

CHAPITRE VI

Symbiose *Rhizobium*-légumineuse

1. Généralités sur la fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote est un processus qui permet de produire des substances protéiques à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère. L'atmosphère contient 78% de N_2 , mais cette forme est inaccessible à la plupart des êtres vivants. En effet les seuls organismes capables de l'utiliser sont des bactéries, dites diazotrophes, qui possèdent le complexe enzymatique réducteur appelé nitrogénase. En conditions de faible teneur en oxygène, cette enzyme catalyse la réduction de l'azote atmosphérique N_2 en ammoniac. Au niveau du sol, les plantes ne peuvent assimiler cet élément que sous forme de nitrate et d'ammonium par absorption racinaire. La transformation de l'azote atmosphérique en azote assimilable par les plantes se fait par deux processus naturels différents :

- Les fixateurs libres comprennent des genres variés : *Azobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, cyanobactéries,...
- Dans le cadre du mutualisme, deux groupes de végétaux forment des symbioses nodulaires avec des bactéries diazotrophes : les plantes actinorhiziennes, dont les partenaires symbiotiques sont des bactéries filamenteuses Gram positif du genre *Frankia*, et les légumineuses qui s'associent aux rhizobiums (bactéries unicellulaires gram négatif). Dans les deux cas, la symbiose avec les bactéries aboutit à la formation de nodules fixateurs d'azote sur les racines, parfois sur les tiges.

2. Symbiose *Rhizobium*-légumineuses

La symbiose *Rhizobium*-légumineuse est le résultat d'une interaction hautement spécifique entre la plante et la bactérie. L'association entre *Rhizobium* (microsymbionte) et la plupart des plantes de la famille des légumineuses (macrosymbionte) conduit à la formation d'un véritable organe, le nodule (appelé aussi nodosité) situé sur les racines de la plante, dans lequel les bactéries fixent l'azote atmosphérique.

2.1. Légumineuses

Les plantes qui établissent des symbioses fixatrices d'azote avec les rhizobiums appartiennent toutes à la superfamille des *Fabaceae* (appelés aussi légumineuses), à l'exception d'une seule non-légumineuse, le genre *Parasponia* de la famille des Ulmacées. Les légumineuses se répartissent en trois sous-familles : les *Caesalpinoideae*, les *Mimosoideae* et les *Papilionoideae*. La nodulation par les rhizobiums est plus fréquente chez les deux sous-familles des Mimosacées (90% des espèces) et des Papilionacées (97% des espèces). Les *Caesalpinoideae*, dont seules 23% des espèces étudiées sont nodulées par les rhizobiums.

2.2. Rhizobiums

Dans la classification initiale des bactéries, les rhizobiums ont été décrits comme Gram négatif en forme de bâtonnet, aérobies, bactéries non sporulantes, et le critère principal était leur capacité de nodulation. Les rhizobiums forment des colonies incolores, blanches ou de couleur crème, sur le milieu de culture (mannitol et extrait de levure). Une croissance optimale de la plupart des souches de *Rhizobium* a lieu à des températures variant de 25 à 30°C et un pH compris entre 6 et 7. Dans la relation symbiotique *Rhizobium*/plante hôte, deux critères sont à prendre en compte : l'aptitude à noduler ou infectivité, et l'aptitude à fixer l'azote atmosphérique en symbiose ou effectivité. Ces deux critères peuvent être influencés par les conditions environnementales.

Actuellement, les rhizobiums sont répartis dans 13 genres et plus de 100 espèces symbiotiques, tels : *Rhizobium*, *Ensifer* (anciennement *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*,

Phyllobacterium,... Cette classification des rhizobiums est loin d'être définitive, elle s'affine sans cesse et s'enrichit d'année en année de nouvelles espèces et nouveaux genres de bactéries grâce à l'exploration de la diversité des symbiotes associés aux légumineuses dans les différentes parties du monde.

L'une des propriétés majeures de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse est sa spécificité. En général, chaque légumineuse ne peut être infectée que par une ou quelques espèces de rhizobiums (spectre d'hôtes de la légumineuse) et réciproquement, chaque souche de rhizobiums ne peut infecter qu'un nombre limité d'espèces de légumineuses (spectre d'hôtes bactérien).

2.3. Formation des nodosités

Les bactéries provoquent la formation de nodosités sur les racines en pénétrant par les poils racinaires, et se transforment en «bactéroïdes» de plus grande taille. Les nodosités sont le siège d'une activité symbiotique dans laquelle la plante apporte les sucres et l'énergie issus de la photosynthèse, et bénéficie en retour des acides aminés qui y sont produits.

2.3.1. Signaux moléculaires

L'installation de la symbiose est contrôlée par un dialogue moléculaire qui se met en place entre la bactérie et la plante hôte (Figure 5). Les flavonoïdes libérés par les racines de la plante constituent le premier signal moléculaire. Ce sont les principaux signaux émis par la plante hôte et perçus par les rhizobiums dans le sol, induisant l'expression des gènes *nod* (pour nodulation) chez *Rhizobium*. Les produits des gènes *nod* sont impliqués dans la biosynthèse des facteurs Nod, qui sont ensuite reconnus par des récepteurs spécifiques de la plante. Ces facteurs Nod sont responsables de la courbure des poils absorbants racinaires, ils constituent le second signal moléculaire nécessaire à l'initiation nodulaire. Par la suite, l'activation de nombreux gènes permet la mise en place et le contrôle de l'infection et de la différenciation du nodule.

a) Les flavonoïdes : Ce sont des métabolites secondaires de nature aromatiques exsudés par les racines de la plante dans la rhizosphère. Chaque plante exsude un mélange de différents flavonoïdes dont les isoflavonoïdes qui sont spécifiques des légumineuses. Par chimiotactisme, les rhizobia colonisent la rhizosphère et s'attachent aux poils absorbants par l'intermédiaire d'une molécule d'adhésion spécifique localisée à la surface des cellules, la rhicadhésine.

b) Les gènes de nodulation et leur localisation : Les gènes *nod* codent pour des enzymes de la voie de biosynthèse des facteurs Nod et ils peuvent être classés en trois groupes : les gènes *nod* régulateurs, les gènes *nod* communs et les gènes *nod* spécifiques.

- Les gènes *nod* régulateurs codent pour des protéines qui, en présence des flavonoïdes, activent l'expression des gènes *nod* communs. Le gène *nodD* codant pour des récepteurs spécifiques de signaux de la plante constitue un premier niveau de contrôle de la spécificité d'hôte.

- Les gènes *nod* communs (A, B, et C), appelés aussi gènes de structure de la nodulation, sont impliqués dans la synthèse des facteurs Nod. Ces gènes jouent un rôle essentiel dans la formation des nodosités.

- Les gènes *nod* spécifiques (ou hsn pour « host specific nodulation »), sont responsables des substitutions qui s'opèrent sur le squelette de base du facteur Nod *Rhizobium*. Ils confèrent des ornements variables aux facteurs Nod et jouent donc directement un rôle dans la spécificité d'hôte.

c) Les facteurs Nod : Les facteurs Nod sont des lipochitoooligosaccharides (LCO) constitués d'un squelette de chitine, c'est-à-dire d'unités de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) reliées entre elles par des liaisons β -1,4 (Figure 6). Une chaîne d'acide gras polyinsaturée est greffée par N-acylation sur l'atome d'azote du résidu glucosamine situé à l'extrémité non réductrice du squelette de chitine. Le nombre d'unités de N-acétyl-D-glucosamine constituant le facteur Nod est généralement compris entre 3 et 5. Les facteurs Nod peuvent encore être décorés à l'aide de substitutions chimiques particulières, qui confèrent aux facteurs Nod leur spécificité. La synthèse du squelette d'oligomères de chitine des facteurs Nod requiert l'activité de trois enzymes codées par les gènes *nodABC*.

2.3.2. Mécanisme de la nodulation

Le processus de nodulation est très complexe, régulé par un échange de signal nécessaire entre les deux espèces en interaction. La constitution d'un nodule fonctionnel peut être divisée en trois étapes : l'infection, l'organogénèse, et la fixation de l'azote. L'interaction symbiotique entre les deux partenaires s'initie par un dialogue moléculaire spécifique.

a) Mode d'infection :

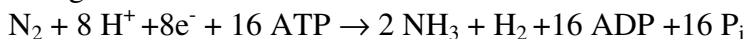
Le mode d'infection le plus étudié et le plus courant est l'infection intracellulaire où l'entrée des bactéries dans la plante a lieu à travers des poils absorbants, et a été observé chez des légumineuses tempérées (exemples : *Medicago*, *Trifolium*, *Pisum*) et certaines légumineuses tropicales et subtropicales (exemples : *Lotus*, *Phaseolus*, *Glycine*). En réponse aux facteurs Nod bactériens (lipochitoooligosaccharides produits par la bactérie via les gènes *nod* de nodulation), l'infection se caractérise par une réorientation de la croissance des poils absorbants conduisant à la formation d'une courbure (Root Hair Curling : RHC) en forme de « crosse de berger ». Au cœur de cette crosse, un espace clos est formé, à l'intérieur duquel les rhizobiums sont piégés et prolifèrent. Les bactéries induisent alors la formation d'un cordon d'infection intracellulaire par invagination de la paroi végétale, cordon au sein duquel les bactéries se multiplient. Le cordon progresse vers le site définitif de libération des bactéries : le primordium nodulaire qui devient ensuite le lobe nodulaire (Figure 7).

b) Structure et développement du nodule

Les cellules racinaires végétales du cortex et du péricycle entrent en division et forme un primordium nodulaire, lieu de libération des bactéries, qui se différencie ensuite en nodule mature. Les bactéries sont libérées du cordon dans le cytoplasme des cellules végétales par un processus d'endocytose par lequel elles sont internalisées dans un compartiment constituant le symbiosome entouré d'une membrane péribactéroïdienne d'origine végétale (Figure 8). Cette membrane assure la séparation des bactéries de la cellule hôte et contrôle l'échange de signaux et de nutriments entre les deux partenaires. Une fois dans le symbiosome, les cellules bactériennes subissent de profonds changements physiologiques et morphologiques, se différenciant en bactéroïdes, forme fixatrices d'azote adaptés aux nouvelles conditions environnementales présentes dans le nodule. Après avoir accueilli les bactéries, le primordium nodulaire va se développer pour former un organe symbiotique (le nodule). La différenciation cellulaire conduit à la formation d'un nodule avec des tissus vasculaires périphériques qui se raccordent à ceux de la racine et tissu central nodulaire réparti en plusieurs zones distinctes. Le nombre de nodules et leur masse sont contrôlés par la plante en fonction des conditions environnementales et de son état physiologique.

2.4. Processus de la fixation symbiotique de l'azote

La fixation d'azote est la réduction du N_2 en NH_3 catalysée par le complexe enzymatique de la nitrogénase selon la réaction suivante :



La fixation de l'azote est un processus très exigeant en énergie, ce qui nécessite au moins 16 molécules d'ATP pour réduire une molécule de N_2 en NH_3 . Le fonctionnement de la fixation d'azote nécessite la contribution des deux partenaires. La plante fournit un environnement microaérobie, de l'énergie et des sources de carbone nécessaires au fonctionnement de la nitrogénase. Le bactéroïde fournit la machinerie génétique pour la synthèse de la nitrogénase : ce sont les gènes *nif* et *fix*. Les gènes *fix* sont des gènes essentiels à la fixation d'azote mais sont rencontrés uniquement chez les microorganismes fixateurs symbiotiques. Les gènes *nif*, codent la biosynthèse de la nitrogénase. Le complexe enzymatique nitrogénase est composé de deux sous unités fonctionnelles à groupement prosthétiques, la dinitrogénase réductase et la dinitrogénase. La nitrogénase est un complexe enzymatique très sensible à l'oxygène, et est rapidement inactivée dans un environnement aérobie. La nodosité lui confère une niche protectrice grâce à la présence d'une protéine végétale, la leghémoglobine qui fixe l'oxygène et permet de maintenir un niveau bas de l'oxygène. Elle permet aussi de réguler la diffusion de l'oxygène aux bactéroïdes.

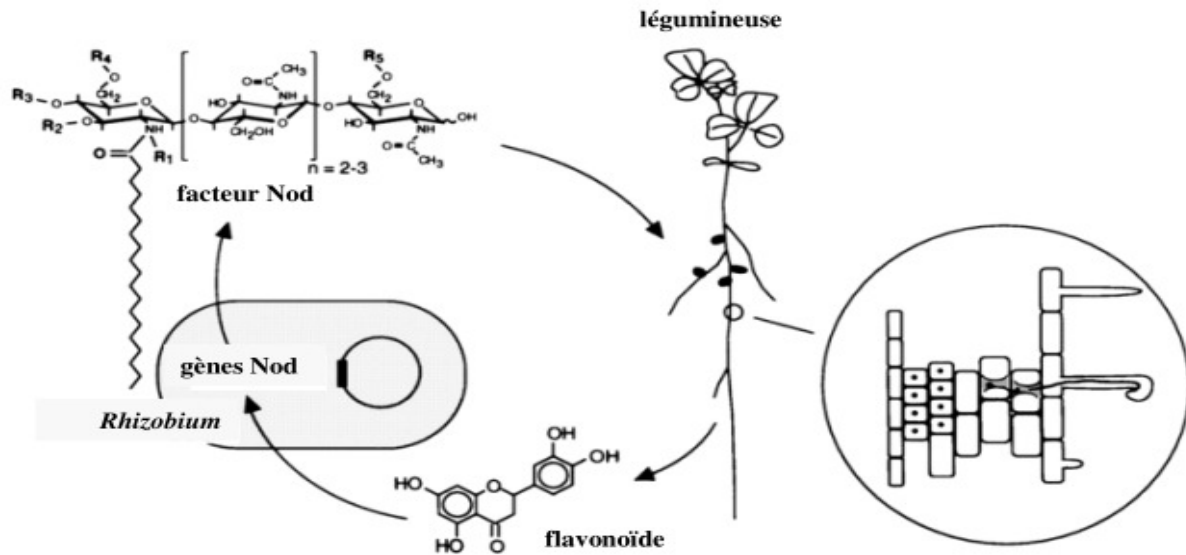


Figure 5 : Le dialogue moléculaire Rhizobium-Légumineuse. Le zoom montre un cordon d'infection passant le cortex racinaire vers un groupe de cellules en division, qui deviendra le primordium nodulaire.

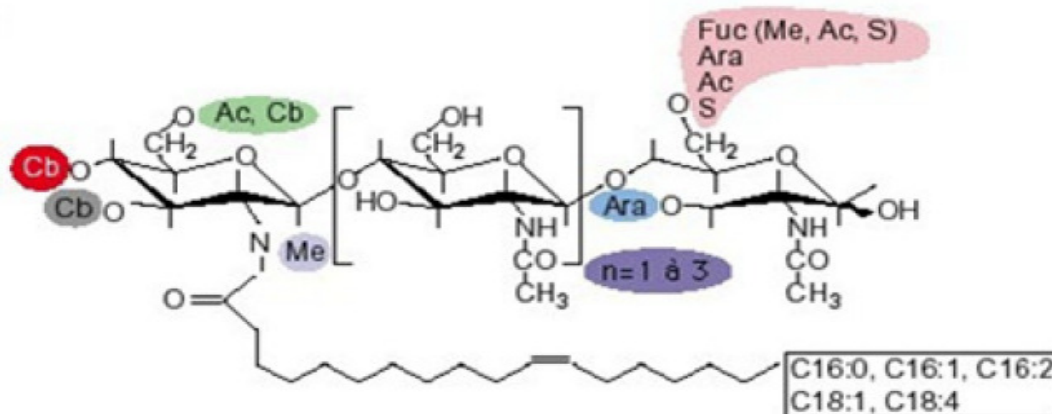


Figure 6 : Structure chimique d'un facteur Nod générique avec quelques une des substitutions que l'on trouve chez plusieurs espèces de rhizobiums. Ac : acetyl, Ara, arabinosyl; Cb, carbonyl; Fuc, fucosyl; Me, methyl; S, sulfuryl

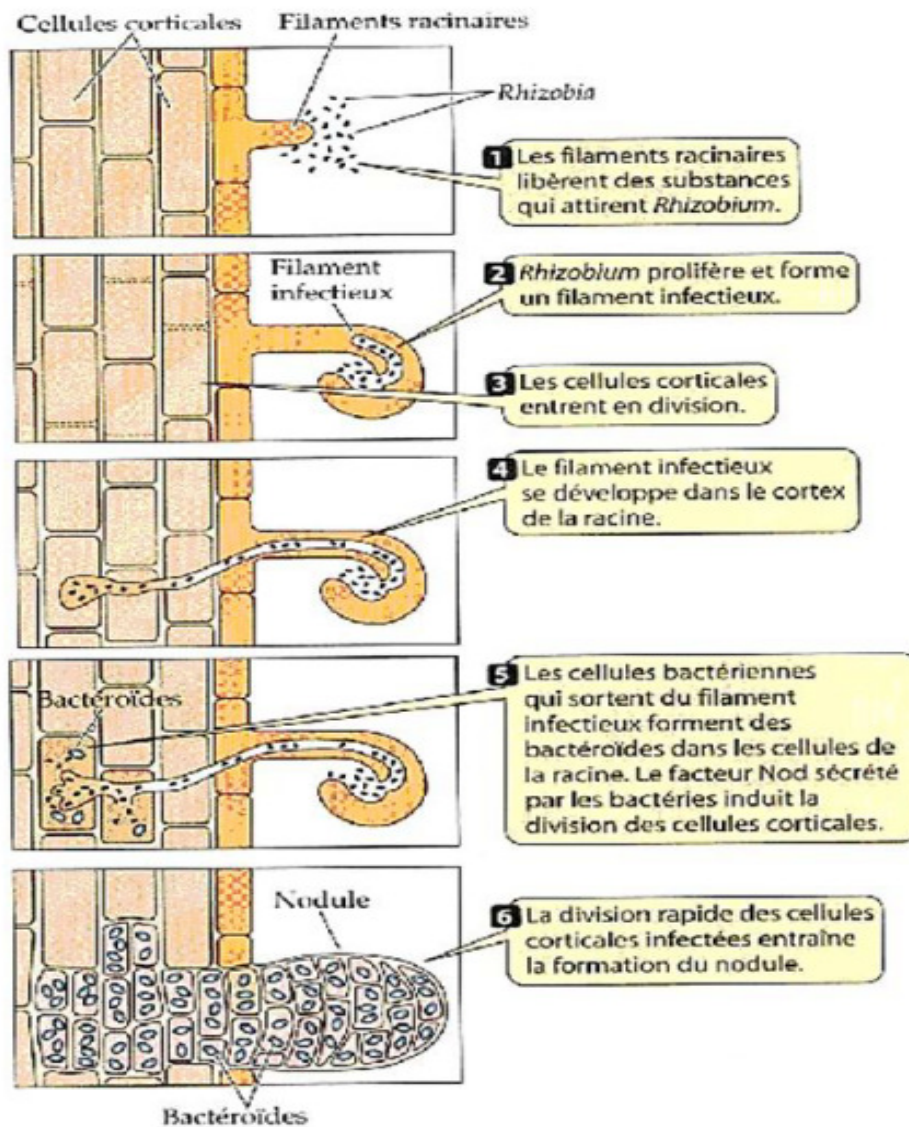


Figure 7 : Développement des noddosités sur les racines dans un cas de symbiose entre *Rhizobium* et une plante légumineuse

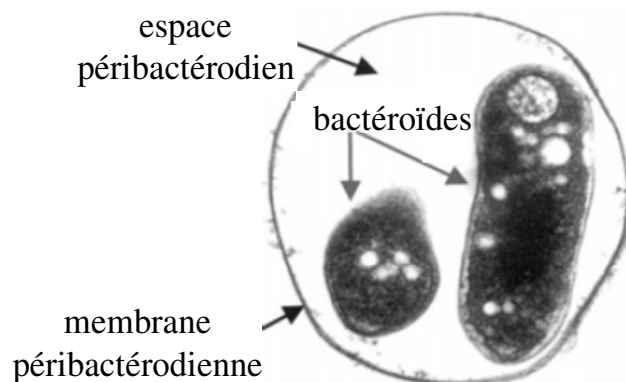


Figure 8 : Symbiosome comportant deux bactéroïde