HAL
open science

Caractérisation des bactériophytochromes identifiés chez Rhodopseudomas palustris et Bradyrhizobium

Laurie Vuillet

To cite this version:

Laurie Vuillet. Caractérisation des bactériophytochromes identifiés chez Rhodopseudomas palustris et Bradyrhizobium. Biochimie [q-bio.BM]. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2007. Français. NNT : . tel-00258550

HAL Id: tel-00258550

https://theses.hal.science/tel-00258550

Submitted on 22 Feb 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Biologie Intégrative des Plantes
Ecole Doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosciences et Environnement

présentée et soutenue publiquement le 03 décembre 2007

Par

Laurie VUILLET

Titre :

Caractérisation des bactériophytochromes identifiés chez *Rhodopseudomonas palustris* et *Bradyrhizobium*.

JURY

M. Bruno TOURAINE	**Professeur UM2**	**Président**
M. Eric GIRAUD	**Directeur de recherche IRD**	**Directeur de Thèse**
Mme. Chantal ASTIER	**Professeur Paris XI**	**Rapporteur**
M. Francis-André WOLLMAN	**Directeur de recherche CNRS**	**Rapporteur**
Mme. Sylvie ELSEN	**Chargé de recherche CNRS**	**Examinateur**
M. André VERMEGLIO	**Directeur de recherche CEA**	**Examinateur**

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Biologie Intégrative des Plantes
Ecole Doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosciences et Environnement

présentée et soutenue publiquement le 03 décembre 2007

Par

Laurie VUILLET

Titre :

Caractérisation des bactériophytochromes identifiés chez *Rhodopseudomonas palustris* et *Bradyrhizobium*.

JURY

M. Bruno TOURAINE	**Professeur UM2**	**Président**
M. Eric GIRAUD	**Directeur de recherche IRD**	**Directeur de Thèse**
Mme. Chantal ASTIER	**Professeur Paris XI**	**Rapporteur**
M. Francis-André WOLLMAN	**Directeur de recherche CNRS**	**Rapporteur**
Mme. Sylvie ELSEN	**Chargé de recherche CNRS**	**Examinateur**
M. André VERMEGLIO	**Directeur de recherche CEA**	**Examinateur**

Mille mercis

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui ont bien voulu évaluer ce travail de thèse.
Je remercie également Bernard Dreyfus qui m'a accueilli dans le laboratoire des symbioses tropicales et méditerranéennes qu'il dirige.

Un grand merci à Eric, mon directeur de thèse, qui a eut la lourde tâche de m'encadrer durant ces 3 ans mais également durant mon stage de DEA. Je tiens à lui exprimer dans ces quelques lignes toute ma gratitude et ma reconnaissance pour sa gentillesse, sa patience et pour la qualité exceptionnelle de son encadrement. J'ai eu énormément de chance, merci Eric.

Un petit mot pour Laure, Joël et Nath qui m'ont tout de suite accueillie dans le labo, merci pour votre gentillesse, et pour toute l'aide que vous m'avez apportée.

Je remercie également toute l'équipe du LBC et tout particulièrement André, David et Mila pour leurs conseils et leur aide précieuse ainsi que Soufiane Ouchane et Sylvie Elsen qui ont bien voulu être présents et me conseiller lors de mes différents comités de thèse.

Un petit mot pour Adeline, ma copine de « roumégage », merci pour ton soutien inconditionnel dans les bons comme dans les mauvais moments, merci pour ta bonne humeur communicative et pour toutes nos discussions qui m'auront fait mourir de rire pendant 3 ans. Bon courage pour la dernière ligne droite et promis je serais là le jour J.

Aux filles du bureau du fond, merci de m'avoir accueilli dans votre bureau pour la dernière année. Certains discutent au coin du feu, nous discutions autour d'une plante ce fut dans tous les cas beaucoup d'éclats …de rire évidemment. Je me souviendrai de Cécile et de ses figures (les camemberts surtout), de Céline, de son bonnet multicolore (très pratique quand on n'y voit rien) et de sa chaise multidirectionnelle, de MM qui s'énerve derrière son ordi (reste zen… c'est juste le début), d'Adeline et de sa main verte (les plantes du bureau te doivent beaucoup), d'Angèle et de son beau bébé et d'Eddy (seul garçon du bureau) toujours heureux.

Aux filles du bureau du milieu, Lucie, Fatou et Katia, merci pour vos conseils et vos encouragements. Bonne continuation à vous trois et bon courage.

Une place spéciale pour Lionel : pour tout plein de choses y compris pour son humour et ses blagues du vendredi soir qui commencent parfois dès le lundi matin!!! merci à toi yoyo heureusement que je pourrai continuer à t'embêter sur MSN….

Une pensée pour toutes les personnes qui forment également ce labo : Clémence (et sa gentillesse et qui veut que je fasse des enfants), Gilles et Yves (les deux chanteurs du labo), Odile qui vient parfois me tenir compagnie dans la salle radioc, Fafa (merci pour le fameux mail), Agnieszka, Nico, Jean-Claude, Lucette, Karine, Philippe, Antoine(s), Joseph, Pierre(s) Gisèle, Marc(s), Christine, Brigitte, Naïma, Bruno, Guilhem et Fabrice. Merci à vous tous pour vos sourires et vos encouragements.

Un petit mot également pour toutes les personnes qui forment l'équipe de direction de l'UM2 et plus particulièrement Jean-Louis, Danièle, Monique et Jacques. Vous m'avez beaucoup appris, et ça a été un réel plaisir de travailler avec vous et d'avoir la possibilité de découvrir « l'envers du décor » merci à chacun d'entre vous.

Je remercie tout spécialement Réjane et nos débriefings du dimanche soir, Johan, Vanessa, Rénald, Eric, Steph, Pao, Katia, Guillaume et Mike qui ont été là toutes ces années, Xavier et Marianne qui ont partagé cette expédition.

Et Sébastien bien sûr, qui a toujours été là quand j'ai eu besoin de lui, qui m'a soutenue, encouragée, consolée et réconfortée quand j'en avais besoin, merci mon cœur.

Enfin, ces remerciements ne seraient pas complets si je ne terminais pas par ceux avec qui tout à commencer. Papa, maman et Thalie, cette fois-ci c'est fini, je n'irai plus à l'école, tant pis s'il me pousse des « oreilles d'âne ». Merci infiniment pour tout ce que vous avez fait tout au long de ces années, c'est grâce à vous si je suis arrivée jusque là. MERCI.

SOMMAIRE

Présentation du sujet de thèse 7

Chapitre I - Synthèse Bibliographique 10

I. LA PHOTOSYNTHESE CHEZ LES BACTERIES POURPRES : 11

I.1. Les antennes collectrices de lumière 11
I.1.1. Les antennes périphériques 12
I.1.1.1. Les antennes LH2 12
I.1.1.2. Les antennes LH3 et LH4 14
I.1.2. les antennes internes (LH1) 15
I.2. Le centre réactionnel 16
I.3. Le complexe b/c1 18
I.4. L'ATP-synthase 18
I.5. Les transporteurs mobiles d'électrons 19
I.6. Les pigments photosynthétiques 20

II. LE CLUSTER DE GENES PHOTOSYNTHETIQUES (PGC) 21

II.1. Composition du PGC 21
II.2. Organisation en superopéron 23
II.3. Régulation de l'expression des gènes photosynthétiques 23
II.3.1. Régulation transcriptionnelle 24
II.3.1.1. Les régulateurs spécifiques 24
II.3.1.1.a. PpsR/ CrtJ 24
II.3.1.1.b. les bactériophytochromes 26
II.3.1.1.c. AppA 26
II.3.1.1.d. AerR 27
II.3.1.2. Les régulateurs globaux 28
II.3.1.2.a. RegB/RegA 28
II.3.1.2.b. FnrL 29
II.3.2. Régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle 29

III. LES BACTERIOPHYTOCHROMES 30

III.1. Les bactériophytochromes : senseurs de lumière 31
III.1.1. PCD : domaine senseur de lumière 31
III.1.2. Structure tridimentionnelle 33
III.1.3. Les propriétés spectrales 35
III.2. Les BphP : transmetteurs du signal lumineux. 36
III.2.1. Domaine histidine-kinase (HKD) 37
III.2.2. Autres domaines transmetteurs 38
III.2.2.1. GGDEF-EAL 38
III.2.2.2. Domaines PAS/PAC 39
III.3. Rôle des bactériophytochromes 39

IV. *RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS* 41

IV.1. Taxonomie 41
IV.2. Caractéristiques génomiques 44
IV.3. Analyse comparative des 5 souches séquencées de *Rps. palustris*. 46

Chapitre II - Résultats 50

Partie I : Contrôle de la synthèse des antennes collectrices de lumière par trois bactériophytochromes chez *Rps. palustris*. 50

Article 1 : *A new type of bacteriophytochrome acts in tandem with a classical bacteriophytochrome to control the antenna synthesis in Rhodopseudomonas palustris.* 51
Résumé 51
Article 53
Résultats complémentaires 64

Article 2 : *Evolution of a bacteriophytochrome from light to redox sensor.* 74
Résumé 74
Article 80

Partie II : Analyse de deux génomes de Bradyrhizobium photosynthétiques : Etude de deux nouveaux bactériophytochromes acquis par transfert horizontal 90

Article 3 : *The Rhizobial Nod key is not Universally Required for legume Nodulation.* 91
Résumé 91
Article 92

Etude du bactériophytochrome BrBphP3.BTAi1 retrouvé chez la souche Br. BTAi1. 98
Introduction 98
Résultats : 99
Caractérisation moléculaire de BrBphP3.BTAi1. 99
Etude de la voie de signalisation initiée par BrBphP3.BTAi1 101
Mise en évidence des antennes périphériques 102
Discussion- conclusion 104

Article 4 : *A singular bacteriophytochrome acquired by lateral gene transfer.* 106
Résumé 106
Article 107

Chapitre III – Conclusions- Perspectives 117

Références Bibliographiques 129

Annexes 147
Supplément article 2 148
Supplément article 3 152
Supplément article 4 161
Article 5 165

Liste des abbréviations

BphP : **Bactériophytochrome (Bacteriophytochrome Photoreceptor)**

***Br*.BphP :** ***Bradyrhizobium* bactériophytochrome**

CR : **Centre Réactionnel**

LH : **Complexe antennaire (Light Harvesting complex)**

PCD : **Domaine senseur de lumière (Photosensory Core Domain)**

PGC : **Cluster des gènes photosynthétiques (Photosynthesis Gene Cluster)**

PpsR : **Photopigment Synthesis Repressor**

***Rp*.BphP :** ***Rhodopseudomonas palustris* bactériophytochrome**

RR : **Régulateur de Réponse**

Présentation du sujet de thèse

Les organismes vivants sont sujets aux fluctuations des conditions environnementales (lumière, oxygène, éléments nutritifs par exemple). De par leur caractère « fixe », les plantes ont dû s'adapter et développer un ensemble de mécanismes très complexes pour capter les signaux environnementaux. De toutes les conditions environnementales intervenant sur le développement des plantes, la lumière est certainement l'une des plus importantes (Smith, 2000 ; Quail, 2002a ; Gyula *et al.*, 2003).

Pour adapter leur croissance à la lumière ambiante, les plantes utilisent une panoplie de photorécepteurs (Smith, 2000). Parmi eux, les phytochromes constituent une famille de protéines capables de fixer un chromophore de type biline. Ces chromoprotéines existent sous deux conformations différentes, notées Pr et Pfr, photoconvertibles suivant la lumière rouge ou infra-rouge qu'elles absorbent. Chez les plantes, les phytochromes déclenchent une cascade d'événements biochimiques aboutissant à l'activation de plusieurs familles de gènes impliquées dans différentes phases du développement comme la germination, la formation des chloroplastes, la pigmentation, la floraison ou la sénescence (Quail *et al.,* 1995 ; Chory *et al.*, 1996 ; Smith, 2000 ; Gilbert *et al.*, 2001).

Bien que les recherches menées sur les phytochromes soient très actives et compétitives au niveau international, les mécanismes de régulation au niveau moléculaire restent très mal compris. Cette situation résulte de difficultés majeures telles que :

- la complexité de ces organismes (pour exemple, la taille du génome d'*Arabidopsis thaliana*, une des plantes modèles les plus simples, est de 125 Mb)
- la présence de différents phytochromes qui interagissent avec d'autres capteurs de lumière tels que les cryptochromes et les phototropines,
- la difficulté d'obtenir des cultures de cellules synchrones ainsi que celle d'obtenir rapidement des mutants.

La présence de phytochromes chez les procaryotes a été décrite en 1997, initialement chez les cyanobactéries (Hughes *et al.*, 1997). Depuis, les programmes de séquençage de génomes complets ont permis de révéler la présence de bactériophytochromes chez de nombreuses autres bactéries photosynthétiques et non photosynthétiques (Jiang *et al.*, 1999 ; Davis *et al.*, 1999 ; Lamparter *et al.*, 2002). Ces bactériophytochromes sont reconnus aujourd'hui comme étant les formes ancestrales des phytochromes végétaux. Ils présentent un domaine N-terminal d'attachement du chromophore homologue aux phytochromes de plantes et un domaine C-terminal correspondant généralement aux motifs histidine-kinases à deux composants suggérant une transduction du signal lumineux par phosphotransfert.

La découverte des bactériophytochromes ouvre de nombreuses perspectives. En effet, les bactéries facilitent grandement l'étude de cette famille de capteurs en raison de :

- leur faible complexité (taille du génome généralement inférieure à 10 Mb),
- leur grande vitesse de croissance (les cellules sont par ailleurs synchrones),
- l'organisation des gènes en opéron qui peut traduire des interactions fonctionnelles,
- la relative facilité de manipulations génétiques (obtention de mutants de délétion, surexpression, mutagenèse dirigée etc…).

Cependant jusqu'à présent très peu d'études ont été réalisées limitant ainsi nos connaissances sur les fonctions et le mode d'action de ces bactériophytochromes.

Rhodopseudomonas (Rps.) palustris est connue des microbiologistes comme étant une des bactéries les plus versatiles ; en effet, elle est capable d'adapter son métabolisme énergétique à des conditions environnementales très variées et de dégrader de nombreux composés xénobiotiques. Elle peut ainsi se développer selon l'un des 4 modes de métabolisme qui supporte la vie (photo-autotrophie, photo-hétérotrophie, chimio-autotrophie et chimio-hétérotrophie) (Larimer *et al*., 2004). En semi-aérobiose ou anaérobiose, elle utilise préférentiellement la photosynthèse comme voie énergétique. L'appareil photosynthétique de cette bactérie présente plusieurs complexes distincts d'antennes collectrices (Tadros & Waterkamp, 1989 ; Tharia *et al*., 1999). La proportion de ces différents complexes antennaires varie en fonction de la qualité et de l'intensité lumineuse (Tadros *et al.*, 1993 ; Hartigan *et al.*, 2002), ce qui permettrait à la bactérie d'adapter la structure de son photosystème à la lumière ambiante.

Le séquençage récent du génome de *Rps. palustris* a révélé de façon surprenante la présence de 6 gènes codant des bactériophytochromes putatifs répartis sur le génome et nommés de *Rp*BphP1 à *Rp*BphP6 (Larimer *et al.*, 2004). Il est à noter que quatre de ces gènes (*RpBphP1, RpBphP2, RpBphP3* et *RpBphP4*) sont retrouvés à proximité de gènes photosynthétiques ; ce qui suggère que les protéines correspondantes pourraient intervenir à différents niveaux dans la formation du photosystème de *Rps. palustris*. Des études, menées précédemment dans l'équipe, ont mis en évidence l'homologie de séquences qui existe entre *RpBphP1* et le gène codant le bactériophytochrome *BrBphP1* retrouvé chez *Bradyrhizobium* ORS278. Il a pu être montré que *Rp*BphP1 et son homologue *Br*BphP1, tous deux retrouvés dans le cluster de gènes photosynthétiques, jouent un rôle central dans la synthèse de l'appareil photosynthétique de ces bactéries. Cette étude constituait la première démonstration d'un rôle clair exercé par un bactériophytochrome (Giraud *et al.*, 2002). La présence de six bactériophytochromes chez *Rps. palustris*, suggère que la bactérie ait

développé un réseau très complexe de régulation entre ces différents photorécepteurs pour adapter son métabolisme aux variations de l'environnement lumineux. *Rps. palustris* constitue, de ce fait, un bon modèle d'étude pour améliorer nos connaissances sur la biologie des bactériophytochromes.

L'objectif premier de cette thèse est d'étudier les bactériophytochromes retrouvés chez *Rps. palustris* afin de mieux comprendre le rôle, le mode d'action ainsi que les propriétés spectrales propres à chacun. Dans un premier temps, nous avons caractérisé les deux bactériophytochromes *Rp*BphP2 et *Rp*BphP3 dont les gènes ont la particularité d'être retrouvés en tandem sur le génome. Nous avons, ainsi, pu mettre en évidence les caractéristiques spectrales inédites de *Rp*BphP3. L'étude de la voie de signalisation, initiée par *Rp*BphP2 et *Rp*BphP3, met en évidence leur action concertée sur la régulation des antennes de type LH4 et l'implication de différents régulateurs de réponse. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés au bactériophytochrome *Rp*BphP4. Chez la plupart des souches de *Rps. palustris,* ce bactériophytochrome a perdu sa sensibilité à la lumière mais il a acquis une sensibilité aux variations du potentiel redox. Cette famille de protéines, sensibles à la lumière ou au potentiel redox, utilise la même voie de signalisation (système à deux composants) pour le contrôle de l'expression des antennes LH2. Il est à noter que c'est la première fois qu'une voie de signalisation complète est décrite pour un bactériophytochrome.

Dans la deuxième partie de ma thèse, je me suis impliquée dans un projet de séquençage et d'annotation du génome complet de deux souches de *Bradyrhizobium* photosynthétiques, ORS278 et BTAi1, coordonné par le LSTM. Les *Bradyrhizobium* sont très proches phylogénétiquement de *Rps. palustris*. L'analyse de leur séquence a permis d'identifier chez ces 2 bactéries la présence de 3 bactériophytochromes dont un est spécifique à chacune des deux souches. Une partie de ma thèse a consisté à caractériser les propriétés et les mécanismes d'action de ces nouveaux bactériophytochromes.

Chapitre - 1 -

Synthèse Bibliographique

La photosynthèse est un processus bioénergétique qui permet aux organismes phototrophes (plantes, algues, bactéries) de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique. Les mécanismes biophysiques et biochimiques qui interviennent dans ce processus conduisent à la synthèse de substances organiques, bien souvent associée à la production d'oxygène. Ces substances sont indispensables, à la fois, aux organismes autotrophes qui les synthétisent et aux organismes hétérotrophes qui les assimilent. Les mécanismes impliqués ont lieu au sein d'appareils photosynthétiques, ou photosystèmes, au niveau de la membrane cytoplasmique bactérienne ou dans les thylacoïdes. Les photosystèmes comprennent différents complexes (antennes collectrices de lumière, centres réactionnels, cytochromes) qui interviennent dans la chaîne de transfert d'électrons impliquée dans la photosynthèse. L'énergie lumineuse, collectée par les antennes collectrices de lumière, est transmise par excitation moléculaire (on parle de transfert d'excitons) vers le centre réactionnel (CR) où elle est convertie en énergie chimique (Jupin & Lamant, 1997 ; Raven *et al.,* 2000). Le centre réactionnel est un complexe pigment-proteine. Il constitue l'unité minimale fonctionnelle pour déclencher un transfert d'électrons induit par l'énergie lumineuse. Il contient le donneur primaire d'électrons qui va initier le transfert des électrons *via* une série d'accepteurs. On distingue deux types de CR en fonction de l'accepteur final d'électrons (Blankenship, 1992).

- Le CR de type 1 : il fait référence au CR des bactéries vertes sulfureuses, des héliobactéries et à celui retrouvé dans le photosystème I des plantes, des algues et des cyanobactéries. L'accepteur final d'électrons est une molécule à centre Fer-Soufre.

- Le CR de type 2 : il est présent chez les bactéries pourpres, les bactéries vertes filamenteuses et dans le photosystème II des plantes, des algues et des cyanobactéries. Dans ce cas, l'accepteur final d'électrons est une molécule de la famille des quinones.

Il existe deux types de photosynthèse. La première, dite photosynthèse oxygénique, dégage de l'oxygène. Elle est réalisée par les plantes, les algues et les cyanobactéries. La seconde est dite anoxygénique car elle ne produit pas d'oxygène. Elle est réalisée par les bactéries (principalement bactéries vertes et pourpres).

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons essentiellement à la photosynthèse anoxygénique réalisée chez les bactéries pourpres et plus précisément chez *Rps. palustris.*

I- La photosynthèse chez les bactéries pourpres.

Les bactéries pourpres vivent essentiellement en milieu aquatique. Leur couleur est due à la présence de certains caroténoïdes tels que la spirilloxanthine, le sphéroïdène ou encore la sphéroïdénone. On distingue classiquement deux groupes de bactéries pourpres : les bactéries sulfureuses qui sont strictement anaérobies et phototrophes et les bactéries non sulfureuses. Ces dernières forment un groupe plus hétérogène et sont pour la plupart photohétérotrophes en anaérobiose. Elles métabolisent de nombreux composés organiques augmentant par là-même leurs ressources énergétiques.

Chez les bactéries pourpres, les réactions d'oxydo-réduction, qui ont lieu lors de la photosynthèse, se déroulent dans des complexes membranaires spécialisés. Afin de collecter l'énergie lumineuse et de la convertir en énergie chimique, quatre complexes, intégrés dans la membrane cytoplasmique sont mis en jeu. Ils correspondent : aux antennes collectrices de lumière, au centre réactionnel, au complexe b/c1 et à l'ATP-synthase. Lors de cette conversion des transporteurs solubles d'électrons localisés dans le périplasme interviennent également.

En raison de leur simplicité, les complexes photosynthétiques des bactéries pourpres ont fait l'objet de multiples études (Wang *et al.,* 1994 ; Verméglio & Joliot, 1999 ; Tavano & Donahue*.,* 2006). La structure ainsi que le fonctionnement des différents complexes, formant le photosystème, sont maintenant bien connus. De ce fait, les bactéries pourpres sont un modèle d'étude très utile pour la compréhension des processus liés à la photosynthèse.

I.1- Les antennes collectrices de lumière

Le rôle des antennes collectrices de lumière est de capter l'énergie lumineuse environnante et de la transférer vers le centre réactionnel du photosystème de la bactérie. Ces antennes permettent d'optimiser la collecte des photons mais ne sont pas indispensables. En effet, des bactéries mutées, incapables d'exprimer leurs antennes, sont encore phototrophes

lorsqu'elles sont exposées à de fortes intensités lumineuses (Hunter, 1995). La plupart des bactéries pourpres possèdent 2 types d'antennes collectrices de lumière :

- les antennes de type I (LH1 pour Light Harvesting Complex I) qui sont fortement liées aux centres réactionnels des photosystèmes auxquels elles transmettent les excitons.

- les antennes périphériques, essentiellement de type II (LH2 pour Light Harvesting complex II). Elles ne sont pas directement associées au centre réactionnel mais lui transmettent l'énergie lumineuse *via* les antennes LH1 (van Grondelle *et al.,* 1994 ; Cogdell *et al.,*1996 ; Hu *et al.,* 1998).

Les deux types d'antennes sont construits sur le même modèle : il s'agit de complexes protéiques, associés à des pigments et à des cofacteurs (McDermott *et al.,* 1995). Les peptides α et β sont codés, respectivement, par les gènes *pufA* et *pufB* pour les antennes LH1, et *pucA* et *pucB* pour les antennes LH2. Contrairement aux antennes LH1, dont la synthèse est proportionnelle à celle du CR, la proportion des antennes LH2 diffère selon les conditions environnementales.

I.1.1- Les antennes périphériques

I.1.1.1- Les antennes LH2

Les antennes de type LH2 absorbent à 800 et 850 nm. La résolution de leur structure cristalline chez *Rps. acidophila* (Mac Dermott, 1995 ; Papiz *et al.,* 2003) et chez *Rhodospirillum molischianum* (Koepke *et al.,* 1996) révèle que ce complexe antennaire est de forme cylindrique (Figure 1). Il est composé :

- <u>De sous-unités α/β</u> :

Chaque sous-unité contient deux peptides (α et β) de faibles poids moléculaires et très hydrophobes. Chaque peptide forme une hélice α transmembranaire avec deux extrémités polaires N- et C- terminales, respectivement du côté cytoplasmique et périplasmique (Tadros *et al.,* 1986). La structure des antennes LH2 est basée sur une répétition de la sous-unité α/β.

L'ensemble de ces sous-unités forme 2 anneaux concentriques transmembranaires :

- l'anneau interne formé par les polypeptides α,
- et l'anneau externe formé par les polypeptides β (Figure 1).

Chez *Rps. acidophila*, *Rhodovulum sulfidophilum, Rhodobacter sphaeroides* et *Rps. palustris* les antennes LH2 sont basées sur un nonamère de sous-unités α/β (Montoya *et al.,* 1995 ; Walz *et al.,* 1998 ; Scheuring *et al.,* 2006), tandis que chez *Rhodospirillum molischianum* les sous-unités α/β forment un motif octamérique (Koepke *et al.,* 1996).

- De pigments de bactériochlorophylle *a* (Bchl *a*) :

Chaque sous-unité α/β est liée de façon non covalente à 3 molécules de Bchl *a*. Les Bchl *a* peuvent être classées en deux groupes en fonction des longueurs d'ondes auxquelles elles absorbent. Le premier groupe de Bchl *a* absorbe à 800 nm (B800) tandis que le second absorbe à 850 nm (B850).

- Et de caroténoïdes :

Ces pigments sont localisés entre les deux anneaux de polypeptides α et β (Papiz *et al.,* 2003 ; Gall *et al.,* 2006) et relient deux sous-unités α/β entre elles. Les caroténoïdes jouent, ainsi, un rôle important dans la stabilité du complexe. Chez une bactérie mutante, l'absence de caroténoïde provoque la dégradation rapide des antennes LH2 synthétisées (Lang & Hunter, 1994).

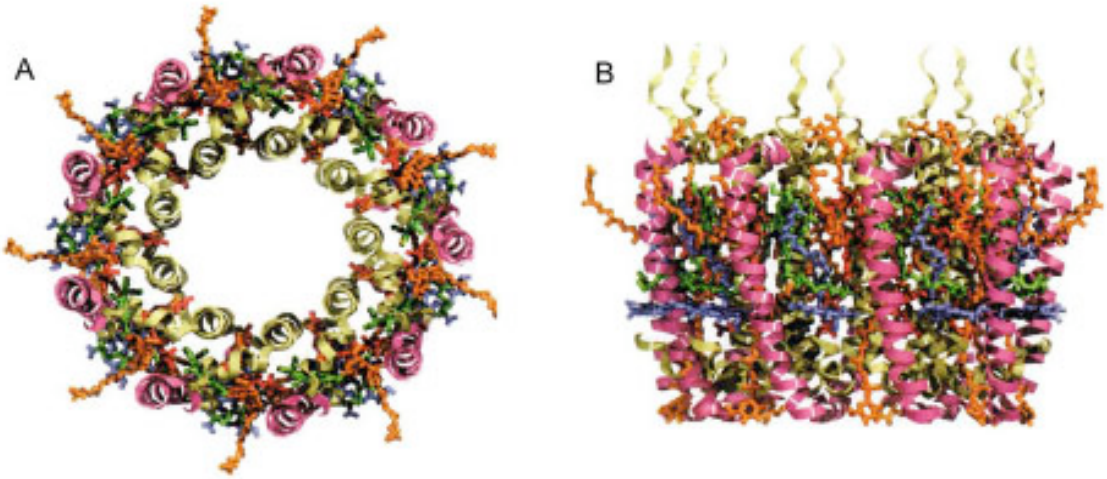


Figure 1 : Représentation schématique des antennes LH2 de *Rps. acidophila*.

(A) Vue de dessus et (B) vue dans le plan de la membrane d'un complexe antennaire de type LH2.
Les chaînes α sont représentées en vert clair, les chaînes β en rose. Les Bchl *a* B850 sont représentées en rouge lorsqu'elles sont associées aux chaînes α et en vert foncé lorsqu'elles sont associées aux chaînes β. Les B800 sont en bleu et les caroténoïdes en orange (cogdell *et al.,* 2003).

La proportion des LH2 varie fortement en fonction des conditions de culture. Sous de fortes intensités lumineuses, peu d'antennes sont nécessaires pour un fonctionnement optimal

du centre réactionnel. Par contre, sous de faibles intensités lumineuses, le nombre d'antennes LH2 est accru autour de chaque CR. Cela a pour effet d'améliorer la capture des photons.
Les sous-unités α et β des complexes LH2 sont codés respectivement par les gènes *pucA* et *pucB*. Les bactéries pourpres peuvent avoir plusieurs opérons *pucBA* dans leur génome, optimisant ainsi la collecte de la lumière incidente. C'est le cas, par exemple, de certaines souches de *Rps. palustris* qui présentent jusqu'à 7 opérons *pucBA* (Cf. Tableau I, chapitre IV.3.1).

Si la plupart des bactéries pourpres, exprimant des antennes périphériques, présentent des antennes LH2, certaines comme les *Bradyrhizobium*, *Rhodospirillum rubrum* et *Rps. viridis* sont dépourvues d'antenne périphérique. D'autres, au contraire, synthétisent des antennes périphériques supplémentaires nommées LH3 (Angerhofer *et al.,* 1986 ; Gardiner *et al.,* 1993) et LH4 (Evans *et al.,* 1990 ; Tharia *et al.,* 1999).

I.1.1.2- Les antennes LH3 et LH4

Ces antennes périphériques se distinguent des antennes LH2 par leurs propriétés spectrales et leurs conditions d'expression. Par exemple :

Rps. acidophila synthétise, en plus des antennes LH2, des antennes de type LH3. Ces dernières sont synthétisées lorsque les conditions de lumière deviennent très faibles et/ou lorsque la température diminue. Les antennes de type LH3 absorbent à 800 nm et à 820 nm. Elles présentent une structure analogue à celle des antennes LH2, basée sur un nonamère de paires α/β, où se logent les Bchl *a* et les caroténoïdes (Gardiner *et al.,* 1993 ; McLuskey *et al.,* 2001). Les différences entre ces deux complexes résultent de la structure primaire des polypeptides qui confère des propriétés d'absorption différentes aux pigments.

Comme nous l'avons dit précédemment, *Rps. palustris* possède dans son génome plusieurs opérons *pucBA* (Tadros & WaterKamp, 1989). La proportion relative de chacun des complexes varie en fonction des conditions environnementales. Sous de faibles conditions de lumière, la synthèse des antennes LH2 peut être remplacée par celle des antennes LH4. Ces antennes, codées par l'opéron *pucBA.d,* ne présentent qu'une seule bande d'absorption à 800 nm (Evans *et al.,* 1990 ; Tharia *et al.,* 1999). Scheuring *et al*. (2006) ont mis en évidence que les antennes LH4 étaient plus petites que les antennes LH2. En effet, les antennes LH4 ne sont pas basées sur un motif nonamérique mais octamérique. Par ailleurs, au sein des antennes LH4, chaque sous-unité α/β est reliée non pas à 3 mais à 4 molécules de Bchl *a* (Hartigan *et al.,* 2002).

I.1.2- Les antennes internes (LH1)

De nombreuses analyses de microscopie et de cristallographie ont été effectuées afin de déterminer la structure des antennes LH1 et leur interaction avec le centre réactionnel (Karrasch *et al.,* 1995 ; Stahlberg *et al.,* 1998). Elles ont révélé que les complexes antennaires LH1 sont très proches des complexes antennaires LH2. Comme ces dernières, les antennes LH1 sont composées de sous-unités α/β. Celles-ci lient des Bchl *a,* responsables de l'absorption du complexe à 870 nm, et des caroténoïdes. L'arrangement des molécules au sein du complexe est similaire à celui des antennes LH2. La protéine transmembranaire, codée par le gène *lhaA,* joue un rôle majeur dans l'assemblage des LH1. Elle facilite l'insertion des polypeptides du complexe dans la membrane. Elle agit aussi comme un intermédiaire en transférant les molécules de Bchl *a* depuis leur lieu de synthèse vers les apoprotéines LH1 (Young *et al.,* 1998 ; Young & Beatty, 1998). Les antennes LH1 sont en interaction étroite avec le CR permettant ainsi un transfert d'énergie plus efficace. Cependant les antennes LH1 présentent des formes et des tailles très variables. La structure majoritairement retrouvée est celle décrite chez *Rsp. rubrum* avec 16 paires α/β, soit 32 hélices α transmembranaires encerclant complètement le CR (Karrasch *et al.,* 1995 ; Fotiadis *et al.,* 2004). Chez *Rsp. Rubrum,* les LH1 peuvent adopter des conformations circulaires mais aussi ellipsoïdales suggérant une flexibilité du système. Cela pourrait faciliter l'export de la quinone réduite hors du centre réactionnel vers le complexe b/c1 (Jamieson *et al.,* 2002 ; Fotiadis *et al.,* 2004).

Chez les bactéries du genre R*hodobacter*, la protéine PufX présente dans le complexe CR-LH1 est indispensable à une croissance autotrophe. PufX empêcherait les antennes LH1 d'encercler entièrement le CR. Cela permettrait le passage des quinols/quinones à travers la membrane (Lilburn *et al.,* 1992 ; Scheuring et al., 2005 ; Qian *et al.,* 2005). Un peptide supplémentaire, nommé peptide W, a également était identifié dans le complexe CR-LH1 de *Rps. palustris* (Roszak *et al.,* 2003). Chez cette bactérie, le complexe antennaire LH1 présente une structure ellipsoïdale, constituée de 15 paires α/β et d'un peptide W (Figure 2). Ce peptide se positionne, comme PufX, en face du site QB du centre réactionnel. Cela suggère que le peptide W pourrait jouer un rôle analogue à celui de PufX, bien que le gène codant ce peptide W n'ait pas encore été identifié dans le génome de *Rps. palustris*.

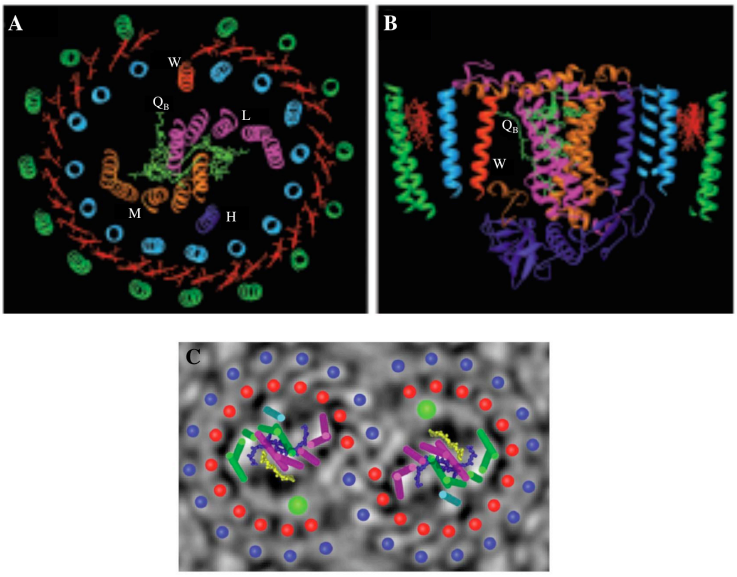
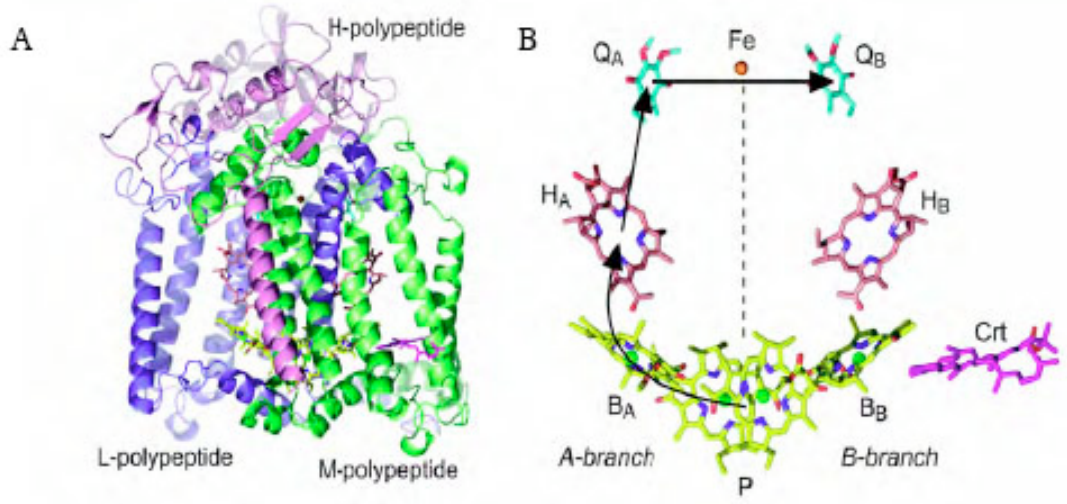


Figure 2 : Représentation schématique des complexes CR-LH1 de *Rps. palustris* et *Rb. sphaeroides*.

(A) Vue perpendiculaire et (B) vue parallèle au plan de la membrane du complexe CR-LH1 de *Rps. palustris*. Au niveau des antennes LH1, les hélices transmembranaires des sous-unités α sont représentées en bleu clair et les sous-unités β en vert. Les hélices transmembranaires du centre réactionnel sont en violet (sous-unité H), en rose (sous-unité L) et en orange (sous–unité M). Les bactériophéophytines (en vert) et les bactériochlorophylles (en rouge) sont représentées par leurs macrocycles respectifs. L'hélice transmembranaire du peptide W est schématisée en rouge (Roszak *et al.,* 2003) (C) Représentation schématique du complexe CR-LH1 de *Rb. sphaeroides*. Les points rouges schématisent les sous-unités α, les points bleus les sous-unités β et les points vert les peptides PufX. Les bâtonnets représentent les polypeptides H (en bleu), L (en mauve) et M (en vert) du CR (Qian *et al.,* 2005).

I.2- Le centre réactionnel

La structure tridimensionnelle des CR, des bactéries pourpres *Rps. viridis* et *Rhodobacter sphaeroides,* sont connues depuis une vingtaine d'années (Deisenhofer *et al.,* 1985 ; Yeates *et al.,* 1987). Le centre réactionnel est constitué de trois peptides (L, M et H) codés respectivement par les gènes *pufL*, *pufM* et *puhA* (Figure 3). Les peptides L et M forment le coeur du centre réactionnel. Ils sont intégrés à la membrane par 5 hélices α. Organisés symétriquement l'un par rapport à l'autre, ils forment une poche dans la membrane où se logent les cofacteurs responsables du transfert d'électrons. La sous-unité H, quant à elle, est ancrée dans la membrane par une hélice α. Elle vient recouvrir la poche formée par les sous-unités L et M. Cette sous-unité serait impliquée dans la formation des membranes intracytoplasmiques et dans la mise en place des antennes et du CR (Cheng *et al.,* 2000 ; Sockett *et al.,* 1989 ; Wong *et al.,* 1996 ; Lupo & Ghosh, 2004).



<u>Figure 3</u> : Structure du centre réactionnel de *Rb. sphaeroides*.

(A) Les sous unités L (en bleu) et M (en vert) du CR possèdent 5 hélices transmembranaires. La sous-unité H (en mauve) n'en possède qu'une. Les différents co-facteurs présents dans le CR sont représentés par des structures en bâtonnets. (B) Schématisation de l'arrangement des co-facteurs au sein du CR.
Q_A et Q_B : molécules d'ubiquinone, H_A et H_B : bactériophéophytines, P: paire spéciale formée de deux molécules de bactériochlorophylle *a*, B_A et B_B : Bchl *a,* Crt : un caroténoïde et Fe : un atome de fer (Heathcote *et al.,* 2002).

Les peptides L et M sont responsables de l'agencement des co-facteurs et donc de l'efficacité du transfert d'électrons. Ces co-facteurs correspondent à :

- 4 molécules de Bchl *a* (dont 2 forment la « paire spéciale »),
- deux bactériophéophytines *a*,
- deux quinones (Q_A et Q_B),
- un caroténoïde
- et un ion fer non hémique.

Les co-facteurs sont fixés de façon non covalente aux peptides L et M. Ils s'organisent en deux branches quasiment symétriques et perpendiculaires au plan de la membrane. Quand un photon est absorbé par les pigments antennaires, l'énergie d'excitation est rapidement dirigée jusqu'à la paire spéciale de Bchl *a* du CR. Cette paire spéciale de Bchl *a* initie alors une succession de réactions d'oxydoréduction. La paire spéciale de bactériochlorophylles photo-excitées cède un électron à une bactériophéophytine. Cet électron est ensuite transmis à la quinone Q_A, puis à la quinone Q_B. Lorsque Q_B est entièrement réduite en quinol (Q_BH_2), son affinité pour le centre réactionnel diminue fortement. Q_BH_2 diffuse, alors, dans la membrane jusqu'au complexe cytochrome *b/c1*.

I.3- Le complexe *b/c1*

Le transfert d'électrons se poursuit dans le complexe cytochrome *b/c1* (van Grondelle *et al.,* 1994). Ce complexe intervient dans le transfert des électrons lors de la photosynthèse et de la chaîne respiratoire. Il se présente comme un dimère et sa structure a été récemment résolue (à 3,8 Å) chez *Rhodobacter capsulatus* (Berry *et al.,* 2004). Il est généralement codé par trois gènes organisés en opéron : *petA*, *petB* et *petC*. Ces gènes codent respectivement la protéine de Rieske avec un centre [2Fe–2S], le cytochrome *b* enchâssé dans la membrane, et le cytochrome *c1* (Davidson & Daldal, 1987a, 1987b). Dans certains cas, les gènes codant les cytochromes b et c1 sont parfois fusionnés et le clivage s'effectue au niveau post-traductionnel comme chez *Rps. palustris* et *Bradyrhizobium japonicum* (Thony-meyer *et al.,* 1989).

Ce complexe enzymatique *b/c1* réoxyde les quinols (Q_BH_2) provenant du centre réactionnel en quinones (Q). Les électrons, issus de cette réoxydation, vont transiter *via* la protéine de Rieske et le cytochrome c1 avant d'être transférés aux transporteurs solubles. En parallèle, ce complexe b/c1 fonctionne comme une pompe à protons facilitant le passage des protons du cytoplasme vers le périplasme. Ceux-ci pourront alors être utilisés lors de la synthèse d'ATP par l'ATP-synthase (Figure 4).

I.4- L'ATP-synthase

L'ATP-synthase, associée à la membrane cytoplasmique des bactéries, est une ATP-synthase de type F, encore appelée F1Fo ATP-synthase. Ce complexe enzymatique, d'environ 530 kDa, est constitué de deux domaines protéiques : un domaine transmembranaire (Fo) et un domaine cytosolique extrinsèque (F1). Lorsque le gradient de protons est favorable, l'enzyme couple la synthèse de l'ATP (à partir de l'ADP et du Pi) au flux spontané de protons qui s'effectue de Fo vers F1. L'énergie nécessaire à la synthèse de l'ATP est fournie par le gradient de protons et la différence de pH, instaurés au cours du transport des électrons lors de la photosynthèse (pour revue, Senior *et al.,* 2002).

I.5- Les transporteurs mobiles d'électrons

Ces transporteurs interviennent à deux moments dans le transfert cyclique d'électrons (Figure 4).

- Tout d'abord, ils permettent le transfert des électrons du CR vers le cytochrome b/c1. Lors de cette étape, les transporteurs mobiles utilisés appartiennent à la famille des quinones.
- La deuxième étape, où ces transporteurs peuvent intervenir, correspond au transfert d'électrons en sens inverse, c'est-à-dire du complexe b/c1 vers le CR. Cette étape permet d'achever le transfert cyclique des électrons. Dans ce cas, les molécules mises en jeu peuvent être d'origines différentes. Il peut s'agir soit :
    - d'un cytochrome soluble localisé dans l'espace périplasmique. Ce cytochrome, nommé cytochrome c2 (cyt c2), est codé par le gène *cycA* retrouvé dans le PGC de *Rps. palustris* et des *Bradyrhizobium* photosynthétiques. Des études ont montré que *Rhodobacter capsulatus* possédait un deuxième cytochrome pouvant se substituer à cyt c2. Il s'agit du cytochrome c_y codé par le gène *cycI* (Jenney & Daldal, 1993).
    - de ferredoxines à haut potentiel (HiPIP pour High Potential Iron Protein). La participation de ces protéines à la réduction du CR dépend de leur potentiel redox et de leur concentration dans la cellule.

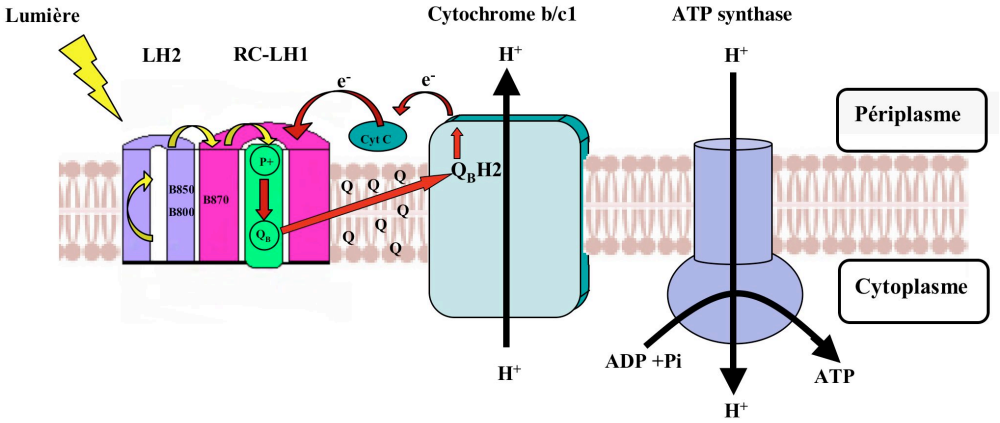


Figure 4 : Schématisation du transfert d'énergie aboutissant à la synthèse d'ATP lors de la photosynthèse. (Roszak *et al.*, 2003).

L'énergie lumineuse (flèches jaunes) capturée par les antennes collectrices de lumière est transmise au centre réactionnel où est initié le transfert cyclique des électrons (flèches rouges) *via* une succession de réactions d'oxydoréduction. Ces réactions engendrent une libération de protons utilisés par l'ATP-synthase lors de la formation d'ATP.

I.6- Les pigments photosynthétiques

Chez les bactéries pourpres, le photosystème contient deux types de pigments : des bactériochlorophylles et des caroténoïdes. Il existe plusieurs types de molécules de bactériochlorophylles et de caroténoïdes, classés selon leur structure chimique et présentant des propriétés spectrales différentes. Chez les bactéries pourpres, c'est la bactériochlorophylle *a* qui est la plus utilisée.

La Bchl *a* joue un rôle essentiel dans les complexes photosynthétiques où elle constitue les photorécepteurs des antennes. Elle intervient aussi dans le transfert des électrons vers le centre réactionnel et dans la stabilité du complexe antennaire. La structure de base d'une molécule de bactériochlorophylle est un noyau tetrapyrrolique contenant un atome de magnésium. Le degré d'insaturation des cycles du tetrapyrrole et la nature des substituants différentient les molécules de bactériochlorophylle.

Les caroténoïdes sont des pigments largement répandus parmi les organismes photosynthétiques et non photosynthétiques. La structure de base des caroténoïdes est une longue chaîne polyénique (doubles liaisons conjuguées), de 40 atomes de carbone, linéaire ou cyclisée aux extrémités. Présents chez tous les organismes phototrophes, les caroténoïdes jouent trois rôles principaux :

- ils participent à la collecte de la lumière dans les longueurs d'onde de 450 à 570 nm,
- ils sont essentiels à la formation et à la stabilité des antennes (Lang & Hunter, 1994),
- ils jouent un rôle photoprotecteur en évitant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (Cogdell *et al.,* 2000).

Les étapes précoces de la voie de biosynthèse sont communes à tous les caroténoïdes ; ensuite le nombre de deshydrogénation, les cyclisations et l'insertion de groupements oxygénés vont différer d'un organisme à un autre générant ainsi la diversité des caroténoïdes observés dans la nature (Armstrong *et al.,* 1990 ; Armstrong, 1994).

- Chez certaines bactéries pourpres (comme les espèces de *Rhodobacter*, par exemple), les caroténoïdes majoritairement retrouvés sont le sphéroïdène et la sphéroïdénone (Takaichi *et al.,* 1999). Le sphéroïdène est majoritaire durant la croissance photosynthétique sous de faibles intensités lumineuses. Lorsque la

concentration en oxygène augmente, ou lorsque l'intensité lumineuse s'accroit, le sphéroïdène est rapidement converti en sphéroïdénone (Yeliseev *et al.,* 1996 ; Yeliseev & Kaplan, 1997).

- D'autres bactéries possèdent, comme caroténoïde, de la spirilloxanthine. C'est le cas de *Rsp. rubrum*, *Acidiphilium rubrum*, des *Bradyrhizobium* photosynthétiques et de *Rps. palustris* (Gall *et al.,* 2005). *Rubrivivax gelatinosus*, quant à elle, est capable de produire à la fois du sphéroïdène et de la spirilloxanthine (Harada *et al.,* 2001). Certaines souches de *Bradyrhizobium* photosynthétiques, en plus de la spirilloxanthine, synthétisent de la canthaxanthine mais celle-ci n'est pas associée au photosystème (Giraud *et al*., 2004).

II- Le cluster de gènes photosynthétiques (PGC)

II.1- Composition du PGC

Chez les bactéries pourpres, les gènes impliqués dans la synthèse du photosystème, sont localisés pour la plupart dans une même région du génome. Cela représente une région d'environ 50 kb que l'on désigne sous le terme de « cluster de gènes photosynthétiques » (ou PGC pour Photosynthesis Gene Cluster) (Alberti *et al.,* 1995 ; Choudhary & Kaplan, 2000 ; Igarashi *et al.,* 2001). Cette région regroupe plus d'une trentaine de gènes codant des protéines impliquées dans :

- la structure du centre réactionnel (*pufL*, *pufM* et *puhA*) et l'assemblage des antennes LH1 (*pufA*, *pufB* et *lhaA*),
- la voie de biosynthèse des pigments photosynthétiques (*bch* et *crt),*
- la régulation spécifique des gènes photosynthétiques (*ppsR*, *aerR*).

Cependant tous les gènes, impliqués dans la photosynthèse, ne sont pas compris dans le PGC. C'est le cas par exemple des gènes *pucBA* codant les apoprotéines α et β des antennes LH2. Chez *Rb. sphaeroides*, les deux opérons *pucBA* encadrent le PGC (Choudhary & Kaplan, 2000 ; Zeng *et al.,* 2003), tandis que les différents opérons de *Rps. palustris* sont répartis dans le génome (Larimer *et al.,* 2004).

L'arrangement global du PGC de *Rps. palustris* est très proche de celui de *Bradyrhizobium* ORS278 (Giraud *et al.,* 2002). De plus des analyses phylogénétiques, réalisées avec les protéines PufL et PufM, indiquent que les gènes photosynthétiques de *Rps. palustris* et de ORS278 sont très proches (Giraud *et al.,* 2000). Il y a plus de 70 % d'identité entre certains gènes présents dans ces deux bactéries (exemple de *pufL* et *pufM*). Le PGC de ces deux bactéries présente des particularités (Figure 5) :

- l'opéron *puf* ne contient pas le gène *pufC* et celui-ci n'est pas retrouvé ailleurs dans le génome. Ce gène, lorsqu'il est présent, code un cytochrome tétrahémique lié au CR. Ce cytochrome est capable de re-réduire la paire spéciale de bactériochlorophylles (donneur primaire d'électrons).
- le gène *cycA,* codant le cytochrome c2, est présent dans le PGC. Le transfert cyclique d'électrons pourrait se faire *via* le cytochrome c2 chez ces deux bactéries.
- deux gènes atypiques, *bphp1* (bacteriophytochrome photoreceptor) et *hmuo,* sont retrouvés dans ce PGC. Ces deux gènes codent respectivement un bactériophytochrome et une hème oxygénase. Les bactériophytochromes sont des protéines sensibles à la lumière qui fixent de façon covalente un chromophore. L'hème oxygénase est l'enzyme qui synthétise le chromophore des bactériophytochromes (Cf. Chapitre III).
- de plus, les PGC de *Rps. palustris* et ORS278 ont aussi en commun deux gènes *ppsR* (habituellement un seul gène *ppsR* est retrouvé).

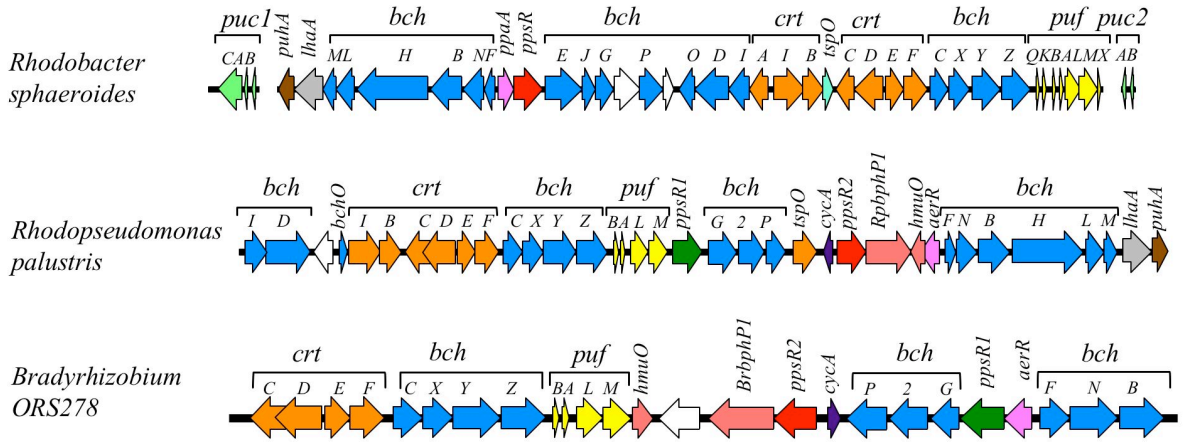
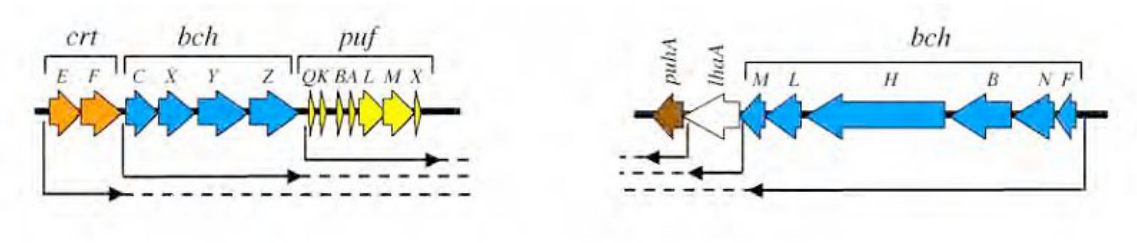


Figure 5 : Représentation du cluster de gènes photosynthétiques chez *Rb. sphaeroides*, *Rps. palustris* et *Bradyrhizobium* ORS278.

II.2- Organisation en superopéron

L'organisation génétique en opérons et superopérons est un bon moyen de coordonner l'expression des gènes impliqués dans une même voie de biosynthèse. Les superopérons regroupent en une seule unité de transcription des opérons adjacents ayant le même sens de transcription. Dans le cas du PGC, une trentaine de gènes doivent être co-régulés de manière à adapter l'expression du photosystème aux variations des conditions environnementales. La transcription peut s'initier à partir de la région promotrice de chaque opéron du superopéron et se poursuivre au-delà de l'opéron suivant. Chez *Rb. capsulatus*, les opérons *crtEF*, *bchCXYZ* et *pufQBALMX* forment un superopéron. Au sein de ce dernier, l'opéron *pufQBALMX* est transcrit à partir de son propre promoteur, mais aussi à partir de ceux des opérons *bchCXYZ* et *crtEF* (Young *et al.,* 1989 ; Wellington & Beatty, 1991) (Figure 6). Ce niveau d'organisation semble être un caractère conservé parmi les bactéries pourpres, peut-être de part ses avantages en terme de régulation (Bauer *et al.,* 1991 ; Beatty, 1995).



<u>Figure 6</u> : Organisation en superopéron des gènes photosynthétiques chez *Rb. capsulatus* (Beatty, 1995).

II.3- Régulation de l'expression des gènes photosynthétiques

La mise en place du photosystème dépend à la fois des concentrations en oxygène et des conditions lumineuses. Chez la plupart des bactéries pourpres, une faible concentration en oxygène induit la mise en place de l'appareil photosynthétique. La lumière module la quantité de photosystèmes formés ; plus l'intensité lumineuse augmente, plus le nombre de photosystèmes diminue. Les systèmes de régulation mis en jeu utilisent différents mécanismes moléculaires et peuvent s'exercer au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel, et post-traductionnel. La caractérisation de ces mécanismes a principalement été réalisée chez *Rb. sphaeroides* et *Rb. capsulatus*. Chez ces bactéries, l'oxygène joue un

rôle majeur dans la régulation de la synthèse du photosystème, tandis que la lumière n'a qu'un rôle secondaire en contrôlant essentiellement l'expression des antennes LH2. *A contrario*, chez *Bradyrhizobium* ORS278 et *Rps. palustris*, même s'il existe un fort effet répresseur de l'oxygène, la lumière joue un rôle prépondérant dans la régulation du photosystème. Cette particularité est due à la présence, dans le PGC, d'un gène codant un bactériophytochrome (Cf Figure 5 et chapitre III.3).

II.3.1- Régulation transcriptionnelle

Le contrôle transcriptionnel de l'expression des gènes photosynthétiques résulte de l'action de plusieurs voies de régulation répondant aux conditions redox et/ou lumineuses. La majorité des gènes photosynthétiques sont ainsi soumis à un contrôle par plusieurs régulateurs. Il en résulte une synthèse coordonnée des pigments et des protéines de structure du photosystème. Certains de ces régulateurs contrôlent spécifiquement les gènes photosynthétiques. D'autres, au contraire, sont également impliqués dans le contrôle de processus métaboliques différents et sont dits : régulateurs globaux.

II.3.1.1- Les régulateurs spécifiques

II.3.1.1.a- PpsR / CrtJ

Jusqu'à présent, le gène *ppsR* a été retrouvé uniquement chez les bactéries pourpres et systématiquement localisé dans le PGC. PpsR a tout d'abord été identifié chez *Rb. capsulatus,* parmi des mutants affectés dans la biosynthèse des caroténoïdes (Armstrong *et al.,* 1990 ; Ponnampalam *et al.,* 1995), où il a été appelé CrtJ. Chez *Rb. sphaeroides,* il a été décrit comme un répresseur de la synthèse des photopigments en aérobiose (gènes *bch*, *crt*), d'où son nom : Photopigment synthesis Repressor (Penfold & Pemberton, 1991 ; Penfold & Pemberton, 1994). Pour plus de clarté, nous parlerons toujours ici de la protéine PpsR quelque soit la bactérie évoquée.

Le gène *ppsR* code une protéine d'environ 50 kDa présentant 3 domaines caractéristiques :

- un domaine HTH (Hélice-Tour-Hélice), situé à l'extrémité C-terminale de la protéine. Ce domaine, présent chez de nombreux facteurs de transcription, permet la fixation d'une protéine à l'ADN.

- deux domaines PAS, situés à l'extrémité N-terminale. Ces domaines sont retrouvés dans de nombreuses protéines impliquées dans les réponses cellulaires à la lumière, à l'oxygène et aux changements de potentiel redox (Taylor & Zulhin, 1999). Ils joueraient aussi un rôle essentiel dans la bonne conformation et dans le bon fonctionnement de la protéine PpsR chez *Rhodobacter sphaeroïdes* (Gomelsky *et al.,* 2000). De plus, les domaines PAS sont impliqués dans des interactions protéine-protéine. Plus spécifiquement, chez *Rb. capsulatus* et *Rb. sphaeroides,* ces domaines permettraient la formation en tétramère des PpsR.

PpsR est un facteur de transcription qui régule l'expression des gènes (*bch*, *crt* et *puc*) en fonction :

- du potentiel redox. Des études biochimiques effectuées chez *Rb. capsulatus* et *Rb. sphaeroïdes* ont mis en évidence une fixation redox-dépendante de PpsR à l'ADN. En conditions oxydantes, il y aurait formation d'un pont disulfure intramoléculaire *via* les cystéines Cys_{249} et Cys_{420}. La conformation oxydée obtenue serait plus affine pour l'ADN (Ponnampalam & Bauer, 1997 ; Masuda & Bauer, 2002).

- de la lumière. En interagissant avec des senseurs de lumière, tels que AppA ou BphP (Cf. chapitre III.3), PpsR régule indirectement l'expression de certains gènes en fonction de ce paramètre environnemental.

Tous les PpsR possèdent un site commun de fixation à l'ADN. Il s'agit du motif palindromique $TGTN_{12}ACA$. Cependant pour que la répression par PpsR soit effective *in vivo*, 2 motifs palindromiques sont nécessaires (Moskvin *et al.,* 2005). La fixation de PpsR sur l'ADN empêcherait la fixation de l'ARN polymérase, ce qui bloquerait la transcription des gènes en aval. Pendant longtemps PpsR a été considéré comme un inhibiteur des gènes photosynthétiques *bch*, *puf* et *puc* (Bowman *et al.,* 1999). Mais, depuis peu, des études ont mis en évidence un rôle plus complexe de PpsR (pour revue, Elsen *et al.,* 2005). En effet, chez *Rubrivivax gelatinosus*, une même protéine PpsR inhibe l'expression du gène *crtI* et active l'expression de *pucBA* (Steunou *et al.,* 2004).

Chez *Bradyrhizobium* ORS278, le PGC contient deux gènes codant des PpsR nommés *ppsr1* et *ppsr2*. Bien que les deux protéines PpsR présentent un taux d'identité relativement faible entre elles (32 %), elles présentent la même architecture que celle des PpsR déjà connus. Par ailleurs, il est à noter que la protéine PpsR2 ne possède pas de cystéine et de ce fait n'est pas sensible au potentiel redox au contraire de PpsR1. Néanmoins, PpsR2 intervient dans le contrôle de la synthèse du photosystème par la lumière *via* le bactériophytochrome *Br*BphP1 dont le gène est retrouvé contigu à *ppsr2* dans le PGC (Cf. Chapitre III.3). PpsR1,

quant à lui, en conditions oxydantes, forme un octamère *via* des ponts disulfures intermoléculaires (Jaubert *et al.,* 2004). L'analyse phénotypique des mutants *ppsr1* et *ppsr2*, chez ORS278, a mis en évidence un rôle antagoniste de ces deux facteurs de transcription. La protéine PpsR1 active l'expression de certains gènes photosynthétiques, tandis que PpsR2 les répriment (Figure 7). Les facteurs de transcription PpsR1 et PpsR2 se fixent donc sur les mêmes régions promotrices de certains gènes. Cela implique que, chez *Bradyrhizobium* ORS278, la régulation de ces gènes photosynthétiques résulte d'une compétition entre les 2 PpsR. Il est à noter que des expériences d'empreintes à la DNAseI ont montré que, si PpsR1 et PpsR2 ont des cibles de régulation communes comme *bchCXYZ*, *crtEF et crtDC,* ils ont également des cibles spécifiques. En effet PpsR2 est, seule, à pouvoir se fixer en amont des gènes *cycA* et *aerR* (Jaubert *et al.,* 2004).

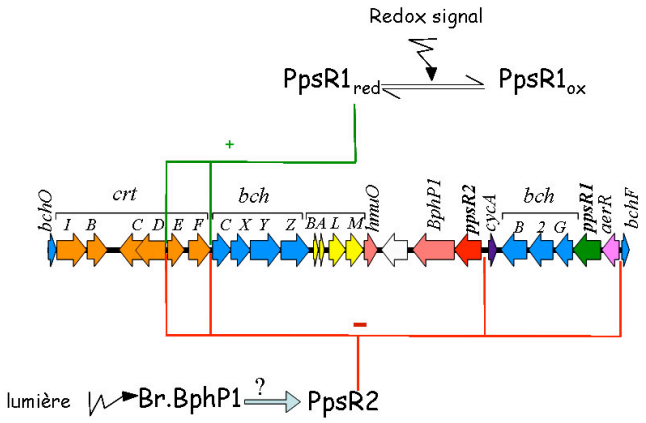


Figure 7 : Rôle des PpsR dans la régulation des gènes photosynthétiques chez *Bradyrhizobium* ORS278 (d'après Elsen *et al.*, 2005).

L'existence d'une interaction directe ou indirecte entre *Br*BphP1 et PpsR2 reste encore à démontrer.

II.3.1.1.b- Les bactériophytochromes

Cette famille de chromoprotéines, sensibles à la lumière rouge et infra-rouge, joue un rôle essentiel dans la régulation des gènes photosynthétiques chez *Rps. palustris* et *Bradyrhizobium* ORS278. La description des modes d'action et des propriétés de cette famille de protéines fait l'objet d'un chapitre spécifique (Chapitre III).

II.3.1.1.c- AppA (Activation of photopigment and puc expression)

A ce jour, la protéine AppA est un régulateur des gènes photosynthétiques retrouvé uniquement chez *Rb. sphaeroides.*

Ce régulateur intègre :

- le signal redox (Gomlesky & Kaplan, 1995 ; Gomlesky & Kaplan, 1997), par la fixation d'un co-facteur de type hémique sur le domaine SCHIC (pour Sensor Containing Heme Instead of Cobalamin) (Moskvin *et al.,* 2007).

- et le signal lumière bleue, par la fixation non covalente d'un co-facteur (type flavine) sur son domaine BLUF (pour Blue light using FAD) (Braatsch *et al.,* 2002 ; Gomelsky & Klug, 2002 ; Masuda & Bauer, 2002).

Les différentes études menées ont permis de déterminer un mode d'action d'AppA en fonction des conditions en oxygène et en lumière chez *Rb. sphaeroides*. Sous faible pression partielle en oxygène et sous faible intensité lumineuse, AppA aurait un rôle activateur de l'expression des gènes photosynthétiques. Il agirait, d'une part, en réduisant PpsR et, d'autre part, en formant un complexe AppA–PpsR empêchant la fixation du répresseur PpsR sur l'ADN (Masuda & Bauer, 2002).

II.3.1.1.d- AerR (Aerobic repressor)

Le gène a*erR* est retrouvé dans le cluster de gènes photosynthétiques des bactéries pourpres et semble être un régulateur spécifique des gènes photosynthétiques. Chez *Rb. sphaeroides*, un homologue de ce gène est retrouvé sous le nom de *ppaA* (photopigment and puc activator) (Gomelsky *et al.,* 2003). Les analyses génétiques et biochimiques, réalisées chez *Rb. capsulatus* et *Rb. sphaeroides,* indiquent que AerR et PpaA interviennent dans la régulation redox-dépendante des gènes photosynthétiques. Cependant, ces deux régulateurs auraient des mécanismes d'action différents :

- En aérobie, PpaA aurait un rôle activateur. Son action pourrait être modulée par la fixation d'un cofacteur de type corrinoïde/vitamine B12. En effet un domaine putatif de fixation de ce type de co-facteur a été décelé (Gomelsky *et al.,* 2003)
- AerR aurait un rôle répresseur sur l'expression de gènes *crtI*, *pucB* et *pufQ*. Bien qu'aucun domaine précis de fixation à l'ADN n'ait pu être caractérisé, AerR semble être capable de se fixer sur la région promotrice de ces trois gènes. De plus, AerR augmente l'affinité de fixation de PpsR à l'ADN. L'hypothèse avancée suggère que AerR interviendrait pour stabiliser la fixation de PpsR à l'ADN (Dong *et al.,* 2002).

II.3.1.2- Les régulateurs globaux

II.3.1.2.a- RegB/RegA

Le système à deux composantes, RegB/RegA (ou PrrB/A chez *Rb. sphaeroides*), a été initialement décrit comme étant un activateur de la synthèse du photosystème en anaérobiose chez *Rb. capsulatus* (Sganga & Bauer, 1992). Cependant, ce système RegB/RegA n'est pas spécifique des gènes photosynthétiques (Elsen *et al.,* 2004). Il contrôle également différents processus métaboliques cellulaires majeurs tels que la fixation du carbone et de l'azote, l'utilisation de l'hydrogène et la synthèse de l'oxydase *cbb3* et de l'ubiquinol oxydase (Vichivanives *et al.,* 2000 ; Elsen *et al.,* 2000 ; Swem *et al.,* 2001). Ce système de transduction du signal est très conservé parmi les protéobactéries (Emmerich *et al.,* 2000). Des homologues de RegB/RegA ont été identifiés chez différentes bactéries photosynthétiques et non photosynthétiques.

RegB est une protéine kinase senseur du potentiel redox qui peut s'autophosphoryler et transmettre son groupement phosphate à RegA, son régulateur de réponse (Inoue *et al.,* 1995 ; Bird *et al.,* 1999). La sensibilité de RegB aux conditions redox ne semble pas dépendre de la présence directe d'oxygène. RegB détecterait plutôt l'état redox cellulaire et celui de la chaîne respiratoire plus particulièrement (Oh & Kaplan, 2001).

Sous sa forme phosphorylée, RegA présente une plus forte affinité pour l'ADN que sous sa forme non phosphorylée. Le site de fixation de ce facteur de transcription reste cependant ambigü. Un site de fixation consensuel a cependant été proposé : TGTcAN$_8$TgACA (Elsen *et al.,* 2005). La phosphorylation de RegA permet l'activation de la transcription de différents gènes. RegA phosphorylé se fixe en amont de gènes impliqués dans la fixation de l'azote (*nifA*), l'utilisation de l'hydrogène (*hupSLC*) (Elsen *et al.,* 2000), la synthèse de cytochromes (*petABC*, *cycA*, *cycY*, *ccoNOPQ*, *cbbI*, *cbbII*) (Swem *et al.,* 2001; Vichivanives et al, 2000), le métabolisme des hèmes (*hemA*, *hemZ*, *hemN*) (Oh *et al.,* 2000). RegA contrôle également l'expression de *regB,* ainsi que sa propre expression en se fixant en amont de l'opéron *senC-regA-hvrA* (Du *et al.,* 1999). Il est à noter que RegA et PpsR peuvent entrer en compétition lorsque leurs sites de fixation respectifs se chevauchent. C'est le cas, par exemple, au niveau de la région promotrice des gènes *puc* chez *Rb. capsulatus* (Bowman *et al.,* 1999).

II.3.1.2.b- FnrL

La protéine FnrL, identifiée chez différentes bactéries pourpres, est homologue au régulateur anaérobique global FNR (fumarate nitrate regulator) d'*E. coli*. FnrL intervient à la fois dans la régulation des gènes impliqués dans la respiration en microaérobie et dans la photosynthèse. Chez *Rb. sphaeroides*, FnrL est indispensable pour une croissance en photosynthèse et en respiration anaérobique (Zeilstra-Ryalls & Kaplan, 1995 ; Zeilstra-Ryalls *et al.,* 1997). Il est sensible au potentiel redox, ce qui affecte son état d'oligomérisation et son activité. Sous de faibles tensions en oxygène, FnrL active l'expression des gènes du métabolisme des hèmes (*hemA, hemZ*, *hemN*) et des gènes photosynthétiques (*puc* et *bchE)*, alors que sous forte tension en oxygène, FnrL réprime l'expression des gènes *hemA* et *puc* (Zeilstra-Ryalls & Kaplan, 1996 ; Zeilstra-Ryalls *et al.,* 1998 ; Oh *et al.,* 2000). Chez *Rb. capsulatus,* FnrL n'est pas nécessaire à la croissance en photosynthèse mais intervient dans la croissance en respiration anaérobie (Smart *et al.,* 2004). Enfin, chez *Rubrivivax gelatinosus,* FnrL est impliqué dans le contrôle de la respiration en régulant *hemN* et aussi dans le contrôle de la photosynthèse en régulant à la fois *hemN* et *bchE* (Ouchane *et al.,* 2007). FnrL est donc un régulateur global anaérobique sensible au potentiel redox dont l'action varie suivant les souches.

II.3.2- Régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle

Si la régulation transcriptionnelle permet de synchroniser l'expression des gènes photosynthétiques, leurs produits ne sont pas tous nécessaires en quantités stoechiométriques pour former un photosystème fonctionnel. C'est le cas par exemple de l'opéron *pufQBALMX*. Trois populations d'ARNm sont retrouvés, il s'agit de : *pufQBALMX*, *pufBALMX*, et *pufBA*. Ces trois ARNm ont une stabilité différente qui peut être affectée de surcroît par les conditions en oxygène (Klug *et al.,* 1987 ; Klug, 1991). Cette différence de stabilité correspond à une différence dans la quantité de protéines synthétisées (Belasco *et al.,* 1985).

La mise en place du photosystème est également régulée au niveau post-traductionnel. Ces mécanismes de régulation font intervenir différentes molécules telles que les pigments photosynthétiques et certaines protéines comme PucC et LhaA. Le rôle de ces différentes molécules est d'incorporer les protéines traduites et les pigments, de les assembler au sein de la membrane et de stabiliser le complexe ainsi formé (Takemoto & Lascelles, 1973).

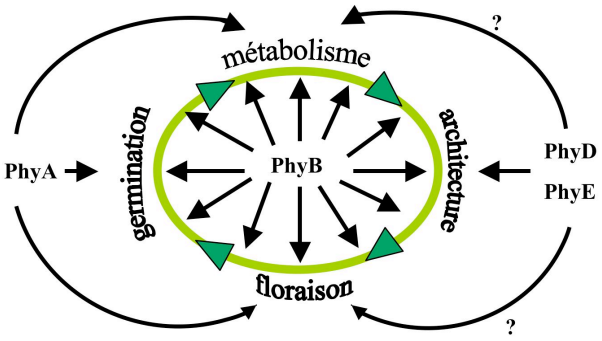
III- Les bactériophytochromes

Les plantes adaptent leur développement en fonction de l'intensité, de la direction, de la périodicité de la lumière mais aussi en fonction des qualités spectrales de celle-ci. Pour ces raisons, les plantes ont développé un grand nombre de photorécepteurs. Chez les plantes supérieures, il existe principalement trois familles de senseurs de lumière :

- les cryptochromes et les phototropines qui absorbent dans l'UV-A et le bleu (Li & Yang, 2007 ; Briggs *et al.,* 2001).

- et les phytrochromes qui absorbent dans la lumière rouge/infra-rouge (pour revue voir Quail, 2002b).

Initialement considérés comme spécifiques du règne végétal ; les phytochromes sont présents chez toutes les plantes à fleurs et les cryptophytes. Ils ont été découverts pour la première fois en 1959 (Butler *et al.,* 1959). Il a été montré que les phytochromes sont des chromoprotéines, sensibles aux rayonnements rouge/infra-rouge, qui interviennent dans de multiples processus vitaux pour la plante tels que la germination, la floraison, l'architecture de la plante, la dé-étiolation, le phototropisme ou encore le syndrome d'évitement de l'ombre, etc (pour revue voir Fankhauser, 2001). La plante modèle, *Arabidopsis thaliana*, possède dans son génome 5 gènes codant des phytochromes, nommés PhyA-PhyE, avec un rôle central du phytochrome PhyB (Figure 8) (Quail, 1997 ; Smith, 2000).



<u>Figure 8</u> : Schématisation des rôles connus ou supposés des phytochromes sur le développement des plantes (Smith, 2000).

Récemment, grâce au développement des programmes de séquençage des génomes procaryotes, de nombreux homologues de phytochromes ont été découverts chez les microorganismes. Des homologues ont ainsi été identifiés chez des cyanobactéries (Cphs), des protéobactéries photosynthétiques et non photosynthétiques (BphPs), et également chez des champignons (Fphs) (Hughes *et al.,* 1997 ; Jiang *et al.,* 1999 ; Davis *et al.,* 1999 ; Galagan *et al.,* 2003). Il est à présent admis que ces protéines, identifiées chez les procaryotes, constituent les formes ancestrales des phytochromes de plantes. La suite de ce chapitre présente essentiellement les structures, les propriétés spectrales et les fonctions des bactériophytochromes.

III.1 Les bactériophytochromes (BphP) : senseurs de lumière

Tous comme les phytochromes, leurs homologues bactériens sont sensibles à la lumière rouge/infra-rouge. Cette superfamille de protéines est constituée de deux domaines :

- un domaine senseur de lumière : le PCD (pour Photosensory Core Domain) situé à l'extrémité N-terminale de la protéine.
- un domaine transmetteur de l'information situé à l'extrémité C-terminale.

III.1.1 PCD : domaine senseur de lumière

La sensibilité à la lumière est assurée chez les (bactério)phytochromes par la fixation d'un chromophore sur l'apoprotéine. Ce chromophore est un tétrapyrrole linéaire issu de la dégradation enzymatique d'un hème (Figure 9). Dans le cas des bactéries pourpres, il s'agit habituellement de la biliverdine. Ce chromophore provient de la simple linéarisation d'un hème par l'enzyme hème oxygénase (HmuO). Le chromophore se lie à la protéine de manière autocatalytique en formant une liaison covalente avec un résidu de cystéine situé à l'extrémité N-terminale de la protéine (Bhoo *et al.,* 2001).

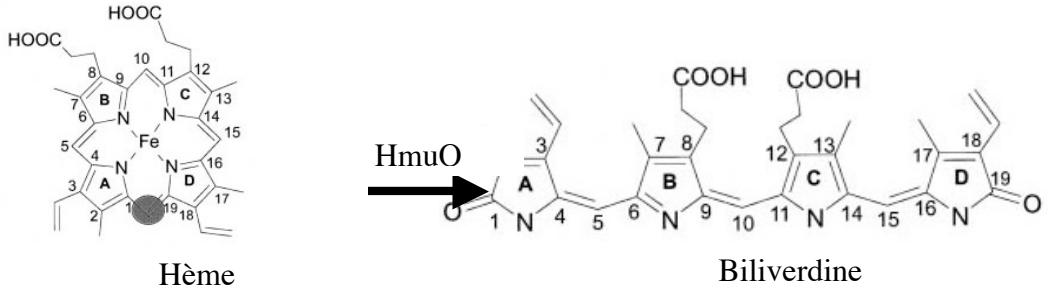


Figure 9 : Formation de la biliverdine à partir d'un hème (Hugues & Lamparter, 1999).

Le PCD est le domaine caractéristique de tous les phytochromes, par lequel l'identification de nouveaux membres de cette superfamille est envisageable (Karniol *et al.,* 2005). Il se compose de trois sous-domaines : PLD, GAF, et PHY (Figure 10).

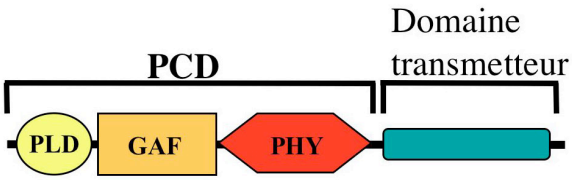


Figure 10 : schématisation des sous-domaines formant le domaine senseur de lumière (PCD).

- Le domaine PLD (PAS-like Domain)

Situé à l'extrémité N-terminale de la protéine, il est retrouvé chez la plupart des bactériophytochromes (Lamparter *et al.,* 2004 ; Karniol *et al.,* 2005). Ce domaine participe à la fixation du chromophore. En effet, c'est dans ce sous-domaine que se situe le résidu de cystéine nécessaire à cette fixation. Des études récentes ont mis en évidence que d'autres acides aminés du PLD interviennent dans la stabilité de la liaison de la protéine avec le chromophore (Karniol *et al.,* 2005).

- Le domaine GAF (cGMP phosphodiesterases/adenylate cyclases/ FhlA).

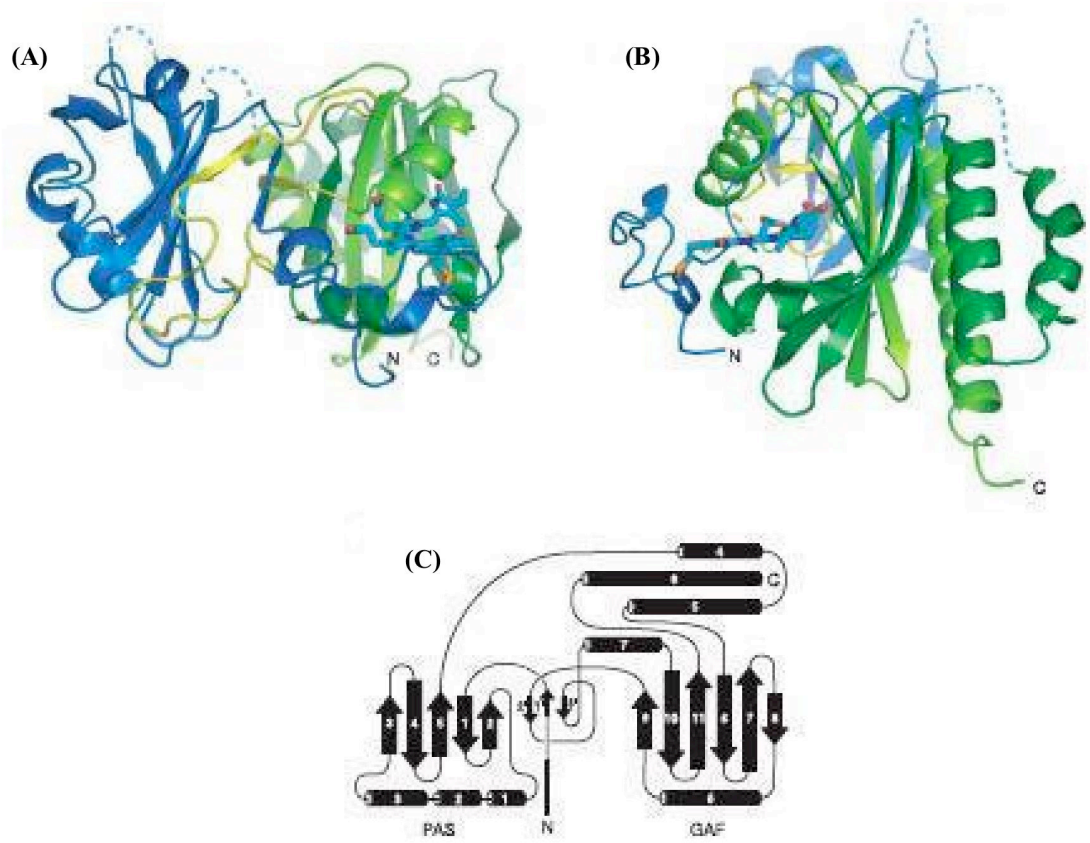
C'est une région d'environ 150 acides aminés qui est retrouvée dans de nombreuses molécules de signalisation. Ce domaine est souvent associé aux domaines PAS (Aravind & Ponting, 1997). Chez les phytochromes de plantes et de cyanobactéries, le domaine GAF fixe de façon covalente le chromophore (Wu & Lagarias, 2000).

- Le domaine PHY (Phytochrome)

Ce domaine est la signature spécifique des phytochromes. Il est nécessaire au maintien des propriétés photochimiques (photoconversion) des BphPs (Karniol *et al.,* 2005). Des études ont montré qu'il n'était pas nécessaire à la fixation du chromophore sur la protéine, cependant il joue un rôle important dans la stabilisation de la forme Pfr chez différents BphPs retrouvés par exemple chez *Agrobacterium tumefaciens* ou *Deinococcus radiodurans* (Karniol & Vierstra, 2003 ; Karniol *et al.,* 2005).

III.1.2 Structure tridimentionnelle

La première étude de cristallographie sur un bactériophytochrome porte sur une protéine tronquée de *Deinococcus radiodurans* ne contenant que les sous-domaines PLD et GAF (Wagner *et al.,* 2005). Cette analyse a permis de mettre en évidence une structure particulière dénommée : le « trefoil knot ». Ce « nœud de trèfle » est formé par l'enroulement du domaine GAF autour de l'extrémité N-terminale de la protéine, en avant du PLD (Figure 11).



<u>Figure 11</u> : Structure tridimentionnelle du PCD chez *Deinococcus radiodurans.*

(A) et (B) La région N-terminale représentée ici consiste en un domaine PLD en bleu et un domaine GAF en vert. Le lasso qui s'enroule autour de l'extrémité N-terminale est représenté en jaune. La structure en bâtonnet correspond à la biliverdine et le résidu de cystéine qui lie de manière covalente la biliverdine est représenté en orange. Les lignes en pointillés représentent les résidus absents du modèle.
(C) Topologie du PCD. Les nombres font référence aux structures secondaires.

Cette structure permet de relier les deux domaines PLD et GAF et de maintenir le chromophore dans une poche. Au sein de celle-ci, certains acides aminés sont essentiels à la bonne orientation du chromophore. Le plus important est certainement le résidu de cystéine C_{24}. Celui-ci intervient dans une liaison covalente avec le carbone 3 du cycle A de la biliverdine. D'autres acides aminés tels que des tyrosines, des aspartates et des phénylalanines

interviennent dans des liaisons faibles (type hydrogène) avec le chromophore (Wagner *et al.,* 2005 ; Wagner *et al.,* 2007) (Figure 12).

Les auteurs suggèrent que cette conformation singulière pourrait donc stabiliser le PCD et participer à la transmission du signal (Wagner *et al.,* 2005).

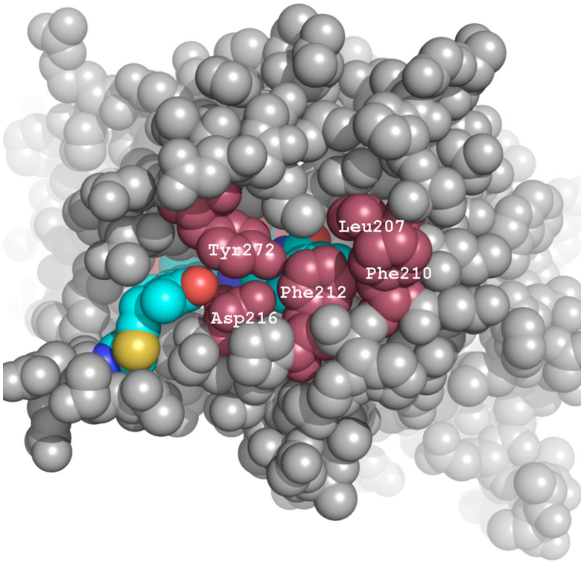


Figure 12 : Représentation de la structure du domaine de liaison du chromophore du *Rp*BphP3 (Yang *et al.*, 2007).

Les résidus Tyr_{272}, Asp_{216} et Leu_{207}-Phe_{210}-Phe_{212} (en bordeaux) interviennent dans des liaisons faibles (forces de Van Der Waals) qui stabilisent le chromophore (en cyan) et protègent le pyrrol D localisé dans le domaine GAF.

Depuis, une analyse structurale, portant sur l'extrémité N-terminale complète (PLD-GAF-PHY), a été réalisée sur deux bactériophytochromes (*Rp*BphP2 et *Rp*BphP3) retrouvés chez *Rps. palustris*. Cette étude a mis en évidence la contribution du domaine PHY dans la stabilité et la bonne conformation de la poche contenant ce chromophore. Elle a aussi permis d'identifier, sur l'ensemble du PCD, des résidus clés dans la régulation de la photoconversion des BphPs (Yang *et al.,* 2007).

Aucune analyse structurale portant sur un bactériophytochrome complet n'a été effectuée à ce jour. Cela résulte certainement d'un problème de stabilité de la protéine et du mélange des deux formes spectrales. L'obtention de bactériophytochromes cristallisés sous leurs deux conformations (Pr et Pfr) et leur analyse constituent, à l'heure actuelle, l'un des principaux enjeux dans la compréhension des mécanismes de perception de la lumière et dans la transduction du signal chez ces chromoprotéines.

III.1.3 Propriétés spectrales

C'est le chromophore qui, de par sa sensibilité à la lumière, confère à la protéine des propriétés spectrales caractéristiques. Les bactériophytochromes, tout comme les phytochromes de plantes, existent sous deux conformations photoconvertibles : une forme Pr absorbant la lumière rouge et une forme Pfr absorbant la lumière infra-rouge (Figure 13). Cependant tous les phytochromes n'absorbent pas aux mêmes longueurs d'ondes. Les phytochromes de plantes absorbent à 660 et 730 nm, respectivement pour les formes Pr et Pfr, tandis que les BphPs absorbent à de plus grandes longueurs d'ondes. La forme Pr absorbe vers 700 nm et la forme Pfr vers 750 nm. Ces différences sont attribuées à la nature du chromophore fixé ; phytochromobiline pour les phytochromes de plantes, phycocyanobiline chez les Cphs, biliverdine pour les BphPs et les Fphs (Quail *et al.,* 1995 ; Smith, 2000).

Le premier évènement photochimique intervenant dans la photoconversion Pr/Pfr des (bactério)phytochromes est provoqué par une rotation du dernier pyrrole (pyrrole D) du chromophore. En effet, la lumière provoque une isomérisation Z/E de la double liaison C15=C16 entre les pyrroles C et D du chromophore. L'isomérisation est suivie par des transitions plus lentes *via* différents intermédiaires aux caractéristiques spectrales distinctes (Heyne *et al.,* 2002 ; Chen *et al.,* 1996 ; Borucki *et al.,* 2005). Il est supposé que ces événements s'accompagnent de changements structuraux au sein du chromophore et dans la protéine qui aboutissent à un changement des propriétés spectrales.

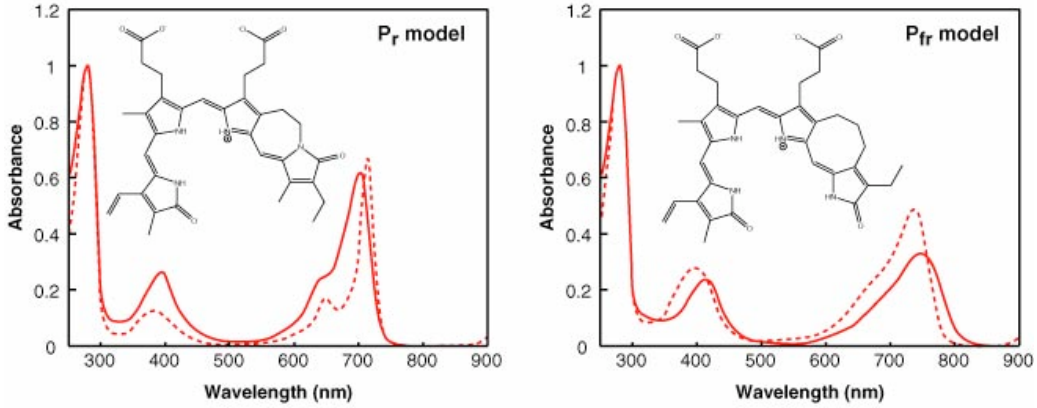


Figure 13 : Représentation schématique des spectres d'absorption Pr et Pfr (Rockwell *et al.*, 2006)

Les spectres sont obtenus à partir du bactériophytochrome Agp1 d'*Agrobacterium tumefaciens* lié à 2 types de chromophores : la biliverdine (ligne continue) et un chromophore synthétique (lignes en pointillés). A gauche la forme Pr de Agp1 obtenue par sa liaison avec la biliverdine et avec le chromophore synthétique bloqué sous la conformation isomère C15-Z anti. A droite la forme Pfr de Agp1 lié à la biliverdine ou à l'isomère synthétique C15-E,anti.

Chez la plupart des phytochromes de plantes la forme Pfr est la forme active, elle est instable. La restauration de la forme Pr au cours du temps est connue sous le terme de « dark reversion ». Cette conversion a été peu étudiée et n'est pas très bien caractérisée. Cependant elle reste un facteur important du ratio Pr/Pfr. Des études menées chez les plantes ont mis en évidence que le retour à l'état stable dépend du taux de fluence (Hennig & schäfer, 2001) et peut être réduit par l'interaction avec d'autres protéines (Sweere *et al.,* 2001). Chez certains bactériophytochromes la forme Pr peut être la forme active, dans ce cas, c'est la forme Pfr qui est stable à l'obscurité (Giraud *et al.,* 2002). Ces bactériophytochromes sont appelés BathyBphPs, cependant les mécanismes mis en jeu dans la stabilité de la forme Pfr ne sont pas encore bien connus (Rockwell *et al.,* 2006).

III.2 Les BphP : transmetteurs du signal lumineux.

Tous les organismes vivants peuvent détecter des changements environnementaux et mettre en place des mécanismes de réponses de façon à s'adapter à ces changements. Les études portant sur les systèmes de transduction du signal ont permis de définir un certain nombre de voies de signalisation. Les bactériophytochromes possèdent pour la plupart un domaine de transmission du signal situé à l'extrémité C-terminale (Figure 14). Chez ces protéines, le domaine transmetteur communément retrouvé est le domaine histidine-kinase. Il semblerait donc que la voie de signalisation, majoritairement utilisée par les bactériophytochromes, fasse intervenir des cascades de phosphorylation pour transmettre l'information. Cependant, d'autres mécanismes de transfert de l'information peuvent être retrouvés chez les bactériophytochromes. Certains présentent des domaines PAS/PAC qui interviennent dans les interactions protéine/protéine ou des domaines GGDEF/EAL impliqués dans la synthèse du di-GMP cyclique (Römling, 2005).

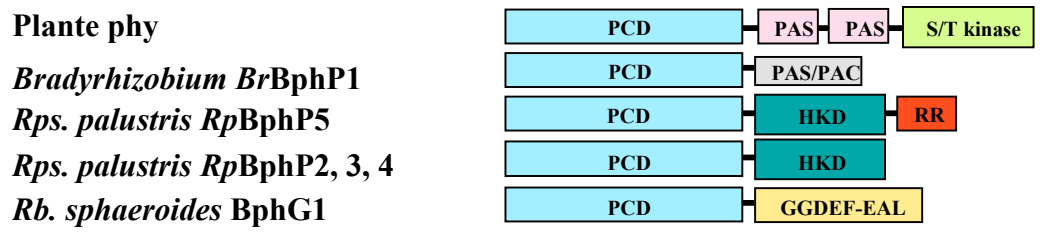


Figure 14 : Structure des bactériophytochromes.

Les bactériophytochromes présentent tous un domaine de liaison du chromophore (PCD : photosensory core domain) à l'extrémité N–terminale et différents domaines transmetteurs à l'extrémité C-terminale (PAS et PAS/PAC : Per/Arnt/Sim domaine, S/T kinase : sérine/thréonine kinase, HKD : domaine Histidine Kinase, RR : Domaine Régulateur de Réponse, GGDEF-EAL : domaine diguanylate cyclase/phosphodiesterase).

III.2.1 Domaine histidine-kinase

Alors que le mode d'action des phytochromes reste encore très flou, les séquences des bactériophytochromes ont montré très clairement que ces protéines présentent majoritairement une activité kinase.

Chez les bactéries, les histidines-kinases sont souvent impliquées dans des réponses adaptatives face à de nombreux stimuli (conditions environnementales, osmolarité, niveaux d'azote, réponse aux pathogènes) (Appleby *et al.,* 1996). La plupart d'entre elles présente un domaine caractéristique : le domaine histidine-kinase. Ce domaine comprend généralement 4 motifs caractéristiques nécessaires à la catalyse (H, N, D/F et G) (Parkinson & Kofoid, 1992). Des études biochimiques montrent que le HKD fonctionne en dimère. Une sous-unité est phosphorylée en trans sur un résidu histidine par l'autre sous-unité du dimère. Le groupement phosphoryl peut alors être transféré sur l'aspartate d'un domaine régulateur de réponse situé sur la même protéine ou non. Ces circuits sont dénommés systèmes à deux composants ou phosphorelais selon leur degré de complexité (Figure 15) (Nixon *et al.,* 1986 ; Parkinson & Kofoid, 1992). Ils régulent une large variété de réponses cellulaires telles que la chémotaxie, l'osmorégulation, la sensibilité à la lumière ou encore la sporulation.

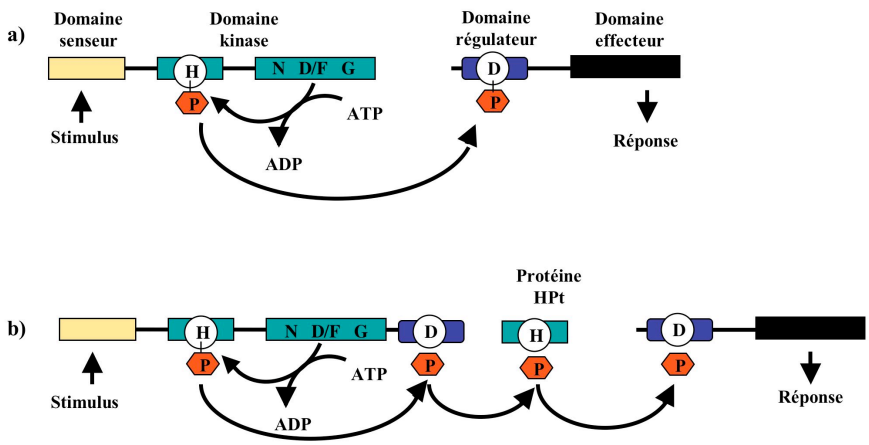


Figure 15: Système à deux composants, phosphorelais (West & Stock, 2001).

(a) Système à deux composants : Ce système est constitué d'un domaine histidine-kinase dimérique et d'un régulateur de réponse. Sous l'action d'un stimulus environnemental perçu par le domaine senseur, le domaine kinase lie l'ATP sur son site de fixation schématisé par les motifs N D/F G et catalyse son autophosphorylation en trans sur un résidu d'histidine. Le groupement phosphate est alors transféré au domaine régulateur sur un résidu conservé d'aspartate. La phoshorylation du domaine régulateur contrôle l'action du domaine effecteur qui initie une réponse cellulaire spécifique.
(b) Phosphorelais : Ce processus est couramment initié par une protéine hybride présentant à la fois un domaine histidine-kinase et un domaine régulateur de réponse à l'extrémité C-terminale. Cette voie de signalisation fait habituellement intervenir différents intermédiaires dont une protéine HPt (His containing phosphotransfer) permettant le transfert du groupement phosphate entre deux domaines régulateurs.

La plupart des bactériophytochromes agissent donc comme de véritables kinases sensibles à la lumière dont l'état de phosphorylation dépend de la conformation du BphP. Selon la protéine considérée, la conformation active qui s'autophosphoryle peut être Pr ou Pfr. Les analyses par cristallographie et microscopie ont permis de mettre en évidence l'importance du PCD dans la capacité d'autophosphorylation de la protéine (Evans *et al.,* 2006).

Par ailleurs, il a pu être montré qu'un phosphotransfertest possible du bactériophytochrome vers un régulateur de réponse (RR). Chez les bactéries, le gène codant le régulateur de réponse est souvent retrouvé à proximité du gène codant l'histidine-kinase (Karniol & Viestra, 2003 ; Yeh *et al.,* 1997). Parfois, le RR est directement associé à la protéine (Kyndt *et al.,* 2004). Cependant, la suite de la chaîne de signalisation et les gènes régulés demeurent la plupart du temps inconnus.

III.2.2 Autres domaines transmetteurs

III.2.2.1 GGDEF-EAL

Ces deux domaines, DDGEF et EAL sont retrouvés fréquemment chez les bactéries où ils contrôlent le turnover du di-GMP cyclique. Cette molécule est un messager secondaire ubiquitaire des bactéries. Le di-GMPc affecte la formation et la structure des biofilms bactériens, la motilité des pili et des flagelles, l'expression des gènes et les interactions hôte-pathogène (pour revue Römling *et al.,* 2005). Le domaine GGDEF possède une activité diguanylate-cyclase c'est-à-dire qu'il synthétise le di-GMP cyclique à partir de deux molécules de GMP (Paul *et al.,* 2004). Le domaine EAL possède, lui, une activité phosphodiesterase. Il dégrade le di-GMP cyclique en di GMP-linéaire (Ross *et al.,* 1987). Ces domaines sont souvent liés à un domaine régulateur tel que des domaines phosphorylables ou sensibles à l'oxygène.

Des études sur le bactériophytochrome BphP1 de *Rb. sphaeroides,* contenant à l'extrémité C-terminale ces deux domaines, ont révélé que :

- cette protéine existe sous deux conformations Pr et Pfr,
- elle possède les deux activités enzymatiques mais, seule l'activité diguanylate-cyclase est lumière dépendante.
- une simple photoconversion suffit pour passer d'une activité enzymatique à l'autre.

Cependant le rôle de ce BphP chez *Rb. sphaeroides* n'a pas encore été identifié (Tarutina *et al.,* 2006).

III.2.2.2 Domaine PAS/PAC

Le domaine PAS (Per/Arnt/Sim) est nommé selon les trois protéines dans lesquelles il a été trouvé initialement :

Per- period circadian protein

Arnt – Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein

Sim- single-minded protein

Ce domaine est retrouvé chez de nombreuses protéines de signalisation où il sert de senseur de signal (Hefti *et al.,* 2004). Les domaines PAS sont capables de fixer des molécules de petites tailles (flavines, hèmes, composés aromatiques) qui servent de groupes prosthétiques sensibles aux états redox et aux variations d'oxygène et de lumière (Taylor & Zhulin, 1999). Par ailleurs, ces domaines interviennent également dans des interactions protéine-protéine. Les domaines PAS sont souvent associés aux domaines PAC et forment ensemble le domaine tridimentionnel PAS conservé (Hefti *et al.,* 2004). *Rhodopseudomonas palustris* et *Bradyrhizobium* ORS278 synthétisent un bactériophytochrome (respectivement *Rp*BphP1 et *Br*BphP1) qui présente ce domaine particulier. Ce bactériophytochrome, situé dans le PGC, régule l'expression du photosystème chez ces deux bactéries (cf ci-dessous) (Giraud *et al.,* 2002).

III.3 Rôle des bactériophytochromes

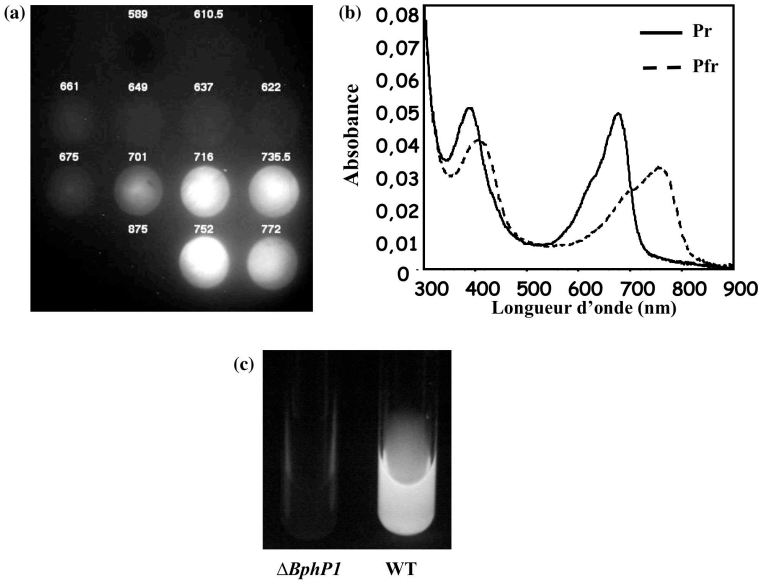
Bien que de nombreux bactériophytochromes aient été caractérisés au niveau spectral, les fonctions *in vivo* et les mécanismes d'action de la plupart d'entre eux restent encore à découvrir. A l'heure actuelle, seules quelques fonctions ont été attribuées à des bactériophytochromes :

- la protéine *Dr*BphP contrôlerait la synthèse de caroténoïdes chez *Deinococcus radiodurans,* ce qui permettrait à la bactérie de se protéger de la lumière visible (Davis *et al.,* 1999),

- Ppr serait impliquée dans le contrôle de la synthèse de la chalcone synthase chez *Rhodospirillum centenum* (Jiang *et al.,* 1999).

-Les bactériophytochromes *Br*BphP1 et *Rp*BphP1, identifiés respectivement chez *Bradyrhizobium* ORS278 et *Rps. palustris* souche CEA001, contrôlent la synthèse du photosystème chez ces deux bactéries (Giraud *et al.,* 2002).

Lors de cette dernière étude, il a été montré que les gènes *Br*BphP1 et *Rp*BphP1 sont retrouvés au sein des PGC chez les deux bactéries. De plus il a clairement été établi que ces bactériophytochromes activent l'expression des principaux gènes photosynthétiques (*puf, crt, bch*) . Ainsi chez ces deux bactéries, en semi-aérobiose, le spectre d'action de la lumière sur la synthèse du photosystème (Figure 16a) se superpose au spectre d'absorption de la forme Pfr du bactériophytochrome (Figure 16b). De plus, chez le mutant *BrBphP1-,* aucune synthèse de photosystème n'a pu être mise en évidence quelques soient les conditions de lumière (Figure 16c). Cette étude a constitué la première démonstration du rôle précis joué par un bactériophytochrome.



<u>Figure 16</u> : Implication du bactériophytochrome *Br*BphP1 dans la synthèse du photosystème chez *Bradyrhizobium* ORS278 (Giraud *et al.*, 2002).

(a) Visualisation de la fluorescence réémise par les bactériochlorophylles du photosystème en fonction de la longueur d'onde d'éclairement. (b) Spectre d'absorption des deux conformations photoconvertibles de *Br*BphP1 reconstitué avec la biliverdine. (c) Visualisation par fluorescence du photosystème chez la souche sauvage (WT) ORS278 et de son absence chez le mutant Δ*BrBphP1*.

Chez les deux bactéries étudiées (ORS278 et *Rps. palustris* CEA001), un gène *ppsR* (*ppsR2*) est retrouvé contigu au gène *BrBphP1*. Une étude, réalisée chez la souche ORS278, a montré que le mutant *ppsR2*- présente une synthèse constitutive du photosystème quelques soient les conditions de lumière, ce qui n'est pas le cas chez la souche sauvage. Les résultats

suggèrent que *Br*BphP1 et PpsR2 appartiennent ainsi à la même voie de signalisation et que *Br*BphP1 sous sa forme Pr jouerait un rôle activateur en levant l'effet répresseur de PpsR2.

Il est intéressant de noter que chez la souche modèle CGA009 de *Rps. palustris* (dont le génome a été entièrement séquencé) des mutations portant sur ces deux principaux régulateurs ont été mises en évidence :

- un décalage de phase sur le gène *RpBphP1*.
- une mutation ponctuelle dans le gène *ppsR2.* Celle-ci entraîne le changement d'un résidu arginine en résidu cystéine au niveau du motif HTH de la protéine.

Chez cette souche bactérienne, une synthèse constitutive du photosystème est observée, ce qui n'est pas le cas chez la souche CEA001. Cette synthèse résulte sûrement de l'inactivation de PpsR2 et *Rp*BphP1.

Il est important de noter que contrairement à la souche CEA001, la souche CGA009 est une bactérie qui a été manipulée et repiquée successivement durant de nombreuses années en laboratoire. Il est ainsi probable que l'absence de pression de sélection, due aux conditions de culture en laboratoire, ait entraîné une dégénérescence de ces principaux régulateurs devenus non essentiels à la survie de la bactérie (Giraud *et al.,* 2004).

IV- *Rhodopseudomonas palustris*

IV.1 Taxonomie

Rps. palustris est une bactérie pourpre, phototrophe, non sulfureuse que l'on retrouve dans de nombreux écosystèmes terrestres et marins. *Rhodopseudomonas palustris* est une bactérie gram négative qui appartient à la classe des α-*proteobacteria.* C'est une bactérie qui présente un mode de reproduction particulier. Elle se multiplie par bourgeonnement et division cellulaire asymétrique. D'une cellule mère se forment deux cellules filles, une mobile et l'autre non (Whittenbury & Lee, 1967).

Une analyse phylogénétique basée sur l'ADNr 16S (Figure 17) montre que cette espèce est très proche du genre *Bradyrhizobium*. Contrairement aux bactéries de ce genre, qui sont capables de s'associer symbiotiquement à des plantes de la famille des légumineuses,

aucune interaction *Rps. palustris*/plante n'a été répertoriée à ce jour. Il est à noter que les *Bradyrhizobium* sont des bactéries non photosynthétiques, à l'exception des souches capables de noduler les tiges de certaines légumineuses aquatiques (*Aeschynomene*) telles que les souches ORS278 et BTAi1.

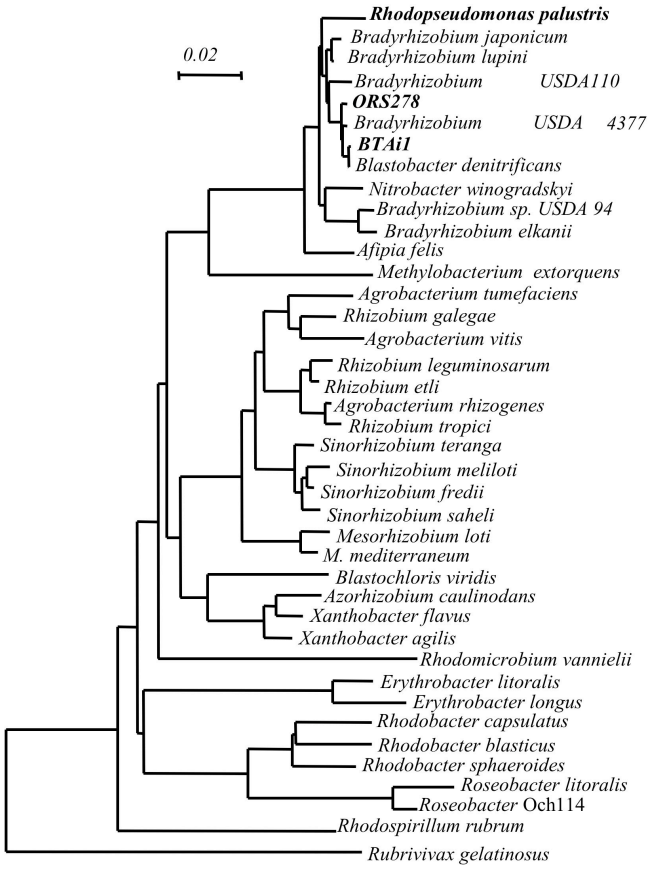
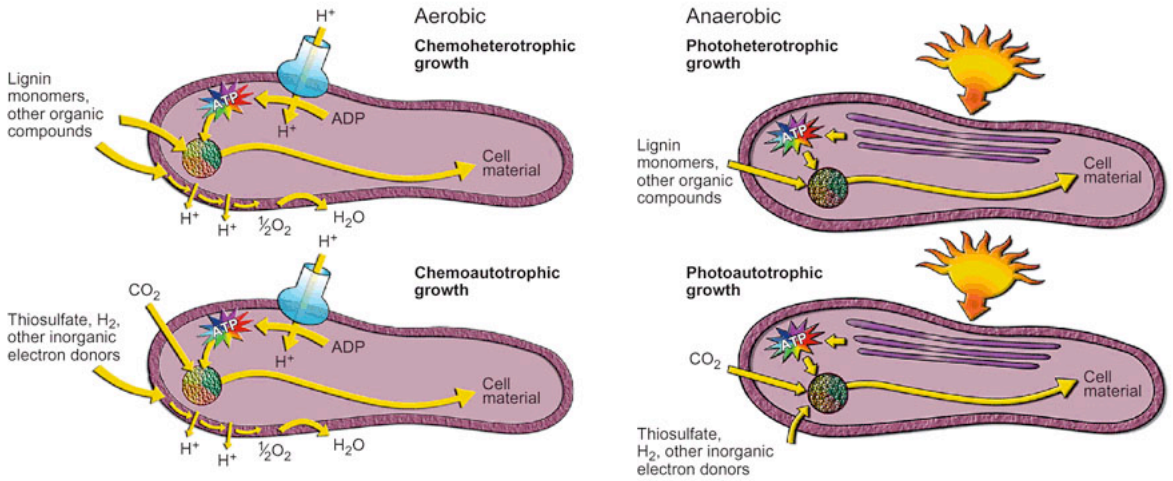


Figure 17 : arbre phylogénétique basé sur l'ADNr 16S.

La grande capacité d'adaptation du métabolisme énergétique de *Rps. palustris* est connue depuis longtemps des microbiologistes. Cette bactérie peut s'adapter à des conditions environnementales nombreuses et variées. Elle est capable de croître avec ou sans oxygène et utilise indifféremment de nombreuses formes de donneurs d'électrons inorganiques, de carbone et d'azote (Sasikala & Ramana, 1998). Cette bactérie peut se développer selon les 4 modes énergétiques qui supportent la vie (Figure 18) :

- photoautotrophe (ou photosynthétique), la lumière fournit l'énergie et la source de carbone est le CO_2,
- photohétérotrophe, elle s'appuie sur une énergie lumineuse et sur les composés orgnaniques comme source de carbone,
- chimioautotrophe, son énergie provient des composés inorganiques et sa source de carbone est le CO_2,

- chimiohétérotrophe, le carbone et l'énergie ont pour origine les composés organiques.



<u>Figure 18</u> : La physiologie de *Rps. palustris* (Larimer *et al.*, 2004).

Représentation schématique des 4 voies métaboliques utilisées par *Rps. palustris* : la chimiohétérotrophie, la chimioautotrophie, la photohétérotrophie et la photoautotrophie. Le cercle multicolore localisé dans chaque cellule représente l'ensemble des réactions enzymatiques intervenant dans le métabolisme central.

En semi-aérobiose ou anaérobiose, *Rps. palustris* utilise préférentiellement la photosynthèse comme voie énergétique. L'appareil photosynthétique de cette bactérie est très développé et présente plusieurs complexes distincts d'antennes collectrices de lumière (LH1, LH2 et LH4). La proportion relative des différentes antennes périphériques (LH2, LH4) varie suivant différents facteurs environnementaux (lumière, oxygène). Cela permettrait à la bactérie d'adapter la structure de son appareil photosynthétique à la lumière ambiante (Evans *et al.*, 1990 ; Hartigan *et al.*, 2002).

Par ailleurs, *Rps. palustris* possède de nombreuses capacités intéressantes pour l'activité humaine :

- Elle convertit l'azote atmosphérique en ammonium et en dihydrogène grâce à des nitrogénases. Le dihydrogène ainsi produit pourrait être utilisé comme un biocarburant (Barbosa *et al.,* 2001 ; Rey *et al.,* 2007).
- Elle utilise de nombreux composés xénobiotiques. La dégradation de ces polluants environnementaux suggère que *Rps. palustris* pourrait être capable d'aider à la détoxication des habitats pollués (McGrath & Harfoot, 1997).
- Elle dégrade et recycle de nombreux composés aromatiques (Egland *et al.,* 1997) intervenant dans la formation de la lignine. Ce polymère, principal constituant du bois,

représente de l'ordre de 20 à 30 % du carbone de la biomasse végétale. C'est, après la cellulose, le deuxième composé organique de la biosphère et une ressource naturelle renouvelable et abondante. Les lignines sont fortement recherchées dans le bois de chauffage pour leur pouvoir calorifique important. En revanche, elles sont gênantes pour la fabrication du papier. Les traitements chimiques actuels, utilisés par l'industrie papetière et visant à éliminer la lignine, sont très polluants. Des procédés propres de conversion biotechnologique, utilisant des microorganismes, sont donc à l'étude.

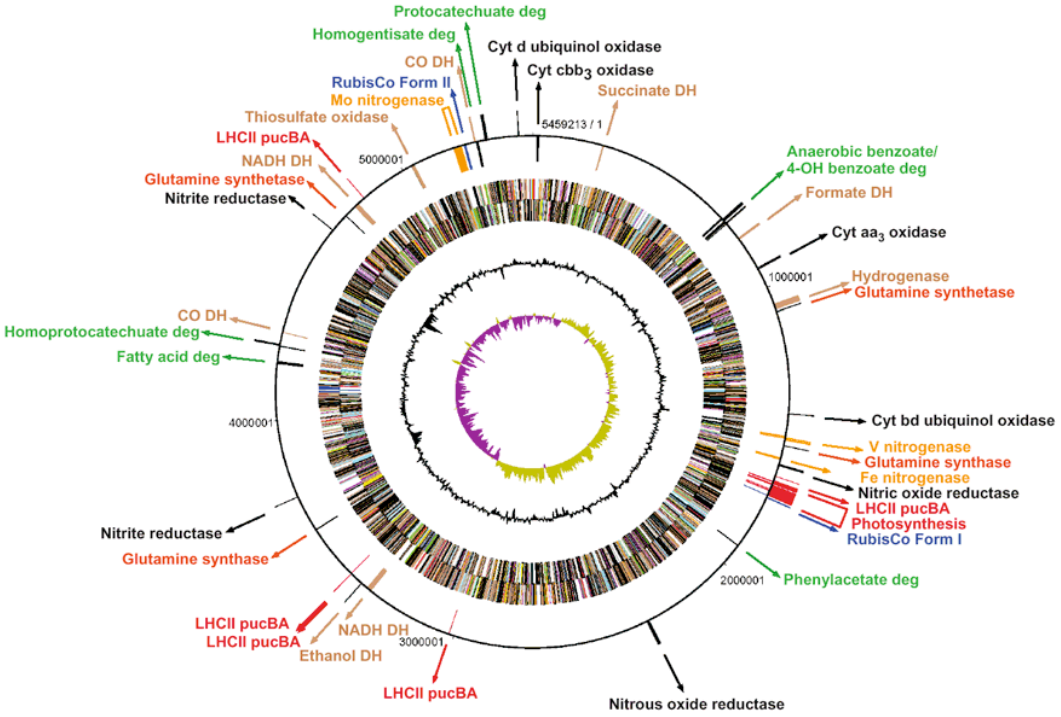
Par ses possibilités métaboliques, *Rps. palustris* est à la fois une bactérie à fort potentiel biotechnologique et un modèle de choix pour l'étude et la compréhension des mécanismes de dégradation et de recyclage du carbone. Ce sont ces caractéristiques qui ont conduit le DOE Genome Institute à séquencer le génome complet de cette bactérie, dans le cadre du programme « gestion du carbone ».

IV.2 Caractéristiques génomiques

Le séquençage de la souche CGA009 de *Rps. palustris* a mis en évidence la présence, chez cette bactérie, d'un chromosome de 5,46 Mb avec 4836 gènes prédits et d'un petit plasmide d'environ 8400 pb. Il est à noter que le génome de CGA009 présente peu de séquences répétées et de transposons (Larimer *et al.,* 2004). Le séquençage a révélé l'existence de nombreux gènes pouvant être impliqués dans l'adaptabilité métabolique de *Rps. palustris* (Figure 19). Parmi ceux-ci, nous pouvons citer 3 nitrogénases intervenant dans la fixation de l'azote, 2 RubisCO (formes I et II) intervenant dans la fixation du CO_2, 5 voies de clivage de cycles benzéniques et 4 opérons *pucBA* complets. Trois opérons *pucBA* codent les antennes LH2 (*pucBA.a .b* et *e*), l'opéron *pucBA.d* code des antennes LH4 (Tadros & Waterkamp, 1989). Il existe un cinquième opéron (*pucBA.c*) qui présente un décalage de phase au niveau du gène *pucBA.b* ce qui laisse supposer que cet opéron n'est pas fonctionnel (Tableau II, chapitre IV.3). Deux des 4 opérons *pucBA* complets sont localisés à proximité des gènes codant les bactériophytochromes *Rp*BphP2, *Rp*BphP3 et *Rp*BphP4. Un lien entre ces bactériophytochromes et les antennes collectrices de lumière est donc envisageable.

De par ses grandes capacités d'adaptation métabolique, *Rps. palustris* possède également un grand nombre de senseurs capables de réagir aux diverses conditions environnementales. Ces nombreux senseurs permettent une régulation très fine de l'expression des gènes nécessaires à la survie et à la croissance bactérienne. Ainsi, le génome de cette bactérie présente 451 gènes codant des protéines de régulation ou de signalisation.

Parmi ces différents gènes, notons la présence de 63 gènes codant des protéines de transduction du signal de type histidine-kinase et 79 gènes codant des protéines de type régulateur de réponse.



<u>Figure 19</u> : Représentation du chromosome de la souche CGA009 de *Rps. palustris*.

De l'extérieur vers l'intérieur : Le premier cercle resitue les principaux gènes codant des protéines majeures du métabolisme. Le deuxième et le troisième cercle décrivent les différentes régions codantes prédites (respectivement sur les brins positif et négatif). Le code couleur a été réalisé selon les différentes catégories fonctionnelles (cf Larimer *et al.,* 2004). Le quatrième cercle schématise le niveau de G+C (déviation par rapport à la moyenne) et le cinquième cercle représente le rapport de C/G. Ces deux derniers cercles renseignent sur les régions génomiques ayant pu subir des modifications (insertion, transposition..).

Plus spécifiquement, en ce qui concerne les gènes impliqués dans la régulation par la lumière ou dans sa perception , nous noterons la présence :

- d'un opéron *kaiBC*. Il a été montré que, chez les cyanobactéries, les protéines Kai interviennent dans le contrôle des rythmes circadiens (Kondo & Ishiura, 2000),
- de 6 gènes codant de putatifs bactériophytochromes (BphPs).

Le séquençage du génome de CGA009 a ainsi renforcé la notion que *Rps. palustris* est une bactérie « généraliste ». Celle-ci est capable de répondre et de s'adapter aux changements de conditions dans les environnements marins et terrestres dans lesquels ces bactéries sont largement représentées. De par la polyvalence métabolique de cette espèce, une diversité importante entre souches est envisageable. Dans ce contexte, le DOE Genome Institute s'est lancé dans le séquençage de 4 autres souches de *Rps. palustris* (BisB5, BisB18,

BisA53 et HaA2) afin de définir les différences génétiques et fonctionnelles qui peuvent exister au sein des souches appartenant à cette espèce.

IV.3 Analyse comparative des 5 souches séquencées de *Rps. palustris*.

Ces 4 nouvelles souches séquencées ont été isolées aux Pays-Bas. Les souches BisB5, BisB18 et BisA53 proviennent d'un sol pollué par les déchets industriels tandis que la souche HaA2 a été isolée d'un sol non pollué. Comme CGA009, ces 4 souches sont phototrophes facultatives, fixent le CO_2 et l'azote, produisent de l'hydrogène et dégradent de nombreux composés aromatiques en conditions aérobie et anaérobie (Oda *et al.,* 2002). Bien que la caractérisation phénotypique de ces souches ne soit pas terminée, elles présentent toutes quelques différences évidentes (pigmentation, vitesse de croissance, taille des colonies…). Par ailleurs, ces souches ont été choisies, car elles présentent également des différences notables au niveau de la séquence génomique codant l'ADNr 16S (Oda *et al.,* 2002).

Afin d'éviter les problèmes rencontrés pour la souche CGA009 (Giraud *et al.,* 2004), les souches ont été immédiatement congelées après leur isolement et séquencées (Oda *et al.,* 2002). La taille du génome de ces bactéries est approximativement le même : 5,5 Mb environ avec une exception pour BisB5 dont le génome est d'une taille légèrement inférieure (4,9 Mb) (Oda & Harwood, 2006).

<u>Analyse comparative des cinq génomes</u>

La souche HaA2 est celle qui présente le plus de gènes en synthénie avec ceux de CGA009 (≈ 73 %). L'étude comparative de ces 5 génomes révèle que seuls 55 % des gènes sont communs aux 5 souches de *Rps. palustris.* De très nombreux réarrangements sont ainsi survenus entre ces 5 génomes. L'inventaire des gènes de chaque souche de *Rps. palustris* permet de prédire les caractères physiologiques spécifiques de chacune (Oda & Harwood, 2006) :

- CGA009, de par la présence de 3 gènes codant des nitrogénases, semble être la mieux à même de métaboliser l'azote.

- BisB5 présente tous les gènes nécessaires à la dégradation de composés aromatiques en anaérobie.

- HaA2 possède dans son génome 7 oxydases, de ce fait elle semble bien adaptée à une croissance aérobie.

- BisB18 se développerait plus facilement en anaérobie et à l'obscurité et serait, de par ses nombreuses déshydrogénases, un bon producteur de dihydrogène.

- et BisA53, enfin, est capable de former des biofilms. Elle serait aussi capable, par ses nombreux complexes antennaires (Tableau I), de se développer facilement sous lumière.

L'analyse comparative de ces génomes laisse penser que chaque souche de *Rps. palustris* s'est adaptée à une niche environnementale spécifique en fonction de la disponibilité en oxygène et en lumière (Oda & Harwood, 2006).

Les séquences des 5 génomes de *Rps. palustris* étant accessibles (**http://www.jgi.doe.gov/**) nous avons effectués une l'analyse comparative plus approfondie des gènes impliqués dans la photosynthèse (PGC, *pucBA*) et des gènes codant les bactériophytochromes (Tableau I). Pour les quatre nouvelles souches séquencées, le cluster de gènes photosynthétiques est parfaitement conservé et en synthénie avec celui de la souche CGA009. Ainsi, dans tous les cas, on retrouve les gènes *RpBphP1* et *ppsR2* en tandem. Comme pour CEA001, on observe pour les 4 nouvelles souches séquencées que le gène *RpBphP1* ne présente pas de mutation et que le gène *ppsR2* code une protéine dépourvue de cystéine. Il semblerait donc que le mécanisme de régulation du photosystème par la lumière, décrit pour CEA001 (Cf. chapitre III.3), s'applique également pour ces quatre nouvelles souches. Il est à noter que chez la souche BisA53, la protéine PpsR1 est dépourvue de cystéine. De ce fait, elle a certainement perdu sa sensibilité au potentiel redox, on peut donc se demander si PpsR1 est encore actif chez cette bactérie.

Si le photosystème est bien conservé entre les différentes souches de *Rps. palustris*, nous notons que le nombre d'opérons *pucBA* varie fortement (4 chez BisB18 et 7 chez BisA53) (Tableau I). Cela est en corrélation avec le fait que les antennes sont souvent considérées comme des systèmes « accessoires » au photosystème.

	CGA009	BISA53	BISB5	BISB18	HaA2
Nombre PucBA	5	**7**	5	4	5
pucB.a/pucA.a	Rpa2654/2653	---	Rpd2610/Rpd2609	---	Rpb2862/Rpb2863
pucB.b/pucA.b	Rpa4291/Rpa4292	---	Rpd3890/Rpd3891	---	Rpb1335/Rpb1334
pucB.c/pucA.c	Rpa3009/Rpa3010	Rpe0627/Rpe0626	Rpd2391/Rpd2392	Rpc3789/Rpc3788	Rpb4440/Rpb4441
pucB.d/pucA.d	Rpa3013/Rpa3012	Rpe0629/Rpe0628	Rpd2400/Rpd2399	Rpc3783/Rpc3784	Rpb4448/Rpb4447
pucB.e/pucA.e	Rpa1491/Rpa1492	Rpe1292/Rpe1293	Rpd3787/Rpd3786	Rpc1238/Rpc1239	Rpb4033/Rpb4032
Autres *puc*	---	4	---	1	---

Tableau I : Correspondance entre les opérons *puc* retrouvés chez les différentes souches de *Rps. palustris*.

Les séquences protéiques codées par les opérons *pucBA* étant très proches, il est difficile de les distinguer. Cependant, si nous regardons l'organisation des gènes retrouvés à proximité de ces opérons nous pouvons noter, en conservant la nomenclature établie pour la souche CGA009, que :

- Les opérons *pucBA.c* et *pucBA.d* sont toujours retrouvés à proximité l'un de l'autre. Chez toutes les souches séquencées, ils sont proches d'une région conservée dans laquelle on retrouve 2 gènes (*RpBphP2* et *RpBphP3)* en tandem codant des bactériophytochromes. Seule la souche BisB18 ne présente qu'un seul de ces deux gènes (*RpBphP3*).

- l'opéron *pucBA.c,* chez les 4 nouvelles souches séquencées, ne présente pas de mutation comme chez CGA009. Chez ces 4 souches l'opéron *pucBA.c* pourrait donc coder des protéines fonctionnelles.

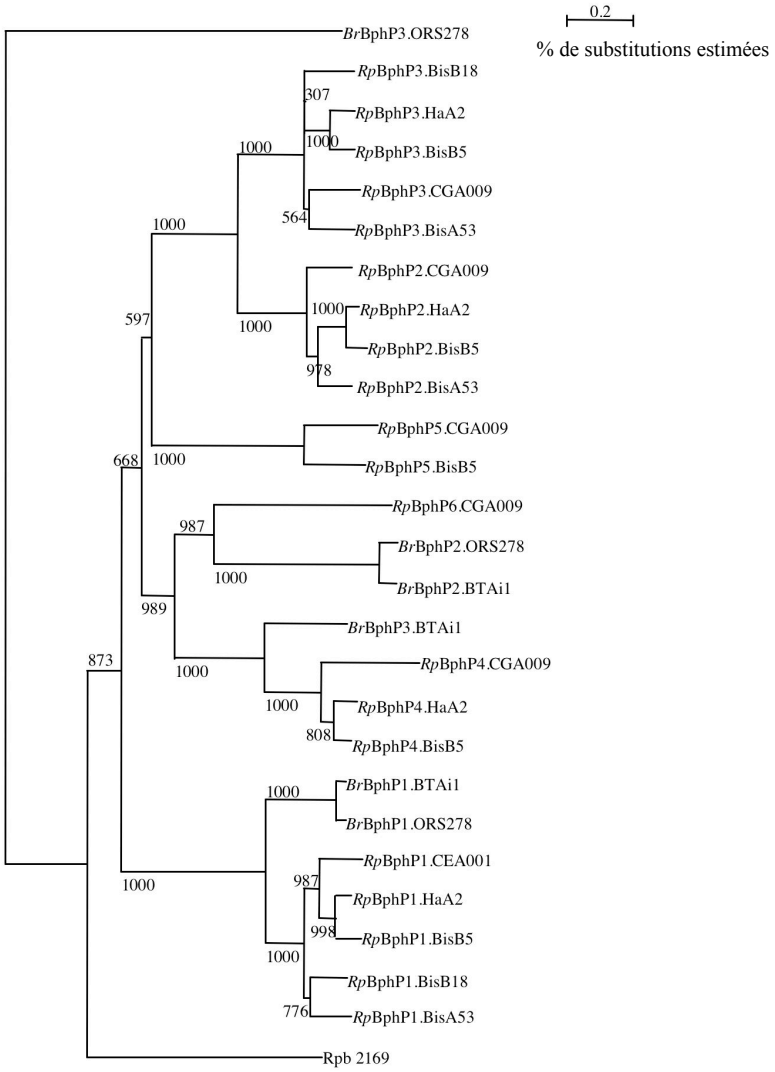
- L'opéron *pucBA.e* est retrouvé à côté du gène *RpBphP4* lorsque celui-ci est présent dans le génome. C'est le cas des souches CGA009, BisB5 et HaA2.

Cette analyse comparative dévoile le lien génétique très fort qui existe entre les gènes *puc* et les gènes *BphPs* (Tableaux I et II).

	CGA009	BISA53	BISB5	BISB18	HaA2
Nb BphP	6	3	5	2	5
*Rp*BphP1	Rpa1537	Rpe1343	Rpd3740	Rpc1309	Rpb3985
*Rp*BphP2	Rpa3015	Rpe0631	Rpd2402	---	Rpb4450
*Rp*BphP3	Rpa3016	Rpe0632	Rpd2403	Rpc3780	Rpb4451
*Rp*BphP4	Rpa1490	-	Rpd3788	-	Rpb4034
*Rp*BphP5	Rpa0122	-	Rpd2377	-	-
*Rp*BphP6	Rpa0990	-	-	-	-
Autre BphP					Rpb2169

Tableau II : Correspondances entre les bactériophytochromes retrouvés chez les différentes souches séquencées de *Rps. palustris*.

Ce tableau récapitulatif (tableau II) met en évidence que la souche CGA009 est celle qui présente le plus de gènes codant des bactériophytochromes. Elle en possède 6, dont un non fonctionnel (*Rp*BphP1) (Cf. chapitre III.3). Si cette souche présente de nombreux *Bphps* il ne s'agit en aucun cas de multiples copies d'un même gène (Figure 20). Seuls les gènes *RpBphP2* et *RpBphP3,* retrouvés en tandem sur le génome, présentent un taux d'identité relativement élevé (53 %).



<u>Figure 20</u> : Arbre phylogénétique regroupant les différents bactériophytochromes présents chez les souches séquencées de *Rps. palustris* et *Bradyrhizobium* ORS278 et BTAi1. Cet arbre a été construit selon la méthode de neighbor-joining.

Une analyse de la distribution de ces différents BphPs montre que seuls *Rp*BphP1 et *Rp*BphP3 sont retrouvés chez toutes les souches de *Rps. palustris.* La conservation de ces 2 bactériophytochromes implique que ceux-ci pourraient jouer un rôle important chez ces bactéries. En accord avec cette hypothèse, la région environnante de chacun de ces 2 BphPs est, elle aussi, fortement conservée. Un seul nouveau bactériophytochrome est mis en évidence chez la souche HaA2. Chez cette protéine, le domaine situé à l'extrémité C-terminale est un domaine GGDEF dont la fonction est de synthétiser du di-GMP cyclique. Cependant contrairement au BphG1 retrouvé chez *Rb. sphaeroïdes* (Tarutina *et al.,* 2006) le domaine EAL n'est pas retrouvé sur ce bactériophytochrome.

Chapitre - 2 -

Résultats

PARTIE 1 : Contrôle de la synthèse des antennes collectrices de lumière par trois bactériophytochromes chez *Rps. palustris*.

Rps. palustris possède comme nous l'avons déjà dit six bactériophytochromes. Durant ma thèse, ils ont tous été purifiés et ont fait l'objet d'études spectrales menées par le Laboratoire de Bioénergétique Cellulaire (LBC) du CEA (Figure 21). Des études préalables, réalisées au sein de l'équipe et en collaboration avec le LBC, ont montré que le bactériophytochrome *Rp*BphP1, joue un rôle clé dans la régulation du photosystème de la bactérie (Cf. chapitre III.3). Mes travaux de thèse se sont focalisés plus spécifiquement sur trois autres bactériophytochromes *Rp*BphP2, *Rp*BphP3 et *Rp*BphP4, retrouvés chez la plupart des souches de *Rps. palustris*. Leur localisation, à proximité des gènes *pucBA,* codant les polypeptides des antennes collectrices de lumière, suggèrerait que ceux-ci pourraient intervenir également à différents niveaux dans la formation du photosystème de *Rps. palustris.*

Les travaux effectués lors de cette thèse s'inscrivent dans un projet mené en collaboration avec le Laboratoire de Bioénergétique Cellulaire du CEA de Cadarache. L'objectif est de comprendre le rôle et le mode d'action de ces bactériophytochromes identifiés chez *Rps. palustris.* Cette étude a fait l'objet de deux articles : un paru dans la revue Journal of Biological chemistry (Giraud *et al.,* 2005) sur la caractérisation des bactériophytochromes *Rp*BphP2 et *Rp*BphP3, le second dans EMBO Journal (Vuillet *et al.,* 2007) sur la caractérisation du bactériophytochrome *Rp*BphP4 et l'étude de son mécanisme d'action.

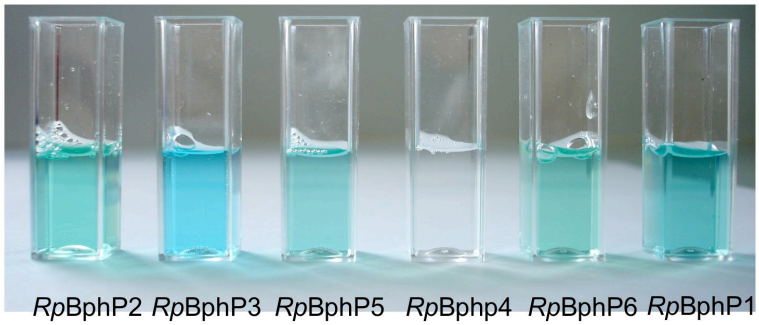


Figure 21 : Photographie des 6 BphPs retrouvés chez la souche CEA001 de *Rps. palustris*.

Article 1 :

A new type of bacteriophytochrome acts in tandem with a classical bacteriophytochrome to control the antennae synthesis in *Rhodopseudomonas palustris.*

Giraud E, Zappa S, Vuillet L, Adriano JM, Hannibal L, Fardoux J, Berthomieu C, Bouyer P, Pignol D, Verméglio A.

Résumé - Discussion

Les gènes *RpBphP2* et *RpBphP3*, codant deux bactériophytochromes, ont la particularité d'être retrouvés en tandem sur le génome de *Rps. palustris*. A proximité de ces deux gènes se trouve l'opéron *pucBA.d* codant des antennes de type LH4 dont la synthèse dépend de l'intensité lumineuse (Hartigan *et al.,* 2002). L'objectif de cette étude était de caractériser ces deux BphPs, de comprendre leur fonctionnement et de déterminer s'ils étaient impliqués ou non dans la régulation des antennes LH4 .

La première étape a consisté à purifier ces BphPs, afin d'étudier leurs propriétés spectrales. Nous avons pu mettre en évidence des caractéristiques inédites pour *Rp*BphP3 qui passe de la forme Pr à une forme nouvelle absorbant à plus courte longueur d'onde (645 nm) que nous avons appelé Pnr (pour phytochrome absorbing in near-red). *Rp*BphP2 présente, quant à lui, deux conformations classiques Pr et Pfr absorbant respectivement dans le rouge et l'infra rouge. De récentes études (Yang *et al*. 2007) ont porté sur la cristallisation de l'extrémité N-terminale de *Rp*BphP3. Couplées à des analyses structure-fonction par mutagenèse dirigée, elles ont permis d'identifier des résidus clés impliqués dans les caractéristiques photochimiques de *Rp*BphP2 et *Rp*BphP3. Les auteurs montrent que la seule mutation L207Y suffit à rétablir une conformation de type Pfr chez *Rp*BphP3, lui rendant ainsi les caractéristiques d'un BphP classique avec ses 2 conformations Pr et Pfr.

Contrairement à *Rp*BphP1, le premier bactériophytochrome étudié chez *Rps. palustris* (Giraud *et al*., 2002)*, Rp*BphP2 et *Rp*BphP3 possèdent tous deux en N-terminal un domaine histidine-kinase comme la plupart des bactériophytochromes. Sur le génome de la souche CGA009, *RpBphP2* (ou *rpa3015*) et *RpBphP3* (ou *rpa3016*) sont entourés par deux gènes *rpa3014* et *rpa3017* codant des protéines de type régulateur de réponse possédant un domaine RR. Cette même organisation génomique a été retrouvée chez la souche modèle CEA001 suggérant que l'ensemble de ces gènes interviendrait dans une même voie de régulation. Ma principale contribution à cet article a été de décrire la voie de signalisation initiée par ces deux bactériophytochromes et d'étudier si un phosphotransfert était possible entre ceux-ci et les deux régulateurs de réponses retrouvés à proximité. Pour cela, la première étape a consisté à

étudier l'activité kinase de ces bactériophytochromes et l'effet des conditions lumineuses sur leur autophosphorylation. Nous avons ainsi pu montrer que ces deux chromoprotéines s'autophosphorylent lorsqu'elles sont sous leur conformation Pr. Dans un deuxième temps, nous avons purifié les régulateurs de réponses associés et étudié les conditions nécessaires à la mise en place d'un phosphotransfert entre ces bactériophytochromes et les régulateurs de réponses. Nous avons mis en évidence que ces deux bactériophytochromes phosphorylent le même réponse-régulateur (Rpa3017) ce qui suggère une voie de signalisation commune initiée par ces deux chromoprotéines. Aucun phosphotransfert vers Rpa3014 n'a pu être établi même en présence de Rpa3017.

Des études fonctionnelles impliquant *Rp*BphP2 et *Rp*BphP3 ont été effectuées afin d'étudier l'effet de la lumière sur la mise en place des antennes LH4. Elles montrent que, lorsque la souche sauvage de *Rps. palustris* est cultivée en semi-aérobiose, les antennes LH4 sont préférentiellement synthétisées pour des longueurs d'ondes comprises entre 680 nm et 730 nm. Ces longueurs d'ondes correspondent aux spectres d'absorption des formes Pr des 2 BphPs. La synthèse des antennes LH4 serait donc favorisée par un éclairement pour lequel *Rp*BphP2 et *Rp*BphP3 sont déphosphorylés. La construction des mutants de délétion Δ*Rp*BphP2 et Δ*Rp*BphP3 a permis de confirmer l'implication de ces 2 BphPs dans le contrôle de la synthèse des antennes LH4.

Les propriétés spectrales de *Rp*BphP2 et *Rp*BphP3, la mise en évidence d'un phosphotransfert possible de ces deux chromoprotéines vers le même régulateur de réponse et les phénotypes observés pour les mutants de délétion suggèrent une action en tandem de ces deux BphPs dans le contrôle de la synthèse des antennes LH4. Nous émettons l'hypothèse que cette action en tandem de *Rp*BphP2 et *Rp*BphP3 permettrait à la bactérie de mesurer l'intensité relative de la lumière à 645 et 710 nm. La mesure du ratio 645/710 nm serait, pour cette bactérie qui se développe en milieu palustre, un moyen de détecter de manière indirecte la présence de phytoplancton.

Quel serait alors l'intérêt de remplacer les antennes collectrices de lumière LH2 par des antennes de type LH4 ? Pour compenser la diminution de l'intensité lumineuse pouvant résulter de la présence d'une couche de phytoplancton, *Rps. palustris* activerait la synthèse des antennes LH4 *via* l'action de *Rp*BphP2 et *Rp*BphP3 et inhiberait la synthèse des antennes LH2. Ce changement de complexes antennaires permettrait ainsi d'augmenter significativement l'efficacité de la capture de la lumière par la bactérie, les complexes antennaires de type LH4 étant plus performants pour capturer et transférer l'énergie lumineuse (Hartigan *et al*., 2002).

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 280, NO. 37, pp. 32389–32397, September 16, 2005
© 2005 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A.

A New Type of Bacteriophytochrome Acts in Tandem with a Classical Bacteriophytochrome to Control the Antennae Synthesis in *Rhodopseudomonas palustris**

Received for publication, June 24, 2005, and in revised form, July 11, 2005 Published, JBC Papers in Press, July 11, 2005, DOI 10.1074/jbc.M506890200

Eric Giraud[‡1], Sébastien Zappa[§1], Laurie Vuillet[‡], Jean-Marc Adriano[§], Laure Hannibal[‡], Joël Fardoux[‡], Catherine Berthomieu[§], Pierre Bouyer[§], David Pignol[§], and André Verméglio[§2]

From the [‡]Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, IRD, CIRAD, AGRO-M, INRA, UM2, TA 10/J, Campus de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France and [§]CEA/Cadarache DEVM-Laboratoire de Bioénergétique Cellulaire UMR 6191 CNRS-CEA, Aix-Marseille II 13108 Saint Paul lez Durance Cedex, France

Phytochromes are chromoproteins found in plants and bacteria that switch between two photointerconvertible forms via the photoisomerization of their chromophore. These two forms, Pr and Pfr, absorb red and far-red light, respectively. We have characterized the biophysical and biochemical properties of two bacteriophytochromes, *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3, from the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. Their genes are contiguous and localized near the *pucBAd* genes encoding the polypeptides of the light harvesting complexes LH4, whose synthesis depends on the light intensity. At variance with all (bacterio)phytochromes studied so far, the light-induced isomerization of the chromophore of *Rp*BphP3 converts the Pr form to a form absorbing at shorter wavelength around 645 nm, designated as Pnr for *n*ear *r*ed. The quantum yield for the transformation of Pr into Pnr is about 6-fold smaller than for the reverse reaction. Both *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 autophosphorylate in their dark-adapted Pr forms and transfer their phosphate to a common response regulator Rpa3017. Under semi-aerobic conditions, LH4 complexes replace specifically the LH2 complexes in wild-type cells illuminated by wavelengths comprised between 680 and 730 nm. In contrast, mutants deleted in each of these two bacteriophytochromes display no variation in the composition of their light harvesting complexes whatever the light intensity. From both the peculiar properties of these bacteriophytochromes and the phenotypes of their deletion mutants, we propose that they operate in tandem to control the synthesis of LH4 complexes by measuring the relative intensities of 645 and 710 nm lights.

Phytochromes are biliprotein photoreceptors originally discovered in plants (1, 2) but only recently in bacteria (3–6). They respond to red/far-red light via a reversible shift from a red absorbing form (Pr) to a far-red absorbing form (Pfr). These light sensors regulate many aspects of photomorphogenesis in plants (1, 2). In bacteria, they have been also described to play various roles, control of the light harvesting complexes in *Fremyella diplosiphon* (3), regulation of chalcone synthase in *Rhodospirillum centenum* (5), regulation of carotenoid synthesis in *Deinococcus radiodurans* (6), phototaxis in *Synechocystis* (7), and control of photosystem synthesis in *Bradyrhizobium* and *Rhodopseudomonas* (*Rds.*)[3] *palustris* (8). Based upon primary sequence alignment, phytochromes and bacteriophytochromes possess a similar protein organization with an N-terminal chromophore binding domain (CBD) and a C-terminal module involved in signal transduction and dimerization. The plant and cyanobacteria chromophores are 3E-phytochromobilin and 3Z-phycocyanobilin, respectively (1, 9), whereas other proteobacteria use, as chromophore, biliverdin, the simplest linear tetrapyrrole synthesized from heme by a heme oxygenase (10). Like plant phytochromes, most bacteriophytochromes studied so far contain a two-component histidine kinase motif at their C termini. However some exceptions occur such as the bacteriophytochromes of the photosynthetic bacteria *Bradyrhizobium* (*Br*BphP) and *Rps. palustris* (denoted here *Rp*BphP1), which do not possess a histidine kinase motif but an S-box domain that might be involved in protein-protein interactions (8). Photoconversion of these two bacteriophytochromes from their Pfr to Pr form triggers the synthesis of the entire photosynthetic apparatus and the associated bacteriochlorophyll and carotenoid molecules (8, 11, 12). This photosynthetic apparatus is composed of a photochemical reaction center and of light-harvesting (LH) complexes. The photosynthetic apparatus of *Rps. palustris* presents the peculiarity of possessing several peripheral LH complexes, encoded by distinct *pucBA* genes (13). The relative proportion of these LH complexes varies according to the light environment (14, 15). They differ by their absorption properties and carotenoid content. Some of these complexes present two distinct optical transitions absorbing around 800 and 850 nm in the near infrared. They are named LH2 (or B800–850 LH2) to differentiate them from the LH1 complexes, which present a single broad absorption band around 870 nm. A novel type of LH, recently characterized and designated LH4 (or B800 LH2), is expressed under low light intensity and presents a single absorption band in the near infrared centered at 800 nm (15).

The recent sequencing of the complete genome of *Rps. palustris* strain CGA009 revealed, in addition to *RpBphP1*, the unexpected presence of five other putative bacteriophytochrome genes scattered over the genome (16). This suggests that this bacterium has developed a sophisticated and complex network of photoreceptors for its adaptation to light environment. Four of these bacteriophytochromes genes, *RpBphP1* (*rpa1537*), *RpBphP2* (*rpa3015*), *RpBphP3* (*rpa3016*), and *RpBphP4* (*rpa1490*), are located close to photosynthesis genes. The *RpBphP1* gene is found inside the photosynthesis gene cluster, and, as already stated, its product controls the synthesis of the RC-LH1 core complexes (8). The *RpBphP4* gene is located close to the *pucBAe* genes encoding one of the

* This work was supported by the CEA, the IRD, and the CNRS (programme Protéomique). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[1] Both authors contributed equally to this study.

[2] To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-442254630; Fax: 33-442254701; E-mail: avermeglio@cea.fr.

[3] The abbreviations used are: *Rds.*, *Rhodopseudomonas*; CBD, chromophore binding domain; LED, light-emitting diode; LH, light harvesting; FTIR, Fourier transform infrared spectroscopy.

LH2 complexes. Remarkably, the *RpBphP2* and *RpBphP3* genes are organized in tandem downstream the *pucBAd* encoding the apoproteins of the LH4 complexes. Two other genes coding for LH complexes (the *pucBAc* genes *rpa3009* and *rpa3010*) are located upstream the *pucBAd* genes. However, one of them, *pucAc*, contains a frameshift mutation and has been annotated as a pseudogene (16).

To better understand the role and function of these bacteriophytochromes in the adaptation of *Rps. palustris* to changes in its light environment, we initiated their systematic study at the genetic and biochemical level. Of particular interest are the two bacteriophytochromes, *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3. What is the significance of the tandem organization of the two bacteriophytochromes genes? Do these two bacteriophytochromes possess different properties? Are these two bacteriophytochromes involved in the regulation of the closely located *pucBAd* genes or in different regulatory processes? In this report, we show by combining genetics, biochemical and biophysical approaches that the bacteriophytochrome *Rp*BphP3 possesses unusual photochemical properties and works in tandem with *Rp*BphP2 to regulate the synthesis of the LH4 complexes.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains and Growth Conditions—*Rps. palustris* CEA001 strain (11) was grown under semiaerobic conditions for 72 h at 30 °C on Petri dishes filled with 40% Sistrom-agar medium and sealed with tape. The cells were subjected to continuous illumination provided by a series of light-emitting diodes (LEDs) of different wavelengths between 590 and 875 nm. Each LED illuminated a 3.5 cm^2 area. The half-peak bandwidth was below 25 nm for all wavelengths. Irradiance was adjusted between 1 and 200 μmol of photon/m^2/s.

Expression and Purification of Rpa3014, RpBphP2, RpBphP3, and Rpa3017 Proteins—The *rpa3014*, *RpBphP2*, *RpBphP3*, and *rpa3017* genes were amplified by polymerase chain reaction from genomic DNA of *Rps. palustris* CEA001 using primers designed to add appropriate restriction sites for expression as His_6-tagged versions in pBAD/HisB expression vector (Invitrogen). To reconstitute *in vivo* the *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 holobacteriophytochromes, the *hmuO* gene from *Bradyrhizobium* ORS278 was amplified by polymerase chain reaction using primers designed to add a ribosome binding site upstream the gene and restriction site for insertion in the previous constructions pBAD::*RpBphP2* and pBAD::*RpBphP3*. The recombinant proteins were overexpressed in *Escherichia coli* LMG194 and purified as described previously (11).

Protein Kinase Assays—Protein kinase reaction was performed as described previously (9). For autophosphorylation experiments, the bacteriophytochromes *Rp*BphP2 or *Rp*BphP3 were either dark-adapted for more than 1 h or pre-illuminated with saturating red light (705 nm) at 30 °C. The kinase reactions were initiated by adding [γ-^{32}P]ATP, and the resulting mixtures were subjected to a further 1-h darkness condition or illumination. At this stage, the reactions were stopped by addition of the buffer used for the SDS-PAGE assay and analyzed by gel electrophoresis. For the phosphotransfer experiments, the *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 were incubated in the presence of [γ-^{32}P]ATP during 1 h in the dark or under 705 nm light and for an additional 10 min with equal amount of Rpa3014 or Rpa3017 or a mixture of Rpa3014 and Rpa3017. ^{32}P-Labeled products were quantified by using a Typhoon PhosphorImager (Amersham Biosciences).

Construction of RpBphP2 and RpBphP3 Mutant Strains—For the construction of the *Rp*BphP2 null mutant, a 1.4-kb PstI fragment inside the *RpBphP2* gene was deleted and replaced by the *lac*Z-Km^r cassette of pKOK5 (17). The *RpBphP3* null mutant was obtained by the deletion of a 0.5-kb SalI fragment inside the *RpBphP3* gene and replacement by the *lac*Z-Km^r cassette. These constructions were introduced in the pJQ200 suicide vector (18) and delivered by conjugation into the *Rps. palustris* CEA001 strain as described (11). Double recombinants were selected on sucrose and confirmed by polymerase chain reaction.

Absorbance Spectra Measurements—Absorbance spectra of purified *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 bacteriophytochromes were recorded with a Cary 50 spectrophotometer. Bacteriophytochrome spectra were recorded either in the dark or under continuous illumination at 645, 705, or 750 nm provided by LEDs with an irradiance of 15 μmol of photon/m^2/s. Light-induced absorbance changes were performed with a laboratory-built spectrophotometer similar to the one developed by Joliot *et al.* (19). The absorption level is sampled using 2-μs monochromatic flashes given from 1 ms to several seconds after actinic excitation. Actinic illumination was provided by a Xenon flash (2 μs).

Fluorescence Measurements—Fluorescence measurements have been performed at room temperature using a Cary Eclipse spectrophotometer. To perform the photoinduced transition of *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3, excitation light was provided by 645-, 705-, or 750-nm LEDs with an irradiance of 15 μmol of photon/m^2/s. For the measurement of the excitation spectra (2-nm slit bandwidth), the fluorescence was detected at 730 nm (10-nm slit bandwidth). For the emission spectra (2-nm slit bandwidth), the excitation was set at 400 nm (10-nm slit bandwidth). Measurements of the variation of the fluorescence yield were performed at 400 nm for the excitation wavelength (10-nm slit bandwidth) and 730 nm for the emission wavelength (2-nm slit bandwidth).

Light-induced FTIR Difference Spectra Measurements—Light-induced FTIR difference spectra were recorded at 10 °C at 4 cm^{-1} resolution, with a Bruker 66 SX spectrometer equipped with a KBr beam splitter and nitrogen-cooled MCT-A detector. The FTIR samples consisted in 10 μl of a solution of bacteriophytochrome at a concentration of ≈200 μM, in 50 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM KCl, 20 mM $MgCl_2$, deposited between two calcium fluoride windows sealed with silicon grease to avoid sample dehydration. The samples were subjected to successive light cycles, applying 705 nm light to generate Pfr (or Pnr) and 750 or 645 nm light to restore the Pr form of *Rp*BphP2 or *Rp*BphP3, respectively.

RESULTS

Expression and Purification of Recombinant Holobacteriophytochromes—The *RpBphP2* and *RpBphP3* genes belong to the same putative operon, which includes three other putative response regulator genes (*rpa3014*, *rpa3017*, and *rpa3018*) (Fig. 1*A*). This operon is found upstream the *pucBAd* genes encoding the apoproteins of the light-harvesting complexes LH4. Sequence analysis reveals that the *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 proteins are highly homologous, with 54% of sequence identity and 76% similarity. In contrast, they present only 30–35% sequence identity with the other bacteriophytochromes of *Rps. palustris*. These two bacteriophytochromes display the classical bacteriophytochrome architecture with an N-terminal CBD and a C-terminal histidine kinase domain (Fig. 1*B*). To prove that *RpBphP2* and *RpBphP3* encode functional bacteriophytochromes, they were co-expressed with the heme oxygenase gene (required for chromophore synthesis) in *E. coli* and subsequently purified. Gel electrophoresis and zinc fluorescence (not shown) demonstrated that the biliverdin molecule was covalently bound in both proteins as previously reported for bacteriophytochromes of various bacterial species (8, 10, 20). Site-directed mutagenesis (data not shown) indicate that the Cys residues of the N terminus, located at position 16 and 28 for *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3, respectively, are necessary for attachment of chromophore and are likely to be the site of attachment based upon their position and the

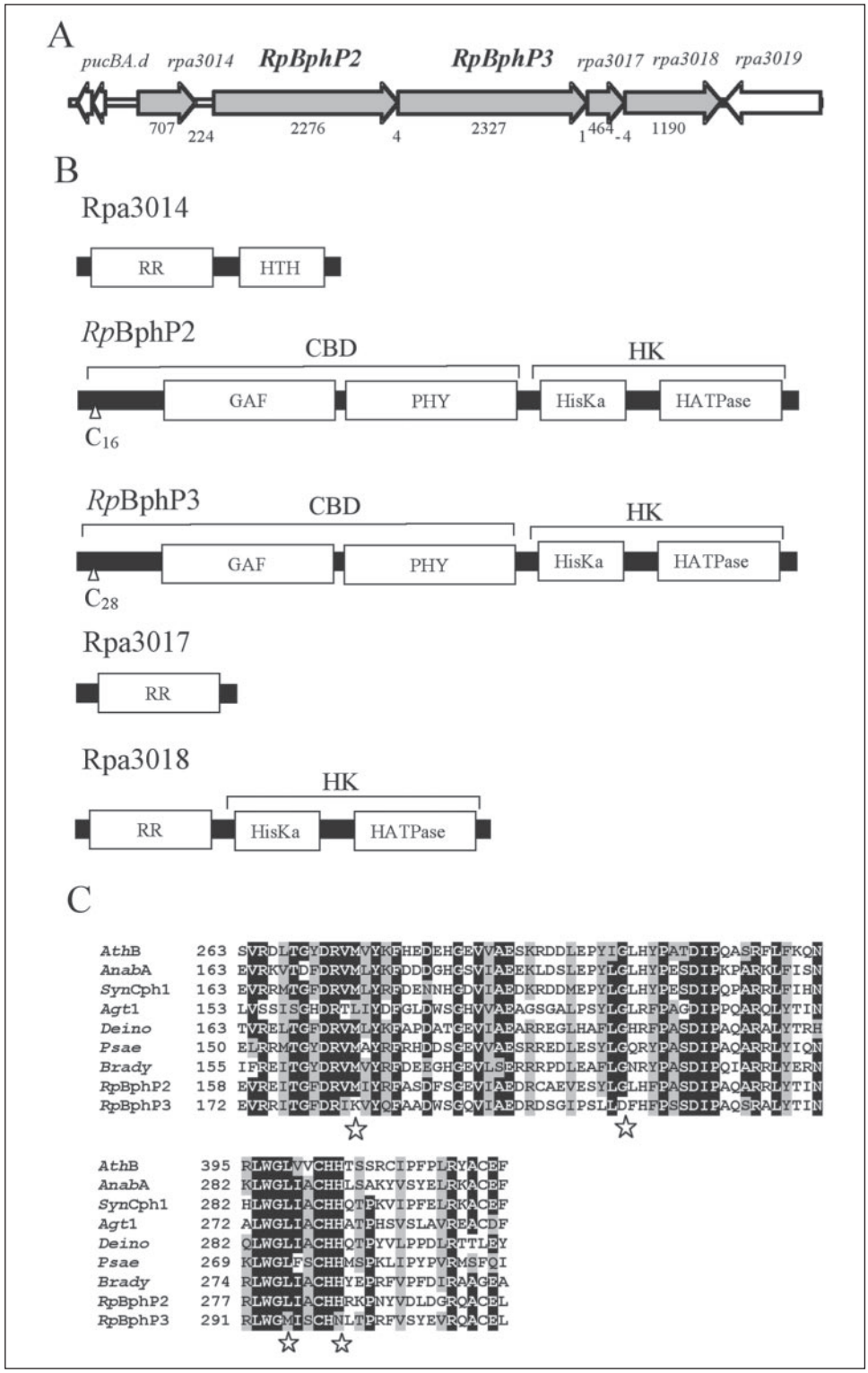


FIGURE 1. **Molecular characterization of *RpBphP2* and *RpBphP3*.** *A*, arrangements of genes located around *RpBphP2* and *RpBphP3*. The genes predicted to belong to the *RpBphP2*/*RpBphP3* operon are in *gray arrows*. The numbers below indicate the size of the open reading frames and of the intergenic regions. *B*, predicted domain structure of Rpa3014, *Rp*BphP2, *Rp*BphP3, Rpa3017, and Rpa3018. The N-terminal cysteine implicated in chromophore binding is indicated by *open triangles*. *HK*, histidine kinase domain; *HisKa*, phosphoacceptor domain; *HATPase*, ATP binding domain; *RR*, response regulator domain, *HTH*, helix-turn-helix domain. *C*, peptide alignment (Clustal X) of two conserved subregions of the CBD. *Ath*B, *Arabidopsis thaliana* PhyB [SW PHYB_ARATH]; *Anab*A, *Anabaena* sp. CphA [SW PHYA_ANASP]; *Syn*Cph1, *Synechocystis* sp. Cph1 [SW PHY1_SYNY3]; *Agt*1, *Agrobacterium tumefaciens At*BhP1 [SPT Q8UDX6]; *Deino*, *Deinococcus radiodurans* [SW BPHY_DEIRA]; *Psae*, *Pseudomonas aeruginosa* [SW BPHY_PSEAE]; *Brady*, *Bradyrhizobium* sp. ORS278 [SPT Q8VUB6]; *Rp*BphP2, *Rps palustris* CGA009 3015 [GenPept g39649933]. *Rp*BphP3, *Rps palustris* CGA009 3016 [GenPept g39649934]. Strictly conserved residues and residues conserved more than 70% are highlighted in *black* and *gray*, respectively. Residues that were mutated in this study are indicated by a *star*.

previous data from the bacteriophytochrome Agp1 of *Agrobacterium* (20).

Absorption and Photochemical Properties—Unexpectedly, the purified *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 bacteriophytochromes present slightly different colors (Fig. 2*A*). The absorption spectra of dark-adapted samples of *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 are typical of the Pr form with a main band centered at 710 and 705 nm, respectively (Fig. 2, *C* and *D*). Both *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 behave as usual bacteriophytochromes assuming a Pr ground state after dark adaptation. This behavior is at variance to that reported for the first bacteriophytochrome (*Rp*BphP1) studied in *Rps. palustris*, which was shown to be stable under its Pfr form (8, 11). Presence of two bacteriophytochromes which differ by their dark-adapted state has also been reported in *Agrobacterium tumefaciens* (21). In this bacterium, the ground state of the bacteriophytochrome *At*BphP1 is the Pr state, whereas the Pfr form of *At*BphP2 corresponds to its dark-adapted state (21). Upon illumination with a 705-nm light of *Rp*BphP2 (Fig. 2*C*), a typical Pr/Pfr transition is observed with the partial bleaching of the main absorption band and appearance of a broad band cen-

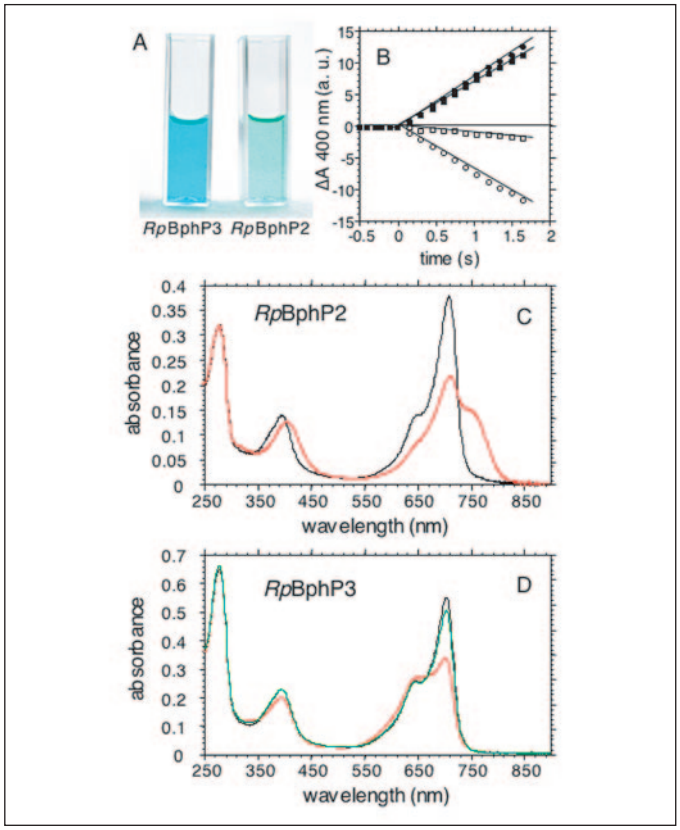


FIGURE 2. **Spectral characterization of recombinant *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3.** *A*, picture of samples of *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 in spectrophotometer cuvettes. *B*, initial rates of the phototransformation of Pr into Pnr (*open squares*) and of Pnr into Pr (*closed squares*) for *Rp*BphP3. As a comparison the initial rates of the phototransformation of Pr into Pfr (*open circles*) and of Pfr into Pr (*closed circles*) are shown for *Rp*BphP2. The light-induced absorbance changes were measured at 400 nm. Light excitation was provided by LEDs emitting at 645, 705, and 750 nm. *C*, absorption spectra of recombinant *Rp*BphP2: dark-adapted sample (*black line*), after photoconversion by 705-nm light (*red line*). *D*, absorption spectra of recombinant *Rp*BphP3: dark-adapted sample (*black line*), after photoconversion by 705-nm light (*red line*) or 645-nm light (*green line*).

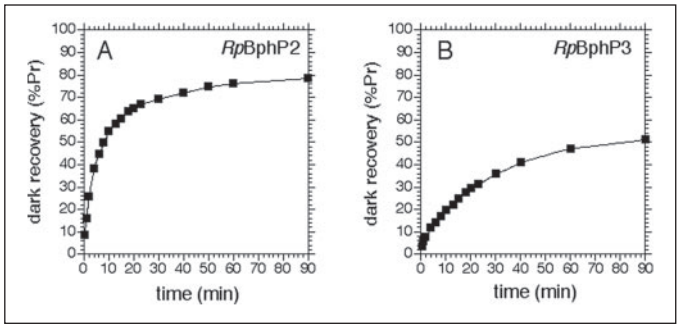


FIGURE 3. **Dark reversion of *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 after a 705 nm illumination.** Absorbance changes occurring in the dark after a 705-nm illumination have been measured at 705 nm and compared with samples dark-adapted for 3 h. *A*, *Rp*BphP2; *B*, *Rp*BphP3.

tered at 750 nm (Fig. 2*C*). Illumination with a 750-nm light restores the dark-adapted spectrum. Dark reversion from the Pfr to the Pr state is a slow process, which requires several tens of minutes (Fig. 3*A*). Unexpectedly, illumination with the 705-nm light on a dark-adapted sample of *Rp*BphP3 (Fig. 2*D*) leads to a large decrease of the main absorption band at 705 nm, but no concomitant absorption band develops in the infrared region. In addition, the shoulder at 650 nm of the Pr form, which corresponds to the vibrational transition of the S1 state, is not bleached. On the contrary, a minor increase in absorption is observed in this wavelength region. This suggests that the 705-nm illumination has induced a new form characterized by an absorption band centered around 650 nm. In agreement with this hypothesis, a fast and near complete reversion to the dark-adapted state is observed when the 705-nm illumination is followed by excitation with a 645-nm light (Fig. 2*D*). In the absence of 645-nm illumination, reversion to the dark-adapted state is very slow. Total dark reversion requires more than 2 h (Fig. 3*B*).

The near complete reversion of *Rp*BphP3 to the dark-adapted state by the 645-nm light (Fig. 2*D*) implies a large difference in quantum yield for the two photoreversible reactions. This difference in quantum yield between the two forms of *Rp*BphP3 is also evidenced by the measurement of the initial rate of Pr formation per absorbed photon upon illumination by a 645-nm light, which is ~6-fold faster than the one measured for the photoconversion under 705-nm illumination (Fig. 2*B*). This behavior is different from that observed for *Rp*BphP2 where the initial rates of the phototransformation of Pr into Pfr and of Pfr into Pr are similar (Fig. 2*B*). Note that these initial rate measurements, determined in the first 2 s of illumination, are not affected by the dark reversion of *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3, which takes several tens of minutes in both cases (Fig. 3). The ratio between these initial rates is therefore a good estimate of the ratio of the quantum efficiencies of the photoconversion of the two photoconvertible states.

To determine the absolute absorption spectra of the two photoconvertible forms of *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3, we have used the following method. The steady-state spectrum $S_1(\lambda)$ obtained under illumination at a given wavelength, λ_1, is a mixture of the spectra $S_A(\lambda)$ and $S_B(\lambda)$ of the two pure photoconvertible forms, with relative weights $\alpha(\lambda_1)$ and $[1 - \alpha(\lambda_1)]$, respectively,

$$S_1(\lambda) = \alpha(\lambda_1)\, S_A(\lambda) + [1 - \alpha(\lambda_1)]\, S_B(\lambda) \qquad \text{(Eq. 1)}$$

The steady-state condition implies

$$\rho_A\, \alpha(\lambda_1)\, S_A(\lambda_1) = \rho_B\, S_B(\lambda_1)\, [1 - \alpha(\lambda_1)] \qquad \text{(Eq. 2)}$$

where the ρs stand for the quantum efficiencies for the conversion into the other form.

From Equation 1,

$$S_B(\lambda) = [S_1(\lambda) - \alpha(\lambda_1) S_A(\lambda)]/[1 - \alpha(\lambda_1)] \qquad \text{(Eq. 3)}$$

and from Equation 2,

$$S_B(\lambda_1) = \frac{\alpha(\lambda_1)}{1 - \alpha(\lambda_1)} \eta S_A(\lambda_1) \qquad \text{(Eq. 4)}$$

where $\eta = \rho_A/\rho_B$.

Making $\lambda = \lambda_1$ in Equation 3 and equating with Equation 4, one obtains the relation between α and η,

$$\alpha(\lambda_1) = \frac{S_1(\lambda_1)}{S_A(\lambda_1)} \frac{1}{(1 + \eta)} \qquad \text{(Eq. 5)}$$

If $S_A(\lambda)$ (dark-adapted spectrum) and $S_1(\lambda)$ (under steady-state illumination at $\lambda = \lambda_1$) are known, then $\alpha(\lambda_1)$ is a unique function of the ratio of quantum efficiencies $\eta = \rho_A/\rho_B$. Thus, the determination of $S_B(\lambda)$ requires one additional information that may be (i) an independent measurement of ρ or (ii) the acquisition of a steady-state spectrum under actinic illumination at another wavelength λ_2. The first method was applied to both *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 bacteriophytochromes. The measurement of $\eta \approx 1$ for *Rp*BphP2 (Fig. 2*B*), implies that the S_{705} spectrum of Fig. 2*C* is contributed by α (705) ≈ 30% of the Pr form. The corresponding $S_B(\lambda)$ spectrum, *i.e.* the absorption spectrum of the Pfr form is shown in Fig. 4*A*. For *Rp*BphP3, using $\eta \approx 6$ (Fig. 2*B*), we found

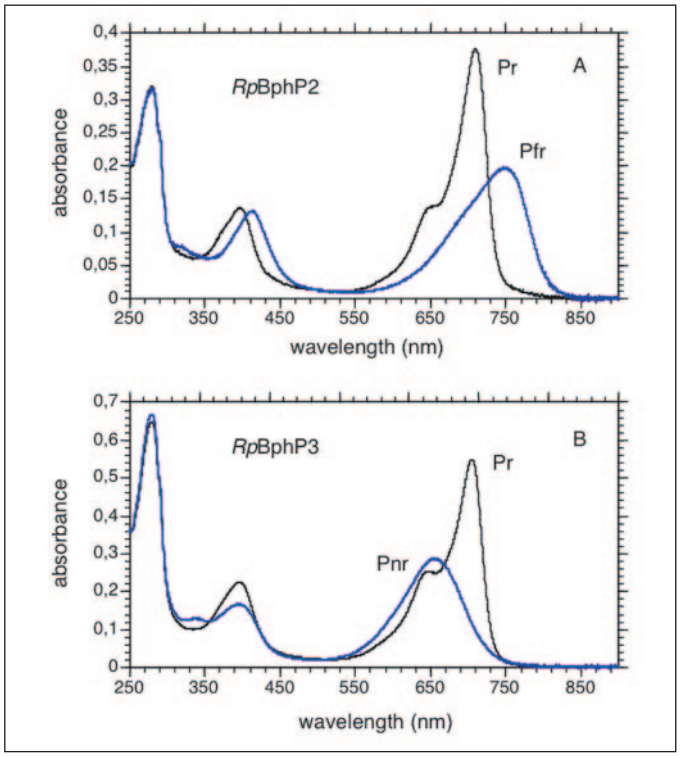


FIGURE 4. **Absorption spectra of recombinant *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3.** *A*, *Rp*BphP2. The Pr spectrum (*black line*) corresponds to the dark-adapted sample. The Pfr spectrum (*blue line*) was derived from the spectrum recorded under 705 nm illumination (Fig. 2) using a Pfr/Pr ratio of 0.70 as described in the text. *B*, *Rp*BphP3. The Pr spectrum (*black line*) corresponds to the dark-adapted sample. The Pnr spectrum (*blue line*) was derived from the spectrum recorded under 705 nm illumination (Fig. 2) using a Pnr/Pr ratio of 0.50 as described in the text.

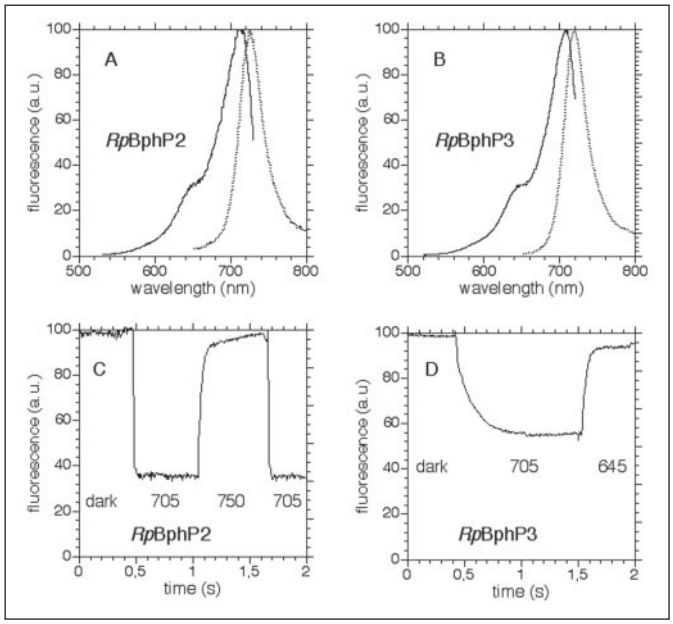


FIGURE 5. **Fluorescent properties of recombinant *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3.** *A*, excitation (*solid line*) and emission (*dotted line*) spectra of a sample of *Rp*BphP2 recorded at room temperature. *B*, same as *A* but for a sample of *Rp*BphP3. *C* and *D*, light-induced variations of the fluorescence yield for *Rp*BphP2 (*C*) and *Rp*BphP3 (*D*). The fluorescence emission is measured at 730 nm upon excitation with 400-nm light. The fluorescence yield is measured in the dark or under 705, 645, or 750 nm illumination as indicated. *a.u.*, arbitrary units.

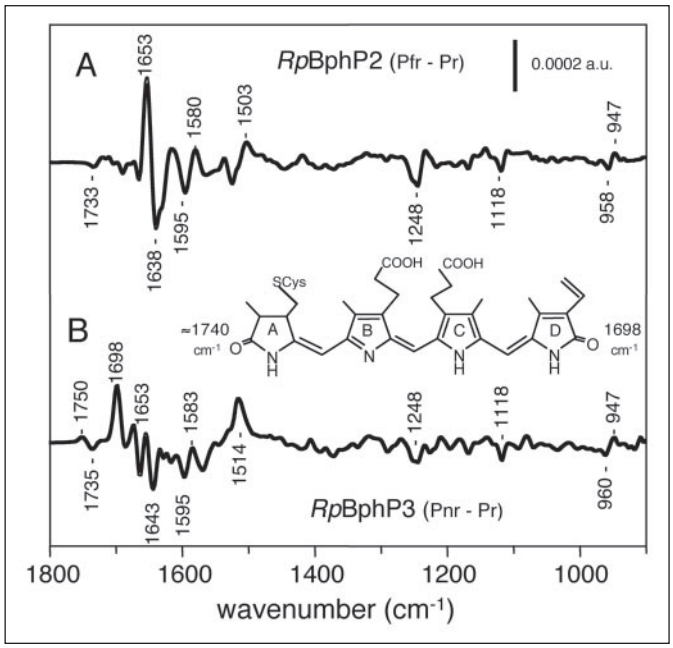


FIGURE 6. **Light-induced FTIR difference spectra of *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3.** Light-induced FTIR difference spectra corresponding to the formation of the Pfr form of *Rp*BphP2 (*A*) and to the Pnr form of *Rp*BphP3 (*B*). These spectra are the result of successive light-cycles, applying 705-nm light to generate Pfr (or Pnr) and 750 nm light or 645 nm light to restore the Pr form of *Rp*BphP2 or *Rp*BphP3, respectively. *Inset*, structure of the biliverdin chromophore. *a.u.*, arbitrary units.

that the S_{705} spectrum of Fig. 2*D* is contributed by $\alpha(705) \approx 50\%$ of the Pr form. Using method (ii) for *Rp*BphP2 with the spectra obtained under steady-state illumination at $\lambda_1 = 705$ nm and $\lambda_2 = 645$ nm (Fig. 2*D*), we confirmed a value 6 of for η. The pure $S_B(\lambda)$ spectrum of *Rp*BphP3 shown in Fig. 4*B*.

The absorption spectra of the pure Pr and Pfr forms of *Rp*BphP2 are typical of bacteriophytochromes described so far (8, 10). As already mentioned, the dark-adapted state of *Rp*BphP3 is similar in shape to the Pr state of *Rp*BphP2, *i.e.* a classical Pr spectrum. On the other hand, the light-induced state of *Rp*BphP3 absorbs maximally at 650 nm. The absorption spectrum of this state is similar in shape to the Pfr state of *Rp*BphP2 but blue-shifted by 95 nm (Fig. 4*B*). Because of its peak location, we name this new spectral form Pnr for pigment absorbing in the near red.

In conclusion, *Rp*BphP3 presents unusual photochemical properties in terms of both quantum yield for photoconversion and wavelength position of the Pnr state.

Chromophore Conformation and Transient States—The new optical properties of the short wavelength state of *Rp*BphP3 poses the problem of the biliverdin conformation in this state and the dark-adapted state. High similarities can be found between the dark-adapted state of *Rp*BphP3 and the classical Pr state of *Rp*BphP2 and accordingly between the classical Pfr state and the new Pnr state of *Rp*BphP3. A first argument comes from the almost identical absorption spectra of the two dark-adapted states of these bacteriophytochromes (Fig. 4). A second argument is the observation that the dark-adapted states of both *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 are fluorescent. The fluorescence excitation spectra of *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 closely match their respective absorption spectra, and the emission spectra are centered at 725 and 720 nm, respectively (Fig. 5, *A* and *B*). On the other hand, a large fluorescence decrease occurs upon 705 nm illumination in both cases. This is shown in Fig. 5, *C* and *D* where the fluorescence yield of both bacteriophytochromes have been measured in the dark or under 705-nm illumination. The decreases in fluorescence yield, ~65 and 45% for *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3, respectively (Fig. 5, *C* and *D*), correspond nicely to the amounts of Pfr and Pnr states formed under such illumination (Fig. 2). The non-fluorescent character of the new Pnr state of *Rp*BphP3 is a typical prop-

erty of the "classical" Pfr form of phytochromes (22). A third argument comes from the comparison of the FTIR difference spectra recorded with both bacteriophytochromes. The Pfr − Pr FTIR difference spectrum recorded with *Rp*BphP2 (Fig. 6*A*) presents a striking similarity to that observed for the plant phytochrome (23, 24) for which ZZZ to ZZE isomerization in C_{15} of phytochromobilin was demonstrated using NMR spectroscopy. The occurrence of common infrared bands at 1653/1643–1638, 1248, 1118, 960–958/947 cm^{-1} and especially at 1595/1583 cm^{-1} in the Pnr-Pr and Pfr-Pr spectra recorded with *Rp*BphP3 or *Rp*BphP2 strongly supports that Z to E isomerization also occurs around the $C_{15}=C_{16}$ double bond for *Rp*BphP3. Previous studies on phytochromes using chromophores chemically modified at ring D or ^{18}O-labeled at ring A have shown that the contributions of the carbonyl group of ring A lie above 1730 cm^{-1}, whereas those of ring D are at 1710–1696 cm^{-1} (24). Thus we assign the upshift of 1735–1750 cm^{-1} upon Pr to Pnr transition to ring A carbonyl, whereas the large positive band at 1698 cm^{-1} is assigned to the carbonyl group of ring D in the Pnr form of *Rp*BphP3 (Fig. 6). The last argument comes from the analysis of the flash-induced absorption changes following an exciting flash. Fig. 7*A* shows the light-induced absorbance changes detected at different times, between 1 and 100 ms, after flash excitation of a dark-adapted sample of *Rp*BphP2. The light-induced difference spectrum detected 1 ms after the exciting flash presents an absorbance increase centered at 740 nm and a bleaching around 640 and 705 nm. When the light-induced absorbance changes are detected at longer times, a shift to longer wavelengths is observed for the positive changes together with an increase of the amplitude of the negative changes (Fig. 7*A*). These light-induced changes can be interpreted as follows. Flash excitation induces the formation of a short-lived state absorbing around 740 nm, which is transformed with a half-time of 10 ms (Fig. 7*A*, *inset*) into the stable Pfr state absorbing around 760 nm. The properties of this transient state, in terms of half-time and absorption at shorter wavelength than the stable Pfr form, are similar to the lumi-R state observed for plant phytochrome (22, 25). An equivalent transitory state is observed upon phototransformation from the Pr to the Pnr state in the case of *Rp*BphP3 (Fig. 7*B*). This short lived state peaks around 730 nm and is converted into the stable Pnr form with a half-time of 10 ms. On the other hand, we have observed no transition state, in the ms to second time range, for both the flash-induced transformation of Pfr into Pr or Pnr into Pr for *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3, respectively (data not shown). We take the similarity between the transient states measured in *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 as supplementary evidence that their dark-adapted states correspond to a Pr state. Collectively, the above results strongly support an identical conformational state of the chromophore for the new Pnr form of *Rp*BphP3 and the classical Pfr form of *Rp*BphP2. We therefore propose that the new Pnr form of *Rp*BphP3 is equivalent to the classical Pfr but absorbing at much shorter wavelengths.

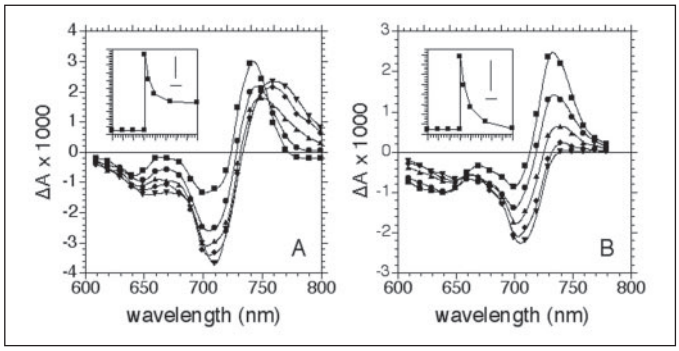


FIGURE 7. **Flash-induced absorption difference spectra of *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3.** Flash-induced absorption difference spectra corresponding to the formation of the Pfr form of *Rp*BphP2 (*A*) and to the Pnr form of *Rp*BphP3 (*B*). Flash-induced absorption changes were detected at different times (*squares*, 1 ms; *circles*, 8 ms; *triangles*, 20 ms; *diamonds*, 50 ms; *inverted triangles*, 100 ms) after a short (2 μs) excitation flash. The *insets* correspond to the kinetics of the absorbance changes detected at 740 nm. The *vertical* and *horizontal bars* represent $\Delta A = 10^{-3}$ and 20 ms, respectively.

Autophosphorylation and Phosphotransfer—Both *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 bacteriophytochromes possess a histidine kinase module at their C-terminal regions (Fig. 1*B*). We have determined the correlation between this kinase activity and their conformational states by incubation in the presence of [γ-^{32}P]ATP. Both bacteriophytochromes autophosphorylate in the dark, *i.e.* under their Pr forms (Fig. 8*A*). In agreement with His serving as phosphoacceptor site, the autophosphorylated *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 are acid labile and base stable (data not shown). Illumination of *Rp*BphP2 with a 705-nm light strongly represses its kinase activity indicating that its Pfr form is not able to autophospho-

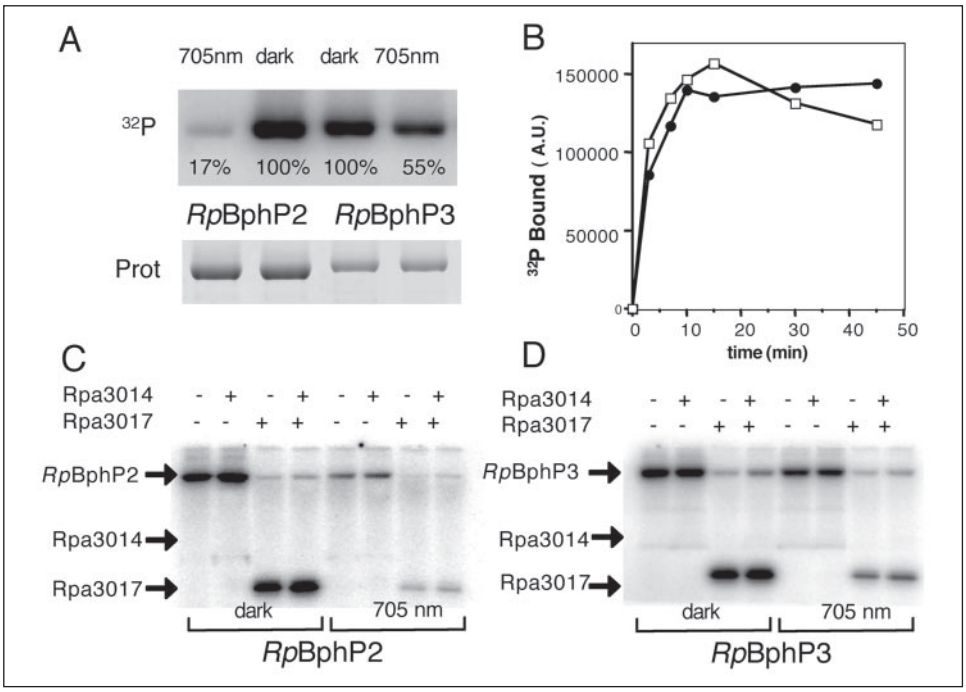


FIGURE 8. ***Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 act as light-regulated histidine kinases.** *A*, autophosphorylation of purified *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 in the dark or under illumination at 705 nm. After incubation with [γ-^{32}P]ATP during 1 h, the reaction products were separated by SDS-PAGE, and the gels were subjected to autoradiography (*top*) or stained for protein (*prot*) with Coomassie Blue (*bottom*). Percentages of phosphorylation levels are indicated below the autoradiogram. *B*, kinetics of phosphotransfer between the two bacteriophytochromes and the response regulator Rpa3017. *Open squares*, *Rp*BphP2; *filled circles*, *Rp*BphP3. *C* and *D*, transfer of the phosphate from *Rp*BphP2 (*C*) and *Rp*BphP3 (*D*) to the response regulators Rpa3014 and Rpa3017. *A.U.*, arbitrary units.

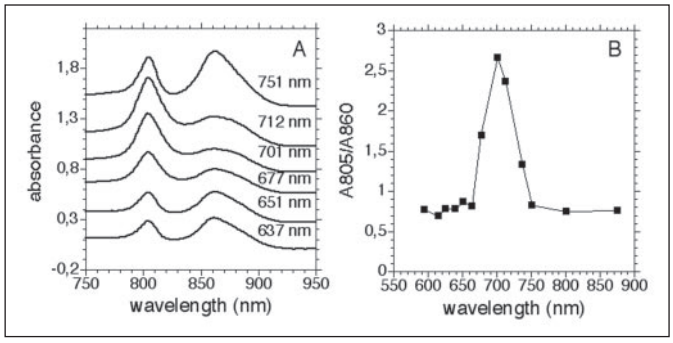


FIGURE 9. **Effect of light of various wavelengths on the LH4 synthesis.** *A*, absorption spectra of *Rps. palustris* cells grown under semiaerobic conditions subjected to illumination at various wavelengths (from 637 to 751 nm) provided by LEDs. The light intensity was set to 10 μmol of photon/m^2/s for each wavelength. *B*, variation of the ratio A805/A860 as a function of the wavelength of the incident light, deduced from experiments similar to those reported in part *A*.

rylate. Excitation with a 705-nm light induces a 45% decrease of the level of phosphorylation in the case of *Rp*BphP3. This value is very close to the amount of state Pnr formed under this light condition (Fig. 2*D*), indicating that the Pnr form of *Rp*BphP3 displays probably no kinase activity.

We next investigated whether the Pr forms of *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 could transfer their phosphates to the response regulators Rpa3014 and Rpa3017, whose genes are located on both sides of *RpBphP2* and *RpBphP3* (Fig. 1, *A* and *B*). A rapid and efficient phosphotransfer was observed from both bacteriophytochromes to Rpa3017 (Fig. 8, *B–D*), indicating that this response regulator is a common element of the signaling pathways initiated by *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3. In contrast, although the prediction of a helix-turn-helix DNA binding domain in Rpa3014 suggests that this response regulator could be the last element of the transduction pathway of *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3, no phosphotransfer was observed from these bacteriophytochromes to Rpa3014, even in the presence of Rpa3017 (Fig. 8, *C* and *D*). We cannot exclude at the moment that this lack of phosphotransfer is because of an incorrect folding of the recombinant Rpa3014 protein. Another explanation could be that additional partners are implicated in the phosphotransfer from *Rp*BphP2 or *Rp*BphP3 to Rpa3014, via Rpa3017. One of these partners could be the response regulator containing also a histidine-kinase domain, encoded by the *rpa3018* gene found just downstream of *rpa3017* (Fig. 1, *A* and *B*). Experiments to complete the characterization of this complex light signaling pathway are in progress.

Action Spectrum of LH4 Synthesis and Phenotypes of RpBphP2 and RpBphP3 Deletion Mutants—To optimize their metabolism according to environmental changes, photosynthetic bacteria regulate the expression level and composition of their photosystems by means of highly sophisticated mechanisms. In the case of *Rps. palustris*, growth under low light intensity under anaerobic condition results in the enhancement of the synthesis of LH4 complexes encoded by the *pucBAd* genes and a decrease of LH2 complexes encoded by the other *pucBA* genes (14, 15). The *pucBAd* genes are located upstream the *RpBphP2* and *RpBphP3* genes. Based on these genes arrangement and the ability of *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 to phosphorylate the same response regulator, one appealing hypothesis is to suppose that these two bacteriophytochromes are involved in the regulation of the LH4 complexes.

To test this hypothesis, *Rps. palustris* CEA001 was subjected to illumination at various wavelengths provided by LEDs emitting between 590 and 875 nm. The experiment was performed under semiaerobic condition because of the requirement for oxygen in the bacteriophytochrome chromophore synthesis. Fig. 9*A* shows the absorption spectra of cells grown under some selected wavelengths. Clearly, the relative amount between the LH4 complexes and the LH2 complexes depends highly upon the illumination wavelength. The ratio between the absorptions at 805 and 860 nm (A805/A860), which is a relative measure of the ratio between LH4 and LH2 complexes, is shown in Fig. 8*B*. The synthesis of the LH4 complexes, concomitant with a decrease in LH2 complexes, is specifically enhanced for wavelengths comprised between 680 and 730 nm with a maximum around 705–710 nm (Fig. 9*B*). This wavelength range corresponds precisely to illumination for which *both Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 are predominantly under their non-phosphorylated states, Pfr and Pnr forms (Fig. 8*A*). Indeed, on the one hand, illumination with wavelengths longer than 740 nm, not absorbed by the dark Pr forms of both *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3, does not modify the phosphorylation state of these bacteriophytochromes, which both remain phosphorylated. On the other hand, excitation with wavelengths shorter than 670 nm converts *Rp*BphP2 to its non-phosphorylated Pfr form but maintains *Rp*BphP3 predominantly in its phosphorylated Pr state (Figs. 2 and 8).

Because the enhancement of LH4 complexes synthesis has been reported to occur only at very low light intensity under anaerobic conditions (15), we have followed the LH4 synthesis as a function of the intensity of 710 nm light. This enhancement was half-saturated for intensity of 5 μmol of photon/m^2/s and remained constant up to 200 μmol of photon/m^2/s (not shown). This unexpected behavior is probably because of the difference in growth conditions between the present work (semiaerobic) and the previous report (anaerobic) (15).

Because of the peculiar absorption and quantum yield properties of the *Rp*BphP3 Pnr state, we expect that both bacteriophytochromes are in their dephosphorylated activating state only when the 710-nm light is in excess to 645-nm light. To test this possibility the synthesis of LH4 complexes has been measured as a function of the ratio between 645 and 710 nm light intensities. We indeed observed that increasing this ratio led to a large decrease in the synthesis of LH4 complexes. Typically, the ratio A805/A860 decreases from 2.0 to 1.2 when the ratio between 645 and 710 nm light intensities increases from 0.1 to 10 (not shown).

To definitively prove that the LH4 synthesis is regulated by the action of *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3, we have examined the phenotype of mutants deleted in *RpBphP2* or *RpBphP3* genes. In contrast to the wild-type strain, no synthesis of LH4 complexes was observed for these mutants irrespective of the illumination intensity and wavelength (not shown).

DISCUSSION

Based on the results described above, we conclude that the light-induced dephosphorylation of *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 is the first step of the signal transduction pathway of the LH4 synthesis. These two bacteriophytochromes act as the inputs to an "and gate" for the regulation of the LH4 synthesis as a function of the relative intensities of 645 and 710 nm light. We propose that measurement of this ratio is an indirect detection of the presence of phytoplankton. Indeed, in their natural environment, photosynthetic bacteria may develop below dense layers of phytoplankton. Because of the strong absorption of cyanobacteria and microalgae chromophores in the visible region up to 700 nm, the ratio of photons of 645 and 710 nm reaching the lower layer of photosynthetic bacteria is significantly affected by the presence of phytoplankton. In particular, photosynthetic bacteria receive only far-red light in these conditions. This significantly decreases their available light energy. To overcome this limitation in light supply, *Rps. palustris* activates the synthesis of LH4 complexes, via the action of *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 and decreases the synthesis of LH2 complexes. These changes in LH complexes significantly enhance the light capture efficiency of the bacteria. First, the infrared absorption of all the bacteriochlorophyll molecules of the LH4 complexes is centered around 800 nm, whereas

most (two-thirds) of the absorption the LH2 complexes peaks at longer wavelengths, around 860 nm (15). Because much more light is transmitted at 800 nm than around 860 nm due to depth water attenuation (26), the LH4 complexes collect more light than the LH2 complexes. In addition, the increase in energy gap between LH4 (B800 LH2) and the B870 LH1 complexes, as compared with the gap between LH2 (B800-850 LH2) and B870 LH1, constitutes an effective sink and a barrier against back transfer of excitonic energy.

The strategy adopted by *Rps. palustris* to measure the difference in intensity and light quality has been the involvement of a pair bacteriophytochromes, one of which, *Rp*BphP3, presents atypical optical properties. Unusual photochemical properties have also been reported recently for the light sensor protein Ppr of *Rhodospirillum centenum* by Kyndt *et al.* (27). This chromoprotein possesses both a photoactive yellow protein domain and a bacteriophytochrome domain (5). The dark-adapted form of Ppr presents an absorption maximum at 702 nm with a shoulder around 650 nm, typical of the Pr form of bacteriophytochromes. Upon illumination, both the 702- and the 650-nm transitions bleach with no concomitant appearance of a red- or blue-shifted transition (27). It is important to note that this behavior, which may appear at first sight similar to what we observed for *Rp*BphP3, corresponds to a real bleaching of the optical transitions of Ppr and not to a blue shift of these transitions as in the case of *Rp*BphP3 (Fig. 4*B*).

Another example of unusual spectral properties has been also reported for the PixJ1 holoprotein of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 (28). This light sensor shows a photoreversible conversion between a blue light-absorbing form and a green light-absorbing form. However this chromoprotein contains two GAF domains but does not possess the CBD, characteristic of phytochromes. In addition, the chemical nature of the chromophore remains unknown. It has been shown to be different from the various phytochrome chromophores previously characterized in plant, cyanobacteria or bacteria (phytochromobilin, phycocyanobilin, biliverdin, respectively) (28). So PixJ1 cannot be considered as a *bona fide* phytochrome.

The short wavelength position of the Pnr form of *Rp*BphP3 may be related to a less extensive conjugation of the π-electrons because of the distortion of one of the biliverdin ring. In agreement with this hypothesis, the large positive absorption band at 1698 cm^{-1}, assigned to the carbonyl group of ring D in the Pnr form of *Rp*BphP3 (Fig. 6) may indicate a difference in the environment of this carbonyl between *Rp*BphP3 and *Rp*BphP2. This could be because of a modification of the coupling of ν(C=O) and ν(C=C) modes (of the C_{15}=C_{16} methine bridge) in the Pnr state of *Rp*BphP3. Sequence alignment of several bacteriophytochromes reveals unconserved amino acids in the CBD of *Rp*BphP3 (Fig. 1*C*). Some of these residues were introduced in *Rp*BphP2 by site-directed mutagenesis (Fig. 1*C*), to test whether this could confer the short wavelength position of the Pnr form of *Rp*BphP3 to *Rp*BphP2. This was not the case with any of these single mutations. The molecular basis of the short wavelength position of the new Pnr form remains therefore to be disclosed. Construction of mutants containing multiple amino acids substitutions is in progress to address this question.

Several questions concerning the molecular mechanism of the light regulation of LH4 complexes remain to be answered. What other partner(s) are involved in the phosphorelay initiated by the two bacteriophytochromes *Rp*BphP2 and *Rp*BphP2? Putative candidates are the transcriptional factor Rpa3014 and the response regulator Rpa3018, whose genes belong to the same operon than *RpBphP2* and *RpBphP3*. These two proteins present some similarities with the transcriptional factor Rpa1491 and the putative *Rp*BphP4 bacteriophytochrome, respectively. The *RpBphP4* and *rpa1491* genes are located near the *pucBAe* genes encoding LH2 complexes. A cross-talk between the bacteriophytochrome *Rp*BphP4 and the three proteins, Rpa3014, Rpa3018, and Rpa1491, is possibly involved in the co-regulation of the synthesis of the LH2 and LH4 complexes. Although the genes of the two other bacteriophytochromes, present in *Rps. palustris*, are found in genome regions noticeably distant from photosynthesis genes, we cannot exclude yet their participation in the regulation of the synthesis of the photosynthetic apparatus. Another point to be solved is the mechanism of the enhancement of the LH4 complexes synthesis observed only at low light intensity under anaerobic conditions, for which the involvement of *Rp*BphP2 or *Rp*BphP3 is difficult to understand, because their chromophore synthesis requires oxygen.

The measurement of light parameters, like those described above for *Rps. palustris*, is essential for photosynthetic organisms for the adaptation to their light environment to regulate light capture for an optimal photosynthetic activity. Changes in pigment composition in response of different wavelengths, the so-called complementary chromatic adaptation, has been observed in different species of cyanobacteria. For example, the pigmentation of cyanobacteria changes in function of light quality. In *Fremyella diplosiphon*, red light (≈650 nm) induces the synthesis of a large amount of blue-absorbing phycocyanin biliprotein but only small amount of the red-absorbing phycoerythrin biliprotein (29, 30). In contrast, green light (≈540 nm) induces the synthesis of large quantities of phycoerythrin but only small amounts of phycocyanin. The regulation observed during this complementary chromatic adaptation suggests the existence of a peculiar light control system. This system presents therefore some homologies to the light-sensing system of regulation of LH4 complexes of *Rps. palustris*. The peculiar light sensors required for complementary chromatic adaptation would have to absorb in the green (540 nm) and the red (650 nm) regions. It has been recently proposed that the photoreceptor RcaE is required for both green and red light responsiveness during complementary chromatic adaptation (31). This protein contains both the CBD and the transmitter module typical of phytochrome (3). Although it has been shown that RcaE covalently binds *in vitro* classical bilins (phycocyanobilin, phytochromobilin, biliverdin), the reconstituted proteins obtained are not photochromics suggesting that contrary to plant or bacterial phytochromes, RcaE could require a separate lyase activity for an accurate bilin attachment (31). In the absence of spectral analysis, it is still unclear whether complementary chromatic adaptation-regulated gene expression in *Fremyella* is under the control of RcaE alone with unusual optical properties. Alternatively, RcaE could be associated in tandem with another photoreceptor similarly to the organization of *Rp*BphP2/*Rp*BphP3 present in *Rps. palustris*.

Acknowledgments—We thank Drs. B. Genty and B. Dimon for helpful comments. We wish also to express our gratitude to Dr. J. Lavergne for computing the equations of the pure spectra calculation and for constructive discussions.

REFERENCES

1. Smith, H. (2000) *Nature* **407,** 585–591
2. Quail, P. H., Boylan, M. T., Parks, B. M., Short, T. W., Xu, Y., and Wagner, D. (1995) *Science* **268,** 675–680
3. Kehoe, D. M., and Grossman, A. R. (1996) *Science* **273,** 1409–1412
4. Hughes, J., Lamparter, T., Mittmann, F., Hartmann, E., Gärtner, W., Wilde, A., and Börner, T. (1997) *Nature* **386,** 663
5. Jiang, Z.-Y., Swem, L. R., Rushing, B. G., Devanathan, S., Tollin, G., and Bauer, C. E. (1999) *Science* **285,** 406–409
6. Davis, S. J., Vener, A. V., and Vierstra, R. D. (1999) *Science* **286,** 2517–2520
7. Yoshihara, S., Suzuki, F., Fujita, H., Geng, X. X., and Ikeuchi, M. (2000) *Plant Cell Physiol.* **41,** 1299–1304
8. Giraud, E., Fardoux, J., Fourrier, N., Hannibal, L., Genty, B., Bouyer, P., Dreyfus, B., and Verméglio, A. (2002) *Nature* **417,** 202–205
9. Yeh, K. C., Wu, S. H., Murphy, J. T., and Lagarias, J. C. (1997) *Science* **277,** 1505–1508
10. Bhoo, S.-H., Davis, S. J., Walker, J., Karniol, B., and Vierstra, R. D. (2001) *Nature* **414,**

776–779
11. Giraud, E., Zappa, S., Jaubert, M., Hannibal, L., Fardoux, J., Adriano, J.-M., Bouyer, P., Genty, B., Pignol, D., and Verméglio, A. (2004) *Photochem. Photobiol. Sci.* **3,** 587–591
12. Giraud, E., Hannibal, L., Fardoux, J., Jaubert, M., Jourand, P., Dreyfus, B., Sturgis, J. N., and Verméglio, A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279,** 15076–15083
13. Tadros, M. H., and Waterkamp, K. (1989) *EMBO J.* **8,** 1303–1308
14. Evans, M. B., Hawthornthwaite, A. M., and Cogdell, R. J. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1016,** 71–76
15. Hartigan, N., Tharia, H. A., Sweeney, F., Lawless, A. M., and Papiz, M. Z. (2002) *Biophys. J.* **82,** 963–977
16. Larimer, F. W., Chain, P., Hauser, L., Lamerdin, J., Malfatti, S., Do, L., Land, M. L., Pelletier, D. A., Beatty, J. T., Lang, A. S., Tabita, F. R., Gibson, J. L., Hanson, T. E., Bobst, C., Torres, J. L., Peres, C., Harrison, F. H., Gibson, J., and Harwood, C. S. (2004) *Nature Biotech.* **22,** 55–61
17. Kokotek, W., and Lotz, W. (1989) *Gene* (*Amst.*) **84,** 467–471
18. Quandt, J., and Hynes, M. F. (1993) *Gene* (*Amst.*) **127,** 15–21
19. Joliot, P., Béal, D., and Frilley, B. (1980) *J. Chimie Physique* **77,** 209–216
20. Lamparter, T., Michael, N., Mittmann, F., and Esteban, B. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99,** 11628–11163
21. Karniol, B., and Vierstra, R. D. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100,** 2807–2812
22. Sineshchekov, V. A. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1228,** 125–164
23. Foerstendorf, H., Benda, C., Gärtner, W., Storf, M., Scheer, H., and Siebert, F. (2001) *Biochemistry* **40,** 14952–14959
24. Foerstendorf, H., Mummert, E., Schäfer, E., Scheer, H., and Siebert, F. (1996) *Biochemistry* **35,** 10793–10799
25. Linschitz, H., Kasche, V., Butler, W. L., and Siegelman, H. W. (1966) *J. Biol. Chem.* **241,** 3395–3403
26. Vilia, X., Colomer, J., and Garcia-Gil, L. J. (1996) *Ecolog. Model.* **87,** 59–68
27. Kyndt, J. A., Meyer, T. E., and Cusanovich, M. A. (2004) *Photochem. Photobiol. Sci.* **3,** 519–530
28. Yoshihara, S., Katayama, M., Geng, X., and Ikeuchi, M. (2004) *Plant Cell Physiol.* **45,** 1729–1737
29. Bogorad, L. (1975) *Annu. Rev. Plant Physiol.* **26,** 369–401
30. Tandeau de Marsac, N. (1977) *J. Bacteriol.* **130,** 82–91
31. Terauchi, K., Montgomery, B. L., Grossman, A. R., Lagarias, J. C., and Kehoe, D. M. (2004) *Mol. Microbiol.* **51,** 567–577

Etudes complémentaires

Afin de mieux caractériser la voie de signalisation initiée par ces deux bactériophytochromes, des études complémentaires ont été réalisées. La présence d'un domaine HTH au niveau du régulateur de réponse Rpa3014 (Figure 22B) indique que cette protéine peut agir comme un facteur de transcription en se fixant à l'ADN. Elle pourrait correspondre au dernier élément de la chaîne de transduction du signal lumineux initié par *Rp*BphP2 et *Rp*BphP3. Cependant l'absence de phosphotransfert des deux BphPs vers Rpa3014, même en présence de Rpa3017, suggérait l'existence d'un partenaire intermédiaire intervenant entre Rpa3017 et Rpa3014. Une analyse plus attentive de la région génomique entourant le cluster *rpa3014-rpa3017* a révélé la présence d'une autre ORF : *rpa3018* orientée selon le même sens de lecture (Figure 22A). Chez les différentes souches de *Rps. palustris,* dont le génome a été séquencé, l'organisation génomique de ces gènes, présentés figure 22A, est systématiquement retrouvée suggérant un lien fonctionnel très fort entre ces gènes. De plus, l'étude de la séquence protéique de Rpa3018 révèle que cette protéine possède à la fois un domaine RR et un domaine histidine-kinase (Figure 22B). Elle constitue donc un bon candidat pour assurer un phosphotransfert vers Rpa3014 dans la chaîne de transduction et pourrait jouer un rôle important dans la voie de signalisation initiée par *Rp*BphP2 et *Rp*BphP3.

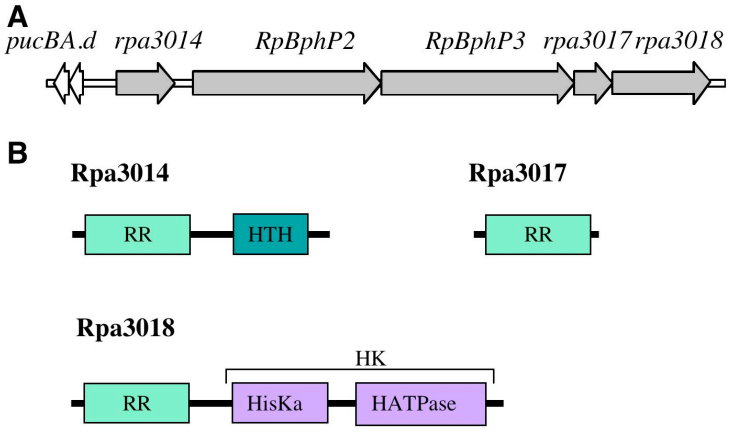


Figure 22 : Caractérisation moléculaire des régulateurs de réponses associés à *Rp*BphP2 et *Rp*BphP3.

(A) Organisation des gènes identifiés à proximité de *RpBphP2* et *RpBphP3*
(B) Représentation schématique des domaines caractéristiques des trois régulateurs de réponses Rpa3014, Rpa3017 et Rpa3018. **RR** : domaine régulateur de réponse ; **HTH** : domaine Hélice-Tour-Hélice ; **HK** : domaine Histidine-Kinase ; **HisKA** : domaine accepteur de phosphate ; **HATPase** : domaine de liaison de l'ATP.

Caractérisation de Rpa3018

Afin de vérifier l'hypothèse précédente, nous avons purifié la protéine Rpa3018 après clonage du gène correspondant dans le vecteur d'expression pBAD. Déposée sur un gel non réducteur SDS-PAGE, la protéine Rpa3018 purifiée apparaît essentiellement oxydée (Figure 23, piste a). En effet des bandes de haut poids moléculaire, comprises entre 150 et 380 kDa, sont principalement présentes tandis que la bande de pois moléculaire attendue (47 kDa environ) apparaît très faiblement. Cette dernière est retrouvée majoritairement dans le gel lorsque la protéine est au préalable incubée avec un agent réducteur, tel que le DTT (Figure 23, piste b). Au contraire, un traitement par le ferricyanure de potassium (**$K_3[Fe(CN)_6]$:**agent oxydant) (Figure 23, piste c) provoque une oxydation complète de la protéine ce qui se traduit par la réapparition des bandes de haut poids moléculaire et la disparition totale de la bande à 47 kDa. Enfin, la ré-oxydation chimique de la protéine après traitement par le DTT (Figure 23, piste d) suggère que cette sensibilité au potentiel redox est réversible. Les bandes de haut poids moléculaire pourraient correspondre à des formes oligomériques de 4 à 8 monomères. Pour confirmer cela, des expériences de gel filtration devront être envisagées.

L'analyse de la séquence n'ayant pas révélée la signature d'un centre redox, nous avons émis l'hypothèse que la sensibilité au potentiel redox de Rpa3018 pouvait être due à un ou plusieurs résidus de cystéines. En effet, de nombreuses publications mettent en évidence le rôle des groupements thiols dans la sensibilité au potentiel redox (Pour revue : Paget et Buttner, 2003). L'analyse de la séquence protéique de Rpa3018 révèle la présence de 4 résidus cystéines, Cys141, Cys262, Cys318 et Cys325. Les quatre mutants cystéines ont donc été construits afin d'étudier le rôle de ces acides aminés dans la sensibilité au potentiel redox de la protéine. Les analyses SDS-PAGE révèlent que les protéines mutées Rpa3018-C262S (Figure 23, pistes i, j , k l) et Rpa3018-C325S (Figure 23, pistes q, r, s t) se comportent comme Rpa3018 WT (Figure 23, pistes a, b, c, d) en réponse aux conditions rédox du milieu. Les mutants Rpa3018-C141S (Figure 23, pistes e, f, g, h) et Rpa3018-C318S (Figure 23, pistes m, n, o, p), quant à eux, présentent une sensibilité moindre aux milieux oxydants. Ces 2 cystéines Cys141 et Cys318 semblent donc être impliquées dans la sensibilité au potentiel redox de la protéine.

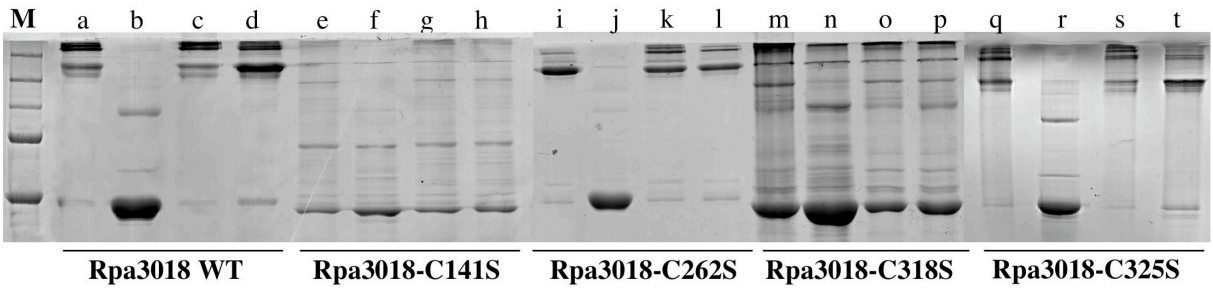


Figure 23 : Analyse sur gel SDS-PAGE de la sensibilité au potentiel redox de la protéine Rpa3018 et des mutants cystéines en réponse à différents traitements.

(a, e, i, m et q) : aucun traitement (b, f, j, n et r) : DTT (1mM)
(c, g, k, o et s) : $K_3[Fe(CN)_6]$ (1mM) (d, h, l, p et t) : DTT (1mM) / $K_3[Fe(CN)_6]$ (5mM)

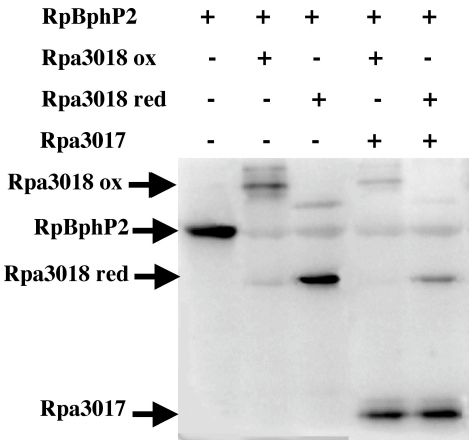
Participation de la protéine Rpa3018 dans la chaîne de phosphotransfert

La protéine Rpa3018, comme nous l'avons déjà souligné, possède un domaine RR et un domaine histidine-kinase. Elle est donc susceptible de se phosphoryler au niveau de ses deux domaines : sur un résidu d'aspartate au niveau du domaine RR et sur un résidu d'histidine au niveau de son domaine histidine-kinase. Pour déterminer sa participation éventuelle dans la chaîne de phosphotransfert initiée par *Rp*BphP2 et *Rp*BphP3, des tests de phosphorylation ont été réalisés en présence des bactériophytochromes et des deux régulateurs de réponses Rpa3014 et Rpa3017 en conditions réductrices ou non.

Alors que nous supposions initialement que Rpa3018 intervenait après la phosphorylation de Rpa3017, nous observons sur la figure 24 qu'un phosphotransfert est possible directement entre le bactériophytochrome *Rp*BphP2 (résultats identiques pour *Rp*BphP3) et la protéine Rpa3018. La stabilité de la liaison phosphate observée en milieu acide mais pas en milieu basique (résultat non montré) est en accord avec une phosphorylation de Rpa3018 au niveau d'un résidu aspartate (Stock *et al.*, 2000), ce qui suggère que c'est le domaine RR de Rpa3018 qui a été phosphorylé lors de ce phosphotransfert.

Lors de l'ajout simultané de Rpa3017 et de Rpa3018 (Figure 24) à *Rp*BphP2 phosphorylé (même résultats pour *Rp*BPhP3) nous observons que le régulateur de réponse Rpa3017 est majoritairement phosphorylé quelque soit l'état d'oxydoréduction de Rpa3018. Cela suggère, dans nos conditions expérimentales un transfert préférentiel du phosphate des bactériophytochromes vers Rpa3017. Cependant, il est à noter qu'au cours d'expériences où *Rp*BphP2, *Rp*BphP3, Rpa3017 et Rpa3018, sont mis en conditions équimolaires, les deux

régulateurs de réponses présentent après une incubation assez longue des niveaux de phosphorylation identiques (résultats non montrés). Aux vues de ces résultats, nous émettons l'hypothèse que le régulateur de réponse Rpa3017 entrerait en compétition avec Rpa3018 dans la chaîne de phosphotransfert commune initiée par *Rp*BphP2 et *Rp*BphP3. Il pourrait jouer un rôle tampon qui permettrait de contrôler le niveau de phosphorylation de Rpa3018 et ainsi d'intégrer l'action en tandem des deux bactériophytochromes.



<u>Figure 24</u> : Phosphotransfert de *Rp*BphP2 vers Rpa3017 et Rpa3018.

Au cours de ces différents essais aucun transfert de phosphorylation vers Rpa3014 n'est observé quels que soient les conditions et les différents partenaires mis en présence (résultats non montrés), remettant ainsi en cause la possibilité que ce régulateur de réponse appartienne vraiment à la chaîne de transduction.

Toutefois, nous savons que la protéine Rpa3014, qui possède un domaine RR, n'est susceptible d'accepter un groupement phosphate que d'un partenaire lui-même phosphorylé au niveau d'un résidu histidine (Stock *et al.,* 2000). Nous pouvons ainsi envisager qu'un phosphotransfert puisse avoir lieu entre Rpa3018 et Rpa3014 à la condition que Rpa3018 soit phosphorylé au niveau de son domaine histidine-kinase.

<u>Capacité d'autophosphorylation de Rpa3018 et rôle de Rpa3014</u>

Afin de vérifier cette dernière hypothèse nous avons tout d'abord testé la capacité d'autophosphorylation de Rpa3018 en conditions oxydante et réduite. Comme nous pouvons le voir sur la figure 25, Rpa3018 s'autophosphoryle uniquement en conditions réductrices. Ceci confirme bien que Rpa3018 possède une activité histidine-kinase propre et que celle-ci est modulée par son niveau d'oxydation. Cependant, l'activité observée ici est très faible, ce qui laisse supposer que nous ne sommes peut-être pas dans les meilleures conditions

d'autophosphorylation ou que la protéine est très faiblement fonctionnelle. De nombreux paramètres peuvent interférer, il peut s'agir d'un problème de l'étiquette 6 histidines qui tout en marquant la protéine empêche son fonctionnement. Il se peut aussi que la protéine purifiée n'ait pas une bonne conformation ou que le milieu de phosphorylation ne soit pas optimum. Une autre hypothèse envisageable est que l'activité kinase de Rpa3018 ne soit effective que lorsque le domaine RR de la protéine est phosphorylé. De nombreux essais pour améliorer l'autophosphorylation de la protéine ont été réalisés, mais ils sont restés sans succès.

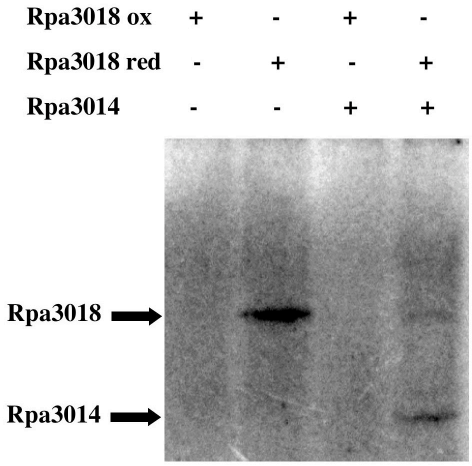


Figure 25 : Autophosphorylation de Rpa3018 et phosphotransfert vers Rpa3014.

Dans un deuxième temps, Rpa3014 est mis en présence de Rpa3018 phosphorylé. Nous observons alors une déphosphorylation de Rpa3018, et une phosphorylation très faible de ce régulateur de réponse (Figure 25).

Cette faible phosphorylation du facteur de transcription peut s'expliquer par la faible autophosphorylation de Rpa3018. Il est à souligner par ailleurs que nous avons eu des difficultés à purifier Rpa3014. Nous ne pouvons donc pas exclure la possibilité que la protéine avec laquelle nous travaillons présente des problèmes de fonctionnalité.

Régulation de *pucBA.d*

Nous avons montré, par des expériences de gel retard, que le facteur de transcription Rpa3014 provoque un léger retard de la région promotrice de *pucBA.d* lors de la migration de l'ADN (Figure 26) ce qui laisse supposer une interaction possible entre cette protéine et le

promoteur. Cependant cette fixation n'a pas été confirmée par des expériences de DNA foot-print (empreinte à la DNAse1) où aucune zone de protection n'est observée dans le cas d'un Rpa3014 non phosphorylé. Comme dit précédemment, il est possible que la protéine avec laquelle nous travaillons ne soit pas complètement fonctionnelle, et qu'ainsi sa fixation sur l'ADN ne soit pas assez stable pour permettre une protection totale de la sonde. Une autre possibilité est que cette protéine, pour se fixer correctement au promoteur *pucBA.d,* doit être phosphorylée, cependant le niveau de phosphorylation de Rpa3014 obtenu jusqu'à présent ne nous a pas permis de réaliser cette expérience.

Figure 26 : Fixation de Rpa3014 sur le Pm*pucBA.d*

(1) : sonde Pm*pucBA.d* marquée au 32P

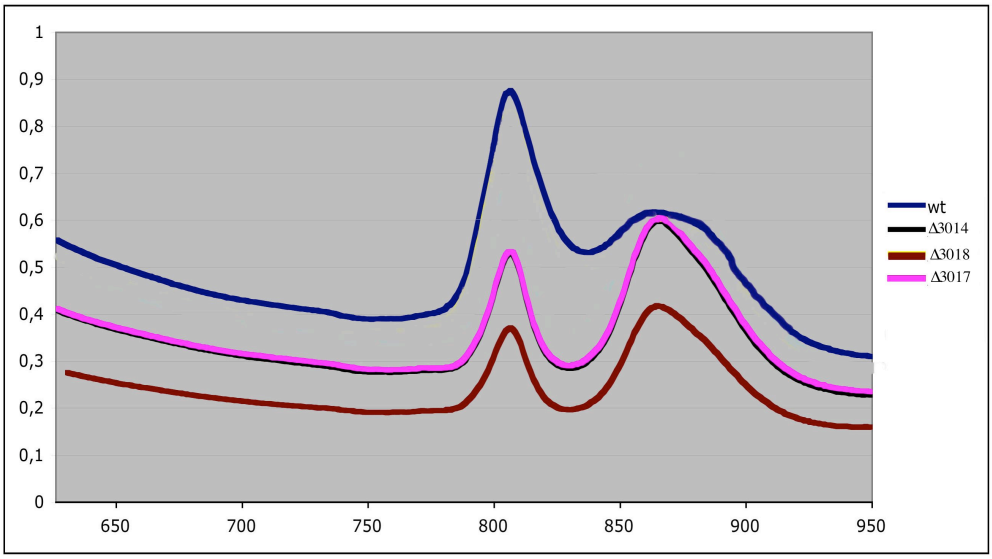
(2) : sonde Pm*pucBA.d* liée à Rpa3014.

Etudes *in vivo*

Les études *in vitro,* menées précédemment, suggèrent l'implication des trois régulateurs de réponses Rpa3014, Rpa3017 et Rpa3018 dans la chaîne de régulation initiée par *Rp*BphP2 et *Rp*BphP3. Des expériences complémentaires ont été réalisées afin de confirmer, *in vivo*, l'implication de ces protéines, dans la mise en place des antennes LH4. Pour cela, nous avons délété, chez *Rps. palustris,* chacun des gènes correspondants. La difficulté réside dans le fait que ces gènes présentent une organisation de type opéron ; bien que le doute subsiste encore pour *rpa3014* car l'espace intergénique le séparant des autres gènes est plus important (224 pb). Il faut donc déléter complètement le gène cible sans pour autant interrompre la transcription de l'opéron. Dans un premier temps, nous avons tenté d'obtenir des mutants non polaires par PCR overlap sans insérer de cassette de résistance ou d'antibiotique, mais aucun clone n'a pu être sélectionné. La solution adoptée a donc été d'insérer une cassette, en phase, portant un gène de sélection (résistance à la kanamycine) sous le contrôle de son propre promoteur (pnptII). Grâce à cette cassette, nous avons pu obtenir des mutants pour chacun des gènes. Ils sont nommés : Δ*rpa3014*, Δ*rpa3017* et Δr*pa3018*. Cependant les gènes de l'opéron, situés en aval de la cassette, ne sont plus sous le

contrôle du promoteur de l'opéron mais sous celui de la cassette. Cela peut entraîner une surexpression de ces gènes. De ce fait, les phénotypes de ces trois mutants doivent être interprétés avec précaution.

Ces mutants ayant été réalisés très récemment, seules quelques études phénotypiques, visant à regarder la capacité de ces mutants à synthétiser ou non les antennes LH4, ont pu être réalisées. Ces tests ont été effectués en anaérobiose et sous faible intensité lumineuse c'est-à-dire dans les conditions où les antennes LH4 sont synthétisées en grande quantité chez le WT. Nous observons chez les trois mutants Δ*rpa3014*, Δ*rpa3017* et Δr*pa3018* l'absence de synthèse des antennes LH4 (Figure 27).



<u>Figure 27</u> : Spectres d'absorbance des souches sauvage et mutées de *Rps. palustris* CEA001.

Ce résultat a pu être confirmé sur 3 essais indépendants. Rpa3014, Rpa3017 et Rpa3018 interviendraient donc bien dans la synthèse de ces antennes en ayant un rôle activateur dans l'expression des gènes *pucBA.d.*

L'ensemble des données ainsi obtenues, *in vitro* et *in vivo,* nous conduit à proposer le modèle de régulation des antennes de type LH4 suivant (Figure 28) :

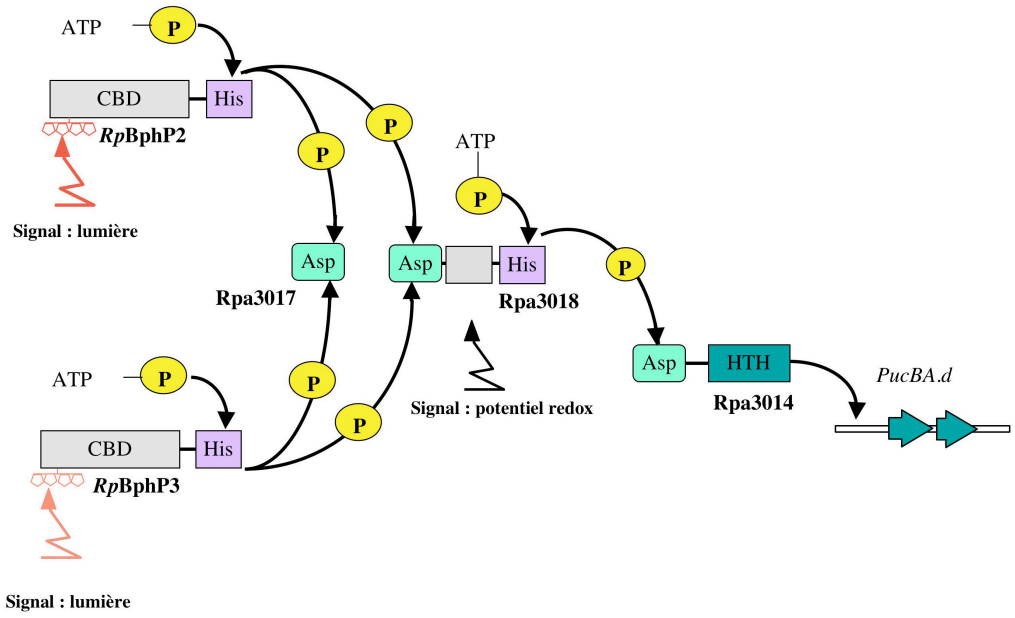


Figure 28 : Proposition d'un schéma de régulation.

La régulation de ce type d'antennes codées par les gènes *pucBA.d* dépendrait à la fois de la lumière et du potentiel redox. Elle impliquerait l'action concertée de 5 partenaires qui agiraient au travers de 2 systèmes à deux composants.

Les deux bactériophytochromes *Rp*BphP2 et *Rp*BphP3, qui présentent des propriétés spectrales distinctes, utiliseraient la même voie de signalisation. Ils transfèreraient leur groupement phosphate, suivant les conditions de lumière, vers deux régulateurs de réponses possibles, Rpa3017 préférentiellement et Rpa3018. Cette dernière protéine jouerait un rôle central dans cette voie de régulation. Elle agirait comme une kinase sensible au potentiel redox dont l'activité serait également modulée par la lumière. Ce signal lumineux serait intégré *via* le niveau de phosphorylation du domaine RR de Rpa3018 par les 2 bactériophytochromes.

Rpa3018 transfèrerait son groupement phosphate vers le facteur de transcription Rpa3014 qui serait donc le dernier élément de la chaîne de transduction et qui activerait, suivant son niveau de phosphorylation, l'expression des gènes *pucBA.d.*

Le schéma que nous proposons permet ainsi de tenir compte des liens possibles entre les différents partenaires mis en évidence par les tests de phosphorylation. Cependant il demeure extrêmement spéculatif et soulève de nombreuses interrogations en ce qui concerne

le mode d'action précis de chacun de ces partenaires. En particulier se posent les questions suivantes :

- quel est le rôle précis de Rpa3017 ? Cette protéine, qui contient uniquement un domaine RR, interagit-elle avec Rpa3018 et Rpa3014 pour former un complexe ? Ou, interviendrait-elle uniquement pour piéger le groupement phosphate transféré par les deux bactériophytochromes ce qui permettrait d'intégrer leur action en tandem ?
- Quel est l'effet de la phosphorylation du domaine RR de Rpa3018 par les deux bactériophytochromes sur sa propre activité kinase ? Est ce que cette phosphorylation inhiberait, ou au contraire activerait, sa capacité d'autophosphorylation ?
- Quel est, *in vivo*, le mode d'action des deux bactériophytochromes ? les tests effectués jusqu'à présents ayant été réalisés uniquement sur des mutants polaires, l'étude *in vivo* sur des mutants non polaires apparaît indispensable. Nous ne pouvons pas non plus exclure l'hypothèse que les bactériophytochromes *Rp*BphP2 et *Rp*BphP3 pourraient former des hétérodimères comme cela a été démontré pour différents phytochromes d'*A. thaliana* (Sharrock & Clack, 2004).
- Comment, en anaérobiose, peut-il y avoir régulation des antennes LH4 par l'intensité lumineuse, alors que les bactériophytochromes devraient être non fonctionnels ; la synthèse de chromophore ne se faisant qu'en présence d'oxygène ? Ce pourrait-il que les apoprotéines de *Rp*BphP2 et *Rp*BphP3 soient capables de s'autophosphoryler, comme cela a déjà été montré chez d'autres organismes (Jiang *et al.,* 1999), et donc d'intervenir sur la voie de signalisation même en anaérobiose ? Un autre senseur de lumière pourrait-il intervenir ?

Comme nous pouvons le voir, de nombreuses questions persistent et des études complémentaires seraient nécessaires pour comprendre parfaitement le mode de fonctionnement extrêmement complexe de cette chaîne de régulation.

Article 2 :

Evolution of a bacteriophytochrome from light to redox sensor.

Vuillet L, Kojadinovic M, Zappa S, Jaubert M, Adriano JM, Fardoux J, Hannibal L, Pignol D, Verméglio A, and Giraud E

Résumé de l'article

Chez *Rps. palustris*, le gène *RpBphP4*, codant une protéine homologue aux bactériophytochromes, est retrouvé, comme le tandem *RpBphP2/RpBphP3*, à proximité d'un opéron *pucBA*. Cet opéron *pucBA.e* code les polypeptides présents dans les antennes de type LH2. On retrouve également, contigu à *Rp*BphP4, un gène qui code un RR (Rpa1489) présentant une très forte similarité avec Rpa3014, le dernier élément de la voie de signalisation de *Rp*BphP2 et *Rp*BphP3. Les similitudes retrouvées au niveau de l'organisation des gènes autour de *RpBphP4*, et du tandem *RpBphP2/RpBphP3*, nous ont laissé supposer que *Rp*BphP4 pouvait intervenir dans la régulation des antennes de type LH2. La voie de signalisation initiée par *Rp*BphP4 pour réguler l'expression des opérons *puc* pourrait également faire intervenir le facteur de transcription Rpa1489. C'est donc sur cette hypothèse, que nous avons initié l'étude de ce bactériophytochrome, ce qui a constitué la partie la plus importante de mon travail de thèse. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication dans la revue EMBO Journal. Le bref aperçu des travaux présenté ici a pour objectif de repositionner cette étude dans un ordre chronologique afin de permettre au lecteur de mieux comprendre le questionnement et la démarche qui ont été les nôtres.

Nous avons initié cette étude en utilisant la souche modèle CEA001. Celle-ci présente un gène *RpBphP4* dont la séquence est identique à celle du *RpBphP4* retrouvé chez la souche séquencée CGA009. Le bactériophytochrome *Rp*BphP4 présente les trois domaines caractéristiques de cette famille de protéines : PLD, GAF et PHY. Cependant la purification de la protéine, par le système d'expression précédemment utilisé pour les autres bactériophytochromes, a montré qu'elle n'était pas capable de fixer un chromophore (biliverdine, phycocyanobiline ou phycoérythrobiline). Une analyse plus attentive de la séquence protéique a mis en évidence l'absence du résidu de cystéine C_{24} nécessaire à la fixation du chromophore. Malgré la réintroduction de ce résidu ou le remplacement de l'extrémité N-terminale par celle de *Rp*BphP1, aucune fixation d'un chromophore n'a pu être obtenue. Cela suggérait que le gène *RpBphP4* avait subi d'importantes mutations ayant

entraîné une perte de la sensibilité à la lumière de la protéine correspondante. De ce fait, la fonctionnalité de cette protéine était remise en cause.

Afin de déterminer si le gène *RpBphP4* pouvait être fonctionnel chez la souche CEA001, nous avons construit un mutant par délétion *ΔRpBphP4*. L'analyse de la mise en place du photosystème en fonction des conditions d'éclairement et d'oxygène a révélé que la synthèse des antennes LH2 était fortement réprimée chez la souche mutante tandis qu'elle était fortement dépendante des conditions d'oxygène chez la souche sauvage. Cette étude phénotypique nous a conforté dans l'idée que la protéine *Rp*BphP4 (souche CEA001) était parfaitement fonctionnelle et qu'elle pourrait intervenir dans un circuit de régulation en intégrant la sensibilité à l'oxygène ou du moins les variations du potentiel redox. Cette hypothèse est également confortée de manière étonnante par l'homologie qui existe entre les protéines Rpa3018, impliquées dans la régulation par le potentiel redox des antennes LH4, et *Rp*BphP4 (Figure 29).

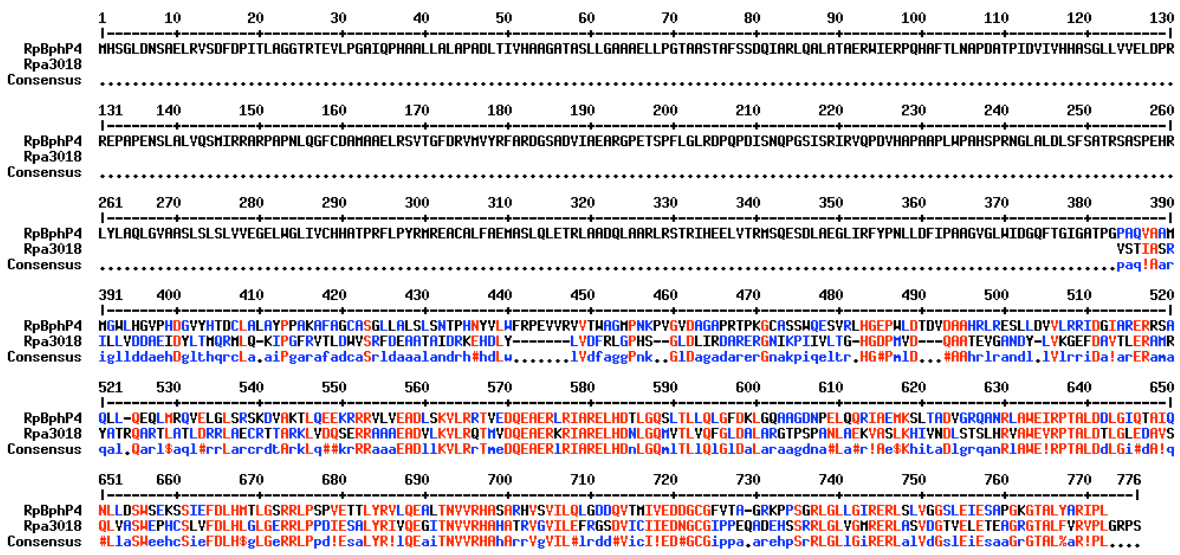


Figure 29 : Alignement des séquences protéiques de Rpa3018 et d'achromo-RpBphP4.

En accord avec ce dernier élément, des analyses biochimiques complémentaires nous ont permis de montrer un changement de l'état d'oligomérisation de la protéine suivant les conditions redox comparable à celui obtenu avec la protéine Rpa3018. Nous avons alors supposé que la sensibilité au potentiel redox de *Rp*BphP4 pouvait être due, comme chez la protéine Rpa3018, à la présence de résidus de cystéines capables de former des ponts disulfures en conditions oxydantes. Par des expériences de mutagenèse dirigée, nous avons montré que 2 résidus de cystéine (C_{472} et C_{722}), retrouvés respectivement dans le domaine

PHY et le domaine histidine-kinase de la protéine, jouaient un rôle crucial dans la sensibilité de *Rp*BphP4 au potentiel redox.

Au moment où nous pensions présenter ces résultats pour publication, nous avons eu accès aux séquences des génomes de 4 nouvelles souches de *Rps. palustris* (**http://www.jgi.doe.gov/**). Seules 2 d'entre elles, les souches HaA2 et BisB5, présentaient un homologue du gène *RpBphP4*. De plus, l'analyse de leur séquence protéique indiquait la présence d'un résidu de cystéine à l'extrémité N-terminale suggérant que ces protéines étaient sûrement capables de fixer un chromophore. Il nous a donc paru important de compléter cette étude par la caractérisation de ces 2 nouveaux *Rp*BphP4. Leurs purifications ainsi que leurs propriétés spectrales ont confirmé leur capacité à fixer la biliverdine. Ces deux *Rp*BphP4, contrairement à leur homologue chez la souche CEA001, agissaient comme de véritables senseurs de lumière. Il est à noter également que ces deux *Rp*BphP4 (souches HaA2 et BisB5) ne présentaient pas de sensibilité au potentiel redox ; ce qui est en accord avec l'absence des résidus de cystéines C_{472} et C_{722} impliqués dans cette sensibilité chez *Rp*BphP4 (souche CEA001). Etant donné les propriétés fondamentalement différentes de ces deux *Rp*BphP4 par rapport à l'homologue *Rp*BphP4 (souche CEA001), nous avons fait une analyse de la diversité de ce gène chez différentes souches de *Rps. palustris*. Le gène *RpBphP4* est retrouvé chez l'ensemble des souches testées (6) mais le résidu de cystéine impliqué dans la fixation du chromophore est toujours absent suggérant un comportement identique à *Rp*BphP4 (souche CEA001).

Une étude phylogénique basée sur le domaine GAF de ces protéines a révélé que l'ensemble des protéines *Rp*BphP4 forme un groupe monophylétique rattaché aux bactériophytochromes mais au sein duquel deux clades sœurs peuvent être distingués en fonction de leur capacité à fixer ou non un chromophore. Tous les *Rp*BphP4 descendraient ainsi d'un bactériophytochrome ancestral commun mais certaines protéines auraient perdu leur sensibilité à la lumière et acquis en contrepartie une sensibilité au potentiel redox. Afin de les distinguer, nous parlons d'achromo-*Rp*BphP4 pour nommer les protéines incapables de fixer la biliverdine et de chromo-*Rp*BphP4 pour celles qui fixent ce chromophore.

L'organisation de la région génomique entourant le gène *RpBphP4* est en synténie chez les souches CGA009, HaA2 et BisB5 de *Rps. palustris*. Comme nous l'avons dit précédemment *RpBphP4* est encadré par un opéron *pucBA.e* codant des antennes LH2 et par le gène *Rpa1489* qui présente une forte identité avec *Rpa3014*. Ceci suggérait que les protéines *Rp*BphP4 et Rpa1489 pouvaient intervenir dans une voie de signalisation commune régulant l'expression de l'opéron *pucBA.e* et de ce fait la synthèse des antennes LH2. Afin de

déterminer la voie de signalisation utilisée par ces protéines, des études ont été menées en parallèle chez les deux types de protéines chromo-*Rp*BphP4 et achromo-*Rp*BphP4.

Nous nous sommes, tout d'abord, intéressés à la capacité d'autophosphorylation des domaines histidine-kinase de chacun de ces deux types de protéines. Des tests au phosphore 32 ont révélé que les chromo-*Rp*BphP4 agissaient comme de véritables kinases sensibles à la lumière en s'autophosphorylant préférentiellement sous leur forme Pfr tandis que les protéines achromo-*Rp*BphP4, insensibles à la lumière, s'autophosphorylaient uniquement en conditions réductrices. Puis, pour tenter de comprendre la suite de la voie de signalisation initiée par l'autophosphorylation des *Rp*BphP4 des essais de phosphotransfert vers la protéine Rpa1489 ont été réalisés. Par ces expériences, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'un phosphotransfert direct entre le *Rp*BphP4 phosphorylé et le domaine RR du facteur de transcription Rpa1489. Ainsi nous avons pu montrer que ces protéines, qu'elles fixent ou non un chromophore sont capables *in vitro* d'agir selon une même voie de signalisation *via* un système à deux composants impliquant le facteur de transcription Rpa1489.

Les gènes *RpBphP4* et *Rpa1489* étant proches de l'opéron *pucBA.e,* nous avions supposé que les protéines *Rp*BphP4 et Rpa1489 pourraient intervenir dans la régulation de la synthèse des antennes périphériques. Afin de vérifier cette hypothèse, des expériences de gels retard ont été menées non seulement sur le promoteur de l'opéron *pucBA.e* mais en incluant également les 4 autres promoteurs des opérons *pucBA.a, b, c* et *d*. Cette étude a révélé que la protéine Rpa1489 se fixait spécifiquement, sur deux des 5 opérons *puc* (*pucBA.b* et *pucBA.e*, tous deux impliqués dans la synthèse des antennes LH2). Afin d'identifier le site de fixation de la protéine Rpa1489, des études complémentaires d'empreintes à la DNAse ont alors été réalisées. Un même motif, correspondant au palindrome TGTCCGN$_8$CGGACA, a ainsi pu être identifié sur ces 2 promoteurs. Une recherche de ce motif sur la séquence complète du génome CGA009 montre que ce palindrome n'est retrouvé que sur les régions promotrices des opérons *pucBA.b* et *pucBA.e* ; ce qui indique une spécificité très grande de ce système de régulation. Rpa1489 pouvant être phosphorylé par *Rp*BphP4, nous nous sommes alors demandés si la phosphorylation du facteur de transcription Rpa1489 pouvait affecter son affinité pour l'ADN. Pour répondre à cette question, des expériences d'empreintes à la DNAse visant à comparer les capacités de fixation de Rpa1489 phosphorylé ou pas sur les deux promoteurs des opérons *pucBA.b* et *.e* ont été réalisées. Ces expériences ont révélé que la phosphorylation de Rpa1489 confère à ce facteur de transcription une affinité plus grande pour les promoteurs des opérons *pucBA.b* et *pucBA.e.*

Ainsi, les résultats obtenus *in vitro* suggéraient fortement que *Rp*BphP4 régulait l'expression des opérons *pucBA via* Rpa1489. De ce fait, il était tentant de supposer que, la synthèse des antennes LH2 était contrôlée par la protéine *Rp*BphP4 et que la synthèse de ces antennes était redox ou lumière dépendante selon les souches bactériennes considérées. Afin de le confirmer *in vivo*, nous avons étudié la composition du photosystème des 3 souches sauvages de *Rps. palustris* (CEA001, HaA2 et BisB5) et de leurs mutants Δ*RpBphP4* respectifs après croissance sous différentes conditions de lumière et d'oxygène. La comparaison de leurs phénotypes indiquait que les chromo-*Rp*BphP4 et achromo-*Rp*BphP4 jouaient un rôle activateur dans la synthèse des antennes LH2 en réponse respectivement à des conditions de lumière spécifiques ou à de faibles concentrations en oxygène confirmant de ce fait les résultats obtenus *in vitro*.

Cette étude constitue la première description complète d'une voie de signalisation induite par un bactériophytochrome. Cependant si la régulation des antennes LH2 par un BphP chez *Rps. palustris* fait intervenir moins de partenaires que celle des antennes LH4, elle n'est pas plus simple pour autant. En effet, un site de fixation du facteur de transcription PpsR est retrouvé en aval du site de fixation de Rpa1489. Nous avons montré que PpsR2 est capable de se fixer sur cette région promotrice et que la synthèse des antennes LH2 est réprimée chez le mutant *ppsr1*. Cela suggère que ces 2 facteurs de transcription interviennent également dans l'expression des gènes *pucBA.b* et *e*.

The EMBO Journal (2007), 1–10 | © 2007 European Molecular Biology Organization | All Rights Reserved 0261-4189/07
www.embojournal.org

THE EMBO JOURNAL

Evolution of a bacteriophytochrome from light to redox sensor

Laurie Vuillet[1], Mila Kojadinovic[2], Sébastien Zappa[2], Marianne Jaubert[1], Jean-Marc Adriano[2], Joël Fardoux[1], Laure Hannibal[1], David Pignol[2], André Verméglio[2,3,*] and Eric Giraud[1,3]

[1]Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, IRD, CIRAD, AGRO-M, INRA, UM2, Campus de Baillarguet, Montpellier Cedex, France and [2]CEA Cadarache, DSV/IBEB/SBVME/LBC, UMR 6191 CNRS/CEA/Université Aix-Marseille, Saint-Paul-lez-Durance, France

Bacteriophytochromes are red/far-red photoreceptors that bacteria use to mediate sensory responses to their light environment. Here, we show that the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* has two distinct types of bacteriophytochrome-related protein (*Rp*BphP4) depending upon the strain considered. The first type binds the chromophore biliverdin and acts as a light-sensitive kinase, thus behaving as a bona fide bacteriophytochrome. However, in most strains, *Rp*BphP4 does not to bind this chromophore. This loss of light sensing is replaced by a redox-sensing ability coupled to kinase activity. Phylogenetic analysis is consistent with an evolutionary scenario, where a bacteriophytochrome ancestor has adapted from light to redox sensing. Both types of *Rp*BphP4 regulate the synthesis of light harvesting (LH2) complexes according to the light or redox conditions, respectively. They modulate the affinity of a transcription factor binding to the promoter regions of LH2 complex genes by controlling its phosphorylation status. This is the first complete description of a bacteriophytochrome signal transduction pathway involving a two-component system.
The EMBO Journal advance online publication, 21 June 2007; doi:10.1038/sj.emboj.7601770
Subject Categories: signal transduction
Keywords: bacteriophytochrome; light harvesting complexes; redox sensing; *Rhodopseudomonas palustris*

Introduction

Phytochromes are light sensors that were first discovered in plants where they mediate development and growth in response to near infrared light. More recently this class of photoreceptor has also been identified in cyanobacteria (Cphs phytochromes), in proteobacteria (BphPs phytochromes) and in fungi (Fphs phytochromes) (for review see Karniol *et al*, 2005). Most of these chromoproteins use a linear tetrapyrrole chromophore (bilin) and sense red and far-red light via a reversible shift from a red-absorbing form (Pr) to a far-red-absorbing form (Pfr). The discovery of prokaryotic phytochromes has provided new insights into the evolution of phytochromes and has led to a detailed biochemical and structural description of this light sensor family (for review see Rockwell *et al*, 2006).

Bacteriophytochromes (BphPs) have an N-terminal domain homologous to the photosensory core domain (PCD) of plant phytochromes and a C-terminal domain involved in signal transduction. The PCD, which consists of PAS, GAF and PHY sub-domains, autocatalytically binds a linear tetrapyrrole (or bilin) (Karniol *et al*, 2005; Rockwell *et al*, 2006). In most cases, BphPs use the chromophore biliverdin (BV), the simplest linear tetrapyrrole synthesized from heme by a heme oxygenase (Bhoo *et al*, 2001). BV is covalently bound to a Cys residue at the N-terminus of the protein (Lamparter *et al*, 2002). The atomic structure of the region spanning from the N-terminus to the GAF domain of *Dr*BphP from *Deinococcus radiodurans* has recently been determined (Wagner *et al*, 2005); this revealed the key residues that form the BV binding pocket and an unusual trefoil knot that stabilizes the PAS and GAF domains.

In most cases, the BphP C-terminal domain has a two-component histidine kinase motif whose phosphorylation status is dependent on the BphP conformation. The most active phosphorylating state can be either the Pr or the Pfr form, depending on the BphP considered. In some cases, a phosphotransfer to a response regulator (RR), whose gene is often found within the *BphP* operon, has been evidenced (Rockwell *et al*, 2006). Whether or not this phosphotransfer is part of the signaling pathway is still to be demonstrated. A small-angle X-ray scattering solution structure of *Rp*BphP2 from *Rhodopseudomonas* (*Rps.*) *palustris* revealed that a Y-shaped dimer forms through an interaction between the two C-terminal domains. The structure shows how photo-induced signal transduction may stimulate auto-phosphorylation followed by phosphotransfer to a RR (Evans *et al*, 2006).

Besides these common properties, there are interesting differences between BphPs. For the bathyBphPs, the thermal ground state is the Pfr form (Giraud *et al*, 2002; Karniol and Viestra, 2003), whereas for other BphPs, the Pfr form converts to the Pr form in the dark as for plant phytochromes (Butler and Lane, 1965; Lamparter *et al*, 2002). Unlike all BphPs studied so far, *Rp*BphP3 from *Rps. palustris* converts between a Pr form and a Pnr (for *n*ear *r*ed) form, which absorbs at around 645 nm, in a light-reversible way (Giraud *et al*, 2005). The bacteriophytochrome Ppr of the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum centenum* is a hybrid of photoactive yellow protein, bacteriophytochrome and histidine kinase domains (Jiang *et al*, 1999). An unusual BphP has also been identified in the photosynthetic bacterium *Bradyrhizobium* ORS278. This BphP binds phycocyanobilin and absorbs light maximally at around

*Corresponding author. SBVME-Laboratoire de Bioénergétique Cellulaire, CEA Cadarache bâtment 156, DSV/IBEB/SBVME/LBC, UMR 6191 CNRS/CEA/Université Aix-Marseille, Saint Paul lez Durance 13108, France. Tel.: +33 44225 4630; Fax: +33 4422 54701;
E-mail: avermeglio@cea.fr
[3]These authors contributed equally to this work

Received: 27 April 2007; accepted: 29 May 2007

610 nm in its dark-adapted state (Jaubert *et al*, 2007). This high diversity in BphPs features that most likely reflect their specific *in vivo* functions warrants further study.

In this context, the purple photosynthetic bacterium *Rps. palustris* is a very interesting organism to study. It has a wide distribution and exhibits extraordinary metabolic versatility. Moreover, its photosystem is one of the most elaborate in terms of light harvesting (LH) complexes. In addition to the LH1 complexes that absorb light at around 870 nm and surround the reaction center, peripheral LH2 and LH4 complexes have been described (Tadros and Waterkamp, 1989; Evans *et al*, 1990). The LH2 complexes, which are encoded by three distinct *pucBA* operons (*a*, *b* and *e*), absorb 800 and 850 nm light, while the LH4 complexes, encoded by the *pucBA.d* operon, only absorb at around 800 nm (Evans *et al*, 1990; Hartigan *et al*, 2002). The relative proportion of these LH complexes varies according to environmental factors such as light and oxygen tension (Evans *et al*, 1990; Hartigan *et al*, 2002). Finally, the genomes of five distinct strains of *Rps. palustris* have been sequenced (Larimer *et al*, 2004; http://spider.jgi-psf.org/index.html). The genome of the model strain CGA009 contains six putative *BphP* genes scattered throughout the genome, four of which are close to photosynthesis genes (Larimer *et al*, 2004). The role of these genes has recently been described: (i) *Rp*BphP1 triggers the synthesis of the entire photosynthetic apparatus (Giraud *et al*, 2002, 2004), and (ii) *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3 act in tandem to control the expression of the *pucBA.d* operon (Giraud *et al*, 2005). The fourth putative BphP (*Rp*BphP4) gene is in the vicinity of the *pucBA.e* operon, suggesting it could be involved in the control of LH2 complex synthesis. Surprisingly, the *Rp*BphP4 from strain CGA009 does not have the conserved N-terminal Cys residue involved in bilin attachment, and a purified recombinant *Rp*BphP4 homologue isolated from another *Rps. palustris* strain (2.1.6) does not bind any chromophore (Evans *et al*, 2005). Comparison of the CGA009 genome with the genomes of four other *Rps. palustris* strains reveals that this gene is only present in two other strains, BisB5 and HaA2. Unlike *Rp*BphP4s in the CGA009 and 2.1.6 strains, *Rp*BphP4s from BisB5 and HaA2 do have the N-terminal Cys residue responsible for bilin attachment. Can this last form of *Rp*BphP4 capture light? And more generally, how do these different *Rp*BphP4s function and what is their role?

In this study, a phylogenetic analysis of *Rp*BphP4 highlights an organization into two sister clades. By combining biophysical, biochemical and genetic approaches, we demonstrate that *Rp*BphP4 acts either as a bona fide BphP or as a redox sensor depending on the clade. In addition, we show that both types of *Rp*BphP4 use the same signal transduction pathway to control the synthesis of the LH2 complexes.

Results

Phylogenetic analysis of RpBphP4 from Rps. palustris strains

The *RpBphP4* (*rpa1490*) gene of strain CGA009 encodes a protein with the classical bacteriophytochrome architecture (Figure 1B). This gene is flanked by a RR encoding gene (*rpa1489*), and by the *pucBA.e* operon encoding the LH2 complex apoproteins (Figure 1A). To investigate *RpBphP4* gene diversity, polymerase chain reaction (PCR) was used to screen for the presence of this gene in the genome of seven

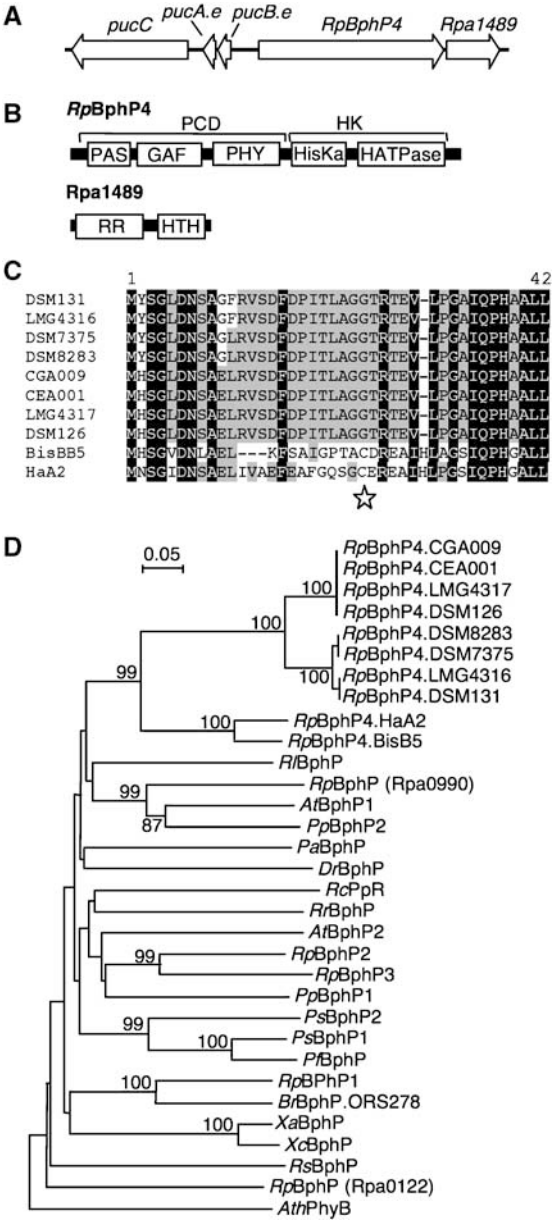


Figure 1 Molecular characterization of *Rp*BphP4. (**A**) Arrangement of genes around *RpBphP4* (*rpa1490* from CGA009). (**B**) Predicted domain structure of *Rp*BphP4 and Rpa1489. PCD: photosensory core domain; HK: histidine kinase domain; HisKa: phosphoacceptor domain; HATPase: ATP binding domain; RR: response regulator domain; HTH: helix–turn–helix domain. (**C**) AA sequence alignment of the N-termini of *Rp*BphP4 proteins from different *Rps. palustris* strains. Residues conserved at more than 50 and 90% are highlighted in gray and black, respectively. Star indicates the Cys residue used as BV binding site. (**D**) Phylogenetic analysis of the BphP family based on an alignment of the GAF domains. The sequences were aligned by CLUSTALX and the tree was generated by the neighbor-joining method and displayed using NJPLOT. Bootstrap values, expressed as percentages of 1000 replications, are shown at the branching points. Species abbreviations: *At*, *Agrobacterium tumefaciens; Ath*, *Arabidopsis thaliana; Br*, *Bradyrhizobium sp.*; *Dr*, *Deinococcus radiodurans*; *Pa*, *Pseudomonas aeruginosa*; *Pf*, *Pseudomonas fluorescens*; *Pp*, *Pseudomonas putida*; *Ps*, *Pseudomonas syringae*; *Rc*, *Rhodospirillum centenum*; *Rl*, *Rhizobium leguminosarum*; *Rp*, *Rhodopseudomonas palustris*; *Rr*, *Rhodospirillum rubrum*; *Rs*, *Rhodobacter sphaeroides*; *Xa*, *Xanthomonas axonopodis*; *Xc*, *Xanthomonas campestris*.

©2007 European Molecular Biology Organization

additional *Rps. palustris* strains, using sets of primers specific to the *pucB.e* and *rpa1489* genes, respectively. The *RpBphP4* gene was found in all the strains tested (CEA001, LMG4316, LMG4317, DSM126, DSM131, DSM8283 and DSM7375). The amino-acid (AA) sequences of the newly found *Rp*BphP4s have a very high level of identity (>93%) with *Rp*BphP4 from CGA009, and also lack the canonical Cys residue used as the bilin attachment site (Figure 1C).

A phylogenetic analysis of the GAF domains showed that all *Rp*BphP4s are related to the BphP family and belong to the same monophyletic group, with a very high bootstrap value of 99% (Figure 1D). Similar clustering patterns were obtained using the PHY and PAS domains (data not shown). Interestingly, two sister clades can be distinguished: a large clade containing most of the *Rp*BphP4s, which all lack the conserved Cys residue involved in bilin attachment, and a smaller clade formed by two representatives (HaA2 and BisB5), which have the Cys residue (Figure 1C). The presence or the absence of this canonical Cys residue suggests there are fundamental differences in the physico-chemical properties of *Rp*BphP4s from each clade. In order to confirm such a hypothesis, three *Rp*BphP4s representative of these two clades (CEA001, HaA2 and BisB5) were studied in more detail.

Expression and purification of recombinant RpBphP4 homologues

*Rp*BphP4s from CEA001, HaA2 and BisB5 were coexpressed with a heme oxygenase (required for chromophore synthesis) in *Escherichia coli* and then purified by affinity chromatography. As shown in Figure 2A, the purified recombinant CEA001-*Rp*BphP4 is colorless as is *Rp*BphP4 from the 2.1.6 strain (Evans *et al*, 2005). The absence of bound bilin was confirmed by spectral analysis and zinc-induced fluorescence (Figure 2A). In addition, several attempts of *in vitro* reconstitution by incubation of the purified CEA001-*Rp*BphP4 apoprotein with various bilins (BV, phycocyanobilin and phycoerythrobilin) were unsuccessful to produce a holoprotein. In contrast, *Rp*BphP4s purified from HaA2 and BisB5 are colored and their absorption spectra are characteristic of a bona fide BphP (Figure 2A for HaA2, data not shown for BisB5). Zn-induced fluorescence of proteins separated by SDS–PAGE confirmed the presence of a covalently bound chromophore (Figure 2A).

In an attempt to generate a functional chromophore binding site in CEA001-*Rp*BphP4, a Cys residue was introduced at the conserved position using site-directed mutagenesis (the G24C mutant). We also exchanged the first 33 AA residues with the N-terminal sequence (residues 1–29) of the holo-BphP *Rp*BphP1. In both cases, the purified mutated proteins were colorless (data not shown). This implies that the lack of BV binding in CEA001-*Rp*BphP4 is not just due to the absence of the N-terminal Cys but is also the result of additional AA differences. There are possible candidates for this in the chromophore binding pocket of *Dr*BphP (Wagner *et al*, 2005). First, Tyr216, which is involved in hydrogen bonding of the chromophore, is not conserved in the CEA001-*Rp*BphP4 sequence. In addition, four AA (Ile29, Ala212, Phe203 and Met267) out of the 15 involved in Van der Waals' contacts with BV are not conserved. Are these subtle changes sufficient to prevent chromophore binding? Further

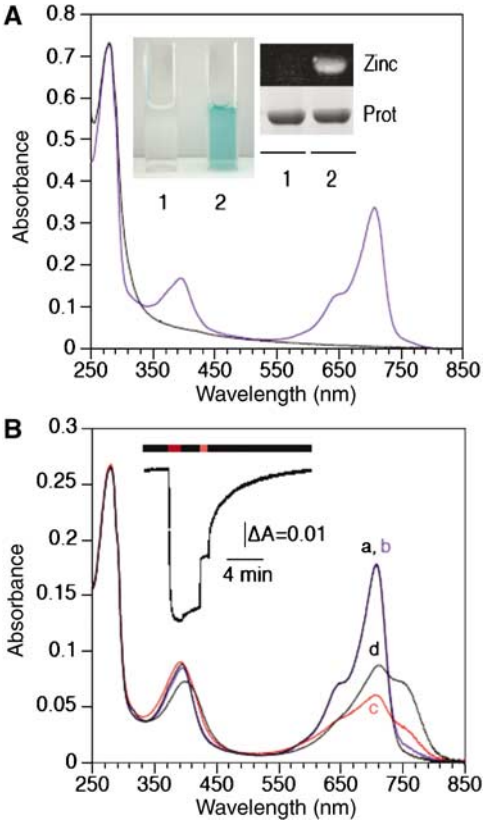


Figure 2 Absorption spectra of *Rp*BphP4 proteins. (**A**) Absorption spectra of recombinant *Rp*BphP4 proteins from strains CEA001 (achromo-*Rp*BphP4, black line) and HaA2 (chromo-*Rp*BphP4, blue line). The inset shows (1) achromo- and (2) chromo-*Rp*BphP4 proteins. The covalent binding of BV to *Rp*BphP4 proteins was visualized by zinc-induced fluorescence or Coomassie staining. (**B**) Absorption spectra of purified HaA2 *Rp*BphP4. The spectra were recorded immediately after: 770 nm illumination (a, black line) followed by 15 min of darkness (b, blue line), 705 nm illumination (c, red line) followed by 15 min of darkness (d, black line). The inset shows the kinetics of changes in absorbance at 750 nm induced by 770 nm light, followed by 2 min of darkness, 1 min of 705 nm light and then a long dark period.

site-directed mutagenesis and structural studies would be necessary to prove this.

Altogether, these data indicate that there are two distinct types of *Rp*BphP4 in *Rps. palustris*, depending on the strain considered. In most strains, *Rp*BphP4 does not bind BV, whereas the second *Rp*BphP4 type does bind this chromophore. To distinguish between these two *Rp*BphP4 types, the prefixes 'chromo' or 'achromo' (indicating the presence or the absence of a chromophore, respectively) will be used from now onward.

Achromo-RpBphP4 is redox sensitive

When freshly prepared achromo-*Rp*BphP4 from CEA001 is analyzed by non-reducing SDS–PAGE, a major band of around 87 kDa, which corresponds to its expected molecular mass (Figure 3A, lane a) is detected. When the same sample was analyzed after ultrafiltration or dialysis, the 87 kDa band was almost undetectable, although several very high-molecular-weight bands were detected (Figure 3A, lane b). This is likely to reflect the formation of aggregates of an unknown number of subunits. A similar effect was observed when the

©2007 European Molecular Biology Organization

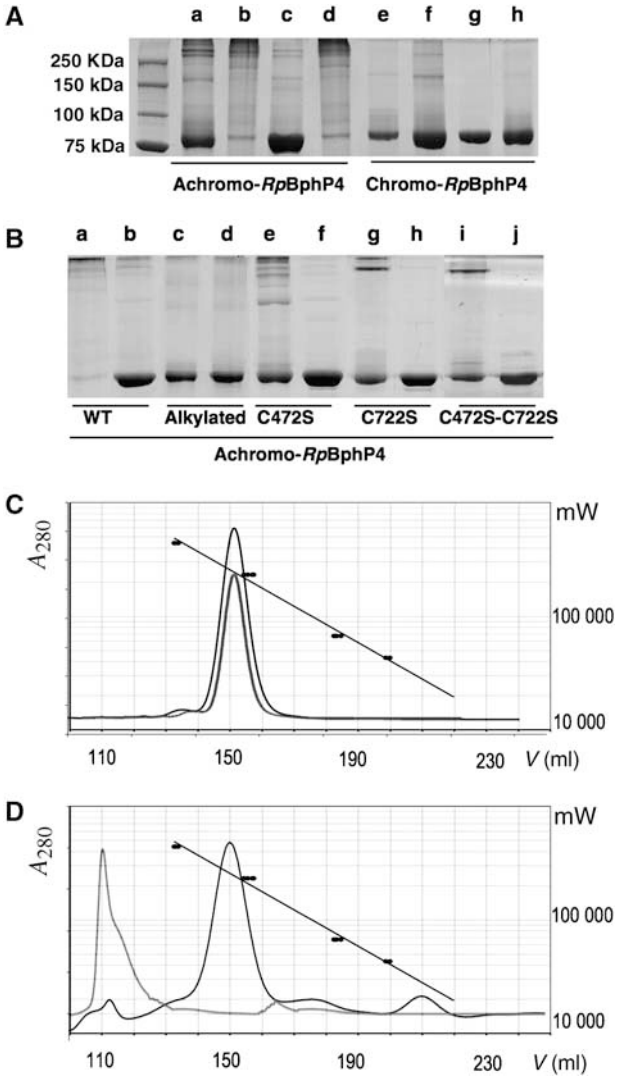


Figure 3 Redox dependence of achromo- and chromo-*Rp*BphP4 proteins. SDS–PAGE analysis and gel filtration of *Rp*BphP4 from CEA001 (achromo) or from HaA2 (chromo) after various treatments. (**A**) Lanes a and e show, respectively, untreated achromo- and chromo-*Rp*BphP4 obtained after nickel affinity chromatography; lanes b and f show the effect of ultrafiltration (Amicon 30 K NMWL); lanes c and g show the effect of 1 mM DTT; and lanes d and h show the effect of 10 mM ferricyanide after reduction by 1 mM DTT. (**B**) Disulfide bond formation in achromo-*Rp*BphP4 (WT), alkylated achromo-*Rp*BphP4, *Rp*BphP4-C472S, *Rp*BphP4-C722S and *Rp*BphP4-C472S-C722S, after oxidation with 1 mM ferricyanide (lanes a, c, e, g and i) or reduction with 1 mM DTT (lanes b, d, f, h and j). (**C, D**) Elution profiles of gel filtration of chromo-*Rp*BphP4 (C) or achromo-*Rp*BphP4 (D) in 50 mM NaCl, 20 mM Tris–HCl pH 8.0 in the absence (gray curves), or in the presence (black curves) of 10 mM DTT. A standard curve is superimposed using the known molecular masses of four protein standards (black circles).

protein sample was exposed to air overnight (data not shown). We therefore assumed that the oligomerization state of the protein was related to the oxygenation, that is, the redox state of the sample. In support of this hypothesis, incubating the protein for 30 min with a reducing agent (DTT) before SDS–PAGE analysis restored the 87 kDa band, while subsequent treatment with an oxidant (potassium ferricyanide) reinduced the formation of aggregates (Figure 3A, lanes c and d). Therefore, the change in the oligomerization state of achromo-*Rp*BphP4 is reversible and redox sensitive. Such an effect was not observed for chromo-*Rp*BphP4s from HaA2 or BisB5, which mainly appear as a single band of the expected size, irrespective the redox conditions (Figure 3A, lanes e–h; data not shown for BisB5). The redox-dependent oligomerization state of achromo-*Rp*BphP4 in solution was confirmed by size-exclusion chromatography (Figure 3D). Oxidized achromo-*Rp*BphP4 eluted with the void volume of the column (Superdex 200), which corresponds to a molecular mass greater than 500 kDa. However achromo-*Rp*BphP4 in the presence of DTT produced a major elution volume peak corresponding to a molecular mass of 200 kDa. Taking into account the predicted molecular mass of the His-tagged *Rp*BphP4 monomer, we conclude that the reduced protein is folded in solution as a homodimer (Figure 3D). When the native chromo-*Rp*BphP4 from HaA2 was separated by gel filtration, the elution volume obtained did not vary with different redox conditions and corresponded to the dimeric form of the protein (Figure 3C).

Analyzing spectra and AA sequences has not revealed any signature of a putative redox center such as those for hemes or flavins, so the redox sensitivity of achromo-*Rp*BphP4 may be determined by one or more Cys residues, as has been described for many thiol-based redox sensors (Paget and Buttner, 2003). To investigate this, achromo-*Rp*BphP4 pre-reduced with DTT was incubated with 10 mM iodoacetamide to fully thiol-alkylate the protein. This modified sample was analyzed by SDS–PAGE in reducing and non-reducing conditions. As shown in Figure 3B, lanes c and d, thiol-alkylated achromo-*Rp*BphP4 was found to be redox independent, confirming that at least one Cys is involved in redox sensing. The AA sequences of achromo-*Rp*BphP4 proteins contain seven Cys residues, two of which (C472 and C722) are conserved in all the achromo-*Rp*BphP4s. C472 is in the PHY domain, whereas C722 is in the His kinase module. To investigate the role of these two Cys residues in the redox sensitivity of achromo-*Rp*BphP4, the single mutants, C472S and C722S, and the double mutant C472S-C722S were produced. SDS–PAGE analysis (Figure 3B) and gel filtration (Supplementary Figure 1) showed that all three mutated proteins form fewer aggregates under oxidizing conditions, indicating that Cys472 and Cys722 are key residues in the redox-dependent oligomerization changes of achromo-*Rp*BphP4.

The chromo-RpBphP4 protein has unusual photochemical properties

Figure 2B shows the absorption spectra of chromo-*Rp*BphP4 from strain HaA2 after red or far-red illumination and different periods of dark adaptation. Under far-red illumination, chromo-*Rp*BphP4 absorbs maximally at around 708 nm (Figure 2B, spectrum a). This is typical of the Pr form of BphPs. This state is relatively stable in the dark. Only a small increase in absorption is recorded at around 750 nm after dark adaptation (Figure 2B, spectrum b). Starting from this state, illumination with red light induces strong bleaching of the 708 nm band, along with a small increase in absorption around 750 nm (Figure 2B, spectrum c). This state, which has strong similarities with the meta-R states of Agp1 BphP (Borucki *et al*, 2005) and phyA (Eilfeld and Rüdiger, 1985), is relatively unstable and slowly transforms (with a half-life of about 2 min) to a new state in the dark. This new state, characterized by the greater absorption of light at around

 ©2007 European Molecular Biology Organization

750 nm typical of the Pfr form (Figure 2B, spectrum d), is relatively stable in the dark and only partially reverts to the Pr state over several hours (not shown). Conversely, illumination of this state with 770 nm light induces rapid formation of the Pr form (Figure 2B, spectrum a). The light-induced formation of Pr and 'meta-R' states starting from the Pfr state is illustrated in Figure 2B (inset). Very similar results were obtained with chromo-*Rp*BphP4 from strain BisB5 (data not shown). Steady-state excitation and emission fluorescence measurements show that only the Pr state of chromo-*Rp*BphP4 is fluorescent (Supplementary Figure 2).

Chromo- and achromo-RpBphP4s use the same signal transduction pathway

Both chromo- and achromo-*Rp*BphP4s have a C-terminal histidine kinase module (Figure 1B). Regulation of the *in vitro* kinase activity was studied by incubating the proteins in the presence of γ-^{32}P-ATP. The redox conditions significantly affected the autophosphorylation of achromo-*Rp*BphP4 of strain CEA001, which only occurred in its reduced form, that is, the dimeric form (Figure 4A, lanes a–c). Such an effect was not observed for the thiol-alkylated achromo-*Rp*BphP4 (Figure 4A, lanes d–f) or for chromo-*Rp*BphP4 from strain HaA2 (Figure 4B, lanes a–c). In contrast, the phosphorylation state of chromo-*Rp*BphP4 was dependent on the light transition (Figure 4B). Indeed, chromo-*Rp*BphP4 from HaA2 appeared to be maximally phosphorylated in its Pfr form (lane d) or following a 705 nm illumination (Figure 4B, lane f), while transition to the Pr state induced a 60% decrease in the level of phosphorylation (lane e).

The genes for chromo- and achromo-*Rp*BphP4 proteins are both found close to a gene encoding a putative transcription factor (Rpa1489), which consists of an N-terminal RR domain and a C-terminal helix–turn–helix DNA binding domain (Figure 1B). Alignment of the sequences of these putative transcription factors from the CEA001 and HaA2 strains shows they have 92% identity. Efficient phosphotransfer from both types of *Rp*BphP4 to Rpa1489 was observed (Figure 4C). As expected, the level of phosphorylation of Rpa1489 can be correlated to the redox or light conditions depending on the *Rp*BphP4 type. Therefore, both types of *Rp*BphP4 are involved in the same signal transduction pathway that is probably a two-component regulatory system, where the Rpa1489 homologue is the last element.

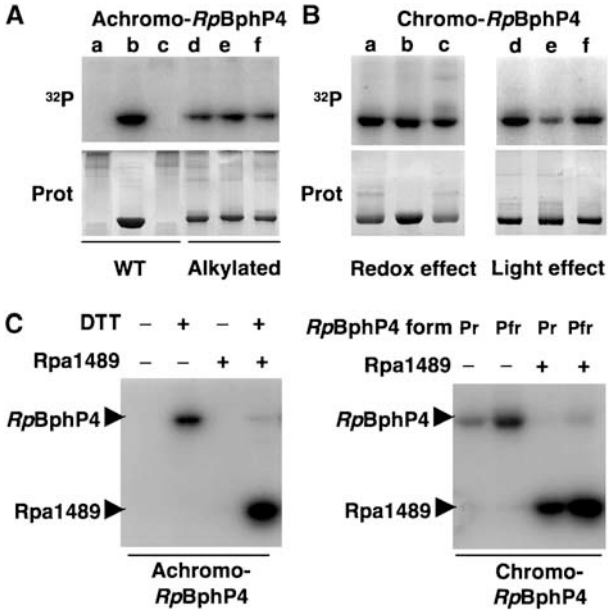


Figure 4 Achromo- and chromo-*Rp*BphP4 proteins act as redox or light-regulated histidine kinases, respectively. (**A**) Effect of redox conditions on the kinase activity of achromo-*Rp*BphP4 (WT) and alkylated achromo-*Rp*BphP4 (alkylated). Lanes a and d, untreated; lanes b and e, reduced with 1 mM DTT; and lanes c and f, oxidized with 1 mM ferricyanide. Proteins were incubated with γ-^{32}P-ATP for 15 min. The reaction products were separated by SDS–PAGE and the gels were autoradiographed (top) or stained with Coomassie blue (bottom). (**B**) Effect of redox or light conditions on the kinase activity of chromo-*Rp*BphP4. For the redox effect, the sample was subjected to 15 min of pre-illumination with 705 nm light followed by 15 min of dark adaptation, and was left untreated (lane a), or treated with 1 mM DTT (lane b) or 1 mM ferricyanide (lane c). For the light effect, chromo-*Rp*BphP4 was converted to its Pfr (lane d), Pr (lane e) or 'meta R' (lane f) forms; the Pfr form was obtained by 15 min of pre-illumination at 705 nm followed by 15 min of dark adaptation, the Pr form by illumination at 770 nm and the 'meta R' form by illumination at 705 nm. (**C**) Phosphotransfer between *Rp*BphP4 and the RR Rpa1489. Transfer of the phosphoryl group between the achromo-*Rp*BphP4 and Rpa1489 relative to the redox conditions (left panel). Phosphotransfer between chromo-*Rp*BphP4 and Rpa1489 relative to the light conditions (right panel).

The transcription factor Rpa1489 binds to pucBA promoters

The position of *RpBphP4/rpa1489* genes in the vicinity of the *pucBA.e* operon suggests that the putative transcription factor Rpa1489 might bind to the *pucBA.e* promoter. DNA binding of recombinant Rpa1489 was first tested by gel mobility shift assays, using the promoter regions of the five *pucBA* operons identified in strain CGA009. The results shown in Figure 5A indicate that Rpa1489 binds specifically to the *pucBA.b* and *pucBA.e* promoters *in vitro*. This specific interaction depends on the phosphorylation state of Rpa1489 (Figure 5B). The affinity of unphosphorylated Rpa1489 for the *pucBA.b* promoter is seven-fold lower than that of phosphorylated Rpa1489. Similar results were obtained for the *pucBA.e* promoter (data not shown).

In addition, we investigated the Rpa1489 DNA binding sites on the *pucBA.b/e* promoters by DNase I protection (footprint). The DNase I digestion patterns (Figure 5C) confirmed that Rpa1489 protects both *pucBA.b* and *pucBA.e* promoters. The sequences of the protected regions are very similar and both contain the palindromic motif TGTCCGN$_8$CGGACA. Interestingly, the *pucBA.b/e* promoters contain a TGTN$_{12}$ACA palindrome downstream and juxtaposed to the Rpa1489 DNA binding site. This sequence corresponds to the DNA binding site of PpsR, a key regulator of photosynthesis gene expression in purple bacteria (Elsen *et al*, 2005). *Rps. palustris* is unusual in having two distinct PpsRs (encoded by *ppsR1* and *ppsR2*) like the photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. ORS278 strain (Jaubert *et al*, 2004). We tested whether purified PpsR2 (Giraud *et al*, 2004) binds to the promoters of the *pucBA.b/e* operons. As shown in Figure 5B, PpsR2 binds these promoter regions downstream of the Rpa1489 binding site, strongly suggesting that these two *pucBA* operons are under the control of Rpa1489, PpsR2 and most probably PpsR1.

©2007 European Molecular Biology Organization

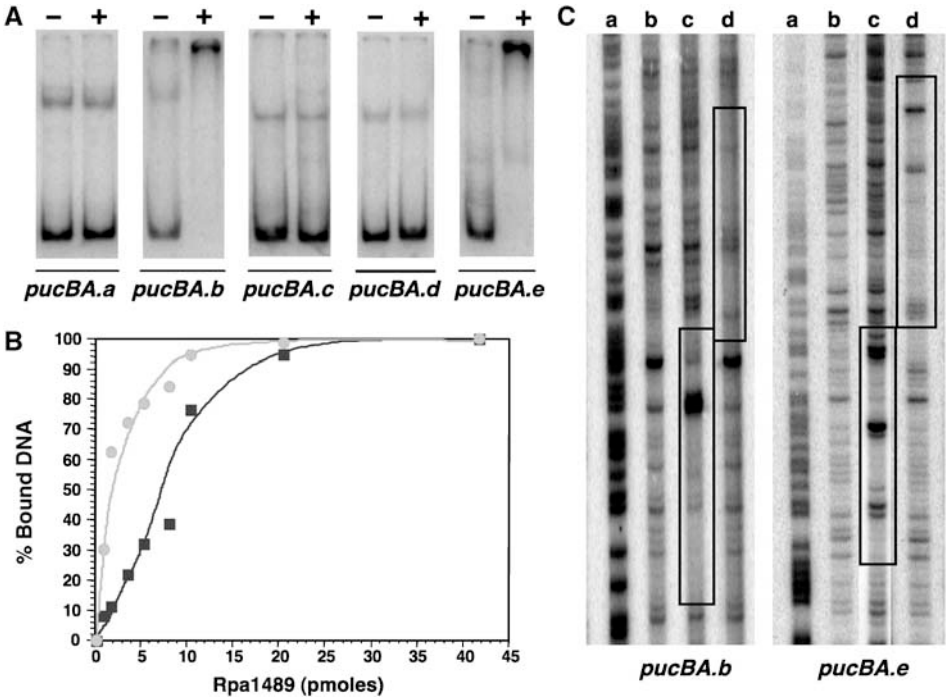


Figure 5 The transcription factor Rpa1489 binds the *pucBA.b/e* promoters. (**A**) Gel mobility shift assays with purified Rpa1489. The left lane (−) of each gel contained only ^{32}P-labeled probe, while the right lane (+) contained in addition 0.5 μM Rpa1489. *PucBA* from *a* to *e* represent the five *pucBA* promoter regions identified in *Rps. palustris* CGA009 strain (Larimer *et al*, 2004). (**B**) Binding affinity of unphosphorylated (blue curve) and phosphorylated (green curve) Rpa1489 to the *pucBA.b* promoter. Phosphorylated and unphosphorylated forms of Rpa1489 were obtained by incubating Rpa1489 with achromo-*Rp*BphP4 for 30 min under reducing conditions in the presence or absence of ATP, respectively. (**C**) DNase I footprints of Rpa1489 and PpsR2 binding to the *pucBA.b/e* promoter regions. G + A ladder (lane a), control without protein (lane b), 1 μM Rpa1489 (lane c), 1 μM PpsR2 (lane d) (for color figure see online version).

Chromo- and achromo-RpBphP4 control LH2 synthesis

The above biochemical data are strong indications that *Rp*BphP4, sensing either a light or a redox signal, may control the synthesis of LH2 complexes through the regulation of some *pucBA* operons using a cognate RR (Rpa1489). The next step was to confirm this role *in vivo*. The photosystem composition of three *Rps. palustris* strains, harboring either achromo- (CEA001) or chromo-*Rp*BphP4 (BisB5 and HaA2), and their corresponding *Rp*BphP4 deletion mutants were analyzed after growth under different light and redox conditions. The absorption spectra of intact cells were recorded at 77 K. At this low temperature, absorption in the near infrared range by LH2 and LH1 complexes can be clearly distinguished, making it more straightforward to calculate the relative contribution made by each type of complex. For BisB5 (chromo-*Rp*BphP4-containing) cells grown in the dark at O_2 tensions of between 1 and 8%, a small amount of photosynthetic apparatus was observed only at 1% (Figure 6A). In contrast, large amounts of photosynthetic apparatus were synthesized when cells were illuminated with 700 or 770 nm light, irrespective of the O_2 tension (Figure 6A, left panel). This effect is related to the activating effect of *Rp*BphP1 (Giraud *et al*, 2002, 2004). Illumination with each of these wavelengths however has a different effect on the synthesis of LH1 and LH2 complexes. The LH2/LH1 ratios are 1 and 0.7 for illumination with 700 or 770 nm light, respectively (Figure 6A). On the other hand, no differential effect of illumination with 700 or 770 nm light on LH2 synthesis was observed for the BisB5Δ*Rp*BphP4 mutant (Figure 6A, right panel). A similar result was observed at 3 or 8% O_2 tension for both the BisB5 and HaA2 strains (not shown). These experiments indicate that 700 nm light absorbed by chromo-*Rp*BphP4 activates the synthesis of LH2 complexes.

A different situation was observed for strain CEA001 (an achromo-*Rp*BphP4 containing strain). A significant amount of photosynthetic apparatus was synthesized in the dark at O_2 tensions lower than 8% (Figure 6B, left panel). In addition, a clear increase in the LH2/LH1 ratio was observed when the O_2 tension decreased from 8 to 1% (Figure 6B, left panel). The deletion of *Rp*BphP4 in strain CEA001 resulted in an approximately two-fold lower LH2/LH1 ratio, but did not affect the amount of LH1 at the various O_2 tensions tested (Figure 6B, right panel). Contrary to the effect observed in BisB5 or HaA2, illumination with 700 nm light induced a decrease in LH2 synthesis, as previously reported (Giraud *et al*, 2005).

Another difference in the behavior of strains CEA001 and BisB5/HaA2 was observed for cells grown under anaerobic conditions under white light. CEA001 cells synthesized many more LH2 complexes than the BisB5 and HaA2 strains (data not shown). On the one hand, this is consistent with the activation of CEA001 achromo-*Rp*BphP4 under reducing conditions, and on the other, with the inability to synthesize the chromophore of BisB5/HaA2 chromo-*Rp*BphP4 in the absence of O_2.

Altogether these data, summarized in Figure 6C, indicate that both achromo- and chromo-*Rp*BphP4s play an activating role in the synthesis of LH2 at low O_2 tension or under specific light wavelengths, respectively. The conditions of

 ©2007 European Molecular Biology Organization

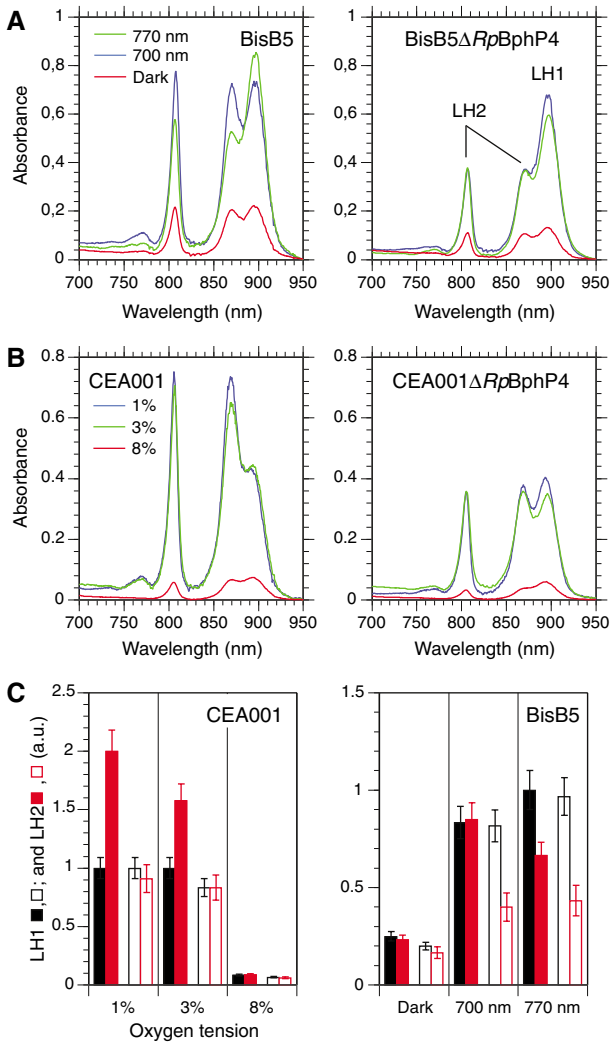


Figure 6 Effect of light and oxygen tension on the synthesis of the photosynthetic apparatus in WT and *Rp*BphP4 deletion mutants. (**A**) Left panel, absorption spectra recorded at 77 K of intact BisB5 cells grown at 1% oxygen tension in the dark (red spectrum), or with 700 nm (blue spectrum), or 770 nm (green spectrum) light. Right panel, as for the left panel, but for the BisB5Δ*Rp*BphP4 mutant. (**B**) Left panel, absorption spectra recorded at 77 K of intact CEA001 cells grown in the dark at 1% (blue spectrum), 3% (green spectrum) and 8% (red spectrum) oxygen tension. Right panel, as for the left panel, but for the CEA001Δ*Rp*BphP4 mutant. (**C**) Left panel, amounts in arbitrary units of LH1 (black bars) and LH2 (red bars) synthesized in the dark in strain CEA001 (filled bars) and mutant CEA001Δ*Rp*BphP4 (open bars) as a function of the oxygen tension. Right panel, amounts of LH1 (black bars) and LH2 (red bars) synthesized in the dark or under 700 or 770 nm illumination in strain BisB5 (filled bars) and mutant BisB5Δ*Rp*BphP4 (open bars). All cell cultures were at 1% oxygen tension.

this induction are consistent with their respective kinase activities described above.

Discussion

Evolution of RpBphP4 from a light to a redox sensor

Rps. palustris is known as one of the most energetically versatile microorganisms, as it is able to grow under different environmental conditions by using photosynthesis, aerobic or anaerobic respiration, or fermentation. To rapidly adapt its metabolism to changes in oxygen or light availability, *Rps. palustris* uses a set of sensors like PpsRs and BphPs.

In this study, we show that there is an additional level of regulation of LH2 complex synthesis by the sensor *Rp*BphP4. Depending on the strain considered, *Rp*BphP4 responds to either redox or light signals to activate synthesis of LH2 complexes. Light- and redox-sensing *Rp*BphP4 proteins, chromo- and achromo-*Rp*BphP4, respectively, correspond to two versions of the same protein, found in the same synthon of different *Rps. palustris* strains. They form two sister clades phylogenetically related to the phytochrome family, suggesting that a BphP ancestor could have evolved from a light sensor to a redox sensor in some of the *Rps. palustris* strains studied. To our knowledge this is the first description of evolution in the nature of signal perception by a histidine kinase sensor. The loss and acquisition of specific Cys residues would thus be decisive events in modifying the sensory properties of *Rp*BphP4; the canonical N-terminal Cys used as the chromophore binding site in all BphPs is specific to chromo-*Rp*BphP4 while Cys422 and Cys722 are specific to the redox-sensing achromo-*Rp*BphP4.

Among the 10 strains of *Rps. palustris*, which have *Rp*BphP4, only two have a chromo-*Rp*BphP4. Interestingly, all the achromo-*Rp*BphP4s were found in collection strains, while the two chromo-*Rp*BphP4 are from strains recently isolated from the environment. However, given the very high similarity between the different achromo-*Rp*BphP4 sequences, it is very unlikely that the same AA modifications have occurred in different laboratories. As already mentioned, *Rps. palustris* strains with achromo-*Rp*BphP4 contain more LH2 complexes than those containing chromo-*Rp*BphP4, when grown under anaerobic conditions in the light, the standard conditions for selecting anoxygenic photosynthetic bacteria. These strains are highly pigmented due to the large quantity of LH2 complexes. When isolating photosynthetic bacteria, selection may be biased toward the more strongly colored colonies, and this may explain the large number of achromo-*Rp*BphP4 strains found in laboratory collections.

Achromo-RpBphP4, a redox sensor

The *in vivo* phenotypes of deletion mutants indicate that achromo-*Rp*BphP4 is a redox-dependent activator of LH2 synthesis. *In vitro* analyses suggest that this redox sensing is mediated by two conserved Cys residues, Cys422 and Cys722, located in the PHY and in the His kinase domains, respectively. These two Cys are involved in the reversible redox-dependent formation of aggregates via intermolecular disulfide bonds. This change of oligomerization state can be correlated to the kinase activity of the protein, which is only active in its dimeric form. This is in agreement with previous studies, which showed that histidine kinases of two-component systems always act as dimers where the subunits transphosphorylate each other (Yang and Inouye, 1991; Ninfa *et al*, 1993).

In the absence of a complete structural description of a classical BphP, including both the PHY and histidine kinase domains, it is not possible to fully explain the role of these cysteines in the oligomerization of the protein. However, the involvement of redox-active cysteines in modulating the activity of regulators of photosystem synthesis has already been proven in purple bacteria. For example, an

©2007 European Molecular Biology Organization

intramolecular disulfide bond, mediated by oxygen, enhances the DNA binding activity of CrtJ, the aerobic repressor of photosynthetic apparatus synthesis in *Rhodobacter capsulatus* (Masuda *et al*, 2002). In contrast, PpsR1, the counterpart transcription factor in *Bradyrhizobium* has only one Cys residue and can form an intermolecular disulfide bond. This leads to a switch from a tetrameric to an octameric form when the redox potential increases (Jaubert *et al*, 2004). Regulation by intermolecular disulfide bonds has also been demonstrated for the global regulator RegB. RegB and its cognate RR RegA control a large number of oxygen response processes (Elsen *et al*, 2004). Thanks to the essential role of a metal cofactor, the formation of an intermolecular disulfide bond modulates the oligomerization state from a tetramer under oxidizing conditions to a dimer under reducing conditions. This intermolecular bond also affects RegB autophosphorylation, which can only autophosphorylate in its dimeric form (Swem *et al*, 2003). The changes in oligomerization state observed *in vitro* for *Rp*BphP4 are probably related to the mechanisms described above.

Chromo-RpBphP4, an atypical light sensor

We show that chromo-*Rp*BphP4 has unusual spectral properties, with significant bleaching of the Pr form when illuminated with a small concomitant increase in absorption in the near infrared region (Figure 2B). This is probably a consequence of a very slow conversion from the intermediate meta-R state to the stable Pfr state. In fact, this unusual property is consistent with the light regulation of photosynthetic apparatus synthesis in *Rps. palustris*. Indeed, the synthesis of the photosystem and its associated pigments is activated by the Pr state of *Rp*BphP1, that is, with 770 nm illumination (Giraud *et al*, 2002, 2004). In contrast, we show in this study that the synthesis of LH2 is activated by 700 nm light, that is, via both the 'meta-R' and the Pfr states of chromo-*Rp*BphP4. In other words, LH2 synthesis in strains BisB5 or HaA2 requires both 770 and 700 nm light. Such light conditions would yield a mixture of both Pr and Pfr states for a classical BphP. However, due to its poor absorption of near infrared light, chromo-*Rp*BphP4 is preferentially in its activated 'meta-R' state when excited by both 700 and 770 nm light (Supplementary Figure 3).

RpBphP4, the first element in a two-component system

Our data show that both chromo- and achromo-*Rp*BphP4s have a kinase activity regulated by light or redox conditions, respectively. Both phosphorylate a transcription factor homologous to Rpa1489, increasing its binding affinity for the promoter regions of the *pucBA.b/e* operons. The enhancement of LH2 synthesis at low oxygen tensions for CEA001 (achromo-*Rp*BphP4) or in 700 nm light for BisB5 and HaA2 (chromo-*Rp*BphP4) implies that the Rpa1489 homologues activate the transcription of both *pucBA* operons under their phosphorylated form. Such regulation is also suggested by the phenotype of *Rp*BphP4 deletion mutants, which are strongly affected in LH2 synthesis. Altogether, this describes a complete two-component signaling pathway to control LH2 synthesis initiated by a BphP sensing either light or oxygen.

The presence of a PpsR binding motif immediately downstream of the DNA binding site of Rpa1489 indicates, however, that additional regulators (PpsR1 and PpsR2) could be involved in LH2 synthesis (Figure 7). We show that PpsR2 binds to *pucBA.b/e* promoters (Figure 5C). This transcription factor represses the synthesis of the entire photosynthetic apparatus, including the LH chromophores. This repressive effect is antagonized by far-red light via *Rp*BphP1 (Giraud *et al*, 2004). Similarly, LH2 synthesis is strongly repressed in a PpsR1 mutant, showing that this transcription factor also acts as a regulator of the expression of *pucBA* genes (Supplementary Figure 4).

In conclusion, the control of photosystem synthesis in *Rps. palustris* is highly sophisticated and involves a complex network of different light and redox regulatory pathways. This complexity, coupled with the sensor flexibility, enables this species to adapt precisely to different environments and to rapid changes in light and redox conditions.

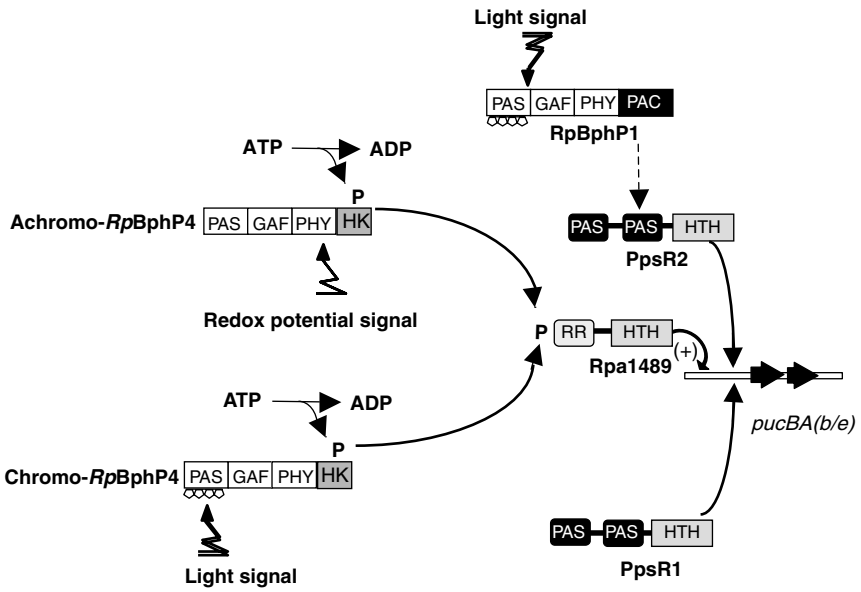


Figure 7 Proposed model for the regulation of LH2 antennae synthesis in *Rps. palustris*.

 ©2007 European Molecular Biology Organization

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

Ten different strains of *Rps. palustris* were used: the CEA001 strain (Giraud *et al*, 2004); the CGA009, HaA2 and BisB5 strains (kindly provided by Dr Harwood, Department of Microbiology, University of Iowa, USA); the DSM126, DSM131, DSM7375 and DSM8283 strains (purchased from the DSMZ Collection) and the LMG4316 and LMG4317 strains (purchased from the BCCM/LMG Bacteria Collection). Cells were grown in liquid medium under different light or oxygen conditions, as previously described (Giraud *et al*, 2004). Light was provided by light-emitting diodes emitting at 700 or 770 nm (ELD700-524 and ELD 770-524 from Roithner), with an irradiance of 200 and 100 μmol of photon/m^2/s, respectively.

Isolation of RpBphP4 and sequencing

The *RpBphP4* gene from different *Rps. palustris* strains was amplified by PCR, using the following primers: *pucB.e.f* (5′-CAACGACGAGTCGCCTCGCGTTG-3′)/*rpa1489.r* (5′-AGCGCCTTC ATGCCGCTGAGCAC-3′). The sequences of the PCR products have been submitted to the GenBank databases under the following accession numbers (CEA001, EF010855; LMG4317, EF010856; DSM126, EF010857; DSM8283, EF010858; DSM7375, EF010859; LMG4316, EF01860; DSM131, EF010861).

Expression and protein procedures

The *RpBphP4* gene was amplified by PCR from *Rps. palustris* genomic DNA from the CEA001, HaA2 and Bis5 strains and the *rpa1489* gene from CEA001. Primers designed to add appropriate restriction sites for expression as His_6-tagged versions in the pBAD/HisB expression vector (Invitrogen) were used. In order to reconstitute *Rp*BphP4 holobacteriophytochromes *in vivo*, the *hmuO* gene from *Bradyrhizobium* ORS278 was inserted in the above pBAD::*RpBphP4* constructs (described in Giraud *et al*, 2004). The recombinant proteins were overexpressed in *E. coli* LMG194 and purified, as previously described (Giraud *et al*, 2004). To test the reduction/oxidation of *Rp*BphP4 proteins, reducing conditions were created with 1 mM DTT and oxidizing conditions with 1 mM $K_3Fe(CN)_6$. After addition of the oxidizing or reducing reagents, the protein samples were incubated for at least 30 min on ice and then analyzed by non-reducing SDS–PAGE.

Site-directed mutagenesis

Single or double mutations were introduced into the achromo-*Rp*BphP4 protein from CEA001 using the QuickChange(tm) site-directed mutagenesis kit (Stratagene), according to the manufacturer's recommendations. To construct the achromo-*Rp*BphP4 C472S and C722S mutants, the plasmid pBAD::*RpBphP4* from CEA001 was used as the template with the following primer pairs: *Rp*BphP4-C472Ssens (5′-GAACGCCGAAAGGCAGCGCGTCGAGCT GG-3′)/BphP4-C472Santisens (5′-CCAGCTCGACGCGCTGCCTTTCG GCGTTC-3′) and BphP4-C722Ssens (5′-CGAGGATGACGGCTCA GGCTTCGTCACCG-3′)/BphP4-C722Santisens (5′-CGGTGACGAAGC CTGAGCCGTCATCCTCG-3′). To construct the double mutant, the pBAD::*RpBphP4-C472* plasmid was used as the template with the BphP4-C722Ssens/BphP4-C722Santisens primer pair.

Sulfhydryl alkylation

To alkylate protein thiol groups, purified achromo-*Rp*BphP4 was treated with 10 mM DTT for 30 min. DTT was removed from the sample on a desalting column and the reduced achromo-*Rp*BphP4 was then incubated at room temperature in the presence of 10 mM iodoacetamide for 3 h. Finally the alkylated sample was thoroughly dialyzed against 20 mM Tris–HCl (pH 8), 50 mM NaCl.

Gel mobility shift assay and DNase I footprint

Five probes corresponding to the *pucBA* promoter regions identified in *Rps. palustris* CGA009 were prepared by PCR using ^{32}P 5′-end-labeled oligonucleotide primers, as previously described (Giraud *et al*, 2004). For gel mobility shift assays, the purified Rpa1489 protein (0.5 μM) was added to 20 μl of reaction buffer composed of 5 fmol of ^{32}P-labeled DNA probe, 1 μg of polydIdC as competitor, 50 mM Tris–HCl (pH 8), 1 mM DTT, 50 mM potassium acetate, 5 μg of bovine serum albumin and 10% glycerol. The reaction mixture was incubated at room temperature for 30 min and was subjected to non-denaturing 5% Tris–glycine–EDTA-buffered polyacrylamide gel electrophoresis at 4°C for 4 h at 70 V. DNase I footprint experiments were performed as previously described (Giraud *et al*, 2004).

Protein kinase assays

Protein kinase reactions were performed as previously described (Giraud *et al*, 2005). For the phosphotransfer experiments, achromo- and chromo-*Rp*BphP4 were phosphorylated for 15 min in the presence of γ-^{32}P-ATP, under reducing conditions or following a 705 nm illumination, respectively. This phosphorylation step was followed by a 25 min incubation in the presence of a stoichiometric amount of Rpa1489. ^{32}P-labeled products were quantified with a Typhoon Phosphor-Imager (Amersham Biosciences).

Construction of RpBphP4 mutants

To create *RpBphP4*-null mutants for strains HaA2 (*RpBphP4.HaA2*) and BisB5 (*RpBphP4.BisB5*), a fragment of each gene was deleted (0.35 kb *Bam*HI for *RpBphP4.HaA2* and 50 bp *Sal*I for *RpBphP4.BisB5*) and replaced by the *lac*Z-Km^r cassette of pKOK5 (Kokotek and Lotz, 1989). The *RpBphP4.CEA001*-null mutant was obtained by inserting the *lac*Z-Km^r cassette directly into the unique *Bam*HI site of the *RpBphP4.CEA001* gene. These constructs were introduced into the pJQ200 suicide vector (Quandt and Hynes, 1993) and delivered by conjugation into the corresponding *Rps. palustris* strains, as described (Giraud *et al*, 2004). Double recombinants were selected on sucrose and confirmed by PCR.

Absorbance and fluorescence measurements

Absorbance and fluorescence spectra of purified chromo-*Rp*BphP4 from HaA2 and BisB5 were recorded as previously described (Giraud *et al*, 2005). Excitation was provided by light-emitting diodes emitting at 770 or 705 nm (ELD770-524 and ELD 700-524 from Roithner), with an irradiance of 15 μmol of photon/m^2/s.

Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online (http://www.embojournal.org).

Acknowledgements

We thank Professor C Harwood (University of Iowa, USA) for the generous gift of the CGA009, HaA2 and BisB5 strains. LV is indebted to the French Ministry of National Education, Higher Education and Research for a doctoral grant.

References

Bhoo SH, Davis SJ, Walker J, Karniol B, Vierstra RD (2001) Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore. *Nature* **414:** 776–779

Borucki B, von Stetten D, Seibeck S, Lamparter T, Michael N, Mroginski MA, Otto H, Murgida DH, Heyn MP, Hildebrandt P (2005) Light-induced proton release of phytochrome is coupled to the transient deprotonation of the tetrapyrrole chromophore. *J Biol Chem* **280:** 34358–34364

Butler WL, Lane HC (1965) Dark transformations of phytochromes *in vivo*. II. *Plant Physiol* **40:** 13–17

Eilfeld P, Rüdiger W (1985) Absorption spectra of phytochrome intermediates. *Z Naturforsch* **40C:** 109–114

Elsen S, Jaubert M, Pignol D, Giraud E (2005) PpsR: a multifaceted regulator of photosynthesis gene expression in purple bacteria. *Mol Microbiol* **57:** 17–26

Elsen S, Swem LR, Swem DL, Bauer CE (2004) RegB/RegA, a highly conserved redox-responding global two-component regulatory system. *Microbiol Mol Biol R* **68:** 263–279

Evans K, Fordham-Skelton AP, Mistry H, Reynolds CD, Lawless AM, Papiz MZ (2005) A bacteriophytochrome regulates the synthesis of LH4 complexes in *Rhodopseudomonas palustris*. *Photosynth Res* **85:** 169–180

Evans K, Grossmann G, Fordham-Skelton AP, Papiz MZ (2006) Small-angle X-ray scattering reveals the solution structure of a

©2007 European Molecular Biology Organization

bacteriophytochrome in the catalytically active Pr state. *J Mol Biol* **364:** 655–666

Evans MB, Hawthornthwaite AM, Cogdell RJ (1990) Isolation and characterisation of different B800-850 light-harvesting complexes from low-and high-light grown cells of *Rhodopseudomonas palustris*, strain 2.1.6. *Biochim Biophys Acta* **1016:** 71–76

Giraud E, Fardoux J, Fourrier N, Hannibal L, Genty B, Bouyer P, Dreyfus B, Verméglio A (2002) Bacteriophytochrome controls photosystem synthesis in anoxygenic bacteria. *Nature* **417:** 202–205

Giraud E, Zappa S, Jaubert M, Hannibal L, Fardoux J, Adriano J-M, Bouyer P, Genty B, Pignol D, Verméglio A (2004) Bacteriophytochrome and regulation of the synthesis of the photosynthetic apparatus in *Rhodopseudomonas palustris*: pitfalls of using laboratory strains. *Photochem Photobiol Sci* **3:** 587–591

Giraud E, Zappa S, Vuillet L, Adriano J-M, Hannibal L, Fardoux J, Berthomieu C, Bouyer P, Pignol D, Verméglio A (2005) A new type of bacteriophytochrome acts in tandem with a classical bacteriophytochrome to control the antennae synthesis in *Rhodopseudomonas palustris*. *J Biol Chem* **280:** 32389–32397

Hartigan N, Tharia HA, Sweeney F, Lawless AM, Papiz MZ (2002) The 7.5-Å electron density and spectroscopic properties of a novel low-light B800 LH2 from *Rhodopseudomonas palustris*. *Biophys J* **82:** 963–977

Jaubert M, Lavergne J, Fardoux J, Hannibal L, Vuillet L, Adriano J-M, Bouyer P, Pignol D, Giraud E, Verméglio A (2007) A singular bacteriophytchrome acquired by lateral gene transfer. *J Biol Chem* **282:** 7320–7328

Jaubert M, Zappa S, Fardoux J, Adriano J-M, Hannibal L, Elsen S, Lavergne J, Verméglio A, Giraud E, Pignol D (2004) Light and redox control of photosynthesis gene expression in *Bradyrhizobium*: dual roles of two PpsR. *J Biol Chem* **279:** 44407–44416

Jiang ZY, Swem LR, Rushing BG, Devanathan S, Tollin G, Bauer CE (1999) Bacterial photoreceptor with similarity to photoactive yellow protein and plant phytochromes. *Science* **285:** 406–409

Karniol B, Viestra RD (2003) The pair of bacteriophytochromes from *Agrobacterium tumefaciens* are histidine kinases with opposing photobiological properties. *Proc Natl Acad Sci USA* **100:** 2807–2812

Karniol B, Wagner JR, Walker JM, Vierstra RD (2005) Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors. *Biochem J* **392:** 103–116

Kokotek W, Lotz W (1989) Construction of a *lacZ*-kanamycine–resistance cassette, useful for site-directed mutagenesis and as a promoter probe. *Gene* **84:** 467–471

Lamparter T, Michael N, Mittmann F, Esteban B (2002) Phytochrome from *Agrobacterium tumefaciens* has unusual spectral properties and reveals an N-terminal chromophore attachment site. *Proc Natl Acad Sci USA* **99:** 11628–11633

Larimer FW, Chain P, Hauser L, Lamerdin J, Malfatti S, Do L, Land ML, Pelletier DA, Beatty JT, Lang AS, Tabita FR, Gibson JL, Hanson TE, Bobst C, Torres JL, Peres C, Harrison FH, Gibson J, Harwood CS (2004) Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. *Nat Biotech* **22:** 55–61

Masuda S, Dong C, Swem D, Setterdahl AT, Knaff DB, Bauer CE (2002) Repression of photosynthesis gene expression by formation of a disulfide bond in CrtJ. *Proc Natl Acad Sci USA* **99:** 7078–7083

Ninfa EG, Atkinson MR, Kamberov ES, Ninfa AJ (1993) Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NR_{II} or NtrB): trans-phosphorylation between subunits. *J Bacteriol* **175:** 7024–7032

Paget MS, Buttner MJ (2003) Thiol-based regulatory switches. *Annu Rev Genet* **37:** 91–121

Quandt J, Hynes MF (1993) Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* **127:** 15–21

Rockwell NC, Su YS, Lagarias JC (2006) Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57:** 837–858

Swem LR, Kraft BJ, Swem DL, Setterdahl AT, Masuda S, Knaff DB, Zaleski JM, Bauer CE (2003) Signal transduction by the global regulator RegB is mediated by a redox-active cysteine. *EMBO J* **22:** 4699–4708

Tadros MH, Waterkamp K (1989) Multiple copies of the coding regions for the light-harvesting B800-850 alpha- and beta-polypeptides are present in the *Rhodopseudomonas palustris* genome. *EMBO J* **8:** 1303–1308

Wagner JR, Brunzelle JS, Forest KT, Vierstra RD (2005) A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome. *Nature* **438:** 325–331

Yang Y, Inouye M (1991) Intermolecular complementation between two defective mutant signal-transducing receptors of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88:** 11057–11061

 ©2007 European Molecular Biology Organization

Partie II : Analyse de deux génomes de Bradyrhizobium photosynthétiques : Etude de deux nouveaux bactériophytochromes acquis par transfert horizontal

Les rhizobiums sont des bactéries symbiotiques capables d'induire la formation de nodules fixateurs d'azote sur les racines des Légumineuses (Beijerinck 1888 ; Van Rhijn & Vanderleyden, 1995). Parmi ceux-ci, les *Bradyrhizobium* photosynthétiques présentent certaines propriétés très originales : (i) ils forment des nodules sur les tiges de certaines légumineuses aquatiques du genre *Aeschynomene*, (ii) et présentent un caractère photosynthétique (propriété unique chez les rhizobiums) jouant un rôle clé lors de cette symbiose caulinaire (Giraud *et al.,* 2000), (iii) ils s'associent naturellement avec une non-légumineuse, le riz, par une association de type mutualisme bénéfique pour la croissance de la plante et l'épiaison (Chaintreuil *et al.,* 2000), (iv) et ils produisent des pigments d'intérêt biotechnologique (Hannibal *et al.,* 2000).

Depuis plusieurs années, le LSTM focalise une partie de ses recherches sur ces bactéries selon 2 axes principaux :

- l'étude des mécanismes d'interaction de ces bactéries avec leurs plantes hôtes.
- et l'étude des mécanismes de régulation de l'activité photosynthétique.

Durant ma thèse, le séquençage du génome de deux souches modèles de *Bradyrhizobium* (ORS278 et BTAi1) a été initié. Quatre laboratoires ont collaboré sur ce projet : celui de Bioénergétique cellulaire du CEA, celui d'Ecologie Microbienne de l'Université du Minnesota, le Centre National de Biotechnologie du soja de l'Université du Missouri et le LSTM qui a coordonné l'ensemble de ce projet. L'annotation manuelle a été réalisée grâce à la plateforme MaGe mise en place par l'Atelier de Génomique Comparative du Génoscope (Vallenet *et al.,* 2006). Cela m'a permis de m'impliquer dans l'annotation de ces génomes bactériens. Leur analyse a révélé que ces 2 bactéries symbiotiques ne présentent pas les gènes *nod* communs (*nodABC*) habituellement impliqués dans la symbiose. Cette découverte majeure a fait l'objet d'un article paru dans la revue Science (Giraud *et al.,* 2007).

Par ailleurs, le séquençage a révélé, chez ces deux souches, la présence de nombreux gènes impliqués dans la perception de la lumière ou dans des mécanismes de réponse à la lumière tels que 3 *BphPs* et 2 opérons *kaiBC* impliqués dans les rythmes circadiens. Une partie de ma thèse a donc consisté à participer à la caractérisation de 2 de ces BphPs, nommés *Br*BphP3.BTAi1 et *Br*BphP3.ORS278. L'étude de *Br*BphP3.BTAi1 montre que ce BphP est homologue aux *Rp*BphP4 retrouvés chez *Rps. palustris*. Enfin, la caractérisation de *Br*BphP3.ORS278 a montré que ce BphP, acquis par transfert horizontal, possède la propriété unique de fixer la phycocyanobiline comme chromophore (Jaubert *et al.,* 2007).

Article 3 :

The Rhizobial Nod key is not Universally Required for legume Nodulation.

Giraud E, Moulin L, Barbe V, Vallenet D, Cytrin E, Avarre JC, Jaubert M, Simon D, Cartieaux F, Prin Y, Béna G, Hannibal L, Fardoux J, Kojadinovic M, Lajus A, Mangenot S, Cruveiller S, Rouy Z, Vuillet L, Saunders E, Bruce D, Richardson J, Normand P, Dreyfus B, Pignol D, Stacey G, Elmerich D, Verméglio A, Medigue C, Sadowsky M.

Résumé de l'article :

Tous les rhizobiums caractérisés à ce jour ont en commun des gènes *nod* nécessaires à la symbiose. Ces gènes permettent la synthèse de facteurs Nod déclenchant le processus de nodulation chez la plante hôte. Des études préalables ont montré qu'il existait deux groupes de spécificité au sein des *Bradyrhizobium* photosynthétiques: (i) l'un possède les gènes *nod*, et induit des nodules sur l'ensemble des *Aeschynomene* à nodules de tiges, (ii) le second groupe ne nodule qu'un nombre restreint d'*Aeschynomene* et *les* gènes *nod* n'ont jamais pu être isolés malgré les diverses approches utilisées (PCR, hybridation, complémentation) (Chaintreuil, 2000)

Les génomes de 2 *Bradyrhizobium* photosynthétiques (ORS278 et BTAi1) appartenant au deuxième groupe ont été séquencés par le Génoscope et le DOE Genome Institut puis annotés manuellement grâce à la plateforme MaGe mise en place par le Génoscope (Vallenet *et al.,* 2006). L'analyse des 2 génomes a montré que ces 2 souches ne possèdent pas les gènes *nod* communs (*nodABC*) essentiels à la symbiose. Cette découverte exceptionnelle remet donc en cause le rôle universel des gènes *nod* dans la symbiose *Rhizobium*/Légumineuses et indique qu'il existe une voie alternative d'induction du processus de nodulation par certains rhizobiums photosynthétiques. Afin d'identifier ce nouveau mécanisme symbiotique, 9500 mutants, obtenus par insertion aléatoire d'un transposon, ont été testés individuellement sur plante. Les premiers résultats obtenus montrent qu'une grande proportion des mutants n'induisant pas la symbiose est affectée dans la voie de biosynthèse des purines. Très récemment, il a été démontré qu'un récepteur des cytokinines jouerait un rôle essentiel dans le processus de nodulation (Tirichine *et al.,* 2007). Les cytokinines étant des dérivés de purines, il est envisagé qu'une cytokinine produite par ORS278 déclencherait l'organogenèse du nodule (Giraud, 2007). A l'heure actuelle, l'équipe se focalise sur la caractérisation de ce mécanisme atypique de nodulation afin de vérifier, entre autre, le rôle joué par les cytokinines dans cette nodulation.

forcing, thereby acting as a tropical feedback. Thus, EEA SST was mainly controlled by radiative forcing corresponding to the variation of atmospheric greenhouse gases (*40*) and orbital forcing (precession); submillennial ice-sheet instabilities in the northern high latitudes did not leave a strong imprint in the thermal evolution of the open-ocean tropical Atlantic, as has been previously observed in the Pacific (*45*). This strongly supports the general observation that thermal changes in the tropics primarily reflect greenhouse forcing and, to a lesser extent, orbital insolation changes.

WA monsoon in the context of the global monsoon system. The results of this study demonstrate the interplay and importance of several factors and forcings that govern the WA monsoon system at different time scales and boundary conditions. The role of low-latitude midsummer solar insolation and tropical SST in modulating the WA monsoon system is clearly evident, but millennial-scale extratropical influences can override tropical forcing. The major increase of deglacial WA monsoon precipitation coincides, within age model uncertainty, with the intensification of the EA monsoon (*27*, *46*) and rapid increase of atmospheric methane (*40*, *47*). This observation suggests that, during deglaciation, the WA and EA monsoons acted in synchrony and supports the notion that the abrupt atmospheric methane increase associated with glacial terminations may have its source in monsoon areas (*46*, *48*) (Fig. 5). However, the WA and EA monsoons responded differently to millennial-scale extratropical influence during the penultimate interglacial: The WA monsoon was weak during GIS events, while the EA monsoon largely followed insolation forcing (*27*). In contrast, during late MIS3 and MIS2, the WA monsoon did not vary strongly, while the EA monsoon varied in concert with GIS events. Land-ocean configuration and glacial-interglacial boundary conditions appear to exert constraints on how individual monsoon systems respond to millennial-scale northern high-latitude climate instabilities.

References and Notes

1. P. Camberlin, S. Janicot, I. Poccard, *Int. J. Climatol.* **21**, 973 (2001).
2. P. deMenocal, J. Ortiz, T. Guilderson, M. Sarnthein, *Science* **288**, 2198 (2000).
3. F. Gasse, *Quat. Sci. Rev.* **19**, 189 (2000).
4. S. Weldeab, R. R. Schneider, M. Kölling, G. Wefer, *Geology* **33**, 981 (2005).
5. M. R. Talbot, T. Johannessen, *Earth Planet. Sci. Lett.* **110**, 23 (1992).
6. A. T. Adegbie, R. Schneider, U. Röhl, G. Wefer, *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **197**, 323 (2003).
7. T. M. Shanahan *et al.*, *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **242**, 287 (2006).
8. S. Levitus, T. P. Boyer, *World Ocean Atlas 1994* (National Oceanic and Atmospheric Administration, National Environmental Satellite, Data, and Information Service, U.S. Department of Commerce, Washington, D.C., 1994), vol. 4.
9. G. Gu, R. F. Adler, *J. Clim.* **17**, 3364 (2004).
10. Materials and methods are available as supporting material on *Science* Online.
11. P. S. Dekens, D. W. Lea, D. K. Pak, H. J. Spero, *Geochem. Geophys. Geosyst.* **3**, 1022 (2002).
12. B. E. Bemis, H. Spero, J. Bijma, D. W. Lea, *Paleoceanography* **13**, 150 (1998).
13. G. A. Schmidt, *Paleoceanography* **14**, 482 (1999).
14. J. M. Hall, L.-H. Chan, *Paleoceanography* **19**, PA1017 (2004).
15. J. M. Edmond, E. D. Boyle, D. Drummond, B. Grant, T. Mislick, *Neth. J. Sea Res.* **12**, 324 (1978).
16. M. Coffey *et al.*, *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **45**, 113 (1997).
17. D. W. Lea, H. Spero, *Paleoceanography* **9**, 445 (1994).
18. A. Ganopolski, C. Kubatzki, M. Clausen, V. Brovkin, V. Petoukhov, *Science* **280**, 1916 (1998).
19. Z. Liu, Y. Wang, R. Gallimore, M. Notaro, J. C. Prentice, *Geophys. Res. Lett.* **33**, L22709 (2006).
20. H. Kuhlmann, H. Meggers, T. Freudenthal, G. Wefer, *Geophys. Res. Lett.* **31**, L22204 (2004).
21. J. E. Kutzbach, Z. Liu, *Science* **278**, 440 (1997).
22. J. Bijma, W. W. Faber, C. Hemleben, *J. Foraminiferal Res.* **20**, 95 (1990).
23. J. E. Janowiak, P. Xie, *J. Clim.* **12**, 3335 (1999).
24. A. M. Lezine, J. C. Duplessy, J. P. Cazet, *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **219**, 225 (2005).
25. U. Salzmann, P. Hoelzmann, I. Morczinek, *Quat. Res.* **58**, 73 (2002).
26. D. Fleitmann *et al.*, *Science* **300**, 1737 (2003).
27. D. Yuan *et al.*, *Science* **304**, 575 (2004).
28. G. H. Haug, K. A. Hughen, D. M. Sigman, L. C. Peterson, U. Röhl, *Science* **293**, 1304 (2001).
29. A. Berger, M. F. Loutre, *Quat. Sci. Rev.* **10**, 297 (1991).
30. K. K. Andersen *et al.*, *Nature* **431**, 147 (2004).
31. S. Weldeab, R. R. Schneider, M. Kölling, *Earth Planet. Sci. Lett.* **241**, 699 (2006).
32. D. W. Lea, D. K. Pak, L. C. Peterson, K. A. Hughen, *Science* **301**, 1361 (2003).
33. C. Waelbroeck *et al.*, *Quat. Sci. Rev.* **21**, 295 (2002).
34. R. G. Peterson, L. Stramma, *Prog. Oceanogr.* **26**, 1 (1991).
35. X. Wang *et al.*, *Nature* **432**, 740 (2004).
36. S. J. Burns, D. Fleitmann, A. Matter, J. Kramers, A. A. Al-Subbary, *Science* **301**, 1365 (2003).
37. H. Schulz, U. von Rad, H. Erlenkeuser, *Nature* **393**, 54 (1998).
38. L. Wang *et al.*, *Science* **294**, 2345 (2001).
39. L. C. Peterson, G. H. Haug, K. A. Hughen, U. Rohl, *Science* **290**, 1947 (2000).
40. J. R. Petit *et al.*, *Nature* **399**, 429 (1999).
41. D. W. Lea, D. K. Pak, H. J. Spero, *Science* **289**, 1719 (2000).
42. R. Saraswat, R. Nigam, S. Weldeab, A. Mackensen, P. D. Naidu, *Geophys. Res. Lett.* **32**, L24605 (2005).
43. R. R. Schneider, P. J. Müller, G. Ruhland, *Paleoceanography* **10**, 197 (1995).
44. D. W. Lea, *J. Clim.* **17**, 2170 (2004).
45. L. Stott, C. Pulsen, S. Lund, R. Thunell, *Science* **297**, 222 (2002).
46. M. J. Kelly *et al.*, *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **236**, 20 (2006).
47. E. J. Brook, T. Sowers, J. Orchardo, *Science* **273**, 1087 (1996).
48. J. P. Severinghaus, T. Sowers, E. J. Brook, R. B. Alley, M. L. Bender, *Nature* **391**, 141 (1998).
49. L. Lisiecki, M. E. Raymo, *Paleoceanography* **20**, PA1003 (2005).

50. We thank G. L. Paradis for mass spectrometry operation, T. Guilderson and P. Grootes for accelerator mass spectrometry (AMS)–^{14}C dating, H.-H. Cordt, H. Gier, and H. Heckt for stable isotope measurements, Z. Liu for discussion, J. Dupak for sample preparation and discussion, and C. Rühlemann and E. Schefuß for shipboard help. R.R.S. thanks Institut Français pour la Recherche et la Technologie Polaires for Calypso coring through European Union grant HPRI-2001-00120. S.W. has been funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (postdoctoral fellowship grant WE 2686/2-1) and D.W.L. by NSF (grants OCE0317611 and OCE0502609).

Supporting Online Material
www.sciencemag.org/cgi/content/full/316/5829/1303/DC1
Materials and Methods
Figs. S1 to S6
Tables S1 and S2
References

26 January 2007; accepted 12 April 2007
10.1126/science.1140461

Legumes Symbioses: Absence of *Nod* Genes in Photosynthetic Bradyrhizobia

Eric Giraud,[1]*† Lionel Moulin,[1] David Vallenet,[2] Valérie Barbe,[3] Eddie Cytryn,[4] Jean-Christophe Avarre,[1] Marianne Jaubert,[1] Damien Simon,[1] Fabienne Cartieaux,[1] Yves Prin,[1] Gilles Bena,[1] Laure Hannibal,[1] Joel Fardoux,[1] Mila Kojadinovic,[5] Laurie Vuillet,[1] Aurélie Lajus,[2] Stéphane Cruveiller,[2] Zoe Rouy,[2] Sophie Mangenot,[3] Béatrice Segurens,[3] Carole Dossat,[3] William L. Franck,[6] Woo-Suk Chang,[6] Elizabeth Saunders,[7] David Bruce,[7] Paul Richardson,[8] Philippe Normand,[9] Bernard Dreyfus,[1] David Pignol,[5] Gary Stacey,[6] David Emerich,[6] André Verméglio,[5] Claudine Médigue,[2] Michael Sadowsky[4]*†

Leguminous plants (such as peas and soybeans) and rhizobial soil bacteria are symbiotic partners that communicate through molecular signaling pathways, resulting in the formation of nodules on legume roots and occasionally stems that house nitrogen-fixing bacteria. Nodule formation has been assumed to be exclusively initiated by the binding of bacterial, host-specific lipochito-oligosaccharidic Nod factors, encoded by the *nodABC* genes, to kinase-like receptors of the plant. Here we show by complete genome sequencing of two symbiotic, photosynthetic, *Bradyrhizobium* strains, BTAi1 and ORS278, that canonical *nodABC* genes and typical lipochito-oligosaccharidic Nod factors are not required for symbiosis in some legumes. Mutational analyses indicated that these unique rhizobia use an alternative pathway to initiate symbioses, where a purine derivative may play a key role in triggering nodule formation.

Legume plants have developed symbiotic associations with specific soil bacteria, collectively referred to as the rhizobia, which allow plants to thrive and reproduce in nitrogen-poor environments. These plant-bacterial symbiotic associations typically result in the formation of root organs, termed nodules, in which the bacteria differentiate into nitrogen-fixing bacteroids. Initiation of nodule development involves molecular recognition between both symbiotic

Downloaded from www.sciencemag.org on December 13, 2007

partners (*1–4*). Flavonoid molecules exuded by plant roots induce expression of bacterial nodulation (*nod*) genes leading to the synthesis of Nod factors, rhizobial lipochito-oligosaccharide signal molecules. Synthesis of the Nod-factor chitin oligomer backbone requires the activity of three specific enzymes, encoded by the *nodABC* genes, which are present in all rhizobia characterized thus far. Nod factor signal molecules are recognized by plant kinases of the LysM-RLKs family, which, in turn, initiate a developmental program in the legume host resulting in the formation of the nodule structure. The ubiquitous presence of *nod* genes and Nod factors in all rhizobia led to the development of a universal "lock-and-key" hypothesis (*5*, *6*), which states that all symbiotic legumes and rhizobia have host nodulation determinants and homologs of the known nodulation genes, respectively.

The rhizobia belong to the alpha and beta subclasses of the Proteobacteria (*7*), and most species belong to the genera *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, and *Azorhizobium*. Among them, some photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strains specifically induce nodules on both the root and stem of the aquatic legume *Aeschynomene* (*8*). According to their host specificity within different species of *Aeschynomene*, two groups of photosynthetic *Bradyrhizobium* have been described (*8*): Group I strains contain the common nodulation genes *nodABC* and form nodules on all stem-nodulating *Aeschynomene* species (*9*), whereas nodulation ability in group II strains is restricted to a few species, including *A. sensitiva* and *A. indica*. The *nod* genes have not been detected in group II strains.

[1]Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, Unité mixte recherche (UMR) 113, Institut de Recherche pour le Développement, Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement, AGRO Montpellier, Institut National de la Recherche Agronomique, Université Montpellier 2, TA A-82/J, Campus de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France. [2]Genoscope, CNRS–UMR 8030, Atelier de Génomique Comparative, 2 rue Gaston Crémieux BP5706, 91057 Evry Cedex, France. [3]Genoscope, Centre National de Séquençage, 2 rue Gaston Crémieux BP5706, 91057 Evry Cedex, France. [4]Department of Soil, Water, and Climate; BioTechnology Institute; and Microbial and Plant Genomics Institute, University of Minnesota, 1991 Upper Buford Circle, 439 BorH, St. Paul, MN, 55108, USA. [5]Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) Cadarache, Direction des Sciences du Vivant, Institut de Biologie Environnementale et Biotechnologie, Service de Biologie Végétale et de Microbiologie Environnementale, Laboratoire de Bioénergétique Cellulaire (DSV/IBEB/SBVME/LBC), UMR 6191 CNRS/CEA/Université Aix-Marseille, Saint-Paul-lez-Durance, F-13108 France. [6]National Center for Soybean Biotechnology, Divisions of Plant Sciences and Biochemistry, Department of Molecular Microbiology and Immunology, University of Missouri, Columbia, MO, 65211, USA. [7]U.S. Department of Energy (DOE) Joint Genome Institute, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM 87545, USA. [8]DOE Joint Genome Institute, Walnut Creek, CA 94598, USA. [9]Université Lyon1, CNRS, UMR 5557, Ecologie Microbienne, Lyon, F-69003, France.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: giraud@mpl.ird.fr; sadowsky@umn.edu.

†E.G. and M.S. coordinated the sequence annotation of the *Bradyrhizobium* ORS278 and BTAi1 genomes, respectively.

To unravel the genetic features contributing to the symbiotic properties of the stem-nodulating *Bradyrhizobium*, we determined the complete genomic sequences of two group II photosynthetic *Bradyrhizobium* strains, BTAi1 and ORS278 (*10*). We also performed a genome-wide screen for mutants unable to induce nodules on *Aeschynomene* plants.

General genome features. The photosynthetic *Bradyrhizobium* strains ORS278 and BTAi1 were isolated from stem nodules of two *Aeschynomene* species, *A. sensitiva* and *A. indica*, in Africa and North America, respectively. The ORS278 and BTAi1 strains were sequenced by Genoscope (France) and the U. S. Department of Energy (DOE) Joint Genome Institute (USA), respectively (see SOM). Manual annotation of both genomes was conducted using MaGe comparative genomic software (*11*).

The ORS278 genome consists of a single, circular, chromosome of 7,456,587 base pairs (bp); the BTAi1 genome contains both a large chromosome of 8,264,689 bp and a single, circular, 228,826-bp plasmid, pBTAi1. Chromosomes from ORS278 and BTAi1 are almost identical in G+C content, 65.5 and 64.9%, respectively. In contrast, the G+C content of plasmid pBTAi1 is 60.7%. The genomes of ORS278 and BTAi1 contain 6752 and 7729 predicted coding sequences (CDSs), respectively, of which 59 and 60.1% could be assigned putative functions (Table 1).

Comparative genomic analyses. BLAST analyses indicate that the genomes of BTAi1 and ORS278 share more genes with *B. japonicum* (4002) than with their closest photosynthetic neighbor, *Rhodopseudomonas palustris* (2563) (*12*). This agrees with phylogenies created using 16*S* ribosomal RNA sequences (*13*). A cross-comparison of the two photosynthetic *Bradyrhizobium* genomes identified a common pool of 1343 genes, whereas 1274 and 2133 genes were unique to ORS278 and BTAi1, respectively. Most of the 1343 genes in common were homogeneously distributed on the genomes (Fig. 1), except for genes involved in photosynthesis, which were clustered in a 50-kb region. This region, designated the photosynthesis gene cluster (PGC), is common in purple photosynthetic bacteria. The organization of the PGC is identical in the BTAi1 and ORS278 strains and is highly conserved with the PGC in *R. palustris*. In addition, the G+C content (67%) of the *Bradyrhizobium* PGCs is similar to the rest of the genomes. *Bradyrhizobium* strains BTAi1 and ORS278 also have additional genes specialized in light perception and response, including three putative bacteriophytochromes (biliprotein photoreceptors) and two *kaiBC* circadian clock operons. Taken together, these data strengthen previous hypotheses that photosynthetic capacity is an ancestral trait in these *Bradyrhizobium* strains that was subsequently lost in most rhizobial lineages (*14*).

The large variation in genome sizes (1.6 Mb between ORS278 and *B. japonicum*, and 1 Mb between ORS278 and BTAi1), the overall low level of synteny (Fig. 2 and fig. S1), and the presence of numerous mobile genetic elements indicate that bradyrhizobial genomes are highly plastic. Indeed, the genomes of ORS278 and BTAi1 contain 21 and 29 putative horizontally acquired genomic islands (HAIs), respectively, displaying hallmarks of recent gene transfer events (Fig. 1 and tables S1 and S2). HAIs may confer functional advantages in the adaptation of these bacteria to their symbiotic or free-living ecological niches. Genes encode for important metabolic functions on HAIs, in both strains, including the following: (i) a ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase (RuBisCo); (ii) enzymes involved in nitrogen metabolism, including urease; (iii) lipopolysaccharide (LPS)–modification enzymes; (iv) a type II secretion system; (v) a chemotaxis operon; and (vi) a multidrug efflux pump. In addition, the BTAi1 genome contains a specialized HAI that is made up of all the genes necessary for CO_2 fixation, along with a hydrogenase gene cluster. Remarkably, this

Table 1. General features of *Bradyrhizobium* genomes. The distribution of CDSs for *B. japonicum* is derived from the original annotation (*19*). IS, insertion sequence.

Genome feature	*Bradyrhizobium* sp.		*B. japonicum*
	ORS278	BTAi1	USDA 110
Genome size (bp)	7,456,587	8,493,515	9,105,828
G+C content (%)	65.5	64.9	64.1
Ribosomal RNA operons	2	2	1
Transfer RNAs	50	52	50
Total protein-coding genes	6,752	7,729	8,317
Assigned function (%)	59	60.1	52.3
Conserved hypothetical (%)	27.7	31.8	30.1
Hypothetical (%)	13.3	8.1	17.6
Coding DNA (%)	90.5	91.0	91.3
Plasmid no. (size in bp)	0	1 (228,826)	0
IS elements (%)	0.5	1.4	2
Pseudogenes (%)	0.3	0.6	0

Downloaded from www.sciencemag.org on September 3, 2007

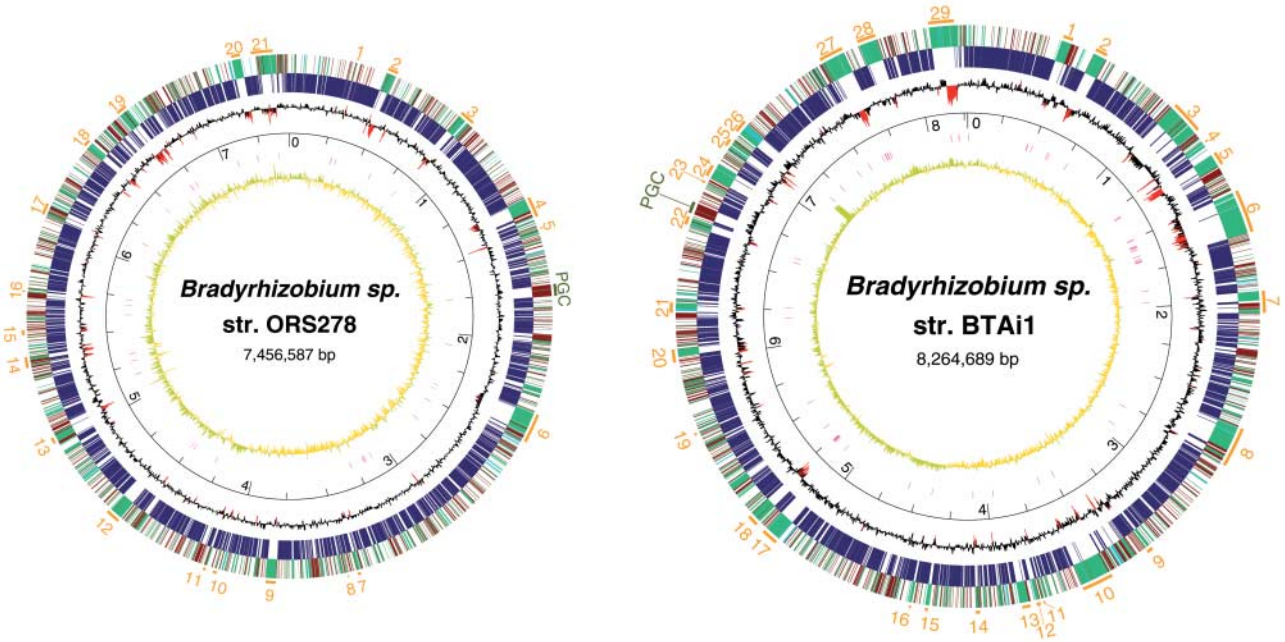


Fig. 1. Circular representation of the *Bradyrhizobium* strains ORS278 and BTAi1 chromosomes. Circles, from the inside out, show (1) GC skew (G+C/G–C using a 1-kb sliding window), (2) IS elements and transposases, (3) the coordinates in Mb beginning at 0 = oriC, and (4) GC deviation (mean GC content in a 1-kb window—overall mean GC). Regions with a GC deviation less than two times the standard deviation are highlighted in red. Circles 5 and 6 show the gene content comparison between the ORS278, BTAi1, and *B. japonicum* USDA110 genomes by using a similarity threshold of 40% identity and a ratio of 0.8 of the length of the smallest protein: blue, backbone genes found in all three strains; red, genes present in ORS278 and BTAi1, but absent from USDA110; cyan in (ORS278) show genes present in ORS278 and USDA110, but not in BTAi1, and in (BTAi1), genes present in BTAi1 and USDA110, but not in ORS278; green, genes specific to each strain. The different genomic islands identified in both chromosomes are highlighted by number. See tables S1 and S2.

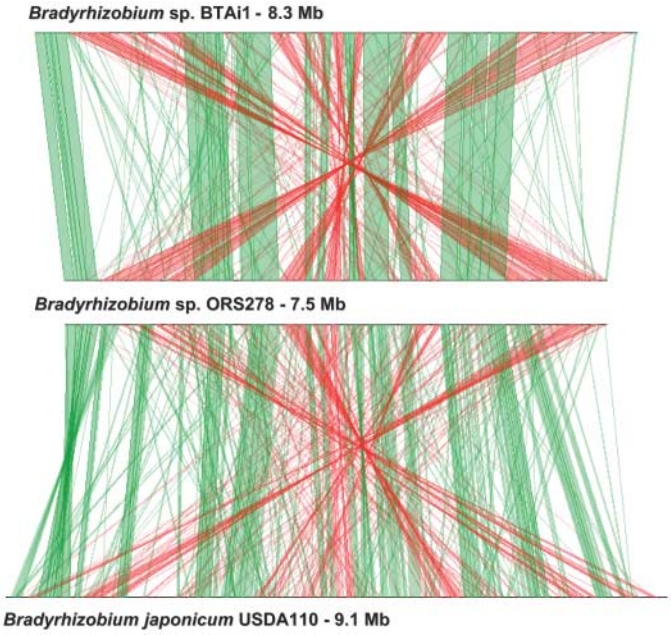


Fig. 2. Synteny plot between the three Bradyrhizobial chromosomes. This line plot (*11*) was obtained by using synteny results between *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 and *Bradyrhizobium* sp. ORS278, as well as results obtained from comparison of *Bradyrhizobium* sp. ORS278 and *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. Synteny groups containing a minimum of five homologous genes are drawn in green for colinear regions, and in red for inverted regions.

strain harbors three RuBisCOs, which assimilate CO_2, and three uptake hydrogenase complexes, one of which is plasmid-borne; the other two are in an HAI and close to the PGC. The presence of these elements suggests that these bacteria have an exceptional ability to fix CO_2 partly due to reducing power furnished by the photosynthetic activity and partly by the uptake hydrogenase enzymes, which potentially scavenge hydrogen produced during nitrogen fixation.

No symbiotic genes (*nod*, *nif*, or *fix*) were found on islands in the chromosomes of ORS278 and BTAi1 or on plasmid pBTAi1 (tables S1 and S2). Although the *nif* and *fix* genes are clustered in a 45-kb region of the BTAi1 and ORS278 genomes, there is no evidence that this region was acquired by lateral transfer. This is in contrast to all rhizobial genomes characterized to date (*15–21*), which have nodulation and nitrogen fixation genes clustered either on plasmids or in large chromosomal symbiotic islands, for example, as observed in *B. japonicum* USDA110 (see fig. S2).

Lack of canonical nodulation genes. BLAST analyses indicate that neither the BTAi1 nor the ORS278 genome contain homologs of NodA (acyl transferase) or NodC (oligomerization of *N*-acetyl-glucosamine), two of the three enzymes essential for the synthesis of lipochito-oligosaccharidic Nod factors in rhizobia. Although a homologous gene in both strains displayed a moderate level of amino acid identity (33 to 36%) to NodB from *Rhizobium galegae*, this homology was limited only to the polysaccharide deacetylase domain of NodB (Table 2), a motif found in other enzymes, including chitin deacetylases and endoxylanases. The low identity that these CDSs have to NodB and the absence of *nodA* and *nodC* gene homologs indicate that the canonical *nodABC* genes are absent in both the BTAi1 and ORS278 genomes. CDSs displaying some similarity to other Nod proteins are present in the genomes of both BTAi1 and ORS278 (Table 2); however, these homologs are well conserved in other nonsymbiotic prokaryotes.

Consistent with genomic information revealed by our analyses, two other observations

Downloaded from www.sciencemag.org on September 3, 2007

support our statement that ORS278 and BTAi1 are unique among rhizobia. First, infection of *A. sensitiva* by ORS278 (fig. S3) revealed the absence of Nod factor–mediated root-hair deformation that classically precedes the entry of rhizobia into legumes. Despite this, the nodules induced by ORS278 (*14*) on the stems and roots of *Aeschynomene* displayed the functional characteristics of classical nodules induced by other rhizobia, such as the synthesis of leghemoglobin, nitrogenase activity, and transfer of fixed N_2 into the plant. Second, the production of classical Nod factor–like compounds by strain ORS278 could not be shown when genistein was used as a *nod*-gene inducer and with a Nod factor isolation method currently shown to work with bradyrhizobia (*22*, *23*). To show more definitively that classical Nod factors are not involved in the *A. sensitiva* symbiosis, we examined the nodulation phenotype of a *nodB* mutant of the broader host-range *Bradyrhizobium* sp. strain ORS285 (group I). This strain nodulates both *A. sensitiva* and *A. afraspera*, whereas the ORS278 and BTAi1 strains do not nodulate *A. afraspera*. As shown in Fig. 3, this mutant failed to induce root and stem nodules on *A. afraspera*, although it maintained its ability to form nitrogen-fixing nodules on roots and stems of *A. sensitiva* with an efficiency similar to that of the wild-type strain. These observations and results demonstrate that the canonical common nodulation genes and, thus, typical lipochito-oligosaccharidic Nod factors are not required for the symbiotic interaction of the photosynthetic bradyrhizobia with *A. sensitiva.*

The absence of *nodABC* genes in *Bradyrhizobium* strains ORS278 and BTAi1 raises the question of the nature of the bacterial signal used to induce nodule formation on *A. indica* and *A. sensitiva* plants. Analysis of the ORS278 and BTAi1 genomes revealed several other genes involved in plant-microbe symbiotic and pathogenic interactions (table S3). These include genes involved in the following: (i) synthesis or degradation of phytohormones (*24*), (ii) modification of O-antigen (or LPS) (*25*, *26*), and (iii) biosynthesis of exopolysaccharides (*5*, *27*). Nevertheless, the symbiotic role of these candidate genes remains highly speculative, and we cannot rule out the possibility that the mechanism of interaction involves genes of unknown function.

Nodulation defective mutants. In order to identify new genes involved in the interaction between the group II photosynthetic bradyrhizobia and *A. sensitiva* and *A. indica* plants, a library of ORS278 transposon (Tn*5*) mutants was screened for strains unable to induce nodule formation on *A. sensitiva*. Of the 9500 mutants tested, 27 were found to be severely defective in symbiosis, most eliciting only a few pseudonodules on a small number of plants (Table 3). Some plants displayed an apparent nodulation-minus phenotype, and microscopic examination often revealed a small number of pseudonodules. No completely nodulation-deficient mutant could be found; we tentatively attribute this phenotype to one or more factors: (i) there are redundant genes controlling this initial step in the symbiotic process; (ii) the appropriate mutation may be fatal in this bacterium; or (iii) the mutagenesis procedure used was not saturating, and an essential gene may have been missed.

The site of Tn*5* insertion in each of the 27 symbiosis-deficient mutants was determined, and none were found to have a mutation in a CDS that could mimic the action of the NodABC proteins. Four classes of mutants were distinguished. Class I comprised 11 independent amino acid–requiring (AA) auxotrophic mutants. Numerous AA auxotrophs of rhizobia were found to be defective in symbiosis (*28*–*31*), and generally, these have symbiotic capacity rescued with the addition of the missing amino acid(s). This suggests that the absence of symbiosis stems from a growth deficiency, rather than an alteration in the infection process (*30*, *32*). The single class II mutant had an insertion in *glnD*, a uridyltransferase/uridyl-removing enzyme constituting the sensory component of the nitrogen regulation (ntr) system, similar to a *Rhizobium leguminosarum glnD* mutant impaired in cell

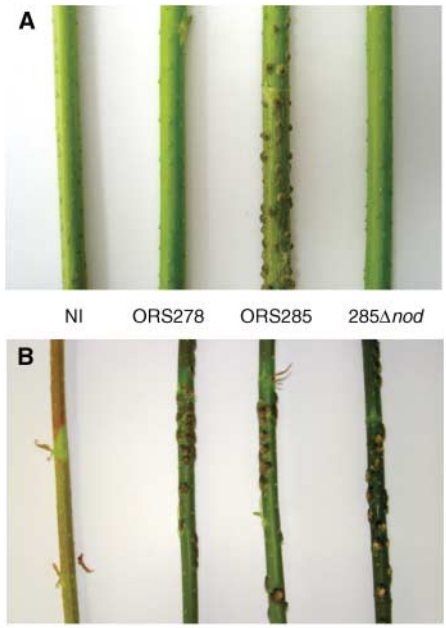


Fig. 3. Efficiency of stem nodulation by *Bradyrhizobium* sp. strains ORS278, ORS285, and the *nod* gene deletion mutant ORS285Δ*nodB* (285Δ*nod*) on *A. afraspera* (**A**) and *A. sensitiva* (**B**). The NI refers to the noninoculated control. The ORS285Δ*nodB* mutant was obtained by homologous recombination as described (*14*) after insertion of the *lacZ-Kan*R cassette (pKOK5) in the unique Xho I site of *nodB*. Plants were inoculated and cultivated as described (*14*).

Table 2. Coding sequences in the ORS278 and BTAi1 genomes showing similarities with known nodulation (Nod) proteins. Absent refers to no hits with ≥30% amino acid identity using the BLASTP algorithm. Brado and BBTa refer to *Bradyrhizobium* sp. strains ORS278 and BTAi1, respectively, CDS with best BLASTP hits. Percent amino acid similarity to named species of the BLASTP hit. Acc no., GenBank accession numbers of the Nod protein. E value of the BLASTP hit. Abbreviations: *R.*, *Rhizobium* sp.; *M.*, *Mesorhizobium* sp.; *R. leg.*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*; and *B.*, *Bradyrhizobium* sp.

Nod protein	*Bradyrhizobium* sp. strains							
	ORS278				BTAi1			
	CDS	Similarity (%)	Acc. no.	E value	CDS	Similarity (%)	Acc no.	E value
NodA	Absent				Absent			
NodB	Brado4564	33% to *R. galegae*	P50354	$2e^{-16}$	BBta4792	36% to *R. galegae*	P50354	$2e^{-16}$
NodC	Absent				Absent			
NodD	Brado3695	39% to *R.*	Q53061	$1e^{-54}$	BBta1932	38% to *R.*	Q53061	$1e^{-53}$
NodE	Absent				BBta0068	31% to *R. leg.*	P04684	$1e^{-47}$
NodG	Brado3311	66% to *M.*	P72332	$4e^{-86}$	BBta3818	65% to *M.*	P72332	$2e^{-85}$
NodI	Brado0517	39% to *R. tropici*	Q933C0	$5e^{-37}$	BBta7658	39% to *R. tropici*	Q933C0	$4e^{-35}$
NodJ	Absent				Absent			
NodL	Brado2093	42% to *R. leg.*	P08632	$2e^{-11}$	Absent			
NodM	Brado3763	78% to *B.*	Q9AQ10	$1e^{-277}$	BBta4166	76% to *B.*	Q9AQ10	$1e^{-269}$
NodP	Brado5192	75% to *B. elkanii*	BAB55898	$1e^{-133}$	BBta0328	73% to *R.*	P72338	$2e^{-125}$
NodQ	Brado5193	66% to *B. elkanii*	BAB55899	$5e^{-236}$	BBta0327	55% to *R.*	O07309	$2e^{-195}$

Downloaded from www.sciencemag.org on September 3, 2007

viability (*33*). Similarly, class III contained a single mutant with an insertion in a key enzyme (PyrF, orotidine 5′-phosphate decarboxylase) of the pyrimidine biosynthesis pathway.

In contrast, class IV contained 14 mutants that were affected in the biosynthesis of purines. The mutated genes (10) were scattered throughout the ORS278 genome, which indicated that there was no Tn*5* integration hotspot and that purines play a pivotal role in the symbiotic process. Symbiotically defective purine auxotrophs of several *Rhizobium* species have been previously reported (*34*–*36*). The intriguing finding that purine intermediates, such as 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR), rather than purine itself, can partially restore nodulation deficiency in purine mutants of *Rhizobium leguminosarum* or *R. etli* suggested that a purine precursor might act as a signal molecule during infection (*35*, *37*).

To further examine this, a ORS278 *purL* mutant, which only produced a few pseudonodules, was evaluated for its ability to normally nodulate *A. sensitiva* in the presence of the purine biosynthesis precursors AICAR, inosine monophosphate (IMP), and adenosine monophosphate (AMP) (fig. S4). In the absence of precursors, the mutant bacterium proliferated on the root surface, which indicated that the host plant can supply the required nutrient(s) for mutant growth. In addition, although cytological analysis showed that pseudonodules elicited by the *purL* mutant contained bundles of infection threads progressing intercellularly around the meristematic zone, the bacteria were not released into meristematic cells. In contrast, the symbiotic ability of the mutants was partially restored when the plant culture medium was supplemented with AICAR, IMP, or AMP at 0.5 mM. Treatment of plants with these compounds allowed the mutant to proliferate in meristematic cells, and plants had normal size nodules.

Similar observations were obtained using *purH* and *purB* mutants, except that the partial rescue of the *purH* mutant was observed only in the presence of IMP and AMP, and the nodulation phenotype of the *purB* mutant was only rescued in the presence of AMP. Taken together, these data suggest that a purine derivative, which may be a cytokinin-like molecule, plays a key role in the formation of nodules on *A. sensitiva*, and presumably *A. indica*, by the photosynthetic bradyrhizobia. This hypothesis is consistent with previous observations that (i) several *Bradyrhizobium* strains were shown to produce cytokinin compounds (*38*, *39*); (ii) a Nod factor–deficient *Sinorhizobium* strain carrying a constitutive trans-zeatin secretion (*tzs*) gene involved in cytokinin production induced nodule-like structures on alfalfa plants (*40*); and (iii) a plant cytokinin-receptor was shown to play a key role in the activation of nodule organogenesis in *Lotus japonicus* (*41*, *42*). We were unable to identify a homolog to the *tzs* gene in the ORS278 or BTAi1 genomes; this suggests that these two strains may use a different pathway for cytokinin production. This is likely the case, as *B. japonicum* USDA110, which produces cytokinin molecules (*39*), also lacks a *tzs* homolog.

Our data show that nodulation of some legumes by rhizobia occurs in the absence of the *nodABC* genes and lipochito-oligosaccharidic Nod factors, which indicates that other signaling strategies can trigger nodule organogenesis in some legumes. The *nodABC* genes have been identified in all the rhizobia thus far characterized, consisting of hundreds of symbiotically distinct strains isolated worldwide. This indicates that the nodulation of legumes in the absence of canonical *nod* genes is likely an unusual phenomenon. However, such a discovery is highly significant and raises several interesting questions: Is the first recognition step initiated by Nod factor simply bypassed in some legume plants, especially those allowing infection via crack entry? What is the signal molecule(s) directly triggering nodule organogenesis in *Aeschynomene*? Is there any relation between the molecular mechanism used by photosynthetic bradyrhizobia and other symbiotic organisms, such as *Frankia* which induces nodulation on nonleguminous plants? Our discovery should stimulate research on plant-bacteria interactions by providing insight into the diversity and evolution of symbiotic strategies used by both partners.

Table 3. *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278 mutants affected in symbiosis with *Aeschynomene sensitiva*. Minitransposon mTn*5*-GNm (*43*), containing a *gusA* reporter gene and the *nptII* gene encoding neomycin resistance, was used for the construction of the insertion mutants. After mutagenesis, the mutants were selected on YM-modified rich medium (*14*) containing kanamycin (50 μg/ml) and nalidixic acid (35 μg/ml). Each of the 9500 mutants was initially individually tested on one *A. sensitiva* plant. Mutants having an alteration in their nodulation efficiency were retested using three plants per mutant, and subsequently tested again in a third analysis with six additional plants. The localization of the site of Tn*5* insertion in symbiotically deficient mutants was ascertained as previously describe (*44*). Mutant number describes the number of independent mutants identified in the corresponding CDS. Phenotype shows the number of plants not nodulated (–); number of plants having pseudonodules (PN); and number of plants having classical nodules (+).

CDS	Gene	Function	Mutant no.	Phenotype
		Amino acid auxotrophs		
Brado0374	*leuC*	Leucine biosynthesis	5	9–, 1PN
Brado0365	*leuD*	Leucine biosynthesis	2	8–, 2PN
Brado3572	*hom* (*metL*)	Homoserine biosynthesis	1	4–, 2PN, 4+
Brado0430	*proA*	Proline biosynthesis	1	9–, 1PN
Brado6238	*gltB*	Glutamate biosynthesis	2	8–, 2PN
		Nitrogen regulation system		
Brado0530	*glnD*	Nitrogen regulation system	1	8–, 2PN
		Pyrimidine or purine biosynthesis		
Brado0160	*pyrF*	Pyrimidine biosynthesis	1	4–, 6PN
Brado3280	*purF*	Purine biosynthesis	1	5–, 5PN
Brado6088	*purD*	Purine biosynthesis	2	5–, 5PN
Brado2785	*purL*	Purine biosynthesis	3	6–, 4PN
Brado3344	*purM*	Purine biosynthesis	1	8–, 2PN
Brado1206	*purE*	Purine biosynthesis	1	2–, 8PN
Brado2830	*purB*	Purine biosynthesis	2	9–, 1PN
Brado0338	*purH*	Purine biosynthesis	1	9–, 1PN
Brado5935	*purA*	Purine biosynthesis	1	8–, 2PN
Brado3165	*guaB*	Purine biosynthesis	1	2–, 8PN
Brado3317	*gmk*	Purine biosynthesis	1	7–, 3PN

References and Notes

1. X. Perret, C. Staehelin, W. J. Broughton, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 180 (2000).
2. J. Cullimore, J. Dénarié, *Science* **302**, 575 (2003).
3. R. Geurts, E. Fedorova, T. Bisseling, *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 346 (2005).
4. G. Stacey, M. Libault, L. Brechenmacher, J. Wan, G. D. May, *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**, 110 (2006).
5. W. J. Broughton, S. Jabbouri, X. Perret, *J. Bacteriol.* **182**, 5641 (2000).
6. M. Parniske, J. A. Downie, *Nature* **425**, 569 (2003).
7. L. Moulin, A. Munive, B. Dreyfus, C. Boivin-Masson, *Nature* **411**, 948 (2001).
8. E. Giraud, D. Fleischman, *Photosynth. Res.* **82**, 115 (2004).
9. C. Chaintreuil, C. Boivin, B. Dreyfus, E. Giraud, *FEMS Microbiol. Lett.* **194**, 83 (2001).
10. Materials and methods are available as supporting material on *Science* Online.
11. D. Vallenet *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **34**, 53 (2006).
12. Two genes were considered orthologs when their products satisfy the bi-directional best hit (BBH) criterion, based on BLAST comparisons with an identity threshold of 40% over more than 80% of the length of the smallest protein.
13. J. P. W. Young, H. L. Downer, B. D. Eardly, *J. Bacteriol.* **173**, 2271 (1991).
14. E. Giraud, L. Hannibal, J. Fardoux, A. Vermeglio, B. Dreyfus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 14795 (2000).
15. C. Freiberg *et al.*, *Nature* **387**, 394 (1997).
16. T. Kaneko *et al.*, *DNA Res.* **7**, 331 (2000).
17. F. Galibert *et al.*, *Science* **293**, 668 (2001).
18. M. J. Barnett *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 9883 (2001).

Downloaded from www.sciencemag.org on September 3, 2007

19. T. Kaneko *et al.*, *DNA Res.* **9**, 189 (2002).
20. V. Gonzalez *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 3834 (2006).
21. J. P. Young *et al.*, *Genome Biol.* **7**, R34 (2006).
22. P. Roche, P. Lerouge, C. Ponthus, J. C. Promé, *J. Biol. Chem.* **266**, 10933 (1991).
23. J. Dénarié and F. Maillet, personal communication.
24. A. Costacurta, J. Vanderleyden, *Crit. Rev. Microbiol.* **21**, 1 (1995).
25. I. Lerouge, J. Vanderleyden, *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 17 (2002).
26. W. D'Haeze, M. Holsters, *Trends Microbiol.* **12**, 555 (2004).
27. J. A. Leigh, D. L. Coplin, *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 307 (1992).
28. J. Dénarié, B. Bergeron, in *Symbiotic Nitrogen Fixation*, P. S. Nutman, Ed. (Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1975), pp. 47–61.
29. H. M. Meade, S. R. Long, G. B. Ruvkun, S. E. Brown, F. M. Ausubel, *J. Bacteriol.* **149**, 114 (1982).
30. M. J. Sadowsky, K. Rostas, P. R. Sista, H. Bussey, D. P. S. Verma, *Arch. Microbiol.* **144**, 334 (1986).
31. J. S. So *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* **207**, 15 (1987).
32. E. J. Patriarca, R. Tate, M. Iaccarino, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 203 (2002).
33. A. Schluter, M. Nohlen, M. Kramer, R. Defez, U. B. Priefer, *Microbiology* **146**, 2987 (2000).
34. C. E. Pankhurst, E. A. Schwinghamer, *Arch. Microbiol.* **100**, 219 (1974).
35. K. D. Noel, R. J. Diebold, J. R. Cava, B. A. Brink, *Arch. Microbiol.* **149**, 499 (1988).
36. M. Collavino, P. M. Riccillo, D. H. Grasso, M. Crespi, M. Aguilar, *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**, 742 (2005).
37. J. D. Newman, R. J. Diebold, B. W. Schultz, K. D. Noel, *J. Bacteriol.* **176**, 3286 (1994).
38. D. B. Sturtevant, B. J. Taller, *Plant Physiol.* **89**, 1247 (1989).
39. L. Boiero *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 874 (2007).
40. J. B. Cooper, S. R. Long, *Plant Cell* **6**, 215 (1994).
41. J. D. Murray *et al.*, *Science* **315**, 101 (2007).
42. L. Tirichine *et al.*, *Science* **315**, 104 (2007).
43. W. G. Reeve *et al.*, *Microbiology* **145**, 1307 (1999).
44. M. A. Jacobs *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 14339 (2003).
45. We would like to thank M. Boursot and C. Chaintreuil for technical help, S. Sylla and I. Ndoye for providing *Aeschynomene* seeds, and the DOE's Joint Genome Institute production sequencing team. The sequencing work on ORS278 was performed at Genoscope, Evry, France and supported by the Consortium National de la Recherche en Génomique (CNRG) and MRT/ACI IMPBio2004. A portion of the BTAi1 sequencing work was performed under the auspices of the U.S. Department of Energy's Office of Science, Biological and Environmental Research Program, by the University of California, Lawrence Livermore National Laboratory, Lawrence Berkeley National Laboratory, and Los Alamos National Laboratory. This work was supported, in part, from grants from the French Agence Nationale de la Recherche (ANR Blanc), and grant 2004-35604-14708 from the National Research Initiative of the Cooperative State Research, Education, and Extension Service, U.S. Department of Agriculture (USDA) (to D.E., M.S., and G.S.). Sequences of the entire genomes of *Bradyrhizobium* sp. ORS278 and BTAi1 have been submitted to the EMBL database under accession number CU234118, and to the GenBank database under accession numbers CP000494 (chromosome) and CP000495 (plasmid), respectively. Expert annotation data and comparative analysis results are publicly available via the MaGe interface in the RhizoScope relational database https://www.genoscope.cns.fr/agc/mage. Strain BTAi1 has been deposited in the American Type Culture Collection under accession number BAA-1182.

Supporting Online Material
www.sciencemag.org/cgi/content/full/316/5829/1307/DC1
Materials and Methods
Figs. S1 to S4
Tables S1 to S3

4 January 2007; accepted 12 April 2007
10.1126/science.1139548

REPORTS

Quantum Register Based on Individual Electronic and Nuclear Spin Qubits in Diamond

M. V. Gurudev Dutt,[1]* L. Childress,[1]* L. Jiang,[1] E. Togan,[1] J. Maze,[1] F. Jelezko,[2] A. S. Zibrov,[1] P. R. Hemmer,[3] M. D. Lukin[1]†

The key challenge in experimental quantum information science is to identify isolated quantum mechanical systems with long coherence times that can be manipulated and coupled together in a scalable fashion. We describe the coherent manipulation of an individual electron spin and nearby individual nuclear spins to create a controllable quantum register. Using optical and microwave radiation to control an electron spin associated with the nitrogen vacancy (NV) color center in diamond, we demonstrated robust initialization of electron and nuclear spin quantum bits (qubits) and transfer of arbitrary quantum states between them at room temperature. Moreover, nuclear spin qubits could be well isolated from the electron spin, even during optical polarization and measurement of the electronic state. Finally, coherent interactions between individual nuclear spin qubits were observed and their excellent coherence properties were demonstrated. These registers can be used as a basis for scalable, optically coupled quantum information systems.

Quantum registers are controllable quantum systems composed of several qubits. They form fundamental building blocks for quantum information science and can be connected into useful communication and computation systems, for example, via quantum optical channels (*1*–*9*). A useful register must support high-fidelity local operations between its qubits as well as permit excellent isolation of the qubits from each other and from the external environment. Over the past few years, quantum registers consisting of a few interacting trapped ions with exceptional coherence properties have been implemented experimentally (*10*, *11*), and the first steps toward optical interconnections have been taken (*12*, *13*). We report on the realization of a quantum register in a room-temperature solid by means of controlled manipulation of individual electron and nuclear spins.

Our approach makes use of coherent manipulation of the electron spin associated with individual nitrogen vacancy (NV) centers in diamond (*14*–*18*). The NV center has a long-lived spin triplet in its electronic ground state (*14*) that can be initialized, manipulated, and measured using microwave and optical excitation (Fig. 1A) (*15*). In pure samples, the electron spin acts as a sensitive magnetic probe of the local environment. The electron spin dynamics is governed by interactions with spin-½ ^{13}C nuclei (present in 1.1% natural abundance) in the diamond lattice (Fig. 1B). Although such a nuclear spin environment normally causes dephasing of electron spin qubits (*19*, *20*), we show that if properly controlled it also provides a very useful resource. Certain proximal nuclei, by virtue of their stronger hyperfine interaction and enhanced magnetic moment, can be distinguished from each other and from the rest of the environment (*21*), allowing us to individually address single nuclear spins and to use the resulting electron-nuclear coupled systems as few-qubit registers.

Although nuclear spins are well known for their long coherence times (*22*), conventional techniques for probing them require the use of macroscopic spin ensembles to obtain measurable signals (*23*, *24*). Coherent oscillations of a single nuclear spin were observed in (*25*), using a thermal state of a ^{13}C nuclear spin that was inextricably coupled by strong contact interactions with the nearest-neighbor NV electron spin. In contrast, we demonstrate a high degree of polarization (corresponding to an effective spin temperature below 1 μK) and control over an isolated nuclear spin that is coupled nonlocally to the electron spin. This results in coherence times

[1]Department of Physics, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA. [2]Physikalisches Institut, Universtität Stuttgart, Pfaffenwaldring 57, D-70550 Stuttgart, Germany. [3]Department of Electrical and Computer Engineering, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA.

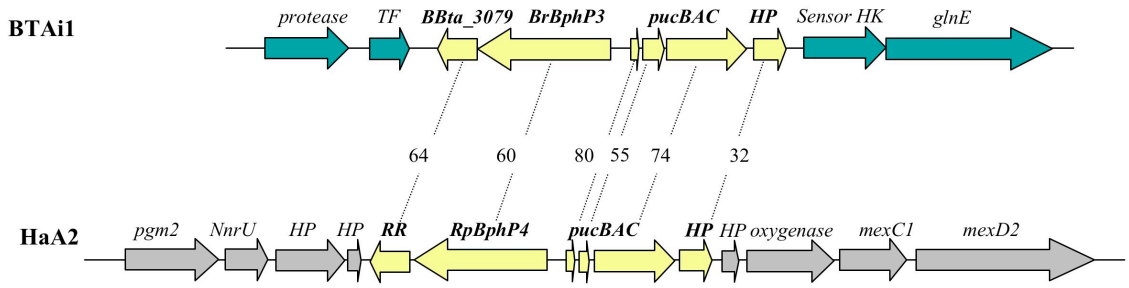
*These authors contributed equally to this work.
†To whom correspondence should be addressed. E-mail: lukin@fas.harvard.edu

Downloaded from www.sciencemag.org on December 13, 2007

Etude du bactériophytochrome *Br*BphP3.BTAI1 retrouvé chez la souche *Bradyrhizobium. BTAi1*

Introduction

Le gène *BrBphP3.BTAi1*, non retrouvé chez la souche ORS278, code une protéine homologue aux protéines *Rp*BphP4 présentes chez diverses souches de *Rps. palustris*. De plus, comme *RpBphP4* des souches CGA009, HaA2 et BisB5, le gène *BrBphP3.BTAi1* est encadré par un opéron *pucBA* et par un gène (*BBta_3079*) (Figure 30) qui code une protéine homologue au facteur de transcription Rpa1489 partenaire de *Rp*BphP4 (Cf article 2). L'existence de cette synténie entre deux bactéries proches phylogénétiquement nous laissait penser que la protéine *Br*BphP3.BTAi1 pouvait avoir une fonction similaire à celles des protéines *Rp*BphP4. Cependant il est à noter que la synthèse des antennes périphériques n'a jamais été répertoriée chez la souche BTAi1 malgré les nombreuses études réalisées sur cette bactérie.



<u>Figure 30</u> : Organisation des gènes entourant *BrBphP3.BTAi1* et *RpBphP4* chez les bactéries *Bradyrhizobium* BTAi1 et *Rps. palustris* souche HaA2.

Les gènes en synténie sont représentés par des flèches jaunes et les nombres correspondent au pourcentage d'identité entre les protéines homologues de ces deux souches.

Durant cette dernière année de thèse, je me suis donc intéressée à la voie de signalisation de *BrBphP3.BTAi1* dont la caractérisation avait été initiée par Marianne Jaubert lors de sa troisième année de thèse. Afin de mieux appréhender le rôle joué par cette protéine nous avons essayé de répondre aux questions suivantes : Le gène *BrBphP3.BTAi1* code-t'il une protéine fonctionnelle lumière ou redox sensible ? La protéine synthétisée est-elle impliquée dans une voie de signalisation similaire à celle utilisée par *Rp*BphP4 ? Est-elle capable de réguler la transcription de l'opéron *pucBA* ? Et enfin ce dernier est-il fonctionnel ?

Résultats

Caractérisation moléculaire de *Br*BphP3.BTAi1 :

L'analyse de la séquence protéique montre que *Br*BphP3.BTAi1 possède, à son extrémité N–terminale, le domaine PCD caractéristique des bactériophytochromes (Figure 31 a). De plus, une analyse phylogénétique basée sur le domaine PHY montre que cette protéine se regroupe avec les protéines *Rp*BphP4 (Figure 31 b). Elle présente un pourcentage d'identité supérieur avec les chromo–*Rp*BphP4 (± 61%) qu'avec les achromo-*Rp*BphP4 (± 53%). En accord avec cela, une analyse plus précise de l'extrémité N-terminale de la protéine *Br*BphP3.BTAi1 révèle qu'elle possède également le résidu de cystéine essentiel à la fixation du chromophore (Figure 31 c). Ainsi cette protéine possède les mêmes caractéristiques que les chromo-*Rp*Bphp4 des souches HaA2 et BisB5 et pourrait, de ce fait, correspondre à un véritable bactériophytochrome.

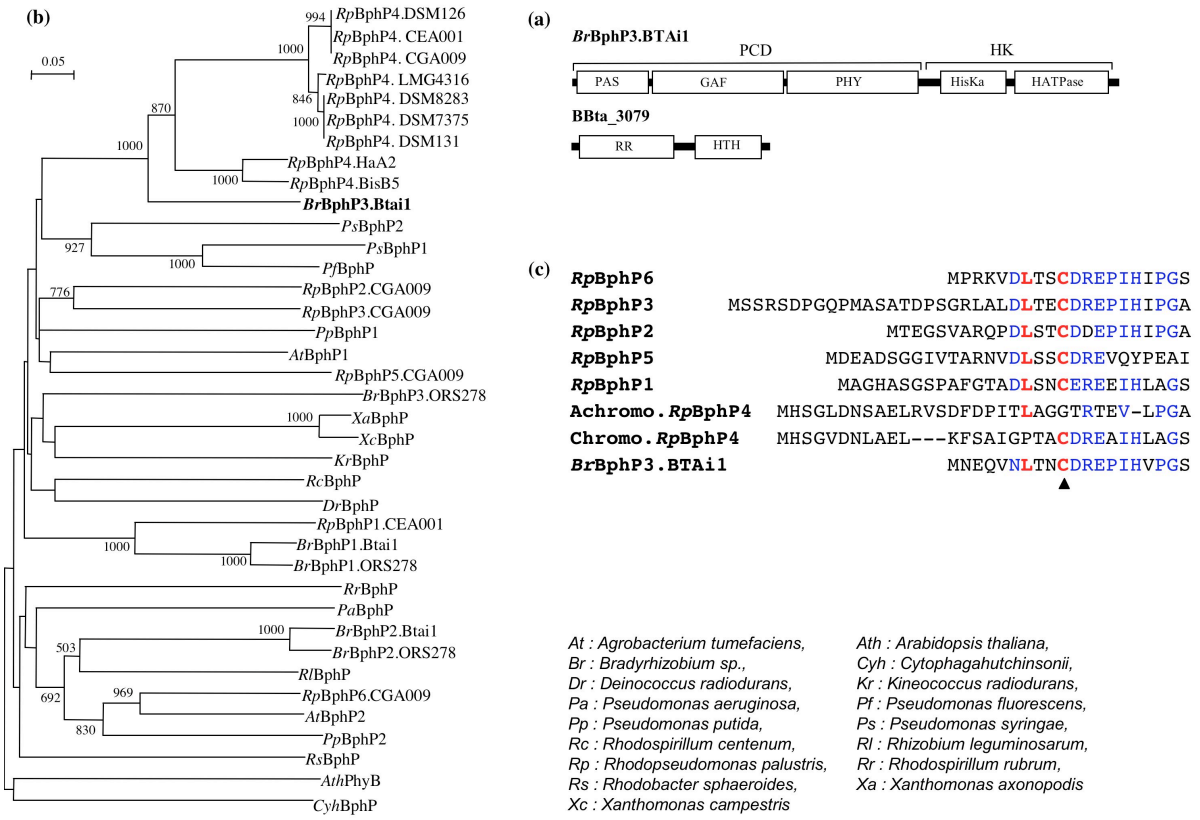


Figure 31 : Caractérisation moléculaire de *Br*BphP3.BTAi1.

(a) : Représentation schématique des domaines caractéristiques des protéines *Br*BphP3.BTAi1 et de BBta_3079. **PCD** : domaine de liaison du chromophore constitué des sous-domaines PAS, GAF et PHY, **HK** : domaine histidine kinase, **RR** : domaine régulateur de réponse et **HTH** : domaine de fixation à l'ADN. (b) : Analyse phylogénétique de la famille des bactériophytochromes basé sur le domaine GAF. (c) : Alignement de l'extrémité N-terminale des différents bactériophytochromes retrouvés chez *Rps. palustris* et de la protéine *Br*BphP3.BTAi1.

Afin de vérifier que le gène *BrBphP3.BTAi1* code bien un bactériophytochrome fonctionnel, il a été co-exprimé avec le gène *hmuO* (nécessaire à la synthèse du chromophore) chez *Escherischia coli,* puis purifié par chromatographie d'affinité. La protéine correspondante a révélé qu'elle était capable, au même titre que les chromo-*Rp*BphP4, de fixer la biliverdine (Figure 32a). De plus, des études complémentaires, réalisées par André Verméglio au LBC, montrent que la protéine *Br*BphP3.BTAi1 présente les mêmes propriétés spectrales inhabituelles (Figure 32c) que celles retrouvées chez les chromo-*Rp*BphP4 des souches HaA2 et BisB5.

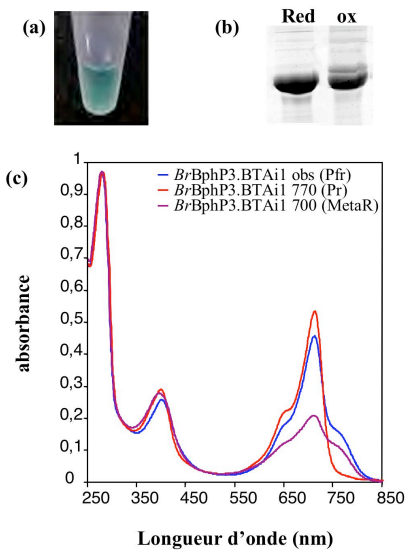


Figure 32 : Purification de la protéine *Br*BphP3.BTAi1.

(a) *Br*BphP3.BTAi1 obtenue après purification. **(b)** La protéine ne semble pas être sensible au potentiel redox. (**red** : conditions réductrices (1 mM) et **ox** : conditions oxydantes (1 mM)). **(c)** Spectre d'absorption de la protéine purifiée *Br*BphP3.BTAi1. Les spectres sont obtenus après des illuminations en lumière infra-rouge (spectre rouge), rouge (spectre mauve), puis retour à l'obscurité (spectre bleu).

En effet, en lumière infra-rouge, cette protéine absorbe aux alentours de 710 nm ce qui est caractéristique de la conformation Pr (Figure 32c : spectre rouge) des bactériophytochromes. L'illumination en lumière rouge de la forme Pr provoque un changement de conformation qui se caractérise par une diminution importante de l'absorption à 710 nm et une faible augmentation de l'absorption à 770 nm (Figure 32c : spectre mauve). Cet état conformationnel présente de fortes similarités avec l'état metaR déjà décrit chez les chromo-*Rp*BphP4 mais également chez Agp1 et phyA (Borucki *et al.*, 2005 ; Eilfeld & Rüdiger, 1985). Cet état est instable à l'obscurité et passe sous une autre conformation qui absorbe à 770 nm et qui correspond à la forme Pfr (Figure 32c : spectre bleu). On retrouve ainsi chez *Br*BphP3.BTAi1 les trois formes spectrales (Pr, Pfr et metaR) précédemment décrites pour les chromo-*Rp*BphP4 mais avec des cinétiques de réversion d'une forme à l'autre légèrement différentes. Des études biochimiques complémentaires (analyse SDS-PAGE) que j'ai réalisées montrent que, comme les chromo-*Rp*BphP4, ce BphP n'est pas sensible au potentiel redox (Figure 32b). En accord avec ce résultat, un alignement des

séquences protéiques de *Br*BphP3.BTAi1 et des achromo-*Rp*BphP4 révèle que la protéine *Br*BphP3.BTAi1 est dépourvue des résidus de cystéine impliqués dans cette sensibilité chez les achromo-*Rp*BphP4 (souches CGA009 et CEA001).

Etude de la voie de signalisation initiée par *Br*BphP3.BTAi1 :

La protéine *Br*BphP3.BTAi1 possède à son extrémité C-terminale un domaine Histidine-kinase (Figure 31 a). Afin de vérifier que ce domaine est bien fonctionnel, des tests d'autophosphorylation ont été effectués. Ils révèlent que les conditions redox n'affectent pas son activité kinase (Figure 33a). En revanche, *Br*BphP3.BTAi1 s'autophosphoryle préférentiellement sous sa forme Pfr, obtenue à l'obscurité, ou après un éclairement à 700nm induisant la forme metaR (Figure 33b). La photoconversion vers la forme Pr obtenue lors d'un éclairement à 770nm induit une diminution de 60 % du niveau d'autophosphorylation de *Br*BphP3.BTAi1 (Figure 33b). Ainsi, comme habituellement observé chez les BphPs, *Br*BphP3.BTAi1 agit comme une kinase sensible à la lumière. Le gène *BBta_3079* retrouvé à proximité du gène *BrBphP3.BTAi1* code une protéine qui présente 64 % d'identité avec la protéine Rpa1489. Nous avons montré précédemment (Cf article 2) que la protéine Rpa1489 intervient dans un système à deux composants avec le bactériophytochrome *Rp*BphP4 pour réguler l'expression d'antennes périphériques chez *Rps. palustris*. Afin d'étudier les capacités de phosphotransfert du bactériophytochrome *Br*BphP3.BTAi1, des essais de purification en système hétérologue de la protéine BBta_3079 ont été tentés, malheureusement ils ont été sans succès. Nous avons donc choisi de réaliser ces expériences de phosphotransfert en utilisant son homologue (Rpa1489) chez *Rps. palustris*. Cette étude a montré qu'un transfert du groupement phosphate de *Br*BphP3.BTAi1 vers le facteur de transcription Rpa1489 est possible (Figure 33c), avec une efficacité de transfert comparable à celle observée pour les 2 chromo-*Rp*BphP4.

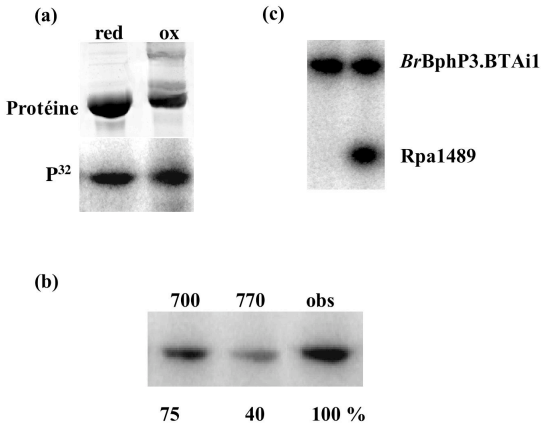


Figure 33 : *Br*BphP3.BTAi1 agit comme une kinase sensible à la lumière.

(a) et (b) L'autophosphorylation du BphP ne dépend pas des conditions d'oxydo-réduction mais de la lumière. (c) Phosphotransfert entre *Br*BphP3.BTAi1 et Rpa1489.

La position de ces 2 gènes à proximité d'un opéron *pucBA* comme chez *Rps. palustris* suggère que les protéines correspondantes pourraient intervenir dans la régulation de la transcription de cet opéron comme cela a été observé chez *Rps. palustris*. En accord avec cette hypothèse, on retrouve dans la région promotrice de *pucBA* le site de fixation spécifique du facteur de transcription Rpa1489 ($TGTCCGN_8CGGACA$). De plus juste en amont de ce palindrome, on retrouve le site de fixation de PpsR ($TGTN_{12}ACA$). On aurait donc chez BTAi1 une voie de régulation comparable à celle retrouvée chez *Rps. palustris* avec un contrôle de l'opéron *pucBA* effectué d'une part par le système à deux composants (*Br*BphP3.BTAi1 / BBta_3079) et d'autre part par les 2 PpsR (PpsR1 et PpsR2).

Mise en évidence des antennes périphériques :

Afin de vérifier l'implication du bactériophytochrome *Br*BphP3.BTAi1 dans la régulation des antennes périphériques, Marianne Jaubert, au cours de sa thèse, a testé différentes conditions de lumière pour induire la synthèse de ces antennes. Cependant, quelles que soient les conditions testées, il n'a pas été possible de révéler la synthèse de ces antennes. Il est à noter que le gène *pucA* présente une extension de 195 pb. Cela correspond pour la protéine à une extension de 65 acides aminés soit le double de la taille attendue, on peut donc légitimement se demander si ce polypeptide permet une synthèse correcte de ces antennes périphériques (Figure 34).

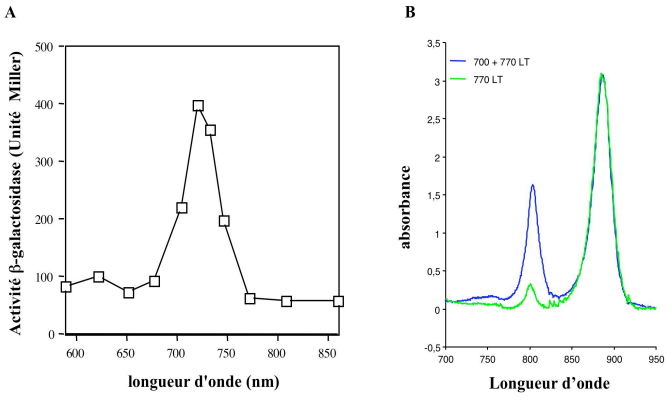
```
             1        10        20        30        40        50        60        70        80        90       100       110       120   127
             |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+------|
      Ros.   MNNAKMWLVVSPSVGVPVFLGAVAVGSFAVHVAVLSNTSWVSDFLSGNELGSGDAQEAAARILENADNDVANASYVVP-SAD----GSQQVLVVMPDGTTAMATLQSPSYVQASVTQPVTIEQ
     BTAi1   MNQGRIWCVVNPTVGLPLFLGSVALTSLCVHYTVLTHTTWMGAFFEGGKSKKASLEETVSPVALNAKAVPGYVISVAPVSAENARAGSSFVVTVAPVPAQAQATSEDTTSHAPDKVSLATLAPRDDK
Rps.pucA.a   MNQARIWTVVKPTVGLPLLLGSVTVIAILVHFAVLSHTTWFSKYWNGKAAAIESSVNVG
Rps.pucA.e   MNQGRIWTVVKPTVGLPLLLGSVTVIAILVHFAVLSNTTWFSKYWNGKAAAIR
Rps.pucA.d   MNQGRIWTVVKPTVGLPLLLGSVAIMVFLVHFAVLTHTTWVAKFMNGKAAAIESSIKAV
Rps.pucA.b   MNQGRIWTVVNPGVGLPLLLGSVTVIAILVHYAVLSNTTWFPKYWNGATVAAPAAAPAPAAPAAKK
Rps.pucA.c   MNQGRIWTVVSPTVGLPLLLGSVAAIALSQYTSRCSKTPRGWPLS
Consensus    MNQgRIWtVV.PtVGLPL1LGSVavia.lvh.avls.Ttw..k..ng...a..........................  ...   ....................................
```

Figure 34 : Alignement de la séquence protéique du polypeptide α codé par le gène *pucA* chez les souches *Bradyrhizobium*.BTAi1, *Rps. palustris* CGA009 et *Roseobacter denitrificans*.

Ce n'est pas la première fois qu'une telle extension du gène *puc* est décrite chez les bactéries pourpres. C'est le cas par exemple de *Roseobacter denitrificans* OCh114 où le polypeptide α montre une extension de 58 acides aminés (Swingley *et al.,* 2007). Cette extension ne semble pas gêner la mise en place des antennes périphériques, un complexe de type LH4 étant détecté chez cette bactérie (Shimada *et al.,* 1985). En revanche chez *Rhodobacter sphaeroides*, le gène *puc2A* qui présente une longue extension de 209 acides aminés ne semble pas fonctionnel (Zeng *et al.,* 2003).

Afin de savoir si l'opéron *pucBA* est réellement exprimé chez cette bactérie, Marianne Jaubert a cloné le gène rapporteur *lacZ* dans cet opéron et analysé l'activité β-galactosidase après culture sous différentes conditions de lumière. Comme on peut le voir sur la figure 35a,

il y a bien une expression lumière dépendante de cet opéron. Cette expérience confirme donc que cette voie de signalisation est bien fonctionnelle et qu'elle régule l'expression de l'opéron *pucBA* en fonction de la lumière. Cependant, une étude plus attentive du spectre d'action de la lumière révèle que celui-ci est légèrement décalé par rapport aux spectres d'absorption du bactériophytochrome *Br*BphP3.BTAi1. En effet, une activité β-galactosidase maximale est obtenue pour des longueurs d'ondes proches de 720 nm ce qui ne correspond au maximum d'absorption d'aucune des 2 conformations Pr et Pfr de *Br*BphP3.BTAi1. Ce décalage pourrait résulter d'un double contrôle de la synthèse des antennes périphériques à la fois par le système à deux composants (*Br*BphP3.BTAi1 / BBta_3079) mais également par PpsR2 dont l'action est modulée par *Br*BphP1 chez ORS278. Ainsi le spectre d'action observé correspondrait non pas à la conformation Pfr de *Br*BphP3.BTAI1 mais à la zone de chevauchement des conformations actives des 2 BphPs : *Br*BphP1 et *Br*BphP3.BTAi1. L'absence de synthèse des antennes périphériques chez la souche BTAi1 lors de nos expériences précédentes pourrait donc résulter de nos mauvaises conditions d'éclairement. Aussi, de nouveaux essais ont été conduits en éclairant la souche bactérienne BTAi1 en lumière rouge **ET** infra-rouge (700 et 770 nm). Dans ces conditions, comme on peut le voir sur la figure 35b, il y a bien mise en place des antennes périphériques. De façon inattendue, il apparaît que ces antennes absorbent essentiellement à 800 nm et pas à 850 nm. Elles présentent de ce fait un spectre caractéristique des antennes LH4 et non des antennes LH2 comme on aurait pu s'y attendre aux vues des similitudes avec la régulation de *pucBA.b* et *.e* par les *Rp*BphP4 chez *Rps. palustris*.



<u>Figure 35</u> : Effet de la lumière sur la mise en place des antennes périphériques collectrices de lumière.

(a) activité β-galactosidase en fonction de la lumière.
(b) Spectre d'absorption réalisé à basse température sur des cellules entières de BTAi1 éclairés à 700 et 770 nm (spectre bleu) et uniquement à 770 nm (spectre vert).

Afin de prouver définitivement l'implication de ce BphP dans la régulation par la lumière de ces antennes nous avons construit le mutant Δ*BrBphP3.BTAi1*. Les études phénotypiques réalisées montrent que chez ce mutant, quelles que soient les conditions de lumière, il n'y a pas mise en place de ces antennes périphériques (Figure 36). Cela confirme

que la synthèse de ces antennes est régulée, comme chez *Rps. palustris, via* le bactériophytochrome *Br*BphP3.BTAi1.

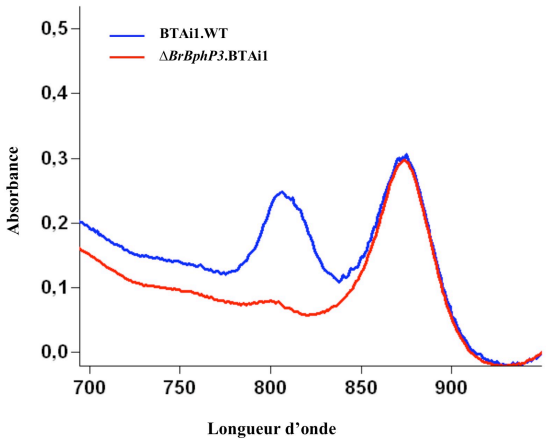


Figure 36 : Etude du phénotype « expression des antennes » sur le mutant de délétion Δ*BrBphP3.BTAi1* (spectre rouge) comparer au phénotype de la souche sauvage (spectre bleu) après culture sous un double éclairement (700+770nm).

Discussion - Conclusion

Ainsi le gène *BrBphP3.BTAi1* code un bactériophytochrome fonctionnel qui intervient dans la même voie de signalisation que son homologue *Rp*BphP4 chez *Rps. palustris*. Cette voie de signalisation correspond à un système à deux composantes qui ferait également intervenir la protéine BBta_3079 pour réguler l'expression de l'opéron *pucBA*, permettant de ce fait un contrôle lumière-dépendant de la synthèse des antennes périphériques chez *Bradyrhizobium* BTAi1 (Figure 37).

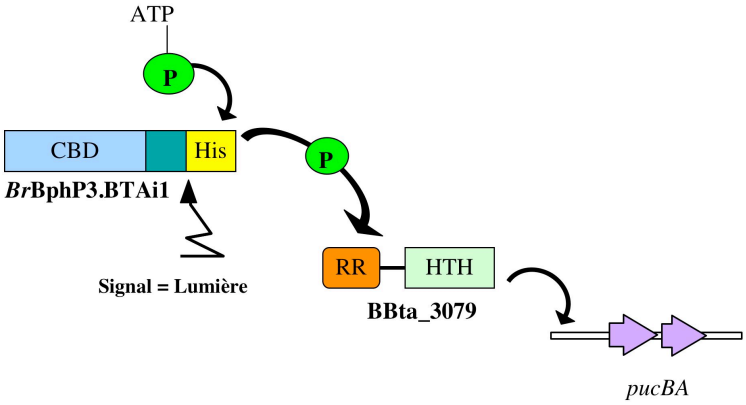


Figure 37 : Modèle proposé pour la régulation des antennes LH4 chez la souche *Bradyrhizobium* BTAi1.

Il apparaît ainsi que l'opéron *pucBA* est bien fonctionnel, cependant il reste encore à déterminer si l'extension de plus de 60 acides aminés observée au niveau de la sous-unité α est conservée dans ce complexe antennaire ou si un clivage a lieu avant son incorporation. Des tentatives de purification de ce nouveau complexe sont en cours afin de pouvoir déterminer par SDS-PAGE la taille des polypeptides α et β.

Afin de savoir si ce complexe est retrouvé chez d'autres souches de *Bradyrhizobium* photosynthétiques, nous avons recherché par PCR la présence de l'opéron *pucBA* et du gène *BrBphP3.BTAi1* sur plus d'une centaine de souches isolées de nodules de tiges de différentes espèces d'*Aeschynomene* et provenant de pays différents. Aucune des souches testées n'a donné de produit d'amplification. Nous avons également testé la souche *Blastobacter denitrificans,* isolée d'un étang en Allemagne, renommée *Bradyrhizobium denitrificans* aux vues des études phylogénétiques qui la rapprochent des *Bradyrhizobium* photosynthétiques et plus spécifiquement de la souche BTAi1 (van Berkum *et al.,* 2006). De façon surprenante, nous avons obtenu avec cette souche des produits d'amplification de la taille attendue. La comparaison des séquences obtenues avec celles de la souche BTAi1 révèle qu'elles ne diffèrent que de quelques nucléotides, confirmant le rapprochement entre ces 2 souches. Le fait que l'opéron *pucBA* et le gène *BrBphP3.BTAi1* n'aient été retrouvés que chez une autre souche de *Bradyrhizobium*, suggère que cette région ait pu être acquise par transfert horizontal. En accord avec cette dernière hypothèse, nous observons (Figure 38) que cette insertion s'est faite au sein d'une région génomique parfaitement conservée chez la souche ORS278 ainsi que chez d'autres espèces de *Rhizobium* (non montré). L'absence de signatures habituellement retrouvées lors d'un événement récent d'insertion (usage différent des codons, transposases ou différence dans le pourcentage en GC), comme observé pour la région contenant *BrBphP3.ORS278* (Cf article 4, ci-après), suggère que cette région ait pu être acquise lors d'un événement **ancien** de transfert horizontal.

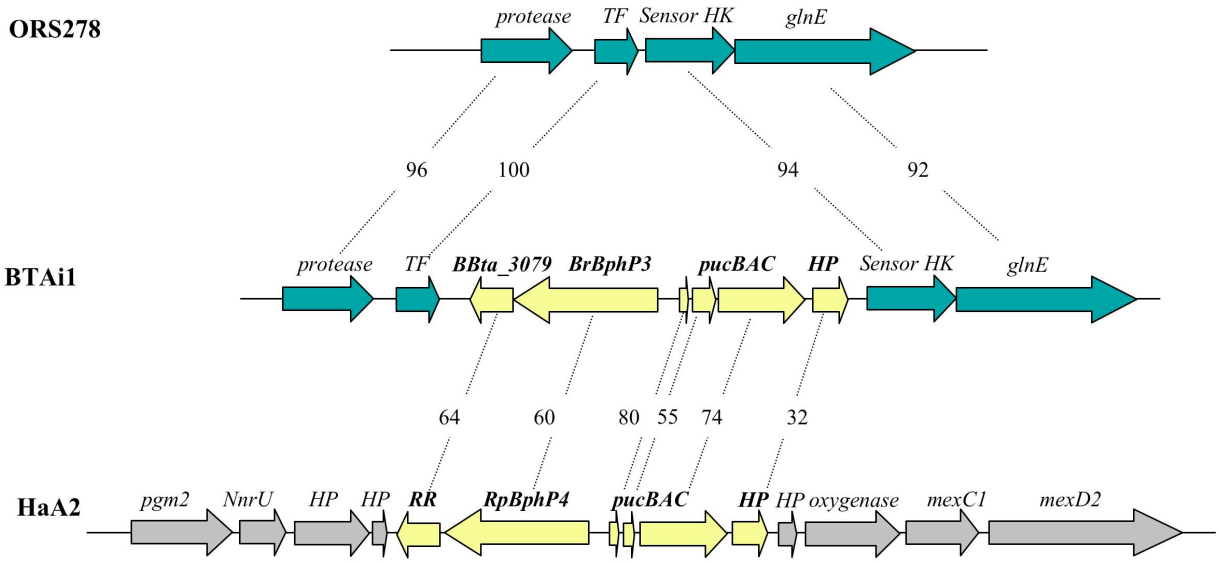


Figure 38 : mise en évidence du phénomène d'insertion de la région génomique entourant le gène BphP chez *Bradyrhizobium* BTAi1.

Article 4 :

A singular bacteriophytochrome acquired by lateral gene transfer.

Jaubert M, Lavergne J, Fardoux J, Hannibal L, Vuillet L, Adriano JM, Bouyer P, Pignol D, Giraud E, Verméglio A.

Résumé de l'article :

Le séquençage de *Bradhyrizobium* ORS278 a révélé l'existence d'un îlot génomique particulier de 91 kb possédant les caractéristiques d'une acquisition par transfert horizontal (pourcentage en G+C et usage des codons différents, présence de gènes impliqués dans l'intégration et le transfert par conjugaison de matériel génétique). Au sein de cet îlot sont localisés un gène *Br*BphP3.ORS278 (non retrouvé chez la souche BTAi1) codant un putatif BphP et deux gènes *hmuO* et *pcyA* codant deux enzymes impliquées dans la synthèse de la phycocyanobiline, le chromophore des phytochromes de cyanobactéries. L'étude de ce BphP révèle qu'il est assez éloigné des autres bactériophytochromes et qu'il est le seul BphP connu capable de fixer la phycocyanobiline. La fixation de ce chromophore se fait comme chez les phytochromes de plantes et de cyanobactéries sur un résidu de cystéine situé dans le domaine GAF. Cela tend à confirmer l'hypothèse de l'acquisition de ce BphP par transfert horizontal.

L'analyse de ce BphP révèle des propriétés spectrales uniques. Cette protéine existe sous deux conformations : une forme Pr classique et une forme Po jamais observée jusqu'à présent absorbant en lumière orange. Cependant, contrairement aux autres bactériophytochromes, la proportion de ces deux formes (Pr et Po) dépendrait plus de l'intensité que de la qualité de la lumière. Cela suggère que ce BphP agirait plutôt comme un senseur de l'intensité lumineuse. A l'heure actuelle nous ne connaissons pas le rôle de ce bactériophytochrome. Il ne présente pas de domaine C-terminal clairement défini et les tests d'autophosphorylation que j'ai menés sur cette protéine n'ont pas été concluants. De plus, aucun phénotype n'a pu être observé chez le mutant *ΔBrBphP3.ORS278*. Cependant l'analyse de l'îlot génomique montre qu'en aval de ce BphP se situe un cluster de gènes *gvp* impliqués dans la synthèse de vésicules à gaz. Ces vésicules, très souvent retrouvées chez les cyanobactéries, permettent à la cellule de se positionner dans la colonne d'eau. Il serait tentant d'envisager qu'en fonction de l'intensité lumineuse *Br*BphP3.ORS278 pourrait réguler l'expression de ces vésicules. Cependant aucune expression de ces vésicules n'a pu être mise en évidence chez ORS278 à l'heure actuelle, peut être en raison des nombreux paramètres intervenant dans la régulation de cette synthèse (pH, salinité, oxygène, lumière…).

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 282, NO. 10, pp. 7320–7328, March 9, 2007
© 2007 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A.

A Singular Bacteriophytochrome Acquired by Lateral Gene Transfer*[S]

Received for publication, December 6, 2006, and in revised form, January 11, 2007 Published, JBC Papers in Press, January 11, 2007, DOI 10.1074/jbc.M611173200

Marianne Jaubert[‡1], Jérôme Lavergne[§], Joël Fardoux[‡], Laure Hannibal[‡], Laurie Vuillet[‡], Jean-Marc Adriano[§], Pierre Bouyer[§], David Pignol[§], Eric Giraud[‡2], and André Verméglio[§2,3]

From the [‡]Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, IRD, CIRAD, AGRO-M, INRA, UM2. TA 10/J, Campus de Baillarguet, 34398 Montpellier and [§]Commissariat à l'Energie Atomique (CEA)/Cadarache DEVM-Laboratoire de Bioénergétique Cellulaire UMR 6191 CNRS-CEA-Aix-Marseille II, 13108 Saint Paul lez Durance, France

Bacteriophytochromes are phytochrome-like proteins that mediate photosensory responses in various bacteria according to their light environment. The genome of the photosynthetic and plant-symbiotic *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278 revealed the presence of a genomic island acquired by lateral transfer harboring a bacteriophytochrome gene, *BrBphP3.ORS278*, and genes involved in the synthesis of phycocyanobilin and gas vesicles. The corresponding protein *Br*BphP3.ORS278 is phylogenetically distant from the other (bacterio)phytochromes described thus far and displays a series of unusual properties. It binds phycocyanobilin as a chromophore, a unique feature for a bacteriophytochrome. Moreover, its C-terminal region is short and displays no homology with any known functional domain. Its dark-adapted state absorbs maximally around 610 nm, an unusually short wavelength for (bacterio)phytochromes. This form is designated as Po for orange-absorbing form. Upon illumination, a photo-reversible switch occurs between the Po form and a red (670 nm)-absorbing form (Pr), which rapidly back-reacts in the dark. Because of this instability, illumination results in a mixture of the Po and Pr states in proportions that depend on the intensity. These uncommon features suggest that *Br*BphP3.ORS278 could be fitted to measure light intensity rather than color.

To adapt their growth and development to light environment, plants use a large panel of photoreceptors. Among them, phytochromes utilize bilin as chromophore to control several aspects of photomorphogenesis like germination, flowering, shade avoidance, chloroplast development, etc. (1–2). Phytochromes respond to red and far-red light via a reversible shift from a red-absorbing form (Pr) to a far-red absorbing form (Pfr). In the last decade, thanks to the accumulating genomic data, it has been recognized that phytochromes are not restricted to plants but are widely distributed among prokaryotes and eukaryotes. This finding has provided new insights into the diversity, the evolution, and the biochemical and structural description of this light sensor family (3–8). A recent phylogenetic analysis shows that the phytochrome superfamily is organized in five different clades: the Phys[4] (plants phytochromes), Cphs (cyanobacterial phytochromes), BphPs (bacteria phytochromes), Fphs (fungi phytochromes), and a cluster of Phy-like sequences (6).

The architecture of most phytochromes is composed of a N-terminal photosensory core domain (PCD) and of a C-terminal module involved in signal transduction. The PCD, comprised of the PAS, GAF, and PHY subdomains, attaches autocatalytically a linear tetrapyrrole (or bilin). All bilins are derived from a heme molecule, converted to biliverdin IX (BV) by a heme oxygenase. Whereas BphPs use this simplest linear tetrapyrrole as a chromophore (9), the chromophores of Phys and Cphs are 3E-phytochromobilin (PΦB) and 3Z-phycocyanobilin (PCB), respectively, modified from BV by bilin reductases (10). These bilins are covalently bound to a Cys residue located in the N-terminal region for BV and in the GAF domain for PΦB and PCB (11, 12). Although little is known about the Fph type, their similarity to BphPs and their biochemical properties are strong indications that BV is also their natural chromophore (13). The Phy-like proteins display an unusual PCD architecture characterized by the absence of PAS and PHY domains and may therefore represent a distinctive group of bilin proteins (6).

The C-terminal region of most BphPs possesses a two-component histidine kinase motif that transfers phosphate to a response regulator (RR) whose gene is often found within the *BphP* operon (14). However, other output modules, like PAC, RR, or GGDEF and EAL domains have been described (3). The spectral properties of BphPs are also highly disparate. Their dark-adapted ground state can be either the Pfr (bathyBphP) or the Pr form (15, 16), and a short wavelength-absorbing form (Pnr) is photo-induced for *Rp*BphP3 from *Rhodopseudomonas (Rps.) palustris* (17). Altogether, these results highlight the modularity and the adaptability of the BphP family.

Photosynthetic bradyrhizobia belong to the α-sub-branch of the Proteobacteria family. They have the capacity to form nitro-

* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[S] The on-line version of this article (available at http://www.jbc.org) contains supplemental Figs. S1–S4.

The nucleotide sequence(s) reported in this paper has been submitted to the DDBJ/GenBank™/EBI Data Bank with accession number(s) CU234118.

[1] Recipient of a doctoral grant from "Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche."

[2] Both authors contributed equally to this work.

[3] To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-442254630; Fax: 33-442254701; E-mail: avermeglio@cea.fr.

[4] The abbreviations used are: Phy, plant phytochrome; BphP, bacteriophytochrome; BV, biliverdin; Cph, cyanobacteria phytochrome; Fph, fungi phytochrome; PCB, phycocyanobilin; PCD, photosensory core domain.

gen-fixing nodules on both roots and stems of some aquatic legumes belonging to the genus *Aeschynomene* (18). Besides their life in association with plant, these bacteria develop freely in aquatic environments or in soils. Recently, a bacteriophytochrome (*Br*BphP) whose gene is located in the photosynthesis gene cluster was shown to play a key role in the control of photosystem synthesis by antagonizing the action of the repressor PpsR (16). The recent sequencing of the genomes of two photosynthetic *Bradyrhizobium* strains (ORS278 and BTAi1) revealed the presence of two other BphPs in each strain.[5] One of these is common to both strains, whereas the second is specific to each strain.

In this study, we have carried out a detailed characterization of the specific BphP present in strain ORS278, denoted *Br*BphP3.ORS278. We give evidence that its gene was acquired by lateral gene transfer together with *bphO* and *pcyA* genes, involved in its chromophore synthesis. This is the first description of a BphP containing phycocyanobilin as chromophore. Furthermore, we show that this new type of BphP possesses a series of unusual photochemical properties, which leads us to propose that it acts as a sensor of light intensity rather than light color.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial Strains and Growth Conditions—*Bradyrhizobium* strain ORS278 was grown in a modified YM agar medium at 35 °C for 7 days (19).

Cloning, Protein Expression, and Purification—The *BrBphP3.ORS278* gene was amplified by PCR using *Pfu* DNA polymerase (Invitrogen) and the following pair of primers (restriction sites are underlined): BrBphP3.PstI.pBAD.f 5′-GGACTGCAGCAATGAATACTCTTGCCAGTTGCATTC-3′ and BrBphP3.HindIII.pBAD.r 5′-AGAAAGCTTGAGAATTCGTCTAGATCACAGGGGTTCGTATTCAGACTTG-3′, designed to allow the expression as His_6-tagged versions of *Br*BphP3.ORS278 in pBAD/HisB expression vector (Invitrogen) and the subsequent insertion of the *bphO* and *pcyA* genes. The two last genes were amplified with the two pairs of primers (the synthetic ribosome binding sites are in bold): bphO.XbaI.f 5′-GACTCTAGAATC**AGGAGG**TGCAAGACATGAGCACGCTGCAGAATTTG-3′ and bphO.EcoRI.r 5′-GTCGTCGAATTCACTCATTGATCGGCAGCCATCCAG-3′, and pcyA.EcoRI.f 5′-CGAATTCTG**AGGAGG**TGCCGATCAATGAGTGATGGGGACGAC-3′ and pcyA.Hind.III.r 5′-TGCGAAGCTTCATCAATCGACATGCGCGAGCGCGCCGCGGGCGGCAG-3′. The PCR products were restricted appropriately and sequentially inserted into the precedent pBAD::BrBphP3 construct. The recombinant protein was overexpressed in *Escherichia coli* LMG194 (Invitrogen) and purified as previously described (17).

Site-directed Mutagenesis—Single mutations were introduced in *Br*BphP3.ORS278 using appropriate primers and the QuikChange™ site-directed mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's recommendations.

Construction of BrBphP3.ORS278 and gvpA Mutants—For the construction of the *BrBphP3.ORS278* minus mutant, the gene was introduced in the pJQ200mp18 suicide vector (20). A gene fragment was deleted (476-bp SalI) and replaced by the *lacZ-kmR* cassette of pKOK5 (21). To construct the *gvpA* minus mutant, the *gvpA* gene was replaced by the *lacZ-kmR* cassette of pKOK5. The sequences flanking *gvpA* were ligated thanks to the following pairs of primers: upgvpA.F 5′-CC**GGATCC**TGGCGTTAGCGCGATGTCGCAAAC-3′ and upgvpA.R 5′-GGATGCAATGTCGACCTCAATAGCCACGGACTTACCTCATGCGTTTC-3′, and dwgvpA.F 5′-GCTATTGAGGTCGACATTGCATCCTAACAACGATCCTGATCCTGAG-3′ and dwgvpA.R 5′-CC**GGGCCC**CGCGCCGGAGATCATCGATCTTG-3′ (the primers upgvpA.R and dwgvpA.F contain an overlapping sequence of 27 bp (underlined) to facilitate overlap extension PCR). The ligated product was amplified and introduced into the pJQ200-SK plasmid thanks to restriction sites designed in each primer (in bold). The 4.7-kb SalI *lacZ-kmR* cassette of pKOK5 was then inserted into the SalI site designed in the overlapping sequences of upgvpA.R and dwgvpA.F primers (in italic). These two constructions were introduced and delivered by conjugation into ORS278 strain as described (19).

Absorbance and Fluorescence Spectra Measurements—Absorbance and fluorescence spectra of purified *Br*BphP3.ORS278 were measured as previously described (17). Excitation light was provided by a Luxeon Star/O LXHL-NL98 light-emitting diode (590 nm, half-peak bandwidth 14 nm, 750 μE m^{-2} s^{-1}), a He-Ne laser (632.8 nm, 10 milliwatt), or a 24-V quartz lamp filtered through an interference filter (670 nm, 18-nm half-bandwidth).

Mathematical Treatment—Under steady-state illumination with a saturating intensity, the fractions of Pr and Po are as shown in Equation 1.

$$[\mathrm{Pr}] = \frac{\kappa_{or}}{\kappa_{or} + \kappa_{ro}} \quad [\mathrm{Po}] = \frac{\kappa_{ro}}{\kappa_{or} + \kappa_{ro}} \qquad \text{(Eq. 1)}$$

In this Equation, κ_{or} and κ_{ro} are the rate constants, under given illumination conditions, of the Po → Pr and Pr → Po photoconversions, respectively. Saturation requires that these photochemical rate constants are much greater than those for the dark relaxation, which can then be neglected. Expressing spectra as vectors (the *n*th component is the amplitude at the *n*th wavelength; in practice all our spectra were measured with a 1-nm interval), we denote as **Pr** and **Po** the spectra of the pure forms Pr and Po. The spectrum **Sm** of the sample under saturating illumination from some light source labeled *m*, as shown in Equation 2 is thus.

$$\mathbf{Sm} = [\mathrm{Pr}]\,\mathbf{Pr} + [\mathrm{Po}]\,\mathbf{Po} = \frac{\kappa_{or}^{m}}{\kappa_{or}^{m} + \kappa_{ro}^{m}}\mathbf{Pr} + \frac{\kappa_{ro}^{m}}{\kappa_{or}^{m} + \kappa_{ro}^{m}}\mathbf{Po} \qquad \text{(Eq. 2)}$$

In this expression, the rate constants κ_{or}^{m}, κ_{ro}^{m} are products of the number of photons absorbed per unit of time and of the probability (ρ_o or ρ_r, respectively) that absorption results in successful conversion to the other form. Denoting as **Zm** the spectrum radiated by source *m*, the absorption rates are the dot products **Zm·Pr** and **Zm·Po** and, as shown in Equation 3, one has the following.

[5] A. Vermeglio and E. Giraud, unpublished data.

$$\kappa_{or}^{m} = \rho_o \, \mathbf{Zm} \cdot \mathbf{Po} \quad \kappa_{ro}^{m} = \rho_r \, \mathbf{Zm} \cdot \mathbf{Pr} \qquad \text{(Eq. 3)}$$

Thus, as shown in Equation 4,

$$\mathbf{Sm} = \mathbf{Pr}\frac{\eta\,\mathbf{Zm}\cdot\mathbf{Po}}{\mathbf{Zm}\cdot\mathbf{Pr} + \eta\,\mathbf{Zm}\cdot\mathbf{Po}} + \mathbf{Po}\frac{\mathbf{Zm}\cdot\mathbf{Pr}}{\mathbf{Zm}\cdot\mathbf{Pr} + \eta\,\mathbf{Zm}\cdot\mathbf{Po}} \qquad \text{(Eq. 4)}$$

where $\eta = \rho_o/\rho_r$ is the ratio of the quantum efficiencies.

In the experiment illustrated by Fig. 5*A*, one measures three spectra, **S1**, **S2**, **S3**, corresponding to illumination by sources of known spectra, **Z1**, **Z2**, **Z3**. The **Pr** and **Po** spectra are unknowns to be determined, together with the ratio of quantum yields ρ. Three **Sm** spectra (at least) are necessary in this case, whereas if η were known, only two spectra would suffice. We have thus a system of three vector equations such as Equation 4, with $m = 1, 2, 3$. Because the **Sm** are linear combinations of **Pr** and **Po**, the latter are instances of the vector family as shown in Equation 5

$$\mathbf{V}(x) = \mathbf{S1} + x(\mathbf{S1} - \mathbf{S2}) \qquad \text{(Eq. 5)}$$

where x is a scalar. The choice of the particular vectors **S1** and **S2** out of the three **Sm** is arbitrary; in practice, it is reasonable to pick the two most different spectra. Now, considering Equation 5, there are two particular values of x, say x_o and x_r, for which $\mathbf{V}(x_o) = \mathbf{Po}$ and $\mathbf{V}(x_r) = \mathbf{Pr}$. One has thus a system of three vector equations to be solved for three scalar unknowns, x_o, x_r, and η. The generic equation is $\mathbf{Sm} - \mathbf{Sm}' = \mathbf{0}$ (a vector with norm 0), where $\mathbf{Sm}'$ is obtained from Equation 4, replacing **Po** and **Pr** by $\mathbf{V}(x_o)$ and $\mathbf{V}(x_r)$, respectively, as shown in Equation 6.

$$\mathbf{Sm}' = \mathbf{V}(x_r)\frac{\eta\,\mathbf{Zm}\cdot\mathbf{V}(x_o)}{\mathbf{Zm}\cdot\mathbf{V}(x) + \eta\,\mathbf{Zm}\cdot\mathbf{V}(x_o)} + \mathbf{V}(x_o)\frac{\mathbf{Zm}\cdot\mathbf{V}(x_r)}{\mathbf{Zm}\cdot\mathbf{V}(x_r) + \eta\,\mathbf{Zm}\cdot\mathbf{V}(x_o)} \qquad \text{(Eq. 6)}$$

Because the **S** and **Z** are (noisy) experimental spectra, we are not looking for an exact solution but rather for a non-linear least square procedure (*e.g.* Levenberg-Marquardt) minimizing the sum of Euclidian norms $N(x_o,x_r,\eta) = |\mathbf{S1} - \mathbf{S1}'| + |\mathbf{S2} - \mathbf{S2}'| + |\mathbf{S3} - \mathbf{S3}'|$. This is easily handled by the mathematical software Mathcad 12 from Mathsoft Inc.

RESULTS

BrBphP3.ORS278, a BphP Acquired by Horizontal Gene Transfer—The *BrBphP3* gene from strain ORS278 encodes a 620-amino acid protein that displays a weak identity (27%) with the Cph-like protein AphA from *Anabaena* sp. strain PCC 7120 and with the BphP from *Pseudomonas fluorescens* strain Pf-5. Prediction of the protein architecture using Pfam or Smart tools permits identification of a classical PCD with PAS-GAF-PHY subdomains, supporting its classification as phytochrome. However, unlike all the phytochromes described thus far, the C-terminal region is very short and displays no homology with any known functional domain (Fig. 1*A*). Furthermore, a phylogenetic analysis (Fig. 1*C*) using the GAF domain (or the entire PCD module, supplemental Fig. S1) indicates that this protein is distant from the five clades that constitute the phytochrome superfamily (6). All these data indicate an unorthodox character for *Br*BphP3.ORS278 and raise the question of its origin and function.

This is strengthened by the fact that the *BrBphP3.ORS278* gene is found in a region of ~91 kb that displays all the hallmarks of a horizontal acquisition island. Indeed, this region is characterized by an atypical G + C content (62.8% compared with the average value 65.4% of the genome), a tRNA insertion site, a distinct codon usage, and the presence of integrase and *tra* genes known to be involved in integration and conjugal transfer of DNA mobile elements, respectively. These features, together with the absence of a homologue gene in the closely related species (*Bradyrhizobium* sp. BTAi1, *B. japonicum*, or *Rps. palustris*), indicate that *BrBphP3.ORS278* was acquired by lateral gene transfer.

Other genes of interesting function are present in this genomic island at the vicinity of *BrBphP3.ORS278*: (i) a gene encoding a heme oxygenase designated *bphO*, (ii) a *pcyA* gene encoding a PCB ferredoxin oxidoreductase, and (iii) a *hemA* gene encoding a 5-aminolevulinate synthase, the first enzyme of the heme biosynthesis pathway (Fig. 1*B*). These proteins are key enzymes for the synthesis of PCB, the chromophore of Cphs. *BrBphP3.ORS278* is also flanked by genes encoding two putative regulatory proteins (a transcriptional factor of the LuxR family and an anti-anti-σ factor) (Fig. 1*B*). A cluster of *gvp* genes encoding gas vesicle proteins is also found in the same genomic island (Fig. 1*B*). Gas vesicles are widely distributed among prokaryotes from aquatic habitats; in particular, they enable cyanobacteria to float up toward the light (22).

BrBphP3.ORS278 Binds PCB as Chromophore—The presence of a *pcyA* gene in the vicinity of *BrBphP3.ORS278* is a strong clue that the native chromophore of *Br*BphP3.ORS278 is PCB. To test this hypothesis, we overproduced, in *E. coli*, recombinant *Br*BphP3.ORS278 proteins using two different constructs. In the first construct, the *BrBphP3.ORS278* gene was cloned in the pBAD-HisB expression vector and transformed in an *E. coli* strain containing the pPL-PCB plasmid. This plasmid, constructed by Gambetta and Lagarias (23), harbors *ho1* and *pcyA* from *Synecchocystis* sp. PCC6803 for the *in vivo* reconstitution of the holoCph1 with PCB as chromophore. In the second construct, the *bphO* and *pcyA* genes found at the vicinity of *BrBphP3.ORS278* were added to the previous pBAD-HisB::*BrBphP3.ORS278* plasmid together with synthetic ribosome binding sites to ensure their expression. Both *E. coli* strains produced large amounts of recombinant proteins. The corresponding purified proteins were blue and presented identical spectral properties (Fig. 2*B*), indicating that *pcyA* and *bphO* genes found in the genomic island are functional and that *Br*BphP3.ORS278 binds a bilin (*i.e.* PCB). To gain further evidence supporting that the *pcyA* gene is involved in the modification of the bilin, we cloned the same synthetic operon but omitted the *pcyA* gene. In this case, the corresponding *E. coli* cell pellet was light green and the holo-*Br*BphP3.ORS278 protein was expressed in low amount and as inclusion bodies (data not shown). This indicates that *Br*BphP3.ORS278 could bind either BV or PCB as a chromophore but that a correct conformational state for the protein is obtained only with PCB.

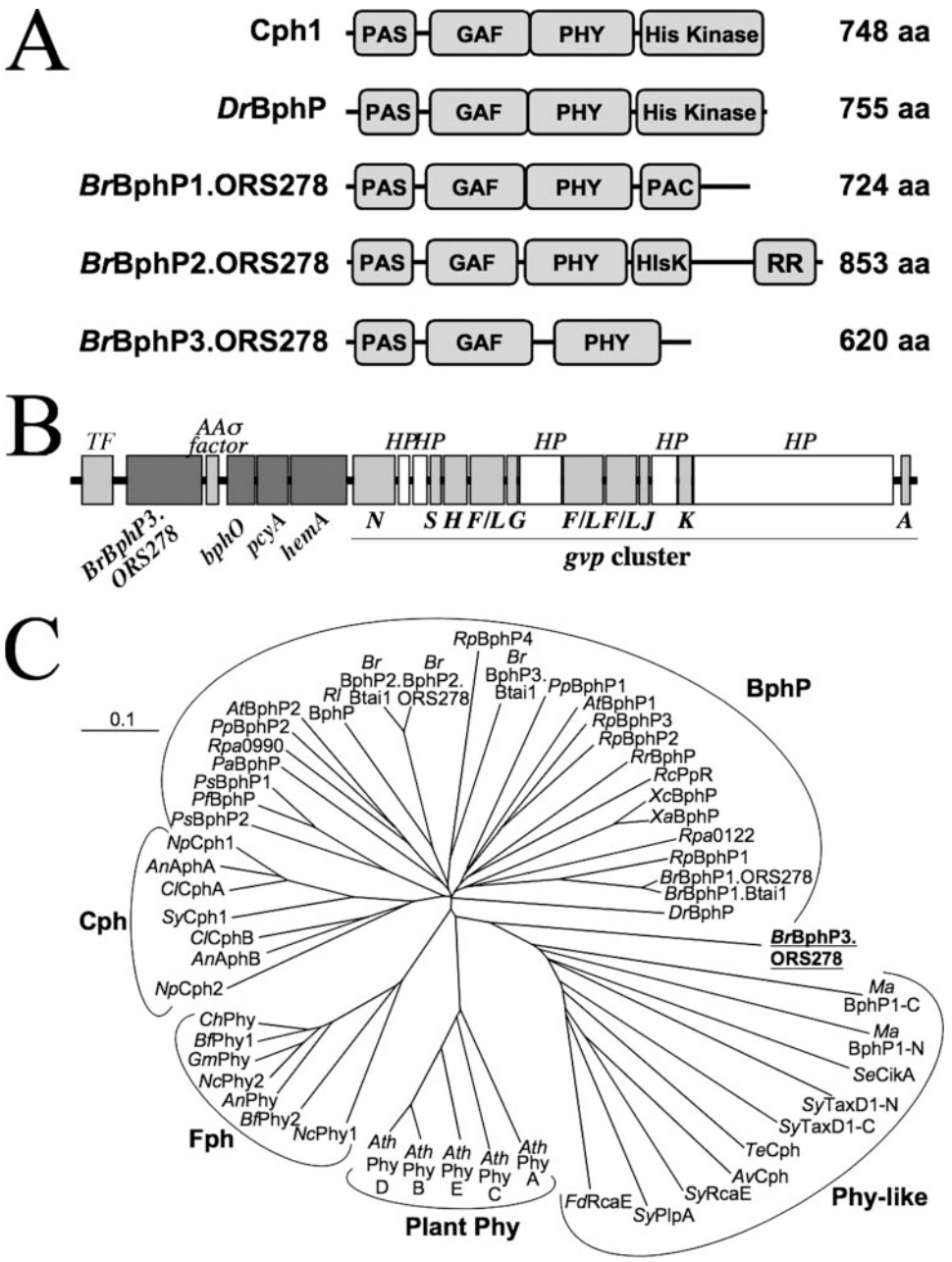


FIGURE 1. **Molecular characterization of *Br*BphP3.ORS278.** *A*, domain structures deduced from phytochrome sequences of Cph1 (*Synechocystis* PCC6803), *Dr*BphP (*D. radiodurans*), and *Br*BphP1,2,3.ORS278 (the three bacteriophytochromes present in *Bradyrhizobium* ORS278. *B*, arrangements of genes located around *BrBphP3*. ORS278. *AAσfactor*, anti-anti-σ factor; *TF*, transcriptional factor; *HP*, hypothetical protein; *gvp*, gas vesicle protein. All genes are transcript in the same direction except TF. *C*, phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily based on GAF domain alignment. The sequences were aligned by ClustalX and the tree, generated by the neighbor-joining method, was displayed using TreeView. *An*, *Aspergillus nidulans*; *Ana*, *Anabaena sp. PCC7120*; *At*, *Agrobacterium tumefaciens*; *Ath*, *Arabidospsis thaliana*; *Av*, *Anabaena variabilis*; *Bf*, *Botryotinia fuckeliana*; *Br*, *Bradyrhizobium sp.*; *Ch*, *Cochliobolus heterostrophus*; *Cl*, *Calothrix PCC7601*; *Dr*, *Deinococcus radiodurans*; *Fd*, *Fremyella diplosiphon*; *Gm*, *Gibberella moniliformis*; *Ma*, *Methanosarcina acetivorans*; *Nc*, *Neurospora crassa*; *Np*, *Nostoc punctiforme PCC 73102*; *Pa*, *Pseudomonas aeruginosa*; *Pf*, *Pseudomonas fluorescens ps-5*; *Pp*, *Pseudomonas putida*; *Ps*, *Pseudomonas syringae*; *Rc*, *Rhodospirillum centenum*; *Rl*, *Rhizobium leguminosarum*; *Rp or Rpa*, *Rps. Palustris*; *Rr*, *Rhodospirillum rubrum*; *Se*, *Synechococcus elongatus*; *Sy*, *Synechocystis sp. PCC 6803*; *Te*, *Thermosynechococcus elongatus*; *Xa*, *Xanthomonas axonopodis*; *Xc*, *Xanthomonas campestris*. *N* and *C* indicate GAF domain from N- and C-terminal extremity, respectively.

Because in phytochromes characterized thus far BV binds to a Cys located at the N-terminal extremity whereas PCB binds to a Cys located in the GAF domain (11, 12), we investigated the PCB binding site by mutating the Cys residues (Cys-7 and Cys-16) of the N-terminal region and the Cys residue (Cys-260) located in the GAF domain (Fig. 2*A*). Once purified, these three mutated proteins turned out to be colored (data not shown). However, as revealed by zinc-induced autofluorescence (Fig. 2*B*, *inset*), the C260S protein failed to bind PCB covalently, at variance with the other mutants. Thus, the covalent binding of *Br*BphP3.ORS278 chromophore implies specifically Cys-260, which is the attachment site of PCB in cyanobacterial phytochromes (12, 24). Altogether, these observations are strong indications that the native chromophore of *Br*BphP3.ORS278 is a PCB molecule.

BrBphP3.ORS278 Possesses Unusual Absorption Properties—The *Br*BphP3.ORS278 chromo-protein presents in its dark-adapted state two main absorption bands centered around 355 and 610 nm (Fig. 2*B*, *black line*). The latter lies at an atypically short wavelength for a PCB-containing chromo-protein whose Pr state usually peaks around 660 nm. We shall denote this dark-adapted form as Po, with "o" standing for orange. Upon illumination with 590 nm light (Fig. 2*B*, *red line*), a partial bleaching of the 610-nm band was observed, accompanied by the appearance of a long wavelength band ~670 nm, indicative of a red form denoted Pr. However, despite the relatively high illumination intensity used (500 μE m^{-2} s^{-1}), only a small fraction of the Po form was photo-transformed. This is due, as made clear below, to three reasons: (i) the speed of the back-reaction to the dark-adapted state, (ii) the spectral overlap between the Po and Pr forms, and (iii) their unequal photochemical efficiencies.

The occurrence of a fast back-reaction is illustrated in Fig. 3*A* showing the kinetics of the absorption changes at 670 nm during and after a 3-s pulse of 590 nm light of variable intensity. The half-time for the dark recovery is ~460 ms at 25 °C. This is several orders of magnitude faster than reported for any phytochrome or BphP studied so far, in which dark recoveries take place in time ranges spanning from minutes to days (15, 24). Fig. 3*B* shows a plot of the steady-state changes measured in *panel A*, as a function of the illumination intensity. The data are well

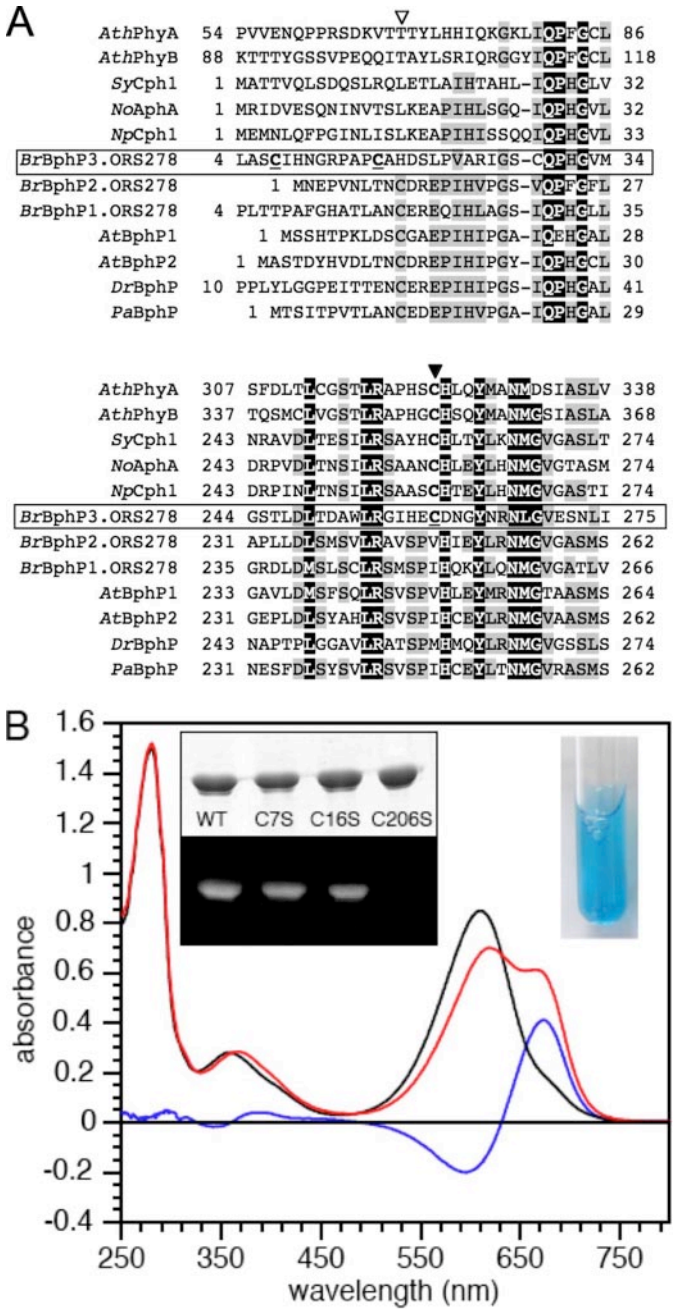


FIGURE 2. **Amino acid sequence alignment and absorption spectra of *Br*BphP3.ORS278.** *A*, amino acid sequence alignment of the N-terminal extremity and subregion of the GAF domain of various phytochromes. Conserved residues by more than 50 and 90% are highlighted in *gray* and *black*, respectively. *Open* and *closed triangles* indicate the Cys residue used as BV or PCB binding sites, respectively. *B*, absorption spectra of the dark-adapted state (*black line*) and under 590 nm illumination (*red line*) recorded at room temperature; the *blue* spectrum is the light-dark difference. *Inset*, picture of a sample of *Br*BphP3.ORS278. The covalent chromophore binding was visualized by zinc-induced fluorescence for the wild type and the single mutants C7S, C16S, and C260S (*lower part*). For the *upper part*, the gel was stained by Coomassie Blue.

fitted by the function expressing the competition between a photochemical process and a dark back-reaction. Even with the highest light intensity used in this experiment (666 μE m^{-2} s^{-1}), we still could not fully saturate the absorption change.

The temperature dependence of the dark recovery is examined in Fig. 3*C*, from 40 °C (where $t_{1/2} \sim 215$ ms) down to −11 °C ($t_{1/2} \sim 30$ s). The kinetics are roughly monoexponential. Assuming that Eyring's transition state theory is applicable to this process, one can estimate the enthalpy and entropy of the transition state P# (with respect to state Pr) from an Eyring's plot, ln(k/T) *versus* $1/T$ (Fig. 3*D*). The linear regression yields ΔH# ~ 15 kcal mol^{-1} and ΔS# = 7.6 cal mol^{-1} K^{-1}. We took advantage of the slower back-reaction at low temperature to demonstrate that, once formed, the Pr state can be photo-converted back to Po (Fig. 4). At the low temperature we used (−11 °C), a first illumination with 590 nm light induced the Pr form, which then returned slowly to Po in the dark. When the protein was submitted to a second illumination with 680 nm light preferentially absorbed by the Pr form, a fast increase of the 600-nm absorption was observed, expressing the formation of Po. *Br*BphP3.ORS278 presents therefore a photo-reversible shift between the Po and Pr forms and behaves, in this respect, like a "classical" (bacterio)phytochrome.

The Two Spectral Forms of BrBphP3.ORS278 and Their Dark Equilibrium—The dark-adapted *Br*BphP3.ORS278 is clearly predominantly in the Po form. Although this gives a good approximation for the Po spectrum, things are different for the other form because, as mentioned earlier, we have no way of obtaining a total photoconversion. We designed a procedure that allows the determination of the spectra of Po and Pr and also of the relative photoconversion efficiencies of the two forms. The mathematical aspects are described under "Experimental Procedures."

This procedure was applied to the data shown in Fig. 5*A*. The sample was equilibrated at 4 °C to slow down the decay to the dark-adapted state, thus facilitating light saturation, which was checked by using neutral density filters. The three experimental spectra (green) were obtained with illuminations centered either in the Po region, or close to the isosbestic wavelength, or in the Pr region (gray spectra). The orange and red spectra are those of the pure forms, **Po** (peaking at 613 nm) and **Pr** (peaking at 672 nm), resulting from the mathematical treatment of the data. Interestingly, for the ratio of quantum yields of the two forms, $\eta = \rho_o/\rho_r$, one obtains 0.31, meaning that the photoconversion efficiency of Pr to Po is ~3-fold larger than the reverse process. The reconstituted spectra **Sm′** (Equation 6) are superimposable to the corresponding experimental spectra. The solution is unique and well defined, both with respect to the **Po** and **Pr** spectra and to the relative yield η; in particular, the quality of the fit became clearly unacceptable when imposing equal efficiencies of the two forms ($\eta = 1$).

Effect of Temperature on the Dark Equilibrium between the Po and Pr Forms—Unexpectedly, we noticed a clear effect of temperature on the dark-adapted spectrum of *Br*BphP3.ORS278. When lowering the temperature, one observes an increase of the 670-nm band, accompanied by a decrease in the 610-nm region (Fig. 5*B*). This is suggestive of a temperature-dependent equilibrium between the Pr and Po forms. This view was confirmed by measuring the extents of the light-induced changes caused by a saturating illumination either in the Pr or Po band. When lowering the temperature, the extent of the Po → Pr photoconversion induced by 590 nm light decreased, while the extent of the Pr → Po photo-

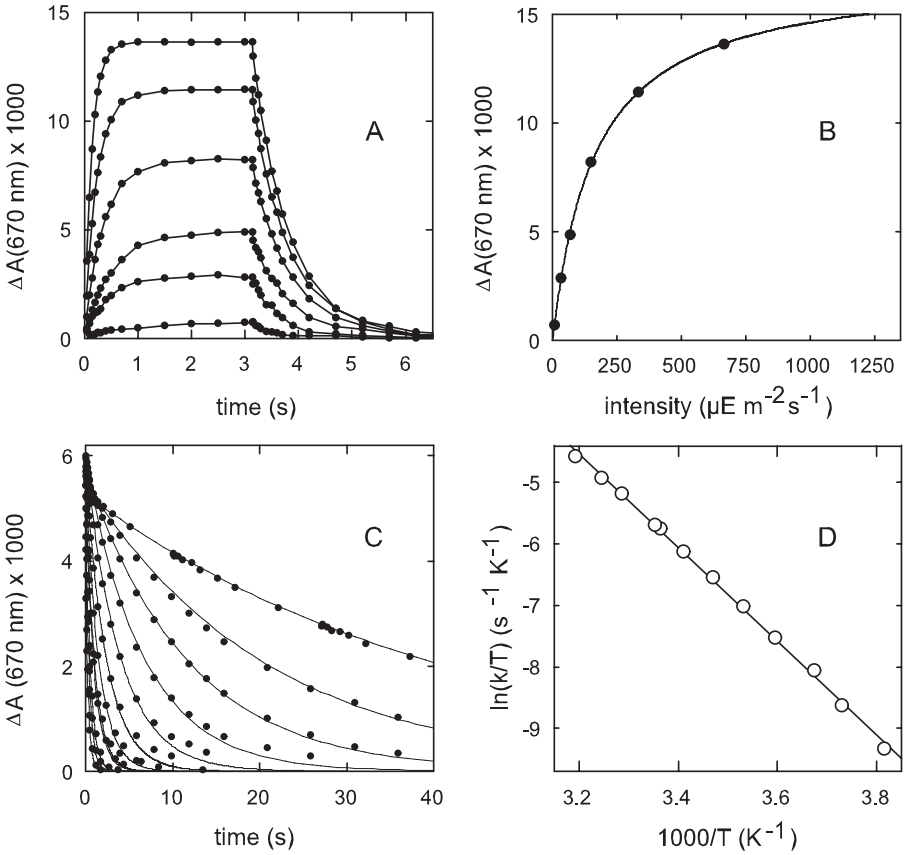


FIGURE 3. **Photoconversion of Po to Pr as a function of the illumination intensity and temperature dependence of the dark decay of Pr.** *A*, kinetics of the absorption changes at 670 nm during and after a light pulse of 3.14-s duration of 590 nm light at room temperature. The light intensity was varied (*bottom to top*) over a 1:100 range. *B*, a plot of the steady-state level reached during the illumination (from *panel A*) as a function of light intensity (*I*). The curve is a fit using the theoretical saturation function $A/(1 + I_{1/2}/I)$. The fitted value for the half-saturation intensity is $I_{1/2} = 163\ \mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$. *C*, kinetics of the dark recovery of the Pr state over a temperature range of −11 °C (slowest) to 40 °C (fastest). The lines are fits using a single exponential. *D*, an Eyring plot $\ln(k/T) = f(1/T)$, where *k* is the rate constant estimated from the fits in *panel C*. The *line* is a regression. The Eyring equation predicts that the slope is $-\Delta H\#/R$ and the intercept $= \ln(k_B/h) + \Delta S\#/R$ (k_B and *h* are Boltzmann and Plank constants, respectively). One obtains in this manner $\Delta H\# \sim 15$ kcal mol^{-1} and $\Delta S\# \sim -7.6$ cal mol^{-1} K^{-1}.

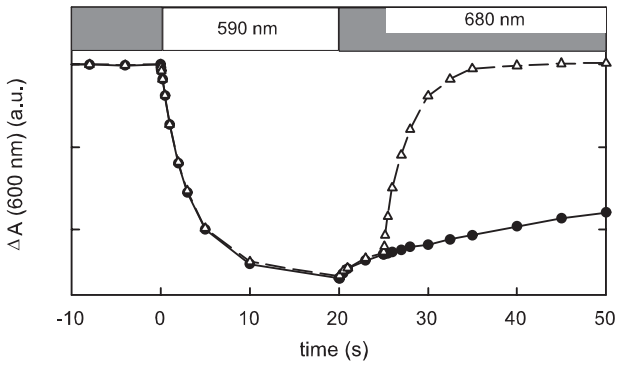


FIGURE 4. **Po to Pr and Pr to Po photoconversions.** A bleaching of the 600-nm absorption of Po is observed during the illumination pulse at 590 nm at −11 °C. The *solid trace* (*circles*) shows the slow dark return following this pulse. The *dashed line* (*triangles*) shows the accelerated restoration of Pr caused by a 680-nm illumination.

conversion induced by 680 nm light increased in a complementary way (not shown).

We used the calculated pure forms of **Po** and **Pr** (Fig. 5*A*) to estimate the fraction of both forms present in the dark, depending on temperature (data of Fig. 5*B*). A complication is that the Po spectrum becomes significantly shifted toward shorter wavelengths when increasing the temperature. The Pr spectrum, however, shows no significant shift with temperature (as seen from light-induced spectra; data not shown). We thus used the 680-nm region in the spectra of Fig. 5*B* to estimate the relative fractions of Po and Pr. The deduced equilibrium constant of the equilibrium in the dark varies from [Pr]/[Po] ~0.02 at 30 °C to ~0.27 at 0 °C. The theoretical dependence of K_{eq} on T is given by $K_{eq} = \exp(-\Delta H_0/RT + \Delta S_0/R)$, where ΔH_0 and ΔS_0 are the enthalpy and entropy differences, respectively, between Pr and Po. This relation predicts a linear dependence of $\ln(K_{eq})$ *versus* $1/T$ (van't Hoff plot) (Fig. 5*C*). The estimates of ΔH_0 and ΔS_0 obtained from the fit are but a rough approximation because of the limited T and K range. The decrease of K_{eq} when lowering T implies that the Pr form has both the lowest enthalpy and entropy, so that the stable form is Pr at low T and Po at high T. The temperature where the inversion occurs ($K_{eq} = 1$) is predicted around −12 °C.

Fluorescence Properties of BrBphP3.ORS278—Fig. 6*A* shows the excitation (*continuous line*) and emission (*dotted line*) spectra for a suspension of *Br*BphP3.ORS278 recorded at room temperature. The excitation spectrum is very similar to the absorption of the Po form of *Br*BphP3.ORS278, except that the long wavelength band peaks at slightly longer wavelength because of uncorrected instrumental distortion in the red part of the spectrum. A clear demonstration that the Po form is markedly more fluorescent than the photo-induced form Pr is exemplified by the light-induced fluorescence changes (Fig. 6*B*). These changes, recorded at 4 °C for a suspension of *Br*BphP3.ORS278 subjected to two 6-s pulses of 590 nm light, imply that the formation of state Pr induces an important decrease in the fluorescence yield. The fluorescence properties of *Br*BphP3.ORS278 do not support a simple identification of its light-induced state with the Pr state of classical phytochromes, despite the similar spectral position. In the latter, Pr is the fluorescent state, whereas the fluorescence is quenched in the far-red form, Pfr (25). In *Br*BphP3.ORS278 the Po form is fluorescent, whereas the light-induced Pr state emits no or little fluorescence. In this respect, *Br*BphP3.ORS278 behaves as other phytochromes, where the short wavelength form is the only fluorescent one.

Attempts to Determine the Role of BrBphP3.ORS278—Because of its localization at the vicinity of *gvp* genes,

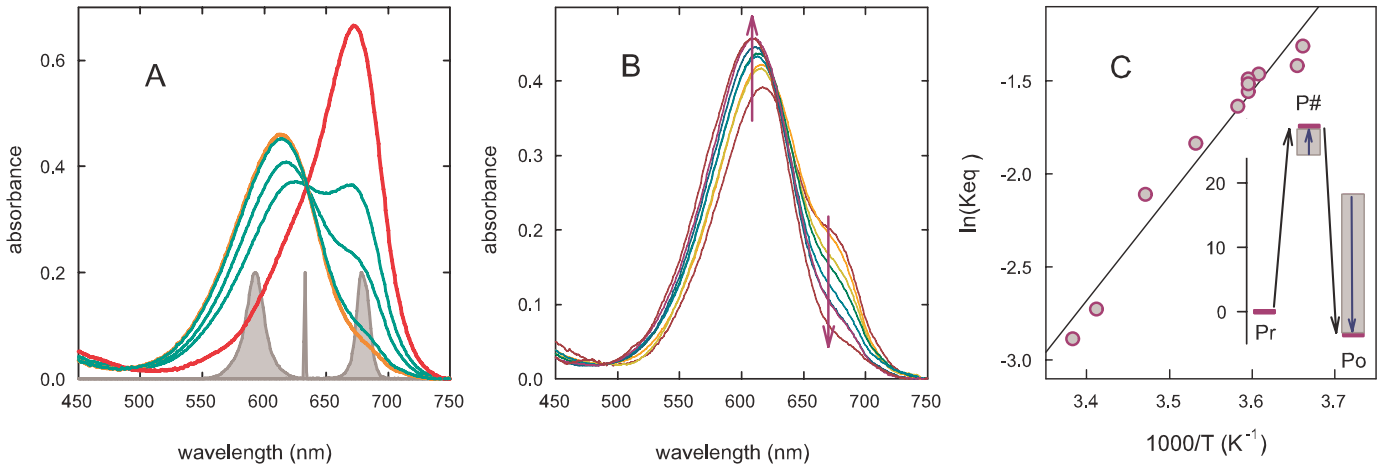


FIGURE 5. **Spectral deconvolution of the Po and Pr forms and temperature dependence of their dark equilibrium.** *A*, the three *green curves* are (from *smaller to larger* in the 600-nm region) the steady-state spectra recorded at 4 °C under saturating illuminations centered at 590, 633, and 680 nm, respectively. The spectral shapes of these illuminations are shown as *gray bands*. The *orange* and *red spectra* are those of the Po and Pr states computed as explained under "Experimental Procedures." *B*, spectra recorded from 0 to 35 °C (the *arrows* indicate the evolution when increasing *T*). *C*, a van't Hoff plot ln(K_{eq}) *versus* 1/*T*, where K_{eq} is the equilibrium constant [Pr]/[Po] in the dark-adapted state, determined from the contribution of the Pr form to the spectra in *panel B* in the 680-nm region. The *line* is a regression whose parameters correspond to $\Delta H_0 = -11$ kcal mol^{-1} and $\Delta S_0 = -43$ cal mol^{-1} K^{-1} (pertaining to the energy differences Pr − Po). The *inset* shows the free energy profile for the Pr → Po transition, compiling the present estimates of ΔH_0 and ΔS_0 with the information on the transition state P# obtained in Fig. 3*D*. The *gray squares* and *blue arrows* show the magnitude and direction of the entropic contribution $-T\Delta S$, for $T = 300$ K. The *vertical* scale is given in k_BT units.

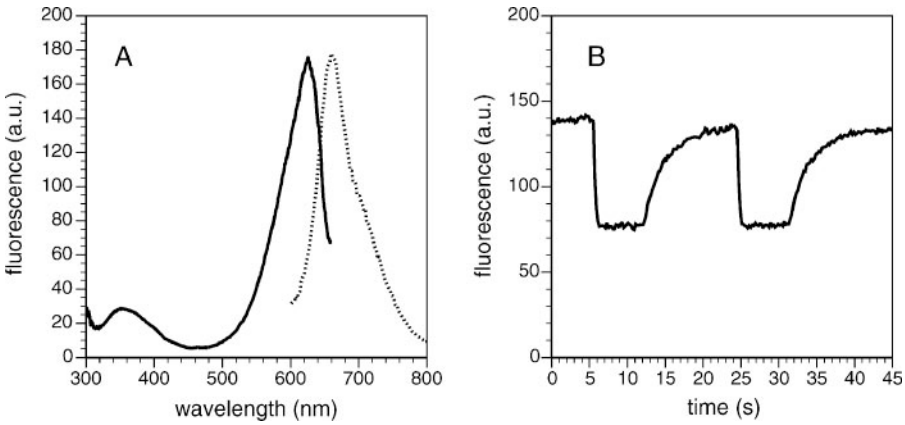


FIGURE 6. **Fluorescence properties of *Br*BphP3.ORS278.** *A*, excitation (*continuous line*) and emission (*dotted line*) for a suspension of *Br*BphP3.ORS278 at room temperature. For the excitation spectrum, the fluorescence was collected at 732 nm. Recording of the emission spectrum was performed under 355 nm excitation. *B*, light-induced fluorescence changes recorded at 4 °C for a suspension of *Br*BphP3.ORS278 subjected to two 6-s pulses of 590 nm light provided by a light-emitting diode.

*Br*BphP3.ORS278 might be involved in the control of the synthesis of gas vesicles. The photosynthetic activity of *Bradyrhizobium* ORS278 requires both light and strictly aerobic conditions, a particularity shared with the aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria (18). One possibility is therefore that *Br*BphP3.ORS278 is involved in the regulation of gas vesicle synthesis by allowing the bacteria to reach the appropriate ecological niche in oxygen tension and light intensity for optimal growth. Such a situation is encountered in *Halobacteria*, for example, where the synthesis of gas vesicles is known to be under the control of various environmental factors, including light and oxygen tension (26, 27). Several attempts were made to test such a hypothesis by cultivating *Bradyrhizobium* ORS278 with various growth media and under different light conditions and/or oxygen tension. However, in all these assays we failed to reveal a buoyancy phenotype. We also constructed deletion mutants in *Br*BphP3.ORS278 and *gvpA* and examined their phenotypes under various growth conditions. No obvious differences could be observed between the wild type and the mutants concerning, for example, growth rate, photosynthetic activity, etc. Similarly, the use of a *lacZ* reporter gene did not permit identification of specific conditions for which *gvpA* is expressed. In contrast, a low but significant β-galactosidase activity (~50 Miller units), similar to those observed for different *BphP* genes of *Rps. palustris*,[6] was observed for the various conditions tested, indicating that *BrBphP3.ORS278* is constitutively expressed.

DISCUSSION

We have described the properties of a new type of bacteriophytochrome present in the photosynthetic strain *Bradyrhizobium* sp. ORS278. Its gene is located in a horizontally acquired genomic island that displays hallmarks suggestive of recent gene transfer. To our knowledge this is the first clear evidence for the acquisition of a phytochrome gene by a prokaryote through lateral transfer. The presence of a *pcyA* gene, identified thus far only in cyanobacteria (28), may appear as a strong clue for a cyanobacterial origin of this genomic island. However, phylogenetic analyses (Fig. 1*C* and supplemental Fig. S1) indicate that this protein is distant from the five clades of the phytochrome superfamily, including Cphs (6). In addition, phylogenetic analysis using other genes (*bphO*, *hemA*, and *gvpA*)

[6] E. Giraud, unpublished results.

identified in this island does not reveal any obvious relationship either with the cyanobacteria phylum or another bacterial phylum (supplemental Figs. S2–S4). As a whole, these results do not confirm a cyanobacterial source for this genomic island and leave open the question of its origin.

Despite the co-localization of *BrBphP3.ORS278* and *gvpA* genes in this genomic island, we could not establish a functional relationship between them. The *gvp* genes are likely to be functional because they are not fragmented as is often found for remnant genes. The absence of gas vesicle synthesis in our various assays may therefore reflect the intrinsic difficulty of reconstituting the physiological conditions where this function is activated. Indeed, such a difficulty is not unprecedented: in *Bacillus megaterium*, all the genes necessary for the synthesis of gas vesicles are functional when expressed in *E. coli* but nevertheless they have not been observed in this species (29).

*Br*BphP3.ORS278 has unique features among all members of the phytochrome superfamily studied thus far: (i) the short wavelength of its dark-adapted form Po, (ii) its very fast recovery to the stable state after illumination, (iii) the temperature dependence of the dark equilibrium between its two spectral forms, and (iv) no homology with any known functional domain for its C-terminal part. One may, however, consider *Br*BphP3.ORS278 as a *bona fide* phytochrome because it presents a clear photo-reversible conversion between two distinct states (Fig. 4). The two genes encoding putative regulatory proteins found at the vicinity of *BrBphP3.ORS278* are possibly involved in the light signal transduction pathway. This may represent a new type of mechanism because the C-terminal region does not possess a "classical" output module.

Although zinc-induced autofluorescence clearly demonstrated that PCB is covalently bound via Cys-260, the absorption spectrum of the stable Po form resembles that of the free PCB (Fig. 5*A*). This may be related to the free energy profile emerging from the present study (Fig. 5*C*), which throws an interesting light on the unusual spectral properties of this BphP. The Po state is massively stabilized by a large entropic contribution. The entropy of the Po form implies a somewhat disordered structure of the protein, which would suggest that the chromophore is subjected to little constraints. This may account for its solution-like spectrum, *i.e.* possibly for a C15-Z,*syn* conformation. On the other hand, the absorption spectrum of the light-induced form resembles that of the Pr form of BphPs (Fig. 5*A*), where the chromophore has been shown to be in the C15-Z,*anti* conformation (30). One should note, however, that besides the isomerization structure, the protonation state of the chromophore is also predicted to have a strong effect on the spectral properties (31). Furthermore, the fluorescence properties of *Br*BphP3.ORS278 do not support a simple identification of its light-induced state with the Pr state of classical phytochromes. Indeed, we observed (Fig. 6) that the Po form of *Br*BphP3.ORS278 was fluorescent, whereas the fluorescence from the light-induced Pr state was undetectable. Therefore, despite the spectral similarity, the Pr form of *Br*BphP3.ORS278 differs from the "classical" Pr state of phytochromes, which is fluorescent.

A high light intensity is required to photoconvert a significant amount of *Br*BphP3.ORS278 (Fig. 3*B*). As previously mentioned, this is because of the fast back-reaction, of the spectral overlap between the two Po and Pr forms, and of the higher quantum yield of photoconversion of the Pr form with respect to the Po form. These features make the Po/Pr composition of the steady state reached in the light very dependent on the intensity, precisely in the range expected for physiological illumination conditions. The half-saturation occurs around 160 μE m^{-2} s^{-1}, to be compared with the full intensity sunlight ($\sim$2,000 μE m^{-2}s^{-1}) where *Br*BphP3.ORS278 would be 92% saturated. From this property, we surmise that *Br*BphP3.ORS278 evolved as sensor of light intensity rather than light color, at variance with the (bacterio)phytochromes characterized thus far.

In conclusion, we have presented evidence showing that *Bradyrhizobium* sp. ORS278 acquired by lateral gene transfer a new type of bacteriophytochrome. The unusual properties of *Br*BphP3.ORS278, in particular its capability of measuring light intensity and its extended absorption range toward short wavelengths, reveal a remarkable adaptability for this family of sensors. This discovery is an additional demonstration of the high diversity among the phytochrome superfamily. In the prospect opened by Wagner and *et al.* (7) it is to be hoped that the resolution of three-dimensional structures of different chromo-proteins of the phytochrome superfamily will throw light on the molecular basis for this photochemical diversity.

REFERENCES

1. Quail, P. H., Boylan, M. T., Parks, B. M., Short, T. W., Xu, Y., and Wagner, D. (1995) *Science* **268,** 675–680
2. Smith, H. (2000) *Nature* **407,** 585–591
3. Rockwell, N. C., Su, Y. S., and Lagarias, J. C. (2006) *Annu. Rev. Plant Biol.* **57,** 837–858
4. Hughes, J., Lamparter, T., Mittmann, F., Hartmann, E., Gärtner, W., Wilde, A., and Börner, T. (1997) *Nature* **386,** 663
5. Davis, S. J., Vener, A. V., and Vierstra, R. D. (1999) *Science* **286,** 2517–2520
6. Karniol, B., Wagner, J. R., Walker, J. M., and Vierstra, R. D. (2005) *Biochem. J.* **392,** 103–116
7. Wagner, J. R., Brunzelle, J. S., Forest, K. T., and Vierstra, R. D. (2005) *Nature* **438,** 325–331
8. Evans, K., Grossmann, G., Fordham-Skelton, A. P., and Papiz, M. Z. (2006) *J. Mol. Biol.* **364,** 655–666
9. Bhoo, S. H., Davis, S. J., Walker, J., Karniol, B., and Vierstra, R. D. (2001) *Nature* **414,** 776–779
10. Frankenberg, N., Mukougawa, K., Kohchi, T., and Lagarias, J. C. (2001) *Plant Cell* **13,** 965–978
11. Lamparter, T., Carrascal, M., Michael, N., Martinez, E., Rottwinkel, G., and Abian, J. (2004) *Biochemistry* **43,** 3659–3669
12. Lamparter, T. (2004) *FEBS Lett.* **573,** 1–5
13. Froehlich, A. C., Noh, B., Vierstra, R. D., Loros, J., and Dunlap, J. C. (2005) *Eukaryot. Cell* **4,** 2140–2152
14. Yeh, K. C., Wu, S. H., Murphy, J. T., and Lagarias, J. C. (1997) *Science* **277,** 1505–1508
15. Karniol, B., and Vierstra, R. D. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100,** 2807–2812
16. Giraud, E., Fardoux, J., Fournier, N., Hannibal, L., Genty, B., Bouyer, P., Dreyfus, B., and Verméglio, A. (2002) *Nature* **417,** 202–205
17. Giraud, E., Zappa, S., Vuillet, L., Adriano, J.-M., Hannibal, L., Fardoux, J., Berthomieu, C., Bouyer, P., Pignol, D., and Verméglio, A. (2005) *J. Biol. Chem.* **280,** 32389–32397
18. Giraud, E., and Fleischman, D. (2004) *Photosynth. Res.* **82,** 115–130
19. Giraud, E., Hannibal, L., Fardoux, J., Verméglio, A., and Dreyfus, B. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97,** 14795–14800

20. Quandt, J., and Hynes, M. F. (1993) *Gene* **127,** 15–21
21. Kokotek, W., and Lotz, W. (1989) *Gene* **84,** 467–471
22. Walsby, A. E. (1994) *Microbiol. Rev.* **58,** 94–114
23. Gambetta, G. A., and Lagarias, J. C. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98,** 10566–10571
24. Lamparter, T., Michael, N., Mittmann, F., and Esteban, B. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99,** 11628–11633
25. Sineshchekov, V. A. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1228,** 125–164
26. Pfeifer, F., Gregor, D., Hofacker, A., Plosser, P., and Zimmermann, P. (2002) *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **4,** 175–181
27. Damerval, T., Guglielmi, G., Houmard, J., and Tandeau de Marsac, N. (1991) *Plant Cell* **3,** 191–201
28. Frankenberg, N., and Lagarias, J. C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278,** 9219–9226
29. Li, N., and Cannon, M. C. (1998) *J. Bacteriol.* **180,** 2450–2458
30. Inomata, K., Hammam, M. A. S., Kinoshita, H., Murata, Y., Khawn, H., Noack, S., Michael, N., and Lamparter, T. (2005) *J. Biol. Chem.* **280,** 24491–24497
31. Göller, A., Strehlow, D., and Hermann, G. (2005) *ChemPhysChem.* **6,** 1259–1268

Chapitre - 3 -

Conclusions et Perspectives

Conclusions et perspectives

Les bactéries pourpres photosynthétiques ont la capacité de se développer grâce à l'énergie lumineuse. Cependant afin d'éviter les effets délétères des espèces réactives d'oxygène générées par la lumière, une régulation fine du métabolisme photosynthétique de ces bactéries est nécessaire. Cette régulation tient compte à la fois de la concentration en oxygène ainsi que de la qualité et de l'intensité de la lumière et fait intervenir de nombreuses protéines, senseurs des conditions environnementales. Parmi ceux-ci, les phytochromes, une famille de chromoprotéines sensibles à la lumière rouge et infra-rouge, jouent un rôle essentiel dans la mise en place du photosystème chez certaines bactéries pourpres (*Rps. palustris* et *Bradyrhizobium*), (Giraud *et al.,* 2002).

Jusqu'alors considérés comme spécifiques du règne végétal, la multiplication récente du nombre de séquençages de génomes bactériens a révélé, ces dernières années, l'importance des bactériophytochromes chez ces organismes unicellulaires. Cependant peu d'études ont permis de mettre en évidence leurs fonctions au sein des bactéries. En 2004, le séquençage de la souche CGA009 de *Rps. palustris* a révélé la présence inattendue de 6 gènes codant des bactériophytochromes, laissant penser que la lumière pouvait jouer un rôle primordial dans la régulation du métabolisme de cet organisme. Cette profusion de bactériophytochromes chez un organisme unicellulaire avait de quoi nous étonner. En effet *Arabidopsis thaliana,* la plante modèle, ne possède que 5 phytochromes. Quel peut être l'intérêt pour la bactérie de posséder ces 6 BphPs et quels peuvent être leur(s) rôle(s) au sein de la bactérie ? Ces bactériophytochromes sont-ils différents ou au contraire présentent-ils tous les mêmes propriétés spectrales ? sont-ils impliqués dans différents circuits régulatoires ou bien agissent–ils de concert pour réguler les mêmes fonctions ? Afin de répondre à ces différentes questions Eric Giraud du LSTM et André Verméglio du Laboratoire de Bioénergétique Cellulaire du CEA de Cadarache ont lancé un projet de recherche sur ces 6 protéines. Quatre de ces bactériophytochromes, *Rp*BphP1, *Rp*BphP2, *Rp*BphP3 et *Rp*BphP4, sont retrouvés sur le génome de 4 autres souches de *Rps. palustris* récemment séquencées (HaA2, BisB5, BisB18, BisA53). Il pourrait donc s'agir de bactériophytochromes essentiels au métabolisme de ces bactéries tandis que les deux autres BphPs, *Rp*BphP5 et *Rp*BphP6, spécifiques aux souches CGA009 et CEA001, pourraient ne jouer qu'un rôle accessoire. Les études que Mila Kojadinovic a menées sur *Rp*BphP1 et celles que j'ai réalisées sur *Rp*BphP2, *Rp*BphP3 et *Rp*BphP4 ont permis d'éclaircir les modes de fonctionnement et les niveaux d'action plus ou moins essentiels de ces différents bactériophytochromes.

_Rp_BphP1 : rôle central dans le contrôle du métabolisme énergétique de la cellule.

Ce bactériophytochrome a été identifié chez *Rps. palustris* et *Bradyrhizobium* ORS278. Chez ces deux bactéries, le gène codant ce BphP est retrouvé au sein du cluster de gènes photosynthétiques (PGC). Les études menées en collaboration avec le LBC ont montré que ce bactériophytochrome existe sous deux conformations classiques Pr et Pfr. Cependant, contrairement à la majorité des bactériophytochromes, il ne présente pas de domaine histidine-kinase à son extrémité C-terminale mais un domaine PAS/PAC pouvant intervenir dans des interactions protéine-protéine. Des études menées précédemment dans l'équipe ont montré que *Rp*BphP1 est actif sous sa forme Pr, obtenue par un éclairement à 770 nm. Dans ces conditions il peut activer la synthèse des opérons *bch*, *crt* et *puf* et permettre ainsi la synthèse du photosystème. De plus, des études très récentes menées par Mila Kojadinovic au LBC durant sa thèse ont permis de mettre en évidence le rôle du bactériophytochrome *Rp*BphP1 dans l'inhibition de l'activité respiratoire chez *Rps. Palustris* (Kojadinovic *et al.,* 2007).

*Rp*BphP1 régulerait ainsi le passage du métabolisme « respiration » au métabolisme « photosynthèse » en fonction de la lumière. Dans ce schéma de régulation, il a été montré que la protéine PpsR2, dont le gène est situé dans le PGC, jouerait un rôle primordial. En effet cette protéine est d'une part capable d'inhiber la synthèse du photosystème en empêchant la transcription des gènes photosynthétiques mais elle est également capable d'activer la transcription du gène *sucA* codant la petite sous-unité du complexe α-cétoglutarate déshydrogénase impliqué dans le cycle de Krebs. *Rp*BphP1 aurait un effet antagoniste à celui de PpsR2 vraisemblablement en interagissant avec ce dernier, l'empêchant de ce fait d'inhiber la synthèse du PGC et d'activer la synthèse du gène *sucA*. Ainsi nous pouvons noter le rôle central du bactériophytochrome *Rp*BphP1 qui régule, lors d'un éclairement à 770 nm, les 2 principales voies énergétiques (photosynthèse et respiration) chez *Rps. palustris via* PpsR2.

Cependant, contrairement à ce qui a été montré pour l'interaction AppA-PpsR chez *Rhodobacter sphaeroides* (Masuda & Bauer, 2002), aucune interaction directe *Rp*BphP1/PpsR2 n'a pu être mise en évidence malgré les nombreuses expérimentations réalisées par Marianne Jaubert, David Pignol ou Mila Kojadinovic. Ces difficultés peuvent résulter de l'instabilité du complexe *Rp*BphP1-PpsR2 qui demanderait le maintien du bactériophytochrome sous sa forme Pr, ce qui nécessite un éclairement en continu à 770 nm tout au long de l'expérimentation. Nous pouvons également supposer que cette interaction n'est pas directe entre les deux protéines mais qu'elle ferait intervenir d'autres partenaires.

Parmi les candidats possibles notons l'implication principale de 2 régulateurs : AerR d'une part et PpsR1, sensible au potentiel redox d'autre part. Si chez B*radyrhizobium* ORS278, PpsR1 est un activateur de la synthèse du photosystème, il présente un rôle plus ambigu chez *Rps. palustris*. En effet, chez cette bactérie, il possède la capacité, à la fois, de réprimer l'expression de certains gènes photosynthétiques (*bch, crt, puf*) et d'activer la synthèse des antennes LH2 (Cf. chapitre III.3, Kojadinovic *et al.,* 2007). Par ailleurs, PpsR1 pourrait également être impliqué dans l'activation du métabolisme respiratoire (Kojadinovic *et al.,* 2007) .

Afin de déterminer si AerR et PpsR1 pourraient être impliqués directement dans le duo *Rp*BphP1/PpsR2 il serait intéressant de tenter de nouvelles expériences d'immuno-coprécipitation. De plus, l'étude de l'effet de la lumière *via Rp*BphP1 sur leur fixation en complexe au niveau des régions promotrices du PGC par des tests d'empreintes à la DNAse sous lumière pourrait être envisagée. Cependant, il sera nécessaire pour initier ce type d'expérimentation de surmonter les obstacles précédemment rencontrés empêchant la purification de ces 2 protéines.

_Rp_BphP2 et _Rp_BphP3 : un tandem qui contrôle la synthèse des antennes LH4.

Dans un premier temps, nous avons étudié les bactériophytochromes *Rp*BphP2 et *Rp*BphP3 dont les gènes ont la particularité unique d'être retrouvés en tandem sur le génome. Il a été montré que ces deux bactériophytochromes régulent l'expression des antennes LH4 codées par l'opéron *pucBA.d,* situé à proximité des gènes *RpBphP2* et *RpBphP3*. L'étude des propriétés spectrales de ces deux bactériophytochromes a révélé que si *Rp*BphP2 présente les deux conformations Pr et Pfr habituelles, *Rp*BphP3 présente une forme Pr classique et une forme Pnr inhabituelle absorbant à plus courtes longueurs d'onde. Bien que cela soit très spéculatif, nous supposons que l'action en tandem de 2 bactériophytochromes présentant de telles différences spectrales constitue un moyen pour mesurer l'intensité relative à 645 et 710 nm. Nous émettons aussi l'hypothèse que la mesure de ce ratio permettrait à la bactérie de détecter la présence de phytoplancton dans son environnement. Dans ces conditions les bactéries photosynthétiques qui se développent sous des couches plus ou moins épaisses de cyanobactéries ne perçoivent que la lumière infra-rouge. Pour suppléer à cette faible luminosité, *Rps. palustris* activerait la synthèse des antennes LH4, plus performantes que les antennes de types LH2 pour capter l'énergie lumineuse.

Nous avons montré que ces deux bactériophytochromes initient une voie de signalisation très complexe qui fait intervenir 3 autres partenaires Rpa3017, Rpa3018 et Rpa3014 (facteur de transcription). Les résultats des tests de phosphorylation nous laissent supposer que cette voie de signalisation ferait intervenir non pas un phosphorelais mais plutôt 2 systèmes à 2 composants. Le premier, induit par la lumière, est initié par les bactériophytochromes et permet un phosphotransfert vers deux RR Rpa3017 et Rpa3018. Si le rôle de Rpa3017 reste encore inconnu dans cette voie de signalisation celui de Rpa3018 semble plus clair. Ce régulateur de réponse, sensible au potentiel redox, initie un second système à deux composants. En conditions réductrices, Rpa3018 s'autophosphoryle puis un phosphotransfert est réalisé entre Rpa3018 et Rpa3014. Nous avons enfin montré que ce dernier se fixe sur la région promotrice de l'opéron *pucBA.d* qui code les antennes périphériques de type LH4. De plus, des expériences *in vivo* ont montré que les protéines Rpa3017, Rpa3018 et Rpa014 jouent un rôle activateur sur la transcription de l'opéron *pucBA.d.*

Il apparaît que la régulation des antennes LH4 est extrêmement complexe car elle fait intervenir (i) la lumière au niveau de DEUX bactériophytochromes et (ii) le potentiel redox au niveau de Rpa3018. Pourquoi une telle complexité dans la régulation de la synthèse des antennes LH4 ? Celle-ci pourrait s'expliquer par le fait que ces antennes sont plus efficaces dans le transfert de l'énergie lumineuse. En effet, la mise en place de ces antennes en présence d'oxygène pourrait avoir un effet très néfaste pour la cellule (génération de nombreuses espèces réactives d'oxygène), de ce fait la synthèse de ces antennes périphériques doit être rigoureusement régulée.

Cette régulation des antennes LH4 semble faire intervenir à la fois un contrôle de la lumière et un contrôle par le potentiel redox. Il semblerait que l'intégration de ce deux signaux se fasse au niveau de la protéine Rpa3018 qui de se fait jouerait un rôle central dans la régulation de ces antennes. Cependant afin de comprendre comment cette intégration de signaux multiples peut avoir lieu, des expériences de phosphorylation devront être réalisées afin d'étudier l'effet de la phosphorylation par les 2 BphPs du domaine RR de Rpa3018 sur la capacité de cette protéine à s'autophosphoryler en conditions réductrices. Des études complémentaires visant à détecter le site de fixation de Rpa3014 sont à envisager afin de savoir si ce facteur de transcription régule spécifiquement ces antennes où s'il est également capable de contrôler d'autres gènes. Le RR Rpa3017 semble jouer également un rôle essentiel dans la régulation des antennes LH4. Mais comment intervient exactement cette protéine

constituée d'un seul domaine RR ? Des études complémentaires devront être menées afin de comprendre sa fonction précise dans cette chaîne de régulation.

Enfin, un dernier élément non élucidé pour l'instant est le fait qu'en anaérobiose, la synthèse des antennes LH4 dépend de l'intensité lumineuse. Dans ces conditions, il est admis que l'hème oxygénase, privée d'oxygène ne peut pas synthétiser de chromophore. Ainsi les apoprotéines correspondant aux bactériophytochromes sans chromophore sont supposées être inactives. La mise en évidence d'un effet lumière en anaérobiose suppose :

- soit que les *Rp*BphP2 et *Rp*BphP3 demeurent fonctionnelles (capacité des apoprotéines à s'autophosphoryler et à percevoir l'intensité lumineuse *via* un autre co-facteur ou existence d'une autre voie alternative de synthèse de la biliverdine en anaérobiose)
- soit que la lumière pourrait influer sur le niveau d'oxydoréduction du pool de quinones auquel Rpa3018 pourrait être sensible.

Afin d'améliorer la compréhension que nous avons de la régulation des antennes LH4 par les bactériophytochromes *Rp*BphP2 et *Rp*BphP3, de nombreuses expériences de phosphorylation sur les différents partenaires et les apoprotéines ainsi que des analyses *in vivo* des différents mutants devront être poursuivies.

_Rp_BphP4 : une protéine sensible au potentiel redox ou à la lumière impliquée dans la synthèse des antennes LH2.

Lors de ce travail de thèse nous avons montré que le gène *RpBphP4* est retrouvé chez la plupart des souches de *Rps. palustris*. Cependant si la protéine correspondante est liée phylogénétiquement aux bactériophytochromes, chez certaines souches, elle se démarque des autres BphPs par son incapacité à fixer la biliverdine et par sa sensibilité au potentiel redox. Nous avons montré que malgré ce changement du stimulus ressenti (potentiel redox et non plus lumière), la voie de signalisation ainsi que les gènes régulés sont, eux, restés identiques. Il est intéressant de noter que la variation de quelques acides aminés, en particulier des résidus de cystéine, a permis de passer d'un senseur de lumière à un senseur du potentiel redox, suggérant une grande plasticité de ces protéines.

En fonction des souches étudiées, la protéine *Rp*BphP4 s'autophosphoryle en conditions réductrices ou sous sa forme Pfr. Un phosphotransfert vers le facteur de transcription Rpa1489 est alors possible permettant à ce dernier de se fixer sur la région promotrice des promoteurs *pucBA.b* et *.e via* un site de fixation spécifique :

TGTCCGN$_8$CGGACA. Ce site de fixation n'a pas été retrouvé ailleurs sur le génome de CGA009, cela suggère donc que ce facteur de transcription régule spécifiquement la synthèse des antennes de type LH2. Cependant un site de fixation PpsR est également retrouvé au niveau de ces régions promotrices ce qui suggère que les protéines PpsR1 et PpsR2 sont sûrement impliquées dans la régulation de la synthèse de ces antennes. En accord avec cette hypothèse, des tests *in vitro* ont mis en évidence la capacité de PpsR2 à se fixer sur ces régions promotrices et le phénotype d'un mutant PpsR1 fortement réprimé dans la synthèse des antennes LH2.

Ainsi selon les souches étudiées, les antennes LH2 sont régulées soit par la lumière soit par l'oxygène *via* un système à deux composants selon un schéma de régulation plus simple que celui impliqué dans la synthèse des antennes LH4. On peut se demander ce qui a provoqué ce changement de sensibilité. Il est probable que les souches de *Rps. palustris* ayant subi ce changement en aient tiré un avantage certain dans l'environnement où elles se trouvaient. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait particulièrement intéressant d'étudier à nouveau, sur une base beaucoup plus large, la diversité du gène *Rp*BphP4 et de croiser celle-ci avec les différents types de niches écologiques à partir desquelles ces bactéries auront été isolées. Cela nous permettrait de déterminer s'il existe une véritable corrélation entre le changement de stimulus (potentiel redox ou lumière) et les conditions environnementales pouvant être à l'origine de cette divergence. Dans tous les cas, cette évolution de la nature du signal perçu par la protéine *Rp*BphP4 nous rappelle que les régulations par la lumière et par l'oxygène sont prédominantes et étroitement liées dans le cadre de la photosynthèse.

Action concertée de ces 4 bactériophytochromes dans le contrôle du photosystème.

Les études que nous avons menées sur ces différents bactériophytochromes révèlent une grande complexité de chacune des voies de signalisation qui peut faire intervenir de nombreux partenaires. Cependant, cette régulation de chaque complexe photosynthétique (CR-LH1, LH2 et LH4) peut être encore plus fine si on tient compte des régulations croisées qui peuvent intervenir.

En effet, nous avons montré que le complexe CR-LH1 était régulé par le bactériophytochrome *Rp*BphP1 et par PpsR1 et PpsR2 et qu'ainsi le photosystème était contrôlé à la fois par la lumière et par la concentration en oxygène. De plus une co-régulation existe entre la photosynthèse et l'activité respiratoire *via Rp*BphP1 qui présente des effets antagonistes sur ces deux voies énergétiques. En effet, *Rp*BphP1 *via* PpsR2 favorise la synthèse du photosystème tout en inhibant en parallèle l'activité respiratoire.

Nous avons également montré que les antennes LH2 étaient régulées par la protéine *Rp*BphP4 mais également par les 2 protéines PpsR. Ainsi le bactériophytochrome *Rp*BphP1, *via* sa probable interaction avec PpsR2, pourrait réguler la synthèse des antennes LH2 en même temps que celle du CR-LH1. *A priori* une telle co-régulation semble logique dans la mesure où les antennes LH2 ne sont utiles que si le complexe CR-LH1 est mis en place.

Par ailleurs, il se pourrait que les antennes périphériques ne soient pas uniquement régulées par une voie de signalisation spécifique mais que leur expression soit le résultat d'une co-régulation qui tiendrait compte à la fois des deux voies de signalisation LH2 et LH4. Une telle co-régulation entre les bactériophytochromes *Rp*BphP2/*Rp*BphP3 d'une part et RpBphP4 d'autre part pourrait être envisagée du fait de la présence dans leurs voies de signalisation respectives de facteurs de transcription homologues ; Rpa3014 et Rpa1489 présentant 65 % d'identité. Il serait intéressant de vérifier l'existence d'une telle phosphorylation croisée qui pourrait expliquer que la mise en place des antennes LH4 s'accompagne d'une diminution concomitante de la synthèse des antennes LH2.
Il est à noter que les voies de régulation des opérons *pucBA*.a et c demeurent toujours inconnues. L'analyse des régions promotrices n'a pas permis d'identifier de site de fixation de PpsR ni de Rpa1489. Il serait intéressant de déterminer si ces opérons codent des protéines fonctionnelles, en particulier *pucBA*.c pour lequel aucun décalage du cadre de lecture n'est détecté chez d'autres souches de *Rps. palustris*, et surtout dans quelles conditions ces opérons sont exprimés.

Pour conclure sur cette partie, notre étude a mis en évidence un réseau très complexe qui permet de réguler la synthèse du photosystème et qui fait intervenir à la fois des voies de signalisation indépendantes initiées par différents bactériophytochromes et des phénomènes de régulation croisés *via* les facteurs de transcription PpsR. Sur la base de ces travaux nous avons pu proposer un schéma général (Figure 39) du rôle des bactériophytochromes *Rp*BphP1, *Rp*BphP2, *Rp*BphP3 et *Rp*BphP4 chez *Rps. palustris*.

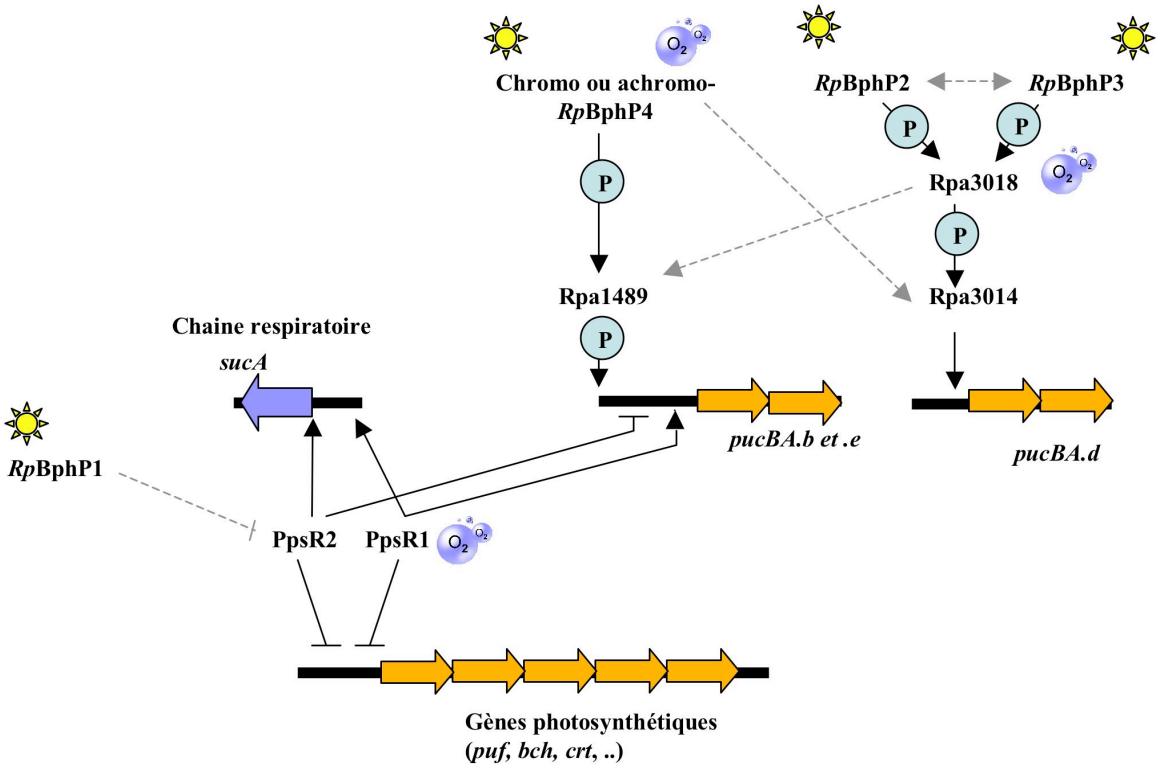


Figure 39 : Schéma récapitulatif des régulations exercées par les bactériophytochromes *Rp*BphP1, *Rp*BphP2, *Rp*BphP3 et *Rp*BphP4. et les régulateurs de transcription PpsR1 et PpsR2 sur la formation du photosystème et des antennes périphériques et sur l'activité respiratoire de *Rps. palustris.*

Les autres bactériophytochromes de *Rps. palustris*.

Les deux bactériophytochromes restants, *Rp*BphP5 et *Rp*BphP6, ont été purifiés et leurs caractéristiques spectrales étudiées. Il s'agit de bactériophytochromes classiques. Cependant leurs rôles demeurent toujours inconnus, l'organisation et la nature des gènes qui les entourent ne permettant pas dans ces cas-là d'émettre des hypothèses quant à leur(s) fonction(s). Nous savons que le bactériophytochrome *Rp*BphP6 possède un domaine RR fusionné et qu'il est capable de s'autophosphoryler. Ce BphP pourrait intervenir dans des phénomènes de phosphorelais mais aucun des partenaires éventuels n'a été décelé pour l'instant. Le second quant à lui (*Rp*BphP5) est un BphP classique cependant malgré la présence d'un domaine histidine-kinase aucune autophosphorylation de ce BphP n'a été mis en évidence. Afin d'étudier plus spécifiquement ces deux bactériophytochromes de nouvelles approches de types protéomiques ou transcriptomiques doivent être envisagées afin d'avoir une idée de la nature des gènes qu'ils contrôlent. Cependant le fait qu'ils ne soient pas conservés chez les autres souches de *Rps. palustris* laisse supposer qu'ils régulent des fonctions accessoires non essentielles au développement de ces bactéries.

Le séquençage de la souche HaA2 a mis en évidence la présence d'un gène codant un bactériophytochrome différent de ceux habituellement retrouvés chez les souches de *Rps. palustris*. En effet ce bactériophytochrome présente non pas un domaine histidine-kinase mais un domaine GGDEF à son extrémité C-terminale. Ce domaine pourrait conférer à ce senseur de lumière la capacité d'intervenir dans la synthèse du di-GMPc, messager secondaire ubiquitaire des bactéries. Un tel rôle a déjà été décrit chez le bactériophytochrome BphG1 retrouvé chez *Rb. sphaeroides* (Tarutina *et al.,* 2006). Le bactériophytochrome possède à l'extrémité N-terminale à la fois le domaine GGDEF mais également le domaine EAL impliqué dans la dégradation du di-GMPc, cependant l'activité phosphodiestérase du domaine EAL ne semble pas être lumière dépendante. Chez la souche HaA2, ce BphP particulier, codé par le gène Rpb2169, ne possède pas le domaine EAL mais celui-ci est localisé sur une protéine codée par un gène situé à proximité du gène Rpb2169. Chez *Rps. palustris* comme chez *Rhodobacter sphaeroïdes*, la synthèse du GMPc pourrait donc être sous le contrôle de la lumière.

_Br_BphP3.BTAi1 et _Br_BphP3.ORS278 : des exemples de BphPs acquis par transfert horizontal.

Une seconde partie de ma thèse a consisté à étudier les BphPs *Br*BphP3.BTAi1 et *Br*BphP3.ORS278 retrouvés respectivement chez les souches de *Bradyrhizobium* BTAi1 et ORS278 et qui ont la particularité d'être spécifiques à chacune de ces souches, au contraire des bactériophytochromes *Br*BphP1 et *Br*BphP2 qu'elles partagent.

Nous avons montré que le bactériophytochrome *Br*BphP3.BTAi1 est similaire aux chromo-*Rp*BphP4 retrouvés chez les souches HaA2 et BisB5 de *Rps. palustris* et que, comme eux, *Br*BphP3.BTAi1 est un senseur de lumière. Les expériences de phosphorylation menées ont permis de mettre en évidence que l'activité kinase de cette protéine est lumière dépendante. Sous sa forme Pfr, elle s'autophosphoryle et un phosphotransfert vers le RR BBta_3079 est envisageable. En effet, cette protéine est capable de phosphoryler le RR Rpa1489 de la souche CGA009 qui présente 63 % d'identité avec la protéine BBta_3079. Nous avons également montré *in vivo* que ce bactériophytochrome régule les antennes périphériques de la souche *Bradyrhizobium* BTAi1 de manière similaire à la régulation des antennes LH2 par les chromo-*Rp*BphP4. Il est intéressant de noter que l'organisation des gènes entourant la région *Br*BphP3.BTAi1, BBta_3079 ainsi que l'opéron *pucBA* est parfaitement conservé chez d'autres souches de *Bradyrhizobium* ainsi que chez d'autres espèces de *Rhizobium*. Il est ainsi tentant de supposer que ces gènes ont été acquis par transfert horizontal. Il est également possible qu'une telle acquisition par transfert horizontal soit survenu chez *Rps. palustris* qui présente la même organisation génomique.

L'étude portant sur ORS278 et plus précisément sur le bactériophytochrome spécifique à cette souche, nommé *Br*BphP3.ORS278, a révélé que la protéine correspond à un bactériophytochrome. Cependant, lors de sa thèse, Marianne Jaubert a montré que ce bactériophytochrome présentait des propriétés spectrales nouvelles dues à la fixation de la phycocyanobiline, le chromophore habituellement retrouvé chez les phytochromes de cyanobactéries. L'étude de ce bactériophytochrome a permis de révéler qu'il agissait plutôt comme un senseur de l'intensité lumineuse cependant la fonction de cette protéine demeure toujours inconnue. L'étude de la région génomique où est localisé ce bactériophytochrome révèle clairement que cette région a été acquise récemment par transfert horizontal. Dans cette région, on trouve également les gènes nécessaires à la formation des vésicules à gaz utilisées par certaines bactéries pour se positionner dans une colonne d'eau. Bien que la synthèse de

ces organites n'ait pu être mis en évidence pour l'instant chez ORS278, nous pouvons envisager que ce bactériophytochrome interviendrait dans la régulation de ces vésicules.

Ainsi, les souches BTAi1 et ORS278 présentent toutes deux des bactériophytochromes acquis par transfert horizontal. Il semblerait qu'une telle acquisition de ces senseurs de lumière ne soit pas rare et qu'elle permette de développer les capacités métaboliques lumière-dépendantes de ces organismes photosynthétiques. Dans ces conditions, on peut également se demander si la présence inhabituelle d'un gène codant un bactériophytochrome au sein du PGC chez *Rps. palustris* et les *Bradyrhizobium* ORS278 et BTAi1 n'est pas due elle aussi à un transfert horizontal. En effet nous ne pouvons pas ignorer cette possibilité considérant que chez ORS278 et *Rps. palustris* l'organisation du PGC est retrouvée en synténie sauf dans la zone comprenant les gènes codant le bactériophytochrome BphP1, le facteur de transcription PpsR2 et l'hème-oxygénase.

Conclusion générale

Ces travaux menés au LBC et au LSTM nous ont permis de mettre en évidence la grande diversité des bactériophytochromes tant dans leurs propriétés spectrales (formes Pr, Pfr, Pnr, Po, achromo, chromo) que dans leurs fonctions (régulation du photosystème, des antennes périphériques, de l'activité respiratoire). Cette diversité semble découler d'une grande flexibilité de cette famille de senseurs de lumière. Les 6 bactériophytochromes de *Rps. palustris* CGA009 illustrent bien cette diversité et mettent en évidence la complexité que peuvent présenter certaines chaînes de régulation initiées par ces chromoprotéines.

Il est maintenant couramment admis que les bactériophytochromes sont les protéines ancestrales des phytochromes de plantes. Différentes études ont également mis en évidence la grande diversité de ces chromoprotéines chez les végétaux. De plus, Sharrock & clack (2004) ont mis en évidence, chez *Arabidopsis,* que les phytochromes phyB-phyC-phyD-PhyE pouvaient *in vivo* former, entre eux, différents types d'hétérodimères. A l'heure actuelle aucune forme hétérodimérique n'a été identifiée chez les BphPs de bactéries. Cependant il n'est pas impossible que ces formes existent aussi chez ces organismes. La présence chez *Rps. palustris* de deux gènes en tandem sur le génome codant les bactériophytochromes *Rp*BphP2 et *Rp*BphP3 est assez troublante et pourrait peut être permettre la synthèse d'un hétérodimère *Rp*BphP2/3. L'hétérodimérisation pourrait jouer un rôle important qui permettrait de générer des formes multiples et variées de phytochromes actifs ce qui rajouterait un niveau supplémentaire à la diversité et à la complexité de ces protéines.

Références Bibliographiques

- A -

Alberti, M., Burke, D. H. and Hearst, J. E. (1995). Structure and sequence of the photosynthesis gene cluster. In *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria.*, (ed. R. E. Blankenship M. T. Madigan and C. E. Bauer), pp. 1083-1106. Dordrecht, The Nederlans: Kluwer.

Angerhofer, A., Cogdell, R. J. and Hipkins, M. F. (1986). A spectral characterisation of the light-harvesting pigment-protein complexes from *Rhodopseudomonas acidophila. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **848**, 333-341.

Appleby, J. L., Parkinson, J. S. and Bourret, R. B. (1996). Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell* **86**, 845-848.

Aravind, L. and Ponting, C. P. (1997). The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem Sci* **22**, 458-459.

Armstrong, G. A. (1994). Eubacteria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J Bacteriol* **176**, 4795-4802.

Armstrong, G. A., Schmidt, A., Sandmann, G. and Hearst, J. E. (1990). Genetic and biochemical characterization of carotenoid biosynthesis mutants of *Rhodobacter capsulatus. J Biol Chem* **265**, 8329-8338.

- B -

Barbosa, M. J., Rocha, J. M., Tramper, J. and Wijffels, R. H. (2001). Acetate as a carbon source for hydrogen production by photosynthetic bacteria. *J Biotechnol* **85**, 25-33.

Bauer, C. E., Buggy, J. J., Yang, Z. M. and Marrs, B. L. (1991). The superoperonal organization of genes for pigment biosynthesis and reaction center proteins is a conserved feature in *Rhodobacter capsulatus*: analysis of overlapping bchB and puhA transcripts. *Mol Gen Genet* **228**, 433-444.

Beatty, J. T. (1995). Organisation of photosynthesis gene transcripts. In *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, (ed. R. E. Blankenship M. T. Madigan and C. E. Bauer), pp. 1210-1217. The Netherlands: Kluwer Acad. Pub.

Beijerinck, M. W. (1888). Die bacterien der Papilionaceen-knöllchen. *Botanische Zeitung* **46**, 794-804.

Belasco, J. G., Beatty, J. T., Adams, C. W., von Gabain, A. and Cohen, S. N. (1985). Differential expression of photosynthesis genes in *R. capsulata* results from segmental differences in stability within the polycistronic rxcA transcript. *Cell* **40**, 171-181.

Berry, E. A., Huang, L. S., Saechao, L. K., Pon, N. G., Valkova-Valchanova, M. and Daldal, F. (2004). X-Ray Structure of Rhodobacter Capsulatus Cytochrome bc (1):

Comparison with its Mitochondrial and Chloroplast Counterparts. *Photosynth Res* **81**, 251-275.

Bhoo, S. H., Davis, S. J., Walker, J., Karniol, B. and Vierstra, R. D. (2001). Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore. *Nature* **414**, 776-779.

Bird, T. H., Du, S. and Bauer, C. E. (1999). Autophosphorylation, phosphotransfer, and DNA-binding properties of the RegB/RegA two-component regulatory system in *Rhodobacter capsulatus*. *J Biol Chem* **274**, 16343-16348.

Blankenship, R. E. (1992). Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosynth Res* **33**, 91-111.

Borucki, B., von Stetten, D., Seibeck, S., Lamparter, T., Michael, N., Mroginski, M. A., Otto, H., Murgida, D. H., Heyn, M. P. and Hildebrandt, P. (2005). Light-induced proton release of phytochrome is coupled to the transient deprotonation of the tetrapyrrole chromophore. *J Biol Chem* **280**, 34358-34364.

Bowman, W. C., Du, S., Bauer, C. E. and Kranz, R. G. (1999). In vitro activation and repression of photosynthesis gene transcription in *Rhodobacter capsulatus*. *Mol Microbiol* **33**, 429-437.

Braatsch, S., Gomelsky, M., Kuphal, S. and Klug, G. (2002). A single flavoprotein, AppA, integrates both redox and light signals in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **45**, 827-836.

Briggs, W. R., Beck, C. F., Cashmore, A. R., Christie, J. M., Hughes, J., Jarillo, J. A., Kagawa, T., Kanegae, H., Liscum, E., Nagatani, A. et al. (2001). The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell* **13**, 993-997.

Butler, W. L., Norris, K. H., Siegelman, H. W. and Hendricks, S. B. (1959). Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **45**, 1703-1708.

- C -

Chaintreuil, C. (2000). Caractérisation des *Bradyrhizobium* photosynthétiques endophytes du riz sauvage *Oriza brevigulata*., (ed.: Montpellier).

Chaintreuil, C., Giraud, E., Prin, Y., Lorquin, J., Ba, A., Gillis, M., de Lajudie, P. and Dreyfus, B. (2000). Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 5437-5447.

Chen, E., Lapko, V. N., Lewis, J. W., Song, P. S. and Kliger, D. S. (1996). Mechanism of native oat phytochrome photoreversion: a time-resolved absorption investigation. *Biochemistry* **35**, 843-850.

Cheng, Y. S., Brantner, C. A., Tsapin, A. and Collins, M. L. (2000). Role of the H protein in assembly of the photochemical reaction center and intracytoplasmic membrane in *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol* **182**, 1200-1207.

Chory, J., Chatterjee, M., Cook, R. K., Elich, T., Fankhauser, C., Li, J., Nagpal, P., Neff, M., Pepper, A., Poole, D. et al. (1996). From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12066-12071.

Choudhary, M. and Kaplan, S. (2000). DNA sequence analysis of the photosynthesis region of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Nucleic Acids Res* **28**, 862-867.

Cogdell, R. J., Fyfe, P. K., Barrett, S. J., Prince, S. M., Freer, A. A., Isaacs, N. W., McGlynn, P. and Hunter, C. N. (1996). The purple bacterial photosynthetic unit. *Photosyn. Res.* **48**, 55-63.

Cogdell, R. J., Howard, T. D., Bittl, R., Schlodder, E., Geisenheimer, I. and Lubitz, W. (2000). How carotenoids protect bacterial photosynthesis. *PPhilosophical Transactions: Biological Sciences* **355**, 1345-1349.

Cogdell, R. J., Isaacs, N. W., Freer, A. A., Howard, T. D., Gardiner, A. T., Prince, S. M. and Papiz, M. Z. (2003). The structural basis of light-harvesting in purple bacteria. *FEBS Lett* **555**, 35-39.

- D -

Davidson, E. and Daldal, F. (1987a). Primary structure of the bc1 complex of *Rhodopseudomonas capsulata*. Nucleotide sequence of the pet operon encoding the Rieske cytochrome b, and cytochrome c1 apoproteins. *J Mol Biol* **195**, 13-24.

Davidson, E. and Daldal, F. (1987b). fbc operon, encoding the Rieske Fe-S protein cytochrome b, and cytochrome c1 apoproteins previously described from *Rhodopseudomonas sphaeroides*, is from *Rhodopseudomonas capsulata*. *J Mol Biol* **195**, 25-29.

Davis, S. J., Vener, A. V. and Vierstra, R. D. (1999). Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science* **286**, 2517-20.

Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., R., H. and Michel, H. (1985). Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodopseudomonas viridis* at 3A resolution. *Nature* **318**, 618-624.

Dong, C., Elsen, S., Swem, L. R. and Bauer, C. E. (2002). AerR, a second aerobic repressor of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* **184**, 2805-2814.

Du, S., Kouadio, J. L. and Bauer, C. E. (1999). Regulated expression of a highly conserved regulatory gene cluster is necessary for controlling photosynthesis gene expression in response to anaerobiosis in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* **181**, 4334-4341.

- E -

Egland, P. G., Pelletier, D. A., Dispensa, M., Gibson, J. and Harwood, C. S. (1997). A cluster of bacterial genes for anaerobic benzene ring biodegradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6484-649.

Eilfeld, P. and Rüdiger, W. (1985). Absorption spectra of phytochrome intermediates. *Z. Naturforsch* **40C**, 109-114.

Elsen, S., Dischert, W., Colbeau, A. and Bauer, C. E. (2000). Expression of uptake hydrogenase and molybdenum nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* is coregulated by the RegB-RegA two-component regulatory system. *J Bacteriol* **182**, 2831-2837.

Elsen, S., Jaubert, M., Pignol, D. and Giraud, E. (2005). PpsR: a multifaceted regulator of photosynthesis gene expression in purple bacteria. *Mol Microbiol* **57**, 17-26.

Elsen, S., Swem, L. R., Swem, D. L. and Bauer, C. E. (2004). RegB/RegA, a highly conserved redox-responding global two-component regulatory system. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 263-279.

Emmerich, R., Hennecke, H. and Fischer, H. M. (2000). Evidence for a functional similarity between the two-component regulatory systems RegSR, ActSR, and RegBA (PrrBA) in alpha-Proteobacteria. *Arch Microbiol* **174**, 307-313.

Evans, K., Grossmann, J. G., Fordham-Skelton, A. P. and Papiz, M. Z. (2006). Small-angle X-ray scattering reveals the solution structure of a bacteriophytochrome in the catalytically active Pr state. *J Mol Biol* **364**, 655-666.

Evans, M. B., Hawthronthwaite, A. M. and Cogdell, R. J. (1990). Isolation and characterization of the different B800-850 light-harvesting complexes from low- and high-light grown cells of *Rhodopseudomonas palustris*, strain 2.1.6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **1016**, 71-76.

- F -

Fankhauser, C. (2001). The phytochromes, a family of red/far-red absorbing photoreceptors. *J Biol Chem* **276**, 11453-11456.

Fotiadis, D., Qian, P., Philippsen, A., Bullough, P. A., Engel, A. and Hunter, C. N. (2004). Structural analysis of the reaction center light-harvesting complex I photosynthetic core complex of *Rhodospirillum rubrum* using atomic force microscopy. *J Biol Chem* **279**, 2063-2068.

-G-

Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L. J., Smirnov, S., Purcell, S. et al. (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* **422**, 859-868.

Gall, A., Gardiner, A. T., Cogdell, R. J. and Robert, B. (2006). Carotenoid stoichiometry in the LH2 crystal: no spectral evidence for the presence of the second molecule in the alpha/beta-apoprotein dimer. *FEBS Lett* **580**, 3841-3844.

Gall, A., Henry, S., Takaichi, S., Robert, B. and Cogdell, R. J. (2005). Preferential incorporation of coloured-carotenoids occurs in the LH2 complexes from non-sulphur purple bacteria under carotenoid-limiting conditions. *Photosynth Res* **86**, 25-35.

Gardiner, A. T., Takaichi, S. and Cogdell, R. J. (1993). The effect of changes in light intensity and temperature on the peripheral antenna of *Rhodopseudomonas acidophila*. *Biochem Soc Trans* **21**, 6S.

Gilbert, I. R., Jarvis, P. G. and Smith, H. (2001). Proximity signal and shade avoidance differences between early and late successional trees. *Nature* **411**, 792-795.

Giraud, E. (2007). Rhizobium/legume symbiose: a new sesame. *Med Sci (Paris)* **23**, 663-664.

Giraud, E., Fardoux, J., Fourrier, N., Hannibal, L., Genty, B., Bouyer, P., Dreyfus, B. and Vermeglio, A. (2002). Bacteriophytochrome controls photosystem synthesis in anoxygenic bacteria. *Nature* **417**, 202-2055.

Giraud, E., Hannibal, L., Fardoux, J., Jaubert, M., Jourand, P., Dreyfus, B., Sturgis, J. N. and Vermeglio, A. (2004). Two distinct crt gene clusters for two different functional classes of carotenoid in *Bradyrhizobium*. *J Biol Chem* **279**, 15076-15083.

Giraud, E., Hannibal, L., Fardoux, J., Vermeglio, A. and Dreyfus, B. (2000). Effect of *Bradyrhizobium* photosynthesis on stem nodulation of *Aeschynomene sensitiva*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14795-14800.

Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J. C., Jaubert, M., Simon, D., Cartieaux, F., Prin, Y. et al. (2007). Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science* **316**, 1307-1312.

Giraud, E., Zappa, S., Jaubert, M., Hannibal, L., Fardoux, J., Adriano, J. M., Bouyer, P., Genty, B., Pignol, D. and Vermeglio, A. (2004). Bacteriophytochrome and regulation of the synthesis of the photosynthetic apparatus in *Rhodopseudomonas palustris:* pitfalls of using laboratory strains. *Photochem Photobiol Sci* **3**, 587-591.

Giraud, E., Zappa, S., Vuillet, L., Adriano, J. M., Hannibal, L., Fardoux, J., Berthomieu, C., Bouyer, P., Pignol, D. and Vermeglio, A. (2005). A new type of bacteriophytochrome acts in tandem with a classical bacteriophytochrome to control the antennae synthesis in *Rhodopseudomonas palustris*. *J Biol Chem* **280**, 32389-32397.

Gomelsky, L., Sram, J., Moskvin, O. V., Horne, I. M., Dodd, H. N., Pemberton, J. M., McEwan, A. G., Kaplan, S. and Gomelsky, M. (2003). Identification and in vivo characterization of PpaA, a regulator of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology* **149**, 377-388.

Gomelsky, M., Horne, I. M., Lee, H. J., Pemberton, J. M., McEwan, A. G. and Kaplan, S. (2000). Domain structure, oligomeric state, and mutational analysis of PpsR, the *Rhodobacter sphaeroides* repressor of photosystem gene expression. *J Bacteriol* **182**, 2253-2261.

Gomelsky, M. and Kaplan, S. (1995). appA, a novel gene encoding a trans-acting factor involved in the regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J Bacteriol* **177**, 4609-4618.

Gomelsky, M. and Kaplan, S. (1997). Molecular genetic analysis suggesting interactions between AppA and PpsR in regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J Bacteriol* **179**, 128-134.

Gomelsky, M. and Klug, G. (2002). BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends Biochem Sci* **27**, 497-500.

Gyula, P., Schafer, E. and Nagy, F. (2003). Light perception and signalling in higher plants. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 446-452.

- H -

Hannibal, L., Lorquin, J., D'Ortoli, N. A., Garcia, N., Chaintreuil, C., Masson-Boivin, C., Dreyfus, B. and Giraud, E. (2000). Isolation and characterization of canthaxanthin biosynthesis genes from the photosynthetic bacterium *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278. *J Bacteriol* **182**, 3850-3853.

Harada, J., Nagashima, K. V., Takaichi, S., Misawa, N., Matsuura, K. and Shimada, K. (2001). Phytoene desaturase, CrtI, of the purple photosynthetic bacterium, *Rubrivivax gelatinosus*, produces both neurosporene and lycopene. *Plant Cell Physiol* **42**, 1112-1118.

Hartigan, N., Tharia, H. A., Sweeney, F., Lawless, A. M. and Papiz, M. Z. (2002). The 7.5-A electron density and spectroscopic properties of a novel low-light B800 LH2 from *Rhodopseudomonas palustris*. *Biophys J* **82**, 963-977.

Heathcote, P., Fyfe, P. K. and Jones, M. R. (2002). Reaction centres: the structure and evolution of biological solar power. *Trends Biochem Sci* **27**, 79-87.

Hefti, M. H., Francoijs, K. J., de Vries, S. C., Dixon, R. and Vervoort, J. (2004). The PAS fold. A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction. *Eur J Biochem* **271**, 1198-1208.

Hennig, L. and Schafer, E. (2001). Both subunits of the dimeric plant photoreceptor phytochrome require chromophore for stability of the far-red light-absorbing form. *J Biol Chem* **276**, 7913-7918.

Heyne, K., Herbst, J., Stehlik, D., Esteban, B., Lamparter, T., Hughes, J. and Diller, R. (2002). Ultrafast dynamics of phytochrome from the cyanobacterium synechocystis, reconstituted with phycocyanobilin and phycoerythrobilin. *Biophys J* **82**, 1004-1016.

Hu, Q., Sturgis, J. N., Robert, B., Delagrave, S., Youvan, D. C. and Niederman, R. A. (1998). Hydrogen bonding and circular dichroism of bacteriochlorophylls in the *Rhodobacter capsulatus* light-harvesting 2 complex altered by combinatorial mutagenesis. *Biochemistry*. **37**, 10006-10015.

Hughes, J. and Lamparter, T. (1999). Prokaryotes and phytochrome. The connection to chromophores and signaling. *Plant Physiol* **121**, 1059-1068.

Hughes, J., Lamparter, T., Mittmann, F., Hartmann, E., Gartner, W., Wilde, A. and Borner, T. (1997). A prokaryotic phytochrome. *Nature* **386**, 663.

Hunter, C. N. (1995). Light-harvesting complex. Rings of light. *Curr Biol* **5**, 826-828.

-J-

Igarashi, N., Harada, J., Nagashima, S., Matsuura, K., Shimada, K. and Nagashima, K. V. (2001). Horizontal transfer of the photosynthesis gene cluster and operon rearrangement in purple bacteria. *J Mol Evol* **52**, 333-341.

Inoue, K., Kouadio, J. L., Mosley, C. S. and Bauer, C. E. (1995). Isolation and in vitro phosphorylation of sensory transduction components controlling anaerobic induction of light harvesting and reaction center gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *Biochemistry* **34**, 391-396.

-J-

Jamieson, S. J., Wang, P., Qian, P., Kirkland, J. Y., Conroy, M. J., Hunter, C. N. and Bullough, P. A. (2002). Projection structure of the photosynthetic reaction centre-antenna complex of *Rhodospirillum rubrum at* 8.5 A resolution. *Embo J* **21**, 3927-3935.

Jaubert, M., Lavergne, J., Fardoux, J., Hannibal, L., Vuillet, L., Adriano, J. M., Bouyer, P., Pignol, D., Giraud, E. and Vermeglio, A. (2007). A singular bacteriophytochrome acquired by lateral gene transfer. *J Biol Chem* **282**, 7320-7328.

Jaubert, M., Zappa, S., Fardoux, J., Adriano, J. M., Hannibal, L., Elsen, S., Lavergne, J., Vermeglio, A., Giraud, E. and Pignol, D. (2004). Light and redox control of photosynthesis gene expression in *Bradyrhizobium*: dual roles of two PpsR. *J Biol Chem* **279**, 44407-44416.

Jenney, F. E., Jr. and Daldal, F. (1993). A novel membrane-associated c-type cytochrome, cyt cy, can mediate the photosynthetic growth of *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodobacter sphaeroides*. *Embo J* **12**, 1283-1292.

Jiang, Z., Swem, L. R., Rushing, B. G., Devanathan, S., Tollin, G. and Bauer, C. E. (1999). Bacterial photoreceptor with similarity to photoactive yellow protein and plant phytochromes. *Science* **285**, 406-409.

Jupin, H. and Lamant, A. (1997). La photosynthèse. In. *Enseignement des sciences de la vie*, pp. 268.

- K -

Karniol, B. and Vierstra, R. D. (2003). The pair of bacteriophytochromes from *Agrobacterium tumefaciens* are histidine kinases with opposing photobiological properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2807-2812.

Karniol, B., Wagner, J. R., Walker, J. M. and Vierstra, R. D. (2005). Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors. *Biochem J* **392**, 103-116.

Karrasch, S., Bullough, P. A. and Ghosh, R. (1995). The 8.5 A projection map of the light-harvesting complex I from *Rhodospirillum rubrum* reveals a ring composed of 16 subunits. *Embo J* **14**, 631-638.

Klug, G. (1991). Endonucleolytic degradation of puf mRNA in *Rhodobacter capsulatus* is influenced by oxygen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1765-1769.

Klug, G., Adams, C. W., Belasco, J., Doerge, B. and Cohen, S. N. (1987). Biological consequences of segmental alterations in mRNA stability: effects of deletion of the intercistronic hairpin loop region of the *Rhodobacter capsulatus* puf operon. *Embo J* **6**, 3515-3520.

Koepke, J., Hu, X., Muenke, C., Schulten, K. and Michel, H. (1996). The crystal structure of the light-harvesting complex II (B800-850) from *Rhodospirillum molischianum*. *Structure* **4**, 581-597.

Kojadinovic, M., Laugraud, A., Vuillet, L., Fardoux, J., Hannibal, L., Adriano, J. M., Bouyer, P., Giraud, E. and Verméglio, A. (2007). Dual Role for a bacteriophytochrome in the bioenergetic control of *Rhodopseudomonas palustris* of photosystem synthesis and limitation of respiration. *Biochim Biophys Acta, sous presse*.

Kondo, T. and Ishiura, M. (2000). The circadian clock of cyanobacteria. *Bioessays* **22**, 10-15.

Kyndt, J. A., Meyer, T. E. and Cusanovich, M. A. (2004). Photoactive yellow protein, bacteriophytochrome, and sensory rhodopsin in purple phototrophic bacteria. *Photochem Photobiol Sci* **3**, 519-530.

- L -

Lamparter, T., Carrascal, M., Michael, N., Martinez, E., Rottwinkel, G. and Abian, J. (2004). The biliverdin chromophore binds covalently to a conserved cysteine residue in the N-terminus of *Agrobacterium* phytochrome Agp1. *Biochemistry* **43**, 3659-3669.

Lamparter, T., Michael, N., Mittmann, F. and Esteban, B. (2002). Phytochrome from *Agrobacterium tumefaciens* has unusual spectral properties and reveals an N-terminal chromophore attachment site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11628-11633.

Lang, H. P., Cogdell, R. J., Takaichi, S. and Hunter, C. N. (1995). Complete DNA sequence, specific Tn5 insertion map, and gene assignment of the carotenoid biosynthesis pathway of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **177**, 2064-2073.

Larimer, F. W., Chain, P., Hauser, L., Lamerdin, J., Malfatti, S., Do, L., Land, M. L., Pelletier, D. A., Beatty, J. T., Lang, A. S. et al. (2004). Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. *Nat Biotechnol* **22**, 55-61.

Li, Q. H. and Yang, H. Q. (2007). Cryptochrome signaling in plants. *Photochem Photobiol* **83**, 94-101.

Lilburn, T. G., Haith, C. E., Prince, R. C. and Beatty, J. T. (1992). Pleiotropic effects of pufX gene deletion on the structure and function of the photosynthetic apparatus of *Rhodobacter capsulatus*. *Biochim Biophys Acta* **1100**, 160-170.

Lupo, D. and Ghosh, R. (2004). The reaction center H subunit is not required for high levels of light-harvesting complex 1 in *Rhodospirillum rubrum* mutants. *J Bacteriol* **186**, 5585-5595.

- M -

Masuda, S. and Bauer, C. E. (2002). AppA is a blue light photoreceptor that antirepresses photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *Cell* **110**, 613-623.

McDermott, G., Prince, S. M., Freer, A. A., Hawthornthwaite-Lawless, A. M., Papiz, M. Z., Cogdell, R. J. and Isaacs, N. W. (1995). Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. *Nature* **374,** 517-521.

McGrath, J. E. and Harfoot, C. G. (1997). Reductive dehalogenation of halocarboxylic acids by the phototrophic genera *Rhodospirillum* and *Rhodopseudomonas*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3333-3335.

McLuskey, K., Prince, S. M., Cogdell, R. J. and Isaacs, N. W. (2001). The crystallographic structure of the B800-820 LH3 light-harvesting complex from the purple bacteria *Rhodopseudomonas acidophila* strain 7050. *Biochemistry* **40**, 8783-8789.

Montoya, G., Cyrklaff, M. and Sinning, I. (1995). Two-dimensional crystallization and preliminary structure analysis of light harvesting II (B800-850) complex from the purple bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*. *J Mol Biol* **250**, 1-10.

Moskvin, O. V., Gomelsky, L. and Gomelsky, M. (2005). Transcriptome analysis of the *Rhodobacter sphaeroides* PpsR regulon: PpsR as a master regulator of photosystem development. *J Bacteriol* **187**, 2148-2156.

Moskvin, O. V., Kaplan, S., Gilles-Gonzalez, M. A. and Gomelsky, M. (2007). Novel heme-based oxygen sensor with a revealing evolutionary history. *J Biol Chem* **282**, 28740-28748.

- N -

Nixon, B. T., Ronson, C. W. and Ausubel, F. M. (1986). Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes ntrB and ntrC. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 7850-7854.

- O -

Oda, Y. and Harwood, C. S. (2006). What defines a species? A comparison of fine *Rhodopseudomonas palustris* genomes. In *12th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes*.

Oda, Y., Wanders, W., Huisman, L. A., Meijer, W. G., Gottschal, J. C. and Forney, L. J. (2002). Genotypic and phenotypic diversity within species of purple nonsulfur bacteria isolated from aquatic sediments. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3467-3477.

Oh, J. I., Eraso, J. M. and Kaplan, S. (2000). Interacting regulatory circuits involved in orderly control of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J Bacteriol* **182**, 3081-3087.

Oh, J. I. and Kaplan, S. (2001). Generalized approach to the regulation and integration of gene expression. *Mol Microbiol* **39**, 1116-1123.

Ouchane, S., Picaud, M., Therizols, P., Reiss-Husson, F. and Astier, C. (2007). Global regulation of photosynthesis and respiration by FnrL: the first two targets in the tetrapyrrole pathway. *J Biol Chem* **282**, 7690-7699.

- P -

Paget, M. S. and Buttner, M. J. (2003). Thiol-based regulatory switches. *Annu Rev Genet* **37**, 91-121.

Papiz, M. Z., Prince, S. M., Howard, T., Cogdell, R. J. and Isaacs, N. W. (2003). The structure and thermal motion of the B800-850 LH2 complex from *Rps.acidophila* at 2.0A resolution and 100K: new structural features and functionally relevant motions. *J Mol Biol* **326**, 1523-1538.

Parkinson, J. S. and Kofoid, E. C. (1992). Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet* **26**, 71-112.

Paul, R., Weiser, S., Amiot, N. C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B. and Jenal, U. (2004). Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev* **18**, 715-727.

Penfold, R. J. and Pemberton, J. M. (1991). A gene from the photosynthetic gene cluster of *Rhodobacter sphaeroides* induces trans-suppression of bacteriochlorophyll and carotenoid levels in *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter capsulatus*. *Curr Microbiol* **23**, 259-263.

Penfold, R. J. and Pemberton, J. M. (1994). Sequencing, chromosomal inactivation, and functional expression in *Escherichia coli* of ppsR, a gene which represses carotenoid and bacteriochlorophyll synthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **176**, 2869-2876.

Ponnampalam, S. N. and Bauer, C. E. (1997). DNA binding characteristics of CrtJ. A redox-responding repressor of bacteriochlorophyll, carotenoid, and light harvesting-II gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *J Biol Chem* **272**, 18391-18396.

Ponnampalam, S. N., Buggy, J. J. and Bauer, C. E. (1995). Characterization of an aerobic repressor that coordinately regulates bacteriochlorophyll, carotenoid, and light harvesting-II expression in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* **177**, 2990-2997.

- Q -

Qian, P., Hunter, C. N. and Bullough, P. A. (2005). The 8.5A projection structure of the core RC-LH1-PufX dimer of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Mol Biol* **349**, 948-960.

Quail, P. H. (1997). The phytochromes: a biochemical mechanism of signaling in sight? *Bioessays* **19**, 571-579.

Quail, P. H. (2002). Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr Opin Cell Biol* **14**, 180-188.

Quail, P. H. (2002). Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 85-93.

Quail, P. H., Boylan, M. T., Parks, B. M., Short, T. W., Xu, Y. and Wagner, D. (1995). Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science* **268**, 675-680.

- R -

Raven, J. A., Kubler, J. E. and Beardall, J. (2000). Put out the light, and then put out the light. *Journal of the marine biological association of the United Kingdom*. **80**, 1-25.

Rey, F. E., Heiniger, E. K. and Harwood, C. S. (2007). Redirection of metabolism for biological hydrogen production. *Appl Environ Microbiol* **73**, 1665-1671.

Rockwell, N. C., Su, Y. S. and Lagarias, J. C. (2006). Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 837-858.

Romling, U., Gomelsky, M. and Galperin, M. Y. (2005). C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol Microbiol* **57**, 629-639.

Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., de Vroom, E., van der Marel, G. A., van Boom, J. H. et al. (1987). Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325**, 279-281.

Roszak, A. W., Howard, T. D., Southall, J., Gardiner, A. T., Law, C. J., Isaacs, N. W. and Cogdell, R. J. (2003). Crystal structure of the RC-LH1 core complex from *Rhodopseudomonas palustris*. *Science* **302**, 1969-1972.

- S -

Sasikala, C. and Ramana, C. V. (1998). Biodegradation and metabolism of unusual carbon compounds by anoxygenic phototrophic bacteria. *Adv Microb Physiol* **39**, 339-377.

Scheuring, S., Goncalves, R. P., Prima, V. and Sturgis, J. N. (2006). The photosynthetic apparatus of *Rhodopseudomonas palustris:* structures and organization. *J Mol Biol* **358**, 83-96.

Scheuring, S., Levy, D. and Rigaud, J. L. (2005). Watching the components of photosynthetic bacterial membranes and their in situ organisation by atomic force microscopy. *Biochim Biophys Acta* **1712**, 109-127.

Senior, A. E., Nadanaciva, S. and Weber, J. (2002). The molecular mechanism of ATP synthesis by F1F0-ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* **1553**, 188-211.

Sganga, M. W. and Bauer, C. E. (1992). Regulatory factors controlling photosynthetic reaction center and light-harvesting gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *Cell* **68**, 945-954.

Sharrock, R. A. and Clack, T. (2004). Heterodimerization of type II phytochromes in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11500-11505.

Shimada, K. (1985). Light-harvesting pigment-protein complexes of *Rhodopseudomonas sphaeroides* forma sp. *denitrificans*. *J Biochem (Tokyo)* **98**, 465-473.

Smart, J. L., Willett, J. W. and Bauer, C. E. (2004). Regulation of hem gene expression in *Rhodobacter capsulatus* by redox and photosystem regulators RegA, CrtJ, FnrL, and AerR. *J Mol Biol* **342**, 1171-1186.

Smith, H. (2000). Phytochromes and light signal perception by plants--an emerging synthesis. *Nature* **407**, 585-591.

Sockett, R. E., Donohue, T. J., Varga, A. R. and Kaplan, S. (1989). Control of photosynthetic membrane assembly in *Rhodobacter sphaeroides* mediated by puhA and flanking sequences. *J Bacteriol* **171**, 436-446.

Stahlberg, H., Dubochet, J., Vogel, H. and Ghosh, R. (1998). Are the light-harvesting I complexes from *Rhodospirillum rubrum* arranged around the reaction centre in a square geometry? *J Mol Biol* **282**, 819-831.

Steunou, A. S., Astier, C. and Ouchane, S. (2004). Regulation of photosynthesis genes in *Rubrivivax gelatinosus:* transcription factor PpsR is involved in both negative and positive control. *J Bacteriol* **186**, 3133-3142.

Stock, A. M., Robinson, V. L. and Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**, 183-215.

Sweere, U., Eichenberg, K., Lohrmann, J., Mira-Rodado, V., Baurle, I., Kudla, J., Nagy, F., Schafer, E. and Harter, K. (2001). Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science* **294**, 1108-1111.

Swem, L. R., Elsen, S., Bird, T. H., Swem, D. L., Koch, H. G., Myllykallio, H., Daldal, F. and Bauer, C. E. (2001). The RegB/RegA two-component regulatory system controls synthesis of photosynthesis and respiratory electron transfer components in *Rhodobacter capsulatus*. *J Mol Biol* **309**, 121-138.

Swingley, W. D., Sadekar, S., Mastrian, S. D., Matthies, H. J., Hao, J., Ramos, H., Acharya, C. R., Conrad, A. L., Taylor, H. L., Dejesa, L. C. et al. (2007). The complete genome sequence of *Roseobacter denitrificans* reveals a mixotrophic rather than photosynthetic metabolism. *J Bacteriol* **189**, 683-690.

- T -

Tadros, M. H., Frank, R. and Drews, G. (1986). Localization of the exposed N-terminal region of the B800-850 alpha and beta light-harvesting polypeptides on the cytoplasmic surface of *Rhodopseudomonas capsulata* chromatophores. *J Bacteriol* **167**, 96-100.

Tadros, M. H., Katsiou, E., Hoon, M. A., Yurkova, N. and Ramji, D. P. (1993). Cloning of a new antenna gene cluster and expression analysis of the antenna gene family of *Rhodopseudomonas palustris*. *Eur J Biochem* **217**, 867-875.

Takaichi, S. (1999). Carotenoids and carotenogenesis in anoxygenic photosynthetic bacteria. In *The photochemistry of carotenoids*, (ed. H. A. Frank A. J. Young G. Britton and R. J. Cogdell), pp. 40-69. Dordrecht, The Nederlans.: Kluwer Academic Publishers.

Takemoto, J. and Lascelles, J. (1973). Coupling between bacteriochlorophyll and membrane protein synthesis in *Rhodopseudomonas spheroides*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 799-803.

Tarutina, M., Ryjenkov, D. A. and Gomelsky, M. (2006). An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *J Biol Chem* **281**, 34751-34758.

Tavano, C. L. and Donohue, T. J. (2006). Development of the bacterial photosynthetic apparatus. *Curr Opin Microbiol* **9**, 625-631.

Taylor, B. L. and Zhulin, I. B. (1999). PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 479-506.

Tharia, H. A., Nightingale, T. D., Papiz, M. Z. and Lawless, A. M. (1999). Characterisation of hydrophobic peptides by RP-HPLC from different spectral forms of LH2 isolated from *Rps. palustris*. *Photosynthesis Research* **61**, 157-167.

Thony-Meyer, L., Stax, D. and Hennecke, H. (1989). An unusual gene cluster for the cytochrome bc1 complex in *Bradyrhizobium japonicum* and its requirement for effective root nodule symbiosis. *Cell* **57**, 683-697.

Tirichine, L., Sandal, N., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Albrektsen, A. S., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S. and Stougaard, J. (2007). A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* **315**, 104-107.

- V -

Vallenet, D., Labarre, L., Rouy, Z., Barbe, V., Bocs, S., Cruveiller, S., Lajus, A., Pascal, G., Scarpelli, C. and Medigue, C. (2006). MaGe: a microbial genome annotation system supported by synteny results. *Nucleic Acids Res* **34**, 53-65.

van Berkum, P., Leibold, J. M. and Eardly, B. D. (2006). Proposal for combining *Bradyrhizobium* spp. (*Aeschynomene indica*) with *Blastobacter denitrificans* and to transfer *Blastobacter denitrificans* (Hirsch and Muller, 1985) to the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium denitrificans* (comb. nov.). *Syst Appl Microbiol* **29**, 207-215.

van Grondelle, R., Dekker, J. P., Gillbro, T. and Sundstrom, V. (1994). Energy transfer and trapping in photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1187**, 1-65.

van Rhijn, P. and Vanderleyden, J. (1995). The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol Rev* **59**, 124-142.

Verméglio, A. and Joliot, P. (1999). The photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*. *Trends Microbiol* **7**, 435-440.

Vichivanives, P., Bird, T. H., Bauer, C. E. and Robert Tabita, F. (2000). Multiple regulators and their interactions in vivo and in vitro with the cbb regulons of *Rhodobacter capsulatus*. *J Mol Biol* **300**, 1079-1099.

Vuillet, L., Kojadinovic, M., Zappa, S., Jaubert, M., Adriano, J. M., Fardoux, J., Hannibal, L., Pignol, D., Vermeglio, A. and Giraud, E. (2007). Evolution of a bacteriophytochrome from light to redox sensor. *Embo J* **26**, 3322-3331.

- W -

Wagner, J. R., Brunzelle, J. S., Forest, K. T. and Vierstra, R. D. (2005). A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome. *Nature* **438**, 325-331.

Wagner, J. R., Zhang, J., Brunzelle, J. S., Vierstra, R. D. and Forest, K. T. (2007). High resolution structure of *Deinococcus* bacteriophytochrome yields new insights into phytochrome architecture and evolution. *J Biol Chem* **282**, 12298-12309.

Walz, T., Jamieson, S. J., Bowers, C. M., Bullough, P. A. and Hunter, C. N. (1998). Projection structures of three photosynthetic complexes from *Rhodobacter sphaeroides*: LH2 at 6 A, LH1 and RC-LH1 at 25 A. *J Mol Biol* **282**, 833-845.

Wang, S., Li, X., Williams, J. C., Allen, J. P. and Mathis, P. (1994). Interaction between cytochrome c2 and reaction centers from purple bacteria. *Biochemistry* **33**, 8306-8312.

Wellington, C. L. and Beatty, J. T. (1991). Overlapping mRNA transcripts of photosynthesis gene operons in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* **173**, 1432-43.

West, A. H. and Stock, A. M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**, 369-376.

Whittenbury, R. and McLee, A. G. (1967). *Rhodopseudomonas palustris* and *Rh. viridis*--photosynthetic budding bacteria. *Arch Mikrobiol* **59**, 324-334.

Wu, S. H. and Lagarias, J. C. (2000). Defining the bilin lyase domain: lessons from the extended phytochrome superfamily. *Biochemistry* **39**, 13487-13495.

- Y -

Yang, X., Stojkovic, E. A., Kuk, J. and Moffat, K. (2007). Crystal structure of the chromophore binding domain of an unusual bacteriophytochrome, RpBphP3, reveals residues that modulate photoconversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12571-12576.

Yeates, T. O., Komiya, H., Rees, D. C., Allen, J. P. and Feher, G. (1987). Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: membrane-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 6438-6442.

Yeh, K. C., Wu, S. H., Murphy, J. T. and Lagarias, J. C. (1997). A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science* **277**, 1505-1508.

Yeliseev, A. A., Eraso, J. M. and Kaplan, S. (1996). Differential carotenoid composition of the B875 and B800-850 photosynthetic antenna complexes in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: involvement of spheroidene and spheroidenone in adaptation to changes in light intensity and oxygen availability. *J Bacteriol* **178**, 5877-5883.

Yeliseev, A. A. and Kaplan, S. (1997). Anaerobic carotenoid biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: H2O is a source of oxygen for the 1-methoxy group of spheroidene but not for the 2-oxo group of spheroidenone. *FEBS Lett* **403**, 10-14.

Young, C. S. and Beatty, J. T. (1998). Topological Model of the *Rhodobacter capsulatus* Light-Harvesting Complex I Assembly Protein LhaA (Previously Known as ORF1696). *J Bacteriol* **180**, 4742-4745.

Young, C. S., Reyes, R. C. and Beatty, J. T. (1998). Genetic Complementation and Kinetic Analyses of *Rhodobacter capsulatus* ORF1696 Mutants Indicate that the ORF1696 Protein Enhances Assembly of the Light-Harvesting I Complex. *J Bacteriol* **180**, 1759-1765.

Zeilstra-Ryalls, J. H., Gabbert, K., Mouncey, N. J., Kaplan, S. and Kranz, R. G. (1997). Analysis of the fnrL gene and its function in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* **179**, 7264-7273.

Zeilstra-Ryalls, J. H., Gomelsky, M., Yeliseev, A. A., Eraso, J. M. and Kaplan, S. (1998). Transcriptional regulation of photosynthesis operons in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Methods Enzymol* **297**, 151-166.

Zeilstra-Ryalls, J. H. and Kaplan, S. (1995). Aerobic and anaerobic regulation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: the role of the *fnrL* gene. *J Bacteriol* **177**, 6422-6431.

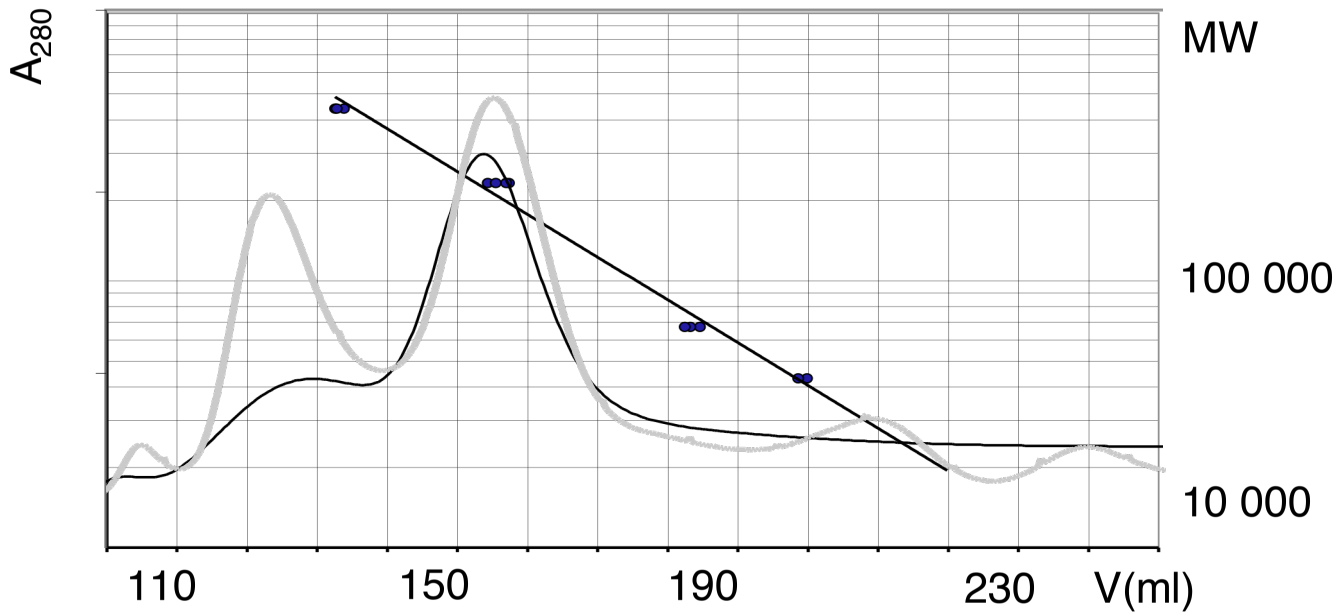
Zeilstra-Ryalls, J. H. and Kaplan, S. (1996). Control of *hemA* expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: regulation through alterations in the cellular redox state. *J Bacteriol* **178**, 985-993.

Zeilstra-Ryalls, J. H. and Kaplan, S. (2004). Oxygen intervention in the regulation of gene expression: the photosynthetic bacterial paradigm. *Cell Mol Life Sci* **61**, 417-436.

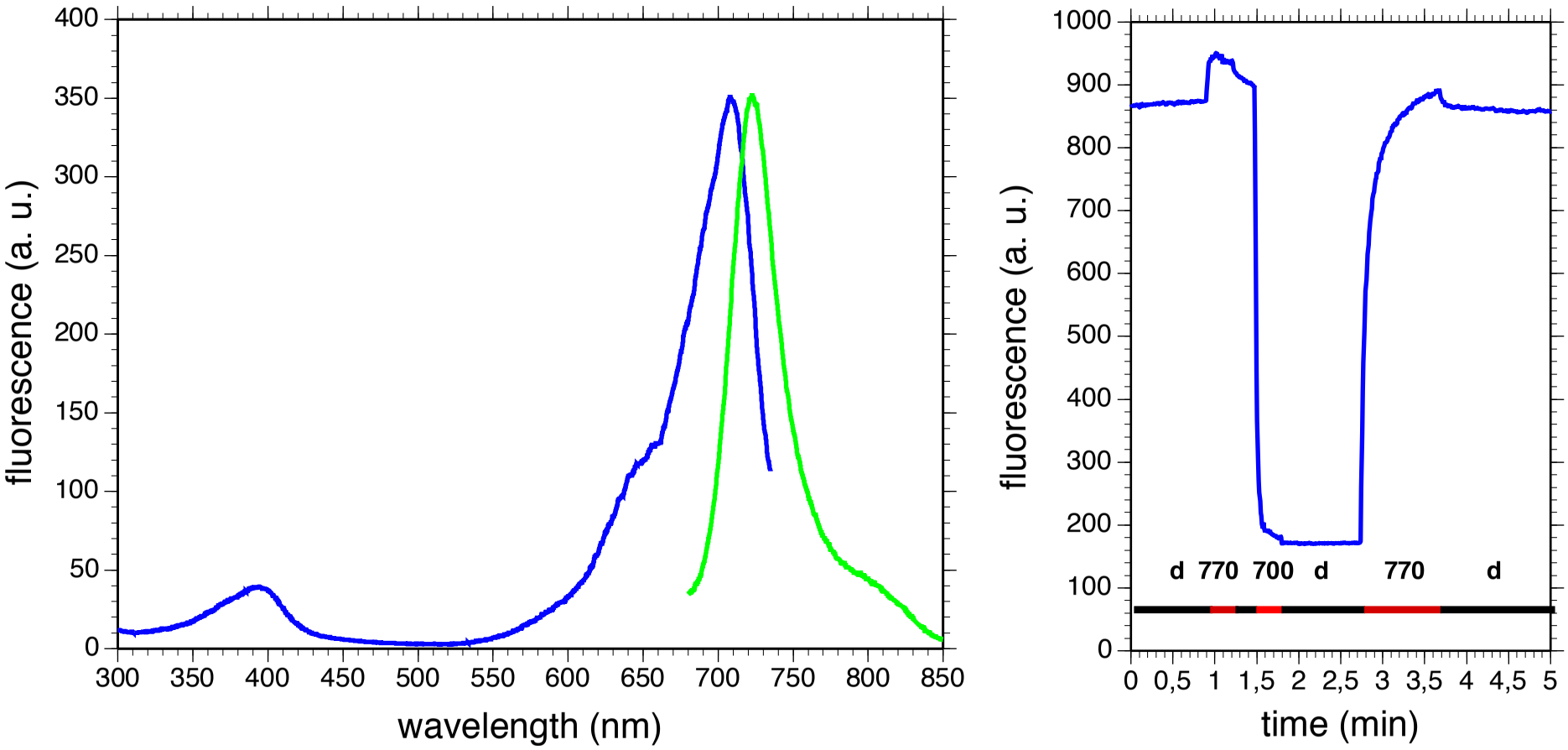
Zeng, X., Choudhary, M. and Kaplan, S. (2003). A second and unusual *pucBA* operon of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: genetics and function of the encoded polypeptides. *J Bacteriol* **185**, 6171-6184.

Annexes

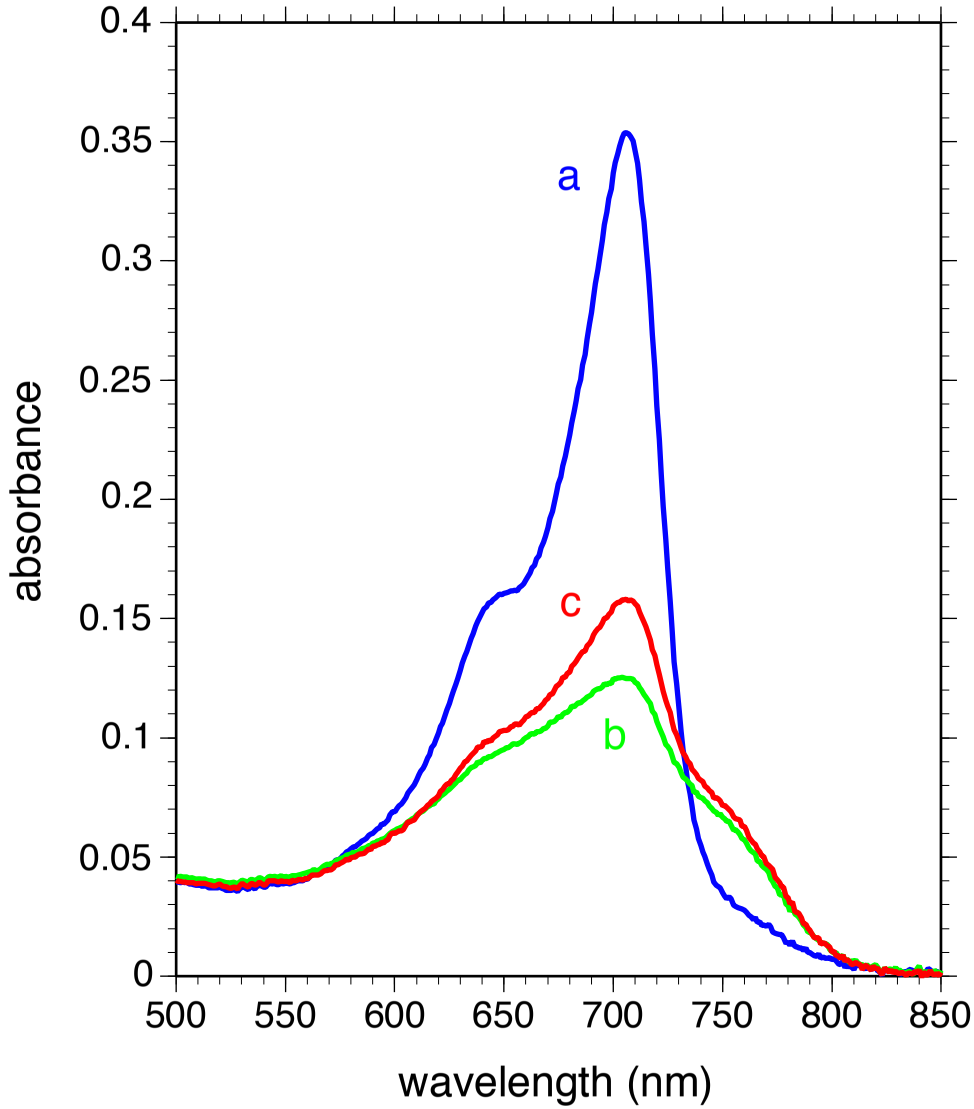
Suppléments Article 2



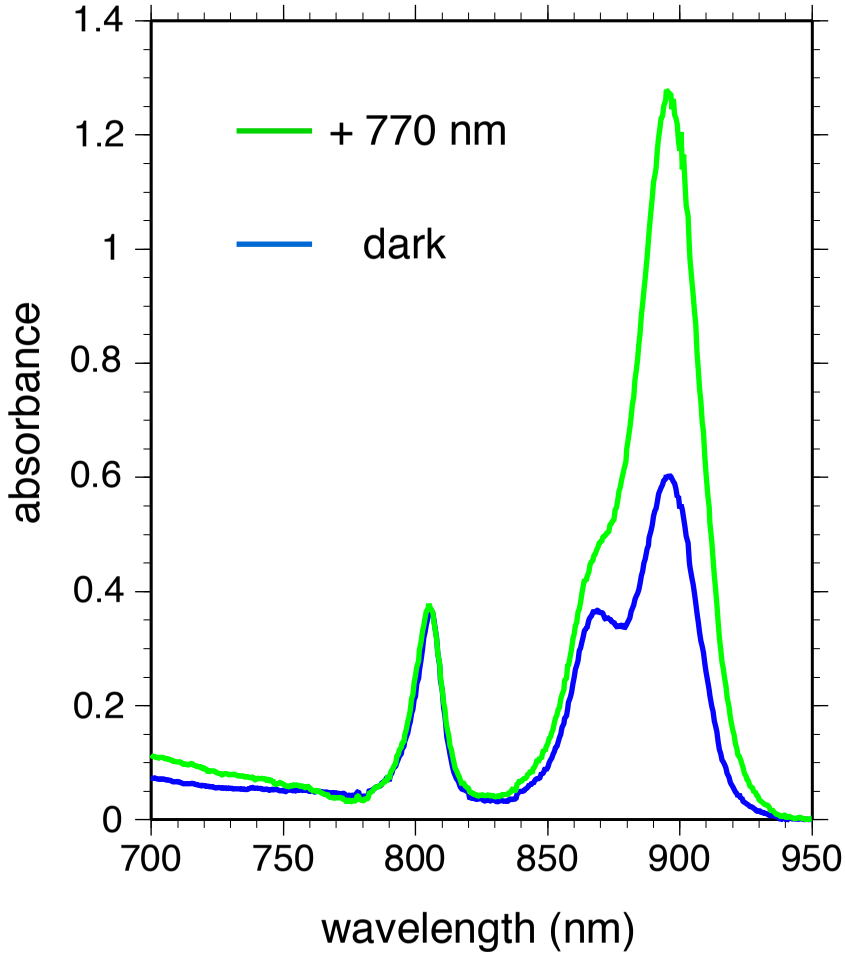
Supplementary Figure 1. Gel filtration experiments of *Rp*BphP4 from CEA001.
Elution profiles of gel filtration experiments carried out with the double mutant C472S-C722S of achromo-*Rp*BphP4 in 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0 in the absence (grey curve) or in the presence (dark curves of 10 mM DTT. A superimposed standard curve was calculated using the known molecular mass of four protein standards (black circles).



Supplementary Figure 2. Fluorescence properties of chromo-*Rp*BphP4 of BisB5.
Left part: Excitation(blue) and emission (green) spectra recorded at room temperature.
Right part: Fluorescence kinetics following a series of dark and light periods. The sample was placed in the dark for 15 min after a 770 nm illumination and was subsequently subjected to 20 s illumination with 770 nm light, 20 s of dark (d), 20 s of 700 nm illumination, 1 min of dark, 1 min of 770 nm light and then dark. The excitation and emission wavelengths were 390 nm and the 720 nm, respectively.



Supplementary Figure 3. Absorption spectra of purified HaA2 *Rp*BphP4.
Spectrum a (blue line) recorded 5 min after 770 nm illumination; spectrum b (green line) during a 705 nm illumination and spectrum c (red line) during illumination by both 705 and 770 nm light.



Supplementary Figure 4. Effect of light on the synthesis apparatus for WT and PpsR1 mutants of strain CEA001.

Absorption spectra recorded at 77K of intact cells of CEA001 grown at 1% oxygen tension in the dark (blue spectrum) or under 770 nm (green spectrum) illumination.

Suppléments Article 3

www.sciencemag.org/cgi/content/full/316/5829/1307/DC1

Supporting Online Material for

Legumes Symbioses: Absence of *Nod* Genes in Photosynthetic Bradyrhizobia

Eric Giraud,* Lionel Moulin, David Vallenet, Valérie Barbe, Eddie Cytryn, Jean-Christophe Avarre, Marianne Jaubert, Damien Simon, Fabienne Cartieaux, Yves Prin, Gilles Bena, Laure Hannibal, Joel Fardoux, Mila Kojadinovic, Laurie Vuillet, Aurélie Lajus, Stéphane Cruveiller, Zoe Rouy, Sophie Mangenot, Béatrice Segurens, Carole Dossat, William L. Franck, Woo-Suk Chang, Elizabeth Saunders, David Bruce, Paul Richardson, Philippe Normand, Bernard Dreyfus, David Pignol, Gary Stacey, David Emerich, André Verméglio, Claudine Médigue, Michael Sadowsky*

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: giraud@mpl.ird.fr; sadowsky@umn.edu

Published 1 June 2007, *Science* **316**, 1307 (2005)
DOI: 10.1126/science.1139548

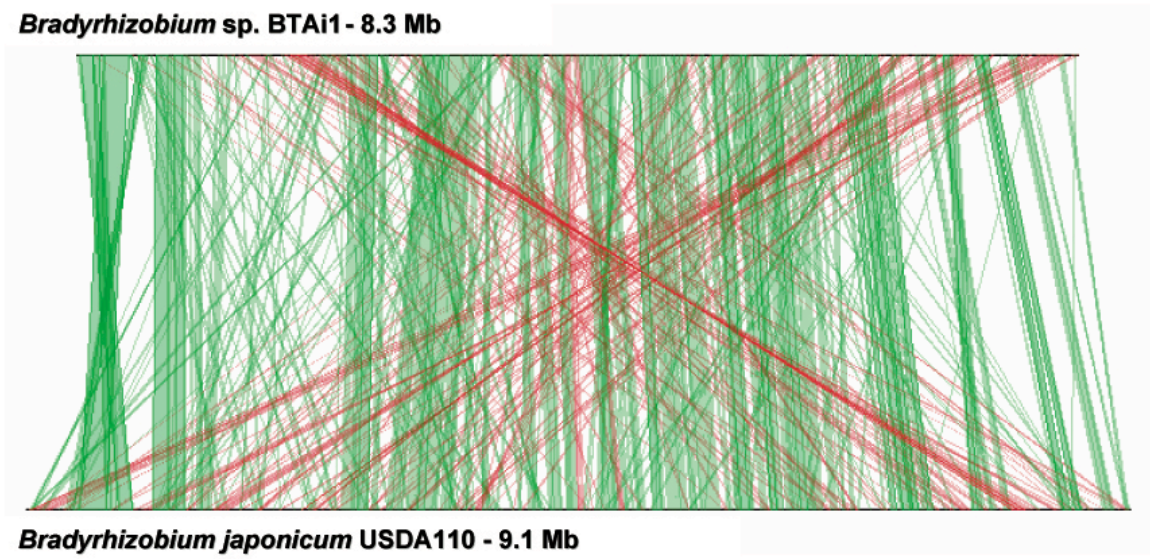
This PDF file includes

Materials and Methods
Figs. S1 to S4
Tables S1 to S3

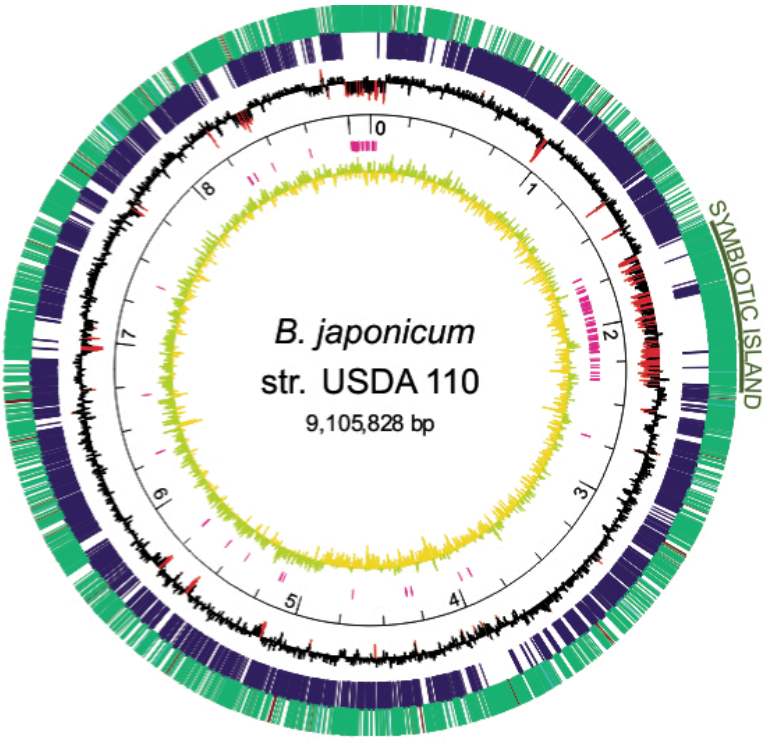
Supporting Online Materials

Materials and Methods

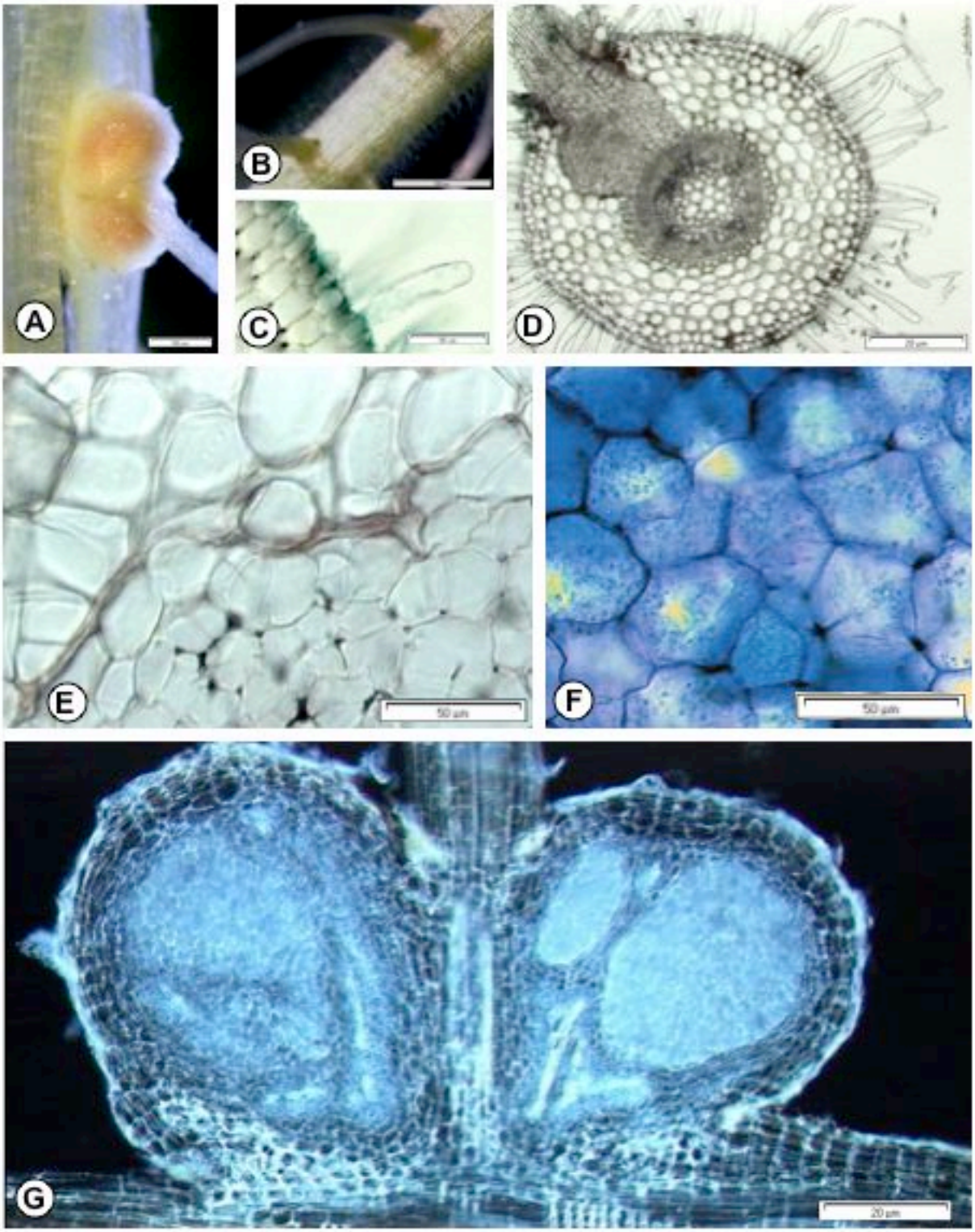
The genome of *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278 was sequenced at the Genoscope (Evry, France). Three libraries were made as follow: two plasmid libraries of 3 kb and 10 kb, obtained by mechanical shearing, were constructed at into pcDNA2.1 (InVitrogen, Carlsbad, CA,USA) and into pCNS home vector (pSU18 modified) respectively. One BAC library of average insert size of 30 kb was constructed by enzymatic digestion (BamH I) into modified pBeloBacII (CALTECH, Pasadena, CA, USA). Plasmid and BAC DNAs were purified and end-sequenced using dyeterminator chemistry on ABI3730xl DNA Analyzer sequencers (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). We generated 148,320 sequences from both ends of genomic clones from the three libraries. The Phred/Phrap/Consed software package (www.phrap.com) was used for sequence assembly and quality assessment. A total of 964 additional reactions were necessary to close gaps, including the transposing method (Entranceposon, Finnzymes, Finland) and to raise the quality of the finished sequence. After a first round of annotation, regions of lower quality as well as regions with putative frame-shifts were checked and, if necessary, re-sequenced from PCR amplification of the dubious regions. The genome of *Bradyrhizobium* sp. strain BTAi was sequenced at the Joint Genome Institute (JGI, Walnut Creek, CA, USA) using a combination of 3 kb, 8 kb and 40 kb (fosmid) DNA libraries. All general aspects of library construction and sequencing performed at the JGI can be found at http://www.jgi.doe.gov/. Draft assemblies were based on 89425 total reads. The Phred/Phrap/Consed software package (www.phrap.com) was used for sequence assembly and quality assessment. Gaps between contigs were closed by editing in Consed, custom primer walk or PCR amplification (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). A total of 1222 additional reactions were necessary to close gaps and to raise the quality of the finished sequence. The completed genome sequences of *Bradyrhizobium* sp. strain BTAi1 contains 90610 reads, achieving an average of 10-fold sequence coverage per base with an error rate less than 1 in 100,000.



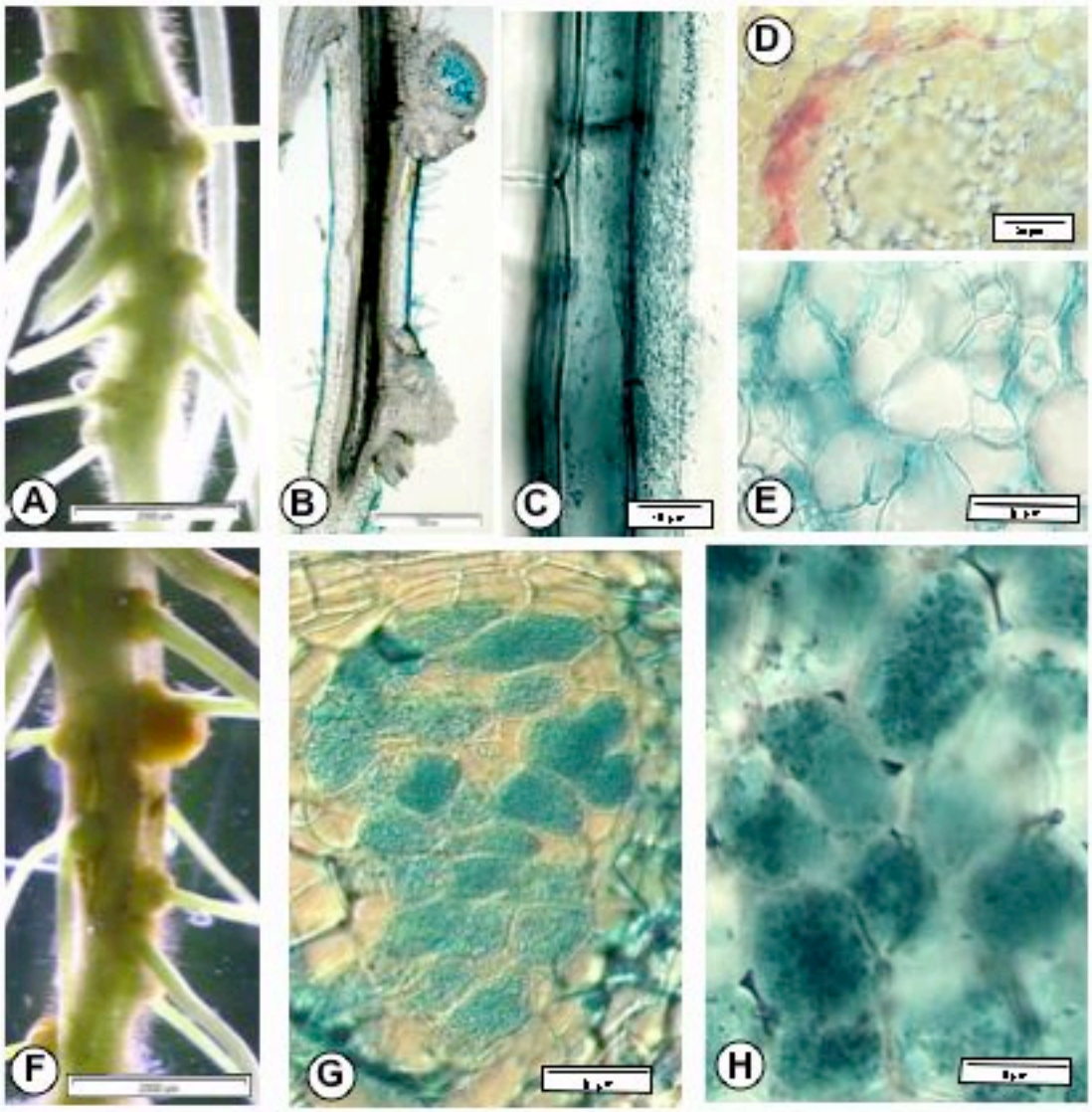
Supplementary Figure 1: Synteny plot between *Bradyrhizobium sp.* BTAi1 and *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 chromosomes; In this figure, synteny groups containing a minimum of three homologous genes are drawn in green for colinear regions, and in red for inverted regions.



Supplementary Figure 2: Circular representation of the *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 chromosome. Circles, from the inside out, show: (1) GC skew (G+C/G-C using a 1kb sliding window), (2) IS elements and transposases, (3) the coordinates in Mb beginning at 0 = oriC, and (4) GC deviation (mean GC content in a 1kb window – overall mean GC). Regions with a GC deviation less than 2-fold standard deviation are highlighted in red. Circles 5 and 6 show the gene content comparison between the ORS278, BTAi1 and B. japonicum USDA110 genomes using a similarity threshold of 40% identity, and a ratio of 0.8 of the length of the smallest protein: blue, backbone genes found in all three strains; red, genes present in ORS278 and USDA110, but absent from BTAi1; cyan, genes present in BTAi1 and USDA110, but not in ORS278.



Supplementary Figure 3: A to G: Steps leading to effective root nodulation of *Aeschynomene sensitiva* inoculated with *Bradyrhizobium* sp strain ORS278. A: Typical shape of red nitrogen-fixing root nodules of *A. sensitiva*, at the base of a lateral root. B and C: root surface colonization by a *puf lacZ*-tagged mutant of ORS278[12], cells are mainly localized in the cracks at outgrowth of lateral roots. D: root cross section at the site of protrusion of a lateral root. Note the straight, non-deformed root hairs at the surface of the root, and the nodule primordium initiated in the lateral root cortex. E: progression of infection threads towards the meristematic zone in the cortex of a young lateral root, viewed after longitudinal sectioning and Congo Red staining. F: a section through densely infected nodule cells filled with bacteroids viewed following toluidine blue staining. G: longitudinal section of two nodules at the emergence of a lateral root. Note that vascular bundles are connected to the bearing root when nodules are initiated on the lateral root.



Supplementary Figure 4: Nodulation of *Aeschynomene sensitiva* after inoculation with a *pur*L Xgluc-tagged mutant of *Bradyrhizobium* sp. strain ORS 278 (A to E) and after addition of adenosine monophosphate (AMP) (F and G). (A): general aspect of the nodules. (B): after longitudinal sectioning and Xgluc staining, massive bacterial proliferation is visible at the root surface (B and C). Nodules are poorly colonized (B) and higher magnification reveals that the mutants do not penetrate the plant cell, but proliferate in intercellular spaces (E) and they do not differentiate into bacteroids. After staining with Congo Red, bundles of infection threads are visible within intercellular spaces, around the meristematic zone (D). (F and G): addition of AMP restores the nodulation phenotype and nodule shape, similar to that seen with the wild-type strain. Sectioning and Xgluc staining reveals that nodule cells are densely packed with bacteroids (G).

Table S1. Putative Horizontally Acquired Islands (HAIs) found in ORS278 genome and their relevant characteristics

CDS identifiers	Island no	Size (kb)	Acquisition evidence	Relevant characteristics
Brado0292-0298	1	5.3	tRNA, transposase, codon usage	
Brado0438-0493	2	45	tRNA, GC deviation, integrase, recombinase, codon usage	Various metabolic enzymes
Brado0787-0846	3	66.7	tRNA, GC deviation, integrase, *tra* genes, intron gpII, codon usage	Chemotaxy operon
Brado1239-1316	4	90.9	tRNA, GC deviation, tra genes, codon usage, integrase, ParA	Peroxidase, bacteriophytochrome, gas vesicle proteins, general secretion type II system
Brado1375-1376	5	4.6	tRNA, GC deviation, codon usage	DNA modification enzymes
Brado2180-2296	6	131.4	tRNA, GC deviation, transposase, integrase, codon usage	General secretion type II system**,** RuBisCo, carboxysome, enzymes involved in EPS biosynthesis and export, large exoprotein
Brado3208-3220	7	13.3	tRNA, GC deviation, codon usage, integrase	ATPase
Brado3261-3267	8	3.1	tRNA, integrase, codon usage	
Brado3599-3660	9	44.2	tRNA, GC deviation, integrase, codon usage	
Brado3882-3900	10	15.0	tRNA, GC deviation, codon usage	Various metabolic enzymes
Brado3923-3943	11	11.3	tRNA, GC deviation, resolvase, codon usage	Various metabolic enzymes
Brado4367-4414	12	63.3	tRNA, GC deviation, codon usage, phage tail region	Multidrug efflux pump, various metabolic enzymes
Brado4805-4826	13	27.3	Repeat region, specific to ORS278	Transporters, enzymes involved in EPS biosynthesis, Various metabolic enzymes
Brado5156-5197	14	48.1	GC deviation, codon usage	Enzymes involved in LPS modifications
Brado5293-5318	15	22.9	GC deviation, codon usage	Transporters
Brado5519-5523	16	6.0	tRNA, GC deviation, codon usage	Peptidase
Brado5843-5891	17	51.1		Enzymes for N assimilation (urease, amidase, glutamate synthase), sarcosine oxidase
Brado6191-6212	18	29.1	tRNA, GC deviation, integrase, transposase, tra genes, codon usage	Acyltransferase, glycosyltransferase, dehydrogenase, toxin secretion system, large exoprotein
Brado6364-6418	19	46.5	tRNA, GC deviation, recombinase, integrase, parA, traG, codon usage	Amidohydrolase, beta-lactamase, nitrilase, ATPase
Brado6921-6949	20	38.5	tRNA, GC deviation, transposase, integrase, codon usage	Toxin secretion system, large exoprotein,
Brado6987-7068	21	97.3	GC deviation, transposase, partition protein, codon usage	Chemotaxis operon, toxin secretion system, enzymes involved in EPS/LPS modifications and export

Abbreviations: EPS: exopolysaccharide; LPS: lipopolysaccharide

Table S2. Putative Horizontally Acquired Islands (HAIs) found in BTAi1 genome and their relevant characteristics

CDS identifier	Island no	Size (kb)	Acquisition evidence	Relevant characteristics
BBta0430-0482	1	43.7	tRNA, GC deviation, *tra* genes, transposase, recombinase, codon usage	RuBisCo, Calvin cycle enzymes, uptake hydrogenase
BBta0580-0636	2	54.8	tRNA, GC deviation, integrase, transposase, codon usage	Siderophore, beta-lactamase
BBta0985-1094	3	148.1	tRNA, codon usage, GC deviation	Enzymes involved in LPS modification, non-ribosomal peptide synthetases
BBta1156-1159	4	6.3	Codon usage, GC deviation	DNA modification enzyme, endonuclease
BBta1215-1273	5	58.4	tRNA, GC deviation, transposase, IS, primase, integrase, codon usage	Various metabolic enzymes, endonuclease
BBta1392-1609	6	193.2	tRNA, GC deviation, recombinase, integrase, transposase, conjugal transfer system, codon usage	ATP synthase, Multidrug efflux pump, chemotaxis operon, aromatic compounds degradation
BBta1884-1982	7	97.3	tRNA, GC deviation, transposase, codon usage	Peroxidase, enzymes for N assimilation (urease, glutamine synthetase I), sarcosine oxidase,
BBta2494-2665	8	180.4	tRNA, codon usage, transposase	Metabolic enzymes, Carbon monoxide dehydrogenase, Rubisco, carboxysome, General secretion type II system
BBta3101-3124	9	26.4	Codon usage, integrase	Beta-lactamase
BBta3310-3456	10	141.0	GC deviation, transposase, plasmid stabilization protein, antirestriction protein ardC, conjugal transfer system, codon usage	Metal cation efflux system, type I secretion protein, thioredoxin
BBta3615-3624	11	6.3	Codon usage	
BBta3638-3658	12	16.1	Codon usage	Metal cation efflux system
BBta3691-3710	13	35.1	Codon usage	Non-ribosomal peptide synthetases
BBta3894-3914	14	17.9	tRNA, transposase, codon usage, GC deviation	Various metabolic enzymes
BBta4107-4114	15	12.5	tRNA, codon usage	Type I Secretion system, sugar modification enzymes, non-ribosomal peptide synthetase
BBta4174-4185	16	6.8	tRNA, transposase, codon usage	
BBta4822-4890	17	73.5	tRNA, plasmid stabilization protein, transposase	Transporters, Various metabolic enzymes
BBta4932-4987	18	47.8	tRNA, GC deviation, integrase, transposases, codon usage	Endonuclease
BBta5436-5445	19	7.8	Codon usage, plasmid stabilization protein	Beta-lactamases
BBta5740-5806	20	56.9	GC deviation, Phage tail and head proteins, integrase, terminase, codon usage	TRAP-type C4-dicarboxylate transport system, peptidases
BBta6000-6039	21	45.4	tRNA, GC deviation, integrase, transposase, codon usage	Various metabolic enzymes, Nitric oxide reductase, D-hydantoinase
BBta6353-6385	22	35.8	tRNA, GC deviation, P4-like integrase, transposases, traA, excisionase, codon usage	Phosphate/phosphonate ABC transporters, Various metabolic enzymes
BBta6534-6540	23	8.5	Intron group II, reverse transcriptase maturase, codon usage	
BBta6566-6635	24	51.7	tRNA, Phage proteins, primase, integrase, terminase, codon usage	DNA modification enzyme, peptidase
BBta6726-6757	25	31.9	GC deviation, Transposase, Integrase, phage tail proteins, codon usage	Chemotaxis operon
BBta6808-6820	26	55.3	tRNA, GC deviation, transposase, codon usage	Non-ribosomal peptide synthetases
BBta7219-7322	27	108.7	tRNA, GC deviation, transposase, integrase, resolvase, ParB-like nuclease, exoDNAse, codon usage	Flagellar proteins, metal cation efflux system
BBta7387-7473	28	83.1	GC deviation, integrase, RadC, RepA, conjugal transfer system	Metal transporter
BBta7689-7820	29	113.7	tRNA, GC deviation, ParB, RepA, conjugal transfer system (tra/trb)	Various metabolic enzymes, chaperone proteins (ClpB, DnaK)

Table S3. Candidate genes putatively involved during the symbiotic interaction of ORS278 and BTAi1 strains with their host plants.

Phytohormones & signalling molecules			
	ORS278	BTAi1	Taxonomic Distribution
Indoleacetamide hydrolase (auxin synthesis)	Brado1769	BBta2081	Homolog in *B. jap.*
Indole-3-pyruvate decarboxylase (auxin synthesis)	Brado7016	BBta0512	Only one homolog in *Azospirillum*
Geranylgeranyl pyrophosphate synthetase (synthesis of GGPP, gibberelin precursor)	Brado1615 Brado6509	BBta6440	Specific to photosynthetic bacteria
ACC deaminase (ethylene degradation)	Brado3803	BBta4127	Homologs in *B. jap.* and *M. loti*
Putative salicylate hydroxylase *nahG*	Brado2935	BBta5237	Homologs in various rhizobia
LPS and exopolysaccharide biosynthesis			
Exopolysaccharide production protein exoY-like	Brado4757	BBta1032	Homologs in various rhizobia
Putative glycosyl transferase, WecB/TagA/CpsF family	Brado4814	BBta1010	Specific to ORS278 and BTAi1
dTDP-L-rhamnose synthetase (*rfbC*-like)	Brado4830	BBtaI1049	Homologs in various rhizobia
Putative sugar nucleotide epimerase/dehydratase	Brado4832	BBtaI1046	Specific to ORS278 and BTai1
Putative CDP-glucose pyrophosphorylase	Brado4835	BBtaI1052	Homologs found in *A. tum and B. jap.* identity<40%
Putative O-linked N-acetylglucosamine transferase, SPINDLY family	Brado5150	BBta5617	Homologs in *B. jap.* and *R. pal.*
Putative O-linked N-acetylglucosamine transferase, SPINDLY family	Brado5151	BBta5618 BBta5619	Homologs in *B. jap.* and *R. pal.*
Putative mannose-1-phosphate guanyltransferase (capsular polysaccharide biosynthesis protein)	Brado5152	BBta5620	Homologs in various rhizobia
Putative nucleotide sugar epimerase (Capsular polysaccharide biosynthesis protein)	Brado5153	BBta5621	Homologs in various rhizobia
Putative UDP-glucose/GDP-mannose dehydrogenase (Capsular polysaccharide biosynthesis protein)	Brado5154	BBta5622	Homologs in *B. jap.* and *M.loti* but identity <40%
Putative acyltransferase (O-antigen acetylase)	Brado5157	BBta5647	Homologs in *S. meliloti* and *R. etli* but identity <35%
Putative Alginate biosynthesis protein	Brado5161	BBta5628	Homologs in *B. jap.* and *M.*loti but identity <40%
Putative bifunctional enzyme (sugar kinase/cytidylyltransferase)	Brado5164	BBta5631	Homolog in *R. pal.*
Putative sugar-nucleotide epimerase/dehydratase	Brado5166	BBta5633	Homolog in *R. pal.*
Putative Phosphoheptose isomerase	Brado5167	BBta5634	Specific to ORS278 and BTAi1
Putative dTDP-glucose 4,6-dehydratase	Brado5168	BBta5635	Homolog in *R. pal.*
Putative Glycosyl transferase, G2	Brado5197	BBta5664	Specific to ORS278 and BTAi1
Putative Glycosyl transferase, G4	Brado5198	BBta5665	Homologs in *B. jap.* and *R. pal*
Putative polysaccharide biosynthesis protein (*capD*-like)	Brado5199	BBta5666	Homologs in *B. jap. , M. loti* and *R. pal.*
Putative O-antigen ligase (*Rfa*L-like)	Brado5200	BBta5667	Homolos in *B. jap.*
Bifunctional protein (*rfa*E) ADP-L-glycero-beta-D-manno-heptose biosynthesis	Brado5201	BBta5668	Homologs in *B. jap. , M. loti* and *R. pal.*
ADP-L-glycero-D-mannoheptose-6-epimerase (*rfaD*)	Brado5202	BBta5669	Homologs in *B. jap. , M. loti* and *R. pal.*
ADP-heptose--LPS heptosyltransferase II (*rfa*F)	Brado5203	BBta5670	Homologs in *B. jap. , M. loti* and *R. pal*
Phosphoheptose isomerase (Sedoheptulose 7-phosphate isomerase) (*gmh*A)	Brado5204	BBta5671	Homologs in *B. jap. , M. loti* and *R. pal*
Lipopolysaccharide core biosynthesis mannosyltransferase (*lpc*C)	Brado5206	BBta5673	Homolog in *B. jap.*
Galactowaldenase (*gal*E)	Brado5207	BBta5674	Homologs in *B. jap. , M. loti* and *R. pal*
RfbABCD (biosynthesis of dTDP-L-rhamnose)	Brado7026-29	BBta1070-73	This gene cluster is found in various rhizobia but not in *B. jap.*
Putative exopolysaccharide biosynthesis protein	Brado7056	BBta1034	Homologs in *B. jap., R etli* and *R. pal*
Putative O-antigen polymerase	Brado7058	BBta1029	Homologs in *B. jap., R etli* and *R. palustris*
Putative polysaccharide export protein	Brado7059	BBta1028	Homologs in *B. jap., R etli* and *R. pal*
Putative 1,4-alpha-glucan branching enzyme	Brado3025	BBta5116	Specific to ORS278 and BTAi1
Putative beta-(1-3)-glucosyl transferase, ndvB-like	Brado3754	BBta4173	Homologs in *B. jap.* and *R. pal*
Putative cyclic beta-1-3, beta-1-6-glucan synthesis regulatory protein, *ndv*D-like	Brado3755	BBta4172	Homologs in *B. jap.* and *R. pal*
Putative beta (1-6) glucans synthase, *ndv*C-like	Brado3757	BBta4171	Homologs in *B. jap.* and *R. pal*

Abbreviations: *B. jap* : *Bradyrhizobium japonicum* USDA110; *R. pal* : *Rhodopseudomonas palustris* strains CGA009, BisB5, BisB18, HaA2; *R. etli* : *Rhizobium etli* CFN42 ; M. loti : *Mesorhizobium loti* MAFF303099; *A. tum*: *Agrobacterium tumefaciens* C58.

Suppléments Article 4

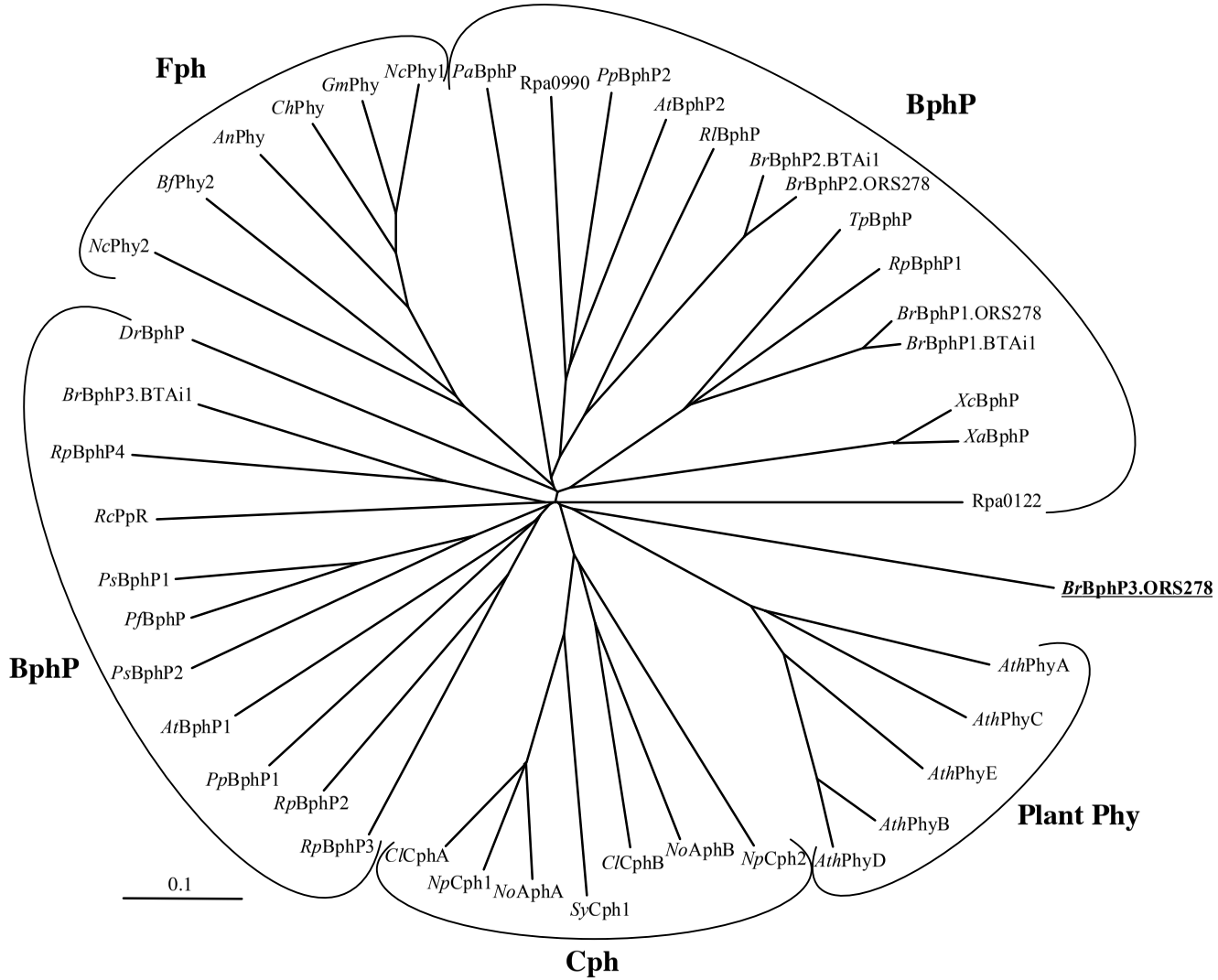


Figure 1: Phylogenetic tree based on the whole photosensory module, PAS-GAF-PHY

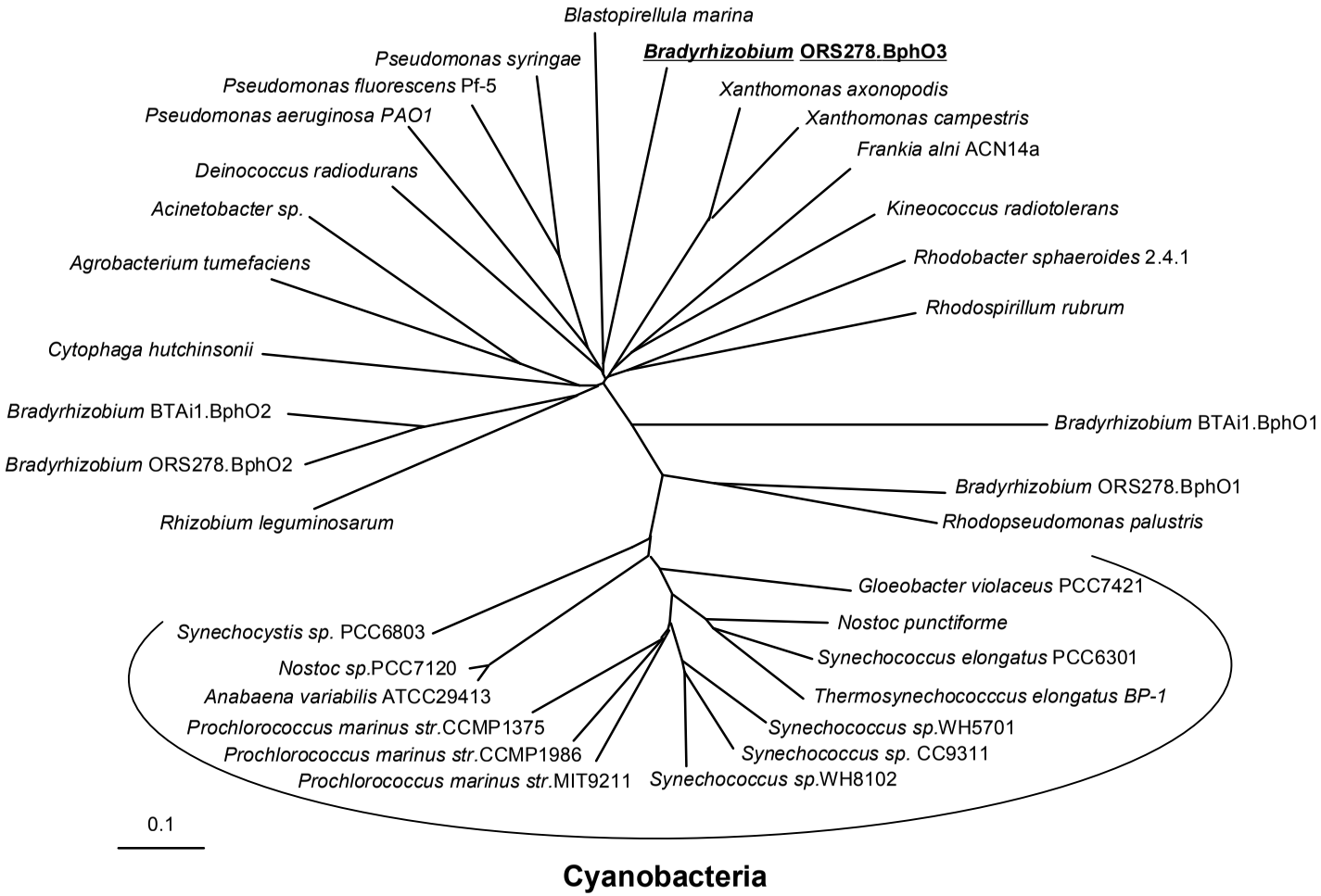


Figure 2: Phylogenetic tree based on the heme oxygenases

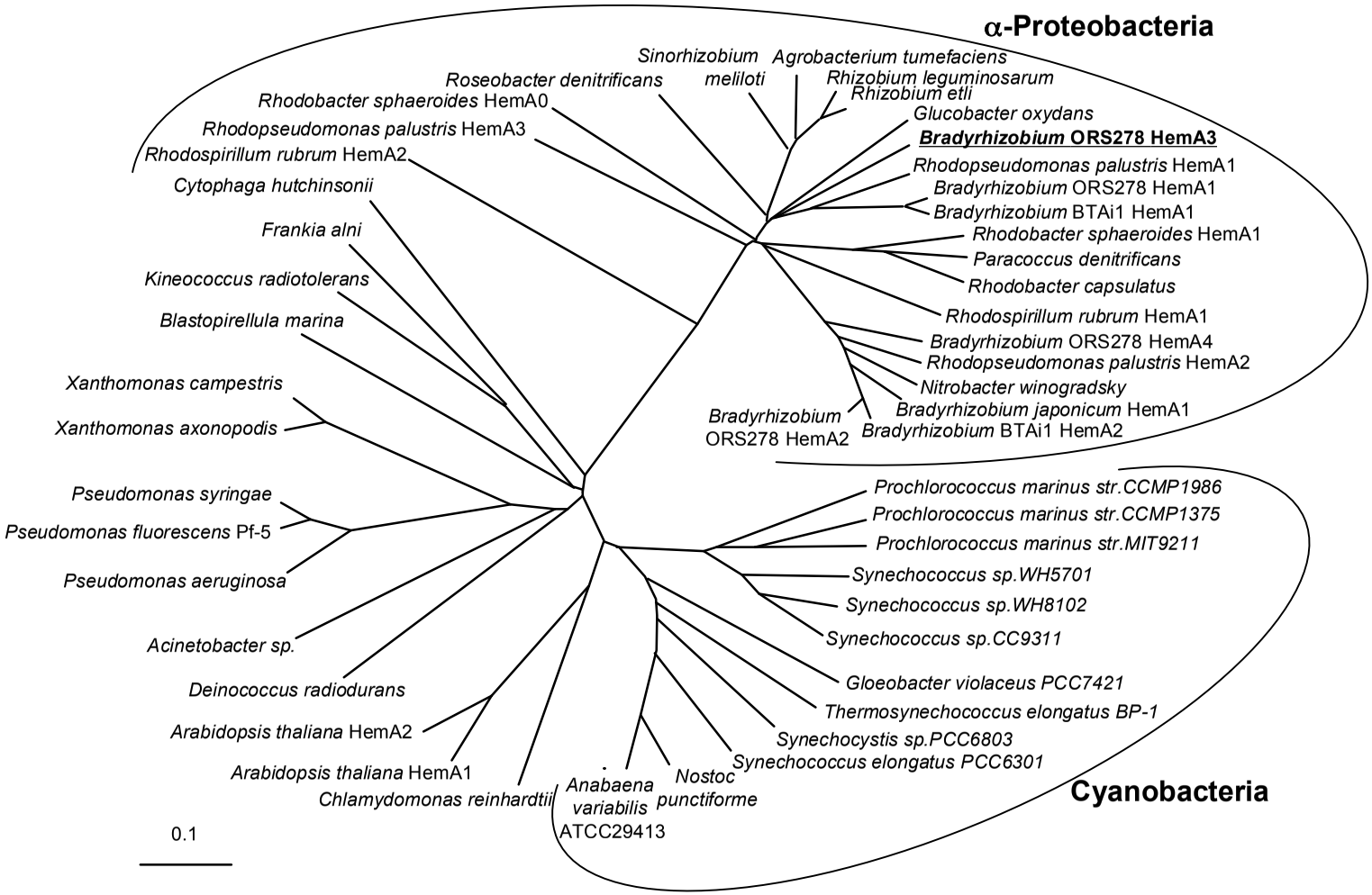


Figure 3: Phylogenetic tree based on 5-aminolevulinate synthases

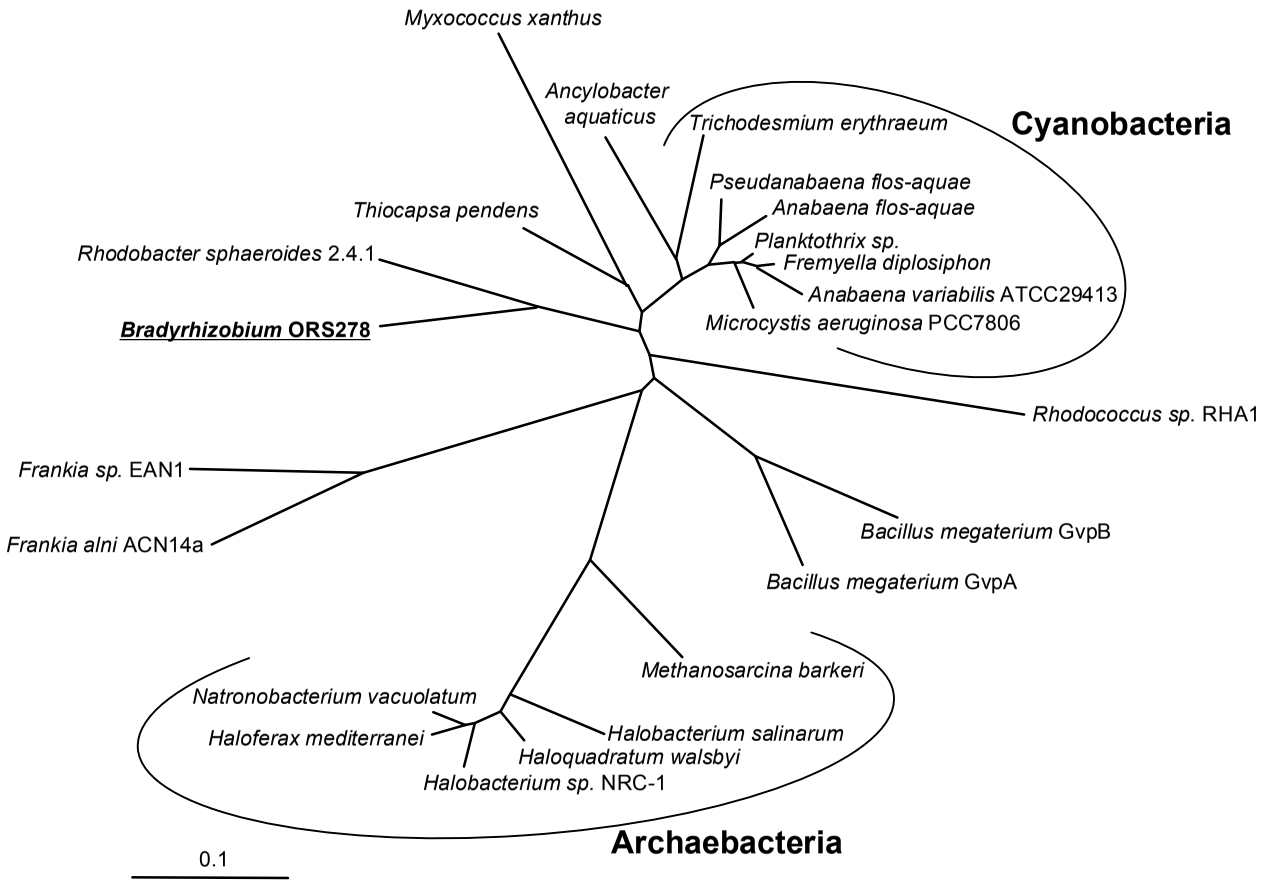


Figure 4: Phylogenetic tree based on the gas vesicles proteins

Article 5

+ model
ARTICLE IN PRESS
BBABIO-45962; No. of pages: 10; 4C: 4
Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Biochimica et Biophysica Acta xx (2007) xxx – xxx
Biochimica et Biophysica Acta BBA
www.elsevier.com/locate/bbabio

Dual role for a bacteriophytochrome in the bioenergetic control of *Rhodopsdeudomonas palustris*: Enhancement of photosystem synthesis and limitation of respiration

Mila Kojadinovic [a], Aurélie Laugraud [b], Laurie Vuillet [c], Joël Fardoux [c], Laure Hannibal [c], Jean-Marc Adriano [a], Pierre Bouyer [a], Eric Giraud [b], André Verméglio [a,*]

[a] *CEA Cadarache, DSV/IBEB/SBVME/LBC, UMR 6191 CNRS/CEA/Univ Aix-Marseille, Saint-Paul-lez-Durance, F-13108 France*
[b] *Université Lyon 1, Pôle Rhone-Alpin de Bioinformatique, UMR 5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, 43 boulevard du 11 novembre 1918, Villeurbanne, F-69622, France*
[c] *Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, IRD, CIRAD, AGRO-M, INRA, UM2. TA A-82/J, Campus de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France*

Received 17 July 2007; received in revised form 30 August 2007; accepted 4 September 2007

Abstract

In the purple photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris*, far-red illumination induces photosystem synthesis via the action of the bacteriophytochrome *Rp*BphP1. This bacteriophytochrome antagonizes the repressive effect of the transcriptional regulator PpsR2 under aerobic condition. We show here that, in addition to photosystem synthesis, far-red light induces a significant growth rate limitation, compared to cells grown in the dark, linked to a decrease in the respiratory activity. The phenotypes of mutants inactivated in *Rp*BphP1 and PpsR2 show their involvement in this regulation. Based on enzymatic and transcriptional studies, a 30% decrease in the expression of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex, a central enzyme of the Krebs cycle, is observed under far-red light. We propose that this decrease is responsible for the down-regulation of respiration in this condition. This regulation mechanism at the Krebs cycle level still allows the formation of the photosynthetic apparatus via the synthesis of key biosynthesis precursors but lowers the production of NADH, i.e. the respiratory activity. Overall, the dual action of *Rp*BphP1 on the regulation of both the photosynthesis genes and the Krebs cycle allows a fine adaptation of bacteria to environmental conditions by enhancement of the most favorable bioenergetic process in the light, photosynthesis versus respiration.
© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Bacteriophytochrome; Photosynthesis; Respiration; Alpha-ketoglutarate; Regulation; *Rhodopseudomonas palustris*

1. Introduction

Due to their extraordinary metabolic versatility, photosynthetic bacteria can grow with or without oxygen, via aerobic or anaerobic respirations and photosynthesis. To benefit from this flexibility and take advantage of available resources, these bacteria have to rapidly adapt and respond to variations in their environment. This requires sensing changes in light and oxygen concentration since the regulation between photosynthesis and respiration is of prime importance for their energetic fitness (for review see [1–3]). This regulation occurs at two different levels.

Short-term interactions between the electron carriers enable photosynthetic bacteria to utilize the most favorable bioenergetic process in the light, i.e. photosynthesis. Consequently, light strongly inhibits respiratory activity [4] by two non-exclusive mechanisms. The first is an indirect effect of the light-induced proton motive force on complexes involved in the respiratory activity in particular at the level of complex I [5–7]. The second mechanism involves a direct competition between electron carriers common to both photosynthetic and respiratory chains (ubiquinone, the cytochrome bc_1 complex or the cytochrome c_2) [8,9].

On the transcriptional level, regulations of the synthesis of the bioenergetic chains in purple bacteria involve several redox and light sensors [3,10,11]. The sensor kinase RegB and its

* Corresponding author. Fax: +33 442254701.
E-mail address: avermeglio@cea.fr (A. Verméglio).

0005-2728/$ - see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bbabio.2007.09.003

Please cite this article as: M. Kojadinovic, et al., Dual role for a bacteriophytochrome in the bioenergetic control of *Rhodopsdeudomonas palustris*: Enhancement of photosystem synthesis and limitation of respiration, Biochim. Biophys. Acta (2007), doi:10.1016/j.bbabio.2007.09.003

response regulator RegA are responsible for the global transcriptional control of aerobic and anaerobic metabolic processes in response to the redox state of the cell (for review see [12]). In addition, specific aerobic regulators of the expression of photosynthesis genes have been described in several photosynthetic bacteria. The transcriptional factors PpsR (or CrtJ) act as repressors of the synthesis of the photosynthetic apparatus under high aeration in *Rhodobacter* (*Rb.*) *sphaeroides* [13], *Rb. capsulatus* [14], and *Rhodopseudomonas* (*Rps.*) *palustris* [15,16]. A more complex role has however been reported in the case of *Rubrivivax gelatinosus* where this transcriptional factor represses some photosynthesis genes or activates others [17]. The aerobic photosynthetic bacterium *Bradyrhizobium* ORS278 possesses two distinct proteins, PpsR1 and PpsR2, which have opposite effect on the synthesis of the photosynthetic apparatus, the O_2-sensitive PpsR1 being an activator whereas the O_2-insensitive PpsR2 acts as a repressor [10,18].

To date, two types of photoreceptors have been documented as regards to the light regulation of the synthesis of the photosynthetic apparatus of purple bacteria. (i) AppA, a blue light receptor, represses the photosynthetic genes expression in *Rb. sphaeroides* [19–21]. (ii) A bacteriophytochrome, present in *Rps. palustris* (*Rp*BphP1) and *Bradyrhizobium* (*Br*BphP), has been shown to trigger the synthesis of the entire photosynthetic apparatus under aerobic conditions by antagonizing the repressing effect of PpsR2 [10,15,22]. In addition to this bacteriophytochrome, two others, *Rp*BphP2 and *Rp*BphP3, act in tandem in *Rps. palustris* to control the synthesis of LH4 complexes [23,24], characterized by a single absorption band in the near infra-red at 800 nm [25].

The sequencing of the complete genome of *Rps. palustris* CGA009 has revealed the presence of 3 other putative bacteriophytochromes and a large number (451) of putative regulatory and signaling genes, corresponding to 9.3% of its genome as compared to the usual 5–6% for free-living bacteria [26]. This makes *Rps. palustris* an excellent model to study the adaptability of a photosynthetic bacterium in response to environmental changes.

In the present work, we demonstrate that *Rp*BphP1, in addition to its up regulation of the photosynthetic units, down-regulates the respiratory activity under far-red illumination. This regulation also involves the transcriptional regulator PpsR2. We propose that this down-regulation of the respiratory activity is linked to a decrease in the expression of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex, a central enzyme of the Krebs cycle. This regulation at the Krebs cycle level both decreases respiratory activity but still allow the synthesis of key biosynthesis precursors for the formation of the photosynthetic apparatus. This mechanism allows a fine adaptation of bacteria to environmental conditions by enhancement of photosynthesis activity versus respiration, i.e. the most favorable bioenergetic process in the light.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strain and growth conditions

The WT strain CEA001 and the various mutants of *Rps. palustris* were grown in a modified photosynthetic medium (PM) [27] by addition of 20 mM ammonium malate as additional carbon and nitrogen sources, and growth factors containing vitamins in proportion used in Hutner medium [28]. Bacteria were grown either in the dark or under 770 nm illumination provided by light emitting diodes (100 μmol of photon/s/m^2, half-peak bandwidth of 25 nm). When indicated, additional actinic illumination was provided by light emitting diodes (875 nm, 1500 μmol of photon/s/m^2, half-peak bandwidth of 25 nm). Pure N_2 and air were mixed using mass-flow controller (Brooks) in order to obtain the appropriate O_2 tension ranging from 1% and 21%. The gas mixtures were flushed in the gas phase of Erlenmeyer flasks of 250 ml. To obtain a good equilibrium between the gas and the liquid phases, the Erlenmeyer flasks contained only 50 ml of growth medium and were shaken at 140 rpm. Cells, inoculated at an initial concentration of $OD_{660}=0.1$, were collected at various times ranging from 8 h to 160 h for absorption spectra recording, respiratory activity determination, RNA extraction and alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex activity determination.

2.2. Absorption spectra and photosystem synthesis measurements

Absorption spectra of intact cells of the WT strain and of the various mutants were recorded with a Cary 50 spectrophotometer. The relative amount of photosystem was determined by integrating the Qy bacteriochlorophyll absorption bands between 700 and 950 nm for suspension of intact cells collected at different times and growth conditions.

2.3. Bacterial growth

Bacterial growth was determined by recording the optical density at 660 nm (OD_{660}) in function of time. This wavelength was chosen because it only depends upon the bacteria light scattering and not to the presence of bacteriochlorophyll molecules which do not absorb in this spectral range. Correlation between OD_{660} and bacterial concentration was determined by plating serial dilutions of the bacterial suspensions and counting the CFU/ml.

2.4. Respiratory activity measurements

The respiratory activity of intact cells was determined using a Clark electrode (Hansatech, Great Britain). Prior to the measurements the cells were harvested and suspended in fresh modified PM medium. The respiratory activity of each strain was normalized to the same number of cells (determined by recording the OD_{660}). The total cytochrome oxidase activity was tested by the addition of tetramethylparaphenylene diamine (TMPD) at a saturating concentration of 100 μM.

2.5. Construction of RpBphP1, RpBphP5, RpBphP6 and ppsR2 mutant strains

The construction of the *RpBphP1*, and *ppsR2* mutants of *Rps. palustris* CEA001 strain has been previously described [15]. The *RpBphP5.CEA001* null mutant was obtained by inserting the *lac*Z-Km^r cassette directly into the unique *Bam*H1 site of the *RpBphP5* gene. To create the *RpBphP6. CEA001* null mutant, a *Sal*I fragment of 39-bp inside the gene was deleted and replaced by the *lac*Z-Km^r cassette of pKOK5 [29]. These constructs were introduced into the pJQ200 suicide vector [30] and delivered by conjugation into the corresponding *Rps. palustris* strain as described [15]. Double recombinants were selected on sucrose and confirmed by PCR.

2.6. RNA extraction

Bacterial cells were collected during dark and 770 nm exponential phases (between 20 h and 25 h of growth corresponding to $OD_{660\ nm}=0.6–0.9$ for dark-grown bacteria, $OD_{660\ nm}=0.4–0.5$ for 770 nm grown bacteria). Two volumes of RNAprotect™ Bacteria Reagent (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) were added to one volume of bacterial culture for RNA stabilization. Cells were harvested (5000×*g*, 10 min, room temperature) and kept at −80 °C. Total RNA extraction was performed from 10^9 bacteria using the Nucleospin RNA II kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer's procedures except for the first lysis step. Indeed, *Rps. palustris* cells being resistant to lysozyme digestion, cells were resuspended in RA1 buffer from the Nucleospin

Please cite this article as: M. Kojadinovic, et al., Dual role for a bacteriophytochrome in the bioenergetic control of *Rhodopsdeudomonas palustris*: Enhancement of photosystem synthesis and limitation of respiration, Biochim. Biophys. Acta (2007), doi:10.1016/j.bbabio.2007.09.003

RNA II kit and broken at 2.3 kbar using a Constant Cell Disruption System (Constant Cell Disruption Systems LTD, Daventry, United Kingdom). Residual genomic DNA was digested using the DNA-free™ kit (Ambion INC, Austin, TX, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.7. Real-Time RT-PCR

Reverse transcription was performed using the TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (Takara Bio INC, Shiga, Japan) in a total volume of 10 μL containing 300 ng total RNA following the manufacturer's instructions. The reaction mixture was subjected to subsequent incubation steps: 10 min at 30 °C, 30 min at 42 °C, 5 min at 99 °C and 5 min at 5 °C. Gene expression analysis was performed on the ABI Prism 7000 Sequence detection system using the SDS 1.0 application software (Applied Biosystems). Primers, summarized in Table 1, were designed using the software eprimer3 (http://bioportal.cgb.indiana.edu/cgi-bin/emboss/eprimer3). Quantitative PCR was performed using the qPCRTM Mastermix Plus for SYBR Green I (Eurogentec, Seraing, Belgium). Assays were performed in a 25-μl final volume with 12.5 μl of 2X Master Mix SYBR Premix, 0.2 μM of each primer and 5 μl of 50 fold diluted cDNA or water for the negative control. Thermal cycling conditions were as follows: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C followed by 40 repeats of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. Specificity of the PCR product was confirmed by melting curve analysis.

Gene expression was analyzed by relative quantification using the control transcripts of *rpoD* (*rpa1288*, encoding the RNA polymerase sigma subunit), *rnpO* (*rpa2692*, encoding the RNA polymerase omega subunit) and *16s rrna* (encoding 16S ribosomal RNA) used as internal standards in several bacteria [31–34]. Prior to 16S quantification, cDNA were diluted 1/500 to obtain results in the confidence range of the technique [31]. The primer efficiency was determined by performing calibration curves using genomic DNA template over 5 orders of magnitude. Calibration curves with linearity R^2 superior to 0.99 were considered and primers with efficiencies superior to 90% were used. Gene expression was expressed as normalized gene expression under 770 nm relative to normalized gene expression in the dark using the efficiency corrected Ct model [35]. Since the three internal standards gave similar tendencies upon gene expression quantification, only results obtained with *rpoD* are shown in this report. Three to five different experiments were performed for each gene quantification. For each of these experiments, the RT-PCR assays were done in triplicate.

2.8. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex activity

Cell extracts were prepared following a modified procedure of Beatty and Gest [36]. Bacteria in exponential phase (around 21 h of growth, $OD_{660} \sim 0.7$ for dark-grown bacteria, $OD_{660} \sim 0.45$ for 770 nm grown bacteria) were harvested by centrifugation, washed and resuspended in 50 mM phosphate buffer, pH 7. Cells were broken in Constant Cell Disruption System (Constant Cell Disruption Systems LTD, Daventry, United Kingdom) under a 2.3-kbar pressure. Extracts were centrifuged at 30,000×*g* for 10 min and the supernatant was then centrifuged 1 h 30 at 150,000×*g*. The pellet corresponding to membranes was resuspended in phosphate buffer. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex (KGD) activity was determined in membrane extracts (KGD enzyme complex co-sediments with membranes) following the Beatty and Guest procedure [36]. Increase in absorbance at 340 nm corresponding to NAD^+ reduction was measured. Calculations were performed using an extinction coefficient of 6.22 mM^{-1} cm^{-1} for NADH.

2.9. In silico search for PpsR binding sites

PpsR binding site search was performed using the software PATTERNn (http://bioinfo.hku.hk/services/analyseq/cgi-bin/patternn_in.pl) [37]. We first extracted the 500 nucleotides upstream all *Rps. palustris* CGA009 CDS using query win (a graphical application for retrieving sequences from databases in ACNUC format developed at PRABI (www.prabi.fr) [38,39]. The data here were retrieved from GenBank. The sequences in fasta format were then entered as personal bank in the PATTERNn program. The pattern searched was either one strictly conserved $TGTN_{12}ACA$ motif or one conserved $TGTN_{12}ACA$ motif and one degenerated motif [T,C]G[A,T]N12[T,A]C[G,T,A] (the letters separated by a comma meaning an alternative) [40] separated by 2 to 300 bases. For the degenerated motif, only one alternative was considered at a time and the results were then compiled.

2.10. Gel mobility shift assay

A 421-bp DNA segment corresponding to the *sucA* promoter region containing the PpsR2 binding site identified in silico was obtained by PCR using ^{32}P 5′-end labeled oligonucleotide primers (5′-CCCGGTCAAGGGCACCGAATTC-3′ and 5′-GGTTACCGGATCAGCAACATAG-3′), as previously described [15]. The purified PpsR2 protein (14 μg) was added to 20 μl of reaction buffer composed of 5 fmol of ^{32}P-labeled DNA probe, 1 μg of polydIdC as competitor, 50 mM Tris–HCl (pH 8), 1 mM DTT, 50 mM potassium acetate, 5 μg of bovine serum albumin and 10% glycerol. The reaction mixture was incubated at room temperature for 30 min and was subjected to non-denaturing 5% Tris–glycine–EDTA-buffered polyacrylamide gel electrophoresis at 4 °C for 4 h at 70 V.

3. Results

3.1. Photosystem synthesis is controlled by RpBphP1 in a wide range of oxygen tension

In a previous work, we reported that photosystem synthesis of *Rps. palustris* CEA001 occurs in the dark only at low O_2 tension, below 8%, a behavior frequently observed in photosynthetic bacteria [15]. At higher O_2 tension, this synthesis is repressed by the transcription regulators PpsR. This repression is however antagonized under low intensity far-red light, specifically absorbed by the Pfr form of *Rp*BphP1 [10,15,22]. This is exemplified in Fig. 1 where the absorption spectra of bacteria grown in liquid medium in the dark or under various illumination

Table 1
Primers used in real time RT-PCR

Gene name	Gene number	Encoding	Forward (5′ to 3′)	Reverse (5′ to 3′)	Amplicon length (bp)
rpoD	*rpa1288*	RNA polymerase sigma 70 subunit	CGGTGCACATGATCGAGA	CCTTGGCGATCTTCAGGA	150
16s rrna	*RNA_52*	16S ribosomal RNA	AGCAATACGTCAGTGGCAGA	TTTCGGCGATAAATCTTTCC	131
rnpO	*rpa2692*	RNA polymerase omega subunit	TCGCGACAACGACAAGAA	GAACCAATCAGCGGAACG	153
sucA	*rpa0189*	putative alpha-ketoglutarate dehydrogenase (E1 subunit)	TCCGGCAAGGTCTATTACGA	TCTTCCTGACACCACACCAG	161
nuoB2	*rpa4263*	NADH-ubiquinone dehydrogenase chain B	TGCTACGTCGAACAGGTCAC	GCTCGTACAAACGCAGCAG	157
nuoM1	*rpa2938*	NADH-ubiquinone dehydrogenase chain M	ATCCTCGAAACGCTGATGAT	AGCAGCGTGTACAGGAAGAA	161
–	*rpa1193*	cytochrome *bc1* precursor	CGACCCTCAAGGACGTGT	AGTACCATTCCGGCACGA	150
cycA	*rpa1535*	cytochrome c_2	CGGCTGGCTTCACCTATTC	ACCGCCTGATCAGCCTTAC	148
pufB	*rpa1525*	light-harvesting complex 1 beta chain	AAGCGGAAGCCAAGGAAT	TCAGTTGATGAACGCTGTCC	150

Please cite this article as: M. Kojadinovic, et al., Dual role for a bacteriophytochrome in the bioenergetic control of *Rhodopsdeudomonas palustris*: Enhancement of photosystem synthesis and limitation of respiration, Biochim. Biophys. Acta (2007), doi:10.1016/j.bbabio.2007.09.003

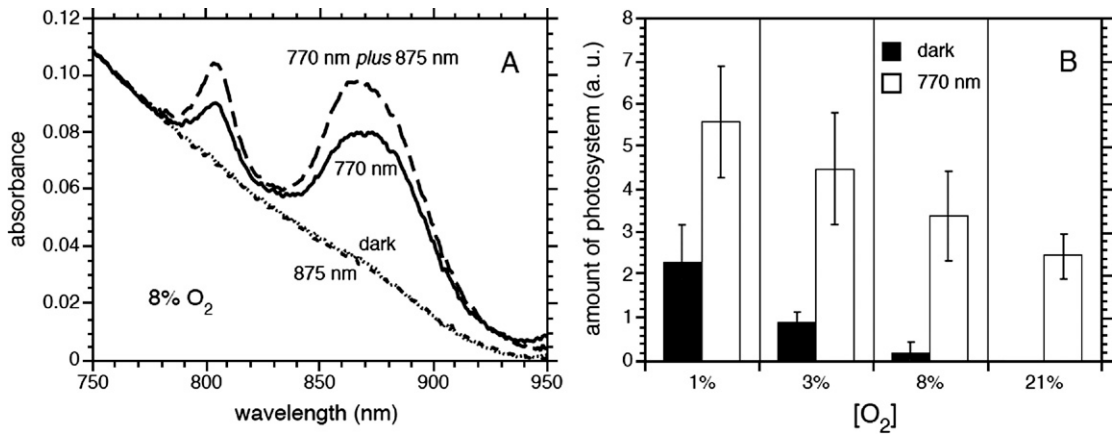


Fig. 1. Effect of O_2 tension and illumination on the synthesis of the photosynthetic apparatus of *Rps. palustris*. (A) Absorption spectra of intact cells harvested in exponential phase (around 21 h of growth) grown in the dark or under various illuminations (770 nm, 875 nm or 875 plus 770 nm) at 8% O_2 tension. (B) Amount of photosystem synthesized in the dark (black) and under 770 nm illumination (white) in function of oxygen tension. This amount was deduced from absorption spectra recorded on intact cells as shown in part A. 770 nm light corresponds to 100 μmol of photon/s/m^2, and 875 nm, light to1500 μmol of photon/s/m^2. In both cases the half-peak bandwidth was 25 nm.

conditions at 8% O_2 tension are reported. In the dark or under strong illumination at 875 nm (1500 μmol of photons/m^2/s), a wavelength absorbed by the bacteriochlorophyll molecules and not by bacteriophytochromes, no synthesis of the photosystem is observed. On the other hand, bacteria grown under 770 nm illumination, preferentially absorbed by *Rp*BphP1, or under 770 nm plus 875 nm illumination present absorption bands around 800 and 860 nm, characteristic of LH2 complexes and LH1 complexes of the photosynthetic apparatus (Fig. 1A). This induction occurs from microaerophilic (1%) to aerophilic (21%) (Fig. 1B) growth conditions, extending the activating role of *Rp*BphP1 in photosystem synthesis in a wide range of O_2 tension [10,15,22].

3.2. 770 nm illumination induces growth rate decrease

Interestingly we noticed that, in addition to the activation of the photosystem synthesis, 770 nm illumination induces a decrease in cell density. This is exemplified in Fig. 2, which compares images of the bacteriochlorophyll fluorescence and of light transmission for *Rps. palustris* cells homogeneously inoculated on a Petri dish and subjected to illumination with different wavelengths between 590 and 870 nm. The wavelength dependence of the decrease in cell density is very similar to the action spectrum of photosystem formation, i.e. corresponds to the Pfr form of a bacteriophytochrome (Fig. 2) [10]. The decrease in growth capability induced by 770 nm illumination was confirmed in liquid medium. An example is shown in Fig. 3 where the growth curves of bacteria under 8% of O_2 tension, placed under 770 nm illumination or in the dark are compared. The 770-nm illumination induces a 2-fold decrease in growth rate compared to dark-grown bacteria. For all O_2 tensions tested (between 1 and 21%), a clear reduction in growth rate was observed when comparing cells grown in these two conditions (Fig. 4A). In the following, we adopted an O_2 tension of 8%, i.e. semi-aerobic conditions.

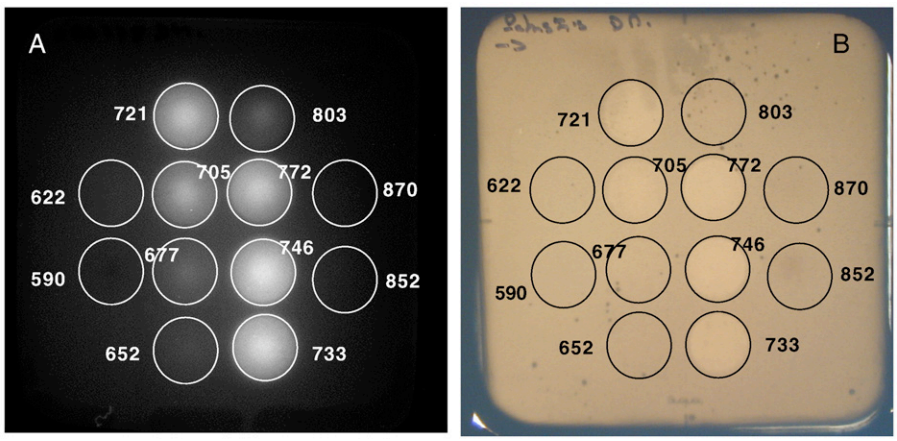


Fig. 2. Effect of light of various wavelengths on the bacteriochlorophyll fluorescence (Part A) and light transmission (Part B) properties of *Rps. palustris* cells. The cells were homogeneously inoculated on a Petri dish and subjected to illumination from 590 to 870 nm in different area (3.5 cm^2) delimited by circles. Irradiance was adjusted to 15 μmol of photon/s/m^2 and the half-peak bandwidth was 25 nm for all wavelengths.

Please cite this article as: M. Kojadinovic, et al., Dual role for a bacteriophytochrome in the bioenergetic control of *Rhodopsdeudomonas palustris*: Enhancement of photosystem synthesis and limitation of respiration, Biochim. Biophys. Acta (2007), doi:10.1016/j.bbabio.2007.09.003

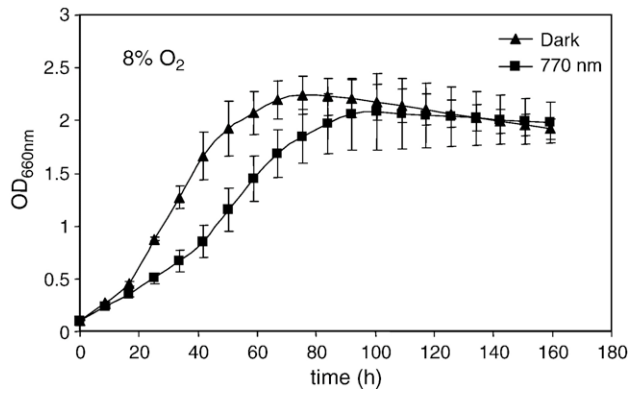


Fig. 3. Growth curves of *Rps. palustris*. Cells were grown in the dark (triangles) or under 770 nm illumination (squares) at 8% of oxygen tension. The curves are the average of three experiments. Bacterial cultures were inoculated at $OD_{660\ nm}=0.1$ with bacteria grown in the dark at 21% oxygen for 60 h.

The suggestion that the photoreceptor responsible for the growth rate limitation is a bacteriophytochrome and not the photosystem bacteriochlorophyll molecules (Fig. 2) was confirmed by the normal growth rate observed for cells subjected to an 875-nm illumination, specifically absorbed by LH complexes, in liquid medium (Fig. 4B). It is important to emphasize at this point that the 770-nm light used in these experiments is not intense enough to produce a significant photosynthetic activity. Photosynthesis could occur only for cells subjected to an additional strong 875 nm light. Under this last condition (770 plus 875 nm), the growth rate limitation induced by the 770-nm light is overcome by the 875-nm illumination, i.e. photosynthetic activity (Fig. 4B). These observations prompted us to test whether the 770-nm induced growth rate decrease could be due to an impaired respiration, the only bioenergetic pathway utilizable for the bacteria to develop under 770 nm illumination and to identify which bacteriophytochrome is involved in this growth rate limitation.

3.3. A respiration restriction is responsible for the 770-nm induced growth rate decrease

In order to test whether the 770-nm induced growth rate decrease is due to a restriction in respiration, the respiratory activities of bacteria grown under different illumination conditions were assessed during bacterial growth. A small but significant decrease of the respiratory activity is observed during the exponential growth phase for both dark-grown bacteria or bacteria grown under 770 nm light (Fig. 5A). But the most striking result is the much lower respiratory activity, for the same numbers of cells, of bacteria grown under 770 nm light compared to dark-grown bacteria all along the first 40 h of growth (exponential and beginning of stationary phases). The difference in respiratory activity observed between these two growth conditions is maximal during the mid-exponential phase reaching a 2-fold difference at 21 h of growth (Fig. 5A). We have also determined the amount of photosystem synthesized in these different growth conditions. Large quantities of photosystem are rapidly synthesized in cells grown under 770 nm light (Fig. 5B). In contrast, dark-grown bacteria synthesized a small amount of photosystem (equivalent to 20–30% of the amount produced by 770 nm grown bacteria) only after the mid-exponential phase (Fig. 5B). This is probably related to the lowering in oxygen tension linked to the respiratory activity of the dense cells suspension. In any case, these results suggest a clear correlation between the decrease in respiratory activity and the synthesis of the photosynthetic apparatus.

To gain further evidence for this correlation, bacteria were subjected to dark–light transitions and analyzed for their respiratory activity and photosystem content. Bacteria grown in the dark until the mid-exponential phase and then illuminated with far-red light, present a well-marked decrease in respiratory activity upon illumination (53±5% decrease after 22 h of growth) and their respiratory activity reaches the respiratory level of 770 nm illuminated bacteria around 41 h of growth. Conversely, the respiratory activity of bacteria subjected to a

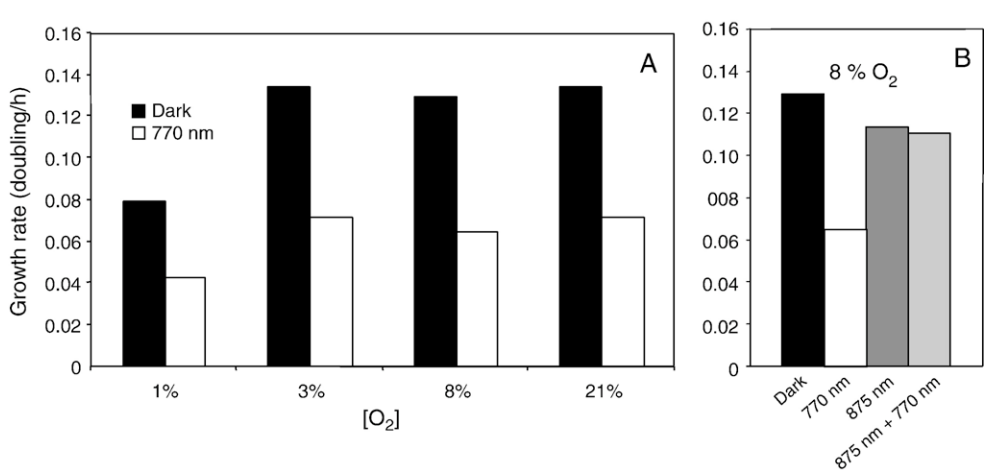


Fig. 4. Growth rate of *Rps. palustris* in function of illumination and oxygen tension. (A) Growth rate of cells grown in the dark (black bars) or under 770 nm illumination (white bars) at various O_2 tensions. (B) Growth rate of cells grown at 8% O_2 tension in the dark (black bar), under 770 nm (white bar), 875 nm (grey bar) or 875 plus 770 nm (light grey bar) illuminations.

Please cite this article as: M. Kojadinovic, et al., Dual role for a bacteriophytochrome in the bioenergetic control of *Rhodopsdeudomonas palustris*: Enhancement of photosystem synthesis and limitation of respiration, Biochim. Biophys. Acta (2007), doi:10.1016/j.bbabio.2007.09.003

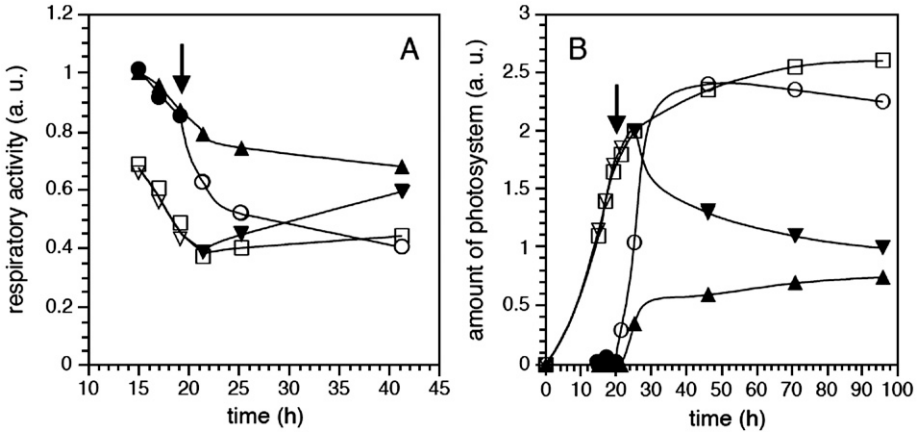


Fig. 5. Respiratory activity and photosystem synthesis during growth in function of illumination under 8% oxygen tension. Cells were grown in the dark (filled triangles), under 770 nm illumination (empty squares), under dark (filled circles) followed by 770 nm illumination (empty circles) or illuminated by 770 nm light (empty reversed triangles) followed by dark conditions (filled reversed triangles). The switch from dark to light (or light to dark) happens at 19 h of growth and is indicated by an arrow. All measurements were normalized to the same cell density. (A) Relative respiratory activity during growth in function of illumination. The results are expressed as the respiratory activity obtained at various times and under different illuminations relative to the respiratory activity of the dark-grown bacteria at 15 h of growth taken equal to 1. This respiratory activity is of about 39 μM O_2/min. (B) Photosystem synthesis during growth in function of illumination. The amount of photosystem corresponds to the area of the bacteriochlorophyll absorption bands in the near infra-red. All measurements are between 5 and 7% interval confidence.

switch from 770 nm illumination to darkness increased about 30±5% after 41 h of growth, reaching a level nearly similar to the one measured for bacteria that were continuously under dark condition. These changes in respiratory activity are correlated to changes in photosystem synthesis. Bacteria grown in the dark until mid-exponential phase (19 h) and then submitted to 770 nm light rapidly produced large amounts of photosystem, reaching the level equivalent to continuously illuminated bacteria within 27 h of growth (Fig. 5B). Conversely, bacteria grown under 770 nm illumination during 19 h and then placed in the dark stopped producing photosystem within 6 h (Fig. 5B). Since the maximal effect of light on respiratory activity is observed in the mid-exponential phase (Fig. 5A), all following experiments were performed with cells collected at this stage.

When bacteria were grown under both 770 nm light (to induce photosystem synthesis) and strong 875 nm light (to perform photosynthetic activity), the respiratory activity of bacteria is about 2-fold decreased compared to the dark control, i.e. similar to effect observed for bacteria illuminated with only the 770-nm light (Fig. 6). Moreover, their growth rate is significantly higher than that of cells subjected to only 770 nm light and represents more than 85% of the dark control (Fig. 6). This indicates that the respiration limitation induced by the 770-nm illumination is overcome by the photosynthetic activity provided by the 875-nm actinic light.

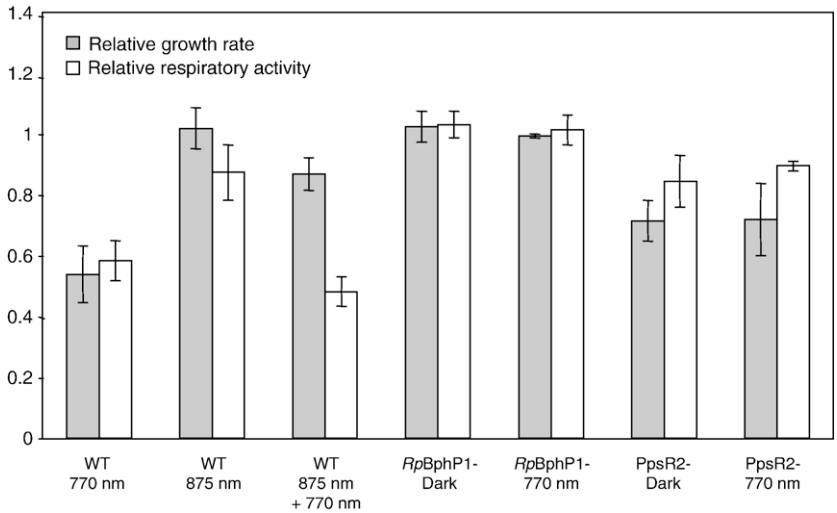


Fig. 6. Growth rate and respiratory activity of WT and mutants of *Rps. palustris* in function of illumination under 8% of oxygen tension. The results are expressed as the growth rate or respiratory activity of the considered strain relative to the growth rate or respiratory activity of the dark-grown WT strain. Each ratio is an average of at least three experimental replicates. The average dark-grown WT strain growth rate is of 0.12±0.2 (corresponding to a doubling time of 8.26 h±1.4). The dark grown WT strain respiratory activity is of about 39 μM O_2/min for bacteria in exponential phase (OD_{660nm} ~0.7 corresponding to about 2.6×10^9 bacteria/ml).

Please cite this article as: M. Kojadinovic, et al., Dual role for a bacteriophytochrome in the bioenergetic control of *Rhodopsdeudomonas palustris*: Enhancement of photosystem synthesis and limitation of respiration, Biochim. Biophys. Acta (2007), doi:10.1016/j.bbabio.2007.09.003

From this series of experiments we conclude that 770 nm light absorbed by the Pfr form of a bacteriophytochrome induces a decrease of about two-fold in respiratory activity. This regulation is reversible and concomitant to the synthesis of the photosynthesis apparatus via the action of *Rp*BphP1 [10,15,22]. This leads to a significant slowing of growth when respiration is the sole available bioenergetic pathway. We cannot exclude that in addition to the decrease in respiratory activity a small part of the growth limitation is due to the burden linked to the synthesis of the photosynthetic apparatus.

Is the same bacteriophytochrome responsible for both the enhancement of the synthesis of the photosynthetic apparatus and the limitation of respiration? Or are two different bacteriophytochromes involved in this dual regulation? This also raises the question of the participation of the transcriptional regulator PpsR2, known to be involved, with *Rp*BphP1, in the regulation of photosystem synthesis. These questions are addressed below.

3.4. The bacteriophytochrome RpBphP1 and the transcription factor PpsR2 are involved in the respiration limitation

Out of the six bacteriophytochromes present in *Rps. palustris*, only three, *Rp*BphP1, *Rp*BphP5 (Rpa0122) and *Rp*BphP6 (Rpa0990) are under their Pfr form after dark adaptation and are therefore susceptible to be activated by 770 nm illumination [41]. Therefore, we measured the growth and the respiratory activities as a function of illumination for *Rps. palustris* mutants inactivated in these three bacteriophytrochromes. The *Rp*BphP5$^-$ and *Rp*BphP6$^-$ mutants showed the same behavior as the wild type strain CEA001: 770 nm illumination induced an important decrease both in the growth rate and the respiratory activity compared to dark growth conditions (not shown). On the contrary, the *Rp*BphP1 mutant had the same growth and respiratory activity as the dark-grown WT strain independently of the illumination conditions (Fig. 6). We therefore conclude that only the bacteriophytochrome *Rp*BphP1 is involved in the light-induced respiration limitation. Since the level of respiratory activity is similar for the 770-nm illuminated *Rp*BphP1 mutant and for WT cells grown in the dark, we conclude that *Rp*BphP1 is a repressor of the respiratory activity. A similar experiment was performed with a mutant inactivated in the transcription factor PpsR2, implicated in the *Rp*BphP1 transduction pathway [10,15,22]. Compared to dark-grown cells, illumination affects neither the growth rate nor the respiratory activity in the PpsR2$^-$ mutant (Fig. 6). This implies that both *Rp*BphP1 and PpsR2 are implicated in the regulation of the respiratory activity. The growth and respiratory levels of the PpsR2$^-$ mutant grown in the dark are lower, by about 30% and 15% respectively, than for the WT strain (Fig. 6) indicating that this transcriptional factor could be an activator of the respiration activity. We therefore propose that the light-induced Pr form of *Rp*BphP1 not only enhances the synthesis of the entire photosynthetic apparatus by counterbalancing the repressive effect of PpsR2 [10,15,22] but also down-regulates the respiratory activity by antagonizing the activation of this transcriptional factor on the respiratory activity. The points where this regulation on the respiratory activity is exerted are addressed in the following paragraphs.

3.5. Decrease in respiratory activity and expression of related genes

Since the transcription regulator PpsR2 is involved in respiration decrease, we searched in silico for genes of *Rps. palustris* that could be affected by this regulator. It has been established that PpsR binds to two adjacent palindromic motifs TGTN$_{12}$-ACA [14,42]. Some variations in the palindromic sequences are possible depending upon the considered species, except for the G and C nucleotides, which appear strictly conserved [40]. A first class of PpsR binding sites consists of two palindromic motifs spaced by 7 or 8 base pairs [43]. For a second class of PpsR, the two palindromic sequences are spaced by a large number of base pairs up to 240 bp as for example in the case of the *pucBA* promoter of *Rb. capsulatus* [44]. In order to identify all the genes potentially controlled by PpsR, we first looked for one strictly conserved motif TGTN$_{12}$ACA in each promoter region (500 bp) of *Rps. palustris* strain CGA009 genes. 238 genes presenting one such conserved motif in their promoter region were identified. We further searched for an additional possibly degenerated palindromic sequence ([T,C]G[A,T]N$_{12}$ [T,A]C[G,T,A], the letters separated by a comma meaning an alternative) [40] spaced by 2 to 300 bp around these previously identified palindromes. This leads to 104 genes potentially regulated by PpsR (see Table 1 supplementary material). Some of them, located in the Photosynthetic Gene Cluster (PGC), are known to be regulated by PpsR, in *Rps. palustris* CEA001 [15] and CGA009 [16,22], in the closely related bacterium *Bradyrhizobium* ORS278 [18], in *Rb. sphaeroides* [32], and in *Rb. capsulatus* [43,44]. Several genes encoding complexes involved in the respiratory chain or an enzyme of the Krebs cycle are of particular interest: (i) *rpa0831 (coxB)* encoding the subunit II of the cytochrome oxidase aa_3, (ii) *rpa1535* (*cycA*) encoding the cytochrome c_2, (iii) *rpa4263 (nuoB2)* encoding the NADH-ubiquinone dehydrogenase chain B, a subunit of one of the two NADH-dehydrogenases of *Rps. palustris*, (iv) *rpa 2938* (*nuoM1*) encoding the NADH-ubiquinone dehydrogenase chain M, a subunit of the other NADH dehydrogenase of *Rps. palustris*, and (v) *rpa0189* (*sucA*) encoding the E1 component of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex (KGD), which catalyzes a key reaction in the Krebs cycle. The promoter region of these various genes are shown in Table 2 of supplementary material.

The regulation of the synthesis of these various complexes and enzymes could therefore be responsible for the 2-fold decrease in respiratory activity via *Rp*BphP1 and PpsR2. We first examined the expression of the enzymes involved in the entry (NADH-ubiquinone dehydrogenase) and the output (cytochrome oxidase) of electrons in the respiratory chain by enzymatic activity assays or quantitative real time RT-PCR measurements.

Difference in the cytochrome oxidases expression for cells grown either in the dark or under 770 nm illumination in exponential phase was probed by measuring their respiration rate. These measurements were performed in the presence of saturating concentration of tetramethylparaphenylene diamine (TMPD), an efficient electron donor to cytochrome oxidases. This procedure overcomes the possible limitation of the respiratory activity

Please cite this article as: M. Kojadinovic, et al., Dual role for a bacteriophytochrome in the bioenergetic control of *Rhodopsdeudomonas palustris*: Enhancement of photosystem synthesis and limitation of respiration, Biochim. Biophys. Acta (2007), doi:10.1016/j.bbabio.2007.09.003

upstream these enzymes. Under such conditions, the levels of respiratory activity are identical for the two growth conditions (data not shown) indicating that the limitation of the respiration activity induced by the 770-nm illumination is not occurring at the cytochrome oxidases level. Looking at the expression of electron carriers upstream the cytochrome oxidases, measurements by real time RT-PCR (average of 3 to 5 experiments) revealed that the expression of *rpa1535*, encoding the cytochrome c_2 was slightly up-regulated (1.2 fold ± 0.3) by 770 nm illumination (Fig. 7A). Similarly, the expression of *rpa2938* and *rpa4263,* encoding subunits of the two NADH dehydrogenases, were up-regulated 2.5 ± 0.4 and 2.1 ± 0.5 fold respectively (Fig. 7A). These results do not explain the 770-nm induced respiration limitation and will be discussed later. For comparison, as expected, the expression of *pufB* (*rpa1525*), a membranous component of the photosynthetic chain encoding the beta chain of the LH1, is strongly up-regulated (up to 13 fold, not shown) under 770 nm illumination.

Looking now at the enzyme involved in the Krebs cycle, the expression of *sucA*, measured by real time RT-PCR, was about 30% down-regulated during the mid-exponential phase (~22 h of growth) and the beginning of the stationary phase (~39 h of growth) under 770 nm illumination compared to dark-grown cells (Fig. 7A). Such difference in *sucA* expression was also observed in the beginning of the stationary phase (39 h of growth). To confirm the alpha ketoglutarate dehydrogenase complex (KGD) down-regulation under 770 nm light, this activity was tested for membrane fractions and checked for its sensitivity to the addition of 1 mM arsenite as described by Beatty et al. [36]. KGD complex activity is 35% ± 6% down-regulated in 770 nm illuminated bacteria versus dark-grown bacteria on the cell number basis, in agreement with the results obtained in quantitative real time RT-PCR.

To provide further proofs of the involvement of PpsR2 in the regulation of *sucA* expression we tested by mobility shift assay its capability to bind to the *sucA* promoter region. As shown in Fig. 7B, PpsR2 binds to *sucA* promoter in agreement with our in silico analysis. This result strongly suggests that PpsR2 activates *sucA* transcription in the dark. This activation is partially repressed under 770 nm illumination via *Rp*BphP1.

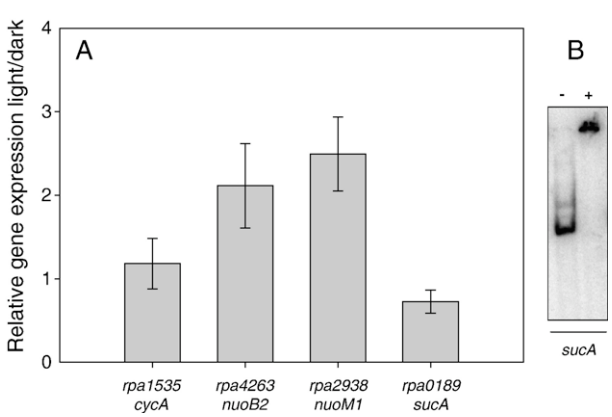


Fig. 7. (A) Relative gene expression of *cycA*, *nuoB2*, *nuoM1* and *sucA* under 770 nm illumination compared to dark growth conditions. Gene expression was normalized using the control transcript of *rpoD*. The results are the average of three to five independent experiments. (B) Gel mobility shift assay with purified PpsR2. The left lane (−) contained only ^{32}P-labeled *sucA* promoter region, while the right lane (+) contained in addition 14 μg of PpsR2.

4. Discussion

Our study demonstrates a dual effect of the bacteriophytochrome *Rp*BphP1 on the bioenergetic status of *Rps. palustris*. Activation of *Rp*BphP1 with 770 nm light induces, on the one hand, the synthesis of the photosynthetic apparatus and limits the respiratory activity on the other hand as discussed in more details below.

4.1. Activation of the photosystem synthesis

*Rp*BphP1 plays an essential role in the light activation on the photosystem synthesis in a large range of O_2 tension ranging from 21% down to 1% (Fig. 1). As already reported [10], this activation is due to the antagonizing effect of *Rp*BphP1 on the repression exerted by PpsR2 under aerobic condition on the transcription of several genes involved in pigments and photosystem synthesis (i.e. *bch*, *crt* and *puf*) [15,16].

In addition to the formation of the photosynthetic apparatus, we found that the *nuoB2* and *nuoM1* genes of the two NADH dehydrogenases of *Rps. palustris* are up-regulated more than two fold under 770 nm illumination. This two-fold increase in mRNA level, which may result in an increase of the NADH dehydrogenase enzymatic activity, might seem at odds with the limitation of the respiratory activity observed under the same illumination condition. It should be recalled, however, that these enzymes are not only involved in the respiratory pathway but are also essential for photosynthesis. Indeed, under photosynthetic activity the proton motive force formed by the light-induced cyclic electron transfer is responsible for a "reverse" electron flow (i.e. reverse with respect to the respiratory pathway) between the reduced quinone pool and NAD^+ at the level of NADH dehydrogenase [6,7,45]. The reducing power produced during this electron transfer is essential for biosynthesis syntheses and carbon assimilation. Therefore it is not surprising that the switch to photosynthetic conditions is accompanied by an enhanced synthesis of NADH dehydrogenases. A similar explanation can be proposed for the slight up-regulation (1.2 fold) we observed for the transcription of genes encoding the cytochrome c_2 because this electron carrier is involved in the photosynthetic chain.

4.2. Limitation of the respiratory activity

As discussed above, the limitation in respiratory activity leading to a decrease in growth rate under 770 nm illumination is not related to changes in the amount of the membrane or soluble electron carriers complexes of the respiratory chain. We propose that the down-regulation of the KGD complex activity is most probably responsible for the observed decrease in respiratory activity. The regulation of the Krebs cycle is essentially controlled at the KGD level. Such a control is exemplified in the case of the photosynthetic bacterium *Rb. capsulatus*, which presents 10-fold more KGD activity when grown aerobically

Please cite this article as: M. Kojadinovic, et al., Dual role for a bacteriophytochrome in the bioenergetic control of *Rhodopsdeudomonas palustris*: Enhancement of photosystem synthesis and limitation of respiration, Biochim. Biophys. Acta (2007), doi:10.1016/j.bbabio.2007.09.003

than photosynthetically [46]. Indeed under aerobic conditions, cells development requires an active Krebs cycle to produce reducing equivalents (NADH) for ATP synthesis by oxidative phosphorylation [46,47] and biosynthesis intermediates, such as alpha-ketoglutarate, oxaloacetate and succinyl-CoA. Due to the production of reducing power under photosynthetic activity, the Krebs cycle activity is only required for the generation of biosynthesis precursors [46,47]. A decrease of the KGD complex activity limits the overall Krebs cycle and consequently the respiratory activity, which is dependent on the reducing power produced by this cycle [47,48]. Our proposal is that the decrease in KGD activity observed for cells placed under 770 nm illumination induces a decrease in respiration and a concomitant limitation of the growth rate since respiration is the only bioenergetic pathway utilizable for the bacteria to develop under this condition.

The KGD expression is modulated by both *Rp*BphP1 and PpsR2. The lower respiratory activity of the PpsR2$^-$ mutant compared to the WT and its ability to bind to the promoter of *sucA* suggests that this transcriptional factor acts as an activator of *sucA* transcription in the dark. This activation is repressed under far-illumination by the action of *Rp*BphP1. PpsR2 would therefore be both a transcriptional repressor (of the photosynthetic genes) and an activator (of *sucA*). A dual role of PpsR transcriptional regulators was already observed in *R. gelatinosus* where PpsR acts as a repressor of *crtI* expression and as an activator of *pucBA* expression [17]. In the case of *Rps. palustris*, PspR1 has also been reported to be both a repressor of photosystem synthesis [16] and an activator of LH2 antennae [49]. In the closely related species *Bradyrhizobium* ORS278, the two PpsRs have antagonistic roles, PpsR2 being a repressor of the photosynthetic genes whereas PpsR1 seems to act as an activator of the photosystem formation [18]. Altogether these studies suggest that the dual role of PpsR could be a general characteristic of this regulator family.

4.3. Photosynthesis versus respiration

Light absorbed by the photosynthetic apparatus is known to strongly inhibit the respiratory activity in photosynthetic bacteria [4]. This inhibition is due to interactions between the photosynthetic and respiratory chains present in the intracytoplasmic membrane. A first indirect interaction is linked to the proton motive force, produced by the light-induced cyclic electron transfer. This light-induced proton motive force initiates a "reverse" electron flow from the reduced quinone to NAD^+ via the NADH dehydrogenases as already mentioned. A direct interaction occurs at the level of the cytochrome c_2, which reduces the photooxidized reaction center preferentially to the cytochrome oxidases [1]. Here we reveal an additional regulation by light, via the bacteriophytochrome *Rp*BphP1, of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase enzymatic complex, a key enzyme of the Krebs cycle. This system allows the integration of the two essential parameters, light and oxygen, for the bacteria to adapt to their environment. On the one hand, *Rp*BphP1 detects the presence of light and induces the synthesis of the photosynthetic apparatus even under aerobic conditions. On the other hand, the light activation of *Rp*BphP1 decreases the synthesis of KGD, which limits the production of reducing power and a concomitant decrease in the respiratory activity. This dual regulation at the transcriptional level favors the photosynthetic activity over the respiratory activity, i.e. the most favorable bioenergetic process in the light.

The repression of the respiratory activity via *Rp*BphP1 is far to be total and does not exceed a factor of 2. Similarly, the repressive effect of O_2 on the synthesis of the photosynthetic apparatus in the dark is incomplete at low tension. The strategy of maintaining a low level of both photosynthetic and respiratory chains allows the bacteria to rapidly switch between their two related bioenergetic processes for a fast adaptation to changes in their environment. The additional predominance of photosynthesis upon respiration at the electrons carriers level ensures an optimal use of their available energy [1].

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbabio.2007.09.003.

References

[1] A. Verméglio, R. Borghese, D. Zannoni, in: D. Zannoni (Ed.), Respiration in Archaea and Bacteria, Springer, 2004, pp. 279–295.
[2] J.H. Zeilstra-Ryalls, S. Kaplan, Oxygen intervention in the regulation of gene expression: the photosynthetic bacterial paradigm, Cell. Mol. Life Sci. 61 (2004) 417–436.
[3] C. Bauer, S. Elsen, L.R. Swem, D.L. Swem, S. Masuda, Redox and light regulation of gene expression in photosynthetic prokaryotes, Philos. Trans. R. Soc. Lond., B Biol. Sci. 358 (2003) 147–153.
[4] H. Nakamura, Über die photosynthese bei der shelfreien purpurbakterie *Rhodobazillus palustris*. Beiträge zur stoffwechselphysiologie der purpurbakterie, Acta Phytochim. 9 (1937) 189–234.
[5] N. Cotton, A. Clark, J. Jackson, Interaction between the respiratory and photosynthetic electron transport chains of intact cells of *Rhodopseudomonas capsulata* mediated by membrane potential, Eur. J. Biochem. 130 (1983) 581–587.
[6] P.M. Vignais, A. Colbeau, J.C. Willison, Y. Jouanneau, Hydrogenase, nitrogenase, and hydrogen metabolism in the photosynthetic bacteria, Adv. Microb. Physiol. 26 (1985) 155–234.
[7] S.M. Herter, C.M. Kortluke, G. Drews, Complex I of *Rhodobacter capsulatus* and its role in reverted electron transport, Arch. Microbiol. 169 (1998) 98–105.
[8] D. Zannoni, P. Jasper, B. Marrs, Light-induced oxygen reduction as a probe of electron transport between respiratory and photosynthetic components in membranes of *Rhodopseudomonas capsulata*, Arch. Biochem. Biophys. 191 (1978) 625–631.
[9] A. Verméglio, J. Carrier, Photoinhibition by flash and continuous light of oxygen uptake by intact photosynthetic bacteria, Biochimica et Biophysica Acta 764 (1984) 233–238.
[10] E. Giraud, J. Fardoux, N. Fourrier, L. Hannibal, B. Genty, P. Bouyer, B. Dreyfus, A. Verméglio, Bacteriophytochrome controls photosystem synthesis in anoxygenic bacteria, Nature 417 (2002) 202–205.
[11] J. Oh, S. Kaplan, in: D. Zannoni (Ed.), Respiration in Archaea and Bacteria: Diversity of Prokaryotic Electron Transport Carriers, Springer, 2004, pp. 287–309.
[12] S. Elsen, L.R. Swem, D.L. Swem, C.E. Bauer, RegB/RegA, a highly conserved redox-responding global two-component regulatory system, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68 (2004) 263–279.
[13] R.J. Penfold, J.M. Pemberton, Sequencing, chromosomal inactivation, and functional expression in *Escherichia coli* of *ppsR*, a gene which represses

carotenoid and bacteriochlorophyll synthesis in *Rhodobacter sphaeroides*, J. Bacteriol. 176 (1994) 2869–2876.

[14] S.N. Ponnampalam, J.J. Buggy, C.E. Bauer, Characterization of an aerobic repressor that coordinately regulates bacteriochlorophyll, carotenoid, and light harvesting-II expression in *Rhodobacter capsulatus*, J. Bacteriol. 177 (1995) 2990–2997.

[15] E. Giraud, S. Zappa, M. Jaubert, L. Hannibal, J. Fardoux, J.M. Adriano, P. Bouyer, B. Genty, D. Pignol, A. Verméglio, Bacteriophytochrome and regulation of the synthesis of the photosynthetic apparatus in *Rhodopseudomonas palustris*: pitfalls of using laboratory strains, Photochem. Photobiol. Sci. 3 (2004) 587–591.

[16] S. Braatsch, J.R. Bernstein, F. Lessner, J. Morgan, J.C. Liao, C.S. Harwood, J.T. Beatty, *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 has two functional *ppsR* genes, each of which encodes a repressor of photosynthesis gene expression, Biochemistry 45 (2006) 14441–14451.

[17] A.S. Steunou, C. Astier, S. Ouchane, Regulation of photosynthesis genes in *Rubrivivax gelatinosus*: transcription factor PpsR is involved in both negative and positive control, J. Bacteriol. 186 (2004) 3133–3142.

[18] M. Jaubert, S. Zappa, J. Fardoux, J.M. Adriano, L. Hannibal, S. Elsen, J. Lavergne, A. Verméglio, E. Giraud, D. Pignol, Light and redox control of photosynthesis gene expression in *Bradyrhizobium*: dual roles of two PpsR, J. Biol. Chem. 279 (2004) 44407–44416.

[19] S. Masuda, C.E. Bauer, AppA is a blue light photoreceptor that antirepresses photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*, Cell 110 (2002) 613–623.

[20] S. Braatsch, M. Gomelsky, S. Kuphal, G. Klug, A single flavoprotein, AppA, integrates both redox and light signals in *Rhodobacter sphaeroides*, Mol. Microbiol. 45 (2002) 827–836.

[21] S. Braatsch, G. Klug, Blue light perception in bacteria, Photosynth. Res. 79 (2004) 45–57.

[22] S. Braatsch, J.A. Johnson, K. Noll, J.T. Beatty, The O(2)-responsive repressor PpsR2 but not PpsR1 transduces a light signal sensed by the BphP1 phytochrome in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009, FEMS Microbiol. Lett. 272 (2007) 60–64.

[23] E. Giraud, S. Zappa, L. Vuillet, J.M. Adriano, L. Hannibal, J. Fardoux, C. Berthomieu, P. Bouyer, D. Pignol, A. Verméglio, A new type of bacteriophytochrome acts in tandem with a classical bacteriophytochrome to control the antennae synthesis in *Rhodopseudomonas palustris*, J. Biol. Chem. 280 (2005) 32389–32397.

[24] K. Evans, A.P. Fordham-Skelton, H. Mistry, C.D. Reynolds, A.M. Lawless, M.Z. Papiz, A bacteriophytochrome regulates the synthesis of LH4 complexes in *Rhodopseudomonas palustris*, Photosynth. Res. 85 (2005) 169–180.

[25] N. Hartigan, H.A. Tharia, F. Sweeney, A.M. Lawless, M.Z. Papiz, The 7.5-A electron density and spectroscopic properties of a novel low-light B800 LH2 from *Rhodopseudomonas palustris*, Biophys. J. 82 (2002) 963–977.

[26] F.W. Larimer, P. Chain, L. Hauser, J. Lamerdin, S. Malfatti, L. Do, M.L. Land, D.A. Pelletier, J.T. Beatty, A.S. Lang, F.R. Tabita, J.L. Gibson, T.E. Hanson, C. Bobst, J.L. Torres, C. Peres, F.H. Harrison, J. Gibson, C.S. Harwood, Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris*, Nat. Biotechnol. 22 (2004) 55–61.

[27] C.S. Harwood, J. Gibson, Anaerobic and aerobic metabolism of diverse aromatic compounds by the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris*, Appl. Environ. Microbiol. 54 (1988) 712–717.

[28] R.K. Clayton, Toward the isolation of a photochemical reaction center in Rhodopseudomonas spheroides, Biochim. Biophys. Acta 75 (1963) 312–323.

[29] W. Kokotek, W. Lotz, Construction of a *lac*Z-kanamycin-resistance cassette, useful for site-directed mutagenesis and as a promoter probe, Gene 84 (1989) 467–471.

[30] J. Quandt, M.F. Hynes, Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria, Gene 127 (1993) 15–21.

[31] H. Eleaume, S. Jabbouri, Comparison of two standardisation methods in real-time quantitative RT-PCR to follow *Staphylococcus aureus* genes expression during in vitro growth, J. Microbiol. Methods 59 (2004) 363–370.

[32] O.V. Moskvin, L. Gomelsky, M. Gomelsky, Transcriptome analysis of the *Rhodobacter sphaeroides* PpsR regulon: PpsR as a master regulator of photosystem development, J. Bacteriol. 187 (2005) 2148–2156.

[33] N. Botteldoorn, E. Van Coillie, K. Grijspeerdt, H. Werbrouck, F. Haesebrouck, E. Donne, E. D'Haese, M. Heyndrickx, F. Pasmans, L. Herman, Real-time reverse transcription PCR for the quantification of the mntH expression of *Salmonella enterica* as a function of growth phase and phagosome-like conditions, J. Microbiol. Methods 66 (2006) 125–135.

[34] H. Savli, A. Karadenizli, F. Kolayli, S. Gundes, U. Ozbek, H. Vahaboglu, Expression stability of six housekeeping genes: a proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR, J. Med. Microbiol. 52 (2003) 403–408.

[35] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, Nucleic Acids Res. 29 (2001) 2002–2007.

[36] J.T. Beatty, H. Gest, Generation of succinyl-coenzyme a in photosynthetic bacteria, Arch. Microbiol. 129 (1981) 335–340.

[37] K.Y. Cockwell, I.G. Giles, Software tools for motif and pattern scanning: program descriptions including a universal sequence reading algorithm, Comput. Appl. Biosci. 5 (1989) 227–232.

[38] G. Perriere, M. Gouy, WWW-Query: an on-line retrieval system for biological sequence banks, Biochimie 78 (1996) 364–369.

[39] M. Gouy, C. Gautier, M. Attimonelli, ACNUC — a portable retrieval system for nucleic acid sequence databases, logical and physical design and usage, Comp. Appl. Biosci. 1 (1985) 167–172.

[40] S. Elsen, M. Jaubert, D. Pignol, E. Giraud, PpsR: a multifaceted regulator of photosynthesis gene expression in purple bacteria, Mol. Microbiol. 57 (2005) 17–26.

[41] E. Giraud, S. Zappa, L. Vuillet, J. Fardoux, L. Hannibal, J. Adriano, M. Jaubert, P. Bouyer, C. Berthomieu, D. Pignol and A. Verméglio. in Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives (Bruce, A.v.d.E.a.D., ed.), Vol. 2, pp. 535–537.

[42] M. Gomelsky, S. Kaplan, Genetic evidence that PpsR from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 functions as a repressor of *puc* and *bchF* expression, J. Bacteriol. 177 (1995) 1634–1637.

[43] S.N. Ponnampalam, S. Elsen, C.E. Bauer, Aerobic repression of the *Rhodobacter capsulatus bchC* promoter involves cooperative interactions between CrtJ bound to neighboring palindromes, J. Biol. Chem. 273 (1998) 30757–30761.

[44] S. Elsen, S.N. Ponnampalam, C.E. Bauer, CrtJ bound to distant binding sites interacts cooperatively to aerobically repress photopigment biosynthesis and light harvesting II gene expression in *Rhodobacter capsulatus*, J. Biol. Chem. 273 (1998) 30762–30769.

[45] J.H. Klemme, Studies on the mechanism of NAD-photoreduction by chromatophores of the facultative phototroph, *Rhodopseudomonas capsulata*, Z. Naturforsch., B 24 (1969) 67–76.

[46] F.P. Dastoor, M.E. Forrest, J.T. Beatty, Cloning, sequencing, and oxygen regulation of the *Rhodobacter capsulatus* alpha-ketoglutarate dehydrogenase operon, J. Bacteriol. 179 (1997) 4559–4566.

[47] J.T. Beatty, H. Gest, Biosynthetic and bioenergetic functions of citric acid cycle reactions in *Rhodopseudomonas capsulata*, J. Bacteriol. 148 (1981) 584–593.

[48] M.E. Spencer, J.R. Guest, Regulation of citric acid cycle genes in facultative bacteria, Microbiol. Sci. 4 (1987) 164–168.

[49] L. Vuillet, M. Kojadinovic, S. Zappa, M. Jaubert, J.M. Adriano, J. Fardoux, L. Hannibal, D. Pignol, A. Verméglio, E. Giraud, Evolution of a bacteriophytochrome from light to redox sensor, EMBO J. 26 (2007) 3322–3331.

Please cite this article as: M. Kojadinovic, et al., Dual role for a bacteriophytochrome in the bioenergetic control of *Rhodopsdeudomonas palustris*: Enhancement of photosystem synthesis and limitation of respiration, Biochim. Biophys. Acta (2007), doi:10.1016/j.bbabio.2007.09.003

Résumé :

Rhodopseudomonas palustris est une bactérie pourpre photosynthétique dont le génome, entièrement séquencé, a révélé avec surprise la présence de 6 gènes codant des bactériophytochromes. L'un d'entre eux (*Rp*BphP1) joue un rôle primordial et inhabituel dans la synthèse du photosystème. Chez cette bactérie, trois autres bactériophytochromes (*Rp*BphP2, 3 et 4) sont localisés à proximité d'opérons *pucBA* codant les polypeptides des antennes collectrices de lumière associées au photosystème. Ce travail de thèse a consisté dans un premier temps à étudier les rôles, les propriétés et les mécanismes d'action de ces 3 bactériophytochromes. Il a pu être ainsi montré que les 2 bactériophytochromes *Rp*BphP2 et 3 agissent de concert dans le contrôle des antennes de types LH4. Cette voie de régulation implique l'action de 3 autres réponses-régulateurs dont la protéine Rpa3018 sensible au potentiel redox. Cette étude a également révélé que, chez certaines souches de *Rps. palustris*, la protéine *Rp*BphP4 a perdu sa sensibilité à la lumière mais a acquis en contrepartie une sensibilité au potentiel redox tout en conservant sa capacité à réguler l'expression des antennes de type LH2 *via* un système à 2 composants. Dans un second temps, l'analyse de la séquence du génome de deux *Bradyrhizobium* photosynthétiques (ORS278 et BTAi1) a révélé que chaque souche possède un bactériophytochrome spécifique sûrement acquis par transfert horizontal. Les études menées sur ces différents bactériophytochromes ont mis en exergue la diversité de cette famille de senseurs de lumière ainsi que la complexité des voies de signalisation qu'ils initient.

Mots-Clés : *Rhodopseudomonas palustris*, bactériophytochromes, régulation, photosynthèse, antennes collectrices de lumière.

Title : Caracterization of bacteriophytochromes identified in *Rhodopseudomonas palustris* and *Bradyrhizobium*.

Summary :

Rhodopseudomonas palustris is a photosynthetic purple bacteria which genome was completely sequenced. Six genes encoding putative bactériophytochromes are present in this genome. One of them plays an essential and unusual role in the synthesis of the photosystem. In this bacteria, three other bacteriophytochromes are localized near *pucBA* operons encoding polypeptides involved in the formation of light harvesting complexes associated with photosystem. First, this PhD work studied roles, properties and mechanisms of action of these three bacteriophytochromes. We showed that RpBphP2 and RpBphP3 act in tandem to regulate the expression of LH4 antennas. This signalling pathway use three reponse-regulators, one of them, Rpa3018 is rdox sensitive. In some strains of *Rps. palustris*, a bactériophytochrome, RpBphP4, lost its light sensitivity and acquired a redox sensibility while keeping its ability to regulate the expression of these antennas. In a second time, analysis of the genome sequence of two photosynthetic *Bradyrhizobium* (ORS278 and BTAi1) revealed, in each strain, the presence of a specific bacteriophytochrome probably acquired by horizontal transfer. The properties of these various bacteriophytochromes led highlighted the variety of this family of light sensors as well as the complexity of the signalling pathways which they introduce.

Keywords: Rhodopseudomonas palustris, bactériophytochromes, regulation, photosynthesis, light harvesting complexes.

Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (IRD, CIRAD, AGRO-M, INRA, UM2) TA- A82/J, Campus de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

Résumé :

Rhodopseudomonas palustris est une bactérie pourpre photosynthétique dont le génome, entièrement séquencé, a révélé avec surprise la présence de 6 gènes codant des bactériophytochromes. L'un d'entre eux (*Rp*BphP1) joue un rôle primordial et inhabituel dans la synthèse du photosystème. Chez cette bactérie, trois autres bactériophytochromes (*Rp*BphP2, 3 et 4) sont localisés à proximité d'opérons *pucBA* codant les polypeptides des antennes collectrices de lumière associées au photosystème. Ce travail de thèse a consisté dans un premier temps à étudier les rôles, les propriétés et les mécanismes d'action de ces 3 bactériophytochromes. Il a pu être ainsi montré que les 2 bactériophytochromes *Rp*BphP2 et 3 agissent de concert dans le contrôle des antennes de types LH4. Cette voie de régulation implique l'action de 3 autres réponses-régulateurs dont la protéine Rpa3018 sensible au potentiel redox. Cette étude a également révélé que, chez certaines souches de *Rps. palustris*, la protéine *Rp*BphP4 a perdu sa sensibilité à la lumière mais a acquis en contrepartie une sensibilité au potentiel redox tout en conservant sa capacité à réguler l'expression des antennes de type LH2 *via* un système à 2 composants. Dans un second temps, l'analyse de la séquence du génome de deux *Bradyrhizobium* photosynthétiques (ORS278 et BTAi1) a révélé que chaque souche possède un bactériophytochrome spécifique sûrement acquis par transfert horizontal. Les études menées sur ces différents bactériophytochromes ont mis en exergue la diversité de cette famille de senseurs de lumière ainsi que la complexité des voies de signalisation qu'ils initient.

Mots-Clés : *Rhodopseudomonas palustris*, bactériophytochromes, régulation, photosynthèse, antennes collectrices de lumière.

Title : Caracterization of bacteriophytochromes identified in *Rhodopseudomonas palustris* and *Bradyrhizobium*.

Summary :

Rhodopseudomonas palustris is a photosynthetic purple bacteria which genome was completely sequenced. Six genes encoding putative bactériophytochromes are present in this genome. One of them plays an essential and unusual role in the synthesis of the photosystem. In this bacteria, three other bacteriophytochromes are localized near *pucBA* operons encoding polypeptides involved in the formation of light harvesting complexes associated with photosystem. First, this PhD work studied roles, properties and mechanisms of action of these three bacteriophytochromes. We showed that RpBphP2 and RpBphP3 act in tandem to regulate the expression of LH4 antennas. This signalling pathway use three reponse-regulators, one of them, Rpa3018 is rdox sensitive. In some strains of *Rps. palustris*, a bactériophytochrome, RpBphP4, lost its light sensitivity and acquired a redox sensibility while keeping its ability to regulate the expression of these antennas. In a second time, analysis of the genome sequence of two photosynthetic *Bradyrhizobium* (ORS278 and BTAi1) revealed, in each strain, the presence of a specific bacteriophytochrome probably acquired by horizontal transfer. The properties of these various bacteriophytochromes led highlighted the variety of this family of light sensors as well as the complexity of the signalling pathways which they introduce.

Keywords: Rhodopseudomonas palustris, bactériophytochromes, regulation, photosynthesis, light harvesting complexes.

Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (IRD, CIRAD, AGRO-M, INRA, UM2) TA- A82/J, Campus de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France.