

LES NODOSITES ET LES PROPRIETES EMERGENTES DE LA SYMBIOSE

Auteur : Marc-André Sélosse (Professeur, MNHN)

Introduction

Cet étal témoigne de la présence de plantes que l'on appelle les **légumineuses**. Ici des haricots verts, des petits pois, des lentilles, des pois-chiches, des haricots secs. Ces légumineuses sont ce qu'on appelle ordinairement des **protéagineux**, c'est-à-dire des plantes dont les graines sont riches en protéines.

Cette richesse en protéine a été utilisée par l'Homme à peu près partout où il a domestiqué des plantes. Il y a toujours eu une complémentarité, dans toutes les civilisations qui ont adopté l'agriculture, entre des céréales (de l'amidon, donc des sucres) et des légumineuses (sources de protéines). Par exemple, en Amérique c'est le maïs et le haricot ; en Orient c'est le riz et le soja ; et dans l'agriculture du Moyen-Orient, qui a été l'agriculture médiévale européenne, on a les pois-chiches et les fèves à côté de l'orge et du blé.

Ainsi, ces plantes, ces légumineuses, sont importantes dans l'alimentation humaine. La question est de savoir : pourquoi sont-elles riches en protéines ? Nous allons découvrir que cela est dû à la présence de bactéries et que le métabolisme qui met en place les acides aminés permettant de faire ces protéines est une **émergence** dans l'**interaction symbiotique** entre les partenaires.

I/ Récolte

Dès la fin du XIXème siècle, les chercheurs avaient également cherché à comprendre une autre particularité des légumineuses, qui est d'être des **engrais verts**, une particularité connue dès l'Antiquité, qui veut qu'elles enrichissent le sol. A la fin du XIXème siècle, on avait compris qu'elles amenaient de l'**azote** au sol, là encore parce qu'elles étaient capables de fabriquer des acides aminés, qui ensuite étaient éventuellement libérés dans le sol et formaient un engrais azoté pour les autres plantes. A la fin du XIXème siècle, dans les années 1880, des agronomes allemands et français comprennent que ceci est dû à la présence de **nodosités** sur les racines.

Aujourd'hui pour voir ces nodosités, nous devons chercher des plantes comme des **vesces** ou des **gesses**, qui bien plus que les trèfles et les luzernes ont de très grosses nodosités. Nous devons les chercher dans un endroit plutôt pauvre, un sol pas trop riche, car sinon l'interaction se fait mal car la plante trouve l'azote toute seule dans le sol.

On peut trouver des vesces un peu partout, nous en avons une ici qui rampe sur la végétation et nous allons suivre sa souche jusqu'au sol. Pour prélever les nodosités nous devons acter deux choses :

- dans le sol il y a une stabilité mécanique qui fait que les organes sont souvent assez peu fermement connectés entre eux, donc il faudra être délicat ;
- la deuxième est que le sol est humide, et donc les structures que nous allons retirer du sol doivent être protégées de la dessiccation d'emblée.

Pour ceci, on prépare un sac en plastique et on prend toute la motte du sol à la base de la plante. On voit déjà apparaître les racines colonisées formant des renflements plus ou moins déformés et rosés qu'on appelle les nodosités. Maintenant, nous allons passer au laboratoire pour observer ces nodosités.

II/ Morphologie et anatomie

Le choix de nodosités de vesce ou de gesse permet d'avoir de très grosses nodosités : on voit très bien qu'elles sont fixées ici sur la racine, dont elles sont un diverticule, avec des **zones claires** qui sont en division (il y a là des méristèmes qui engendrent la nodosité) et des **zones rougeâtres** qui sont colorées par une protéine sur le rôle de laquelle nous reviendrons, **l'hémoglobine**.

Sur cette coupe qui est très facile à réaliser étant donné la taille de l'organe, on visualise très bien :

- d'abord les tissus protecteurs : le cortex qui entoure toute la nodosité ;
- d'autre part, au bout, des cellules blanches : ce sont des cellules méristématiques qui engendrent par leur division la nodosité ;
- puis une **zone rose**, c'est là que sont situées, d'une part la protéine qui donne cette couleur rose : l'hémoglobine de légumineuse ou **Leg-hémoglobine** ; et puis des bactéries que l'on appelle **Rhizobium**, qui **synthétisent des acides aminés** en permettant la fixation de l'azote atmosphérique sous forme de NH₃, puis son assimilation sous forme d'acides aminés ;
- il y a une zone verdâtre de cellules sénescents. Ces cellules sénescents voient l'altération de l'hémoglobine et relâchent le fer, qui est ferreux donc de couleur verdâtre, mais qui apparaît en rouge lorsqu'il est lié à l'hémoglobine ;
- enfin, dans la partie qui flanque intérieurement le cortex, se trouvent des vaisseaux conducteurs qui desservent la nodosité.

Ainsi la nodosité a une structure très particulière : il y a une zone de cellules sénescents à sa base, les faisceaux vasculaires sont périphériques alors que dans une racine ils sont normalement au milieu. En d'autres termes la nodosité est un organe complètement original formé dans l'association, qui n'est pas l'équivalent d'une racine. C'est une première modification des partenaires, nous allons en voir une seconde en réalisant un frottis pour visualiser les bactéries présentes ici (dans la zone rosée).

III/ Observations des bactéroïdes

Pour faire un frottis, il faut écraser avec le dos de l'ongle jusqu'à extraire le jus des nodosités. Puis on retire les éléments solides et on laisse sécher le jus obtenu. Lorsque la lame est sèche, l'étape suivante consiste à mettre de l'alcool absolu sur la lame de façon à fixer les échantillons. Quand la lame est sèche, les débris fixés sont assez bien attachés pour procéder à la coloration au bleu de méthylène. On étale le bleu de méthylène sur la lame ; on laisse agir quelques instants, puis on rince à l'eau distillée pour éviter une coloration trop excessive.

On peut maintenant observer ce frottis à l'objectif x40. On voit très bien d'une part, des **grains d'amidon** qui nous rappellent que beaucoup de photosynthétats arrivent dans la nodosité : ils sont blancs et ronds. On voit, parfois ramifiés ou en Y, des **bâtonnets** qui sont en fait des **bactéries**. Ces bactéries sont très grosses ; elles ont une forme modifiée : c'est l'intérêt d'avoir pris des vesces et des gesses, c'est qu'ici la forme de la bactérie est modifiée et plus visible. Au passage, ces Rhizobium dans leur forme modifiée par la symbiose s'appellent des **bactéroïdes** pour marquer cette modification.

Ces bactéroïdes sont ici très visibles, et ils nous récapitulent une **déformation réciproque des deux partenaires** par la symbiose, puisque la forme de la nodosité et du bactéroïde sont spécifiques. Dans ce cas, la raison pour laquelle les bactéroïdes sont très gros est qu'ils ne se divisent plus. On sait que les vesces et les gesses émettent des petits peptides qui rentrent dans les bactéries et bloquent leur machine de division, provoquant leur hypertrophie et les modifications qui les affectent.

Maintenant se pose le problème du fonctionnement de cette association entre bactéroïdes et cellules de nodosité qui les contiennent.

IV/ Fonctionnement

Maintenant que nous avons vu la présence de ces micro-organismes (*Rhizobium*) au cœur des cellules de nodosité, comment marche l'association ?

D'un point de vue formel, la plante exploite le CO₂ de l'atmosphère pour produire des **photosynthétats** qui vont nourrir les bactéries qui sont au cœur de ses cellules. D'un autre côté, les bactéries exploitent l'**azote atmosphérique**, le transforment en acides aminés dont une partie sert à nourrir la plante. Formellement, les partenaires associent leurs propriétés. Mais quand on regarde de plus près, la fixation de l'azote ne se réalise pas aussi simplement.

Les molécules de l'alimentation des deux partenaires arrivent par le phloème, et servent à produire des corps en C₄ qui vont nourrir les bactéries. Celles-ci sont entourées par la membrane pér bactéroïde, une membrane de séquestration mise en place lorsqu'elles sont rentrées dans les cellules.

Ces corps en C₄ servent au catabolisme et notamment à produire des électrons qui passent dans une chaîne respiratoire qui est exactement la même que celle de la mitochondrie, et qui se trouve dans la membrane de la bactérie intra-cellulaire. Cette chaîne respiratoire va permettre de fabriquer de l'ATP. Elle produit finalement de l'eau en utilisant le dioxygène atmosphérique comme accepteur final d'électrons.

Le métabolisme coûteux de fixation de l'azote est entretenu par respiration et nécessite donc le dioxygène. Il permet d'alimenter la nitrogénase l'enzyme qui transforme l'azote atmosphérique en ammonium, qui sert à réaliser des acides aminés pour la bactérie et pour l'hôte. Mais, cette nitrogénase ne supporte absolument pas le dioxygène, en sorte qu'il faut à la fois du dioxygène pour la respiration, mais pas de dioxygène pour la fixation de l'azote. Comment ce paradoxe est-il résolu ? L'hémoglobine dont nous avons parlé précédemment, qui représente 15 à 25% des protéines nodulaires, se trouve située entre la membrane de séquestration et la membrane de la bactérie. Elle séquestre le dioxygène de telle sorte qu'il ne peut pas entrer dans la cellule mais reste disponible pour la chaîne respiratoire. Ainsi, le dioxygène lié peut-il être relargué pour les besoins de la respiration (qui donne de l'eau), mais il ne rentre plus et ne peut pas oxyder la nitrogénase.

En d'autres termes, grâce à cette hémoglobine on a créé un micro-environnement qui permet à la nitrogénase de fonctionner et à la respiration de se faire, donc qui permet une fixation de l'azote qui ne serait pas possible lorsque le *Rhizobium* est seul. C'est une **propriété émergente de l'association**. Cette propriété apparaît lorsque les *Rhizobium* sont dans la plante, et cette fixation est produite à la fois par cette perfusion de photosynthétats qui arrivent aux *Rhizobium* (c'est quand même 15% des photosynthétats de la plante qui finissent dans les nodosités) et par le micro-environnement créé par l'hémoglobine.

Un dernier problème est de savoir, quand on voit les coûts pour les partenaires (les pertes d'azote pour la bactérie et le coût photosynthétique pour la plante), ce qui stabilise cette interaction qui est coûteuse pour les partenaires ?

Notons au passage que le coût en photosynthétats pour la plante explique pourquoi toutes les plantes n'ont pas de nodosités. Clairement, ces nodosités permettent de s'alimenter en azote mais à un coût extrêmement élevé en carbone, ce qui fait que la stratégie qui consiste à avoir moins d'azote mais donner moins de carbone à cette association est également sélectionnée. En quelque sorte, il y a un polymorphisme qui existe ici parce que ne pas fixer l'azote, c'est économiser le carbone.

V/ Stabilité du mutualisme

Mais revenons à notre problème. On a effectivement une situation dans laquelle :

- la plante pourrait économiser des sucres en n'en donnant pas aux bactéries
- la bactérie pourrait économiser de l'azote en n'en donnant pas à la plante

Disons d'emblée que la plante n'a pas le choix : si elle « veut » que la bactérie à l'intérieur de ses cellules fonctionne, il faut absolument que la plante lui fournisse des sucres. Mais la bactérie pourrait très bien

garder l'azote pour elle. Comment l'interaction dans ces conditions est-elle contrainte du point de vue du fonctionnement de la bactérie ?

La réponse provient d'expériences qui ont consisté à empêcher certaines bactéries de fixer l'azote et donc à les empêcher d'en donner à la plante. Sur ce système racinaire, on voit très bien que certaines nodosités sont en présence d'une atmosphère normale, tandis que d'autres sont dans de petites capsules où l'air a été modifié : on a remplacé l'azote par de l'argon. Ainsi ces nodosités, bien qu'habitées par les mêmes bactéries que les nodosités qui sont à l'extérieur, ne peuvent pas fixer l'azote, elles ne peuvent donc pas en donner à la plante. On a donc des nodosités où la bactérie ne coopère pas avec la plante et d'autres où elle coopère avec la plante.

On s'aperçoit au bout d'un certain temps que le nombre de bactéries, en millions par nodosité, est beaucoup moins grand dans les nodosités sans azote que dans les nodosités en présence d'azote. En d'autres termes, quand la plante ne reçoit pas d'azote fixé, quand elle alimente des nodosités non fonctionnelles, elle sanctionne les bactéries en empêchant leur développement, et ceci va limiter le développement et le succès évolutif des bactéries qui ne coopèrent pas.

Il y a donc un **dispositif de sanction** qui permet du côté de la plante de stabiliser l'interaction. Mais si les plantes sont capables d'une réponse physiologique de sanction, c'est sans doute qu'elles ont été confrontées dans leur histoire évolutive à des bactéries qui rentraient dans les nodosités sans fixer l'azote. Ainsi la sanction a sans doute évolué sous l'effet de la présence de bactéries « indésirables » tandis que d'un autre côté, la sanction sélectionne des bactéries et nourrit plus les bactéries qui coopèrent. On est ici sur un processus de **coévolution**, où les partenaires sélectionnent réciproquement des caractéristiques qui vont stabiliser chez l'un et chez l'autre le mutualisme.

Conclusion

Nous terminons cette séquence à côté de lupins qui nous rappellent la production de graines protéagineuses, et de genêts d'Espagne (*Spartium junceum*), qui nous rappelle l'utilisation de ces plantes comme fixateur d'azote pour enrichir les sols.

Ce que nous avons montré, c'est que cette propriété d'engrais vert ou de plante protéagineuse, cette **richesse en azote de ces végétaux repose en fait sur une symbiose et sur la présence de bactéries**, les *Rhizobium*, qui fixent l'azote atmosphérique au fond des cellules. Mais cette fixation n'est possible

- qu'au fond des cellules,
- avec l'aide de la **leg-hémoglobine** de la plante qui régule l'apport de dioxygène
- et l'apport de photosynthétats de la plante.

En d'autres termes, cette fixation d'azote, cette propriété d'engrais vert ou cette richesse en azote de l'alimentation, sont des **propriétés émergentes de l'association**.