

La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes

La symbiose racinaire fixatrice d'azote entre l'actinobactérie *Frankia* Oet un groupe de plantes appelées actinorhiziennes est un facteur structurant pour les écosystèmes terrestres. On commence à comprendre comment la bactérie dialogue avec la plante, ce qui se fait sans les gènes *nod* connus chez *Rhizobium*.

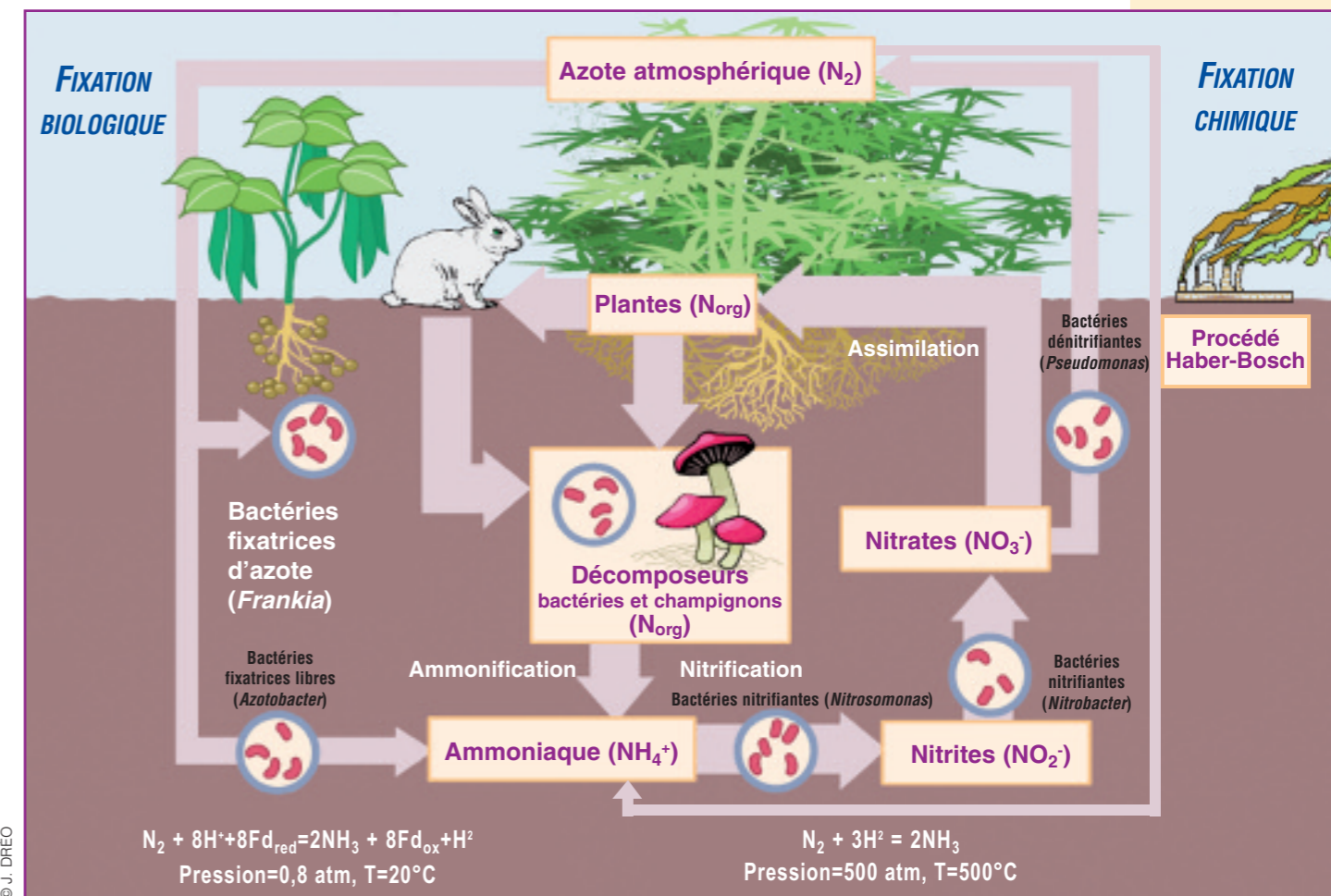
Unité Écologie microbienne,
UMR CNRS 5557
Université Lyon 1
69622 Villeurbanne.
petar.pujic@univ-lyon1.fr
philippe.normand@pop.
univ-lyon1.fr

Petar Pujic et Philippe Normand

Les plantes ont besoin pour croître d'éléments minéraux qu'elles trouvent essentiellement dans le sol – ou plutôt les sols, car ceux-ci varient selon la roche mère, le climat et l'histoire botanique. Certains sols sont riches en éléments nutritifs adsorbés sur les argiles ou la matière organique. De nombreuses plantes y poussent et la compétition est intense. D'autres sols, les sols sableux par exemple, sont au contraire pauvres et contiennent ou retiennent peu d'éléments nutritifs. Parmi les éléments nutritifs nécessaires, celui qui est le plus souvent limitant pour la croissance des plantes est l'azote. Ce nom est paradoxal, d'ailleurs : il vient du préfixe « a- » privatif et du radical grec « ζωοτ » (zoot) vivant – alors que l'azote est nécessaire à la vie. Un autre paradoxe réside dans le fait que l'air que nous respirons en contient 80 %, mais sous une forme inaccessible aux animaux et aux plantes, le diazote (N₂). L'azote exploitable existe sous différentes formes dans les sols (ammonium, nitrite, nitrate ou encore des formes organiques). Le cycle de l'azote (figure 1) est donc central pour le fonctionnement des écosystèmes. Il comporte notamment des minéralisateurs, surtout des champignons, qui dégradent les plantes et les animaux morts. Il comprend aussi des nitrifiants et des dénitrifiants transformant l'azote en formes volatiles qui passent dans l'atmosphère.

Le cycle met également en jeu des fixateurs d'azote, tous procaryotes, qui peuvent transformer le diazote

inorganique de l'atmosphère en acides aminés assimilables. La fixation biologique de l'azote consiste à réduire le diazote, une transformation biochimique très coûteuse énergétiquement car ce dernier est très stable. La réduction de chaque molécule de N₂ demande 12 molécules d'ATP, outre le pouvoir réducteur mobilisé, et l'énergie nécessaire à la fixation biologique prend souvent sa source dans la photosynthèse. Il y a donc peu de fixation biologique non couplée à la photosynthèse et les fixateurs les plus efficaces sont ceux qui ont établi une relation stable avec des plantes, une symbiose. Il en existe plusieurs types, comme celle qui associe la bactérie *Rhizobium* et les légumineuses, ou entre les cyanobactéries et certaines fougères. Nous envisagerons ici celle qui associe l'actinobactérie *Frankia* à des plantes appartenant à huit familles botaniques appelées « actinorhiziennes ». Ces plantes sont très fréquentes en sols pauvres : promenez-vous dans une forêt après une coupe à blanc, à la marge d'un glacier en cours de retrait, dans un brûlis, dans un champ de lave après une éruption volcanique, dans une gravière ou un éboulis en montagne et vous trouverez des aulnes, des myriques, des driades, des chalefs, autant de plantes actinorhiziennes. Sur l'île Anak Krakatau (« l'enfant de Krakatoa »), issue de l'éruption du Krakatoa en 1883 qui en stérilisa le sable, les botanistes qui visitèrent cette région en 1895 découvrirent des filaos, arbres également actinorhiziens. Les plantes actinorhiziennes sont donc



© J. DRÉO

Figure 1 Cycle de l'azote simplifié pour les écosystèmes terrestres (d'après http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d3/Cycle_azote_fr.svg)

pionnières sur des sols où le stock d'azote n'existe pas encore et sont capables d'initier des successions écologiques menant à des communautés plus diversifiées (1).

Applications

La fixation biologique de l'azote est une propriété de très nombreux taxons microbiens (table 1), qui sont répartis dans plusieurs lignées évolutives. On les trouve dans différents biotopes. La plupart sont des fixateurs libres mais ils sont très peu efficaces car il y a peu de sources d'énergie disponibles dans le sol. Ces bactéries ne contribuent donc que marginalement au flux d'azote dans l'écosystème. Les fixateurs symbiotiques sont, eux, capables de fixer jusqu'à 300 kg d'azote par hectare, dans le cas de l'aulne rouge ou du filao par exemple (2). En comparaison, l'ajout de 300 kg de fertilisant coûterait 250 €, avec un bilan écologique plus lourd : la synthèse de nitrate d'ammonium par le procédé industriel de Haber-Bosch consomme de 1 à 5 % du gaz naturel produit globalement et produit du CO₂ (figure 2).

Des espèces d'aulne étaient déjà plantées par les Romains ou les Incas pour fixer les sols et en accroître la fertilité. Actuellement, l'aulne est utilisé à grande

échelle pour obtenir rapidement un couvert végétal, par exemple dans le nord du Québec pour stabiliser les digues des barrages hydro-électriques ou encore pour recouvrir les substrats obtenus suite à l'extraction des sables bitumineux en Alberta. Le filao, lui, est utilisé comme brise-vent en Asie tropicale, en Inde et en Afrique. Une barrière verte de 500 km de long et de 500 m de large a ainsi été plantée il y a 20 ans au Sénégal, de Saint-Louis à Dakar, pour protéger les cultures vivrières du sable entraîné par le vent marin. En Egypte, des filaos sont plantés le long des routes et autour des champs pour protéger les cultures – tout

Table 1 Liste des principaux taxons microbiens fixateurs d'azote et leur biotope

Genre	Phylum	Biotope
<i>Trichodesmium</i>	Cyanobacteria	mer
<i>Anabaena</i>	Cyanobacteria	mer
<i>Nostoc</i>	Cyanobacteria	mer et sol
<i>Azospirillum</i>	Alphaproteobacteria	rhizosphère
<i>Rhizobium</i>	Alphaproteobacteria	nodule racinaire et sol
<i>Burkholderia</i>	Betaproteobacteria	sol et nodule racinaire
<i>Pseudomonas</i>	Gammaproteobacteria	rhizosphère
<i>Desulfobacter</i>	Deltaproteobacteria	sédiment
<i>Chlorobium</i>	Chlorobi	mer
<i>Clostridium</i>	Firmicutes	sédiment
<i>Frankia</i>	Actinobacteria	nodule racinaire et sol
<i>Methanobacter</i>	Methanobacteria	marais, lisier
<i>Bacillus</i>	Firmicutes	sol

(1) Benson DR, Silvester WB (1993) *Microbiol Rev* 57, 293-319.
(2) Dixon ROD, Wheeler CT (1986) *Nitrogen Fixation in Plants*. Glasgow : Blackie & Son Ltd

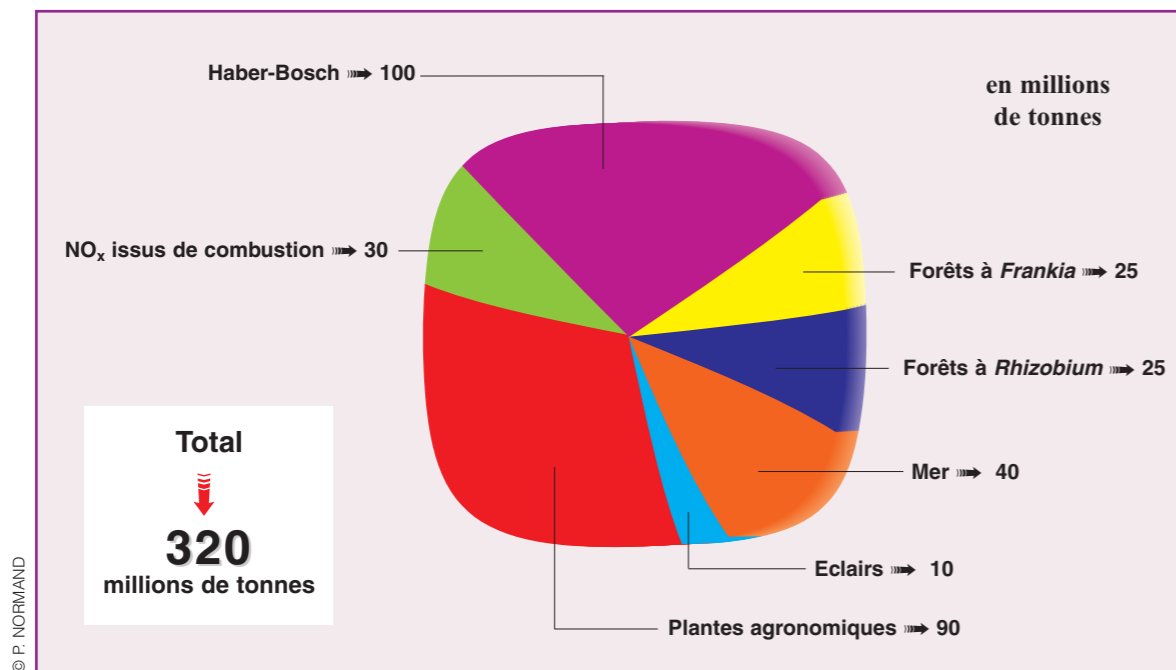


Figure 2 Fixation globale d'azote

La fixation industrielle est estimée d'après www.cci-promotor.de/archiv/amm_papr.htm, la fixation par les différents écosystèmes d'après www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/microbes/nitrogen.htm et la synthèse de NO_x (oxydes d'azote) issus de la combustion de fossiles d'après www.eoearth.org/article/Global_material_cycles. La synthèse issue d'éclairs est estimée d'après www.isws.illinois.edu/nitro/ntrans.asp. La proportion de l'azote fixé biologiquement dans les écosystèmes forestiers par *Rhizobium* et *Frankia* est mal documentée, elle est ici estimée à parts égales sur la base de taux de fixation comparables à l'hectare et de la prédominance des plantes actinorhiziennes dans les écosystèmes tempérés et des légumineuses dans les écosystèmes tropicaux. L'ensemble de ces approximations attribue à *Frankia* 8 % de l'azote entrant dans l'écosystème global et 14 % de l'azote fixé biologiquement.

en donnant du bois pour la cuisson des aliments. En Chine du Sud et en Inde, près de 2 millions d'hectares de filao ont été plantés comme brise-vent et comme source de bois (3). Des argousiers (*Hippophae*) sont plantés en Chine du Nord et en Europe sur les plages et les dunes pour en stabiliser le sable – ils donnent un fruit savoureux et riche en vitamines A et C, utilisé pour confectionner des sirops et des confitures. Toutes ces applications sont basées sur l'utilisation de souches sauvages de *Frankia* et de plantes peu sélectionnées. Il est cependant envisageable d'entreprendre des programmes de sélection conjointe des deux partenaires, notamment en vue de plantation en sites particuliers, par exemple pour une résistance aux métaux lourds sur les sols pollués de sites miniers ou une résistance à la dessiccation. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la symbiose permet d'espérer le transfert de cette capacité à d'autres plantes économiquement importantes ou l'utilisation des substances produites par *Frankia* comme produits phytosanitaires, à l'image de ce qui a été fait avec *Rhizobium* (4).

Etude fondamentale

Les souches de *Frankia* sont divisées en neuf génoespèces*1 et en quatre clades sur la base d'une analyse du gène marqueur le plus utilisé en taxonomie bactérienne, le gène de l'ARN ribosomal 16S (5). Ces souches peuvent aussi être classées selon leur spectre d'hôte. Cependant, aucune n'a encore pu être transformée génétiquement, ce qui aurait permis une approche de génétique inverse classique pour identi-

fier les déterminants impliqués dans la symbiose. Néanmoins, certaines similarités biochimiques avec *Rhizobium* ont été constatées, en particulier dans les propriétés chimiques d'un composé présent dans le surnageant de culture de *Frankia* : ce composé est thermostable, de petite taille (PM < 2 kDa), sensible à certaines enzymes (chitinase) et contenant du N-acétyl-D-glucosamine (6,7) comme le facteur Nod de *Rhizobium*, qui est un oligomère substitué qui cause une déformation des poils racinaires préluant à l'infection (figure 3). C'est pour identifier les gènes potentiellement liés à la symbiose qu'une approche génomique a été entreprise.

Trois souches appartenant à trois génoespèces et ayant des spectres d'hôtes différents ont été sélectionnées en vue du séquençage de leur génome complet. Deux de ces génomes ont été séquencés par le département de l'Énergie aux États-Unis (DOE) et le dernier l'a été par le Genoscope en France (8). La première surprise a été la différence de taille marquée entre les trois : le plus gros atteint 9,0 Mb, avec près de 9 000 gènes, tandis que le plus petit a un génome de 5,3 Mb, avec près de 5 300 gènes. Deuxième surprise : ces trois génomes ont subi de très nombreux remaniements, avec des duplications de gènes, des délétions et des acquisitions, ne laissant comme cœur de génome (« core genome » commun aux trois souches) qu'environ 3 000 gènes, dans lesquels on s'attend à retrouver les gènes impliqués dans la symbiose (qui seront identifiés quand on aura élaboré une technique de transformation génétique de *Frankia* ou qu'une approche « gain de fonction » aura été mise au point avec de l'ADN de *Frankia* dans une autre actinobactérie proche). La troisième surprise a été que les gènes liés à la symbiose comme *nif* (codant

la nitrogénase, l'enzyme qui réduit le diazote), *shc* (codant la squalène-hopane cyclase, qui forme les lipides polycycliques, ou hopanoïdes, isolant la nitrogénase de l'oxygène qui l'inactive) et *hup* (codant l'hydrogénase uptake qui recycle l'hydrogène, sous-produit de la nitrogénase) ne sont pas liés en un « îlot symbiotique ». Enfin il n'a pas été rencontré d'amas de gènes *nod* « canonique » qui, chez *Rhizobium* servent à synthétiser le facteur Nod, la molécule signal chito-oligosaccharidique déclenchant le programme de mise en place de la symbiose chez la légumineuse hôte.

Une autre molécule signal de *Frankia* est le phénylacétate (PAA) (figure 3), un acide aromatique retrouvé dans le surnageant des cellules bactériennes (9) et lié par un pont ester aux hopanoïdes, les lipides qui assurent une barrière à la diffusion de l'oxygène entre les compartiments intra- et extracellulaire (10). Le PAA est un analogue d'auxine, hormone végétale qui induit la synthèse de racines secondaires adventives. Ces racines sont par la suite colonisées par la bactérie et ont une croissance très ralentie, avec de fréquentes dichotomies (figure 4). L'application de PAA à 10⁻⁴-10⁻⁵ M sur des racines induit ainsi à lui seul la mise en place des racines adventives à croissance inhibée qui ont une morphologie très proche de celle des nodules. De nombreux gènes sont probablement impliqués dans le métabolisme du PAA, en particulier une phénylacétate thio-estérase située à côté du gène *shc* mentionné plus haut.

Les bactéries peuvent également s'attacher à leur hôte par l'intermédiaire de protéines ayant une forte affinité pour des constituants cellulaires, notamment pariétaux. C'est le cas des lectines, petites protéines pouvant adhérer à des sucres à la surface des cellules. Nous avons constaté que plusieurs gènes codant des lectines étaient présents dans le génome d'une des trois souches mais absents des deux autres génomes. La surexpression de cette protéine dans le colibacille avec une protéine rapporteur a permis de constater que la protéine obtenue s'attache aux poils racinaires de l'aulne, ainsi d'ailleurs qu'à *Frankia*, et qu'elle augmente le nombre de nodules produits. Il semblerait donc qu'en plus des gènes communs à l'ensemble des *Frankia*, des déterminants particuliers à chacune des souches existent.

Perspectives

De nombreux autres génomes sont en cours de séquençage. Ils devraient être bientôt publiés et ainsi permettre de mieux caractériser le cœur de génome. En particulier, une souche infectieuse sur les *Dryas*, *Coriaria* et *Datisca* a résisté à toutes les tentatives de mise en culture hors de la plante. Elle possède sans doute un

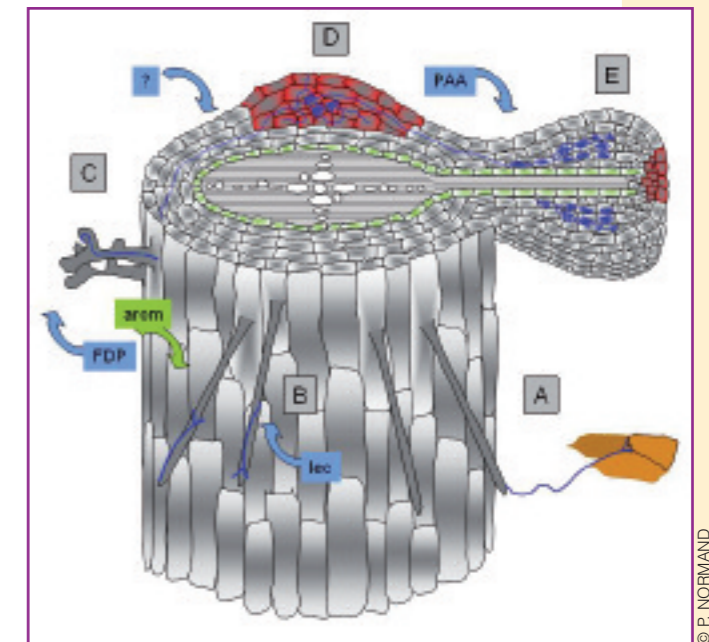


Figure 3 Étapes de l'infection de l'aulne par *Frankia*

(A) *Frankia* colonise le sol (brun) et produit des lectines (lec) et un facteur thermostable (B) de faible poids moléculaire (<2 kDa) qui cause une déformation des poils racinaires (fdp). *Frankia* infecte ces poils déformés (C) et pénètre jusqu'au cortex (rouge) où il induit, par un facteur inconnu, des prénodules (D). Les prénodules sont des gonflements de la racine principale, colorés en rouge par la synthèse d'anthocyanes. *Frankia* synthétise ensuite du phénylacétate (PAA), une auxine qui favorise l'émergence à partir du péri-cycle (en vert) de racines adventives dont le cortex hypertrophié est colonisé par *Frankia* (E), formant des nodules.

génomme restreint, selon la tendance évolutive identifiée chez les bactéries à vie strictement intracellulaire. Par ailleurs, le génome de leurs voisins phylogénétiques, *Acidothermus* des sources hydrothermales*2 (11) et *Geodermatophilus* des sols irradiés et pierres des monuments calcaires (en cours de séquençage par le DOE et le Genoscope), devraient permettre de mieux comprendre l'origine évolutive des *Frankia*, en lien avec les pressions sélectives subies par ces micro-organismes dans leurs différents biotopes.

L'expression des gènes devrait pouvoir être suivie dans la symbiose et dans différentes situations physiologiques pour identifier les gènes sur ou sous exprimés. Il est en effet courant que les gènes liés à une fonction soient exprimés différemment. Certains de ces gènes devraient également pouvoir être clonés dans un hôte hétérologue, comme l'actinobactérie *Streptomyces*, afin de pouvoir analyser leur fonction et les composés impliqués dans le dialogue moléculaire avec la plante.

L'analyse des gènes de plantes liés à la symbiose a été entreprise de différentes manières. Une première approche a été l'identification chez *Casuarina* d'un des gènes participant à la transmission du signal symbiotique (12), montrant ainsi que la cascade de signalisation pour *Rhizobium* et conservée pour d'autres symbiotes comme *Frankia*. Une deuxième approche a été le séquençage des gènes exprimés chez *Casuarina* et *Alnus* et leur suivi au cours de la mise en place de la symbiose*3. Ce travail devrait être publié bientôt et permettra de savoir si les autres acteurs de la cascade de signalisation sont présents et actifs dans la symbiose actinorhizienne. ●

(9) Hammad Y et al. (2003) *Plant Soil* 254, 193-205
 (10) Berry A et al. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 6091-4
 (11) Barabote RD et al. (2009) *Genome Res*, sous presse
 (12) Gherbi H et al. (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 4928-32

*2 [genome.jgi-psf.org/fini- shed_microbes/acice/acice.info.html](http://genome.jgi-psf.org/finished_microbes/acice/acice.info.html)

*3 www.genoscope.cns.fr/spip/Casuarina-glaucal-Alnus-glutinosa.html

Figure 4 Racine d'aulne traitée au PAA (5.10-5 M) après 20 jours. On observe (en rouge) les pseudo-nodules.

(3) Booth T (1996) *Focus* 11, 32-4
 (4) Prithiviraj B (2003) *Planta* 216, 437-45
 (5) Normand P et al. (1996) *Int J Syst Bacteriol* 46, 1-9
 (6) Ceremonie H (1998) *Interactions moléculaires et génétiques de la symbiose Frankia-aulne*. In: Lyon: Lyon1, p. 159
 (7) Ceremonie H et al. (1999) *Can J Bot* 77, 1293-301
 (8) Normand P et al. (2007) *Genome Research* 17, 7-15

*1 Groupes de souches ayant une grande proximité dans leur génome mais sans caractère phénotypique emblématique