

LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L' AZOTE :

L' ORSTOM ET LES RECHERCHES FONDAMENTALES

Microbiologie , Dakar

D. Bogusz

C. Franche

Août 1985

**O.R.S.T.O.M.**

Fonds Documentaire

N° : 23059 ex. 1

Cote : B 23059 30 M

Date : 12/11/86 ex 1

Ce rapport traite uniquement d'une partie des recherches faites au laboratoire de Biologie des Sols O.R.S.T.O.M. de Dakar ; il s'agit de recherches en Biologie Moléculaire sur les symbioses Sesbania-Rhizobium et Azolla-Anabaena azollae.

Il n'est pas question ici des recherches effectuées sur les symbioses actinorhiziennes ni sur les symbioses avec d'autres légumineuses à nodules caulinaires (Aeschynomene) ni sur les symbioses avec les légumineuses arborescentes. Les recherches sur ces systèmes portent sur la physiologie et l'écologie.

Ce rapport a pour but de présenter les recherches fondamentales entreprises dans le monde et à l' ORSTOM sur la fixation biologique de l'azote.

Nous présenterons :

- en introduction , une définition de la fixation biologique de l'azote , ainsi qu'une liste des différents micro-organismes fixateurs d' azote
  
- un historique des recherches fondamentales entreprises dans le monde sur les principaux systèmes fixateurs d' azote
  
- un résumé des recherches fondamentales menées par les chercheurs ORSTOM de la section microbiologie de Dakar sur deux systèmes fixateurs d'azote :
  - . d'une part la symbiose Rhizobium- Sesbania rostrata
  - . d'autre part la symbiose Azolla -Anabaena azollae
  
- les perspectives à long terme de ce type de recherche
  
- en conclusion , nous proposerons une réflexion sur l'enjeu pour les pays en voie de développement de la biologie moléculaire et du génie génétique , et sur le rôle que peut jouer l'ORSTOM dans ce domaine .

## LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE

### Définition :

L' azote moléculaire contenu dans l'atmosphère terrestre représente une réserve pratiquement illimitée d'environ  $4.10^{15}$  tonnes , mais , pour être assimilable par les végétaux , l' azote doit être combiné à d'autres éléments tels que l'hydrogène ou l'oxygène . La transformation de l'azote moléculaire en azote combiné est appelée fixation d'azote ; elle peut se faire selon des voies biologiques ou chimiques.

### Quelques chiffres :

La fixation biologique de l'azote représente environ 180 millions de tonnes d'azote fixé par an; elle est réalisée uniquement par certains microorganismes procaryotes . La fixation chimique naturelle représente environ  $20.10^6$  tonnes et la synthèse chimique d'ammoniaque par le procédé Haber environ  $100.10^6$  tonnes.

L'emploi d'engrais représente 30 pour cent de la "note énergétique " en agriculture moderne . Il existe dans le monde 600 usines qui utilisent le procédé Haber. Leur consommation en énergie est considérable : elle équivaut à environ 2 millions de barils de pétrole par jour.

### Les microorganismes fixateurs d'azote :

Les microorganismes fixateurs d'azote appartiennent à des groupes taxonomiques très divers regroupant une cinquantaine d'espèces bactériennes et de nombreuses cyanobactéries.

On peut classer les fixateurs d'azote en deux groupes selon leur relation avec les plantes :

. le groupe des bactéries fixatrices libres non associées avec une plante spécifique , comme Klebsiella pneumoniae , Azospirillum , Azotobacter vinelandii , Clostridium pasteurianum , Rhodospirillum rubrum et de nombreuses cyanobactéries;

. le groupe des bactéries symbiotiques qui fixent l'azote en association avec la plante ; c'est le cas de Rhizobium avec les légumineuses , de certains actinomycètes comme Frankia avec Casuarina et d'Anabaena azollae qui fixe l'azote à l'intérieur de la fougère Azolla .

Le tableau I présente une liste des principaux systèmes fixateurs d'azote étudiés dans le monde .

Les systèmes fixateurs d'azote étudiés à l'ORSTOM :

Dans la nature , les systèmes fixateurs d'azote les plus efficaces sont les systèmes symbiotiques . En raison de leur intérêt pour le maintien de la fertilité des sols tropicaux , l'ORSTOM a choisi d'étudier les symbioses suivantes :

- 1). - légumineuses- Rhizobium :  
Sesbania - Rhizobium ; Aeschynomene - Rhizobium ; Acacia - Rhizobium ; Albizia - Rhizobium ; Leucaena - Rhizobium
- 2). - non légumineuse - actinomycète :  
Casuarina - Frankia
- 3). - ptéridophyte - cyanobactérie :  
Azolla- Anabaena azollae

Tableau I : liste des principaux microorganismes fixateurs d'azote

<p><u>Fixateurs libres</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Klebsiella pneumoniae</li> <li>. Azospirillum</li> <li>. Rhodospirillum rubrum</li> <li>. Azotobacter vinelandii</li> <li>. Cyanobactéries : Gloeotheca , Anabaena , Nostoc , ...</li> </ul>
<p><u>Fixateurs symbiotiques</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. <u>Rhizobium</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>-symbioses avec les légumineuses: trèfle, soja, luzerne, arachide, haricot, pois, sesbania, aeschynomene acacia, albizia, leucaena, ...</li> <li>-symbiose avec les non légumineuses: parasponia</li> </ul> </li> <li>. <u>Actinomycètes</u> : Frankia symbiose avec Casuarina</li> <li>. <u>Cyanobactéries</u> : Anabaena azollae symbiose avec Azolla</li> </ul>

HISTORIQUE DES RECHERCHES FONDAMENTALES ENTREPRISES  
SUR LES BACTERIES FIXATRICES D'AZOTE

Klebsiella pneumoniae :

Klebsiella pneumoniae est le fixateur libre qui a été le plus utilisé jusqu'en 1980 pour les analyses génétiques et biochimiques de la fixation d'azote . En effet , cette bactérie présente des atouts majeurs pour le travail de laboratoire :

- c'est une entérobactérie dont la carte génétique est très proche de la bactérie modèle Escherichia coli

- elle pousse rapidement et se manipule facilement en laboratoire

- il est très facile d'en isoler sur boîte de pétri des mutants incapables de fixer l'azote . Ces mutants sont des outils indispensables à l'étude des gènes impliqués dans la fixation d'azote.

Grâce à ces propriétés remarquables , les techniques d'analyse génétique classique connues chez Escherichia coli ont pu être employées avec Klebsiella pneumoniae . C'est ainsi que dès 1971 les gènes nif ( nitrogen fixation ) de Klebsiella pneumoniae ont été localisés et isolés . Le développement des techniques de génie génétique a permis dans les années 1979

une analyse fine du processus biologique de la fixation d'azote chez cette bactérie .

Aujourd'hui , tous les gènes impliqués dans la fixation d'azote sont connus ; le produit de ces gènes est identifié ; la fonction de ces produits est pratiquement déterminée . Les recherches actuelles portent sur les mécanismes de régulation de l'expression des gènes nif .

Klebsiella pneumoniae a donc été jusqu'en 1980 la bactérie modèle pour les microbiologistes étudiant la fixation d'azote . Cependant le rôle agronomique de ce fixateur libre est faible .

### Les bactéries du genre Rhizobium :

En association avec les légumineuses, Rhizobium est responsable de 40 % de la fixation biologique naturelle . Les bactéries du genre Rhizobium infectent les racines des légumineuses où ils induisent la différenciation de structures appelées nodules . C'est au sein de ces nodules que Rhizobium exprime son activité nitrogénase .

Bien que de nombreuses études aient été entreprises sur ces bactéries en raison de leur intérêt agronomique , les recherches fondamentales ont été difficiles . En effet , une fois isolées des nodules de la plante hôte , les bactéries du genre Rhizobium ne poussent plus aux dépens de l'azote moléculaire . Il est donc impossible d'identifier sur boîte de pétri des mutants de Rhizobium incapables de fixer l'azote ; chaque mutant potentiel isolé en laboratoire doit être testé sur la plante hôte pour conclure ou non à une mutation dans les gènes de la fixation d'azote . Ces études sont donc très laborieuses .

Cependant , dans les années 1980 , la biologie moléculaire a permis une progression notable des études fondamentales chez Rhizobium . En utilisant les connaissances obtenues sur la bactérie modèle Klebsiella pneumoniae ; les chercheurs ont pu étudier quelques gènes nif de ces Rhizobium . Plusieurs gènes bactériens impliqués dans le processus de nodulation sont en cours d'étude .

Le facteur limitant des recherches fondamentales en Rhizobiologie était donc l'impossibilité de cultiver les bactéries du genre Rhizobium en condition de fixation d'azote .

### Les cyanobactéries :

Les cyanobactéries sont des microorganismes procaryotes possédant une photosynthèse de type végétale . La photosynthèse est la transformation de l'énergie lumineuse pour la croissance d'un système biologique . Les cyanobactéries se présentent sous des formes très diverses , unicellulaires ou filamenteuses , non fixatrices ou fixatrices d'azote , en symbiose ou à l'état libre , et colonisent des biotopes très variés . Dans les régions tropicales , leur rôle dans le maintien du bilan d'azote des sols

assujettis à une culture intensive est important .

C'est vers les années 1970 que l'isolement , la purification et les milieux de culture des cyanobactéries sont mis au point . Les travaux généraux de physiologie , de biochimie et de génétique de ces microorganismes sont donc relativement récents .

Les cyanobactéries fixatrices d'azote les plus importantes au niveau écologique sont les formes filamenteuses hétérocystées, comme par exemple les cyanobactéries du genre Anabaena . L'hétérocyste est une cellule spécialisée dans la fixation de l'azote . Il n'existe à l'heure actuelle aucun système d'analyse génétique classique de ces microorganismes . Dans les années 1980 , la biologie moléculaire a cependant permis , comme pour les bactéries du genre Rhizobium , une étude de quelques gènes impliqués dans la fixation d'azote , en particulier pour une souche d'Anabaena vivant à l'état libre .

Les connaissances fondamentales sur la fixation d'azote chez les cyanobactéries sont donc encore plus embryonnaires que pour Rhizobium , et surtout il est très difficile d'isoler des mutants incapables de fixer l'azote .

La symbiose Rhizobium - Sesbania rostrata :

La découverte :

En 1979 , B. Dreyfus redécouvre dans le Nord du Sénégal ) une légumineuse tropicale : Sesbania rostrata. Cette légumineuse présente l'originalité d'une double nodulation : racinaire et caulinaire ( nodules de tiges ) . Il isole de ces nodules une souche de Rhizobium qu'il appelle ORS 571 .

En culture pure, la souche d'ORS 571 présente la propriété unique d'utiliser l'azote moléculaire pour sa croissance . Les études en laboratoire sur boîte de pétri de la fixation d'azote chez Rhizobium , sans passer par l'intermédiaire de la plante, sont donc possibles . L' ensemble des Rhizobiologistes à travers le monde avait trouvé sa bactérie modèle .

Une autre propriété remarquable de cette symbiose est l'existence sur la tige de Sesbania de nombreuses ébauches racinaires qui , après infection par Rhizobium , se transforment en nodules fixateurs d'azote . La quantité d'azote fixée par une telle plante est donc beaucoup plus importante que celle observée pour les légumineuses à nodules exclusivement racinaires ( soja , luzerne , haricot , ... )

La symbiose Rhizobium - Sesbania rostrata présente donc la double caractéristique d'être un modèle unique pour les recherches fondamentales, et un matériel de choix pour une utilisation comme engrais vert .

Les recherches fondamentales ORSTOM :

Nous ne parlerons pas ici volontairement des recherches agronomiques menées par l'ORSTOM ( engrais vert ) . Nous n'aborderons que les recherches fondamentales et distinguerons les recherches effectuées au sein du laboratoire de microbiologie de Dakar , et les recherches qui , en l'absence d'un laboratoire de biologie moléculaire ORSTOM , ont du être menées dans d'autres structures .

### Etudes génétiques :

. à l'ORSTOM Dakar : des bactériophages ( virus des bactéries capables d'infecter Rhizobium ORS 571 ont été isolés et caractérisés . Le contenu plasmidique ( matériel génétique extrachromosomique ) de la souche ORS 571 a été étudié .

. en collaboration avec des chercheurs ORSTOM :

- Institut Pasteur , Paris : des mutants incapables de fixer l'azote ont été isolés et caractérisés . Par les techniques de biologie moléculaire , une analyse fine de plusieurs de ces gènes a été entreprise .
- Université de Gent , Belgique : des mutants de la souche ORS 571 affectés dans la fixation d'azote et dans la nodulation de la plante hôte ont été isolés et caractérisés .
- INRA , Toulouse : l'étude des gènes de la plante Sesbania rostrata impliqués dans la symbiose est en cours .

### Etudes biochimiques :

. à l'ORSTOM Dakar : les leghémoglobines ( protéines présentes dans les nodules des légumineuses et indispensables à la fixation d'azote ) ont été purifiées à partir des nodules de tige et de racine de Sesbania rostrata et partiellement caractérisés .

Il est très vite apparu que les leghémoglobines de Sesbania rostrata pouvaient servir de modèle pour l'étude du fonctionnement et du rôle des leghémoglobines .

. en collaboration avec des chercheurs ORSTOM :

- CSIRO , Camberra , Australie : la caractérisation biochimique des leghémoglobines a été poursuivie et une étude physiologique est en cours .
- Albert Einstein College , U.S.A. : l'affinité pour l'oxygène des leghémoglobines a été mesurée .
- Université de Melbourne , Melbourne , Australie : la séquence en aminoacides des leghémoglobines est en cours .
- Université de Californie , La Jolla , U.S.A. : la structure fine des leghémoglobines est étudiée en utilisant la résonance magnétique nucléaire .

FRANCE :

- . Unité de Physiologie cellulaire , Institut Pasteur , Paris
- . Laboratoire de Biologie Moléculaire des relations plantes-microorganismes , INRA / CNRS , Toulouse
- . Laboratoire de Biologie Végétale , Université de Nice , NICE

ETATS - UNIS :

- . Department of Physiology and medecin , Albert Einstein College of Medecine, New-York
- . Department of Molecular Biology , University of California, La Jolla , Californie
- . Department of Biology , University of California , Santa Cruz , Californie

Belgique :

- . Laboratorium voor Genetika en voor Histologie en Genetika, Rijkuniversiteit , Gent

Allemagne :

- . Max Plank Institut für Zuchtugs forschung , Cologne

Hollande :

- . Biological laboratory vrije Universiteit , Amsterdam

Angleterre :

- . School of Chemical Sciences , University of East - Anglia , Norwich

Australie :

- . CSIRO , Division of Plant Industry , Canberra
- . University of Melbourne , Melbourne

## La symbiose Anabaena azollae - Azolla :

### Présentation :

L'utilisation des souches de cyanobactéries libres fixatrices d'azote comme engrais vert reste délicate et assez inefficace . Par contre , un engrais vert qui a fait ses preuves depuis des siècles en riziculture est la fougère aquatique Azolla . A l'intérieur de cette fougère vit une cyanobactérie : Anabaena azollae qui fournit tout l'azote nécessaire à la croissance de la plante .

Afin d'améliorer les potentialités naturelles de la symbiose Azolla-Anabaena azollae ( obtention de souches résistantes aux hautes intensités lumineuses , de souches hyperfixatrices,... ) il est nécessaire de bien connaître les deux partenaires : la plante et la cyanobactérie . Or jusqu'à présent , on ne connaît pas le milieu de culture de la cyanobactérie ; il est donc impossible de la cultiver en dehors de la fougère .

### Etudes génétiques :

. à l'ORSTOM Dakar : la démarche entreprise est la suivante: bien que l'on ne puisse pas cultiver la cyanobactérie à l'état libre , on peut l'isoler à partir des broyats de la plante , extraire le matériel génétique ( ou A.D.N. ) de la cyanobactérie, et l'étudier .

C'est ainsi que nous avons pu montrer qu'Anabaena azollae possède de petits plasmides; ceux-ci pourront être utiles pour la mise au point de méthodes d'analyse génétique de la cyanobactérie

. en collaboration avec l'Institut Pasteur , Paris : Nous avons étudié par les techniques de biologie moléculaire plusieurs gènes impliqués dans la fixation d'azote chez Anabaena azollae . Ce sont les premiers résultats obtenus sur les gènes de la fixation d'azote d'une cyanobactérie symbiotique .

PERSPECTIVES A LONG TERME DE CES RECHERCHES

La finalité de toutes ces recherches fondamentales sur la fixation d'azote menées à travers le monde est la disparition des engrais chimiques azotés par l'introduction de la capacité de fixer l'azote dans les cellules végétales .

Deux approches sont envisageables :

- conférer aux végétaux naturellement non fixateurs ( le blé , le riz , la canne à sucre ; ... ) la capacité de former des nodules avec des microorganismes fixateurs d'azote
- introduire directement dans les cellules des végétaux les gènes responsables de la fixation d'azote .

Ces deux approches nécessitent une connaissance parfaite de tous les processus biologiques permettant la fixation d'azote , aussi bien chez la plante hôte que chez les microorganismes . Une telle connaissance n'est possible que grâce à l'emploi des techniques de biologie moléculaire et de génie génétique .

## CONCLUSION

Ce rapport souligne l'intérêt des systèmes biologiques que l'on trouve dans les régions tropicales et l'existence de recherches dites fondamentales dans la section microbiologie des sols de l'ORSTOM . Il met également en évidence les difficultés rencontrées pour poursuivre des recherches compétitives de haut niveau dans les structures actuelles de l'ORSTOM .

La biologie moléculaire et le génie génétique nécessitent l'emploi de produits et de matériels coûteux et sophistiqués. La solution adoptée jusqu'à présent consiste pour les chercheurs ORSTOM concernés à faire des stages dans des laboratoires de haut niveau . Cependant , si une telle collaboration est profitable sur le plan scientifique , elle conduit souvent à une fuite des sujets de recherche ORSTOM dans les laboratoires des pays industrialisés . On peut donc s'interroger sur l'utilisation du matériel biologique en provenance des pays en voie de développement et sur la façon dont ces pays profiteront des retombées de ces recherches .

Dans le cadre de ces réflexions , nous proposons la création d'un laboratoire ORSTOM de biologie moléculaire au sein du laboratoire sciences de la vie de Montpellier . Ce laboratoire pourrait être ouvert à toutes les disciplines ORSTOM concernées par la biologie moléculaire ( virologie , phytopathologie , ... ) et devrait se fixer un double objectif :

- mener à bien une recherche ORSTOM compétitive au niveau international

-servir de structure d'accueil pour la formation et la sensibilisation des chercheurs des pays en voie de développement .