 100-200 Millions d'années selon Normand et *al*, (1996). Une distance inférieure à 1 % au niveau de l'ADNr 16S entre les *Frankia-Alnus* et les *Frankia-Casuarina* indique que ces derniers serait apparu depuis moins de 50 Millions d'années (Normand et *al*, 1996). Le groupe *Frankia-Casuarina* est d'évolution plus récente que le groupe *Frankia-Coriaria*. Ce groupe présente aussi une faible variabilité génétique et une dépendance symbiotique élevée. Du fait de son évolution récente il n'aurait pas encore interagit avec d'autres hôtes sur d'autres territoires ce qui lui aurait fait perdre le signal de sa cospéciation à la plante-hôte.

L'association symbiotique a souvent tendance à devenir obligatoire comme dans le cas de *Frankia-Casuarina* où le microsymbiote n'est présent que dans un sol proche de son

partenaire végétal (Zimpfer *et al*, 1997) ce qui reflète une perte d'autonomie et une dépendance à la plante-hôte. La spéciation de l'hôte pourrait conduire à une spéciation synchrone de son microsymbiote sauf en cas de dispersion sur longue distance (par exemple par le vent ou les oiseaux migrateurs) ou s'il y a survie des *Frankia* du groupe 2 dans la rhizosphère d'une plante non hôte comme nous l'avons démontré pour *Frankia-Coriaria* présent dans la rhizosphère d'*Alnus glutinosa* en Tunisie (Nouioui *et al*, 2013). Les nombreuses transitions observées, en passant d'un continent à un autre, au niveau de l'arbre phylogénétique de *Frankia* issu de cette étude, renforcent cette idée.

Yokoyama *et al* (2000) ont étudié la phylogénie des différentes espèces de *Coriaria* et ont déduit que les espèces Eurasiennes ont divergé tôt et qu'elles ont une diversité plus importante que les autres groupes. Par contre l'origine du genre *Coriaria* aurait pu être en Amérique du Nord, dans ce cas il sera facile d'enraciner les espèces de l'Amérique de Sud et de Pacifique. Notre présente étude nous mène à l'idée de l'Océanie qui paraît être logique et répond aux inférences émises par le positionnement phylogénétique des deux symbiotes *Frankia* et *Coriaria*. Un autre élément qui pourrait étayer cette hypothèse est le grand nombre d'espèces de *Coriaria* existantes. Selon Yokoyama *et al* (2000), la Nouvelle-Zélande est à l'origine de 8 de 17 espèces de *Coriaria*.

Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent que les *Frankia* microsymbiotes associés aux différentes espèces de *Coriaria* ont probablement été dispersées dans le monde comme un proto-*Frankia*, ancêtre non-symbiotique libre dans le sol. En parallèle, les proto-*Coriaria* ont évoluées et se sont diversifiées en différentes espèces dans 4 régions distinctes du monde créant un isolement renforcé par l'intervention humaine (déracinement en raison de la toxicité des fruits pour les mammifères (Belcher et Morton, 2013; De Haro *et al*, 2005) expliquerait leur éparpillement actuelle. On peut faire l'hypothèse que *Coriaria* serait apparue dans les îles du Pacifique depuis plus de 70 Millions d'années et probablement était symbiotique dès le début, avant sa dispersion géographique sur tous les continents. Ensuite les espèces de *Coriaria* se sont diversifiées sur différents biotopes alors que d'autres plantes hôtes susceptibles d'héberger des souches du groupe 2 (Datisceae, Rosaceae et *Ceanothus*) ou même des plantes non hôtes telles que *Alnus glutinosa* (Nouioui *et al*, 2013) apparaissaient. Les membres de ces espèces de plantes hôtes alternatives sont retrouvés en sympatrie avec *Coriaria*, par exemple *Ceanothus* et *Purshia* au Mexique et *Datisca Cannabina* au Pakistan. Ces espèces de plantes associées aux *Frankia* du groupe 2 ont une

distribution géographique plus large et chevauchant dans certains cas l'aire disjointe de *Coriaria* ce qui aurait pour conséquence d'obscurcir le signal de cospéciation. La cospéciation pourrait aussi être produite et aurait été perdue suite au mélange et à la compétition entre les microsymbiotes indigènes et allogènes.

3. Publication

Ce travail a été valorisé sous forme d'une publication dans le journal Biomed Research International (IF : 2.88).

Article 3 : Imen Nouioui, Faten Ghodhbane-Gtari, Maria Fernandez, Philippe Normand, Maher Gtari. 2014. Absence of cospeciation between the uncultured *Frankia* microsymbionts and the disjunct actinorhizal *Coriaria* species. Biomed Research International. 2014 : 924235. doi: 10.1155/2014/924235.

Chapitre II

Ecologie évolutive du groupe 2 de *Frankia* non-cultivable

B. Détection des *Frankia* du groupe 2 dans des sols dépourvus de plantes hôtes compatibles

Plusieurs études ont signalé la présence de *Frankia* dans un sol en dehors de sa niche écologique, qu'elle soit en dehors de la région géographique appropriée de sa plante-hôte (Benecke, 1969) ou bien qu'elle soit dans une zone où son partenaire végétal a disparu depuis très longtemps (Rodriguez-Barrueco, 1968; Smolander et Sundman, 1987; Wollum et al, 1968; Gtari et al, 2004). Ceci est confirmé pour le groupe 1 des *Frankia-Alnus-Myrica* et le groupe 3 des *Frankia-Elaeagnus*. Cependant, la situation reste incertaine pour les *Frankia* du groupe 2 associées à *Coriaria*, *Datisca*, *Ceanothus* et aux Rosaceae (Benson et al, 2004) et les *Frankia-Casuarina* (Zimpfer et al, 1999). Les données sur ces derniers (groupe 2 et *Frankia-Casuarina*) sont limitées à l'inoculation de *Datisca cannabina* et *Coriaria nepalensis* par des échantillons des sols collectés au Nord de Pakistan (Mirza et al, 1994). Le temps de formation des nodules racinaires pour les plantes actinorhiziennes varie de quelques semaines à plusieurs mois et dépend de l'inoculum, de l'espèce végétale et de la technique de culture (Burgess et Peterson, 1987; Berry et Sunell, 1990).

En Tunisie, *Coriaria myrtifolia* n'a jamais été observée depuis plus de deux siècles, sauf ponctuellement dans une haie dans la ville de Tunis. Elle a donc été considérée comme une plante disparue en Tunisie (Alapetite, 1979). C'est un arbuste à feuilles de myrte (figure 11), qui se trouve sur les côtes du Nord de la Méditerranée (Espagne, Sud de la France, les montagnes des Apennins italiennes et les Iles Baléares (Montserrat, 1958) ainsi que le long des côtes ouest d'Afrique du Nord (du Maroc jusqu'à la frontière orientale algérienne) (Good, 1930; Gtari et Dawson, 2011). La nodulation de cette plante a été confirmée au Maroc par des souches appartenant au groupe 2 du genre *Frankia* (Nouioui et al, 2011). Jusqu'à présent, aucune étude n'a été effectuée sur la présence des souches dans des zones dépourvues de la plante-hôte compatible. Dans la présente étude, l'occurrence de *Frankia* microsymbiote dans un sol tunisien dépourvu de la plante hôte a été évaluée.

1. Résultats

Des échantillons de rhizosphères d'*Alnus glutinosa*, de *Casuarina glauca* et d'*Elaeagnus angustifolia* ont été prélevés à Tamra (37°3'N, 9°7'E, 150 m d'altitude), à Zerniza (37°9'N, 9°7'E, 60 m d'altitude) et à Ghar Elmelh (37°10'N, 10°11'E, 10 m d'altitude), respectivement. Après germination des graines de *C. myrtifolia*, trois plantules ont été transférées dans des pots contenant 2kg de chaque échantillon de rhizosphère. Les plantules ont été examinées avec soin pour la formation des nodules. Elles ont été contrôlées à 1, 6, 12, 18, et 24 mois. Des nodules racinaires d'une taille typique à ceux des espèces de *Coriaria* ont été détectés après 18 mois. Cette nodulation a été observée pour 80% (n=5) des plantules de *Coriaria* testées dans le sol du site de Tamra où *A. glutinosa* est la seule espèce actinorhizienne indigène (figure 11a). Comme le montre la figure 11b, les nodules sont matures depuis plusieurs mois. Aucune nodulation n'a été détectée au niveau des racines des plantules ancrées dans un sable stérile, utilisé comme un témoin négatif. L'observation microscopique d'une coupe histologique d'un lobe de nodule collecté à partir des plantules de *C. myrtifolia* montre une structure asymétrique classique, comme décrit pour d'autres espèces de *Coriaria* (hyphes ramifiés et des vésicules allongées qui n'occupent pas le centre de la cellule infectée) (Canizo et Rodriguez-Barrueco, 1978; Newcomb et Pankhurst, 1982; Silvester et Harris, 1989; Mirza et al, 1994).



Figure 11. Piégeages de *Frankia* endosymbiote de *C. myrtifolia*.

(a) Des plantules de *Coriaria myrtifolia* implantées sur un sol d'*Alnus glutinosa*; barre = 1 cm. (b) Des nodules racinaires de *C. myrtifolia*; barre = 2 mm. (c) Coupe transversale d'un lobe nodulaire de *C. myrtifolia* observée au microscope optique; barre = 20 µm.

Vu que la nodulation a eu lieu en présence d'un sol sous *Alnus glutinosa*, l'identification moléculaire des souches piégées est obligatoire (Rodriguez-Barrueco et al, 1988). L'ADN extrait à partir des lobes nodulaires a été amplifié. Un amplicon d'environ 477pb a été obtenu pour un total de 6 lobes nodulaires. L'alignement des séquences nucléotidiques et protéiques du gène *glnA* des *Frankia* piégées montre une similarité de 96 à 100% et de 99 à 100%, respectivement. Le blast de séquence de *glnA* affiche une homologie de 97% à 98 % et de 99 % à 100% avec celles de *Chamaebatia foliolosa* (AF156758) de la famille des Rosaceae et de *Ceanothus americanus* (AF156762) de la famille de Rhamnaceae, respectivement (Figure 12).

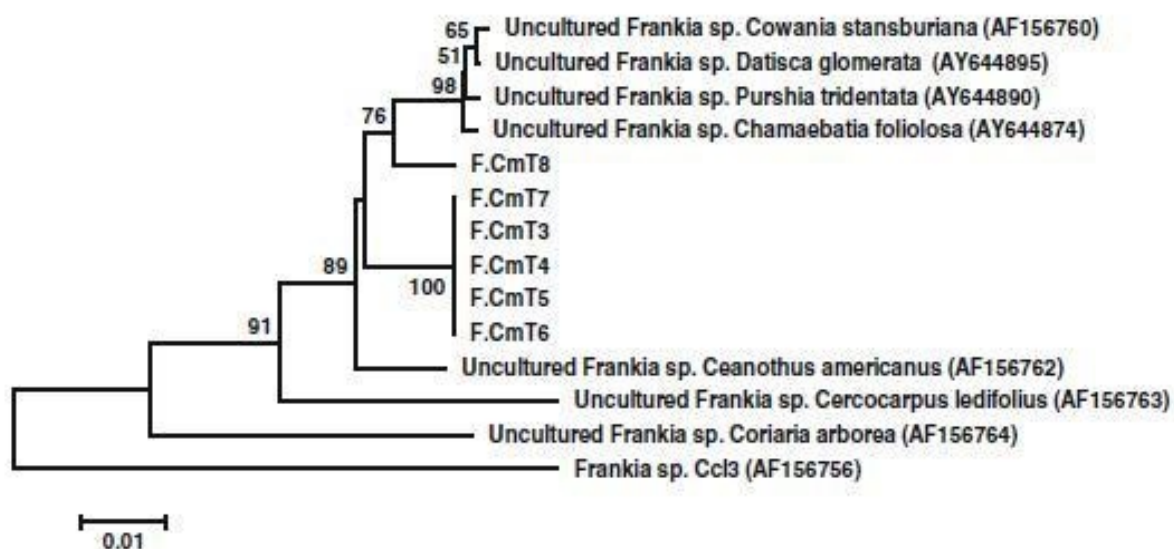


Figure 12. Arbres des relations phylogénétiques entre les souches du genre *Frankia* piégées, construit par Neighbor-Joining basée sur des séquences de *glnA* de 477 pb. Les valeurs de bootstraps ont été déterminées à partir de 1000 répliques.

2. Discussion

L'occurrence des *Frankia* non-cultivables a été évaluée dans un sol tunisien par piégeage utilisant *Coriaria myrtifolia*. L'absence de la plante-hôte compatible dans le territoire tunisien depuis plus de deux siècles n'a pas empêché la formation des nodules racinaires qui ont été mis en place après 18 mois. Le séquençage du gène *glnA* des souches piégées montre qu'elles ont un lien génétique avec les *Frankia* non-cultivables du groupe 2. Ce dernier est connu par une distribution géographique restreinte et dépendante de la plante-

hôte. Dans cette étude, il apparaît que c'est l'une des périodes les plus longues (18 mois) pour laquelle la nodulation racinaire est obtenue après un essai de piégeage (Figure 11). Cela pourrait être expliqué par le faible taux de *Frankia* compatible avec *Coriaria* comme cela a été suggéré par Mirza et al (1994) qui ont montré une nodulation plus faible pour *Coriaria* que pour *Datisca* malgré l'utilisation du même inoculum. Ce temps de latence correspondrait donc au temps de prolifération des cellules de *Frankia* persistantes dans la rhizosphère (CU après la disparition de la plante hôte) pour atteindre le seuil nécessaire pour initier la nodulation avec la plante hôte compatible.

La faible variabilité génétique de *Frankia* associées à *Coriaria* a été confirmée à plusieurs reprises. Par exemple seulement deux séquences de l'ADNr 16S différant par un seul nucléotide ont été décrites parmi un total de douze séquences de nodules de *C. arborea* de Nouvelle Zélande (Clawson et al, 1997). Egalement, Nick et al (1992) ont détecté une seule différence à la position 274 pb de l'ADNr 16S entre les séquences des nodules recueillis en Nouvelle-Zélande, en France et au Mexique. Dans ce travail, l'analyse des séquences du *glnA* a montré une diversité génétique relativement importante. En outre, le fait que les *Frankia* microsymbiotes de *C. myrtifolia* aient été piégées à partir d'un sol privé de la plante-hôte compatible soutient l'hypothèse de l'indépendance des *Frankia* du groupe 2 envers leur plante-hôte et questionne la non cultivabilité des *Frankia* du groupe 2.

Les résultats de ce travail complètent le chapitre précédent et forme un argument solide pour expliquer l'absence de cospéciation entre les *Frankia* endophytes de *Coriaria* et la plante hôte. Avec ce travail, on peut adopter l'idée que la sympatrie des *Coriaria* avec les autres plantes actinorhiziennes, les permet d'interagir avec son partenaire bactérien du groupe 2. Cependant, le signal et le mécanisme d'interaction reste à décoder et nous convoque à approfondir les études et vérifier le mode de vie de symbiose obligatoire des *Frankia* du groupe 2.

3. Publication

Ce travail a été valorisé sous forme d'une publication dans le journal Biosciences (IF 1.8).

Article 4 : Imen Nouioui, Imed Sbissi, Faten Ghodhbane-Gtari, Kawtar Fikri Benbrahim, Maria Fernandez, Philippe Normand, Maher Gtari. 2013. First report on the occurrence of the uncultivated *Frankia* microsymbionts in soil outside the native host range area. J. Biosci. 38 (4) :695-8.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

Le présent travail s'est intéressé à la phylogénie et l'évolution du genre *Frankia* dans le cadre des activités menées dans le laboratoire de Microorganismes et Biomolécules Actives de Tunis en collaboration avec le laboratoire d'Ecologie Microbienne à Lyon.

Au démarrage de ce travail, la taxonomie incomplète et la phylogénie lacunaire du genre *Frankia* reflétaient la complexité et la particularité de ce modèle de symbiose actinorhizienne. Le faible nombre de souches pour certains groupes d'infectivité étudiés, la variabilité des souches d'une étude à une autre, le faible pouvoir discriminant de l'ADNr 16S ont freiné la progression des études phylogénétiques et taxonomiques. Une révision phylogénétique approfondie s'avérerait donc nécessaire afin d'éclaircir le lien de parenté et l'évolution de différents groupes décrits dans la littérature.

Au cours de cette étude sur la phylogénie et l'évolution du genre *Frankia*, nous avons cherché tout d'abord à retracer et affiner la structuration du genre *Frankia*, ensuite nous avons focalisé notre travail sur l'écologie évolutive des *Frankia* non cultivables associées aux espèces actinorhiziennes du genre *Coriaria*.

Nous avons montré que le choix des gènes pour les analyses phylogénétiques est crucial et ne peut pas être universel. Les gènes *nifH* et *glnII* avaient été déjà utilisés auparavant, mais leur analyse individuelle a montré des variations importantes dans les phylogénies engendrées. Cette fluctuation dans les liens de parenté entre les groupes est due au phénomène de transfert horizontal des gènes. Pour améliorer la robustesse des constructions phylogénétiques nous avons choisi une analyse basée sur la concaténation des séquences de ces trois gènes. En plus des gènes *nifH* et *glnII*, le gène *gyrB* a été retenu comme marqueur phylogénétique et pour la première fois dans le cas du genre *Frankia*. En outre, un marqueur moléculaire plus variable, l'ITS de l'ADNr 16S-23S, a été également utilisé pour affiner la phylogénie du genre *Frankia*. L'analyse de cette région d'ADN a engendré une ségrégation des souches en quatre groupes, ce qui est en concordance avec les résultats issus de l'analyse des séquences de *gyrB*, *nifH* et *glnII*. Nous avons remarqué que la diversité génétique est large pour les *Frankia* cultivable des groupes 1 (*Alnus*, Myricaceae, Casuarinaceae), 3 (Elaeagnaceae, Rhamnaceae) et 4 (souches atypiques) mais elle est limitée pour les symbiotes obligatoires du groupe 2 (Datiscaceae, Coriariaceae, *Ceanothus*,

Rosaceae). L'ensemble des résultats souligne l'existence d'une relation étroite entre la diversité génétique et le mode de vie de *Frankia*. Nous avons déduit qu'il existe un lien entre la variabilité génétique montrée par la phylogénie moléculaire, la taille du génome et le mode de vie symbiotique. Une diversité génétique faible coïncide avec un mode de vie des *Frankia* dépendantes de leur hôte et une taille du génome réduit, comme l'illustrent le cas des *Frankia-Casuarina* et des *Frankia* non cultivables du groupe 2.

Très peu d'études se sont intéressées à la phylogénie de *Frankia* du groupe 2 en général et aucune n'a porté sur le modèle des *Frankia-Coriaria* en particulier. Ce modèle actinorhizien représente un cas particulièrement intéressant (i) du fait de la non-cultivabilité du symbiote et de la faible variabilité génétique des souches du groupe 2 et (ii) de la répartition discontinue de la plante hôte. Ces éléments suggèrent une possible cospéciation dans la symbiose *Frankia-Coriaria*.

Pour cela nous avons testé, dans la deuxième partie de la thèse, l'hypothèse de la cospéciation des *Frankia* microsymbiotes de *Coriaria*. Nous avons pu classer les *Frankia* associés à *Coriaria* en quatre groupes en se basant sur trois marqueurs moléculaires, *glnA*, IGS *nifD-K*, *dnaA*. Le groupe A renferme les endophytes associés à *C. arborea* de Nouvelle Zélande. Le groupe B contient les endophytes de *C. nepalensis* (Pakistan), *C. ruscifolia* ssp. *microphylla* (Mexique) et *C. myrtifolia* (France). Le groupe C englobe les souches associées à *C. myrtifolia* du Maroc. Le groupe D contient des *Frankia* endophytes associés à *C. myrtifolia* de France, *C. japonica* du Japon ainsi que la souche séquencée Dg (microsymbiote de *Datisca glomerata*). Pour la plante hôte *Coriaria*, deux groupes ont été obtenus en se basant sur deux régions d'ADN, *matk* et ITS1-2. Le groupe 1 renferme des espèces de *Coriaria* de Nouvelle Zélande et Amérique du Sud et le groupe 2 associe les *Coriaria* du Japon, des régions méditerranéennes et du Pakistan. Aucune concordance n'a été observée entre la phylogénie de *Frankia* et celle de sa plante hôte *Coriaria*, réfutant l'hypothèse de cospéciation. Nous avons montré que les *Frankia* auraient émergé en Nouvelle Zélande alors que *Coriaria*, pourrait avoir émergé entre l'Asie et la Nouvelle Zélande. La présence de *Coriaria* en sympatrie avec d'autres plantes actinorhiziennes (Datiscaceae, Rosaceae et *Ceanothus*) aurait facilité l'adaptation des souches du groupe 2 présentes dans la rhizosphère de ces plantes à *Coriaria*. Cependant, le signal d'interaction de ces deux partenaires actinorhiziens reste à déterminer. La détection de souches de *Frankia* compatibles avec *Coriaria* dans un sol dépourvu de la plante hôte depuis plus de deux siècles et dans la rhizosphère d'*Alnus glutinosa* est en accord

avec l'absence de cospéciation observée. Ce résultat questionne l'hypothèse de symbiote obligatoire des *Frankia* associés à *Coriaria* et suggère la nécessité d'études supplémentaires pour élucider les mécanismes d'interaction de *Frankia*-*Coriaria*.

Cette thèse a permis d'améliorer et d'affiner la phylogénie du genre *Frankia*. Cependant, les données de la phylogénie moléculaire toutes seules ne sont pas suffisantes pour définir les espèces bactériennes. Malgré les nombreuses données moléculaires accumulées et récemment le séquençage du génome de 13 souches représentantes du genre *Frankia*, nous avons besoin d'études phénotypiques qui demeurent toujours indispensables pour donner un statut d'espèce aux Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTU), déduites des phylogénies moléculaires. Chez *Frankia*, il n'existe qu'une unique espèce décrite à ce jour, *Frankia alni*, parmi les OTU existantes. Donc, nous projetons de participer à définir les espèces de *Frankia* en combinant les résultats génotypiques à des résultats phénotypiques, basés sur un profilage par la technologie automatisée Omnilog, et sur les profils chimiotauxonomiques. Ce travail a débuté dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire DSMZ, Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, en Allemagne. Ce travail bénéficiera du réservoir d'information fourni par le génome.

Nous avons généré grâce à l'approche Omnilog de nombreuses données phénotypiques (résultats non présentés dans ce manuscrit) qui ont mis en évidence des propriétés nouvelles des souches (résistance aux métaux lourds, aux antibiotiques...). Une de nos perspectives est d'élucider les déterminants génétiques de ces résistances. Pour cela nous nous proposons de cribler des banques génomiques de *Frankia*, dans l'hôte hétérologue *E. coli*, pour les phénotypes d'intérêt (collaboration UMR 5557 Ecologie Microbienne).

A plus long terme, nous souhaitons développer une approche de génomique comparative afin d'étudier les corrélations entre les gènes et l'écologie des espèces de *Frankia*, et en particulier de rechercher les marqueurs génétiques pouvant être impliqués dans le niveau de dépendance à la plante hôte (symbiotes obligatoires vs saprophytes) en nous focalisant sur les *Frankia* non cultivables du groupe 2.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

- Achouak W, Normand P, Heullin T. 1999. Comparative phylogeny of *rrs* and *nifH* genes in the bacillaceae. *Int J Syst Bacteriol.* 49 : 961-967.
- Akimov VN, Dobrista SV. 1992. Grouping of *Frankia* strains in the basis of DNA relatedness. *Syst Appl Microbiol.* 15 : 372-379.
- Akkermans ADL, Roelofsen W, Bloom J, Huss-Danell, Harkink R. 1983. Utilization of carbon and nitrogen compounds by *Frankia* in synthetic media and in root nodules of *Alnus glutinosa*, *Hippophae rhamnoides* and *Datisca cannabina*. *Can J Bot.* 61 : 2793-2800.
- Alapetite GP. 1979. Flore de la Tunisie. Edition du Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique et du Ministère de l'agriculture. République Tunisienne
- Allan HH. 1961. Coriariaceae. In 'Flora of New Zealand. (Government Printer: Wellington, New Zealand). 1: 300–305.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ. 1990. Basic local Alignment Search Tool. *J Mol Biol.* 215 : 403-410.
- An CS, Wills JW, Riggsby WS, Mullin BC. 1983. Deoxyribonucleic acid base composition of 12 *Frankia* isolates. *Can J Bot.* 61: 2859-2862.
- An CS, Riggsby WS, Mullin BC. 1985. Relationships of *Frankia* isolates based on deoxyribonucleic acid homology studies. *Int Syst Bacteriol.* 35 : 140-146.
- Baker DD. 1987. Relationships among pure cultured strains of *Frankia* based on host specificity. *Physiol Plantarum.* 70 : 245-248.
- Bautista GHH, Cruz HA, Nesme X, Valdés M, Mendoza HA, Fernandez MP. 2011. Genomespecies identification and phylogenomic relevance of AFLP analysis of isolated and non-isolated strains of *Frankia* spp. *Syst Appl Microbiol.* 34 : 200–206.
- Bautista GHH, Herrera-Belaroussi A, Xu R, Normand P, Valdés M, Fernandez MP. 2014. Multilocus-based phylogenetic reconstruction of *Frankia* genus. *Appl Environ Microbiol.* Non publié.
- Beauchemin N, Gtari M, Ghodhbane-Gtari F, Furnholm T, Sen A, Wall L, Tavares F, et al. 2012. What can the genome of an infective ineffective (Fix-) *Frankia*. Strain (Eu11c) that is able to form nodules with its host plant tell us about actinorhizal symbiosis and *Frankia* evolution. The 112th General Meeting of the American Society for Microbiology American Society for Microbiology, San Francisco, CA.

- Becking JH. 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.
- Belcher SF, Morton TR. 2013. Tutu toxicity: three case reports of *Coriaria arborea* ingestion, review of literature and recommendations for management. NZMJ. 26 : 103-133.
- Bell CD, Soltis DE, Soltis PS. 2010. The age and diversification of the angiosperms re-revisited. American J Botan. 97 : 1296-1303.
- Benecke U. 1969. Symbionts of alder nodules in New Zealand. Plant Soil. 30 : 145–149
- Benoist P, Müller A, Diem HG, Schwencke J. 1992. High-molecular-mass multicatalytic proteinase complexes produced by the nitrogen-fixing actinomycete *Frankia* strain BR. J Bacteriol. 174 : 1495-1504.
- Benson DR, Vanden Heuvel BD, Potter D. 2004. Actinorhizal symbioses: diversity and biogeography, p. 97-127. In M. Gillings (ed.), Plant Microbiology. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford.
- Benson DR, Schultz NA. 1990. Physiology and biochemistry of *Frankia* in culture. In " The biology of *Frankia* and Actinorhizal plant". Edited by Scwintzer C. R. et Tjepkema J. D. Edition : Academic Press, Inc. New-York. 107-127.
- Benson DR, Clawson ML. 2000. Evolution of the actinorhizal plant symbioses; In Prokaryotic nitrogen fixation: A model system for analysis of biological process (ed) EW Triplett (Wymondham, UK: Horizon Scientific Press). 207-224
- Benson DR, Silvester WB. 1993. Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. Microbiol Rev. 57 : 293-319.
- Benson DR, Stephens DW, Clawson ML, Silvester WB. 1996. Amplification of 16S rRNA genes from *Frankia* strains in root nodules of *Ceanothus griseus*, *Coriaria arborea*, *Coriaria plumosa*, *Discaria toumatou*, and *Purshia tridentata*. Appl Environ Microbiol. 62 : 2904-9.
- Berry AM, Kleemann G. 1994. Hapanoid lipids in relation to nitrogen fixation : function in *Frankia* and occurrence in other diazotrophic organisms. In “Nitrogen fixation with non-legumes. Edited by Hegazi N.A., Fayez M et Monib M. cairo, American University in Cairo Press. 191-200.
- Berry AM, Moreau RA, Jones AD. 1991. Bacteriohopanetetrol: abundant lipid in *Frankia* cells and in nitrogen-fixing nodule tissue. Plant Physiol. 95 : 111-115.

- Berry AM, Sunell LA. 1990. The infection process and nodule development. In C. R. Schwintzer and J. D. Tjepkema (ed.), The biology of *Frankia* and actinorhizal plants. Academic Press, San Diego. 61-81.
- Bond G. 1983. Taxonomy and distribution of non-legume nitrogenfixing systems. In: Gordon JC, Wheeler CT (eds) Biological nitrogen fixation in forest ecosystems: Foundations and applications. Martinus Nijhoff/Dr. W Junk, The Hague, Netherlands, 55–87.
- Bosco M, Fernandez M, Simonet P, Materassi R, Normand P. 1992. Evidence that some *Frankia* sp. strains are able to cross boundaries between *Alnus* and *Elaeagnus* host specificity groups. Appl Environ Microbiol. 58 : 1569-1576.
- Bosco M, Lumni ER, Normand P. 1996. PCR-RFLP fingerprint of uncultured *Frankia* Microsymbiotes from *Dryas Drummondii* nodules. Ann Microbiol Enzymol. 46 : 115-123.
- Bosco MS, Jamann S, Chapelon C, Simonet P, Normand P. 1994. *Frankia* microsymbiont in *Dryas drummondii* nodules is closely related to the microsymbiont of *Coriaria* and genetically distinct from other characterized *Frankia* strains, p. 173-183. In H. A. Hegazi, M. Fayez, and M. Monib (ed.), Nitrogen Fixation with Non-legumes. The American University in Cairo Press, Cairo.
- Brunchorst J. 1886. Ueber einige Wurzelanschwellungen, besonders diejenigen von *Alnus* und den *Elaeagnaceen*. Unters Botan Inst TUBingen. 2 : 151-177.
- Burgess D, Peterson RL. 1987. Development of *Alnus japonica* root nodules after inoculation with *Frankia* strain HFPArI3. Can J Bot. 65 : 1647-1657.
- Burggraaf AJP, Shipton WA. 1983. Studies on the growth of *Frankia* isolates in relation to infectivity and nitrogen fixation (acetylene reduction). Can J Bot. 61 : 2774-2782.
- Burleigh SH, O J Dawson. 1991. Effects of sodium chloride and melibiose on the in vitro growth and sporulation of *Frankia* strain HFPCcI3 isolated from *Casuarina cunninghamiana*. Aus J Ecolo. 16 : 531-535.
- Callaham D, Tredici PD, Torrey JG. 1978. Isolation and cultivation *in vitro* of the actinomycete causing root nodulation in *comptonia*. Science. 199 : 899-902.
- Canizo A, Rodriguez-Barrueco C. 1978. Nitrogen fixation by *Coriaria nepalensis* Wall. Rev Ecol Biol Sol. 15 : 453–458.
- Clawson ML, Bourret A, Benson DR. 2004. Assessing the phylogeny of *Frankia*-actinorhizal plant nitrogen-fixing root nodule symbioses with *Frankia* 16S rRNA and glutamine synthetase gene sequences. Mol Phylogenet Evol. 31 : 131-8.

- Clawson ML, Carú M, Benson DR. 1998. Diversity of *Frankia* strains in root nodules of plants from the families Elaeagnaceae and Rhamnaceae. *Appl Environ Microbiol.* 64 : 3539-3543.
- Clawson ML, Benson DR, Stephens DW, Resch SC, Silvester WB. 1997. Typical *Frankia* infect actinorhizal plants exotic to New Zealand. *J Bot.* 35 : 361-367.
- Colwell RR. 1970. Polyphasic taxonomy of bacteria. In the proceeding of the International conference on culture collection. Edited by Lizuka H et Hasegawa T. Tokyo Univ. Press. Tokyo. 421-436.
- Counoyer B, Normand P. 1994. Characterization of a spontaneous thiostrepton-resistant *Frankia alni* infective isolate using PCR-RFLP of *nif* and *glnII* genes. *Soil Biol Biochem.* 26 : 553–559.
- Counoyer B, Gouy M, Normand P. 1993. Molecular phylogeny of the symbiotic actinomycetes of the genus *Frankia* matches host-plant infection processes. *Mol Biol Evol.* 10 : 1303-16.
- Counoyer B, Lavire C. 1999. Analysis of *Frankia* evolutionary radiation using *glnII* sequences. *FEMS Microbiol. Letts.* 177 : 29-34.
- Counoyer B, Normand P. 1992a. Relationship between electroporation conditions, electropermeability and respiration activity for *Frankia* Stain ACN14a. *FEMS Microbiol. Lett.* 94 : 95-100.
- Counoyer B, Normand P. 1992b. Electropermeabilization of *Frankia* intact cells to plasmid DNA. *Act. Oecol.* 13 : 369-378.
- Crawford AM, Mille LK. 1988. Characterization of an early gene accelerating expression of late genes of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology.* 62 : 2773–2781.
- Crawford DL, Doyle JD, Wang Z, Hendricks CW, Bentjen SA, Bolton H, Jr, Fredrickson JK, Bleakley BH. 1993. Effects of a lignin peroxidase-expressing recombinant, *Streptomyces lividans* TK23.1, on biogeochemical cycling and the numbers and activities of microorganisms in soil. *Appl Environ Microbiol.* 59 : 508–518.
- Croizat L. 1952. *Manual of Phytogeography: An Account of Plant Dispersal Throughout the World*, Junk, The Hague.
- Dawson JO. 2008. Ecology of actinorhizal plants. In: Pawlowski K, Newton WE (eds) *Nitrogen fixing actinorhizal symbioses*. Springer, Berlin, Germany. 199–234.

- De Haro L, Pommier P, Tichadou L, Hayek-Lanthois M, Arditti L. 2005. Poisoning by *Coriaria myrtifolia* Linnaeus: a new case report and review of the literature. *Toxicon*. 46 : 600-3.
- Diem HG, Dommergues YR. 1985. *In vitro* production of specialized reproductive torulose hyphae by *Frankia* strain ORS021001 isolated from *Casuarina junghuhniana* root nodules. *Plant Soil*. 87 : 17-29.
- Dobrista SV, Tomashevsky A.Y. 1989. Homology between structural nifrogenase genes (*nifHDK*) from *Klebsiella pneumoniae* and extrachromosomal DNAs from microsymbiontes vesicles of *Alnus glutinosa*. *Biopolym Cell*. 4 : 44.
- Dobritsa SV. 1998. Grouping of *Frankia* strains on the basis of susceptibility to antibiotics, pigment production and host specificity. *Int J Syst Bacteriol*. 48 : 1265–1275.
- Doyle JA. 1969. “Cretaceous angiosperm pollen of the Atlantic coastal plain and its evolutionary significance”. *Journal of the Arnold Arboretum*. 50 : 1-35.
- Elliot JM, Mathre DE, Sands DC. 1987. Identification and characterization of rhizospherecompetent bacteria of wheat. *Appl Environ Microbol*. 53: 2793-2799.
- Eriksson O, Bremer B. 1992. “Pollination systems, dispersal modes, life forms, and diversification rates in angiosperm families”. *Evolution*. 46 : 258-266.
- Euzéby JP. 1998. Taxonomic note: necessary correction of specific and subspecific epithets according to Rules 12c and 13b of the International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 revision). *Int J Syst Bacteriol*. 48 : 1073-1075.
- Faloon FA, Mullis KB. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. *Methods Enzymol*. 155 : 335-350.
- Felsenstein J. 1989. PHYLIP—phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics*. 5 : 164-166.
- Fernandez MP, Meugnier H, Grimont AD, Bardin R. 1987. Deoxyribonucleic acid relatedness among members of the genus *Frankia*. *Int J Syst Bacteriol*. 39 : 424-429.
- Fernandez MP, Meugnier H, Grimont PAD, Bardin R. 1989. Deoxyribonucleic acid relatedness among members of the genus *Frankia*. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 39 : 424-429.
- Forrest LL, Hollingsworth PM. 2003. A recircumscription of *Begonia* based on nuclear ribosomal sequences. *Plant Syst. Evol*. 241 : 193-211.
- Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk PJr. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 42 : 166-170.
- Garde M, Lalonde M. 1987. Identification and subgrouping of *Frankia* strains using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Physiol Plant*. 70 : 237-244.

- Ghodbhane-Gtari F, Beauchemin N, Bruce D, Chain P, Chen A, Walston Davenport K, Deshpande S, Detter C, Furnholm T, Goodwin L, Gtari M, Han C, Han J, Huntemann M, Ivanova N, Kyrpides N, Land ML, Markowitz V, Mavrommatis K, Nolan M, Nouioui I, Pagani I, Pati A, Pitluck S, Santos CL, Sen A, Sur S, Szeto E, Tavares F, Teshima H, Thakur S, Wall L, Woyke T, Tisa LS. 2013. Draft genome sequence of *Frankia* sp. strain CN3, an atypical, noninfective (Nod-) ineffective (Fix-) isolate from *Coriaria nepalensis*. *Genome Announc.* 1(2) : e00085-13. doi:10.1128/genomeA.00085-13.
- Ghodbhane-Gtari F, Nouioui I, Boudabous A, Gtari M. 2010. 16S–23S rRNA intergenic spacer region variability in the genus *Frankia*. *Micro Ecol.* 60: 487-495.
- Girgis MGZ, Ishae YZ, El-Haddad ME, Saleh EA, Diem HG, Dommergues YR. 1990. First report on isolation and culture of effective *Casuarina*-compatible strains of *Frankia* from Egypt. In: Proc. Of the 2.nd Int. *Casuarina* Workshop, pp: 156-164. (Eds., El-Lakany, M.H.; J.W. Turnbull and J.L. Breweaker) American University, Cairo, Egypt.
- Gladkova AN. 1962. Fragments of the history of the Myricaceae family, *Pollen and Spore.* 4 : 345.
- Good RDO. 1930. The geography of the genus *Coriaria*. *New Phytol.* 29 : 170-198.
- Goodfellow M. 1988. Numerical taxonomy and selective isolation of industrially important actinomycetes. *Actinomycetologica.* 2 : 13-19.
- Gouy M, Giundon S, Gascuel O. 2010. SeaView version 4: A Mutiplatform Graphical User Intergace for Sequence Alignement and Phylogenetic tree Building. *Mol Bio Evo.* 27 : 221-224.
- Gtari M, Beauchemin N, Ghodbhane-Gtari F, Nouioui I, Tisa LS. 2012. Phylogenetic perspectives of nitrogen-fixing actinobacteria. *Arch Microbiol.* 194 : 3-11.
- Gtari M, Brusetti L, Cherif A, Boudabous A, Daffonchio D. 2007. Heteroduplex structures in 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer PCR products reveal ribosomal interoperonic polymorphisms within single *Frankia* strain. *Appl J Microbiol.* 103 : 1031-1040.
- Gtari M, Brusetti L, Skander G, Mora D, Boudabous A, Daffonchio D. 2004. Isolation of *Elaeagnus*-compatible *Frankia* from soils collected in Tunisia. *FEMS Microbiol Lett.* 234 : 349-55.
- Gtari M, Dawson J. 2011. An overview of actinorhizal plants in Africa. *Funct. Plant Biol.* 38 : 653-661.

- Gtari M, Tisa LS, Normand P. 2013. Diversity of *Frankia* Strains, Actinobacterial Symbionts of Actinorhizal Plants. Springer Berlin Heidelberg. In Symbiotic Endophytes. 123-148.
- Gürtler V, Stanisich VA. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. Microbiol. 142 : 3–16.
- Haansuu JP, Klika KD, Soderholm PP, Ovcharenko VV, Pihlaja K, Haahtela KK, Vuorela PM. 2001. Isolation and biological activity of frankiamide. J Ind Microbiol Biotechnol. 27 : 62-6.
- Haansuu P, Vuorela P, Haahtela K. 1999. Detection of antimicrobial and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ blocking activity in *Frankia* culture broth extracts. Pharm Pharmacol Lett. 9 : 1-4.
- Hahn D, Lechevalier MP, Fischer A, Stackebrandt 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, Nickel A, Dawson J. 1999. Assessing *Frankia* populations in plants and soil using molecular methods. FEMS Microbiol Ecol. 29 : 215-227.
- Harris S, Silvester W. 1992. Nitrogenase activity and growth of *Frankia* in batch and continuous culture. Can J Microbiol. 38 : 296-302.
- Henneke H, Kaluza K, Thony B, Fuhrmann M, Ludwig W, Stackebrandt E. 1985. Concurrent evolution of nitrogenase genes and 16S rRNA in *Rhizobium* species and other nitrogen fixing bacteria. Arch Microbiol. 142 : 342-348.
- Hermans MA, Neuss B, Sahm H. 1991. Content and composition of hopanoids in *Zymomonas mobilis* under various growth conditions. J Bacteriol. 173 : 5592-5595.
- Heusser LE, Shackleton NJ. 1979. Direct marine continental correlation: 150,000 year oxygen isotope pollen record from the North Pacific. Science. 204 : 837-839.
- Honerlage W, Hahn D, Zepp K, Zyer J, Normand P. 1994. A hypervariable region provides a discriminative target for specific characterization of uncultured and cultured *Frankia*. Syst Appl Microbiol. 17: 433-443.
- Igual JM, Velázquez E, Mateos PF, Rodriguez-barrueco C, Cervantes E, Martinez-Molina E. 2001. Cellulase isozyme profiles in *Frankia* strains belonging to different cross-inoculation groups. Plant Soil. 229 : 35-39.
- Ihaka R, Gentleman R. 1996. "R: A language for data analysis and graphics," Journal of Computational and Graphical Statistics. 5 : 299-314.

- Jamann S, Fernandez MP, Moiroud A. 1992. Genetic diversity of Eleagnaceae infective *Frankia* Strains from various soils. *Acta Oecologica*. 13 : 395-405.
- Jamann S, Fernandez MP, Normand P. 1993. Typing method for N₂-fixing bacteria based on PCR-RFLP: application to the characterization of *Frankia* strains. *Mol Ecol*. 219 : 17-26.
- Jeong SC, Ritchie NJ, Myrold DD. 1999. Molecular phylogenies of plants and *Frankia* support multiple origins of actinorhizal symbioses. *Mol Phylogen Evol*. 13 : 493-503
- Kalman S, Kiehne KL, Ohn Libs JL, Yamamoto T. 1993. Cloning of a Novel CryIC Type Gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Galleriae*. *Appl Environ Microbiol*. 59 : 1131-1137.
- Kim HB, An CS. 1997. Nucleotide sequence and expression of *nifHD* from *Frankia* strain EuIK1, a symbiont of *Elaeagnus umbellata*. *Physiol Plant*. 99 : 690-695.
- Kim HB, Song SD, An CS. 1994. Molecular cloning of *nifHD* from *Frankia* EuIK1 strain, a symbiont of *Elaeagnus umbellata* root nodules. *Kor J Microbiol*. 32 : 258-263.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 16 : 111-120.
- Kimura M. 1983. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, MA.
- Klika KD, Haansuu JP, Ovcharenko VV, Haahtela KK, Vuorela PM, Pihlaja K. 2001. Frankiamide, a highly unusual macrocycle containing the imide and orthoamide functionalities from the symbiotic actinomycete *Frankia*. *J Org Chem*. 66 : 4065-8.
- Kubitzki K. 2011. Coriariaceae. Springer Berlin Heidelberg. In *Flowering Plants. Eudicots*. 105-108.
- Kumada Y, Benson DR, Hillemann D, Hosted TJ, Rochefort DA, Thompson CJ, Wohlleben W, Tateno Y. 1993. Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90 : 3009-3013.
- Lavire C, Louis D, Perriere G, Briolay J, Normand P, Cournoyer B. 2001. Analysis of pFQ31, a 8551-bp cryptic plasmid from the symbiotic nitrogen-fixing actinomycete *Frankia*. *FEMS Microbiol Lett*. 197 : 111-6.
- Lawrence JG. 1999. Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. *Curr Opin Microbiol*. 2 : 519-523.
- Lawrence JG, Retchless AC. 2009. The interplay of homologous recombination and horizontal gene transfer in bacterial speciation. *Methods Mol Biol*. 532 : 29-53

- Leavis HL, Willems RJ, Van Wamel WJ, Schuren FH, Caspers MP, Bonten MJ. 2007. Insertion sequence-driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of *E. faecium*. PLoS Pathog. 3: e7.
- Lechevalier MP, Lechevalier HA. 1984. Taxonomy of *Frankia*, p. 575-582. In L. Ortiz-Ortiz, L. F. Bojalil, and V. Yakoleff (ed.), Biological, biochemical, and biomedical aspects of Actinomycetes. Academic Press, New York.
- Lechevalier MW, Cawthon CD, Lee RG. 1988. Inactivation of biofilm bacteria. Appl Environ Microbiol. 54: 2492.
- Lechevalier MP. 1984. The taxonomy of the genus *Frankia*. Plant and Soil. 78 : 1-6.
- Lechevalier MP. 1994. Taxonomy of the genus *Frankia*. Int. J. Syst. Bacteriol. 44 : 1-8.
- Lechevalier MP, et Lechevalier HA. 1989. Genus *Frankia* Brunschorst 1886, 174^{AL}, Bergey's Manual of systematic bacteriology. Edited by Williams ST, Sharpe ME et Holt JG. The Williams and Wilkins, Baltimore. 4 : 2410-2417.
- Lechevalier MP, Baker D, Horrière D. 1983. Physiology, chemistry, serology and infectivity of two *Frankia* isolates from *Alnus incana* ssp. *rugosa*. Can J Bot. 61: 2826-2833.
- Lechevalier MP, Labeda DP, Ruan JS. 1987. Studies on *Frankia* sp. LLR02022 from *Casuarina cunninghamiana* and its mutant LLR 02023. Physiol Plant. 70 : 249-254.
- Lechevalier MP, Lechevalier HA. 1990. Systematics, isolation and culture of *Frankia*. C. R. Schwintzer. 35-60.
- Lechevalier MP, Ruan JS. 1984. Physiology and chemical diversity of *Frankia* spp. isolated from nodules of *Comptonia peregrina* (L.) Coult. and *Ceanothus americanus* L. Plant Soil. 78 : 15-22.
- Legendre P, Desdevises Y, Bazin E. 2002. A statistical test for host-parasite coevolution. System Biol. 51 : 217-234.
- Lowe TM, Eddy SR. 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. Nucleic Acids Res. 25 : 955-964.
- Lumini E, Bosco M. 1996. PCR-restriction fragment length polymorphism identification and host range of single-spore isolates of the flexible *Frankia* sp. strain UFI 132715. Appl Environ Microbiol. 62 : 3026-3029.
- Lumini E, Bosco M, Fernandez MP. 1996. PCR-PFLP and total DNA homology revealed three related genomic species among broad host range *Frankia* strains. FEMS Microbiol Ecol. 21: 303-311.
- Lumini E, Bosco M. 1999. PCR-RFLPs for assessing and increasing biodiversity of *Frankia* culture collections. Can J Bot. 77 : 1261-1269.

- Maggia L, Bousquet J. 1994. Molecular phylogeny of the actinorhizal Hamamelidae and relationships with host promiscuity towards *Frankia*. *Mol Ecol.* 3 : 459-467.
- Marechal J, Clement B, Nalin R, Gandon C, Orso S, Cvejic JH, Bruneteau M, Berry A, Normand P. 2000. A recA gene phylogenetic analysis confirms the close proximity of *Frankia* to *Acidothermus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50 : 781-785.
- Meesters TM, VanVliet WM, Akkermans ADL. 1987. Nitrogenase is restricted to the vesicles in *Frankia* strain EANpec. *Physiol. Plant.* 70 : 267-271.
- Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Huson DH, Göker M. 2007. CopyCat: Cophylogenetic analysis tool. *Bioinformatics.* 23 : 898-900.
- Melville R. 1966. Continental drift, mesozoic continents, and the migration of the angiosperms. *Nature.* 211: 116-120.
- Melville R. 1981. Vicarious plant distributions and palaeogeography of the Pacific region. In 'Vicariance biogeography: a critique'. (Eds G Nelson, G Rosen) pp. 283-302. (Columbia University Press: New York)
- Miller IM, Baker DD. 1985. Initiation, development and structure of root nodules in *Elaeagnus angustifolia* L. (Elaeagnaceae). *Protoplasma.* 128 : 107-119.
- Mirza M, Pawlowsk K, Hafeez F, Chaudhary A, Akkermans A. 1994. Ultrastructure of the endophyte and localization of *nifH* transcripts in root nodules of *Coriaria nepalensis* Wall by in situ hybridization. *The New phytologist.* 126 : 131-136.
- Montaña JS, Jiménez DJ, Hernández M, Ángel T, Baena S. 2012. Taxonomic and functional assignment of cloned sequences from high Andean forest soil metagenome. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 101 : 205-215.
- Montserrat P. 1958. Root nodules of *Coriaria*. *Nature.* 182 : 475.
- Moran NA, Dunbar H, Dale C, Smith W, Ochman H. 2003. Intracellular symbionts of sharpshooters (Insecta: Hemiptera : Cicadellinae) form a distinct group with a small genome. *Environ. Microbiol.* 5 : 116-126.
- Mort A, Normand P, Lalonde M. 1983. 2-O-methyl-D-mannose, a key sugar in the taxonomy of *Frankia*. *Can J Bot.* 29 : 993-1002.
- Muller J. 1981. Fossil pollen records of extant angiosperms. *Bot. Rev.* 47 : 1-142.
- Mullin BC, An CS. 1990. The molecular genetics of *Frankia*. In "The biology of *Frankia* and Actinorhizal plant". Edited by Scwintzer C. R. et Tjepkema J. D. Academic Press, Inc. New-York. 195-214.

- Nazaret S, Cournoyer B, Normand P, Simonet P. 1991. Phylogenetic relationships among *Frankia* genomic species determined by use of amplified 16S rDNA sequences. J Bacteriol. 173 : 4072-4078.
- Newcomb W, Pankhurst CE. 1982. Fine structure of actinorhizal root nodules of *Coriaria arborea* (coriariaceae) New Zealand. J bot. 20 : 93-103.
- Nick G, Paget E, Simonet P, Moiroud A, Normand P. 1992. The nodular endophytes of *Coriaria* spp. form a distinct lineage within the genus *Frankia*. Mol Ecol. 1: 175–181.
- Normand P, Benson DR. 2012. Order XVI Frankiales, p 508–510. In Goodfellow M, et al (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed, vol 5. The actinobacteria. Springer, New York, NY.
- Normand P, Bousquet J. 1989. Phylogeny of nitrogenase sequences in *Frankia* and other nitrogen-fixing microorganisms. J Mol Evol. 29 : 436-447.
- Normand P, Gouy M, Cournoyer B, Simonet P. 1992. Nucleotide sequence of *nifD* from *Frankia alni* strain ArI3: Phylogenetical inferences. Mol Biol Evol. 9 : 495-506.
- Normand P, Lalonde M. 1986. The genetic of actinorhizal *Frankia*: a review. Plant Soil. 90 : 429-453.
- Normand P, Lapierre P, Tisa LS, Gogarten JP, Alloisio N, Bagnarol E, Bassi CA, Berry AM, Bickhart DM, Choisine N, Couloux A, Cournoyer B, Cruveiller S, Daubin V, Demange N, Francino MP, Goltsman E, Huang Y, Kopp OR, Labarre L, Lapidus A, Lavire C, Marechal J, Martinez M, Mastronunzio JE, Mullin BC, Niemann J, Pujic P, Rawnsley T, Rouy Z, Schenowitz C, Sellstedt A, Tavares F, Tomkins JP, Vallenet D, Valverde C, Wall LG, Wang Y, Medigue C, Benson DR. 2006. Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography. Genome Res. 17 : 7-15
- Normand P, Lapierre P, Tisa LS, Gogarten JP, Alloisio N, Bagnarol E, Bassi CA, Berry AM, Bickhart DM, Choisine N, Couloux A, Cournoyer B, Cruveiller S, Daubin V, Demange N, Francino MP, Goltsman E, Huang Y, Kopp OR, Labarre L, Lapidus A, Lavire C, Marechal J, Martinez M, Mastronunzio JE, Mullin BC, Niemann J, Pujic P, Rawnsley T, Rouy Z, Schenowitz C, Sellstedt A, Tavares F, Tomkins JP, Vallenet D, Valverde C, Wall LG, Wang Y, Medigue C, Benson DR. 2007. Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography. Genome. Res. 17 : 7-15.

- Normand P, Orso S, Cournoyer B, Jeannin P, Chapelon C, Dawson J, Evtushenko L, Misra AK. 1996. Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation of the family Frankiaceae. *Int J Syst Bacteriol.* 46 : 1-9.
- Normand P, Simonet P, Bardin R. 1988. Conservation of *nif* sequences in *Frankia*. *Mol. Gen. Genet.* 213 : 238-246.
- Nouioui I, Sbissi I, Ghodhbane-Gtari F, Benbrahim K.F, Normand P, Gtari M. 2013. First report on the occurrence of the uncultivated groupe 2 *Frankia* microsymbionts in soil outside the native actinorhizal host range area. *J Biosci.* 38 : 695-698.
- Nouioui I, Beauchemin N, Cantor MN, Chen A, Detter JC, Furnholm T, Ghodhbane-Gtari F, Goodwin L, Gtari M, Han C, Han J, Huntemann M, Hua SX, Ivanova N, Kyrpides N, Markowitz V, Mavrommatis K, Mikhailova N, Nordberg HP, Ovchinnikova G, Pagani I, Pati A, Sen A, Sur S, Szeto E, Thakur S, Wall L, Wei CL, Woyke T, Tisa LS. 2013a. Draft genome sequence of *Frankia* sp. strain BMG5.12, a nitrogen fixing actinobacterium isolated from Tunisian soils. *Genome Announc.* 1(4): e00468-13. <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00468-13>.
- Nouioui I, Ghodhbane-Gtari F, Beauchemin NJ, Tisa LS, Gtari M. 2011. Phylogeny of members of the *Frankia* genus based on *gyrB*, *nifH* and *glnII* sequences. *Antonie van Leeuwenhoek.* 100 : 579–587.
- Oakley B, North M, Franklin JF, Hedlund BP, Staley JT. 2004. Diversity and distribution of *Frankia* strains symbiotic with *Ceanothus* in California. *Appl Environ Microbiol.* 70 : 6444-52.
- Ochman H, Wilson AC. 1987. Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J Mol Evol.* 26 : 74-86.
- Ortiz-Ortiz L, Bojalil F, Yakoleff V. (ed.). 1984. Biological, biochemical, and biomedical aspects of actinomycetes. Academic Press, Inc., New York
- Paschke MW. 1997. Actinorhizal plants in rangelands of the Western United States. *Journal of Range Management.* 50 : 62-72.
- Persson T, Benson DR, Normand P, Vanden Heuvel B, Pujic P, Chertkov O, Teshima H, Bruce DC, Detter C, Tapia R, Han S, Han J, Woyke T, Pitluck S, Pennacchio L, Nolan M, Ivanova N, Pati A, Land ML, Pawlowski K, et. Berry AM. 2011. Genome sequence of “*Candidatus Frankia datiscae*” Dg1, the uncultured microsymbiont from nitrogen-fixing root nodules of the dicot *Datisca glomerata*. *J Bacteriol.* 193 : 7017-7018.

- Poly F, Mnrozier LJ, Bally R. 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res Microbiol.* 152 : 95-103.
- Ponsonnet C, Nesme X. 1994. Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. *Arch Microbiol.* 161 : 300-309.
- Poralla K, Hartner T, Kannenberg E. 1984. Effect of temperature and pH on the hopanoid content of *Bacillus acidocaldarius*. *FEMS Microbiol Lett.* 23 : 253-256.
- Pouch MN, Cournoyer B, Baumeister W. 2000. Characterization of the 20S proteasome from the actinomycete *Frankia*. *Mol Microbiol.* 35 : 368-377.
- Prasanna BM. 2012. Diversity in global maize germplasm: characterization and utilization. *J Biosci.* 37: 843-855.
- Ramachandran S, Deshpande O, Roseman CC, Rosenberg NA, Feldman MW, Cavalli-Sforza LL. 2005. Support from the relationship of genetic and geographic distance in human populations for a serial founder effect originating in Africa. *Proc Natl Acad Sci.USA.* 102 : 15942-15947.
- Raven PH, Axelrod DI. 1974. "Angiosperm biogeography and past continental movements," *Annals of the Missouri Botanical Garden.* 61: 539–673.
- Ritchie NJ, Myrold DD. 1999. Geographic distribution and genetic diversity of *Ceanothus*-infective *Frankia* strains. *Appl Environ Microbiol.* 65 : 1378-1383.
- Rocheffort DA, Benson DR. 1990. Molecular cloning, sequencing, and expression of the glutamine synthetase II (*glnII*) gene from the actinomycete root nodule symbiont *Frankia* sp. strain CpI1. *J Bacteriol.* 172 : 5335-5342.
- Rodriguez-Barrueco C, Sevillano F, Nebreda TM. 1988. Effective nodulation of *Coriaria myrtifolia* L. induced by *Frankia* strains from *Alnus glutinosa* L. (Gaertn.). *Plant Soil.* 110 : 167–176.
- Rodriguez-Barrueco C. 1968. The occurrence of the root nodule endophytes of *Alnus glutinosa* and *Myrica gale* in soils. *J Gen Microbiol.* 52 : 189-194.
- Rohmer M, Rouvier-Nave P, Ourisson G. 1984. Distribution of hopanoid triterpenes in procaryotes. *J Gen Microbiol.* 130 : 1137-1150.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* 19 : 1572-1574.
- Rosbrook PA, Burggraaf AJP, Reddell P. 1989. A comparaison of two methods and different media for isolating *Frankia* from *Casuarina* root nodule. *Plant and soil.* 120 : 187-193.

- Rothrock CS, Gottlieb D. 1984. Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. *Can J Microbiol.* 30 : 1440-1447.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi RG, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239 : 487-491.
- Saitou M, Nei M. 1987. A neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 44 : 406-425.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F, Nicklen S, Chase AR. 1977. DNA Sequencing with Chain Terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74 : 5463-5468.
- Schleifer KH, Kandler O. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev.* 36 : 407-477.
- Schulenberg-Schell H, Neuss B, Sahm H. 1989. Quantitative determination of various hopanoid in microorganisms. *Anal Biochem.* 181: 120-124.
- Schuster RM. 1976. "Plate tectonics and its bearing on the geographical origin and dispersal of angiosperms," in *Origin and Early Evolution of Angiosperms*, C.B. Beck, Ed. 48-138, Columbia University Press, New York.
- Schwintzer CR. 1990. Spore-positive and spore-negative nodules, p. 177-193. *In* C. R. Schwintzer and J. D. Tjepkema (ed.), *The biology of Frankia and actinorhizal plants*. Academic Press, Inc., New York
- Séguin A, Lalonde M. 1989. Detection of pectolytic activity and pel homologous sequences in *Frankia*. *Plant Soil.* 118 : 221-229.
- Sen A, Beauchemin N, Bruce D, Chain P, Chen A, Walston Davenport K, Deshpande S, Detter C, Furnholm T, Ghodhbhane-Gtari F, Goodwin L, Gtari M, Han C, Han J, Huntemann M, Ivanova N, Kyrpides N, Land ML, Markowitz V, Mavrommatis K, Nolan M, Nouioui I, Pagani I, Pati A, Pitluck S, Santos CL, Sur S, Szeto E, Tavares F, Teshima H, Thakur S, Wall L, Woyke T, Wishart J, Tisa LS. 2013. Draft genome sequence of *Frankia* sp. strain QA3, a nitrogen-fixing actinobacterium isolated from the root nodule of *Alnus nitida*. *Genome Announc.* 1(2): e00103-13. doi: 10.1128/genomeA.00103-13.
- Shibata K. 1902. Cytologische Studien über die endotrophen Mykorrhiza. *J. b. wiss.*

- Shipton WA, Burgraaf A. J. P. 1982. Aspects of the cultural behaviour of *Frankia* and possible ecological implications. Can J Bot. 61 : 2783-2792.
- Silvester WB, Harris SL. 1989. Nodule structure and nitrogenase activity of *Coriaria arborea* in response to varying pO₂. Plant Soil. 118 : 97-109
- Simonet P, Bardin R, Haurat J, Moiroud A, Normand P. 1986. Localization of *nif* genes on a large plasmid in *Frankia* sp. strain ULQ0132105009. Mol Gen. 204 : 492-495.
- Simonet P, Capellano A, Navarro E, Bardin R, Moiroud A. 1984. An improved method for lysis of *Frankia* with aehronopeptidase allows detection of new plasmids. Can J Microbiol. 30 : 1292-1295.
- Simonet P, Grosjean MC, Misra AK, Nazaret S, Cournoyer B, Normand P. 1991. *Frankia* genus-specific characterization by polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol. 57 : 3278-3286.
- Simonet P, Navarro E, Rouvier C, Reddell P, Zimpfer J, Dommergues Y, Bardin R, Combarro P, Hamelin J, Domenach AM, Gourbiere F, Prin Y, Dawson JO, Normand P. 1999. Co-evolution between *Frankia* populations and host plants in the family Casuarinaceae and consequent patterns of global dispersal. Environ Microbiol. 1: 525-533.
- Simonet P, Normand P, Bardin R. 1988. Heterologous hybridization of *Frankia* DNA to *Rhizobium meliloti* and *Klebsiella pneumoniae nif* genes. FEMS Microbiol Lett. 55 : 141-146.
- Simonet P, Normand P, Hirsch AM, Akkermans ADL. 1990. The genetics of *Frankia* actinorhizal symbiosis. In "The molecular biology of symbiotic nitrogen fixation. Edited by Gresshoff M. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Skog LE. 1972. The genus *Coriaria* (Coriariaceae) in the western Hemisphere. Rhodera. 74 : 242-253.
- Smolander A, Sundman V. 1987. *Frankia* in acid soils of forests devoid of actinorhizal plants. Physiol Plant. 70 : 297-303.
- Sogo A, Setoguch H, Noguchi J, Jaffre T, Tobe H. 2001. Molecular Phylogeny of Casuarinaceae Based on *rbcL* and *matk* Gene Sequences. J Plant Res. 114 : 459-464.
- Soltis DE, Soltis PS, Morgan DR, Swensen SM, Mullin BC, Dowd JM, Martin PG. 1995. Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. Proc Natl Acad Sci USA. 92 : 2647-2651.
- Stackbrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. Int J Syst Bacteriol. 47: 479-491

- St-Laurent L, Bousquet J, Simon L, Lalonde M. 1987. Separation of various *Frankia* Strains in the *Alnus* and *Elaeagnus* host specificity groups using sugar analysis. *Can J Microbiol.* 33 : 764-772.
- Swensen SM, Mullin BC, Chase MW. 1994. Phylogenetic affinities of the Datisceae based on an analysis of nucleotide sequences from the plastid *rbcL* gene. *Syst Bot.* 19 : 157-168.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28 : 2731-2739.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, Jeanmougin F, Higgins DG, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. 1997. *Nucleic Acids Res.* 25 : 4876-4882.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22 : 4673-4680.
- Tisa L, Mc Bride M, Enseign JC. 1983. Studies of growth and morphology of *Frankia* strains EAN1pec, Eu11c, Cp11 and ACN1AG. *Can. J. Bot.* 61 : 2768-2776.
- Tisa SL, Beauchemin N, Gtari M, Sen Arnab, Wall LG. 2013. What stories can the *Frankia* genomes start to tell us?. *J Biosci.* 38 : 719-726.
- Torrey JG. 1987. Endophyte sporulation in root nodules of actinorhizal plants. *Physiol Plant.* 70 : 279-288.
- Tzean SS, Torrey JG. 1989. Spore germination and the life cycle of *Frankia in vitro*. *Can J Microbiol.* 35 : 801-806.
- Udwary DW, Gontang EA, Jones AC, Jones CS, Schultz AW, Winter JM, Yang JY, Beauchemin N, Capson TL, Clark BR, Esquenazi E, Eustáquio AS, Freel K, Gerwick L, Gerwick WH, Gonzalez D, Liu WT, Malloy KL, Maloney KN, Nett M, Nunnery JK, Penn K, Prieto-Davo A, Simmons TL, Weitz S, Wilson MC, Tisa LS, Dorrestein PC, Moore BS. 2011. Significant Natural Product Biosynthetic Potential of Actinorhizal Symbionts of the Genus *Frankia*, as Revealed by Comparative Genomic and Proteomic Analyses. *Appl Environ Microbiol.* 77 : 3617-3625.
- Valdés M, Perez NO, Estrada-de Los Santos P, Caballero-Mellado J, Peña-Cabriaes JJ, Normand P, Hirsch AM. 2005. Non-*Frankia* actinomycetes isolated from surface-

- sterilized roots of *Casuarina equisetifolia* fix nitrogen. Appl Environ Microbiol. 71 : 460-466.
- Van Dijk C. 1979. Endophyte distribution in the soil, p. 84-94. In J. C. Gordon, C. T. Wheeler, and D. A. Perry (ed.), Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests. Oregon State Univ. Press, Corvallis.
- Vanden Heuvel BD, Benson DR, Bortiri E, Potter D. 2004. Low genetic diversity among *Frankia* spp. strains nodulating sympatric populations of actinorhizal species of Rosaceae, *Ceanothus* (Rhamnaceae) and *Datisca glomerata* (Datiscaceae) west of the Sierra Nevada (California). Can J Microbiol. 50 : 989-1000.
- Wall LG, Beauchemin N, Cantor MN, Chaia E, Chen A, Detter JC, Furnholm T, Ghodhbane-Gtari F, Goodwin L, Gtari M, Han C, Han J, Huntemann M, Hua SX, Ivanova N, Kyrpides N, Markowitz V, Mavrommatis K, Mikhailova N, Nordberg HP, Nouioui I, Ovchinnikova G, Pagani I, Pati A, Sen A, Sur S, Szeto E, Thakur S, Wei CL, Woyke T, Tisa LS. 2013. Draft genome sequence of *Frankia* sp. strain BCU110501, a nitrogen-fixing actinobacterium isolated from nodules of *Discaria trinevis*. Genome Announc. 1 (4) : e00503-13. <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00503-13>.
- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky M, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP, Truper HG. 1987. Report of the Ad Hoc Committee on reconciliation of approach to bacterial systematics. Int J Syst. Bacteriol. 37 : 463-464.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: PCR Protocols: A guide to methods and applications, eds. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, and White TJ. Academic press, Inc., New York.
- Woese CR. 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51 : 221-271.
- Wollum AG, Youngberg CT, Chichester FW. 1968. Relation of previous timber stand age to nodulation of *Ceanothus velutinus*. Forest Sci. 14 : 114-118.
- 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 : 1-13.
- Yokoyama J, Suzuki M, Iwatsuki K, Hasebe M. 2000. Molecular phylogeny of *Coriaria*, with special emphasis on the disjunct distribution. Mol Phylogenet Evol. 14 : 11-19.

- Yoshimi Y, Hiraishi A, Nakamura K. 1996. Isolation and characterization of *Microsphaera* multipartite gen. nov., sp. nov., a polysaccharide accumulating Gram positive bacterium from activated sludge. *Int J Syst Bacteriol.* 46 : 519-525.
- Zhang LB, Simmons MP, Kocyan A, Renner SS. 2006. Phylogeny of the Cucurbitales based on DNA sequences of nine loci from three genomes: implications for morphological and sexual system evolution. *J Mol Phylogenet Evol.* 39 : 305-322.
- Zimpfer JE, Smyth CA, Dawson, JO. 1997. The capacity of Jamaican mine spoils, agricultural and forestsoils to nodulate *Myrica cerifera*, *Leucaena leucocephala* and *Casuarina cunninghamiana*. *Physiol Plant.* 99 : 664-672.
- Zimpfer JF, Kennedy GJ, Smyth CA, Hamelin J, Navarro E, Dawson JO. 1999. Localization of *Casuarina*-infective *Frankia* near *Casuarina cunninghamiana* trees in Jamaica. *Can J Bot.* 77 : 1248-1256.
- Zuckerlandl E, Pauling L. 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In : *Evolving genes and proteins* (Eds V Bryson, HJ vogel) Academic Press, New York. 97-166.

ANNEXES

Annexe 1. Origine des souches étudiées

Origine d'isolement	Souche	N° d'accension <i>gyrB</i>	N° d'accension <i>nifH</i>	N° d'accension <i>glnII</i>	N° d'accension ADNr <i>16S</i>	N° d'accension ITS 16S-23S
<i>A. crispa</i> (France)	ACN1AG	JF273718a	FJ477419	AF121809	-	GQ891622.1
<i>A. rubra</i> (USA)	ArI4	-	-	-	-	GQ891633.1
<i>A. viridis</i>	NRRLB-16406	JF273722a	JF273738a	JF273681a	-	GQ891620.1
<i>A. viridis</i>	NRRL B-16410	-	-	-	-	GQ891621.1
<i>A. crispa</i> (Canada)	ACN14a	CAJ58691	AAU00812	CAJ63803	NC_008278	M88466
<i>Alnus incana</i> (USA)	NRRL B-16315	-	-	-	-	GQ891628.1
<i>A. rubra</i> (USA)	ArI3	JF273720a	L41344	AF121808	-	GQ891625.1
<i>A. viridis</i> (Canada)	AvcI1	JF273716a	EU862916	JF273659a	-	GQ891627.1
<i>Casuarina. equisetifolia</i> (Australia)	KB5	JF273697a	JF273733a	JF273676a	-	GQ891617.1
<i>Casuarina. cunninghamiana</i> (Egypte)	Thr	F273696a	JF273742a	JF273686a	-	-
<i>C. cunninghamiana</i> (USA)	NRRL B16414	-	-	-	-	GQ891654.1
<i>C. equisetifolia</i> (Bahamas)	NRRLB-16412	JF273709a	JF273739a	JF273682a	-	GQ891653.1
<i>C. equisetifolia</i> (Brazil)	BR	JF273692a	JF273727a	JF273665a	-	GQ891614.1
<i>C. equisetifolia</i> (Sénégal)	CeD	JF273693a	M55343	JF273666a	M55343	M55343
<i>Casuarina. glauca</i> (Tunisie)	BMG5. 23	JF273695a	b	JF273663a	-	GQ891615.1

Annexe 1 (suite)

<i>Coriaria. japonica</i> (Japon)	CjJ14	JF273701a	JF273730a	JF273670a	-	-
<i>Coriaria. myrtifolia</i> (France)	CmF1	JF273702a	JF273731a	JF273671a	-	-
<i>C. myrtifolia</i> (France)	CmF6	JF273703a	None	-	-	-
<i>Comptonia peregrina</i> (USA)	NRRL B16323	-	-	-	-	GQ891662.1
<i>Casuarina</i>	NRRLB-16306	JF273707a	JF273735a	F273678a	J DQ472228	GQ891650.1
<i>C. cunninghamiana</i> (USA)	CcI3	ABD09400	ABD13834	CP000249	NC_007777	NC_007777
<i>C. glauca</i> (India)	Cg70.9	JF273698a	JF273728a	JF273667a	NC_009921	GQ891618.1
<i>Ceanothus</i> (USA)	CeaLb1	-	-	-	-	GQ891637.1
<i>Ceanothus</i> (USA)	CeaLb2 378	-	-	-	-	GQ891638.1
<i>Ceanothus</i> (USA)	CeaLb3	-	-	-	-	GQ891639.1
<i>Ceanothus americanus</i> (USA)	NRRLB-16322	JF273712a	JF273736a	JF273679a	-	GQ891652.1
<i>C. americanus</i> (USA)	NRRL B-16316	-	-	-	-	GQ891651.1
<i>Ceanothus integerrimus</i> (USA)	HG1	-	-	-	-	AY644936
<i>Ceanothus velutinus</i> (USA)	FrCveliz	-	-	-	-	AF050768

Annexe 1 (suite)

<i>Cercocarpus betuloides</i> (USA)	LP1	-	-	-	-	AY644943
<i>Chamaebatia foliolosa</i> (USA)	FC2	-	-	-	-	AY644925
<i>Colletia hystrix</i> (Chile)	ChI7	JF273705a	JF273729a	JF273668a	-	-
<i>C. peregrina</i> (USA)	CpI1	JF273719a	JF273732a	FJ477438	GU296536	GQ891632.1
<i>Coriaria arborea</i> (N.Zélande)	FE37	-	-	-	AF063641	-
<i>C. japonica</i> (Japon)	CjJ11	JF273700a	None	JF273669a	-	-
<i>C. myrtifolia</i> (Moroc)	CmM1	None	JF273672a	-	JF273699a	-
<i>Coriaria nepalensis</i> (Pakistan)	CN3	JF273688a	b	F273673a	JL18977	GQ891665.1
<i>Datisca cannabina</i> (Pakistan)	DC12	JF273689a	b	JF273674a	-	GQ891666.1
<i>Datisca glomerata</i> (Pakistan)	Dg	EFD28683	EFD27776	EFD30377	ADGT01000028	-
<i>D. glomerata</i> (USA)	VM1	-		-	-	AY644945
<i>Discaria articulata</i> (Argentine)	BCU110601	-	-	-	-	GQ891658.1
<i>Discaria chacaye</i> (Argentine)	BCU110345	JF273714a	JF273724a	JF273660a	DQ336134	GQ891659.1
<i>Discaria trinervis</i> (Argentine)	BCU110501	JF273713a	JF273725a	JF273661a	DQ336135	GQ891657.1
<i>Eleaegnus. angustifolia</i> (Tunisie)	BMG5.11	JF273708a	AJ545037	AJ545042	AJ549326	-
<i>E. angustifolia</i> (Tunisie)	BMG5.3	-	-	-	-	GQ891646.1

Annexe 1 (suite)

<i>E. angustifolia</i> (Tunisie)	BMG5.10	-	-	-	-	GQ891641.1
<i>E. angustifolia</i> (Tunisie)	BMG5.12	JF273706a	AJ545031	AJ545043	AJ549325	GQ891644.1
<i>E. angustifolia</i> (Tunisie)	BMG5.15	JF273715a	JF273726a	JF273662a	-	GQ891642.1
<i>E. angustifolia</i> (Tunisie)	BMG5.17	-	-	-	-	GQ891643.1
<i>E. angustifolia</i> (Tunisie)	BMG5.18	-	-	-	-	GQ891655.1
<i>E. angustifolia</i> (France)	Ea1-12					GQ891656.1
<i>E. angustifolia</i> (Italie)	EI5c	-	-	-	-	GQ891648.1
<i>E. angustifolia</i> (Tunisie)	BMG5.16	-	-	-	-	GQ891645.1
<i>E. angustifolia</i> (Tunisie)	BMG5.7	JF273705a	b	JF273664a	-	-
<i>E. angustifolia</i> (Tunisie)	BMG5.14	-	-	-	-	GQ891660.1
<i>E. angustifolia</i> (USA)	EAN1pec	ABW09475	ABW16215	ABW11207	NC_009921	NC_009921
<i>E. angustifolia</i> (USA)	NRRLB-16219	JF273710a	JF273734a	JF273677a	-	GQ891649.1
<i>Elaeagnus umbelata</i> (USA)	EuI1c	ADP78093	b	ADP79805	NC_014666	GQ891661.1
<i>E. umbellata</i> (USA)	EUN1f	-	-	-	-	GQ891640.1
<i>Hippophae</i> (India)	H1S2Hp	-	-	-	-	DQ988981

Annexe 1 (suite)

<i>Hippophaë rhamnoides</i> (France)	CH37	-	-	-	-	GQ891647.1
<i>Myrica. pensylvanica</i> (USA)	NRRL B-16464	-	-	-	-	GQ891629.1
<i>M. pensylvanica</i> (USA)	NRRL B-16459	-	-	-	-	GQ891635.1
<i>M. pensylvanica</i> (USA)	NRRLB-16466	JF273717a	JF273740a	JF273683a	-	GQ891630.1
<i>M. pensylvanica</i> (USA)	NRRLB-16467	JF273721a	JF273741a	JF273684a	AJ408870	GQ891631.1
<i>M. pensylvanica</i> (USA)	NRRL B-16458	-	-	-	-	GQ891636.1
<i>Myrica californica</i> (USA)	NRRLB-16386	JF273690a	JF273737a	JF273680a	AJ408869	GQ891663.1
<i>Purshia tridentata</i> (USA)	SV2	-	-	-	-	AY644923
<i>P. tridentata</i> (USA)	NRRLB-16512	JF273687a	b	JF273685a	-	GQ891664.1

(a) Souche utilisée dans cette présente étude, en gras les souches sélectionnées à partir de GenBanK, (b) pas du gène *nif*, (-) Non déterminé

Annexe 2. Milieu de culture DPM Modifié et la solution de lyse

Milieu DPM (Defined Propionate Minimal Medium) modifié

NaPropionate	1 g/l
Succinate	0.6 g/l
Pyruvate	0.5 g/l
Acétate	0.6 g/l
KH ₂ PO ₄	1.0 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.01 g/l
Solution stock de FeSO ₄ .7H ₂ O/EDTA	1.0 ml
Solution stock de Hoagland's microéléments	1.0 ml
pH	6.8

La composition de la solution stock : 0.75 g Na₂EDTA.2H₂O + 0.56 g FeSO₄.7H₂O pour 100 ml

La solution de Hoagland's microéléments

H ₃ BO ₄	2.8 g/l
MnCl ₂ .4H ₂ O	1.8 g/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.1 g/l
NaMoO ₄	0.025 g/l

Tampon de lyse

Tris-Cl	100mM
NaCl	1.4 M
EDTA 0.5M	20 Mm
CTAB	2 %
PVPP	3 %
H ₂ O	50 ml

Annexe 3. Origine des nodules utilisés

Espèces de <i>Coriaria</i> Origine géographique Site	Abréviatio ns des Nodules	ITS1-ITS2	<i>matK</i>	<i>glnA</i>	<i>dnaA</i>	ITS <i>nifDK</i>	Référence
<i>Coriaria myrtifolia</i> Maroc Oued El Koub, Ouezzane 35°E 01' 879 N / 05° 20' 565 E / 140 m Bab Berred, Chefchaouen 35°E 00' 979 N / 04° 58' 092" E / 1290 m	CmMs1	KC796592	KC796601	KC796522	KC796582	KC796555	Cette étude
	CmMs2	-	-	KC796523	KC796583	KC796556	Cette étude
	CmMs3	-	-	KC796524	KC796584	KC796557	Cette étude
	CmMs4	-	-	KC796525	KC796585	KC796558	Cette étude
	CmM1a	KC796590	KC796599	KC796517	KC796578	KC796550	Cette étude
	CmM1b	-	-	KC796518	KC796579	KC796551	Cette étude
	CmM1c	-	-	KC796519	KC796580	KC796552	Cette étude
	CmM2a	KC796591	KC796600	KC796520	-	KC796553	Cette étude
	CmM2b	-	-	KC796521	KC796581	KC796554	Cette étude
	<i>C. myrtifolia</i> France Nyons, 44°E 21'46.50'' N/5°08'21.82''E / 259m	CmNy1	KC796598	KC796603	KC796531	KC796591	KC796564
CmNy2		-	-	KC796532	KC796592	KC796565	Cette étude
CmNy3		-	-	KC796533	KC796593	-	Cette étude
CmNy4		-	-	KC796534	KC796594	KC796566	Cette étude
CmNy5				KC796535	KC796595	KC796567	Cette étude
<i>C. myrtifolia</i> Montpellier, 43°E 36' 51.48"N/ 3° 52' 23.97" E / 41m	CmF1	KC796593	KC796602	KC796526	KC796586	KC796559	Cette étude
	CmF2	-	-	KC796527	KC796587	KC796560	Cette étude
	CmF3	-	-	KC796528	KC796588	KC796561	Cette étude
	CmF4	-	-	KC796529	KC796589	KC796562	Cette étude
				KC796530	KC796590	KC796563	Cette étude
	CmF5	AF280102	Yang et <i>al</i> , non publié				
		AB016459	Yokoyama et <i>al</i> , 2000				

Annexe 3 (suite)

<i>Coriaria japonica</i> Japon	CjJA	-	KC796605	KC796536	KC796503	KC796576	Cette étude Cette étude Cette étude Cette étude
	CjJB	KC796594	-	KC796537	KC796504	KC796577	
	CjJC	-	-	KC796538	KC796505	KC796578	
	CjJD	-	-	KC796539	KC796506	KC796579	
33°E 45' 39.18", +133° 27',42, 89" / 10m	CjJE			KC796540	KC796507	KC796580	Cette étude
		AF280101					Yang et <i>al</i> , non publié
			AB016456				
<i>C. nepalensis</i> Pakistan	CnP1	KC796597	KC796607	KC796544	KC796508	KC796584	Cette étude
Murree	CnP2	-	-	KC796545	KC796509	KC796585	Cette étude
	CnP3	-	-	KC796546	KC796510	KC796586	Cette étude
33°E 54'15"N 73°23'25"E /33.90 42°N 73.3903°E / 2291.2m	CnP4	AF280103		-	-	-	Yang et <i>al</i> , non publié
<i>C. arborea</i> Nouvelle Zélande	CaNZ1	-	KC796604	KC796542	KC796511	KC796581	Cette étude
	CaNZ2	KC796595	-	KC796543	KC796512	KC796582	Cette étude
	CaNZ3	-	-	KC796544	KC796513	KC796583	Cette étude
La rivière Hapuku, Nord de Canterbury, Ile du sud		EF635457		-	-	-	Yokoyama et <i>al</i> , 2000
42°E 23' 42.24",+173° 41' 18.07" / 64m		EF635475		-	-	-	Rotherham et <i>al</i> , non publié
		AF277293		-	-	-	Rotherham et <i>al</i> , non publié
			AB16454	-	-	-	Yang et <i>al</i> , non publié
<i>C. microphylla</i> Mexique	CmicMx1	KC796596	KC796606	KC796547	KC796514	KC796587	Cette étude
Morelos	CmicMx2	-	-	KC796548	KC796515	KC796588	Cette étude
	CmicMx3	-	-	KC796549	KC796516	KC796589	Cette étude

Annexe 3 (suite)

99°E 30', 19° 30' / 2400m	AY091813	-	-	-	-	Yang et al, non publié
	AB016458	-	-	-	-	Yokoyama et al, 2000
<i>C. intermedia</i> ND	AF280100	-	-	-	-	Yang et al, non publié
	AB016455	-	-	-	-	Yokoyama et al, 2000
<i>C. terminalis</i> ND	AY091817	-	-	-	-	Yang et al, non publié
<i>C. ruscifolia</i> ND	AY091815	-	-	-	-	Yang et al, non publié
	AY091814	-	-	-	-	Yang et al, non publié
	AF280104	-	-	-	-	Yang et al, non publié
	AB016462	-	-	-	-	Yokoyama et al, 2000
<i>C. sarmentosa</i> ND	AY091816	-	-	-	-	Yang et al, 2001
	AB016464	-	-	-	-	Yokoyama et al, 2000
<i>C. papuana</i> ND	AB016461	-	-	-	-	Yokoyama et al, 2000
<i>Datisca Glomerata</i> ND	AY968449	CP002801	CP002801	CP00280		Persson et al, 2011
		-	-	-		Zhang et al, 2006
		AF485250	-	-	-	Forrest et Hollingsworth, 2003
<i>Casuarina equisetifolia</i> ND	AB015462	CP000249	CP000249	CP000249		Normand et al, 2007
		-	-	-		Sogo et al, 2001
	AY864057	-	-	-	-	Herbert et al, non publié

Annexe 4. Séquences des ITS 16S-23S des souches de *Frankia* représentatives de 4 groupes du genre *Frankia*. CcI3 et ACN14a (groupe1); CeaLb1 et FrCveliz (groupe2); EAN1pec et H1S2Hp (groupe3) et NRRL16386 et NRRL16512 (groupe 4).

	1												107
CcI3	CTAAGGAGCG	T-CTGGCTGG	TCTGTCTCTGT	AGTGGG--GT	GGGCTGGTGC	AGAGCCAGGG	CCGGCTGTGG	ATGCCCGTCT	GGT-TGCTC-	GTGGGTG--G	AACGCTGACG	A-TGGGG	
ACN14a		AA.	.GGTGTTC	T.-----	--CT..TCCA	GAG.....T.	T...A...TC	.G.....C..	...-.....G	A.....--	T	GG.T...	
CeaLb1		AA.	.GGTGTTC	T.-----	--CT..TCCA	GAG.....T.	T...A...TC	.G.....C..	...-.....G	A.....--	T	GG.T...A	
FrCveliz		AA.	.GGTGTTC	T.-----	--CT..TCCA	GAG.....T.	T...A...TC	.G.....C..	...-.....G	A.....--	T	GG.T...A	
EAN1pec	T	T.....	GTGCC.....	TG..	T.C.....C.	G.T.A	T.A.TC.A.T	G-.T.....	..A.....-	A.....--	G.T	--..TT	
H1S2Hp	T	T...A....	GGCC.T.....	GG..	T-T.....	G.A.A	C.GAT	G-.TT.....	..GG.....	A.....TG.	T	--..TT	
NRRLB16386	A	..-CC.---	GTCTGT.C.C	G.-----	-----	..GC.GGATT	.T.A...TC	A.C	..TC....-	AGT..C.TG.	..T.....T	TCA.A..	
NRRLB16512	A	..-CA.---	GT.TGT.C..	G.-----	-----	..GC.GGTTC	T.....C	G..	..T.....-	AGT..C.TG.	..T.....T	TCA.A.C	
												234	
CcI3	TTTC-GGCTG	GTTGTCCGGG	GTCTAGTACT	CCTCTG-TCC	TTATCTTC--	-----GG--	GTGGGGTGGG	GGGTGGAACG	GTCCGGGTGG	GT---GGCTG	G-GGTCCGTG	GCACGCT	
ACN14a	C.G.T..T..	TC..G.A..C		..-...G..G	.CC.TC..CC	TTGTG..GTT	.G.T..GT..		.GT.T.....	..-.....	.T...G...		
CeaLb1	..GTCATGGC	TG.TCTG.TT	G	T.GT	G.GG-----	-----	-----	..T.GAACGG.	.CTG.....	T---.TGG.	.GTC.A...		
FrCveliz	.G.TCATGGC	TG.TCTG.TT	G	T.GT	G.GG-----	-----	-----	..T.GAACGG.	.CTG.....	T---.TGG.	.GTC.A...		
EAN1pec	C.G.T.A...-	C..GTTC..	A...T.GGT.	..G..TGGG	C.TG-----	-----	-----	-----	-GGTT.G..	C---.GGT	TG.TGGGTC.	.T....	
H1S2Hp	C..TCT.G.-	-C..GTT.TT	..CG.GGT.	TGTT	C.TC-----	-----	-----	-----	-GGTT....	C---.TCT	.G.TGGG-C.	.T....	
NRRLB16386	CCGTC.T.G.	CCG.CGT..T	.G.....	..ATC.T.	-----	-----	GT..		TG..T.C...	T.CGG..A..	.TCTCGT...	.TG....	
NRRLB16512	C.GTTC.TG.	C.G..T...T	.G.....	..-..ATCT.	..C.G-----	-----	GT..		.G....CT.	..TGG..A..	.TTTCGT...	.TG....	
												351	
CcI3	GTTGGGTCCT	GAGGGAGTGA	GGCTCTCTCG	GCTGGTGGGT	TCCTGTG---	-----	CTGTGGTCCT	GGTGGGGATC	GTGGTGGGGG	GGTCTGCTGG	TGGAACGGAC	CGGTC-G	
ACN14a			..TC....	T.....T.A	C..CT.C---	-----	TGC..A...C	TT.C...GGG	T..TG.T...		..-.....	-	
CeaLb1			..-TC-...	..GATC...	..GAGC----	-----C	..CC...G..	-----GGT	..CC.....	.T..G.TC.C	G-.T...GT	.ATCT-.	
FrCveliz			..TG.GCT..C	TTG.CGATCG	..GGGAGC----	-----C	..CC...G..	-----GGT	..CC.....	.T..G.TC.C	G-.T...GT	.ATCT-.	
EAN1pec		T.	..TG.C....	TG..TG.CCC	.G..T.TGTT	CGACTTGCCT	.GA...C.T.	CTG.TT.TCG	.G.T..TT..	.CGGG.TG..	..-TG...G.	T...T..	
H1S2Hp	TT.		..ATG.C....	TG..ATGACCC	.G.CT.C---	-----	TGC...C..-	-----T.G	.G.T...T..	..-AG..A..	.T-TG...G.	T...TC.	
NRRLB16386		C.G	AAA..GT.TC	TTC....CC	AT.GACC---	-----	.CCG...T.	CC.TC..GAA	.G...C...	..TG...C	G.-T.....	.A.CTCT	
NRRLB16512		..C....C.G	AAA..GT.TC	TTC....CC	AT.GACC---	-----	.CCG...T.	CC..TC.GGG	AG...C...	..TG...C	G.-T.....	.A...CT	
												465	
CcI3	TGGTGGAGGA	CTGCCTTCCC	GTTGGGTGGG	GGTGGGT---	--TTCGCGGG	TCGGCTGGGG	-CCTCCGTAC	GTGAGAACT	GCACAGTGA	CGCGA-GC--	----ATCTTT	GT	
ACN14a	...A.GA..	.C.....T			--CT.....	..CG.....	-----					..	
CeaLb1	C.TC.TG.A.	GGTGT	CC	C---	---CGCG..T	GT..G.....	T...T	C.....				..	
FrCveliz	C.TC.TG.A.	GGTGT	CC	C---	---CGCG..T	GT..G.....	T...T	C.....				..	
EAN1pec	GAT.	.C..TG.TG.	C..T-TG..T	.A....TTG	GTC..AG..C	G.....TT	T...T...G	T.....		..-..AT	CTTT.....	..	
H1S2Hp	.C....GAT.	.C..TG.---	T..T-A...T		--CCT.A..T	G.....TT	T..CT...G	T.....		..-..AT	CTTT.....	..	
NRRLB16386	.CCAAACATC	GC..T.C.T.	..G.---.T	..CT...T--	--GG.G...	.A..G.C.TC	GGT.TG...	T.....		..-..	G.	..	
NRRLB16512	.AC--ACA.G	A.CGT.CGTG	--CC	C.....GT--	--C.G..T.T	.G..G.C.TC	CGT..G...	T..C.....		..A.---	G.	..	