
Les symbioses fixatrices d'azote

Cécile Revellin

UMR Agroécologie, Inra/Université de Bourgogne
17, rue Sully - BP 86510, 21065 Dijon Cedex

Résumé

Les plantes dites « fixatrices symbiotiques d'azote », comme toutes les plantes, ont besoin d'azote, mais ont la propriété remarquable de pouvoir puiser cet élément à partir de l'atmosphère, tandis que les autres plantes cultivées doivent recevoir des engrais azotés. En fait, ce n'est pas la plante elle-même qui est capable de fixer l'azote de l'air, mais des bactéries spécifiques avec lesquelles elles vivent en association au niveau d'organes particuliers : les nodosités. C'est le cas de deux principaux groupes de plantes : les légumineuses (ou fabacées) qui s'associent avec les Rhizobia et des plantes appartenant à huit familles d'angiospermes (dites actinorhiziennes) qui s'associent avec l'actinomycète Frankia. La plante forme la nodosité qui abrite la bactérie et lui fournit l'énergie nécessaire ; ces bactéries réduisent l'azote gazeux de l'air en ammoniac et cèdent l'azote fixé à la plante. Cette association à bénéfices réciproques est appelée symbiose.

Les partenaires de ces symbioses ainsi que leur fonctionnement et leur importance écologique seront décrits, puis seront présentées et discutées leurs utilisations commerciales actuelles, les applications futures (fertilité des sols, revégétalisation de sols dégradés, et foresterie) ou les perspectives d'utilisation pour d'autres services écosystémiques (réduction du gaz à effet de serre N₂O, solubilisation des phosphates, dégradation des xénobiotiques...)

La fixation d'azote

Les ressources en azote de la planète sont pratiquement illimitées grâce au réservoir atmosphérique (N₂). Pourtant l'azote est, après l'eau, le principal facteur limitant la croissance des végétaux. En effet, pour être utilisable par les végétaux, l'azote doit être sous forme minérale (NH₄⁺ et NO₃⁻), ce qui peut se réaliser par deux voies : la voie de la fixation biologique et la voie industrielle de synthèse des engrais azotés.

La fixation biologique de N₂ a représenté, jusqu'au début du xx^e siècle, la seule source d'azote combiné de notre planète et représente encore aujourd'hui, à l'échelon mondial, un apport environ 1,5 fois supérieur à celui des engrais. Elle est estimée à environ 195 millions de tonnes d'N par an (Smil, V. 2002).

Cette fixation biologique, découverte à la fin du XIX^e siècle, est uniquement le fait de procaryotes¹ (bactéries ou cyanobactéries), une centaine d'espèces au plus, qui vivent à l'état libre ou en association avec certaines plantes.

Ces bactéries sont capables de réduire l'azote gazeux (N₂) en ammoniac (NH₃), qui est transformé en ammonium (NH₄⁺). L'ion ammonium sera incorporé immédiatement dans divers types d'acides aminés. Cette réaction - analogue à celle mise en œuvre industriellement dans la production d'engrais azotés - se fait, par contre, sous des conditions normales de température et de pression, grâce à la nitrogénase, complexe enzymatique particulier et de nature comparable chez tous les organismes fixateurs. Cependant, la réduction de l'azote atmosphérique est un processus très coûteux en énergie. Les organismes fixateurs d'azote doivent donc trouver dans leur environnement de grandes quantités de carbone, qu'ils se procurent :

- directement via la plante dans le cas d'associations plantes-microorganismes,
- indirectement via la matière organique du sol pour les organismes fixateurs libres.

Dans les sols, on constate en général que les bactéries

¹ Les procaryotes sont des organismes unicellulaires caractérisés par l'absence de noyau c'est-à-dire que leur matériel génétique n'est pas enclos dans un organite limité par une enveloppe. Ce taxon s'oppose aux eucaryotes, caractérisés par la présence d'un noyau. Cette division du vivant en deux étant la plus simpliste en termes de classification des espèces.

ries fixatrices libres ne jouent qu'un rôle mineur. Par contre, dans le cas d'une association avec un végétal, la fixation d'azote bénéficie directement des photosynthétats de la plante et on obtient alors un système très performant.

Cette association se traduit par la formation d'organes nouveaux, les nodosités, situées le plus souvent sur le système racinaire, dans lesquelles les bactéries se multiplient et réduisent l'azote de l'air. La plante hôte fournit une niche protectrice et de l'énergie aux bactéries qui, en échange, cèdent l'azote fixé à la plante. On a donc bien une symbiose, c'est-à-dire une association à bénéfice réciproque.

Les symbioses légumineuses - *Rhizobia*

La grande majorité des plantes connues pour former des nodosités fixatrices d'azote sont les légumineuses (ou fabacées) qui s'associent avec les *Rhizobia*. Trois sous-familles sont distinguées : les *Cesalpinoidae*, les *Mimosoidae* et les *Papilionidae*. Très peu d'espèces chez les *Cesalpinoidae* sont nodulées, alors que la plupart des espèces de *Papilionidae* d'intérêt agronomique le sont (soja, luzerne, pois, haricots, arachide...)

Depuis très longtemps une spécificité d'hôte pour la formation des nodosités (infectivité) et la fixation d'azote (efficacité) a été mise en évidence et a conduit à la constitution de groupes d'inoculation croisée pour les légumineuses et la définition d'espèces et de biovars pour les *Rhizobia*. Cette classification des *Rhizobia* basée sur des critères de spécificité d'hôte a longtemps été utilisée. Mais avec le développement très rapide des techniques de biologie moléculaire, on a pu mettre en évidence que des *Rhizobia* de groupes d'inoculation différents pouvaient être génétiquement très proches, et qu'une même légumineuse pouvait être nodulée par des *Rhizobia* génotypiquement distants. Au cours de ces dernières années, la classification des *Rhizobia* a donc subi d'importantes modifications et un développement considérable (Willems, 2006). Ainsi, en septembre 2011, le site ZR *Rhizobia*² recensait plus de 90 espèces réparties en 12 genres (dont les 4 principaux sont *Rhizobium*, *Ensifer* - ex *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* et *Bradyrhizobium*).

² <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>

Formation des nodosités

Une caractéristique remarquable de la symbiose *Rhizobia* - légumineuse est son degré élevé de spécificité. L'établissement de cette symbiose est le fruit d'un « dialogue permanent » entre le *Rhizobia* et sa plante hôte, de nombreux signaux moléculaires spécifiques sont échangés entre les deux partenaires tout au long de la formation de la nodosité. Les flavonoïdes libérés par la plante constituent le premier signal moléculaire et permettent l'activation chez la bactérie des gènes de nodulation responsables de la production des facteurs Nod. Ces facteurs Nod sont capables d'induire les étapes clés intervenant lors de la formation de la nodosité : 1) la fixation du *Rhizobia* sur le poil absorbant ainsi que la courbure du poil, 2) les étapes du processus d'infection via un cordon d'infection, 3) la division cellulaire corticale, 4) le primordium nodulaire se développe alors en nodosité pendant que les bactéries pénètrent dans les cellules végétales et se différencient en bactéroïdes formant ainsi le symbiosome dans lequel la fixation de N₂ va se réaliser (Djordjevic, 2004).

Inoculation et compétition entre souches

Lorsque les *Rhizobia* spécifiques d'une légumineuse sont absents d'un sol ou en faible nombre, pour qu'il y ait nodulation et fixation symbiotique, les *Rhizobia* peuvent être apportés par inoculation. C'est ce qui est pratiqué en France pour le soja dans tous les sols, la luzerne dans les sols de pH inférieur à 6,5 et le lupin dans les sols de pH supérieur à 6 (Amarger, 1980). L'inoculation est réalisée au semis à partir d'un inoculant constitué le plus souvent d'une culture de *Rhizobia* sur un support tourbe. Cet inoculant doit apporter un nombre suffisant de bactéries par graine pour assurer une bonne nodulation de la plante. Les quantités minimales sont de 10⁶ *Rhizobia* par graine du type soja ou lupin et de 5 x 10³ par graine de luzerne. Des inoculants liquides ou granulés appliqués dans la raie de semis sont également utilisés (Catroux *et al.*, 2001). Des millions d'hectares ont été et sont actuellement inoculés chaque année à travers le monde avec différentes espèces de *Rhizobia*, dont environ 50 millions pour le soja (Lindström *et al.*, 2010).

Lorsque les *Rhizobia* d'un groupe d'inoculation donné sont présents dans un sol, leur efficacité à fixer l'azote avec certaines espèces de ce groupe peut être faible ou nulle. Dans ce cas, il peut être difficile d'imposer une souche plus fixatrice, car elle va entrer en compé-

tition pour la formation des nodosités avec les souches indigènes. Le succès de l'intervention dépendra alors essentiellement des rapports de compétitivité et de nombre entre *Rhizobia* du sol et de l'inoculant, d'où la nécessité de chercher à caractériser les populations naturelles pour pouvoir maîtriser le phénomène (Amarger, 1980 ; Lindström *et al.*, 2010).

Intérêts agronomique, environnementaux et économiques

On estime que la moitié de la fixation biologique de N₂ est réalisée par cette symbiose, avec un taux allant de 10 à 300 kg de N₂ fixé par hectare et par an (Werner & Newton, 2005, Lindström *et al.*, 2010), et produit 25 à 35 % des protéines mondiales. Les légumineuses sont principalement utilisées dans l'alimentation humaine et animale pour leur teneur élevée en protéines. Ces cultures représentent un marché mondial d'environ 2 milliards de dollars par an³.

On distingue les légumineuses fourragères (trèfles, luzerne, lotier, pois fourrager, vesces, sainfoin...) et les légumineuses à graines (pois, féverole, lupin, soja pour le bétail ; lentille, pois, haricot pour l'alimentation humaine). Elles sont également cultivées pour leurs huiles alimentaires (soja, arachide) ou non (peinture avec huile de soja). Les légumineuses ligneuses, telles qu'acacia, *Leucaena*, mimosas pouvant fixer des quantités énormes de N₂ (jusqu'à 600 kg /hectare/an) sont utilisées en agroforesterie (Sprent et Parsons, 2000). D'autres comme le lupin, la glycine, les *Cytisus* ou *Genista* peuvent être utilisées comme plantes ornementales.

Les symbioses actinorhiziennes

Les plantes dites actinorhiziennes établissent de la même manière une symbiose fixatrice d'azote avec des bactéries filamenteuses appartenant à un genre particulier d'actinomycètes, le genre *Frankia*. Ces plantes, toutes pérennes et ligneuses, appartiennent à environ 200 espèces réparties dans 24 genres appartenant à huit familles d'angiospermes phylogénétiquement très diversifiées (Franche *et al.*, 2009). La plupart des genres de *Casuarinaceae*, *Coriariaceae*, *Eleagnaceae*, *Datisceae* et *Myricaceae* sont nodulés, alors que seulement quelques espèces des genres *Betulaceae*,

Rhamnaceae et *Rosaceae* le sont. Ces espèces vivaces sont distribuées sur toutes les surfaces terrestres du globe, aussi bien en zones froides avec de fortes variations saisonnières qu'en zones tropicales sans différence marquée entre les saisons. Des exemples de genres bien connus incluent *Alnus* (aulne), *Eleagnus*, *Hippophae* et *Casuarina*.

Comme pour les symbioses légumineuse - *Rhizobia*, les nodosités induites par les *Frankia* sur les plantes actinorhiziennes sont essentiellement localisées sur les racines. Mais à la différence des légumineuses, ces nodosités sont toujours des racines déformées, constituées de lobes renfermant un faisceau vasculaire central entouré d'une zone corticale de cellules infectées (Franche *et al.*, 2009).

Si, depuis 1890, on sait isoler et cultiver au laboratoire les représentants du genre *Rhizobium*, ce n'est que vers 1980 que la première culture pure de *Frankia* a été obtenue. Depuis, de nombreuses cultures pures ont été isolées et des progrès très sensibles dans la connaissance des microsymbiotes et du fonctionnement de la symbiose ont été obtenus. Des améliorations très nettes de l'efficacité de la fixation sont maintenant possibles ; du reste, dans divers pays, des espèces actinorhiziennes sont déjà utilisées sur une vaste échelle dans des domaines aussi variés que la protection contre l'érosion ou la sylviculture, notamment pour la production de biomasse ou de bois de qualité et pour l'amélioration de la productivité d'autres ligneux forestiers (Douglas) ou précieux (noyer, merisier) (Moiroud, 1996). En France, ces espèces pourraient jouer un rôle important pour l'agroforesterie, la réhabilitation de zones dégradées, la valorisation des zones de déprise agricole...

Les symbioses avec cyanobactéries

Il existe un autre type de symbiose qui présente un intérêt agronomique. Les *Azolla* sont de petites fougères aquatiques qui colonisent la surface des rizières en Asie ; grâce à leur association étroite et spécifique avec une cyanobactérie *Anabaena*, elles parviennent à fixer jusqu'à 200 kg d'azote par hectare et par an, et sont utilisées pour la fertilisation des rizières (Franche *et al.*, 2009).

³ <http://www.ildis.org/Leguminosae/>

Perspectives d'application futures

Revégétalisation de terrains dégradés

Les sols dégradés - par une action humaine, plus ou moins intempestive ou indispensable à la bonne économie d'un pays, ou par l'action de phénomènes naturels (eau, éruptions volcaniques, glaces...) - se caractérisent essentiellement par la disparition des horizons de surface et la mise à nu de la roche-mère. Les sols dégradés deviennent des sols « stériles » pour lesquels la recolonisation végétale spontanée est très aléatoire, même par des espèces réputées très frugales. Les exemples de sols dégradés, encore totalement dévégétalisés même après un siècle, sont très nombreux : terrils, délaissées torrentielles, dos d'éléphant...

Parfois cependant, en fonction de l'environnement local, on constate qu'en quelques années une nouvelle végétation s'installe. Nous avons pu suivre, à la fois dans le temps et dans l'espace, de tels phénomènes sur la moraine du glacier de Saint-Sorlin (74) ou dans un ancien lit torrentiel au Col d'Ornon (38) (Danière *et al.* 1986). La littérature fournit aussi d'autres exemples de même type, notamment en Suisse (glacier d'Aletsch) et en Alaska (glacier Bay). Dans tous ces cas, on observe que les premiers végétaux qui s'installent sont soit des trèfles, soit des aulnes ou de l'argousier, donc tous associés à des bactéries fixatrices d'azote (Moiroud, 1996).

Ces végétaux sont en effet non seulement capables d'une bonne croissance sur ces types de sols (nous avons mesuré des gains de croissance annuelle supérieurs à 60 cm pour de jeunes aulnes blancs à Ornon), mais aussi, notamment grâce à un apport massif d'une litière riche en azote et autres minéraux, de modifier suffisamment le sol pour permettre l'installation de nouvelles espèces, des graminées principalement. Ainsi, à Ornon, on est passé en 10 ans d'un stade pionnier à aulnes blancs clairsemés, d'une hauteur moyenne de 50 cm, à un stade où les aulnes dépassaient 6 m de hauteur avec, au niveau du sol, une strate continue comptant plus de 52 espèces (Danière *et al.* 1986).

Des observations tout aussi spectaculaires avaient été faites sur la moraine du glacier Bay en Alaska où, après l'établissement rapide d'un stade pionnier à aulne crispé, le sol s'était suffisamment enrichi pour permettre l'installation d'une forêt de *Tsuga*.

Dans les sols dégradés, les bactéries fixatrices libres ne

jouent aucun rôle. En revanche, grâce à leur symbiose, les végétaux dits fixateurs d'azote sont particulièrement bien armés pour coloniser ces sols, d'autant qu'ils sont aussi capables de s'associer avec des champignons pour former des mycorhizes (Moiroud, 1996). Le rôle des mycorhizes - ecto ou endomycorhizes - n'est plus à démontrer, notamment dans le domaine de la nutrition phosphatée. Il est de toute première importance pour les végétaux fixateurs poussant en sols pionniers car, dans ces sols, le phosphore, autre élément limitant fortement la croissance, est soit présent en très faible quantité soit, en sols calcaires, présent sous formes totalement inassimilables. La littérature actuelle fournit de nombreux exemples attestant d'une corrélation très positive entre intensité de la fixation symbiotique d'azote et présence de mycorhizes.

Cependant, les cas de revégétalisation spontanée de sols dégradés par les fixateurs symbiotiques sont relativement rares. En fait, cela s'explique facilement car, pour qu'une telle symbiose puisse s'établir, il faut : 1) des semenciers à proximité et des conditions permettant la germination des semences, 2) que la très jeune plante trouve dans le sol non seulement des bactéries fixatrices compatibles mais aussi des champignons mycorhiziens. La réunion de toutes ces conditions a une faible probabilité de se réaliser dans les sols soumis à une érosion permanente. Ceci explique que bon nombre de sols ne se recolonisent pas spontanément, même après des décennies.

Actuellement, on dispose de souches hautement performantes de symbiotes microbiens, aussi bien parmi les *Rhizobia* que parmi les *Frankia*, ainsi que de champignons ectomycorhiziens. Il est donc possible de construire des systèmes fixateurs à trois partenaires, plantes, bactéries fixatrices, champignons mycorhiziens, et de les installer sur des terrains dégradés pour suivre, en vraie grandeur, leurs performances⁴.

Identification de nouvelles fonctions d'intérêt agro-écologique

De nombreuses recherches sont en cours pour identifier et exploiter pleinement toutes les propriétés des symbioses légumineuses - *Rhizobia* (pour revue Vance, 1998). Elles peuvent être utilisées en phytoremédiation car elles ont la propriété de faciliter la dégradation de contaminants du sol, comme les pesticides, les herbicides. Elles peuvent aussi piéger et accumuler des polluants. Les légumineuses peuvent être utilisées

⁴ Pour les légumineuses : *Colutea arborescens*, *Coronilla minima*, *emerus* ou *glauca*, *Bonjania hirsuta*, *Genista cinerea*, *Cytissus sessifolius*, *Coronilla*, *Ononis fructicosa*, *Caragana arborescens*, et pour les actinorhizes : *Alnus incana* ou *cordata*, *Hippophae rhamnoides*, *Eleagnus umbellata*, ou *angustilolia*.

directement grâce aux propriétés de leurs exsudats et de la microflore rhizosphérique associée, mais aussi par ingénierie écologique en sélectionnant des souches de *Rhizobia* capables naturellement de rendre des services écosystémiques (dégrader des composés xénotoxiques, solubiliser les phosphates...) Ainsi, nous avons développé un projet pour évaluer l'utilisation des *Rhizobia* en symbiose avec les légumineuses pour favoriser la réduction du gaz à effet de serre, N₂O, dans les sols.

Les sols cultivés sont la principale source d'émission de protoxyde d'azote (N₂O), puissant gaz à effet de serre (GES) puisque son pouvoir de réchauffement global (PRG) est d'environ 300 fois supérieur à celui du dioxyde de carbone (CO₂). Certains *Rhizobia* possèdent la capacité de réduire N₂O en N₂. Nous avons réalisé des expérimentations en serre où nous avons pu réduire les émissions de N₂O en cultivant sur ce sol du soja inoculé avec la souche *Bradyrhizobium japonicum* G49, possédant la capacité de réduire N₂O en N₂. Nous avons également mis en évidence cette propriété chez la souche *Sinorhizobium meliloti* 2011 en symbiose avec de la luzerne. Nous proposons donc une technique d'ingénierie écologique, consistant en l'utilisation de couples symbiotiques plantes - microorganismes spécifiques, dans les sols pour diminuer les émissions de GES par l'agriculture (Hénault & Revellin, 2011). Actuellement, nous poursuivons ces études afin : 1) de démontrer la faisabilité du procédé en grande culture, et 2) de sélectionner, parmi l'importante collection de l'UMR Agroécologie, des symbiotes de plantes qui ne sont actuellement pas inoculées en France (pois, haricot, féverole, trèfle) et qui pourraient l'être à l'avenir avec l'objectif environnemental de réduire des émissions de GES.

Conclusion

La fixation symbiotique de N₂ est un processus qui se compare très favorablement à la synthèse industrielle des engrais, ceci d'autant plus qu'elle utilise de l'énergie solaire via la photosynthèse. Or, bien que ces symbioses fixatrices d'azote présentent des enjeux agronomiques mais aussi environnementaux considérables et incontestables, leur utilisation actuelle en Europe est bien en dessous de ce qu'elle pourrait être. Les services agroécologiques offerts par les symbioses fixatrices aussi bien à *Rhizobia* qu'à *Frankia* devraient nous inciter à reconsidérer la place qu'elles pourraient tenir dans une agriculture, une agroforesterie ou une gestion des territoires durables.

Bibliographie

- Amarger, N. (1980). Aspect microbiologique de la culture des légumineuses. *Le Sélectionneur français*. 28: 61-66.
- Catroux, G., A. Hartmann, C. Revellin (2001). « Trends in rhizobial inoculant production and use. » *Plant and Soil* 230(1): 21-30.
- Danière, C., A. Capellano, A. Moiroud (1986). « Dynamique de l'azote dans un peuplement naturel d'*Alnus incana* (L.) Moench. » *Acta Oecologica* 7: 165-175.
- Djordjevic, M. A. (2004). « *Sinorhizobium meliloti* metabolism in the root nodule : A proteomic perspective. » *Proteomics* 4(7): 1859-1872.
- Franche, C., K. Lindstrom, C. Elmerich (2009). « Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. » *Plant and Soil* 321(1-2): 35-59.
- Henault, C. and C. Revellin (2011). Inoculants of leguminous crops for mitigating soil emissions of the greenhouse gas nitrous oxide. *Plant and Soil* 346(1-2): 289-296.
- Lindstrom, K., M. Murwira, A. Willems, N. Altier (2010). « The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. » *Research in Microbiology* 161(6): 453-463.
- Moiroud, A. (1996). « Diversity and ecology of actinorhizal plants. » *Acta Botanica Gallica* 143(7): 651-661.
- Smil, V. (2002). Biofixation and nitrogen in the biosphere and in global food production. In : *Nitrogen fixation: global perspectives*. T.M. Brogan et al. ed., CAB International, New York, 7-9.
- Sprent, J. I. and R. Parsons (2000). « Nitrogen fixation in legume and non-legume trees. » *Field Crops Research* 65(2-3): 183-196.
- Vance, C. P. (1998). Legume symbiotic nitrogen fixation: agronomic aspects. In: *The Rhizobiaceae - Molecular biology of model plant associated bacteria*. H. P. Spaink, A. Kondorosi and P. J. J. Hooijkaas (Eds). Dordrecht/ Boston/ London, Kluwer Academic publishers: 509-530.
- Werner, D., Newton W. E. (2005). Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment. Dordrecht, Pays Bas, Springer.
- Willems, A. (2006). « The taxonomy of rhizobia: an overview. » *Plant and Soil* 287(1/2): 3-14.