

Fixation de l'azote et

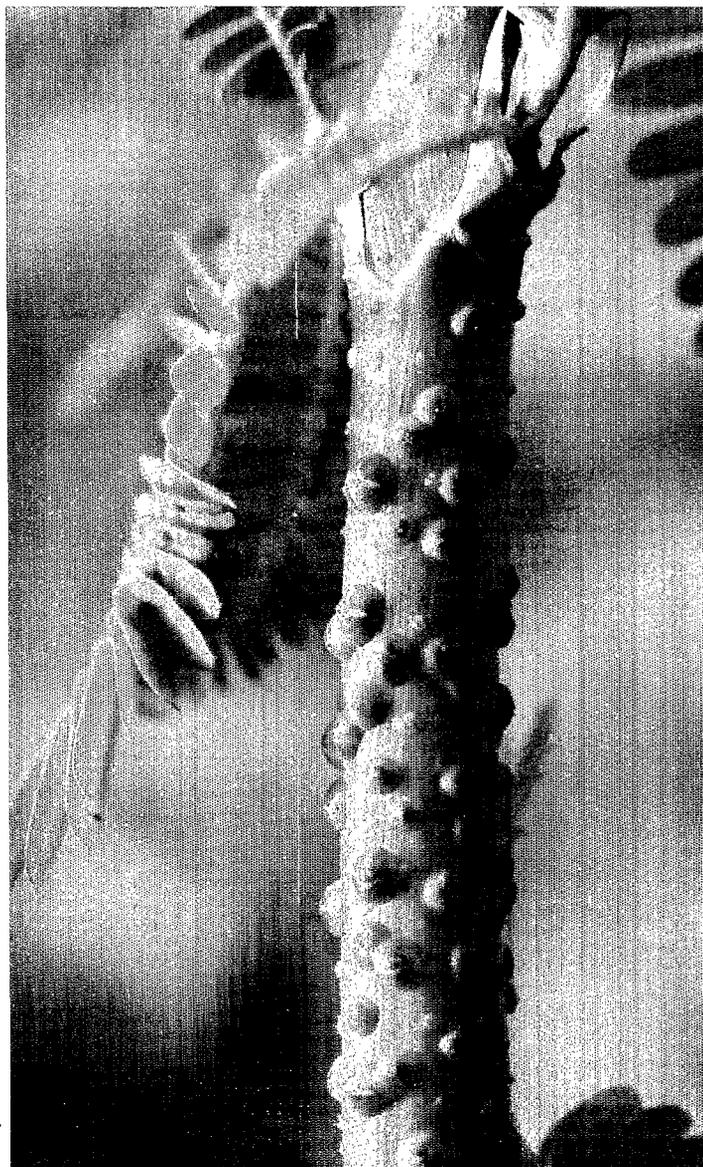
La faible productivité agricole dans beaucoup de pays tropicaux est liée à la pauvreté des sols en éléments minéraux indispensables aux cultures.

L'utilisation de variétés cultivées à haut rendement visant à diminuer le déficit alimentaire dans ces pays est freinée par deux difficultés :

l'épuisement rapide de ces sols, encore accéléré par les aléas climatiques, la cherté des engrais chimiques qu'il est nécessaire d'importer en quantités importantes.

Quelle solution adopter pour répondre à ces deux problèmes à la fois ?

Planter des végétaux fixateurs d'azote ? Certaines de ces plantes, à haut potentiel de fixation biologique de l'azote, peuvent pratiquement remplacer les engrais chimiques si elles sont utilisées comme « engrais verts », enfouies dans le sol; d'autres de ces plantes, arbres fixateurs d'azote à puissant réseau racinaire, servent à régénérer les sols et à fixer les dunes, car ce sont des végétaux pionniers, s'installant sur les sols érodés et dégradés. Des recherches menées sur place, dans un pays africain, aident à renverser le mouvement d'appauvrissement des sols tropicaux.



Dans une perspective d'amélioration de la productivité agricole, l'agriculture tropicale pose un certain nombre de problèmes qui ne peuvent être résolus en copiant simplement l'ensemble des mesures qui ont permis un accroissement régulier des rendements : entre autres, introduction de variétés végétales plus performantes, utilisation d'engrais chimiques et de pesticides, irrigation. L'ensemble de ces techniques, qui sont à la base de ce que l'on a appelé la « révolution verte », a permis d'obtenir de hauts rendements dans certaines conditions, en particulier en Inde et en Asie du Sud-Est. Mais, dans le cas le plus général, l'agriculture tropicale présente des problèmes spécifiques que la

révolution verte ne suffit pas à atténuer ou à résoudre, spécialement en Afrique.

Les variétés modernes de céréales à haut rendement (riz, sorgho, maïs) obtenues par sélection, sont exigeantes en éléments minéraux; elles épuisent rapidement les sols tropicaux qui sont, bien souvent, très pauvres en azote, en phosphore et en autres éléments indispensables à la croissance des végétaux. Les quantités d'engrais azotés et phosphatés nécessaires à une amélioration des rendements sont donc élevées et le coût de ces fertilisants — généralement importés des pays développés — est incompatible avec les ressources financières de la grande majorité des paysans dans les pays tropicaux — pays en voie de développement

pour la plupart. Par ailleurs, l'épuisement des sols tropicaux, provoqué par une intensification de l'agriculture et de l'élevage (résultant elle-même de l'explosion démographique), est souvent aggravé par l'érosion. Ce phénomène est particulièrement sensible dans les régions du Sahel, soumises à une sécheresse récurrente.

Or il existe une réponse commune, d'une part pour régénérer la fertilité des sols appauvris et d'autre part pour fixer les sols érodés. Et cela sans faire appel aux importations d'engrais chimiques ni peser sur les finances locales. Cette solution consiste à planter des végétaux fixateurs d'azote. Dans le premier cas, ces végétaux servent d'engrais vert, c'est-à-dire qu'ils sont enfouis dans le sol par

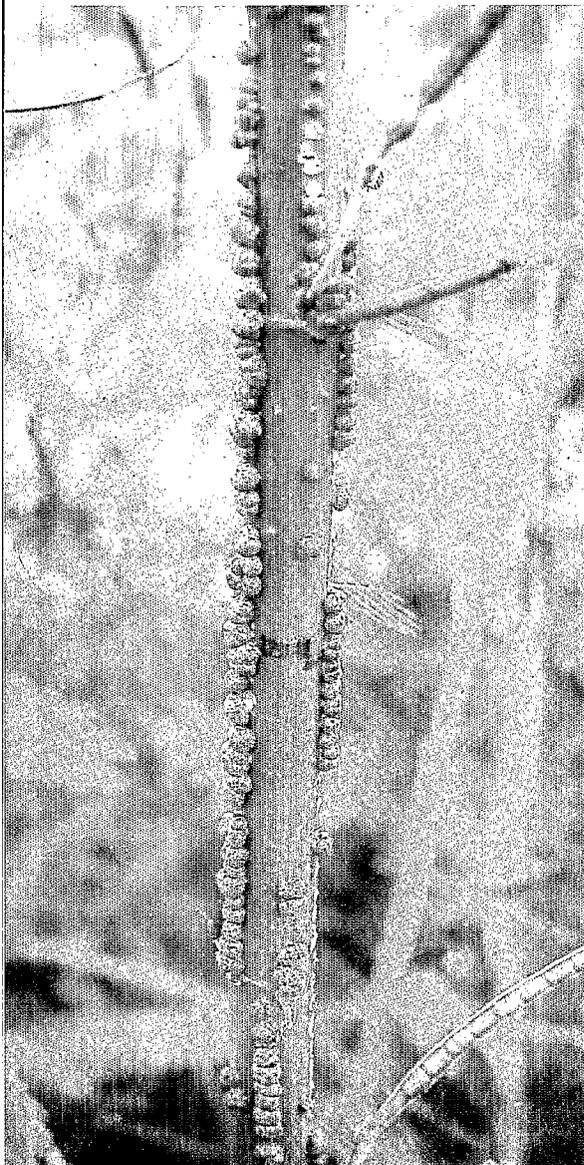


Figure 1. Dans la grande majorité des cas, les plantes qui sont capables d'assimiler directement l'azote gazeux de l'air au lieu d'exiger des engrais azotés pour leur croissance portent des nodules fixateurs d'azote uniquement sur leurs racines. Il en est ainsi du haricot ou du soja. Mais certaines légumineuses tropicales, comme le Sesbania rostrata (photo de droite) ou l'Aeschynomene afraspera (photo de gauche), possèdent des nodules fixateurs d'azote à la fois sur leurs racines et sur leurs tiges. Ces plantes sont ainsi capables de fixer, par saison de culture, des quantités d'azote comparables à celles que l'on doit fournir sous forme d'engrais azotés chimiques.

Il est donc possible de les employer comme « engrais verts », en les enfouissant dans le sol avant de semer les céréales. Avec Sesbania rostrata, les rendements du riz peuvent doubler ou tripler par rapport aux rendements obtenus avec les techniques de culture traditionnelles, comme l'ont montré des expériences effectuées au Sénégal. Les nodules fixateurs d'azote sur les tiges ne sont pas disposés de la même façon selon les espèces. Pour Sesbania rostrata, les nodules sont alignés régulièrement le long de la tige et se développent jusqu'au sommet de la plante sur la tige principale et sur les tiges secondaires.

Pour Aeschynomene afraspera, les nodules de tige apparaissent disposés de façon beaucoup plus irrégulière. (Cliché de gauche, D. Alazard, cliché de droite, B. Dreyfus, ORSTOM, Dakar.)

les plantes. Cette fertilisation favorise l'installation d'autres espèces végétales assurant ainsi la reconstitution d'une couche d'humus et l'accumulation d'éléments nutritifs.

Pour les sols africains, aussi bien dans les régions où sévit la sécheresse et où la mince couche de sol arable est emportée par le vent que dans les régions soumises à des pluies torrentielles qui, elles aussi, emportent le sol superficiel, les deux problèmes sont aussi importants et aussi urgents l'un que l'autre. Les sols appauvris et les sols érodés voient, chaque année, leur aire d'extension s'agrandir. Au laboratoire de microbiologie des sols de l'Office de la recherche scientifique et technique d'outre-mer (ORSTOM) à Dakar (Sénégal), nous nous sommes donc attachés depuis plusieurs années⁽¹⁾ à mettre au point des stratégies de recherche ayant pour objectif de trouver rapidement des solutions, d'une part à la régénération de la fertilité des sols par la fixation biologique de l'azote, d'autre part à l'arrêt de l'érosion par des plantations forestières appropriées. Nos travaux sont menés en collaboration avec l'université de Dakar et l'Institut sénégalais de recherche agricole (ISRA).

Un engrais naturel miraculeux.

En ce qui concerne l'enrichissement en azote des sols cultivés, les légumineuses servant d'engrais vert dans les pays tempérés — vesce ou féverole par exemple — ne poussent pas en pays tropicaux. Sous ces climats, ce sont d'autres légumineuses qui jouent ce rôle. Par exemple, dans les rizières de l'Inde et de l'Extrême Orient (Chine, Philippines, Malaisie), plusieurs espèces du genre *Sesbania* sont cultivées comme engrais vert pour la culture du riz. Ces plantes qui préfèrent les sols humides sont semées dans la rizière avant la saison de culture de la céréale. Après quelques mois, une fois que les plantes de *Sesbania* ont atteint une certaine taille, elles sont enfouies dans le sol de la rizière. Leurs protéines foliaires sont minéralisées en ammoniac et nitrates, formes sous lesquelles l'azote est utilisable par les plantes pour leur propre croissance. Les agronomes estiment que l'apport azoté de l'engrais vert est alors de 50 à 150 kg par hectare et par an; par comparaison, la quantité moyenne d'engrais azoté requise pour la culture intensive du blé ou de maïs en Europe ou aux Etats-Unis est de 150 à 200 kg d'engrais azoté par hectare et par an.

En Afrique, cette fumure azotée sous forme d'engrais vert n'est pas pratiquée dans la culture traditionnelle du riz. Il existe pourtant une légumineuse africaine, appartenant elle aussi au genre

Yvon Dommergues, directeur de recherche au CNRS, anime depuis 1977 le groupe dakarais ORSTOM/CNRS qui se consacre à l'étude de la fixation d'azote.

Bernard Dreyfus, chargé de recherche à l'ORSTOM, a initié en 1979 les recherches sur les légumineuses à nodules caulinaires.

Hoang Gia Diem, maître de recherche au CNRS, est connu par ses travaux sur les endophytes racinaires, notamment le *Frankia*.

Emile Duhoux est depuis 1980 maître de conférences à l'université de Dakar, où il étudie plus particulièrement la physiologie des légumineuses à nodules caulinaires.

labourage avant de mettre en culture les céréales et les autres plantes vivrières qui ne peuvent avoir de bons rendements sans engrais. Le plus souvent, les plantes employées comme engrais vert sont des légumineuses. Ces végétaux, du fait qu'ils sont fixateurs d'azote, ont des feuilles plus riches en protéines que celles des autres végétaux. Lorsque ces feuilles sont enfouies dans le sol, leurs protéines se décomposent pour donner des substances azotées plus simples, qui remplacent les engrais azotés chimiques, comme l'ammoniac et les nitrates.

Pour le deuxième problème, celui de la protection des sols érodés, les végétaux pionniers utilisés pour fixer les dunes mobiles ou les pentes dénudées, en

retenant le sol par leur puissant réseau racinaire, sont par excellence des arbres et des arbustes fixateurs d'azote. Ces arbres et arbustes peuvent appartenir à la famille des légumineuses, comme les acacias, ou faire partie d'autres familles végétales non-légumineuses, comme les aulnes en pays tempéré ou les filaos (*Casuarina*) dans les pays tropicaux. Ces végétaux fixateurs d'azote participent en outre à la restauration de la fertilité des sols en les enrichissant en azote par l'intermédiaire des feuilles mortes et des parties aériennes qui tombent à terre et, aussi, par l'intermédiaire de leurs racines et de leurs nodules morts, qui se décomposent dans le sol en libérant l'azote sous des formes directement assimilables par



Figure 2. Parmi les arbres tropicaux, les Casuarina sont très intéressants pour la régénération des sols pauvres, grâce à leur association avec un actinomycète, le Frankia, qui forme sur les racines des nodules fixateurs d'azote. Originaires de l'Australie et de l'Asie du Sud-Est, ces arbres à croissance très rapide peuvent servir de brise-vent dans les régions sahéliennes pour protéger les cultures des vents de sable; ils sont également utilisés pour fixer les dunes et les pentes des sols érodés. Les Casuarina, au nombre d'une soixantaine d'espèces, sont acclimatés dans toutes les régions tropicales et sub-tropicales, tel ce Casuarina rumphiana, au feuillage plumeux, qui pousse aux Philippines et en Indonésie. (Cliché Y. Dommergues.)

Sesbania. Cette plante, *Sesbania rostrata* (fig. 1), qui pousse, comme les autres plantes du même genre, dans les sols inondés, est capable de fixer des quantités d'azote beaucoup plus importantes que ne le font ses cousines asiatiques — et, donc, de fournir au sol de plus grandes quantités d'azote si on l'utilise comme engrais vert. Son apport azoté atteint en effet facilement les 200 kg par hectare et par saison de culture. Les essais de culture du riz, effectués au Sénégal en 1980 et 1981⁽²⁾, après enfouissement de *Sesbania rostrata* dans le sol de la rizière ont montré que la productivité du riz est très fortement augmentée par rapport aux techniques de fertilisation à l'aide d'engrais chimiques. L'emploi de cette légumineuse comme engrais vert sur des micro-rizières expérimentales au centre ORSTOM de Dakar en 1980 a permis d'obtenir un rendement en grains de 5,9 tonnes par hectare alors que les parcelles ayant reçu 60 kg d'engrais chimique azoté par hectare ne fournissaient que 3,8 t/ha et les parcelles témoins, sans engrais azoté, seulement 2,1 t/ha. Bien plus, la teneur en protéines du riz ainsi obtenu était accrue de 37 % par rapport au riz des parcelles avec engrais chimique et de 53 % par rapport à celui des parcelles sans engrais. Des essais sur une plus grande échelle dans la région rizicole du sud du Sénégal, en Casamance, menés en collaboration avec l'Institut sénégalais de recherche agricole, ont confirmé en 1981 les résultats observés sur les micro-rizières expérimentales.

La raison de ces performances du *Sesbania rostrata* tient à une particularité remarquable de cette plante. Normalement, une légumineuse comme le haricot, le soja ou l'arachide présente sur ses racines des renflements plus ou moins nombreux — appelés nodosités ou nodules — bourrés de bactéries fixatrices d'azote, les *Rhizobium*; mais ces nodules ne se développent que sur les racines. Pour sa part, *Sesbania rostrata* possède des nodules fixateurs d'azote à la fois sur ses racines et sur ses tiges (fig. 1). Les nodules de tiges, nommés aussi nodules caulinaires (du latin *caulis*, tige), sont disposés sur des lignes génératrices, tout le long de la tige principale et des tiges secondaires. De la sorte, le nombre total des nodules fixateurs d'azote est de cinq à dix fois plus élevé chez *Sesbania rostrata* que chez la plupart des autres espèces de légumineuses. C'est probablement une des raisons pour lesquelles la quantité d'azote gazeux fixé et transformé en azote combiné est beaucoup plus importante. L'un de nous, Bernard Dreyfus⁽³⁾, a découvert en 1979 la présence et la signification de ces nodules de tige de *S. rostrata* et, depuis cinq ans, une partie de notre équipe de recherche, à Dakar, s'est consacrée à l'étude de l'association symbiotique de cette plante avec les bactéries *Rhizobium* de ses nodules de tige. Tout récemment, un autre chercheur du groupe dakarois de l'ORSTOM, D. Alazard⁽⁴⁾, a entrepris l'étude systématique des légumineuses sauvages à nodules caulinaires de l'ouest africain. Ces légumineuses, qui appartiennent au genre *Aeschynomene* (fig. 1),

pourraient à l'instar de *Sesbania rostrata* être utilisées comme engrais vert ou comme fourrage. Devant l'intérêt de cette forme particulière de symbiose que constituent les légumineuses à nodules de tige, d'autres laboratoires, en France, en Belgique, en Allemagne, en Hollande, en Australie, aux Etats-Unis, ont également centré leurs travaux sur les *Rhizobium* des nodules caulinaires. L'un des objectifs de toutes ces recherches est de comprendre la physiologie et la génétique des *Rhizobium*. Un autre objectif est de transférer à d'autres légumineuses — voire à d'autres plantes — la capacité de développer des nodules fixateurs d'azote sur leurs tiges, avec l'espoir d'accroître le rendement de la fixation biologique de l'azote et, par là, la productivité des cultures sans augmenter les quantités d'engrais chimiques nécessaires.

Certaines espèces non légumineuses d'arbres fixateurs d'azote, en particulier les *Casuarina* (fig. 2) présentent un grand intérêt pour la restauration des sols appauvris et érodés. Au Sénégal, par exemple, où cette espèce est bien acclimatée, *Casuarina equisetifolia*, connu sous le nom de filao, semble spécialement approprié à des programmes de reforestation et de régénération du sol. Dans le cas d'un peuplement de 3 000 arbres par hectare, la quantité d'azote fixé par l'association symbiotique *Frankia*-filao est comprise entre 50 et 200 kg/ha et par an. Dans le but d'accroître l'efficacité de cette symbiose et d'augmenter la quantité d'azote fixé par hectare, une autre partie

(1) Biotechnologie et production végétale. Bilan de trois années de recherches effectuées au Sénégal (1979-1982), ORSTOM, Dakar, 1982; Rapport annuel 1983, ORSTOM/CNRS/Université de Dakar.

(2) G. Rinaudo, B. Dreyfus, Y. Dommergues, *Soil Biol. Biochem.*, 15, 111, 1983.

(3) B. Dreyfus, Y. Dommergues, *FEMS Microbial Letters*, 10, 313, 1981.

(4) B. Dreyfus, D. Alazard, E. Duhoux, Y. Dommergues, in *Advances in nitrogen fixation research*, C. Weeger et W. E. Newton (eds), 1984, p. 370.

de notre équipe de recherche a entrepris l'étude méthodique de la fixation de l'azote chez les *Casuarina*^(1,5). Mais avant d'exposer en détail les résultats obtenus dans notre laboratoire et dans d'autres centres de recherche sur *Sesbania rostrata* et les *Casuarina*, rappelons d'abord brièvement quelques données fondamentales sur la fixation biologique de l'azote en général.

Deux types de microorganismes fixateurs d'azote.

Pour commencer, il est inexact, bien que commode, de parler de « plantes fixatrices d'azote ». Les seuls organismes capables de transformer l'azote gazeux de l'air en azote combiné puis, à partir de l'ammoniac ainsi formé, en acides aminés et en protéines, sont des microorganismes procaryotes (bactéries, actinomycètes, algues bleues). Certains d'entre eux peuvent fixer l'azote en vivant librement dans le sol; d'autres, pour le faire, ont besoin de vivre en symbiose avec une plante, autrement dit de céder leurs composés azotés à une plante-hôte, en échange des substances énergétiques que leur procurent celles-ci (voir *la Recherche*, n° 66, p. 335, avril 1976). Les microorganismes libres fixateurs d'azote sont assez nombreux; on en connaît plusieurs dizaines d'espèces. En revanche, les microorganismes fixateurs d'azote qui vivent en symbiose avec des plantes supérieures sont en nombre limité. Il s'agit des cyanobactéries ou algues bleues (dont nous ne parlons pas ici), des *Rhizobium*, bactéries principalement associées aux plantes de la famille des légumineuses et des *Frankia*, actinomycètes associés à des espèces végétales réparties dans plusieurs familles de plantes à fleurs (fig. 3). Bien que le résultat final de la symbiose soit le même, les deux types de microorganismes symbiotiques fixateurs d'azote sont très différents l'un de l'autre. Les *Rhizobium* sont des bactéries unicellulaires typiques, alors que les *Frankia* sont des bactéries filamenteuses croissant radialement comme les microchampignons, d'où le nom d'actinomycètes donné au groupe bactérien auquel ils appartiennent (*actinos*, rayon, et *myces*, champignon). En conséquence, les plantes symbiotiques de ces microorganismes filamenteux sont désignées par le terme général de plantes actinorhiziennes (*actino*, pour actinomycètes et *rhizos*, racine).

La biologie des *Frankia* est moins bien connue que celle des *Rhizobium* car, contrairement à ce qui s'est passé avec les *Rhizobium* qui avaient été isolés et cultivés *in vitro* depuis longtemps (voir *la Recherche*, n° 66, p. 335, avril 1976), ce n'est que récemment que les chercheurs ont réussi la culture *in vitro* de *Frankia*. En 1978, le groupe de J. Torrey⁽⁶⁾, à l'université Harvard aux Etats-Unis, a pu réaliser le premier isolement d'une souche de *Frankia*, provenant d'une plante actinorhizienne pionnière qui colo-

nise les sols dégradés en Amérique du Nord, *Comptonia peregrina*. Le succès de l'équipe de Torrey a été le point de départ de l'isolement de souches de *Frankia* à partir d'autres plantes actinorhiziennes des régions tempérées, notamment de diverses espèces d'aulnes, et a permis la culture *in vitro* de ces souches. Pour les *Casuarina*, qui sont l'objet de nos travaux à Dakar, l'isolement de leur symbiote présentait des difficultés particulières qui n'ont pas pu être surmontées avant 1982. A cette époque, l'un de nous, H. G. Diem⁽⁷⁾ a obtenu la première souche de *Frankia* infective (capable de noduler) et effective (capable de fixer l'azote) à partir d'un nodule de *Casuarina junghuhniana* fraîchement prélevé sur un plant vivant, convoyé jusqu'à Dakar depuis la pépinière des Services forestiers de Thaïlande à Bangkok. Cette souche s'est révélée capable de fixer l'azote aussi bien *in vitro* qu'en association avec la plante-hôte. Depuis 1982, nous avons isolé à partir de nodules de *Casuarina* provenant de diverses régions du monde

(notamment d'Asie), plus d'une dizaine de souches infectives dont l'efficacité est en cours d'étude.

Comment s'établit la symbiose entre la plante et le microorganisme ?

Les différences entre les deux types de bactéries sont manifestes dans la façon dont les *Rhizobium* et les *Frankia* pénètrent dans les cellules racinaires de leur plante-hôte et forment des nodules. Mais il s'agit, dans les deux cas, d'une véritable infection qui se transforme par la suite en association symbiotique, c'est-à-dire en association mutuellement bénéfique. Chez la quasi-totalité des légumineuses étudiées jusqu'à présent, qu'elles soient tempérées (comme le pois, la luzerne, le trèfle) ou tropicales (comme le soja ou l'arachide), la pénétration du *Rhizobium* se produit uniquement au niveau des racines. Chez nombre d'espèces de légumineuses des régions tempérées, l'infection débute lorsque des *Rhizobium* spécifiques, présents dans le sol, entrent dans

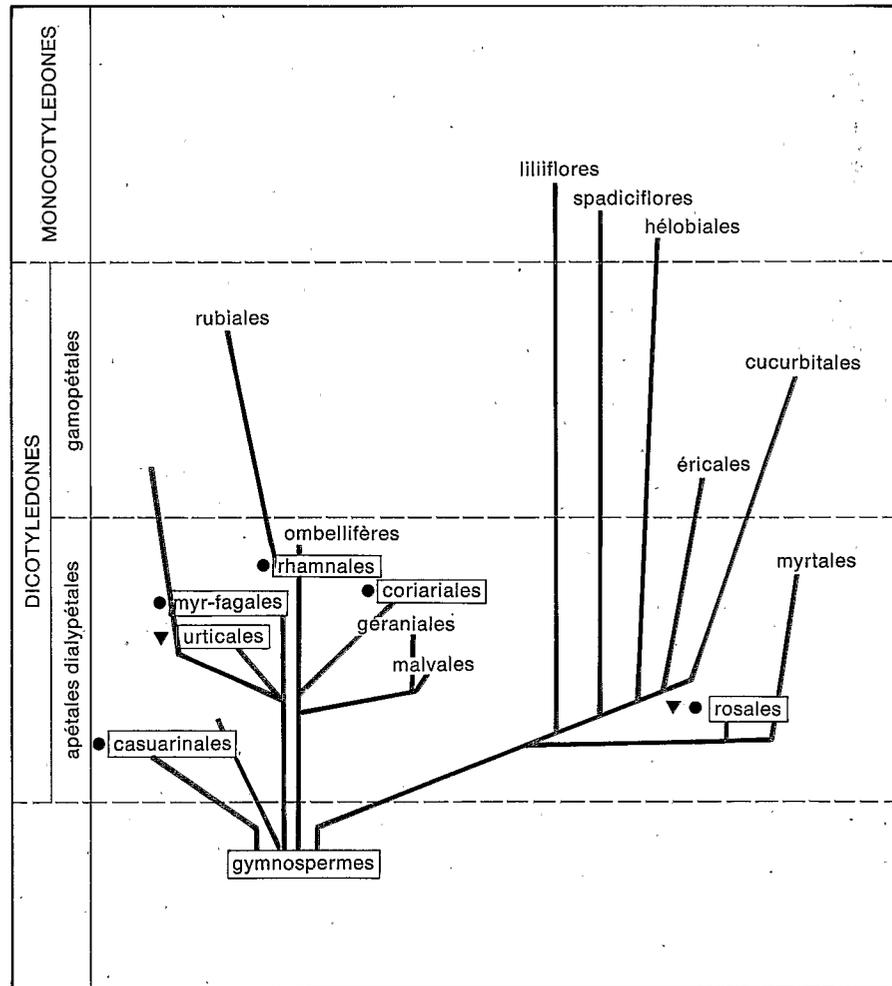


Figure 3. L'étude de l'arbre généalogique des plantes vasculaires (c'est-à-dire où la sève est transportée dans des vaisseaux, au contraire des algues et des mousses par exemple) montre que les plantes susceptibles de fixer l'azote appartiennent toutes aux groupes de plantes à fleurs les plus anciens : les apétales et les dialypétales. Dans les groupes les plus récents, les dicotylédones gamopétales (fleurs aux pétales soudés) et les monocotylédones, aucune plante fixatrice d'azote n'a pu être mise en évidence jusqu'ici. Sur le schéma, les ordres de plantes symbiotiques de *Rhizobium* sont marqués d'un triangle; les ordres de plantes symbiotiques de *Frankia* sont marqués d'un cercle. L'arbre généalogique a été ici simplifié pour mieux mettre en évidence les familles de plantes associées aux *Rhizobium* et aux *Frankia*.

(5) H. G. Diem, Y. Dommergues, *Can. J. Bot.*, 61, 2822, 1983; M. A. Andeke-Lengui, Y. Dommergues, in *Casuarina ecology management and utilization*, J. Midgley et al. (eds), 1983, p. 158.
 (6) D. Callahan, P. Tredici, J. Torrey, *Science*, 199, 877, 1978.
 (7) H. G. Diem, G. Gauthier, Y. Dommergues, C.R. Acad. Sci., 295, 759, 1982.

les racines par l'extrémité des poils absorbants; ceux-ci se recourbent en crosse (fig. 4 A). Il se forme alors dans le poil absorbant un ou parfois plusieurs cordons d'infection, structure tubulaire à l'intérieur de laquelle les cellules de *Rhizobium* se disposent en file. En 48 heures le cordon d'infection a atteint la base du poil absorbant, puis pénètre dans les cellules de l'écorce de la racine, ou cortex. Sous l'influence d'un médiateur chimique encore non déterminé, certaines des cellules de la racine se divisent activement pour former un méristème. Les cellules de *Rhizobium* contenues dans les cordons d'infection sont libérées dans le cytoplasme de ces cellules méristématiques. A ce stade, les bactéries présentent certaines caractéristiques morphologiques et physiologiques différentes de celles que présentent les *Rhizobium* du sol avant leur pénétration dans le poil absorbant. C'est sous cette forme, appelée « bactéroïde » que les *Rhizobium* sont capables de fixer l'azote. Chaque bactérie libérée du cordon infectieux est entourée d'une enveloppe appelée membrane pér bactéroïde. Il peut y avoir dans chaque enveloppe de un à plus de vingt bactéroïdes, selon l'espèce végétale et l'âge du nodule. Chez certaines légumineuses, chaque cellule-hôte du cortex racinaire peut héberger jusqu'à plusieurs milliers de bactéroïdes.

Les cellules infectées se multiplient jusqu'à former, à la surface des racines des excroissances d'une taille variable : de 0,5 à 4 mm. Ce sont les nodules, dont l'aspect est propre à chaque espèce de légumineuse infectée (fig. 5 A). Chez certaines légumineuses tropicales, comme l'arachide, les *Rhizobium* pénètrent directement dans les cellules du cortex racinaire selon un processus encore mal défini; puis l'infection se propage par division des cellules infectées et non par l'intermédiaire d'un cordon d'infection comme dans le cas décrit précédemment.

Pour les nodules de tige de *Sesbania rostrata* (fig. 1), l'infection se produit par une modalité tout à fait différente. Elle démarre toujours au niveau de sites prédéterminés sur les tiges. Ce processus a été décrit par notre équipe, à l'ORSTOM de Dakar, en association avec l'université du Minnesota (Etats-Unis)⁽⁸⁾, ainsi que par Emile Duhoux⁽⁹⁾ de l'université de Dakar. Chaque site de nodulation est constitué par une ébauche racinaire perçant l'épiderme de la tige. L'épiderme se soulève légèrement pour former un petit dôme, appelé mamelon caulinaire (fig. 6). Ces mamelons, dans le cas de *Sesbania rostrata*, sont régulièrement distribués le long des tiges sur trois ou quatre lignes génératrices. Pour *Aeschynomene afraspera* (fig. 1), l'infection débute également au niveau de sites prédéterminés, mais la distribution de ces sites sur la tige est irrégulière. Chez *Sesbania rostrata*, l'infection par le *Rhizobium* débute à l'endroit d'une fissure

circulaire au point d'émergence de l'ébauche racinaire. Les bactéries sont amenées au niveau des mamelons caulinaires par la poussière, les insectes, la pluie ou encore par l'eau recouvrant le sol où poussent ces plantes de terrain humide. Les bactéries qui ont pénétré par la fissure circulaire se multiplient d'abord entre les cellules, pour former des poches d'infection, dites poches intercellulaires. Dans le même temps et à proximité des poches, certaines cellules de la couche interne de l'écorce racinaire se divisent et forment un méristème, induit par un médiateur chimique non déterminé, comme cela se passe dans le cas des racines de légumineuses de pays tempérés. A partir de la paroi des poches intercellulaires remplies de *Rhizobium*, des cordons d'infection se développent et s'allongent; puis ces cordons pénètrent à l'intérieur des cellules dérivées du méristème (fig. 6). Comme pour les autres légumineuses, chaque bactérie, désormais au stade de bactéroïde, est entourée d'une enveloppe, la membrane pér bactéroïde. A ce stade, les cellules envahies par les bactéries sont devenues nombreuses et constituent un tissu central volumineux qui donne au nodule caulinaire une forme globuleuse (fig. 1 et 6). Au bout d'une dizaine de jours, ces excroissances ont atteint 3 à 4 mm de diamètre et fixent activement l'azote.

En ce qui concerne l'infection par les actinomycètes *Frankia* des plantes actinorhiziennes, comme l'aulne ou la filao, seules les étapes initiales rappellent ce qui se passe pour l'infection par le *Rhizobium*. Les *Frankia* induisent également une courbure de l'extrémité des poils absorbants (fig. 4, B) dans laquelle ils pénètrent. Une fois les *Frankia* à l'intérieur du poil absorbant, au lieu d'un cordon d'infection, il se développe des filaments, appelés hyphes infectieux, qui s'allongent et atteignent les cellules de l'écorce racinaire. Les hyphes sont entourés d'une gaine de nature pectique synthétisée par la plante. En dehors de ces hyphes, il existe, en général, dans les cellules infectées par les *Frankia* un autre type de structure, les vésicules, de forme sphérique ou ovoïdes, qui sont le siège de la fixation de l'azote. Dans ce cas comme dans celui des *Rhizobium*, les formes des nodules varient avec la plante-hôte et avec l'âge des nodules (fig. 5 B).

Lorsque les bactéries symbiotiques sont installées dans les cellules des nodules, que se passe-t-il donc à l'intérieur de ces nodules et comment se déroule la transformation de l'azote gazeux atmosphérique en azote combiné NH_3 ? Cette transformation, qui est chimiquement une réduction, est catalysée par une enzyme spécifique, la nitrogénase, comme l'ont montré en 1966 I. R. Kennedy et ses collaborateurs⁽¹⁰⁾. Depuis lors, les chercheurs ont découvert que c'est la même nitrogénase qui opère chez toutes les bactéries fixatrices d'azote, qu'il s'agisse de bactéries vivant libre-

ment dans le sol ou de bactéries symbiotiques comme *Rhizobium* ou *Frankia*.

Depuis les travaux de R. R. Eady⁽¹¹⁾ en 1972, on sait que la nitrogénase n'est pas une enzyme simple mais un complexe enzymatique constitué de deux protéines, notées protéines I et II. La protéine I contient du molybdène et du fer; appelée molybdoferrédoxine, elle est formée de quatre composants identiques. Son rôle est de réduire l'azote N_2 en ammoniac NH_3 . La protéine II, ou molybdoprotéine, ne contient que deux composants. Elle a pour fonction de transférer à la protéine I l'énergie nécessaire à son fonctionnement.

Les connaissances sur l'activité de la nitrogénase ont fait d'énormes progrès depuis une douzaine d'années; en fait, depuis que la nature des gènes codant pour cette enzyme a été déterminée. Les premiers travaux sur les gènes de la nitrogénase, datant de 1972, sont dus à deux chercheurs anglais, R. Dixon et J. Postgate⁽¹²⁾, qui travaillent à l'université du Sussex en Grande-Bretagne. Leur matériel d'étude n'était pas une bactérie symbiotique mais une bactérie libre, *Klebsiella pneumoniae*, facilement cultivable *in vitro*. Ce choix a facilité leurs conditions de travail et leur a permis de découvrir l'ensemble des gènes responsables de la production du complexe nitrogénase. A l'époque, on savait déjà cultiver *in vitro* les *Rhizobium* sur des milieux de culture complexes, contenant de l'azote combiné sous forme organique. En 1975, trois équipes de recherche, travaillant indépendamment les unes des autres en Australie et au Canada, réussissaient à cultiver certaines souches de *Rhizobium* capables de faire la synthèse de la nitrogénase mais toujours incapables d'assimiler l'azote gazeux de l'air. Il n'existait donc encore aucun moyen d'étudier *in vitro* les gènes de la nitrogénase chez cette bactérie symbiotique ni surtout chez ses mutants, puisque toute souche mutante, affectée dans l'un des gènes de la nitrogénase devait être inoculée à une plante-hôte et que les effets de la mutation ne pouvaient être observés qu'au travers des modifications de l'infection et de la fixation de l'azote chez cette plante-hôte. Cet obstacle a été levé en 1983, lorsque B. Dreyfus, C. Elmerich et Y. Dommergues⁽¹³⁾ ont réussi à isoler et à cultiver *in vitro*, sur un milieu complètement dépourvu d'azote combiné sous forme organique, une souche de *Rhizobium* possédant la double propriété de synthétiser la nitrogénase et d'assimiler l'azote gazeux de l'air pour sa propre croissance.

Il ne s'agissait pas de n'importe quel *Rhizobium*! Cette souche, en quelque sorte miraculeuse, baptisée par nous ORS571, provient de nodules de tige de *Sesbania rostrata*. Cette possibilité de culture *in vitro* de *Rhizobium* aux dépens de l'azote gazeux ouvre une nouvelle voie d'approche à l'étude génétique de ces bactéries. Il va être possible de détermi-

- (8) H. C. Tsien, B. Dreyfus, E.L. Schmidt, *J. Bact.*, 156, 888, 1983.
(9) E. Duhoux, *Can. J. Bot.*, 62, 982, 1984.
(10) I. R. Kennedy *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 130, 517, 1966.
(11) R. R. Eady *et al.*, *Biochem. J.*, 128, 655, 1972.
(12) R. Dixon, J. Postgate, *Nature*, 237, 102, 1972.
(13) B. Dreyfus, Cl. Elmerich, Y. Dommergues, *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 711, 1983.

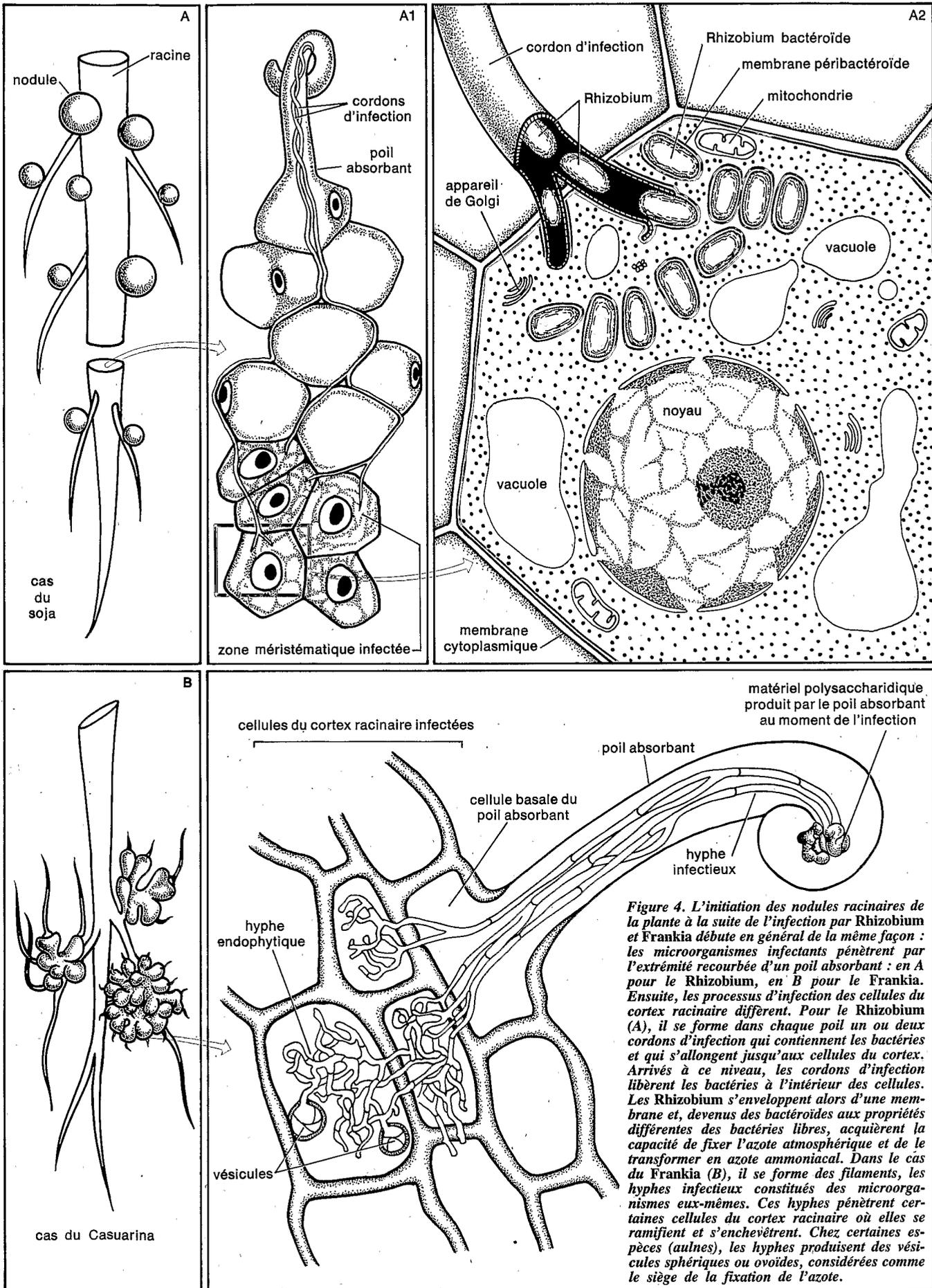
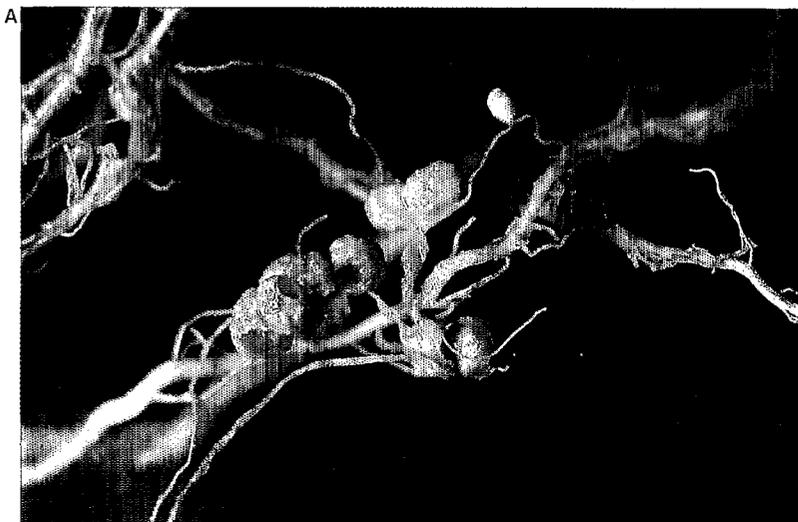


Figure 4. L'initiation des nodules racinaires de la plante à la suite de l'infection par Rhizobium et Frankia débute en général de la même façon : les microorganismes infectants pénètrent par l'extrémité recourbée d'un poil absorbant : en A pour le Rhizobium, en B pour le Frankia. Ensuite, les processus d'infection des cellules du cortex racinaire diffèrent. Pour le Rhizobium (A), il se forme dans chaque poil un ou deux cordons d'infection qui contiennent les bactéries et qui s'allongent jusqu'aux cellules du cortex. Arrivés à ce niveau, les cordons d'infection libèrent les bactéries à l'intérieur des cellules. Les Rhizobium s'enveloppent alors d'une membrane et, devenus des bactéroïdes aux propriétés différentes des bactéries libres, acquièrent la capacité de fixer l'azote atmosphérique et de le transformer en azote ammoniacal. Dans le cas du Frankia (B), il se forme des filaments, les hyphes infectieux constitués des microorganismes eux-mêmes. Ces hyphes pénètrent certaines cellules du cortex racinaire où elles se ramifient et s'enchevêtrent. Chez certaines espèces (aulnes), les hyphes produisent des vésicules sphériques ou ovoïdes, considérées comme le siège de la fixation de l'azote.



ner exactement la localisation des gènes de la nitrogénase, comme cela a été fait pour *Klebsiella pneumoniae* car les mutants, y compris les mutants dépourvus de gènes de la nitrogénase, pourront être observés directement *in vitro*. L'étude des gènes de cette enzyme pour la souche ORS571 a été entreprise par Claudine Elmerich⁽¹⁴⁾ au laboratoire de J.-P. Aubert, à l'Institut Pasteur de Paris.

Où l'oxygène pose un problème.

Si la nitrogénase formée par les bactéries symbiotiques dans les nodules est en train de perdre une partie de son mystère grâce à l'analyse génétique, il reste dans le fonctionnement des nodules un paradoxe dont tous les éléments ne sont pas encore élucidés. Chez les *Rhizobium*, la nitrogénase ne peut fonctionner *in vivo* qu'en présence d'une faible concentration d'oxygène. *In vitro*, elle fonctionne seulement en l'absence totale d'oxygène. Dans les nodules, la pression de l'oxygène est très basse : de l'ordre de 0,005 à 0,01 mm de mercure. Si elle est plus élevée, la nitrogénase est inhibée et le nodule ne fixe pas d'azote. Pourtant le nodule est un gros consommateur d'oxygène. Ce paradoxe est résolu par la présence, dans les nodules, de substances spéciales qui ont un double rôle : elles approvisionnent les bactéries en oxygène et facilitent en même temps la diffusion de l'oxygène sous très faible pression à l'intérieur des nodules. Ce subterfuge permet le déroulement normal des processus métaboliques, sans inactiver la nitrogénase.

Ces substances, qui sont des transporteurs d'oxygène, ont une structure très voisine de celle de l'hémoglobine du sang des vertébrés. D'où leur nom de leghémoglobines (*leg* pour légumineuse). Contenant du fer comme l'hémoglobine, elles confèrent aux nodules leur teinte rosée ou rouge. Les leghémoglobines apparaissent dès les premiers stades de l'infection de la plante par les *Rhizobium*; elles constituent plus de 35 % des protéines solubles contenues dans les nodules. Les spécialistes savent depuis quel-

ques années que, dans les nodules d'une même légumineuse, il peut exister plusieurs formes de leghémoglobines différant légèrement les unes des autres par leur masse moléculaire ou l'ordre de succession de leurs acides aminés. *A fortiori*, les leghémoglobines de deux espèces de légumineuses distinctes présentent elles aussi des différences. Les travaux de W. H. Fuchsman et C. A. Appleby⁽¹⁵⁾ ont montré en 1979 que la leghémoglobine du soja est composée de quatre espèces moléculaires « majeures » et de plusieurs espèces moléculaires « mineures ». Selon K. A. Marcker et son équipe⁽¹⁶⁾, ces dernières pourraient résulter de la modification des espèces « majeures », postérieurement à leur biosynthèse dans le nodule. En ce qui concerne *Sesbania rostrata*, l'un de nos collaborateurs, D. Bogusz⁽¹⁷⁾ a montré en 1983 que les nodules de tige et les nodules de racine n'ont pas le même nombre d'espèces moléculaires de leghémoglobine. Comparativement aux nodules racinaires, les nodules de tige en comportent une de plus, dont l'activité pourrait être liée au fait que ces nodules sont aériens (et non pas souterrains comme ceux des racines) et possèdent donc une activité photosynthétique couplée à leur activité de fixation de l'azote. Les leghémoglobines apparaissent seulement lorsque la symbiose est établie. Les derniers travaux sur cette question ont montré, tout au moins chez le soja, que les leghémoglobines se localisent de la façon suivante dans les cellules infectées : deux tiers dans le cytoplasme, un tiers à l'intérieur des membranes péribactéroïdes⁽¹⁸⁾. Les leghémoglobines font partie d'un ensemble de substances protéiques, représentées exclusivement dans les nodules et qui pour cette raison ont été appelées « nodulines ». P. Legocki et D. P. Verma⁽¹⁹⁾, travaillant à l'université de Mac Gill au Canada, ont prouvé en 1980 que les nodulines sont des protéines synthétisées par la plante-hôte. Ce sont des produits des gènes de la plante et non pas de ceux de la bactérie. Les leghémoglobines représentent un cas par-

ticulier : la partie globine est synthétisée par la plante; la partie hème par le microorganisme symbiotique.

Jusqu'à l'année dernière, les chercheurs qui travaillent sur la nodulation ont cru que seules les légumineuses possédaient la propriété d'initier dans les nodules la production des leghémoglobines. Mais les résultats obtenus en 1983 sur des plantes actinorhiziennes conjointement par C. A. Appleby, M. J. Trinick à Canberra en Australie et J. D. Tjepkema⁽²⁰⁾ à l'université du Maine aux Etats-Unis (voir *la Recherche*, n° 147, p. 1101, septembre 1983) ont mis fin à ce dogme. Ces chercheurs ont montré que chez certaines plantes actinorhiziennes, comme *Casuarina cunninghamiana* par exemple, les nodules formés de cellules infectées de *Frankia* possèdent, eux aussi, des hémoglobines voisines des leghémoglobines des nodules de légumineuses. La structure de ces hémoglobines n'est pas encore bien connue, ni la nature exacte de leur rôle dans les nodules d'actinorhiziens. Mais il est légitime de penser qu'en facilitant le transport de l'oxygène, elles facilitent l'approvisionnement en oxygène des nodules de végétaux, comme l'aulne ou certains *Casuarina*, qui poussent dans des sols très humides. Des mesures de la pression d'oxygène, effectuées en utilisant des microélectrodes, montrent qu'il existe dans les nodules de *Casuarina cunninghamiana* des zones où la pression d'oxygène est très basse.

Des partenaires qui ne se choisissent pas au hasard.

Quelles sont les conditions nécessaires à l'établissement de la symbiose ? Il est bien connu que les deux partenaires des symbioses fixatrices d'azote sont caractérisés par leur spécificité. N'importe quelle souche de *Rhizobium* ne peut pas infecter n'importe quelle légumineuse. Même si l'on parvient à induire cette infection expérimentalement, cela ne signifie pas que les nodules ainsi formés vont être fonctionnels et fixer effectivement l'azote. En fait chaque souche de *Rhizo-*

(14) Cl. Elmerich, B. Dreyfus, G. Reysset, J. P. Aubert, *The EMBO J.*, 1, 499, 1982.

(15) W. H. Fuchsman, C. A. Appleby, *Biochim. Biophys. Acta*, 579, 314, 1979.

(16) K. A. Marcker et al., *in Advances in nitrogen fixation research*, C. Weeger et W. E. Newton (eds.), 1984.

(17) D. Bogusz, communication personnelle.

(18) C. A. Appleby, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35, 443, 1984.

(19) P. Legocki, D. P. Verma, *Cell*, 20, 153, 1980.

(20) C. A. Appleby, M. J. Trinick, J. D. Tjepkema, *Science*, 220, 951, 1983.

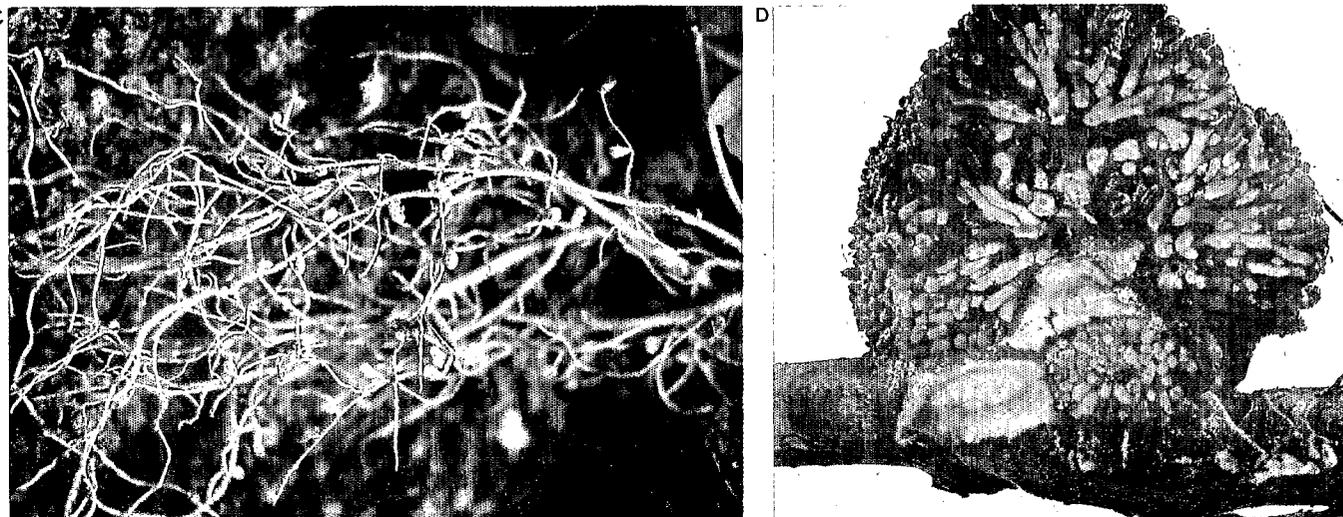


Figure 5. Les nodules fixateurs d'azote sont de formes et de tailles très variées suivant la nature de la plante-hôte et du micro-organisme associé. Ils peuvent être groupés sur la racine principale ou être répartis sur l'ensemble du système racinaire.

Ils peuvent aussi changer d'aspect suivant que la plante est jeune ou âgée, en particulier chez les arbres fixateurs d'azote. Ces différences d'aspect sont bien visibles sur cette série de clichés représentant des nodules à *Rhizobium*, en A chez le haricot, en C chez la luzerne, et des nodules à *Frankia*, en B chez la Casuarina, en D chez l'aulne. Pour Casuarina equisetifolia, chaque nodule donne naissance à une racine nodulaire à géotropisme négatif, c'est-à-dire dirigée vers le haut contrairement aux racines normales.

Lorsque l'arbre devient âgé, les nodules ressemblent à des grappes, qui peuvent avoir de 2 à 4 centimètres de diamètre (cliché B). En D, à droite, le nodule d'aulne a une forme typique en « chou-fleur » ou en « corail ». (Clichés A et C. Noailles et Champroux, agence Jacana; cliché B, Hoang Gia Diem, ORSTOM Dakar; cliché D, Pizelle.)

bium ou de *Frankia* ne peut infecter et noduler qu'un nombre assez limité d'espèces; la spécificité peut même être très étroite. Par exemple, une souche de *Rhizobium* isolée des racines d'une espèce de trèfle forme des nodules avec un certain nombre d'autres espèces du genre trèfle mais jamais avec des pois ou des haricots. Cette spécificité des plantes-hôtes vis-à-vis des bactéries symbiotiques a conduit à définir plusieurs groupes de *Rhizobium*. De même, il existe aussi plusieurs groupes de *Frankia*.

Pour les *Rhizobium*, les chercheurs ont commencé par établir une première distinction entre deux grands types : le type dit à croissance rapide où les cellules à la température de 30 °C se divisent dans un laps de temps assez court (de 2 à 5 heures); le type à croissance lente où les divisions successives sont séparées par 12 à 24 heures. Parallèlement à cette classification, des groupes ont été définis en fonction des plantes infectées. Ainsi, un groupe de *Rhizobium*, *R. japonicum*, à croissance lente est spécifique du soja; un groupe à croissance rapide, *R. trifolii*, est spécifique du trèfle, etc.

Quelles sont les causes de la spécificité de la symbiose ? Des recherches concernant les premiers stades de l'infection ont été menées pour éclaircir ce problème mais seulement, jusqu'à présent, pour la symbiose *Rhizobium*-légumineuse. Selon l'hypothèse de B. Bohlool et E. L. Schmidt⁽²¹⁾, il pourrait y avoir une interaction entre des glycoprotéines sécrétées par les racines des légumineuses et des polysaccharides de la paroi des bactéries. Ces polysaccharides joueraient le rôle de récepteurs vis-à-vis des glycoprotéines. Les *Rhizobium* présents dans le sol pourraient reconnaître ces glycoprotéines, appelées lectines; mais le mécanisme de cette interaction n'est pas encore clairement élucidé. Bien que solidement étayée dans le cas de quelques légumineuses, notamment le trèfle et le soja, la validité de cette hypothèse n'a pu être vérifiée pour toutes les symbioses fixatrices d'azote actuellement connues et étudiées.

Chez les plantes actinorhiziennes, associées symbiotiquement à *Frankia*, le problème de la spécificité semble encore plus complexe que chez les légumineuses, mais nos connaissances dans ce domaine sont encore très limitées. On sait simplement que certaines souches de *Frankia* présentent un spectre large, c'est-à-dire peuvent noduler plusieurs espèces différentes, ou même plusieurs genres différents. Mais il existe aussi des cas de spécificité extrêmement étroite. C'est ainsi que la plupart des souches de *Frankia* isolées de *Casuarina* nodulent seulement des espèces appartenant au genre *Casuarina*.

La souche spécifique et effective — autrement dit formant des nodules fixateurs d'azote — n'existe pas toujours dans le sol. C'est le cas en Europe pour le *Rhizobium* spécifique du soja, plante d'origine tropicale, ou en Afrique de l'Ouest pour le *Frankia* spécifique des *Casuarina*, plantes originaires de l'Australie et de l'Asie du Sud-Est. Pour obtenir qu'une espèce nouvellement introduite dans une région donnée fixe l'azote comme dans sa région d'origine, il est alors absolument nécessaire d'apporter dans le sol la souche symbiotique spécifique par une opération appelée « inoculation ». Celle-ci consiste à contaminer le sol ou les graines ou encore les jeunes plants avec une culture de la souche spécifique. Dans ces conditions, les résultats de l'inoculation sur le rendement des cultures ou des plantations sont en général spectaculaires.

Mais l'inoculation avec une souche spécifique est sans effet si le sol renferme déjà des souches natives, spécifiques et également effectives. Cette situation se rencontre dans nombre de sols français, aussi bien pour les souches de *Rhizobium* spécifiques du pois ou du trèfle que pour les souches de *Frankia* spécifiques de l'aulne. Dans tous les sols où existent les souches natives spécifiques et effectives, il serait vain d'espérer accroître le rendement de la fixation biologique de l'azote tant que l'on ne saura pas fabriquer, par des méthodes de génie génétique, de

nouvelles souches de bactéries qui seraient plus efficaces que les souches natives et seraient capables de se substituer à ces souches.

Dans les cas où le sol est dépourvu des souches spécifiques des plantes à cultiver, au lieu de procéder à l'inoculation avec la souche spécifique, on peut adopter une autre approche, tout à fait différente. Cela consiste à sélectionner les plantes-hôtes de façon à réduire leur spécificité symbiotique et à leur permettre de s'associer à des souches natives préexistant dans le sol. C'est ainsi qu'à l'Institut international d'agriculture tropicale (IITA) à Ibadan au Nigéria⁽²²⁾, de nouvelles variétés de soja ont été créées. Elles sont capables de noduler non seulement avec le *Rhizobium* spécifique du soja, *R. japonicum*, mais avec des souches tropicales banales, présentes dans les sols africains et qui ne nodulent pas les variétés de soja introduites en Afrique. L'utilisation des nouvelles variétés obtenues par l'IITA rend ainsi caduc le recours obligatoire à l'inoculation du soja avec le *Rhizobium* spécifique.

On pourrait penser qu'une fois la

(21) B. Bohlool, E. L. Schmidt, *Science*, 185, 263, 1974.

(22) IITA, *Annual Report for 1978*, Ibadan (Nigeria), 1979, p. 39.

symbiose établie et, si cela est nécessaire grâce à l'inoculation, une connaissance plus approfondie du fonctionnement de la nitrogénase et des leghémoglobines — c'est-à-dire des mécanismes qui sont à la base de la fixation biologique de l'azote — permettrait d'envisager sans problème un meilleur fonctionnement de la symbiose. Et, donc, une meilleure productivité des plantes symbiotiques. Mais, dans la pratique agronomique ou forestière, les choses ne sont jamais aussi simples. Dans la prévision des rendements, il faut tenir compte d'une multitude de facteurs, en particulier tous les facteurs limitants. Dans le cas d'une association plante-microorganismes, aux facteurs propres à la symbiose s'ajoutent ceux qui conditionnent de façon générale la productivité agricole : température, pluviosité, nature du sol, parasites, etc.

En effet, l'absence dans le sol de souches spécifiques n'est pas le seul facteur restreignant le taux de fixation de l'azote. C'est l'intervention de facteurs de l'environnement qui explique bien souvent la variabilité considérable observée au champ dans la quantité d'azote fixé par une plante donnée. Ainsi, pour le soja, on relève des chiffres s'échelonnant entre quelque 10 kg et 200-250 kg d'azote fixé, par hectare et par cycle cultural. Il est même des situations où certaines légumineuses ne fixent pas d'azote du tout; c'est assez souvent le cas de l'arachide dans certains sols du Sénégal.

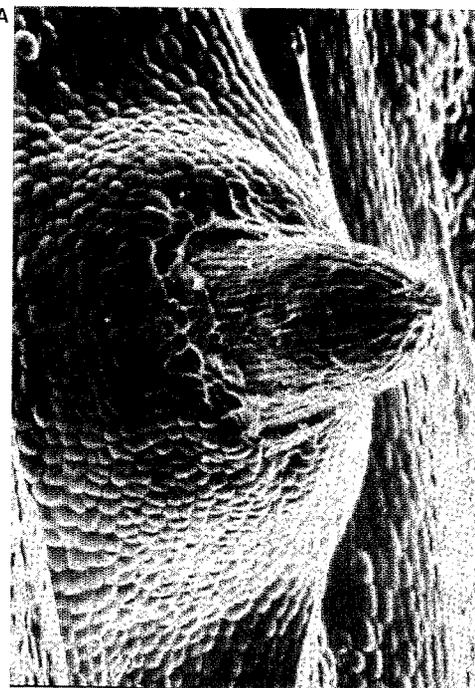
L'identification de ces facteurs de l'environnement, l'élimination de leur impact constituent deux objectifs majeurs du biologiste du sol et de l'agronome. On peut classer les facteurs limitants en trois catégories : facteurs tenant au sol ou édaphiques (humidité ou sécheresse excessives, excès d'azote combiné minéral) (ammoniac, nitrate); facteurs climatiques (températures excessives; intensité lumineuse insuffisante); facteurs biotiques (parasites des racines; nématodes; antagonistes). L'un des facteurs limitants les plus importants est la présence dans le sol d'azote combiné minéral. L'effet inhibiteur de cet azote combiné sur l'efficacité de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse est connu depuis longtemps. L'intolérance à l'azote combiné minéral est le talon d'Achille des légumineuses. Cet effet négatif peut intervenir à trois stades : infection, croissance du nodule, fixation de l'azote. Le blocage du processus d'infection a été attribué à diverses causes, dont l'inhibition de la synthèse des lectines par la plante-hôte, ce qui entraînerait le blocage du processus de reconnaissance mutuelle (voir plus haut). D'autres raisons du blocage sont l'arrêt de la courbure du poil absorbant ou de la formation du cordon d'infection. Quant à la réduction de la fixation de l'azote, elle a été attribuée à une inhibition de l'activité nitrogénase dans le nodule, notamment à la suite de la production de nitrite⁽²³⁾. Mais il existe d'autres causes possibles : diminution de la teneur du

Figure 6. Chez la légumineuse tropicale *Sesbania rostrata*, l'infection par la bactérie *Rhizobium* au niveau des tiges n'est pas conforme au scénario décrit à la figure 4. Cette infection se produit sur des sites prédéterminés (A), les mamelons caulinaires (du latin : *caulis*, tige). Ces sites sont des ébauches racinaires qui percent l'épiderme de la tige et peuvent, dans certaines conditions, devenir de véritables racines adventives. Les *Rhizobium* amenés jusqu'au niveau de ces mamelons caulinaires par la pluie ou la poussière pénètrent dans la fissure circulaire au point d'émergence des ébauches racinaires et cheminent jusqu'aux cellules d'un tissu spécial : le méristème nodulaire qu'elles envahissent presque totalement. Le mamelon caulinaire se dilate et prend une forme globulaire (C). Au bout d'une dizaine de jours, les nodules de tiges atteignent 3 à 4 mm de diamètre. A ce stade, ils fixent activement l'azote gazeux de l'air. (Cliché E. Duhoux; schémas d'après E. Duhoux.)

nodule en leghémoglobine⁽²⁴⁾, sénescence précoce du nodule, diminution de l'approvisionnement des nodules en produits de la photosynthèse (photosynthétats), principalement des sucres. Ces photosynthétats, au lieu d'être acheminés vers les nodules seraient détournés vers l'assimilation par la plante de l'azote combiné minéral du sol. L'un des intérêts majeurs de la légumineuse tropicale *Sesbania rostrata*, à nombreux nodules de tige, est qu'elle possède une tolérance remarquable à l'azote combiné minéral présent dans le sol, sous forme d'engrais par exemple⁽¹⁾. Cette espèce est en effet capable d'assimiler simultanément l'azote sous forme d'ammoniac et de nitrate et de fixer activement l'azote gazeux de l'air. Cette particularité lui ouvre de grandes possibilités d'applications agronomiques.

Un autre facteur peut intervenir dans la baisse de productivité. Dans nombre de sols tropicaux, les nématodes parasites des racines constituent un facteur limitant important de la production agricole, y compris pour la culture du riz. Au début de cet article, nous avons mentionné le fait que l'emploi de *Sesbania rostrata* comme engrais vert pouvait accroître considérablement le rendement en riz, en enrichissant le sol en azote. Des travaux ultérieurs ont montré que, par un processus encore mal expliqué, l'enfouissement de cet engrais vert dans le sol pouvait en outre éliminer une grande partie de la population de nématodes parasites des racines du riz. Ce fait a pu faire croire à certains que *Sesbania rostrata* n'agissait pas en apportant de l'azote aux cultures mais seulement en éliminant les nématodes (voir la Recherche, n° 141, p. 225, février 1983). En fait, les deux mécanismes, fixation d'azote et élimination des nématodes pathogènes, peuvent coexister et contribuer efficacement à l'amélioration de la fertilité des sols de rizière.

Sesbania rostrata est particulièrement intéressant pour bonifier les sols pauvres de certaines rizières mais il existe d'autres plantes tropicales fixatrices d'azote, le plus souvent arborescentes, qui peuvent avoir des effets bénéfiques sur les rendements agricoles ou sur la préservation des



écosystèmes. On commence depuis quelques années à se rendre compte des possibilités remarquables que présentent les légumineuses arbustives et arborescentes en agronomie, foresterie, agroforesterie dans les régions tropicales humides. Le *Leucaena*, arbre légumineux au rythme de croissance très rapide, connaît depuis une dizaine d'années un grand succès, à la fois pour la production de fourrage et pour la régénération des sols dans les régions tropicales humides. C'est le premier exemple d'utilisation systématique d'une légumineuse forestière. Les *Acacia* suscitent eux aussi un intérêt croissant dans les régions méditerranéennes ou semi-arides fournissant à la fois le bois et le fourrage. De nombreuses autres espèces d'arbres légumineux commencent à être étudiées. On peut, dès maintenant, prévoir que certaines d'entre elles connaîtront le succès actuellement réservé au *Leucaena*⁽²⁵⁾.

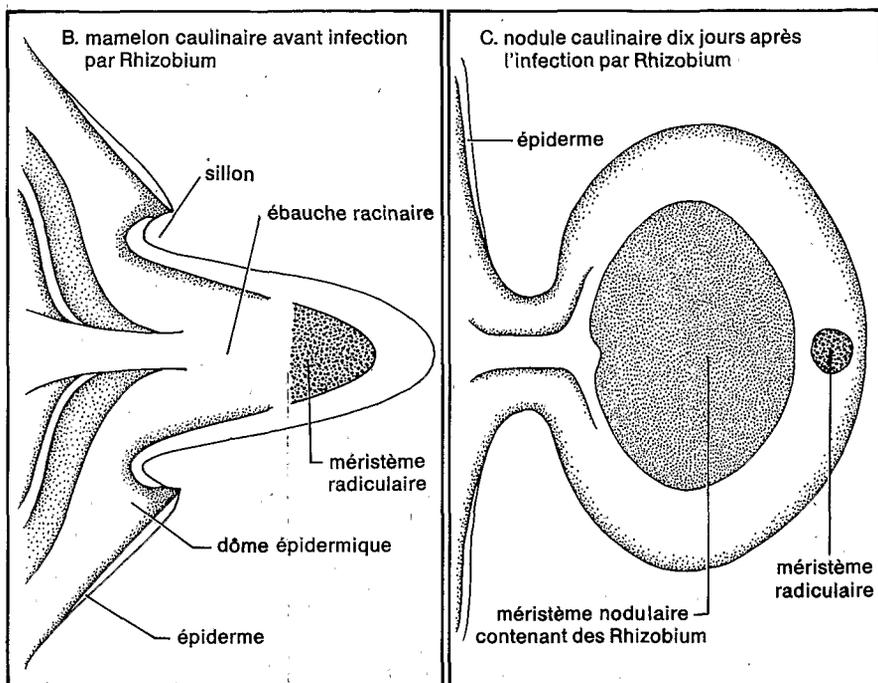
Des perspectives prometteuses.

Comme les légumineuses arborescentes, les plantes actinorhiziennes arbustives et arborescentes pourraient avoir de multiples usages en agronomie et en foresterie tropicales. Elles pourraient être cultivées en peuplements purs ou en mélange avec des arbres non fixateurs d'azote; dans ce cas elles contribueraient à la nutrition azotée de ces derniers. Des espèces buissonnantes comme *Colletia* en Amérique du Sud pourraient être utilisées en sous-bois pour enrichir le sol des forêts en azote et favoriser la croissance des arbres associés non fixateurs d'azote. Pour les espèces arborescentes, les *Casuarina*, en particulier *C. equisetifolia*, sont effectivement utilisés d'ores et déjà dans de nombreux pays tropicaux comme brise-vent, pour fixer les dunes vives et pour protéger les cultures contre

(23) J.-C. Trinchant, J. Rigaud, *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 1385, 1982.

(24) J. Rigaud, A. Puppo, *Biochim. Biophys. Acta*, 497, 702, 1977.

(25) National Academy of Sciences, *Tropical legumes*, Washington D.C., 1979.



l'envahissement par le sable. Le long de la côte de la Chine méridionale, on a planté depuis 1954 plus d'un million d'hectares de *Casuarina* pour former une ceinture protectrice de 3 000 km de long et de 500 m à 5 km de large. Des reboisements effectués sur une moindre échelle au Sénégal ont permis de fixer définitivement les dunes côtières. C'est également aux *Casuarina* qu'on a fait appel pour protéger la ville de Mexico contre les vents chargés de poussières provenant du lac Texcoco.

Faut-il se contenter d'optimiser la fixation biologique de l'azote en éliminant l'impact des facteurs limitants ou bien est-il possible d'obtenir des systèmes fixateurs à potentiel plus élevé que l'association naturelle, « sauvage », de la bactérie avec sa plante hôte ? Pour améliorer le rendement de la fixation de l'azote, on peut agir soit sur l'un soit sur l'autre des deux partenaires de la symbiose. L'un des moyens d'y arriver, connu depuis longtemps, est de sélectionner des souches de *Rhizobium*; un autre moyen est d'utiliser les techniques du génie génétique, ce qui devrait permettre de construire des souches plus performantes, qu'il s'agisse de souches de *Rhizobium* ou de *Frankia*.

En ce qui concerne les plantes-hôtes, les chercheurs commencent seulement à mettre à profit leur variabilité génétique pour la fixation de l'azote en vue d'obtenir des systèmes symbiotiques à haut potentiel fixateur. Le groupe de J. Picard à l'INRA de Dijon a effectué depuis quelques années des recherches ayant pour objet l'amélioration génétique des pois à forte teneur en protéines (dits protéagineux) en ce qui concerne leur aptitude à fixer l'azote. L'existence, prouvée par les travaux de S. L. A. Hobbs et J. D. Mabon⁽²⁶⁾ en 1982, d'une variabilité génétique chez le pois pour les caractères de fixation de l'azote devrait

permettre de lancer un programme de sélection pour ce caractère. Cette approche n'a pas encore été utilisée à grande échelle dans le cas des arbres fixateurs d'azote (*Leucaena*, *Acacia*, *Prosopis*), mais les progrès dans les techniques de multiplication végétative permettent de prévoir la production dans un proche avenir de clones d'espèces ligneuses à pouvoir fixateur d'azote élevé.

On peut très bien concevoir dès maintenant l'obtention de légumineuses « tous terrains » capables de fixer activement l'azote indépendamment des facteurs liés aux caractéristiques physiques et chimiques des sols. Ces facteurs, bien souvent, font qu'une légumineuse se comporte en fait comme une simple céréale et puise dans le sol l'azote sous forme combinée au lieu d'utiliser l'azote atmosphérique; c'est ce qui se passe assez souvent pour l'arachide. Des légumineuses « tous terrains » pourraient, par exemple, être obtenues en transférant à d'autres légumineuses l'aptitude à la nodulation caulinaire qui caractérise seulement quelques espèces de légumineuses, dont *Sesbania rostrata*. L'intérêt d'une telle opération serait de doter les nouvelles légumineuses ainsi obtenues d'une grande indépendance vis-à-vis des facteurs liés au sol qui limitent la nodulation et la fixation d'azote puisque les nodules de tige sont beaucoup moins sensibles à la présence d'azote combiné dans le sol que les nodules des racines et que les légumineuses naturellement pourvues de nodules de tige peuvent croître dans des sols gorgés d'eau. Un tel transfert de l'aptitude à la nodulation caulinaire d'une plante à une autre pourrait être réalisé grâce aux méthodes les plus récentes de culture de tissus. Ces méthodes sont de deux sortes : la fécondation et le développement d'embryons *in vitro* à partir de deux plantes mères appartenant à des

espèces ou à des genres différents; fusion de protoplastes (cellules végétales dépouillées de leur enveloppe cellulosique) provenant d'espèces différentes, suivie de la régénération de nouvelles plantes (pour ces techniques, voir la Recherche, n° 155, p. 764, mai 1984).

En utilisant de telles méthodes, on pourrait également concevoir la création de nouvelles plantes actinorhiziennes qui deviendraient donc capables de noduler avec *Frankia*. Le fait qu'il existe déjà des plantes actinorhiziennes dans des familles végétales très éloignées les unes des autres, incite à penser que les possibilités d'association des végétaux avec *Frankia* sont plus fréquentes que leurs possibilités d'association avec *Rhizobium*. Si les chercheurs parvenaient à transmettre l'aptitude à la nodulation actinorhizienne à des plantes non fixatrices d'azote, les nouvelles plantes obtenues pourraient être utilisées pour la production de biomasse dans les sols les plus désahérés, où toute autre tentative de mise en valeur est vouée à l'échec.

On assiste actuellement à un développement inattendu des recherches sur des symbioses tropicales fixatrices d'azote atmosphérique, qui jusqu'à présent avaient été ignorées pour différentes raisons. Bien que nous n'ayons obtenu qu'une première moisson de résultats, en particulier sur *Sesbania rostrata* et sur *Casuarina*, ces résultats sont déjà prometteurs pour la recherche fondamentale comme pour la recherche appliquée. La conjugaison des efforts des biologistes moléculaires, des physiologistes et des écologistes devrait, dans un proche avenir, ouvrir la voie à des découvertes susceptibles de donner un nouvel essor à l'agriculture et à la foresterie tropicales. ■

Pour en savoir plus

Trois ouvrages de base sur les différentes symbioses fixatrices d'azote :

- A. Quispel (ed.), *The biology of nitrogen fixation*, North-Holland, 1974.
- R. W. F. Hardy and W. S. Silver (eds), *A treatise on dinitrogen fixation*, sect. III, *Biology*, John Wiley, 1979.
- R. W. F. Hardy and A. H. Gibson, *A treatise on dinitrogen fixation*, sect. IV, *Agronomy and ecology*, John Wiley, 1977.

Un ouvrage récent sur la fixation d'azote chez les légumineuses :

- J. M. Vincent (ed.), *Nitrogen fixation in legumes*, Academic Press, 1982.

Une mise au point claire en langue française :

- R. Blondeau, *Fixation biologique de l'azote atmosphérique*, Vuibert, 1980.

Deux notes de synthèse :

- J. Dénarié et G. Truchet, « La symbiose *Rhizobium*-légumineuses : rôles respectifs des partenaires », *Physiol. veg.*, 17, 643, 1979.
- J. H. Becking, « N₂-fixing tropical non-legumes », in *Microbiology of tropical soils and plant productivity*, Y. R. Dommergues and H. G. Diem (eds), Martinus Nijhoff, 1982, p. 109.
- Pour une bibliographie plus complète voir page 104.

(26) S.L.A. Hobbs et al., *Crop Sci.*, 22, 773, 1982.

Page 5

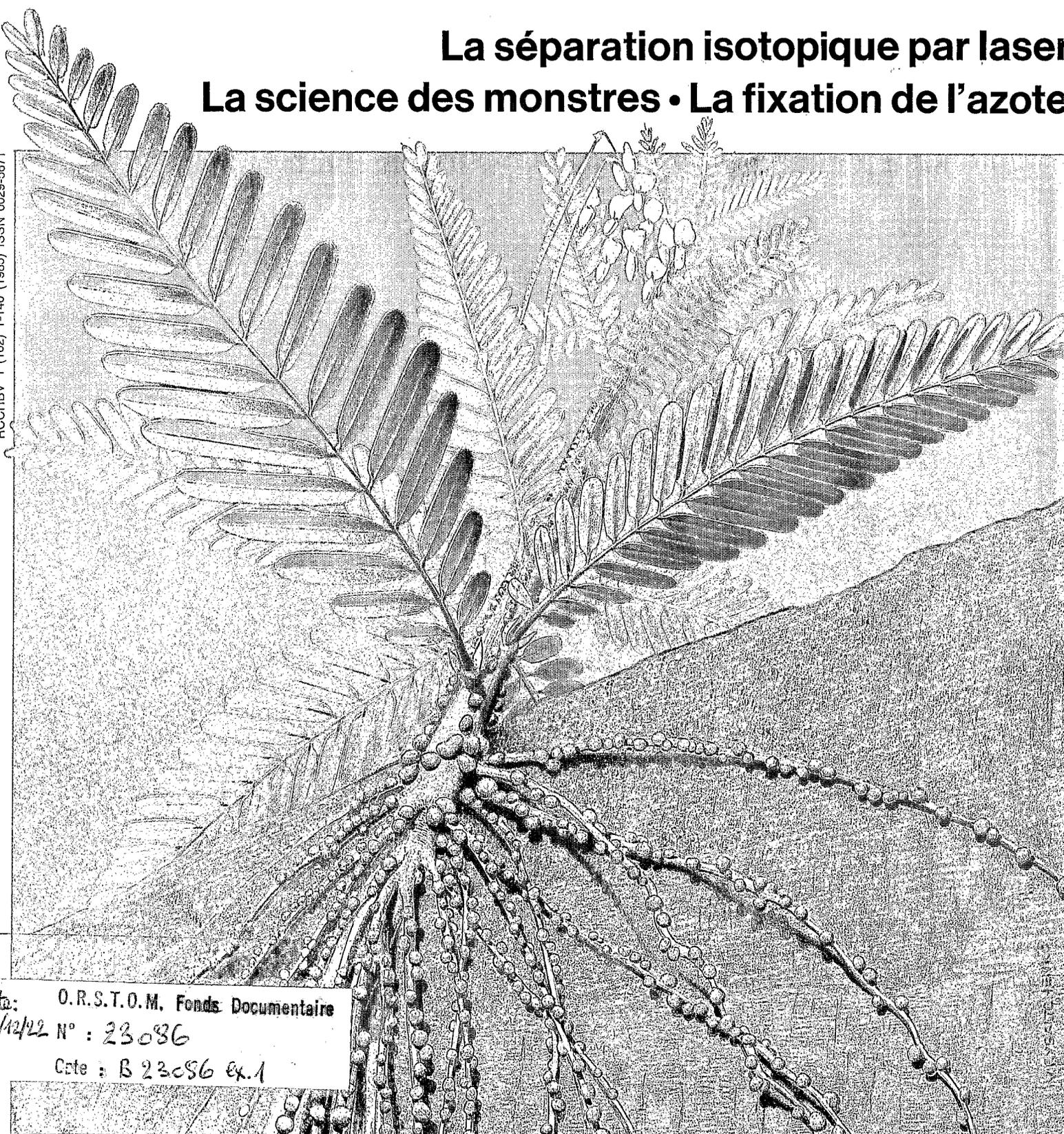
LA RECHERCHE

DOSSIER:
LES ARMES
CHIMIQUES

M 1108 - 162 - 24 F

mensuel n° 162 janvier 1985 - 24 francs

La séparation isotopique par laser La science des monstres • La fixation de l'azote



RCCHBV 1 (162) 1-140 (1985) ISSN 0029-5671

date: O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire
6/12/82 N° : 23086
Cote : B 23086 ex.1

BELGIQUE : 185 FB CANADA : 3,95 \$ ESPAGNE : 500 PTAS SUISSE : 9,50 FS ITALIE : 6000 LIRE

30 M