

53

Paris

# UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DAKAR



90-154

## DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES

Mémoire présenté à la  
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
Département de Biologie Végétale

par

**Tatiana WADE**  
née **KRASOVA**

SUJET

**ETUDE DE LA PHOTOSYNTHESE BACTERIENNE CHEZ  
UN *BRADYRHIZOBIUM* D'*AESCHYNOMENE*.  
Photoactivité et caractérisation du complexe capteur de lumière**

scutenu le 7 Novembre 1998  
devant la Commission d'Examen composée de :

- |                    |                    |         |                                |
|--------------------|--------------------|---------|--------------------------------|
| <b>Président :</b> | Mr Amadou Tidiane  | BA      | Professeur, UCAD               |
| <b>Membres :</b>   | Mr Tahir Abdoulaye | DIOP    | Assistant, UCAD                |
|                    | Mr Nicolas         | DIALLO  | Maître de Conférence, UCAD     |
|                    | Mr Marc            | NEYRA   | Chargé de Recherche, ORSTOM    |
|                    | Mr Jean            | LORQUIN | Ingénieur de Recherche, ORSTOM |



Fonds Documentaire ORSTOM  
Cote: Ax-16504 Ex:

# UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DAKAR



## DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES

Mémoire présenté à la  
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
Département de Biologie Végétale

par

**Tatiana WADE**  
née **KRASOVA**

SUJET

**ETUDE DE LA PHOTOSYNTHESE BACTERIENNE CHEZ  
UN *BRADYRHIZOBIUM* D'*AESCHYNOMENE*.  
Photoactivité et caractérisation du complexe capteur de lumière**

soutenu le 7 Novembre 1998  
devant la Commission d'Examen composée de :

<b>Président :</b>	Mr Amadou Tidiane	BA	Professeur, UCAD
<b>Membres :</b>	Mr Tahir Abdoulaye	DIOP	Assistant, UCAD
	Mr Nicolas	DIALLO	Maître de Conférence, UCAD
	Mr Marc	NEYRA	Chargé de Recherche, ORSTOM
	Mr Jean	LORQUIN	Ingénieur de Recherche, ORSTOM

*A mon cher mari, pour son soutien et sa  
compréhension...*

## Remerciements

Cette étude a été effectuée au Laboratoire de Microbiologie de l'ORSTOM à Dakar (Sénégal). J'exprime ma profonde gratitude :

A Monsieur Marc NEYRA, Chargé de Recherche et responsable du laboratoire, pour m'avoir accueillie, pour sa gentillesse et son humanisme.

A Monsieur Jean LORQUIN, Ingénieur de Recherche et maître de mon stage, pour m'avoir proposé ce sujet si passionnant, pour sa rigueur scientifique et sa disponibilité. Je le remercie particulièrement pour son soutien moral et ses conseils, pour m'avoir encouragé dans mes initiatives.

A Madame Catherine BOIVIN, Chargée de Recherche pour son intérêt dans mon travail et ses conseils.

Je suis reconnaissante aux enseignants du Département de Biologie Végétale de la Faculté des Sciences de l'UCAD, en particulier à :

Monsieur Le Professeur Amadou Tidiane BA, Chef du Département, qui me fait l'honneur de présider ce jury.

Monsieur Tahir Abdoulaye DIOP, Assistant, pour m'avoir suivie et soutenue.

Monsieur Nicolas DIALLO, Maître de Conférence, pour avoir accepté spontanément de juger ce travail.

Je tiens à remercier également Monsieur Jean Pierre NDIAYE, Directeur Scientifique de l'ISRA, ainsi que Monsieur Mamadou GUEYE, Directeur de Recherche et responsable du MIRCEN, pour m'avoir aidée dans mes débuts.

Je profite de l'occasion pour remercier l'ensemble des chercheurs de l'ORSTOM, pour leur disponibilité et leurs conseils pratiques. Je voudrais exprimer aussi toute ma sympathie et remerciements aux collègues et amis de l'UCAD et de l'ORSTOM, à toute l'équipe des techniciens du laboratoire pour leur disponibilité et surtout pour l'exceptionnelle qualité des relations humaines que nous avons entretenues et que je n'oublierai jamais.

Et enfin, de tous mon cœur, je remercie mes parents et ma belle famille pour leur soutien si précieux, de loin et de près, pour m'avoir encouragé à mener ce travail.

Que tous ceux qui m'ont apporté leur soutien, sous une forme ou sous une autre, trouvent ici mes chaleureux remerciements.

**Nom** : WADE

**Prénom** : Tatiana

née KRASOVA

**Titre** : Etude de la photosynthèse bactérienne chez un *Bradyrhizobium* d'*Aeschynomene*. Photoactivité et caractérisation du complexe capteur de lumière.

**Mots-clés** : *Bradyrhizobium*, *Aeschynomene sensitiva*, Complexe Photosynthétique, Bactéριοchlorophylle, Canthaxanthine, Cytochrome.

### Résumé

Le système photosynthétique d'un *Bradyrhizobium*, caulinaire d'*Aeschynomene sensitiva*, la souche ORS278, est décrit dans ce travail. La bactérie est aérobie stricte; les pigments sont formés à l'obscurité et leur synthèse est stimulée par la lumière intermittente. Le complexe membranaire Bactéριοchlorophylle-protéines, capteur de lumière de la bactérie, est purifié à l'aide de détergents et par chromatographie. Il est stable et les analyses spectroscopiques montrent qu'il est fonctionnel photochimiquement : le transfert des électrons et les mécanismes d'oxydo-réduction engendrés par les photons sont bien réversibles. Ainsi, quelques éléments de sa structure ainsi que des propriétés physiologiques intéressantes ont été apportés. Ce complexe est formé (i) d'un centre réactionnel (RC) ( $\lambda_{\max}$  800 nm) composé de deux polypeptides L et M et ne contenant pas de cytochrome *c* tétrahémique; (ii) d'une seule antenne collectrice (LH) ( $\lambda_{\max}$  870 nm) composée de deux polypeptides  $\alpha$  et  $\beta$ ; (iii) comme toutes les souches de la famille des *Rhodospirillaceae*, la spirilloxanthine y est associée. Ainsi, il se présente comme une seule entité nommée complexe RC-B870. La canthaxanthine, caroténoïde majoritaire et original dans cette souche, a une localisation cellulaire différente du complexe RC-B870. Elle a un rôle de photoprotection et sa synthèse ne dépend pas de ce complexe : sa production est encore augmentée en lumière continue alors que la bactéριοchlorophylle est détruite.

Les *Bradyrhizobium* photosynthétiques d'*Aeschynomene* semblent être destinés plutôt à la nodulation de tige car la bactéριοchlorophylle est synthétisée dans le nodule caulinaire et non dans le nodule racinaire.

## ABREVIATIONS

AcOEt	: acétate d'éthyle
ADN	: acide désoxyribonucléique
ARN	: acide ribonucléique
ARNr	: acide ribonucléique ribosomal
ATP	: adénosine triphosphate
B875	: antenne collectrice (complexe capteur de lumière) absorbant à 875 nm
Bchl <i>a</i>	: bactériochlorophylle <i>a</i>
BSA	: sérum albumine bovin
CCM	: chromatographie sur couche mince
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	: dichlorométhane (ou chlorure de méthylène)
DEAE	: diéthylaminoéthyl (groupement échangeur d'anions)
DO	: densité optique ou absorbance
DTT	: dithiotréitol
EDTA	: éthylènediamine tétraacétique acide
HiPIP	: High Potential Iron Protein (ferrédoxine à haut potentiel redox)
ICM	: membrane intracytoplasmique
IPP	: isopenténylpyrophosphate
Facteur Nod	: facteur de nodulation
GGPP	: géranylgeranylpyrophosphate
HiPIP	: ferrédoxine à haut potentiel (High Potential Iron Protein)
HPLC	: chromatographie liquide haute pression (ou haute performance)
kb	: kilobase (1000 paires de base)
kDa	: kiloDalton (1000 Daltons)
LH	: complexe photosynthétique capteur de lumière
LHI et LHII	: antenne collectrice centrale et antenne collectrice périphérique
$\lambda_{max}$	: longueur d'onde à absorbance maximale
Ln	: logarithme népérien
Log	: logarithme décimal
MeOH	: méthanol
NaBH <sub>4</sub>	: borohydrure de sodium
NAD et NADPH	: nicotinamide adénine dinucléotide et sa forme réduite
NADP et NADPH	: NAD phosphate et sa forme réduite
nm	: nanomètre
nmoles	: nanomoles
P870	: dimère de Bchl absorbant à 870 nm
PGC	: cluster de gènes de photosynthèse
PM	: poids moléculaire
p/v	: poids/volume
Q <sub>A</sub> et Q <sub>B</sub>	: quinones accepteurs primaires et secondaires d'électrons
Q <sub>P</sub>	: quinone mobile périplasmique
RC	: complexe centre réactionnel photosynthétique
R <sub>f</sub>	: indice de migration en chromatographie sur couche mince
RMN	: résonance magnétique nucléaire
R <sub>t</sub>	: temps de rétention
TEMED	: tétraméthyléthylènediamine
SDS	: sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE	: gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate
UV/VIS	: ultraviolet/visible
v/v	: volume/volume
YM	: yeast mannitol

# SOMMAIRE

	page
<b>INTRODUCTION</b>	1
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	19
<b>1- Culture bactérienne.</b>	20
1.1 Aérobie, anaérobie, semi-aérobie	20
1.2 En présence d'inhibiteurs de la synthèse des caroténoïdes	20
1.3 En présence de TMAO ou NO <sub>3</sub>	20
<b>2- Inoculation des plantes hôtes</b>	21
2.1 Stérilisation et germination des graines d' <i>Aeschynomene</i>	21
2.2 Inoculation	21
<b>3- Isolement des bactéroïdes</b>	21
<b>4- Purification des complexes photosynthétiques</b>	23
4.1 Préparation des chromatophores	23
4.2 Solubilisation et purification partielle du complexe RC-LH	23
4.3 Purification finale par filtration sur gel	24
<b>5- Caractérisation et quantification des pigments bactériens</b>	24
5.1 Extraction des caroténoïdes	24
5.2 Détermination structurale des caroténoïdes	25
5.2.1 Chromatographie sur couche mince	25
5.2.2 Spectrophotométrie UV/VIS	25
5.2.3 Réduction chimique	25
5.2.4 Par HPLC	25
5.3 Quantification des pigments bactériens	25
5.3.1 Bactériochlorophylle	26
5.3.2 Caroténoïdes	26
5.3.3 Canthaxanthine	26
<b>6- Méthodes relatives aux protéines</b>	26
6.1 Dosage protéique	26
6.2 Détermination des poids moléculaires par filtration sur gel	26
6.3 Electrophorèse SDS-PAGE	27
6.3.1 Préparation des échantillons protéiques	27
6.3.2 Electrophorèse	27

6.3.3 Révélation	27
6.4 Détermination d'activité hème <i>c</i>	28
<b>7- Méthodes spectroscopiques sur le complexe RC-LH</b>	28
7.1 Détermination de l'activité photochimique	28
7.2 Détermination de la quantité de RC	28
7.3 Détermination de la quantité de LH	28
<b>RESULTATS</b>	29
<b>1- La bactériochlorophylle est synthétisée dans le nodule caulinaire et non dans le nodule racinaire</b>	31
<b>2- Comportement de la bactérie vis-à-vis de l'oxygène : respiration</b>	31
<b>3- Comportement de la bactérie en fonction du mode d'éclairage</b>	33
<b>4- Purification du complexe RC-LH de la souche ORS278</b>	34
4.1 Préparation des chromatophores	34
4.2 Solubilisation par des détergents.	34
4.3 Purification par chromatographie	36
4.4 Poids moléculaire	36
<b>5- Le complexe RC-LH est unique</b>	37
<b>6- Le complexe de la souche ORS278 est stable et fonctionnel</b>	37
<b>7- La canthaxanthine n'est pas localisée sur le complexe RC-LH</b>	39
<b>8- Protéines <i>puf</i> et cytochrome <i>c</i></b>	41
8.1 Poids moléculaires des protéines <i>puf</i>	41
8.2 Le complexe RC-LH ne contient pas d'hème <i>c</i>	41
<b>9- Recherche du mécanisme de biosynthèse des caroténoïdes</b>	41
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>	44
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	49
<b>ANNEXE</b>	58



# INTRODUCTION

L'azote est un des principaux facteurs limitants de la production agricole bien que l'atmosphère en constitue une réserve considérable. Seules quelques espèces bactériennes peuvent utiliser directement cet azote atmosphérique par réduction de l'azote moléculaire (N<sub>2</sub>) en ammoniac (NH<sub>4</sub>OH), grâce à un processus biochimique catalysé par un complexe enzymatique, la nitrogénase, et connu sous le nom de "fixation biologique de l'azote".

Parmi les bactéries fixatrices d'azote, certaines bactéries du sol communément appelées rhizobiums sont capables d'induire sur les racines, et parfois sur les tiges de la plupart des plantes de la famille des Légumineuses la formation d'organes symbiotiques particuliers, les nodules, dans lesquels les rhizobiums réduisent l'azote de l'air en ammoniac assimilable par la plante et reçoivent en retour de la plante les composés carbonés, sources d'énergie nécessaires au métabolisme bactérien et à la réaction de fixation de l'azote.

Contrairement à la majorité des autres plantes et en particulier des céréales, les Légumineuses ont donc acquis la propriété de puiser directement dans l'air l'azote dont elles ont besoin et s'affranchissent ainsi des engrais azotés, fort coûteux et polluants. Un petit nombre des 20.000 espèces de la famille des Légumineuses a été examiné pour leur capacité à noduler (Allen et Allen, 1981). On estime cependant que 80% d'entre elles forment des symbioses racinaires, la nodulation par les rhizobiums étant plus fréquente dans les deux sous-familles des Papilionacées et des Mimosacées, que chez les Césalpiniacées (Polhill *et al.*, 1981). Chez la grande majorité des légumineuses, les nodules fixateurs d'azote sont localisés sur le système racinaire (*Phaseolus vulgaris*, *Arachis hypogaea*, *Glycine max*). Cependant, quelques rares espèces présentent une particularité remarquable qui les distingue des autres légumineuses, elles possèdent des nodules fixateurs d'azote non seulement sur leurs racines mais aussi sur leurs tiges (Dreyfus *et al.*, 1985).

La formation des nodules est l'aboutissement d'un dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie : les racines de la légumineuse produisent des flavonoïdes qui activent les gènes de nodulation (gènes *nod*) des rhizobiums qui émettent alors en retour des signaux spécifiques ou facteurs Nod permettant la reconnaissance de la plante hôte, l'induction des méristèmes nodulaires et la formation des nodules (Dénarié et Truchet, 1979; Dénarié *et al.*, 1996). Tous les facteurs Nod identifiés jusqu'à présent sont des oligomères de N-acétylglucosamine liés en β-1,4 et substitués par des groupes chimiques divers (Dénarié *et al.*, 1996; Lorquin *et al.*, 1997a et c). Ce sont ces différentes substitutions qui confèrent aux facteurs Nod leur spécificité et qui expliquent qu'une espèce de rhizobium donnée ne soit capable de noduler qu'un nombre limité de Légumineuses. Les facteurs Nod purifiés provoquent, spécifiquement sur les plantes hôtes, et à de très faibles concentrations (jusqu'à 10<sup>-12</sup> M), des réactions voisines de celles induites par les rhizobiums vivants : déformations de poils absorbants, division de cellules corticales racinaires et, dans certains cas, formation de nodosités vides de bactéries (Dénarié *et al.*, 1996).

Tableau 1. Classification des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote de la famille des *Rhizobiaceae*.

Genres	Espèces	Plantes hôtes	Références
<b>Rhizobium</b> (croissance rapide)	<i>R. leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i>	<i>Pisum, Vicia,</i> <i>Lathyrus, Lens</i>	Jordan, 1984
	biovar <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i>	Jordan, 1984
	biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	Jordan, 1984
	<i>R. galegae</i>	<i>Galega orientalis</i>	Lindström, 1989
	<i>R. tropici</i> <i>R. etli</i>	<i>P. vulgaris L., Leucaena</i> <i>Phaseolus vulgaris</i>	Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991 Segovia <i>et al.</i> , 1992
<b>Mesorhizobium</b> (croissance rapide)	<i>M. loti</i>	<i>Lotus</i>	Jarvis <i>et al.</i> , 1982
	<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	Chen <i>et al.</i> , 1991
	<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1994
	<i>M. tianshanense</i>	<i>13 tropical pl. sp.</i>	Chen <i>et al.</i> , 1995
	<i>M. mediterraneum</i> Cluster U (a,b,c) <i>M. plurifarium</i>	<i>Cicer arietinum</i> <i>Acacia, Prosopis</i> <i>Acacia, Leucaena,</i> <i>Prosopis, Chamaecrista</i>	Nour <i>et al.</i> , 1995 de Lajudie <i>et al.</i> , 1994 de Lajudie <i>et al.</i> , 1998
<b>Sinorhizobium</b> (croissance rapide)	<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus,</i> <i>Trigonella</i>	Jordan, 1984; de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
	<i>S. fredii</i> <i>S. saheli</i> <i>S. terengae</i>	<i>Glycine max</i> <i>Sesbania sp.</i> <i>Sesbania, Acacia</i>	Chen <i>et al.</i> , 1988; de Lajudie <i>et al.</i> , 1994 de Lajudie <i>et al.</i> , 1994 de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
	<b>Azorhizobium</b> (croissance rapide)	<i>A. caulinodans</i> <i>A. sp</i>	<i>Sesbania rostrata</i> <i>Sesbania rostrata</i>
<b>Bradyrhizobium</b> (croissance lente)		<i>B. japonicum</i> <i>B. sp.</i>	<i>Glycine max, G. soja</i> <i>Vigna, Lupinus, Mimosa</i> <i>Acacia</i>
	<i>B. elkanii</i> <i>B. liaoningensis</i>	<i>Aeschynomene</i> <i>Glycine max</i> <i>Glycine max, G. soja</i>	Alazard, 1985 ; Young <i>et al.</i> , 1991 Kuykendal <i>et al.</i> , 1992 Xu <i>et al.</i> , 1995

Depuis quelques années, de nouvelles observations et récoltes de nodules ont été effectuées sur de nombreuses espèces annuelles ou pérennes, en particulier dans les régions tropicales. Parallèlement, l'isolement de nombreux rhizobiums de ces espèces a récemment permis à plusieurs laboratoires dans le monde de développer des recherches sur l'étude de la diversité des rhizobiums et de les caractériser. Ainsi, la classification des bactéries de la famille des *Rhizobiaceae* est en pleine évolution. Sur la base d'études systématiques fondées sur la taxonomie numérique (t'Mannetje, 1967), les hybridations ADN/ADN et ADN/ARNr (Gibbons et Gregory, 1972) ainsi que d'autres critères comme en particulier leur temps de régénération sur mannitol-extrait de levure (Jordan, 1982; Jarvis *et al.*, 1992), les rhizobiums capables d'induire des nodules fixateurs d'azote chez les Légumineuses sont actuellement subdivisés en cinq genres et plusieurs espèces nouvelles (Tableau 1) :

\* **Le genre *Rhizobium*** regroupe des bactéries dites à croissance rapide (temps de génération inférieur à 6 heures) et comporte 4 espèces définies : *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium galegae* (Lindström, 1989), *Rhizobium tropici* (Martinez-Romero *et al.*, 1991), et *Rhizobium etli* (Segovia *et al.*, 1992). Ce genre infecte principalement les légumineuses des régions tempérées.

\* **Le genre *Bradyrhizobium*** comprend les bactéries à croissance lente (temps de génération supérieur à 6 heures). Depuis sa caractérisation par Jordan (1982 et 1984), ce genre ne comprenait qu'une seule espèce définie : *Bradyrhizobium japonicum* nodulant le soja (*Glycine max*) et le siratro (*Macroptilium atropurpureum*). Récemment, deux nouvelles espèces, *Bradyrhizobium elkanii* (Kuykendal *et al.*, 1992), et *B. liaoningensis* (Xu *et al.*, 1995) ont été définies. Les bactéries appartenant au genre *Bradyrhizobium* infectent de nombreuses légumineuses tropicales.

\* **Le genre *Sinorhizobium*** a été décrit récemment par de Lajudie *et al.* (1994). Il est actuellement constitué de quatre espèces. Deux espèces, *Sinorhizobium meliloti* (Jordan, 1984; Eardly *et al.*, 1990) et *S. fredii* (Scholla et Elkan, 1984), qui appartenaient auparavant au genre *Rhizobium* sont incluses dans ce nouveau genre. Deux nouvelles espèces, *S. saheli* et *S. teranga* ont été décrites (de Lajudie *et al.*, 1994). *S. saheli* ne comprend que des souches nodulant les différentes espèces de *Sesbania*, alors que *S. teranga* comprend à la fois des souches de *Sesbania* et des souches d'*Acacia*.

\* **Le genre *Mesorhizobium***. Le genre *Rhizobium* étant très hétérogène, plusieurs branches divergentes ont été taxonomiquement identifiées. Celle de *R. loti* est très éloignée des autres branches et justifie donc la description d'un cinquième genre qui a été appelé *Mesorhizobium* et où seront regroupées au moins six espèces, *Mesorhizobium loti*, *M. huakuii*, *M. ciceri*, *M. tianshanense*, *M. mediterraneum*, *M. plurifarum* (Tableau 1).

\* **Le genre *Azorhizobium*** comprend une seule espèce définie, *Azorhizobium caulinodans* dont la souche ORS571 (Dreyfus *et al.*, 1988) qui nodule les tiges et les racines de *Sesbania rostrata* (Dreyfus *et al.*, 1988). Le genre *Azorhizobium* est taxonomiquement

éloigné des genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Sinorhizobium*, mais extrêmement proche des bactéries aquatiques appartenant aux genres *Xanthobacter* et *Aquabacter*. Ainsi, les *Azorhizobium* seraient des bactéries aquatiques ayant reçu par conjugaison avec des rhizobiums du sol (peut être des *Sinorhizobium*) des gènes de nodulation, et qui seraient devenus spécifiques de la nodulation de tige de la légumineuse aquatique *Sesbania rostrata*. Contrairement aux bactéries du genre *Sinorhizobium* qui forment des nodules effectifs sur les racines de nombreuses espèces de *Sesbania*, les *Azorhizobium* ne fixent l'azote qu'avec *Sesbania rostrata*.

### Les Légumineuses à nodules caulinaires

La nodulation de tige a été rapportée pour la première fois en 1928 chez *Aeschynomene aspera* L. par Hagerup et était considérée comme une curiosité naturelle (Hagerup, 1928). Les légumineuses à nodules de tige appartiennent à quatre genres différents, *Sesbania* (5 espèces), *Aeschynomene* (22 espèces), *Discolobium* (1 espèce) appartenant à la sous-famille des Papilionacées, et le genre *Neptunia* (1 espèce) de la sous-famille des Mimosacées. Toutes ces plantes poussent en saison des pluies, dans les sols temporairement inondés, dans les mares et marécages, aux bords des rivières, lacs et cours d'eau des régions tropicales (Allen et Allen, 1981).

Les Légumineuses à nodules de tiges sont caractérisées par la présence sur les tiges des sites prédéterminés de nodulation (Dreyfus *et al.*, 1984). Ces sites de nodulation caulinaire se développent indépendamment de toute infection bactérienne et correspondent à des primordiums racinaires en état de dormance, capables de se différencier en racines latérales en cas d'immersion des tiges ou bien qui donnent naissance à des nodules après infection par les rhizobium spécifiques. La formation des nodules sur leur tiges est considérée comme une adaptation permettant la fixation d'azote dans les conditions d'inondation au niveau de nodules racinaires (Becker et George, 1995; Pugh *et al.*, 1998).

Grâce à cette double nodulation caulinaire et racinaire, certaines espèces comme *Sesbania rostrata* et *Aeschynomene afraspera* peuvent porter 5 fois plus de nodules que les autres légumineuses et présentent une croissance extrêmement rapide, jusqu'à 10 cm par jour pour *Sesbania rostrata* en milieu inondé (Dreyfus, 1984). La découverte de ces différentes propriétés a été le point de départ de l'utilisation des légumineuses aquatiques comme engrais vert dans les rizières tropicales, leur capacité de fixation d'azote étant supérieure à celle des légumineuses à nodules racinaires ou de la fougère *Azolla* utilisée traditionnellement dans les rizières asiatiques.

Les Légumineuses à nodules caulinaires ont été classées suivant leur aptitude à noduler sur la tige et l'intensité de cette nodulation aérienne. Chez les Légumineuses du

groupe 1 (*Aeschynomene afraspera*, *A. nilotica*, *Sesbania rostrata* et *S. puncta*), les nodules sont disposés le long de la tige sur trois ou quatre lignes génératrices. Le groupe 2 renferme des espèces telles que *Aeschynomene indica*, *A. sensitiva*, *Sesbania speciosa* ou *S. pubescens*, qui présentent une nodulation aérienne limitée à la base de la tige. Par contre, les espèces d'*Aeschynomene crassicolis*, *A. elaphroxylon*, *A. pfundii*, *Sesbania javanica* et *Neptunia oleracea* appartenant toutes au groupe 3 développent des nodules uniquement sur la partie basse de la tige périodiquement soumise à l'immersion. Chez *Discolobium pulchellum*, du groupe 3 également, la nodulation caulinaire apparaît aussi sur des tiges immergées mais présentant un tissu aërenchyme abondant (Loureiro *et al.*, 1994).

Il faut ajouter à cela, le cas particulier des nodules d'*Aeschynomene sensitiva* dont la morphologie est différente : le nodule a l'aspect d'un collier (en anglais 'stem-collar' nodule) qui ceinture la tige (Lorquin *et al.*, 1993).

### Les *Rhizobium* nodulant les tiges

L'originalité des légumineuses aquatiques se retrouve aussi dans les propriétés de leurs bactéries symbiotiques. Ainsi, les bactéries du genre *Azorhizobium* nodulant les racines et les tiges de *Sesbania rostrata* sont capables de fixer l'azote atmosphérique en culture pure lorsque la concentration d'oxygène dans l'air est de 3% (Dreyfus *et al.*, 1983). Les bactéries isolées de nodules de tige d'*Aeschynomene* sont également capables de fixer l'azote en culture pure, mais à des concentrations en O<sub>2</sub> plus faibles, de l'ordre de 0,5% (Alazard, 1990).

Ces bactéries sont capables de survivre et de se développer, aussi bien en dehors qu'à l'intérieur du nodule malgré de conditions très particulières pour les rhizobiums. Les tensions très élevées en oxygène au niveau de la tige, le manque d'azote combiné ainsi que la présence de la lumière et de tissus photosynthétiques dans les nodules du cortex peuvent expliquer les propriétés exceptionnelles de certaines de ces souches de *Rhizobiaceae*. La contrainte majeure de la nodulation caulinaire réside donc dans la nécessité pour le symbiote de s'adapter à une vie épiphytie (Boivin *et al.*, 1997).

### Le cas des *Bradyrhizobium* d'*Aeschynomene*

Dans le genre *Aeschynomene*, la plupart des rhizobiums isolés de nodules de tige se distinguent des *Azorhizobium* par leur propriété, unique parmi tous les rhizobiums connus, de synthétiser de la bactériochlorophylle *a* (Bchl *a*) et des caroténoïdes sous l'effet de la lumière (Eaglesham *et al.*, 1990; Evans *et al.*, 1990; Lorquin *et al.*, 1993 et 1997b). De ce fait, ces rhizobiums sont considérés comme des bactéries photosynthétiques. Sur la base de techniques SDS-PAGE, il a été également montré que ces bactéries appartiennent bien au genre

*Bradyrhizobium* (Lorquin *et al.*, 1993). Le premier *Bradyrhizobium* photosynthétique isolé de nodules de tige d'*Aeschynomene indica* a été la souche BTAi1 (Eaglesham *et al.*, 1990) pour laquelle la lumière induit une augmentation de l'absorption du CO<sub>2</sub> (Hungria *et al.*, 1993). Depuis cette découverte, de nombreuses souches photosynthétiques ont été isolées à partir des nodules de tige de plusieurs espèces d'*Aeschynomene* (Ladha et So, 1994; So *et al.*, 1994). Au Sénégal, grâce à l'établissement d'une importante collection de souches isolées de divers espèces d'*Aeschynomene*, il a été montré qu'environ 80% des isolats sont photosynthétiques (Lorquin *et al.*, 1993).

Trois groupes de *Bradyrhizobium* de spécificité différente caractérisent la nodulation (Alazard et Duhoux, 1988) :

- Le groupe I correspond à des souches de *Bradyrhizobium* typiques, non spécifiques et non photosynthétiques, qui nodulent les espèces à nodules exclusivement racinaires ou dont les primordia racinaires restent inclus dans les tissus corticaux de la tige (*A. uniflora*, *A. pfundi*, *A. schimperi*, *A. Elaphroxylon*, etc ...).

- Le groupe II intermédiaire comprend à la fois des souches non photosynthétiques et photosynthétiques qui nodulent deux espèces très voisines, *A. afraspera* et *A. nilotica*, caractérisées par une nodulation caulinaire importante, l'apex du primordium étant recouvert par une seule couche de cellules épidermiques aplaties.

- Le groupe III, qui comprend exclusivement des bactéries photosynthétiques, est très spécifique et ne nodule que les espèces à nodules de tige comme *A. indica* ou *A. sensitiva* dont les primordia racinaires présents sur la tige affleurent sous une couche de cellules épidermiques intactes.

L'étude phylogénétique basée sur l'homologie ADN-ARNr et le séquençage de l'ARNr 16S confirment l'appartenance des isolats photosynthétiques des *Aeschynomene* à la branche *Bradyrhizobium japonicum-Rhodopseudomonas palustris*, une bactérie photosynthétique pourpre non sulfato-réductrice appartenant à la famille des *Rhodospirillaceae* (Young *et al.*, 1991).

Mais contrairement aux bactéries photosynthétiques "classiques" de la famille des *Rhodospirillaceae*, des *Chromatiaceae*, des *Chlorobiaceae* et *Chloroflexaceae* ainsi que les héliobactéries (Pfennig, 1978), les souches photosynthétiques de *Bradyrhizobium* d'*Aeschynomene* sp. sont aérobies strictes et présentent une hétérotrophie pour le carbone. Aucune croissance n'a été observée en conditions de photo autotrophie (Hungria *et al.*, 1993). Ces propriétés physiologiques se rencontrent également chez d'autres bactéries photosynthétiques, telles que les bactéries marines (*Erythrobacter*, *Roseobacter*), les bactéries méthilotrophes (*Methylobacterium*) et chez la bactérie *Porphyrobacter neustonensis* (Harashima *et al.*, 1978; Shiba, 1991; Sato, 1978; Nishimura *et al.*, 1981; Fuerst *et al.*, 1993). Les *Bradyrhizobium* photosynthétiques appartiennent donc au groupe des bactéries

photosynthétiques, appelées également bactéries quasi-photosynthétiques (Gest, 1993) et qui réalisent une photosynthèse anoxygénique en aérobiose, *ie* sans production d'oxygène.

En culture pure, les *Bradyrhizobium* photosynthétiques d'*Aeschynomene* synthétisent des pigments leur confèrent ainsi une coloration due à la présence de caroténoïdes. Ces derniers peuvent, après extraction, être aisément visualisés en spectrophotométrie entre 400 et 550 nm (Lorquin *et al.*, 1997b), et être identifiés après purification et analyses (propriétés physico-chimiques, spectrophotométric, spectrométrie de masse et réactions chimiques spécifiques). Ainsi, sur cette base, il a été possible de différencier 2 groupes. Le premier groupe, le plus important en nombre, est constitué de bactéries de couleur rose claire, identique à celle de la souche BTAi1 (Evans *et al.*, 1990). Ces bactéries synthétisent un seul caroténoïde, la spirilloxanthine (1,1'-diméthoxy-3,4,3',4'-tétrahydro-1,2,1',2'-tétrahydro- $\psi,\psi$ -carotène), un pigment typique des *Rhodospirillaceae*, et isolé d'une bactérie photosynthétique pourpre *Rhodospirillum rubrum* (Goodwin et Osman, 1954). Le deuxième groupe, comprenant une dizaine de bactéries de couleur orange voire rose vif, synthétisent sept caroténoïdes parmi lesquels la spirilloxanthine, et surtout très majoritairement la *trans*-canthaxanthine (4,4'-dikéto- $\beta$ -carotène) qui représente 85% de la quantité totale en caroténoïdes. Jusqu'à présent, la canthaxanthine n'avait jamais été mise en évidence dans les bactéries photosynthétiques non sulfato-réductrices. On la trouve cependant en minorité dans des cyanobactéries ou des micro algues (Czygan, 1968; Goodwin, 1980).

Il est indispensable ici de souligner l'aspect industriel intéressant de la canthaxanthine, colorant très utilisé dans le domaine de l'agroalimentaire (charcuteries, viandes, œufs, ...) (Nelis et De Leenheer, 1991). La souche ORS278 fournit 2 mg/litre de culture dans les conditions d'éclairage classiques (J. Lorquin, résultats non publiés). Cette teneur, la plus importante chez les *Bradyrhizobium* photosynthétiques d'*Aeschynomene*, est insuffisante pour une production industrielle; cependant, des expérimentations visant à surproduire la canthaxanthine à l'aide du génie génétique sont en cours. Actuellement, la canthaxanthine est synthétisée chimiquement par le groupe Hoffman-LaRoche qui détient le marché mondial de ce colorant.

Il est bon, à ce stade, de rappeler comment, d'une manière générale la photosynthèse bactérienne fonctionne, en explicitant le rôle des différents compartiments protéiques et des pigments.

### **Description et fonctionnement de la photosynthèse des bactéries pourpres**

La photosynthèse est le mécanisme par lequel les végétaux, les algues ou les bactéries utilisent l'énergie solaire pour synthétiser des molécules organiques indispensables pour leur métabolisme cellulaire. Pour convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique, les bactéries



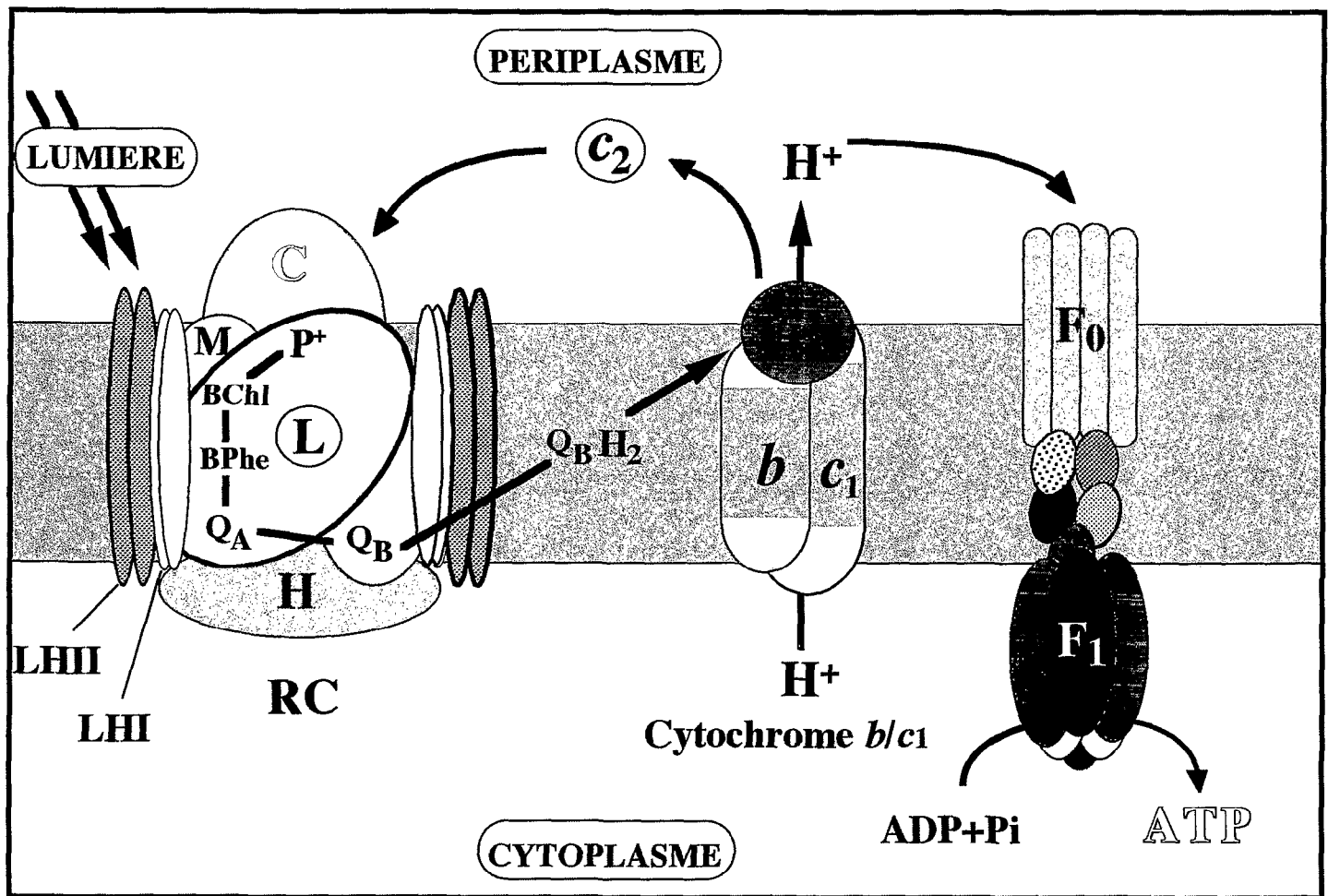


Fig. 1. Représentation schématique de l'appareil photosynthétique des bactéries pourpres (d'après Kiley et Kaplan, 1988).

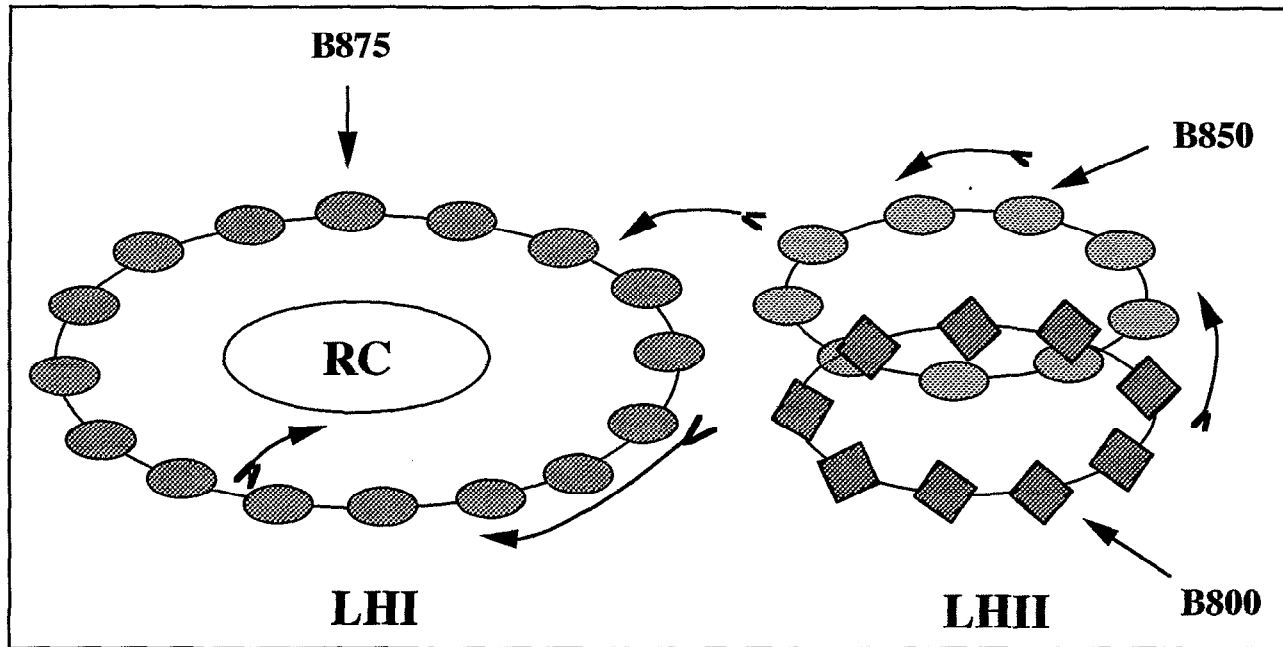


Fig. 2. Organisation schématique du complexe de lumière et du transfert d'énergie dans les bactéries photosynthétiques. Les carrés et les ovales représentent des sous-unités structurales qui sont des assemblages de molécules de caroténoïdes, de bactériochlorophylles (ovale, dimère de BChl; carré, monomère de BChl) et de protéines. Les flèches ayant deux extrémités montrent la direction du transfert d'énergie (d'après Fleming et Grondell, 1997). RC, centre réactionnel; LHI et LHII, antennes collectrices; B800, B850, B875, bactériochlorophylle absorbant à 800, 850 et 875 nm respectivement.

pourpres comme d'autres organismes photosynthétiques disposent de pigments capteurs de lumière (bactériorhodospirilles, caroténoïdes) dont la nature biochimique et les propriétés spectrales varient selon l'organisme considéré, ainsi que des protéines transporteurs d'électrons.

La photosynthèse met en jeu quatre complexes intégrés dans la membrane cytoplasmique : les antennes collectrices (LHI, LHII; Light Harvesting), le centre réactionnel (RC), le complexe cytochrome *b/c*<sub>1</sub> et l'ATP synthase, en plus de transporteurs solubles d'électrons localisés dans le périplasma (Fig. 1). La circulation d'électrons entre ces composants via un transporteur soluble (cytochrome *c*<sub>2</sub> ou HiPIP) permet de générer un gradient de protons qui sera utilisé pour la synthèse d'ATP. Les pigments photochimiquement actifs dans le photosystème bactérien sont les bactériorhodospirilles (*a* et *b*) et les caroténoïdes. En raison de leur simplicité, les complexes photosynthétiques des bactéries pourpres ont fait l'objet de multiples études (Wang *et al.*, 1994). La structure ainsi que le fonctionnement de plusieurs complexes (centre réactionnel, antennes et cytochromes) sont maintenant bien connus, ce qui a ouvert la voie aux études de relation structure-fonction chez certaines espèces.

Les unités photosynthétiques sont localisées dans des membranes intracytoplasmiques extrêmement invaginées (membranes ICM); ces membranes sont appelées communément 'chromatophores' (Kaplan, 1978).

\* **Les antennes collectrices ou complexes capteurs de lumière** absorbent les photons du visible et de l'infrarouge du spectre de la lumière et transfèrent l'énergie d'excitation qui en résulte au centre réactionnel où se déroulent les réactions photochimiques primaires de la photosynthèse. La majorité des bactéries pourpres ont deux types d'antennes collectrices. L'antenne centrale ou LHI, présente chez toutes les bactéries est liée au centre réactionnel (RC-LHI). L'antenne périphérique ou LHII est synthétisée par certaines espèces bactériennes et est située à la périphérie de l'ensemble RC-LHI. Les antennes collectrices sont en fait des complexes protéiques, associés aux pigments et aux cofacteurs et sont organisés sous formes d'anneaux de sous-unités (McDermott *et al.*, 1995) (Fig. 2). Par exemple, la bactérie photosynthétique *Rhodospirillum rubrum* dispose de 12 sous-unités de LH pour 1 RC, et 9 et 8 dans le cas de *Rhodospirillum rubrum* et *R. molischianum*, respectivement (Fleming et Grondelle, 1997).

Après purification, l'analyse des antennes par des méthodes spectroscopiques ou de séquençage de protéines a permis de déterminer leur organisation spatiale. Les sous-unités de ces complexes sont formées d'un hétérodimère de polypeptides  $\alpha$  et  $\beta$  de 45 à 60 aminoacides. Ces polypeptides présentent une structure conservée, à savoir un domaine transmembranaire en forme d'hélice  $\alpha$  avec deux extrémités polaires N- et C- terminale respectivement du côté cytoplasmique et périplasmique (Tadros *et al.*, 1987).

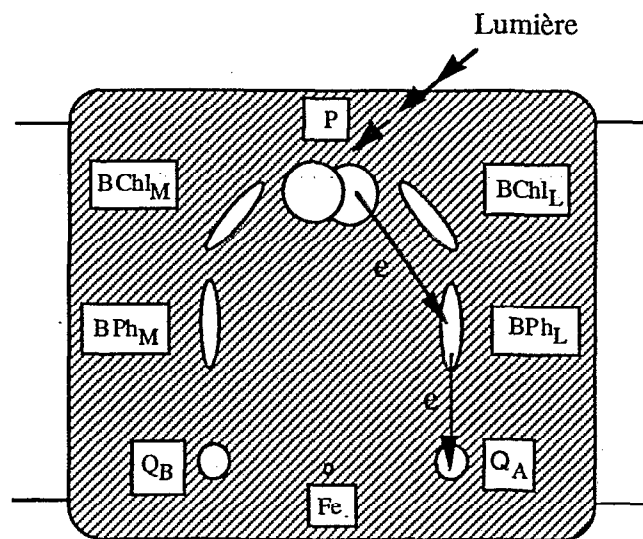


Fig. 3. Représentation schématique du centre réactionnel d'une bactérie photosynthétique (d'après McDowell *et al.*, 1991). P, dimère de bactériochlorophylle; BChl, bactériochlorophylle; BPh, bactériophéophytine; Q<sub>A</sub>, ménaquinone A; Q<sub>B</sub>, ubiquinone B; L et M, polypeptides; Fe, ion fer; e, électron.

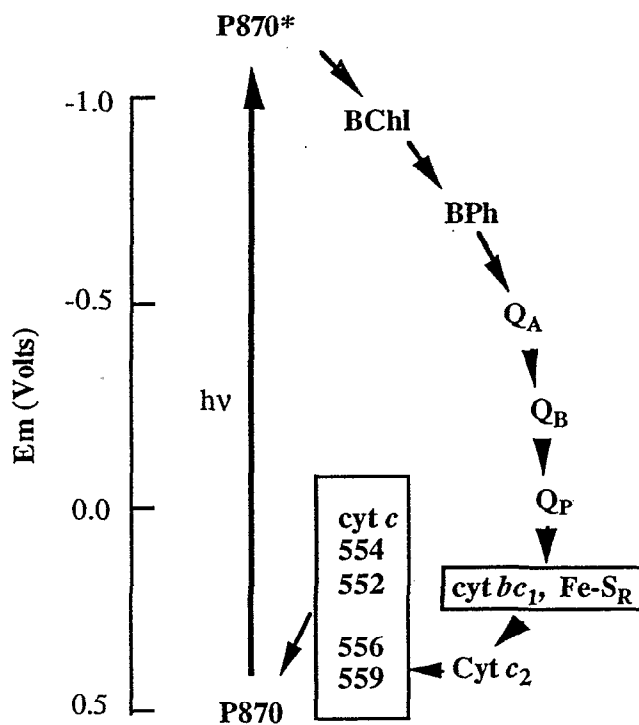


Fig. 4. Diagramme de transfert des électrons dans le centre réactionnel des bactéries pourpres (d'après Blankenship, 1994). La flèche verticale en gras indique l'énergie apportée par l'absorption de photons, les flèches en trait fin indiquent le parcours des électrons. Le transfert des électrons dans le complexe *cyt b/c<sub>1</sub>* sont omis. hv, photons; P870, dimère de BChl à absorbance maximale (870 nm); BChl, bactériochlorophylle; BPh, bactériophéophytine; Q<sub>A</sub>, quinone accepteur primaire; Q<sub>B</sub>, quinone accepteur secondaire; Q<sub>P</sub>, quinone mobile; Fe-S<sub>R</sub>, centre Rieske Fer-Soufre; cyt, cytochrome; cyt c, cytochrome tétrahémique.

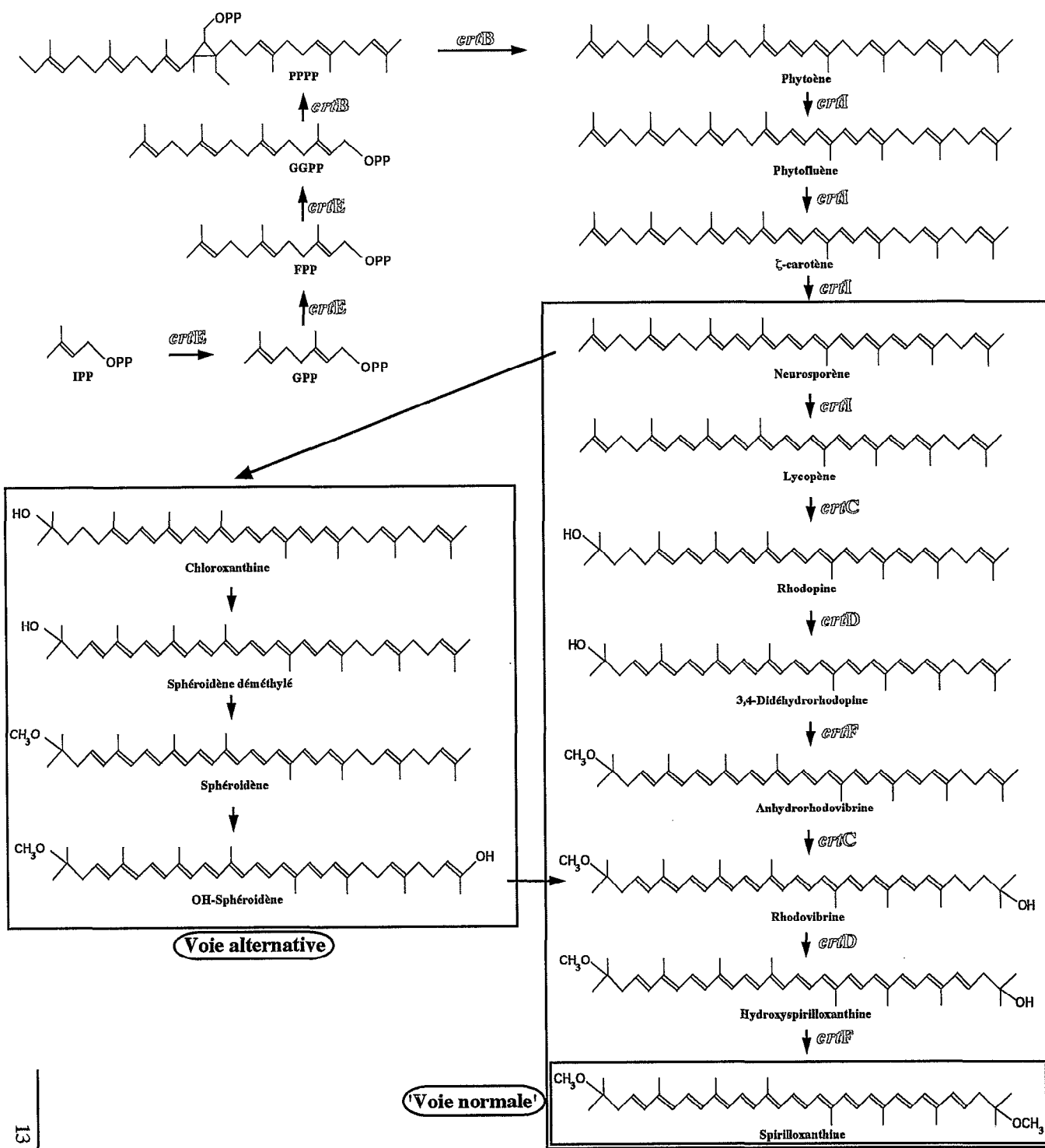
Les caroténoïdes et un dimère de la bactériochlorophylle (Bchl) sont liés de manière non covalente aux polypeptides  $\alpha$  et  $\beta$  de ces complexes au niveau des résidus Histidine. Les molécules de Bchl du complexe LHI sont caractérisées par un maximum d'absorption dans la zone 870-895 nm et sont désignées par B870 ou B895. Le complexe LHII possède généralement deux types de molécules de bactériochlorophylle aux propriétés spectrales différentes : l'absorption maximale est à 800 nm pour un type et à 850 nm pour le second type (Clayton, 1966).

\* **Le centre réactionnel (RC)** est composé de trois polypeptides H (Heavy), M (Medium) et L (Light) définis suivant leur mobilité relative en électrophorèse SDS-PAGE (Fig. 1 et 3). Ces sous-unités protéiques, en proportion stœchiométrique 1 : 1 : 1, représentent environ 10% des protéines totales de la membrane ICM (Okamura *et al.*, 1974). Chez *Rhodocyclus gelatinosus*, *Rhodospirillum centenum* et *Rhodopseudomonas viridis*, un cytochrome *c*, formé des quatre hèmes  $c_{559}$ ,  $c_{552}$ ,  $c_{556}$  et  $c_{554}$ , constitue la quatrième sous-unité du centre réactionnel (Agalidis *et al.*, 1990; Yildiz *et al.*, 1992; Deisenhofer *et al.*, 1985). On l'appelle de ce fait cytochrome *c* tétrahémique. La sous-unité H est constituée d'une seule hélice  $\alpha$  transmembranaire alors que le reste de la chaîne polypeptidique est replié en un domaine globulaire qui fait saillie sur la face externe de la membrane où elle se lie à l'hétérodimère L-M (Rees *et al.*, 1989; Chang *et al.*, 1991). Les centres réactionnels de *Rhodobacter sphaeroides* (Kiley *et al.*, 1988), *Rhodopseudomonas palustris* (Varga et Staehelin, 1985) et *Erythrobacter longus* (Shimada *et al.*, 1985) ne contiennent pas de cytochrome *c* tétrahémique.

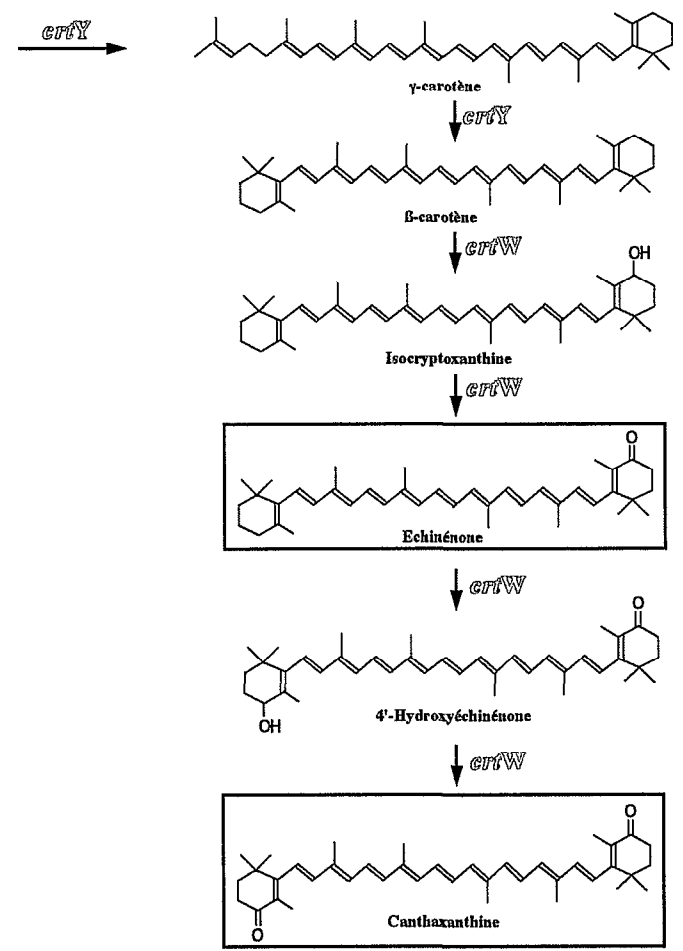
Les polypeptides L et M du complexe RC sont associés à des cofacteurs : chez *Rhodopseudomonas viridis*, on trouve 1 dimère de Bchl dénommé P, 2 monomères de Bchl, 2 molécules de bactériophéophytine, 2 quinones  $Q_A$  et  $Q_B$ , 1 ion  $Fe^{2+}$  et 1 caroténoïde (Wang *et al.*, 1994) (Fig. 3). Ces cofacteurs forment deux branches presque symétriques. Ce type de centre réactionnel est appelé encore "phéophytine-quinone type" et est similaire au système photosynthétique II des plantes (Blankenship, 1992).

#### \* **Le système transporteur d'électrons**

En général, à température ambiante, le transfert d'énergie se déroule selon le schéma LHII --> LHI --> RC en 1 à 100 picosecondes. L'énergie lumineuse captée est ensuite transférée au complexe LHII, ou au complexe RC-LHI dans le cas où les capteurs de lumière LHII ne sont pas présents. La séquence des transferts d'électrons au sein du centre réactionnel est schématisée à la Figure 4. L'énergie de transfert apportée par les antennes collectrices LH excite le dimère de Bchl P870 (P960 dans les organismes contenant la Bchl *b* tels que *Rhodopseudomonas viridis*). Un électron du dimère (premier donneur) est ensuite transféré à une bactériophéophytine puis transmis à un premier accepteur d'électrons, la quinone  $Q_A$ .



**Fig. 5.** Hypothétiques étapes de biosynthèse des caroténoïdes chez les *Bradyrhizobium* photosynthétiques d'*Aeschynomene* (D'après Misawa *et al.*, 1995; Lorquin *et al.*, 1997; Fraser *et al.*, 1998). Les structures encadrées correspondent à celles trouvées chez la souche ORS278 (Lorquin *et al.*, 1997). Les noms en bleu correspondent aux gènes impliqués (Misawa *et al.*, 1995; Fraser *et al.*, 1998). IPP, isopenténylpyrophosphate; GPP, géranylpyrophosphate; FPP, farnésylpyrophosphate; GGPP, géranylgéranylpyrophosphate; PPPP, préphytoènépyrophosphate. En grand encadré sont indiquées les voies 'normale' et 'alternative' conduisant à la synthèse de spirilloxanthine.

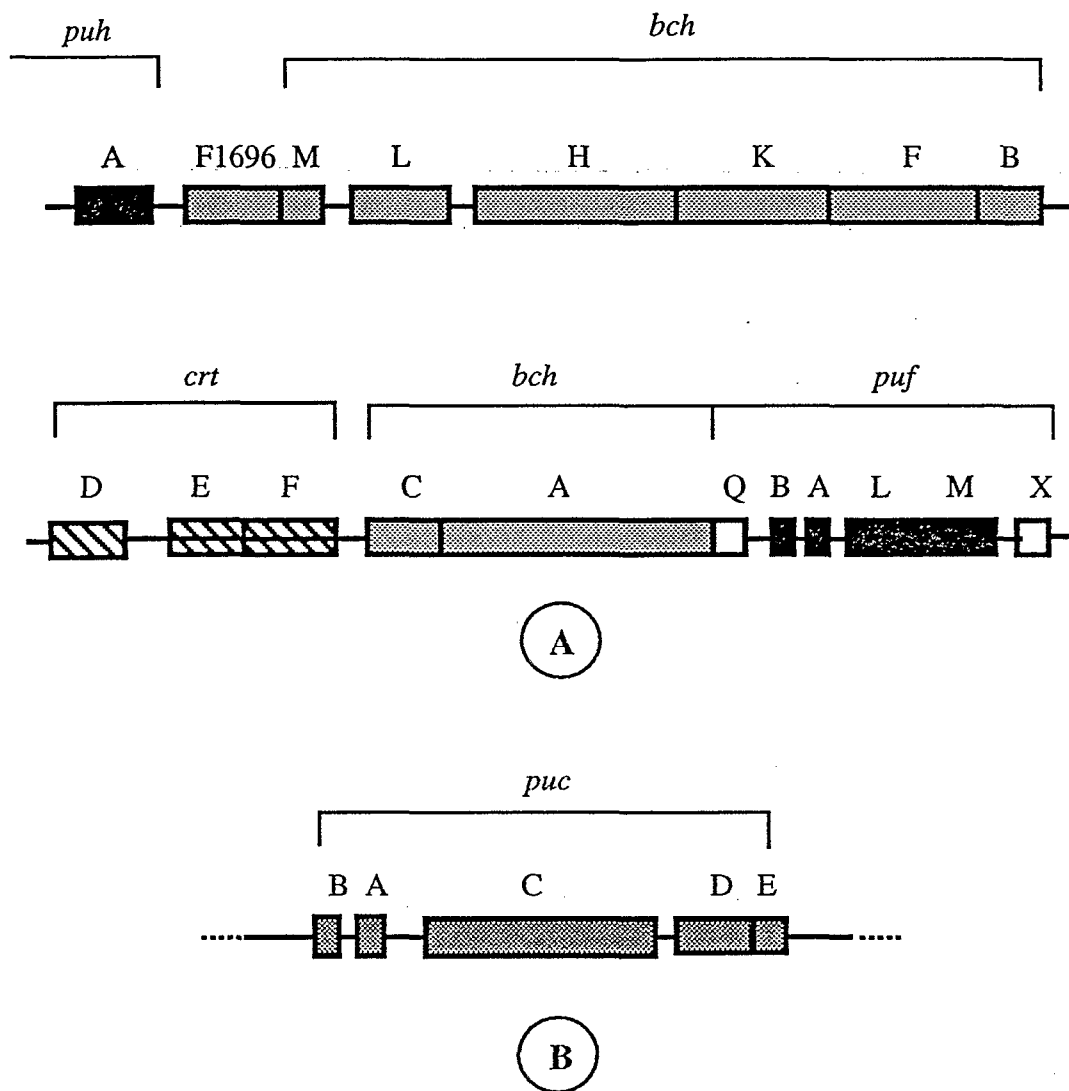


Cet électron suit son chemin vers une seconde quinone  $Q_b$ , à partir de laquelle il quitte le centre réactionnel vers une molécule de quinone mobile  $Q_p$  localisée dans la membrane plasmique. Le transfert cyclique d'électrons se poursuit ensuite sur un transporteur membranaire comme le cytochrome  $c_2$  : oxydoréductase (ou cytochrome  $b/c_1$ ), puis sur le cytochrome  $c_2$  soluble et enfin pour revenir sur le cytochrome tétrahémique  $c$  (dans le cas où il existe). Le complexe  $b/c_1$  contient deux hèmes ainsi qu'une protéine Fe-Soufre. Lorsque le centre réactionnel ne contient pas de cytochrome  $c$  tétrahémique, c'est le cytochrome  $c_2$  qui fonctionne comme transporteur d'électrons vers le centre réactionnel (Kiley et Kaplan, 1988). L'énergie véhiculée par les électrons à travers les quinones membranaires est réutilisée ensuite pour générer d'une part l'énergie chimique libre, d'autre part l'ATP et le NADPH. Il faut rajouter également à cela, que le complexe  $b/c_1$  participe aussi bien au processus de photosynthèse qu'au processus de respiration, où il alimente en électrons nécessaires les enzymes de la chaîne respiratoire (Knaff, 1993).

#### \* Les caroténoïdes : rôle et biosynthèse

L'intégrité structurale des complexes pigment-protéines est préservée par les caroténoïdes. Ils sont liés aux molécules de Bchl du centre et de l'antenne. Les caroténoïdes sont des pigments naturels colorés, abondants et très répandus dans la nature, dans les organismes photosynthétiques et non photosynthétiques. On en compte actuellement environ 700 dans la nature. Ils sont surtout connus pour leur rôle de photoprotection contre les phénomènes de photo-oxydation (Goodwin, 1980). Certains caroténoïdes cycliques, tel que le  $\alpha$ -carotène, le  $\beta$ -carotène ou la  $\beta$ -cryptoxanthine sont chez les humains et les animaux, des précurseurs de vitamine A, de rétinol et d'acide rétinoïque (Pitt, 1971; Britton, 1983; Frickel, 1985). Le métabolisme de certains caroténoïdes conduit à des composés précurseurs de l'acide abscissique, une hormone végétale essentielle (Rock et Zeevaart, 1991). Dans les organismes photosynthétiques, les caroténoïdes jouent le rôle de pigments secondaires capteurs de lumière (Cogdell et Franck, 1987) et de protection contre la photo-oxydation de la Bchl (Goodwin, 1980; Cogdell et Franck, 1987; Siefermann-Harms, 1987). En absorbant les longueurs d'ondes dans la zone bleu-verte de la lumière visible (400-500 nm), qui est peu ou pas absorbée par la Bchl, les caroténoïdes jouent le rôle de pigments accessoires. L'énergie lumineuse captée est ensuite transférée aux molécules de Bchl. Les caroténoïdes en absorbant certaines longueurs agiraient comme des écrans protecteurs grâce à leur structure chimique. En présence d'oxygène moléculaire, la lumière est nuisible aux bactéries privées de caroténoïdes (Gest et Favinger, 1983).

Au niveau de leur biosynthèse, le précurseur est l'isopenténylpyrophosphate (IPP); l'addition successive de IPP aboutit ensuite à la formation de géranylgeranylpyrophosphate ou GGPP (molécule en  $C_{20}$ ). La condensation de deux molécules de GGPP conduit au phytoène, composé incolore en  $C_{40}$ , et véritable précurseur des caroténoïdes (Fig. 5).



**Fig. 6.** Organisation des gènes photosynthétiques chez *Rhodobacter capsulatus*. **A**, "Super-opéron" organisé sur le cluster de 46 kb (d'après Burke *et al.* 1991). Les gènes sont représentés par des rectangles. Les gènes de structure du complexe capteur de lumière et du centre réactionnel (*puh* et *puf*) sont en noir, les gènes de biosynthèse de la bactériochlorophylle (*bch*) sont en gris, et les gènes des caroténoïdes (*crt*) sont hachurés. En blanc sont indiqués les cadres de lecture. **B**, gènes de l'opéron polycistronique *puc* (d'après Klug, 1993).

Puis, des réactions de désaturation, de substitution et/ou de cyclisation aboutissent ensuite à la formation des caroténoïdes colorés acycliques ou présentant un ou deux groupements cycliques à l'extrémité de la chaîne hydrocarbonée. Ce sont le nombre de doubles liaisons (3 à 15), la présence ou non de groupes mésomères (carbonyle, aldéhyde, acide, ...) ainsi que l'état d'isomérisation d'un caroténoïde qui déterminent ses propriétés spectrales. Divers études menées chez les bactéries photosynthétiques de la famille des bactéries pourpres non sulfato-réductrices ont permis d'identifier et de proposer des voies de biosynthèse des caroténoïdes chez ces organismes (Goodwin, 1956 et 1980). En résumé, elles sont de deux types (Fig. 5) : celles qui correspondent à la synthèse de caroténoïdes cycliques telles que la zéaxanthine, la nostoxanthine (Harashima, 1989), ou encore la canthaxanthine (Fig. 5); cette voie a pour précurseur direct le lycopène et le  $\beta$ -carotène. Le deuxième type conduit à la biosynthèse de caroténoïdes linéaires comme la spirilloxanthine. Deux voies de biosynthèse de la spirilloxanthine sont possibles : la 'voie normale' qui passe par le lycopène et entre autres la rhodopine; c'est la plus fréquente ; la 'voie alternative', d'autre part, est rencontrée dans certains cas, et passe par la chloroxanthine et le sphéroidène (Harashima, 1989). Citons quelques exemples. *Rhodospirillum rubrum* contient une molécule de spirilloxanthine par paire  $\alpha\beta$  du complexe RC-LHI (Berger *et al.*, 1992). Chez *Rhodopseudomonas acidophila*, on trouve une molécule de rhodopine pour un dimère de Bchl au sein du LHII (McDermott *et al.*, 1995).

#### \* Les bases génétiques de l'appareil photosynthétique

Les gènes impliqués dans la synthèse du photosystème sont : 1) les opérons *puf*, *puh*, et *puc*, qui codent pour les protéines et les cofacteurs du centre réactionnel et des antennes, 2) les gènes *bch* codant pour les enzymes de la biosynthèse de la bactériochlorophylle, 3) les gènes *crt* correspondant aux protéines de la biosynthèse des caroténoïdes. A l'exception des gènes *puc*, les opérons *puf* et *puh* sont organisés sur le chromosome en un large cluster de 46 kb, qui constitue le cluster des gènes de photosynthèse ou PGC (Photosynthetic Gene Cluster) (Fig. 6). Ces gènes sont par exemple entièrement séquencés chez *Rhodobacter capsulatus* (Yen et Marrs, 1976; Marrs, 1981; Taylor *et al.*, 1983; Zsebo et Hearst, 1984 ; Burke *et al.*, 1991). L'opéron polycistronique *puf* renferme les gènes de structure des polypeptides L et M du centre réactionnel (*pufL* et *pufM*), les gènes de structure des polypeptides  $\alpha$  et  $\beta$  du complexe LHI (*pufA* et *pufB*), et les cadres de lecture *pufQ* et *pufK*. Lorsque le centre réactionnel comprend un cytochrome *c* tétrahémique, ce dernier étant codé par le gène *pufC*, situé en aval de *pufM*. L'unique gène *puhA* de l'opéron *puh* codant pour le polypeptide H est localisé à environ 39 kb de l'opéron *puf*. Les gènes codant pour les polypeptides  $\alpha$  et  $\beta$  du complexe LHII se regroupent dans l'opéron *puc* (*pucA* et *pucB*) situé sur un autre segment du chromosome, à 18 kb de l'opéron *puh*. Les gènes *bch* et *crt* sont organisés en différents opérons dans le cluster du PGC. Les gènes *hem A* et *hem T*, qui codent pour des précurseurs



de la bactériochlorophylle, ne font pas partie du PGC (Suwanto et Kaplan, 1989). Il en est de même pour le gène de structure *cycA*, qui code pour le cytochrome soluble  $c_2$  ou encore pour l'opéron *fbc*, composé des gènes codant respectivement pour la protéine Fer-Soufre du cytochrome *b/c\_1* (Gabellini *et al.*, 1985; Davidson et Daldal, 1987). Ainsi, l'organisation polycystronique des gènes permet une corégulation de leur expression.

#### **\* Régulation de la photosynthèse**

Chez les bactéries photosynthétiques non sulfato-réductrices, aérobies ou non, le taux de bactériochlorophylle et de caroténoïdes dans les membranes photosynthétiques est régulé par des facteurs exogènes tels que l'oxygène et la lumière, qui interviennent dans la transcription et l'expression des gènes de l'opéron *puf*. Leurs effets sur l'accumulation des pigments photosynthétiques sont différents chez les bactéries aérobies et les bactéries pourpres non-sulfato-réductrices. Les bactéries photosynthétiques aérobies comme *Roseobacter denitrificans* accumulent des membranes photosynthétiques durant les périodes d'obscurité en aérobiose (Shiba *et al.*, 1979). Chez *Rhodobacter sphaeroides* et *Rhodobacter capsulatus*, les pigments sont synthétisés à la lumière en anaérobiose ou à l'obscurité en semi-aérobie (Drews, 1978 ; Kiley et Kaplan, 1988). L'expression des gènes de l'opéron *puf* s'avère être dépendant du rapport oxygène/lumière (Nishimura *et al.*, 1996). La présence de Bchl est indispensable pour la formation de l'appareil photosynthétique (Iba *et al.*, 1988).

La synthèse de Bchl par la souche BTAi1 est maximale sous pression atmosphérique; sous tension optimale d'oxygène, l'accumulation de Bchl est inhibée par de fortes intensités lumineuses (Evans *et al.*, 1990). En effet, la synthèse et l'accumulation maximale de Bchl chez BTAi1 requiert une photopériode. Des cellules, préalablement exposées à une illumination de courte durée (30 min), synthétisent efficacement de la bactériochlorophylle durant la phase obscure, alors que des illuminations de longue durée et/ou de fortes intensités lumineuses inhibent l'accumulation de ce pigment. Les travaux préliminaires sur le transfert photosynthétique d'électrons chez cette souche ont montré qu'en présence d'oxygène, la lumière induit l'oxydation d'un cytochrome (Fleischman, communication personnelle). Comme chez les bactéries marines, tous les accepteurs d'électrons sont complètement réduits en absence d'oxygène rendant ainsi toute croissance phototrophique impossible.

#### **Présentation du travail et de son intérêt**

L'idée générale de nos recherches est de savoir si l'utilisation de *Bradyrhizobium* photosynthétiques est bénéfique pour la fixation de l'azote ainsi que pour la croissance des *Aeschynomene*. Le travail que nous nous sommes proposés de mener au Laboratoire de Microbiologie du Centre ORSTOM/ISRA de Dakar est de savoir si, réellement, le système photosynthétique de ces *Bradyrhizobium* est fonctionnel. Nous avons donc caractérisé le

mieux possible l'appareillage photosynthétique dans son ensemble. La souche ORS278 productrice de canthaxanthine (souche orange) a été prise comme modèle. Ainsi, la purification du complexe RC-LH, sa caractérisation spectroscopique, et la détermination de ses composantes (protéines L, M, H, cytochromes, caroténoïdes, ...) ont été entreprises. Dans le même temps, la localisation cellulaire des caroténoïdes, en particulier celle de la canthaxanthine vis à vis de la spirilloxanthine, a été étudiée. Enfin, quelques éléments de la régulation de la synthèse des pigments sont apportés dans ce travail, aussi bien au niveau des bactéroïdes (dans le nodule) qu'au niveau de la bactérie en culture pure, vis-à-vis de l'oxygène et de la lumière.



## **MATERIELS ET METHODES**

## **1- Culture bactérienne**

### **1.1 Aérobie, anaérobie, semi-aérobie**

\* **Aérobie.** *LeBradyrhizobium* photosynthétique la souche ORS278 isolée de nodules caulinaires d'*Aeschynomene sensitiva* a été cultivée dans des erlenmeyers contenant 50 ml de milieu liquide YM (Vincent, 1970; cf. Annexe). L'agitation est d'environ 200 rpm (agitateur 'Orbit shaker', Bioblock). L'éclairage est effectué par des lampes incandescentes de 60 watts (type Mazda); il est soit intermittent (15h/9h (lumière/obscurité)), soit continu, soit les cultures sont réalisées à l'obscurité (papier d'aluminium entourant les erlenmeyers). Le flux lumineux mesuré au niveau des erlenmeyers est de 4500 lux, la température de 30°C. En phase stationnaire (5 à 6 jours), les milieux contenant la bactérie sont mis à centrifuger (10.000 g, 10 min, rotor SORVALL SS34). Le surnageant est éliminé et les culots bactériens sont mis à congeler à -20°C. Pour des expérimentations demandant des quantités plus importantes de bactéries, les cultures sont réalisées dans des récipients contenant 500 ml de milieu YM, dans les mêmes conditions que précédemment.

\* **Anaérobie.** Des récipients contenant environ 100 ml de milieu YM et inoculés par la souche bactérienne sont bouchés stérilement avec un septum. Un balayage de 5 min à l'argon est effectué en introduisant une aiguille hypodermique reliée au gaz. Une autre aiguille piquée à côté permet d'évacuer le flux d'argon en excès. Les aiguilles sont ensuite enlevées délicatement et les cultures mises en agitation, dans les mêmes conditions qu'en aérobie.

\* **Semi-aérobie.** Dans les flacons conditionnés pour les expérimentations en anaérobiose, une partie du gaz est retirée à l'aide d'une seringue stérile, par piquage dans le septum. La même quantité en oxygène est introduite ensuite avec la même seringue dans le flacon. Les conditions de culture restent identiques aux précédentes.

### **1.2 En présence d'inhibiteurs de la synthèse des caroténoïdes**

Des substances connues pour inhiber la synthèse des caroténoïdes sont ajoutées dans le milieu YM. Ils sont préalablement préparés en solution concentrée dans l'éthanol pur. Les concentrations finales dans le milieu de culture sont : Nicotine(-) (SIGMA), 5 mM et 10 mM; 2-méthylimidazole, 0,1, 0,5, 1,0, 5,0 et 10 mM; Diphénylamine, 20, 40, 200 µM et 1 mM. La 2-méthylimidazole est ajoutée au démarrage de la culture, alors que le DPA et la Nicotine sont additionnés 48 h après. Les cultures sont réalisées en lumière intermittente.

### **1.3 En présence de TMAO ou de KNO<sub>3</sub>**

La triméthylamine-N-oxyde (TMAO) et le nitrate de potassium sont préparés en solution aqueuse concentrée qui sont ensuite stérilisées par filtration sur une membrane de 0,45 µm. Ils sont ajoutés dans le milieu à raison de 1 et 10 mM pour le TMAO, et 10 mM pour le nitrate, qui sont les concentrations finales dans la culture.

## **2- Inoculation des plantes hôtes**

### **2.1 Stérilisation et germination des graines d'*Aeschynomene***

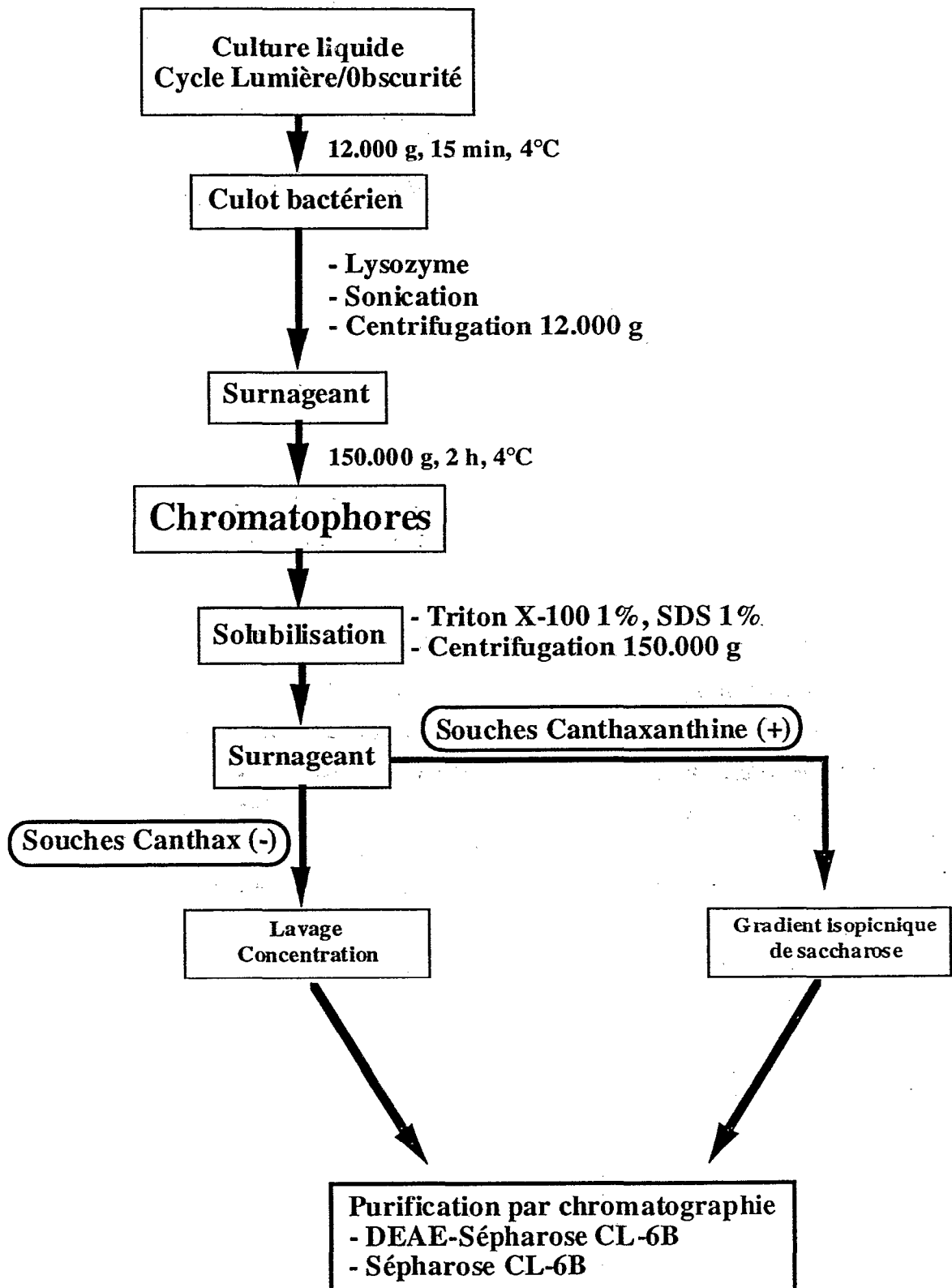
Les graines d'*Aeschynomene* sont stérilisées par immersion dans l'acide sulfurique concentré (96%) pendant 40 min. Après plusieurs rinçages abondants à l'eau distillée stérile, les graines sont laissées pendant 6 h dans l'eau. Cette étape favorise le gonflement des graines qui sont ensuite déposées stérilement dans des boîtes de Petri contenant de l'eau gélosée à 0,7% d'agar, à raison de 20 graines par boîte. La germination s'effectue ensuite en atmosphère humide, à 30°C et à l'obscurité, pendant 24 h. Lorsque les racines des jeunes plantules ont atteint environ 1 à 2 cm de long, elles sont transférées dans des tubes Gibson. Ces tubes de culture contiennent une solution nutritive (milieu de Jensen, cf. Annexe) en gélose inclinée; ils sont munis d'un capuchon en aluminium présentant un orifice par lequel la racine de la plantule est introduite. Pour éviter le dessèchement de l'enveloppe cotylédonaire des graines et pour leur permettre de se libérer spontanément de l'enveloppe de la graine, il est nécessaire de laisser les tubes en atmosphère humide pendant 24 h sous éclairage continu (lumière du jour).

### **2.2 Inoculation**

L'inoculation sur les racines se fait avec 1 ml de culture bactérienne pure en phase exponentielle de croissance (milieu YM). L'inoculation des tiges d'*Aeschynomene* est réalisée en badigeonnant les sites de nodulation avec un pinceau fin stérilisé, trempé au préalable dans la culture bactérienne pure. 48 plantules (correspondant à un portoir) sont inoculées sur les racines disposées à l'obscurité, et 48 autres plantules sont inoculées sur les racines exposées à la lumière du jour intermittente (15h/9h, lumière/obscurité). Sur un troisième, 48 autres plantules sont inoculées en badigeonnant les tiges exposées à la lumière intermittente. Les plantules sont laissées ainsi à 30°C.

## **3- Isolement des bactéroïdes**

Environ un mois après l'inoculation, les nodules racinaires et caulinaires sont prélevés dans un bécher refroidi dans la glace. Ils sont ensuite broyés dans un tampon  $\text{PO}_4^{2-}$  50 mM, EDTA 2 mM, à pH 7,4. L'extrait est filtré sur 3 couches de toile à Butler de 150  $\mu\text{m}$  de porosité. Le filtrat est centrifugé (12.000 g, 15 min, rotor SS-34), le culot obtenu lavé 2 fois par un tampon  $\text{PO}_4^{2-}$  50 mM,  $\text{MgSO}_4$  2 mM, à pH 7,4, puis repris ensuite par un tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4. Un gradient discontinu de Percoll (SIGMA) est ensuite réalisé dans des tubes de 15 ml borosilicatés, de la manière suivante. Deux couches successives de 5 ml chacune (1,08 g/ml et 1,04 g/ml) sont coulées délicatement, 3 ml d'extrait précédent sont alors déposés au sommet du tube qui est ensuite centrifugé (25.000 g, 2 h, à



**Fig. 7.** Etapes de purification du complexe RC-LH des *Bradyrhizobium* photosynthétiques d'*Aeschynomene*.

4°C). La phase de couleur marron contenant les bactéroïdes est récupérée à la pipette Pasteur, puis lavée plusieurs fois par le tampon Tris précédent afin d'éliminer le plus possible la chlorophylle. Une vérification de la présence des bactéries est faite systématiquement au microscope. Les pigments contenus dans le culot de bactéroïdes sont extraits de la même manière que dans le cas d'un culot bactérien (cf. 5.1 ci-dessous).

#### **4- Purification des complexes photosynthétiques**

Les étapes correspondantes à la purification du complexe RC-LH des *Bradyrhizobium* photosynthétiques d'*Aeschynomene* sont décrites à la Figure 7. Elles vont se différencier suivant qu'il s'agisse d'une souche produisant de la canthaxanthine ou non. Ce protocole est donc applicable à toutes les souches en général.

##### **4.1 Préparation des chromatophores**

Trois litres de culture bactérienne en phase logarithmique de croissance sont centrifugés (12.000 g, 40 min, à 4°C, rotor SORVALL GS3). Le culot obtenu est repris par un tampon de Tris-HCl 10 mM, pH 7,8, le mélange homogénéisé à l'aide d'un potter refroidi, et incubé à 37°C pendant 1h. Après addition de lysozyme 2% (p/v), d'EDTA 10 mM (pH 8,0), l'homogénat est incubé encore 1 h. Il est ensuite soniqué à 4°C pendant 10 min à 100 Hz sur un appareil 'VibraCell' (microsonificateur à sonde BIOBLOCK). Après centrifugation (12.000 g, 15 min, à 4°C, rotor SS-34), le surnageant contenant les chromatophores est centrifugé à nouveau (150.000 g, à 4°C, 1 h, rotor BECKMAN SW40 Ti). Le culot ainsi obtenu et contenant les chromatophores est congelé à -20°C.

##### **4.2 Solubilisation et purification partielle du complexe RC-LH**

Le culot contenant les chromatophores obtenus précédemment est repris par 2 ml de tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, contenant un mélange Triton X100 1%, SDS 1%. Il est mis en agitation douce pendant 2 h à température ambiante. La suspension est ensuite diluée jusqu'à 12 ml par un tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,5.

Souche ORS278. Dans ce cas, l'élimination définitive de la canthaxanthine se réalise en effectuant un gradient discontinu de saccharose, de la manière suivante. Trois couches successives de 3 ml, chacune sont déposées délicatement dans des tubes de 13 ml en polycarbonate; les couches correspondent à des concentrations de saccharose de 0,2, 0,6 et 1,0 M préparés dans un tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, et contenant du Triton X100 0,05% et du SDS 0,05%. Des aliquotes de 3 ml sont déposés au-dessus du tube. Après centrifugation (150.000 g, 16 h, à 4°C, rotor BECKMAN SW40Ti), les fractions sont délicatement prélevées à la pipette puis lavées plusieurs fois par un tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 dans une cellule d'ultrafiltration AMICON munie d'une membrane PM10 (retenant les poids moléculaires

supérieurs à 10 kDa), afin d'éliminer le saccharose. Après concentration, le spectre d'absorption des 2 fractions obtenues est enregistré sur un appareil BECKMAN DU40, entre 200 et 900 nm, afin de visualiser le complexe RC-LH. La fraction contenant le complexe est déposée sur une colonne de DEAE-Sépharose CL-6B (16 x 180 mm) (PHARMACIA) conditionnée dans un tampon Tris-HCl 10 mM, Triton X100 0,025%, pH 7,8, à 4°C (chambre froide). Le débit d'élution est maintenu à 1 ml/min. Après rinçage de la colonne par deux volumes du même tampon, puis encore par deux volumes du tampon contenant 50 mM de NaCl, le complexe RC-LH est décroché par 100 mM de NaCl dans le même tampon. Le complexe est visualisé par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 870 nm. Les fractions contenant le complexe sont rassemblées, puis filtrées et concentrées sur cellule AMICON (membrane PM10).

Souche BTAi1. Dans le cas de la souche BTAi1, les 12 ml obtenus après solubilisation (cf. ci-dessus) sont lavés plusieurs fois par un tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, et concentrés sur une cellule d'ultrafiltration AMICON jusqu'à un petit volume (environ 2 ml).

Les complexes des souches ORS278 et BTAi1 ainsi obtenus sont enfin purifiés par filtration sur gel.

#### **4.3 Purification finale par filtration sur gel**

La dernière étape de purification des complexes RC-LH des souches ORS278 et BTAi1 consiste en une filtration sur gel (ou 'perméation de gel'). Elle est effectuée sur une colonne de Sépharose CL-6 B (PHARMACIA, 16 x 430 mm) éluée par un tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, contenant du Triton X100 à 0,025%. Son domaine de fractionnement s'échelonne de 10.000 à  $4 \times 10^6$  Da. Le débit d'élution est de 1,5 ml/min. Les fractions contenant le complexe sont rassemblées, concentrées ensuite sur cellule AMICON (membrane PM10), puis congelées à -20°C.

### **5- Caractérisation et quantification des pigments bactériens**

#### **5.1 Extraction des caroténoïdes**

Un mélange acétone-MeOH (7:2, v/v) est ajouté aux culots bactériens (environ 3 volumes de solution pour 1 volume de culot) et laissé à 4°C, à l'abri de la lumière pendant 30 à 60 min. De la même manière, l'extraction peut s'effectuer sur le complexe RC-LH purifié. L'extrait est alors centrifugé (8000 g, 10 min) et le surnageant contenant les pigments récupéré. L'extraction est répétée plusieurs fois jusqu'à décoloration complète du culot. Une solution concentrée de NaCl est ajoutée (5% en final) au surnageant. Les caroténoïdes sont ensuite extraits une fois par l'hexane. Les traces d'eau qui peuvent être présentes dans la phase hexane sont éliminées soit par l'addition de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> soit à la pipette Pasteur. Après filtration sur papier, la solution d'hexane est concentrée (rotavapeur BUCHI) jusqu'à un très petit



volume. L'extrait est conservé ainsi à 4°C, à l'abri de la lumière.

## 5.2 Détermination structurale des caroténoïdes

La structure des caroténoïdes a été déterminée par plusieurs méthodes complémentaires entre elles.

### 5.2.1 Chromatographie sur couche mince

L'extrait obtenu précédemment est déposé sur une plaque de CCM (plaque d'aluminium recouvertes de silice Si60, MERCK N°5553, sans indicateur fluorescent). Les caroténoïdes sont visualisés après élution de la plaque par un solvant CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt (95:5, v/v) (Lorquin *et al.*, 1997b). Les divers caroténoïdes se séparent pour former des bandes visibles de couleur variable. Par comparaison des R<sub>f</sub> et par co-élution avec des témoins du commerce, les caroténoïdes peuvent ainsi être identifiés. Le β-carotène, la canthaxanthine, le lycopène, l'asthaxanthine, la zéaxanthine ont été fournis par la société Hoffman-LaRoche (Bâle, Suisse). L'isozéaxanthine et l'isocryptoxanthine sont synthétisés par réduction de la canthaxanthine et de l'asthaxanthine respectivement, à l'aide du borohydrure de sodium (cf. 5.2.3).

### 5.2.2 Spectrophotométrie UV/VIS

Après grattage de la silice dans la zone correspondante aux différentes bandes obtenues en CCM, les caroténoïdes sont extraits par du méthanol et la silice est éliminée par centrifugation. Le spectre d'absorption de ces molécules est ensuite enregistré à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS Beckman DU40. Les λ<sub>max</sub> correspondants sont alors comparés à ceux de la littérature (Foppen, 1971), afin de proposer une structure éventuelle.

### 5.2.3 Réduction chimique

La réaction est réalisée par l'addition de quelques cristaux de NaBH<sub>4</sub> en présence de méthanol (Krinsky et Goldsmith, 1960) sur le caroténoïde purifié. Le spectre d'absorption permettra ensuite de vérifier si la molécule contient des groupes cétoniques.

### 5.2.4 Par HPLC

La purification s'effectue à l'aide d'une pompe HPLC WATERS 600E, d'un détecteur PHILIPS PU4110, d'un injecteur RHEODYNE muni d'une boucle de 20 µl, et d'un intégrateur SPECTRA PHYSICS 4290. La séparation s'effectue sur une colonne C<sub>18</sub> HYPERSIL (ALLTECH-France) (250 x 4,6 mm) avec un solvant méthanol/tétrahydrofurane (95 : 5, v/v), à un débit de 1 ml/min. Un dégazeur à membranes WATERS est placé dans le circuit du fluide. La détection est effectuée à 450 nm (absorbance max : 0,5).

## 5.3 Quantification des pigments bactériens

Le dosage des pigments s'effectue directement à partir de l'extrait obtenu dans le mélange acétone/méthanol (cf. 5.1). Le spectre d'absorption de l'extrait est enregistré à l'aide du spectrophotomètre BECKMAN DU40 de 300-350 à 900 nm.

### 5.3.1 Bactériorchlorophylle

La concentration en bactériorchlorophylle *a* (Bchl *a*), visualisée principalement à 770 nm (Eimhjellen *et al.*, 1963), est calculée par la loi de Beer-Lambert. Le coefficient d'extinction molaire est de  $76 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Clayton, 1966). La teneur en Bchl *a* est exprimée en nmoles/ml de culture.

### 5.3.2 Caroténoïdes

La teneur en caroténoïdes totaux est déterminée par la formule suivante (Liaaen-Jensen et Jensen, 1971):  $Q(\text{mg}) = \text{DO} \times V \times 10/2500$ . DO est la densité optique mesurée au  $\lambda$  max; V est le volume de l'extrait total en ml; 2500 est le  $\epsilon$  moyen des caroténoïdes, Q étant exprimée en mg/ml de culture.

### 5.3.3 Canthaxanthine

La canthaxanthine (Rf 0,48) est purifiée par chromatographie sur couche mince (cf. 5.2.1). Les isomères de la canthaxanthine (Rf 0,37 et 0,26) sont également pris en compte pour la détermination de la canthaxanthine totale. Le spectre d'absorption est enregistré dans le méthanol. Le calcul de la concentration s'effectue par la loi de Beer-Lambert en prenant une valeur de  $2200 \text{ cm}^{-1} \cdot \%$  pour le coefficient d'absorption (Liaaen-Jensen et Jensen, 1971).

## 6- Méthodes relatives aux protéines

### 6.1 Dosage protéique

50  $\mu\text{l}$  de soude 1M sont ajoutés à 20  $\mu\text{l}$  de solution de complexe purifié (ou à 20  $\mu\text{l}$  d'extrait de chromatophores). La concentration en protéines est déterminée ensuite par la méthode de Bradford (1976). Cette technique utilise le Bleu de Coomassie sous forme anionique qui se fixe préférentiellement aux groupements cationiques des protéines.

Un ml du réactif de Coomassie est ajouté à 20  $\mu\text{l}$  de solution à doser. La lecture de la densité optique est ensuite effectuée à 595 nm, 2 min minimum après, à température ambiante. Trois répétitions sont nécessaires. La solution colorante est préparée comme suit : 100 mg de Bleu de Coomassie G250 (SIGMA) sont dissous dans une solution contenant 100 ml d'acide phosphorique à 85% et 50 ml d'éthanol à 95%, dans 1 litre d'eau. Le mélange est filtré sur papier et conservé à 4°C pendant un mois maximum. La gamme étalon est établie en prenant l'albumine de sérum de bœuf (BSA), et s'échelonne entre 0 et 60  $\mu\text{g}$ . La solution concentrée de BSA (1 mg/ml) est préparée dans l'eau en présence de NaCl 1M.

### 6.2 Détermination des poids moléculaires par filtration sur gel

La colonne utilisée est identique à celle décrite ci-dessus (cf. 4.3) mis à part un débit de 0,25 ml/min et l'utilisation d'un tampon Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,8. La détermination des poids moléculaires des protéines s'effectue en traçant la courbe  $\text{Ln}(\text{PM})$  en fonction du rapport  $V_e/V_o$ , où :

Ve, volume d'élution de la protéine

V<sub>0</sub>, volume d'exclusion (ou volume 'mort'). Celui-ci est déterminé en éluant du Bleu Dextran 2000 (SIGMA; 250 µl de solution à 2 mg/ml) au même débit.

La courbe de calibration est établie à l'aide des protéines standard du kit MW-GF1000 (SIGMA) qui sont : Anhydrase carbonique (29 kDa), Albumine (66 kDa), Alcohol Déhydrogenase (150 kDa), β-Amylase (200 kDa), Apoferritine (443 kDa) et Thyroglobuline (669 kDa). Chaque protéine est préparée dans le tampon d'élution : Thyroglobuline (13 mg/ml), β-amylase (7 mg/ml), Alcohol déhydrogénase (10 mg/ml), Albumine (33 mg/ml), Anhydrase carbonique (10 mg/ml). 300 µl de chaque protéine sont déposés et élués sur le gel une à une. 300 µl de complexe purifié sont déposés et élués sur le gel dans les mêmes conditions.

### 6.3 Electrophorèse SDS-PAGE

#### 6.3.1 Préparation des échantillons protéiques

Elle s'effectue par précipitation à l'acétone ("poudre acétonique"). Un volume de complexe purifié (ou 1/2 volume de solution de chromatophores) sont ajoutés goutte-à-goutte sur 10 volumes d'acétone à -20°C en agitation. La solution est ensuite laissée pendant 2 h à -20°C. Après centrifugation (12.000 g, 15 min), le culot est lavé deux fois par de l'acétone à -20°C. Il est ensuite séché sous vide pendant 2 h afin d'éliminer les dernières traces d'acétone.

#### 6.3.2 Electrophorèse

L'électrophorèse unidimensionnelle des protéines est réalisée sur un gel discontinu de polyacrylamide à 15% (cf. Annexe). Le gel est coulé dans des moules verticaux, préparés avec des minicellules Mini-Protean II cell (BIO-RAD) de 7 cm de long et 8 cm de large.

Les protéines précipitées sont dissoutes dans une solution dénaturante de SDS et DTT (cf. Annexe). L'addition de bleu de bromophénol permet ensuite de visualiser le front de migration. Le dépôt (10 µl) est d'environ 12 µg pour les protéines du complexe RC-LH et de 22 µg pour celles des chromatophores. Parallèlement, 7 µl de marqueurs standard de poids moléculaires connus (gamme allant de 14,4 à 97,4 kDa) et fournis par BIORAD (Low Range, N°161-0304) sont déposés. Les protéines sont séparées en appliquant une tension constante de 30 Volts pendant 5 h. Le tampon de migration est Tris-Glycine, à pH 8,3.

#### 6.3.3 Révélation

La révélation s'effectue par coloration au bleu de Coomassie. Le gel résolutif est récupéré et mis dans un récipient contenant une solution de fixation à 3% (p/v) d'acide trichloroacétique, puis soumis à une agitation douce pendant 15 à 30 min. La fixation se poursuit ensuite pendant 1 h dans une solution de bleu de Coomassie (Brillant Bleu R, SIGMA) à 0,25 % (p/v) contenant du méthanol 50 % (v/v), et de l'acide acétique à 10% (v/v). Après élimination du colorant et rinçage à l'eau distillée, la décoloration est effectuée par une solution de méthanol 25% (v/v) contenant 10% (v/v) d'acide acétique et 3% d'éthylène glycol.

La courbe standard des poids moléculaires est établie en traçant  $\text{Log}(\text{PM})$  en fonction du  $R_f$  (coefficient de migration) de chaque protéine standard.

#### **6.4 Détermination d'activité hème c**

Elle correspond à la méthode de Goodhew *et al.* (1986). Avant coloration par le bleu de Coomassie, le gel d'acrylamide précédent est immergé pendant 15 min dans une solution de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMBZ), avec agitation à l'obscurité (cf. Annexe). Puis, 0,68 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sont ajoutés et une agitation de 10 min est encore effectuée jusqu'à l'apparition d'une coloration bleue. Le gel est lavé ensuite dans la solution de lavage (cf. Annexe).

La décoloration s'effectue en ajoutant quelques cristaux de sulfite de sodium solide et se poursuit par plusieurs rinçage dans la solution de lavage. La révélation des protéines se réalise ensuite comme indiqué ci-dessus (cf. 6.3).

### **7- Méthodes spectroscopiques sur le complexe RC-LH**

#### **7.1 Détermination de l'activité photochimique**

Les spectres de changement d'absorption du complexe purifié ont été effectués au Laboratoire de Photosynthèse Bactérienne du CNRS situé à Gif sur Yvette (France). Ils sont effectués à l'aide d'un spectrophotomètre CARY 2300 équipé d'un système d'illumination perpendiculaire au trajet de lecture de l'absorbance.

La solution contenant le complexe RC-LH purifié est introduite dans la cellule de mesure. Après l'avoir illuminé pendant un temps très court, à une longueur d'onde choisie dans le proche-infrarouge, l'appareil mesure le signal environ 35 ms après le flash. Cette différence d'absorbance  $\Delta A$  est répertoriée ensuite sur une deuxième courbe (encore appelée spectre de lumière noire) qui représente les  $\Delta A$  en fonction de la longueur d'onde du flash. Cette courbe est calculée par interpolation à l'aide d'un programme (Kaleidagraph) qui utilise une méthode de calcul des 'moindre carrés' sur un ordinateur MACINTOSH.

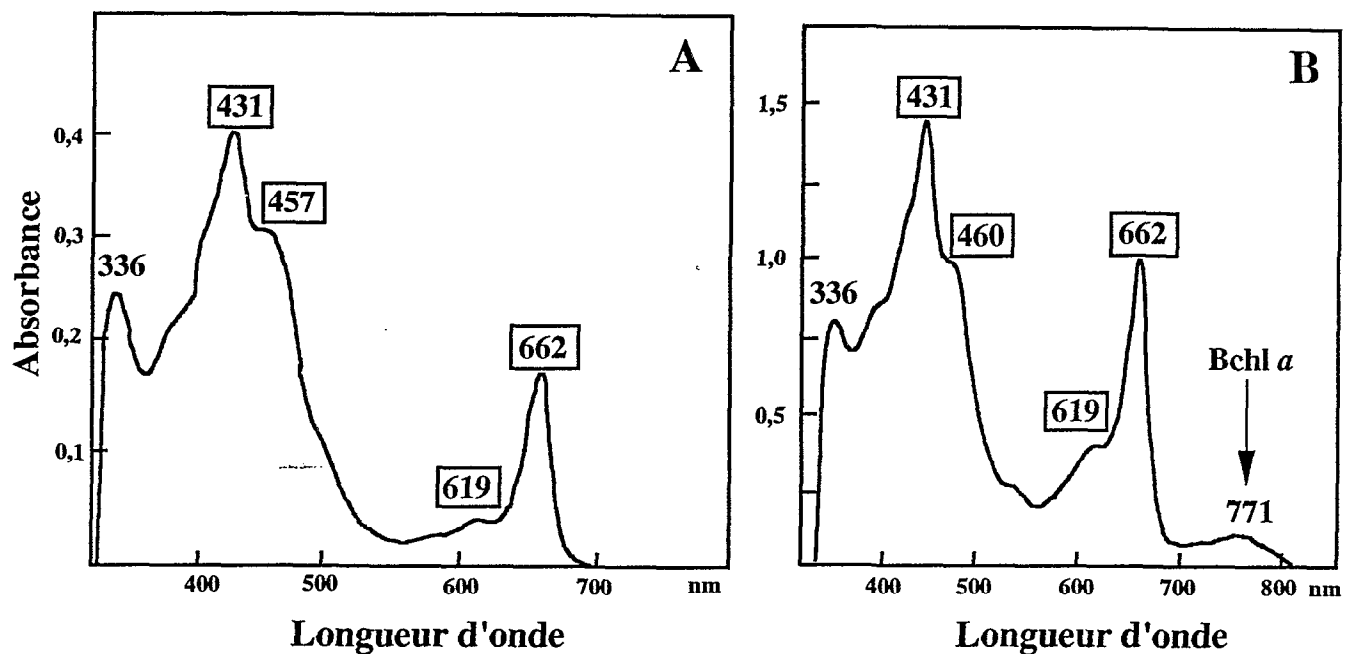
#### **7.2 Détermination de la quantité de RC**

A l'aide des courbes d'activités photochimiques, le  $\Delta A$  mesuré à 870 nm est relevé. Puis, la concentration de RC est calculée comme suit :  $[\text{RC}] = \Delta A / \Delta \epsilon$ , où  $\Delta \epsilon_{870} = 113 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Straley *et al.*, 1973).

#### **7.3 Détermination de la quantité de LH**

Elle est calculée par la formule  $[\text{LH}] = A_{870} / \epsilon_{870}$ , où  $\epsilon_{870} = 128 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Clayton *et Clayton*, 1981).

# RESULTATS



**Fig. 8.** Spectres d'absorption des extraits de bactéroïdes isolés des nodules (A) racinaires, (B) caulinaires. Solvant : Acétone/MeOH (7: 2). Dans le cas des nodules racinaires, éclairés ou pas, le spectre obtenu est identique à (A). Les longueurs d'onde encadrées correspondent à celles de la chlorophylle : 431, 619 et 662 nm sont celles de la chlorophylle *a*, 457 est celle de la chlorophylle *b*.

La souche ORS278 est étudiée dans ce mémoire. La souche BTAi1, premier rhizobium photosynthétique isolé (Eaglesham *et al.*, 1990), sera comparée dans des études particulières. Les résultats exposés ici donnent un aperçu général du comportement de l'ORS278, et un accent particulier est mis sur la description de l'appareil photosynthétique, sur sa purification et sa fonctionnalité.

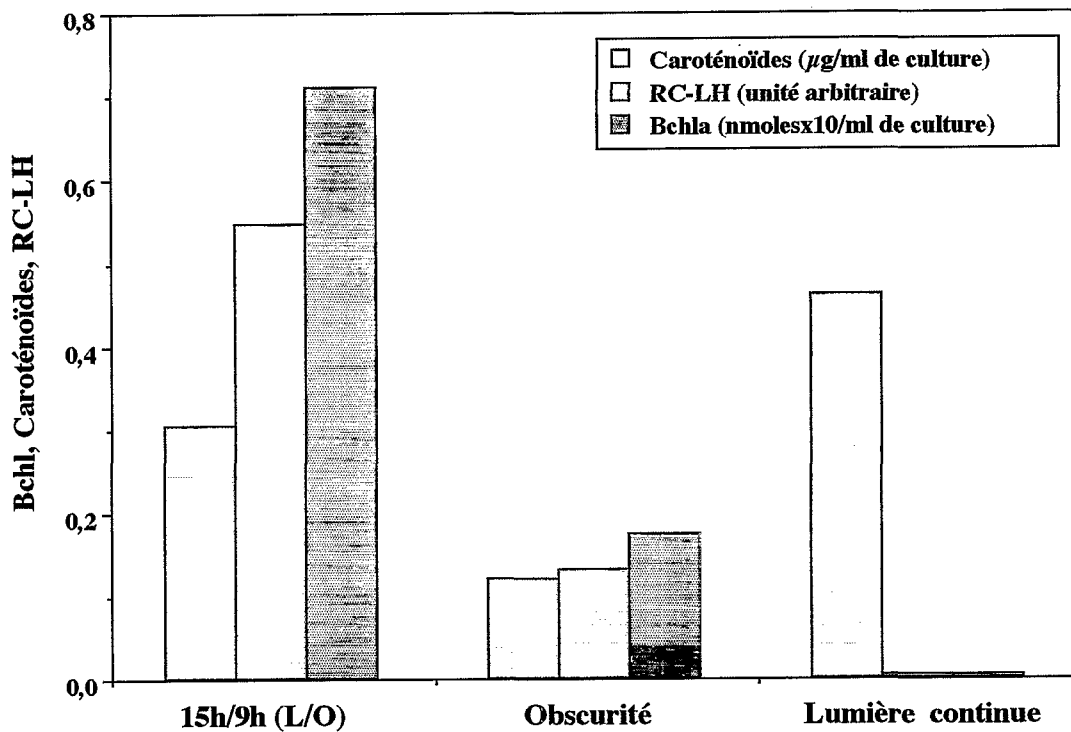
## **1- La bactériochlorophylle est synthétisée dans le nodule caulinaire et non dans le nodule racinaire**

ORS278 synthétise-t-elle les pigments (Bchl *a*, caroténoïdes) dans le nodule ? Des tests portant sur la nodulation caulinaire et racinaire ont donc été entrepris. Les essais ont été effectués en éclairant ou en maintenant à l'obscurité les nodules racinaires, les nodules caulinaires étant eux éclairés (cf. Matériels et méthodes). Après isolement des bactéroïdes et extraction des pigments, les spectres d'absorption ont été enregistrés (Fig. 8A et 8B).

Il ressort que la bactériochlorophylle *a* n'est pas synthétisée dans les nodules racinaires éclairés ou non (Fig. 8A), alors qu'elle est présente dans les bactéroïdes de nodules caulinaires (Fig. 8B). Notons la présence de chlorophylle résiduelle que l'on visualise à 662 nm et à 457-460 nm (Zilinskas Braun, 1974). La zone des caroténoïdes est masquée ; on ne peut donc déterminer si ces composés sont synthétisés ou non. La séparation totale de la chlorophylle dans l'extrait est très difficile. Il faudra ultérieurement travailler sur un plus grand nombre de nodules et séparer correctement par chromatographie sur couche mince la chlorophylle des caroténoïdes.

## **2- Comportement de la bactérie vis-à-vis de l'oxygène : respiration**

Rappelons dans un premier temps quelques généralités sur la respiration des bactéries photosynthétiques. La voie principale de la génération d'énergie chez une bactérie aérobie hétérotrophe *Erhythrobacter longus* est la photosynthèse et la respiration oxygénique (Harashima *et al.*, 1982; Okamura *et al.*, 1986). Chez d'autres espèces aérobie hétérotrophes, il peut également exister une respiration anaérobie, dans la mesure où l'on remplace l'accepteur terminal d'électrons, l'oxygène, par d'autres substituts comme la triméthylamine-N-oxyde (TMAO), le diméthylsulfoxyde (DMSO) (Madigan et Gest, 1978), le monoxyde d'azote (N<sub>2</sub>O) (McEwan *et al.*, 1985) ou encore le nitrate (Shioi *et al.*, 1986). Ces substrats auxiliaires maintiennent la balance redox au cours du métabolisme photosynthétique. Ils oxydent le dernier cytochrome de la chaîne des électrons, entraînant ainsi une modification du niveau redox en un état plus oxydé. Le complexe photosynthétique des bactéries aérobies hétérotrophes n'est généralement pas opérationnel en anaérobiose car les accepteurs primaires d'électrons que sont les quinones sont à l'état réduit. Une exception est celle de la souche



**Fig. 9.** Effet du mode d'éclairage sur la synthèse des pigments (Bchl, caroténoïdes) ainsi que sur la formation du complexe RC-LH de la souche ORS278. Le complexe RC-LH est purifié puis quantifié arbitrairement par la mesure de l'absorbance à 870 nm.



*Roseobacter denitrificans* (anciennement *Erythrobacter* sp. souche OCh114), capable de se développer en présence de nitrate et de TMAO (Shioi *et al.*, 1986). En fait, il faut savoir que les bactéries photosynthétiques anaérobies se comportent de la même manière, c'est-à-dire qu'elles possèdent une activité de dénitrification où le nitrate est le substrat auxiliaire. Citons comme exemple *Rhodobacter spheroides* f.s. *denitrificans* (Satoh *et al.*, 1976) et *R. capsulatus* (McEwan *et al.*, 1985).

Voyons maintenant le comportement de ORS278. La bactérie pousse parfaitement en aérobie (21% d'O<sub>2</sub>) dans un milieu liquide YM (Vincent, 1970), et sa couleur est orange. En anaérobie, la bactérie ne pousse pas, qu'elle soit éclairée ou non. En semi-aérobie, la croissance est plus faible, et la couleur de la culture est rosée. Lorsque 1 et 10 mM de TMAO, ou encore 10 mM de nitrate sont ajoutés dans le milieu de culture en condition d'anaérobie, on n'observe toujours pas de croissance. Par conséquent, **ORS278 est aérobie stricte.**

### **3- Comportement de la bactérie en fonction du mode d'éclairage**

Différents modes d'éclairage ont été expérimentés sur la production des pigments et la formation du complexe photosynthétique par la souche en culture liquide: (i) lumière intermittente (15 heures de lumière/9 heures d'obscurité), (ii) obscurité totale ou (iii) lumière continue. La teneur en bactériochlorophylle, en caroténoïdes ainsi que la quantité relative de complexe RC-LH ont été suivis dans les 3 cas (Fig. 9).

Il ressort tout d'abord que la bactériochlorophylle, les caroténoïdes, ainsi que le complexe RC-LH sont synthétisés à l'obscurité. Comme chez les bactéries marines, la souche ORS278 n'a pas forcément besoin de lumière pour former des pigments photosynthétiques, contrairement à la souche BTA11 chez qui sa présence est indispensable pour initier leur synthèse (Evans *et al.*, 1990). En lumière intermittente, la quantité de Bchl *a* est 4 fois supérieure à celle synthétisée à l'obscurité. Par contre, elle est inexistante (ou détruite) en lumière continue.

La synthèse des caroténoïdes est induite par la lumière, confirmant ainsi les données de la littérature (Lorquin *et al.*, 1997b). De plus, nous avons évalués que la souche synthétise 1,5 fois plus de caroténoïdes à la lumière continue qu'en lumière intermittente, et 4 fois plus qu'à l'obscurité. Après extraction à l'hexane des caroténoïdes, une purification par CCM est réalisée. On trouve alors que, en lumière continue, la spirilloxanthine est toujours présente malgré l'absence de Bchl *a*.

La concentration de complexe photosynthétique RC-LH est 4 fois plus importante en lumière intermittente qu'à l'obscurité. Il est logique aussi de trouver également le même rapport de teneur en Bchl entre lumière intermittente et obscurité. En lumière continue, le complexe RC-LH est absent (ou détruit).

L'augmentation de canthaxanthine, est un phénomène nouveau (non répertorié dans la littérature) chez les bactéries photosynthétiques. De toute évidence, la canthaxanthine n'est pas synthétisée via le complexe RC-LH : on suppose donc que l'apparition de radicaux libres oxygénés (anions superoxydes, OH<sup>-</sup>, ...) engendrés par la lumière sur l'oxygène stimule la synthèse de canthaxanthine, et que cette synthèse est plus importante lorsque la quantité de lumière est augmentée. En lumière continue, il se pourrait que la synthèse des apoprotéines du centre réactionnel et de l'antenne soit inhibée; ainsi, la Bchl ne peut plus s'incorporer et est rapidement dégradée. Par contre, la spirilloxanthine est beaucoup plus stable et est présente dans ces conditions car après tout, des caroténoïdes de bactéries photosynthétiques sont bien synthétisés dans *E. coli* quand on y exprime des gènes codant pour les enzymes nécessaires (Misawa *et al.*, 1990).

Une purification du complexe Bchl-protéines a été réalisée pour caractériser ce système. Nous la développons dans ce qui suit.

#### **4- Purification du complexe RC-LH de la souche ORS278**

Les étapes de purification du complexe photosynthétique sont résumées sur la Figure 7 (cf. Matériels et méthodes). Elles se différencient à un moment suivant qu'il s'agit d'une souche productrice de canthaxanthine ou non. Les deux souches étudiées sont ORS278 et par comparaison la souche BTAi1.

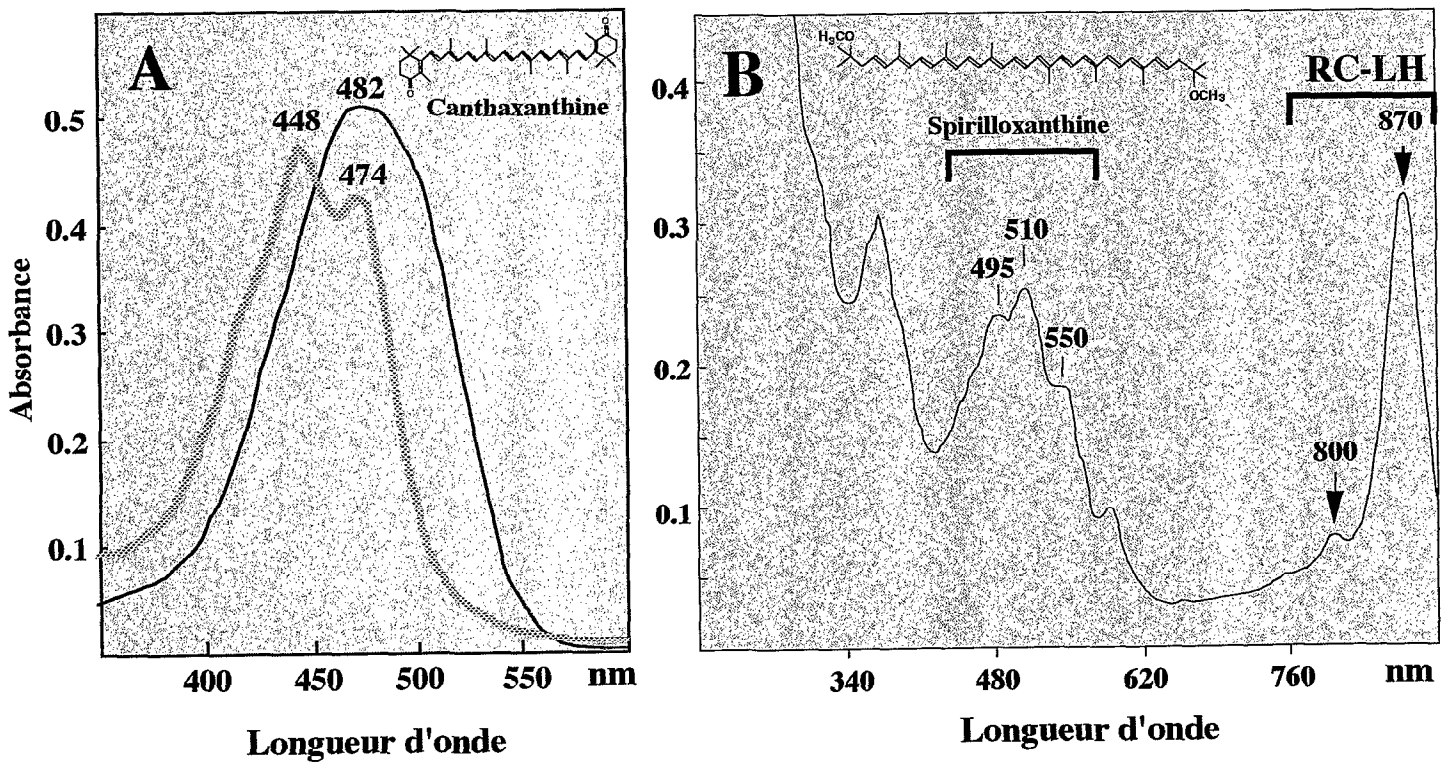
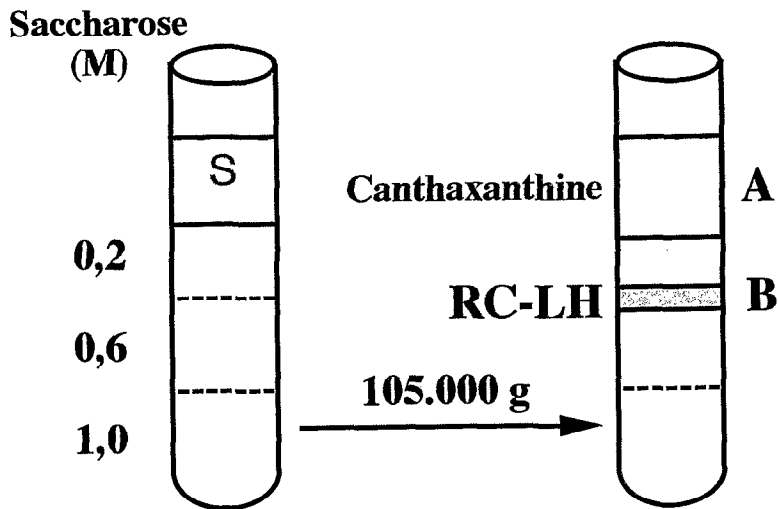
##### **4.1 Préparation des chromatophores**

La méthode est adaptée de celle de Tai et Kaplan (1985) qui porte sur l'étude des membranes de *Rhodobacter spheroides*. Le lysozyme est une protéine qui coupe les liaisons  $\beta$ -1,4 des polysaccharides membranaires permettant ainsi une libération des chromatophores du reste de la membrane bactérienne. La sonication, elle, aide les chromatophores à se détacher des structures lipidiques membranaires.

##### **4.2 Solubilisation par des détergents**

Le traitement par des détergents organiques permet de rendre soluble l'appareil photosynthétique des chromatophores. Le choix du détergent est donc primordial. Ainsi, l'oxyde de lauryldiméthylamine (LDAO) (Picorel *et al.*, 1983), le Triton X-100 (Shimada *et*

## Gradient isopicnique



**Fig. 10.** Purification du complexe photosynthétique de la souche l'ORS278 par gradient isopicnique. S, surnageant obtenu par solubilisation des chromatophores (cf. Matériels et méthodes). A, spectre d'absorption de la couche contenant la canthaxanthine, avant (—) et après (----) réduction par le borohydrure de sodium. Cette réduction donne l'isozéaxanthine. B, spectre de la bande rose contenant le complexe photosynthétique.

al., 1985), l'octyl- $\beta$ -glucopyranoside (OG) (Varga et Staehelin, 1985), le SDS, en combinaison ou non, ont été testés. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 2 ci-dessous.

**Tableau 2. Solubilisation par divers détergents.**

Détergent testé <sup>1</sup>	Absorbance (870 nm) <sup>2</sup>
LDAO 0,6 %	0,020
LDAO 1,0 %	0,033
Triton X-100 1 %, SDS 1 %	0,042
OG 30 mM	0,018
OG 30 mM, SDS 7,5 mM	0,057

<sup>1</sup> Préparé dans un tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,8. Deux millilitres sont rajoutés sur les membranes de chromatophores, et, après homogénéisation au vortex, incubés pendant 2 heures à agitation douce, à température ambiante (cf. Matériels et méthodes). <sup>2</sup> Longueur d'onde maximale de l'absorption de l'antenne du complexe photosynthétique.

L'extraction du complexe par un mélange OG 30 mM, SDS 7,5 mM est la plus efficace. Cependant, pour des raisons de coût, le mélange Triton X100 1%, SDS 1%, à l'exemple de Shimada et ses collaborateurs (1985) est choisi.

### 4.3 Purification par chromatographie

Après gradient isopicnique de saccharose (Fig. 10), le complexe photosynthétique de la souche ORS278 est déposé sur un gel de DEAE-Sépharose, puis élués par une solution de NaCl 100 mM. Il est facilement visualisable par sa couleur rose. Le spectre d'absorption de la fraction purifiée de cette manière est identique à celui de la Figure 10B. Une chromatographie sur gel de filtration (ou par 'perméation de gel') permet ensuite d'éliminer les impuretés résiduelles.

Dans le cas de la souche BTAi1, l'extrait ne s'accroche pas sur le gel de DEAE-Sépharose. Ce qui semble vouloir dire que le complexe photosynthétique de cette souche est différent de celui de l'ORS278. Une seule fraction est récupérée après chromatographie sur gel de filtration. Son spectre d'absorption est similaire à celui de la souche ORS278 (Fig. 10B).

### 4.4 Poids moléculaire

Les complexes purifiés des souches ORS278 et BTAi1 sont élués à des volumes d'éluion identiques à celui du Bleu Dextran (2000 kDa). Leur poids moléculaire est donc égal ou supérieur à 2000 kDa. Par rapport aux poids moléculaires des complexes photosynthétiques des bactéries pourpres comme par exemple *Rhodospseudomonas sphaeroides* (101 kDa, Williams *et al.*, 1986) ou encore *Rhodocyclus gelatinosa* (500 kDa,

Rivas et Agalidis, résultats non publiés), les complexes de l'ORS278 et BTAi1 sont à première vue beaucoup plus lourds. On pourrait aussi émettre l'hypothèse de la présence de lipides ou de polysaccharides membranaires qui ne peuvent être éliminés ni par la sonication, ni par les détergents.

### **5- Le complexe RC-LH est unique**

Des gradients isopicniques effectués avec des couches de saccharose plus fines n'ont pas permis d'obtenir d'antenne LHII (Varga et Staehelin, 1985). De même, un gradient continu de NaCl lors de l'étape de purification par chromatographie d'échange d'ions (DEAE-Sépharose) n'a pas abouti à l'obtention d'une telle antenne. Au niveau des spectres d'absorption du complexe purifié, les bandes à 800 et 870 nm sont caractéristiques du centre réactionnel RC et de l'antenne centrale LHI respectivement (Fig. 10B). De ce fait, qu'il s'agisse de la souche ORS278 ou BTAi1, le complexe est unique et est nommé RC-B870.

Les complexes RC-B870 des souches ORS278 et BTAi1 sont très similaires au complexe RC-B865 de la bactérie marine *Erythrobacter longus* (Harashima, 1989) et aux complexes RC-B870 et RC-B880 de *Rhodocyclus gelatinosus* (Agalidis *et al.*, 1990) et *Rhodospirillum rubrum* (Berger *et al.*, 1992) respectivement. Le complexe RC-B870 de la souche ORS278 ressemble aussi quantitativement à ceux de certaines bactéries pourpres. Il contient 2% de centre RC par rapport à l'antenne LH, 3% ayant été enregistrés pour le centre de *Rhodocyclus gelatinosus* (Agalidis *et al.*, 1990). La teneur en bactériochlorophylle est très faible, 3 nM/mg de protéines (50 nM/mg de protéines chez la bactérie *Rhodocyclus gelatinosus* ; Agalidis, communication personnelle).

### **6- Le complexe de la souche ORS278 est stable et fonctionnel**

Le complexe RC-B870 de la souche ORS278 est très stable lorsqu'il est conservé à -20°C pendant plusieurs mois. Par contre, ce n'est pas le cas du complexe de la souche BTAi1 dont le centre réactionnel RC est rapidement dégradé : en effet, le spectre d'absorption fait apparaître une bande à 773 nm et une autre à 680 nm, qui correspondent à de la bactériophéophytine *a*, et de l'acétylbactériochlorophylle *a* respectivement, et qui sont deux produits de dégradation de la BChl (non représenté).

Pour savoir si le complexe RC-B870 est fonctionnel, il est illuminé pendant 35 ms à différentes longueurs d'onde (cf. Matériels et méthodes). La Figure 11 rend compte du phénomène observé. L'explication en est le suivant : la lumière oxyde le dimère de bactériochlorophylle (P); on voit ainsi un blanchiment après un flash (premier pic, Fig. 11). L'électron éjecté du dimère migre sur la quinone Q<sub>A</sub>, puis sur Q<sub>B</sub> (cf. Fig. 1 et Introduction).

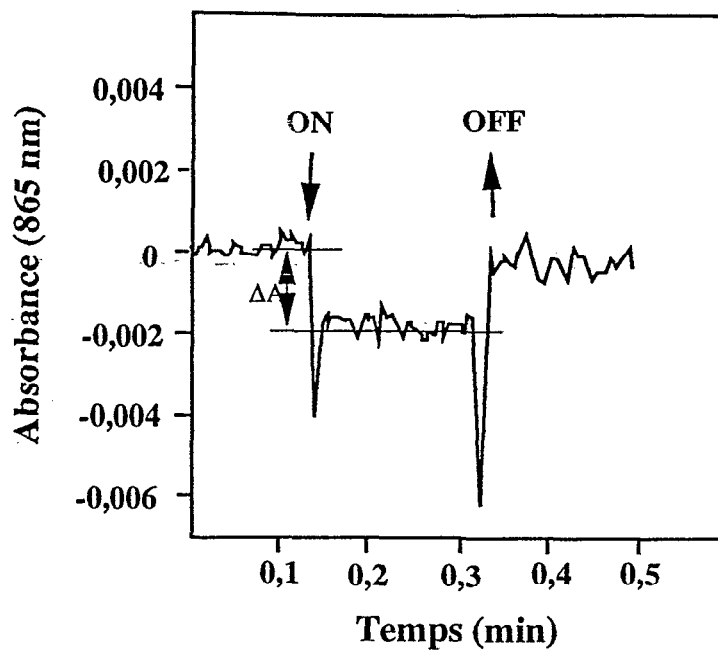


Fig. 11. Spectre de changement d'absorbance induit par la lumière à une longueur d'onde de 865 nm. ON, flash de lumière; OFF, coupure du flash;  $\Delta A$ , différence d'absorbance.

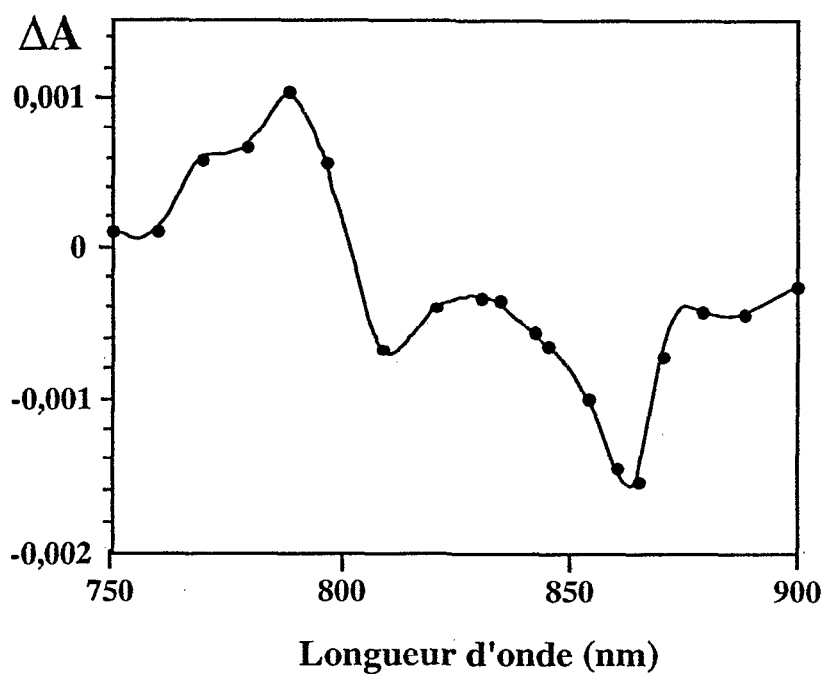


Fig. 12. Spectre des différences d'absorbance (lumière-obscurité) du complexe RC-LH en fonction de la longueur d'onde expérimentée. Ces différences sont calculées à partir du spectre de la Fig. 11.

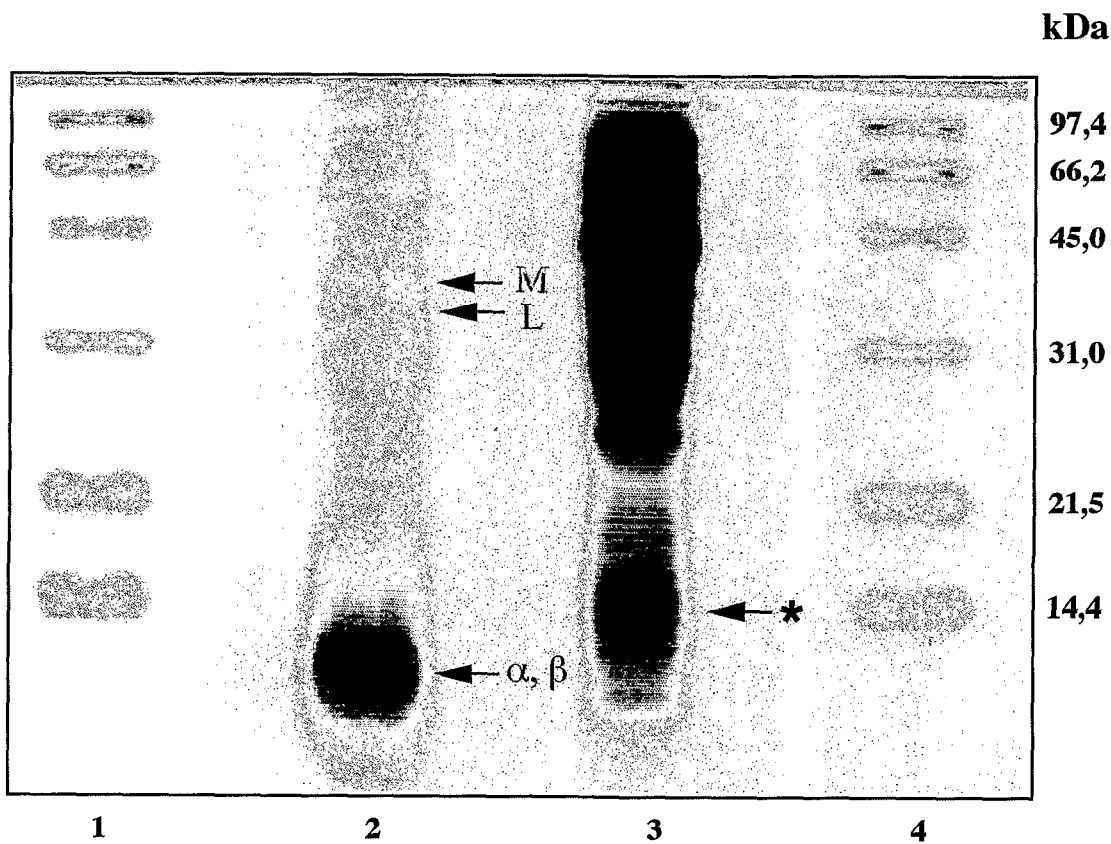
On forme donc un couple  $P^+Q_B^-$  (semiquinone). A l'obscurité (deuxième pic), il y a recombinaison de charges, c'est-à-dire un retour inverse de l'électron de  $Q_B^-$  vers  $P^+$ . On régénère ainsi l'état initial  $P(\text{red})Q_B(\text{ox})$ . Cette expérience montre que le système est réversible. L'appareil photosynthétique de la souche ORS278, débarrassé de sa membrane est donc fonctionnel.

La Figure 12 qui représente la variation des  $\Delta A$  en fonction de la longueur d'onde étudiée fait apparaître deux bandes, à 800 et 870 nm; elles correspondent à l'excitation des molécules de Bchl au sein de l'antenne (B870) et de celles du centre réactionnel (B800). Un tel spectre de différences d'absorption est similaire à ceux des bactéries pourpres *Rhodospseudomonas spheroides* (Reed, 1969) et *Erythrobacter longus* (Harashima *et al.*, 1982).

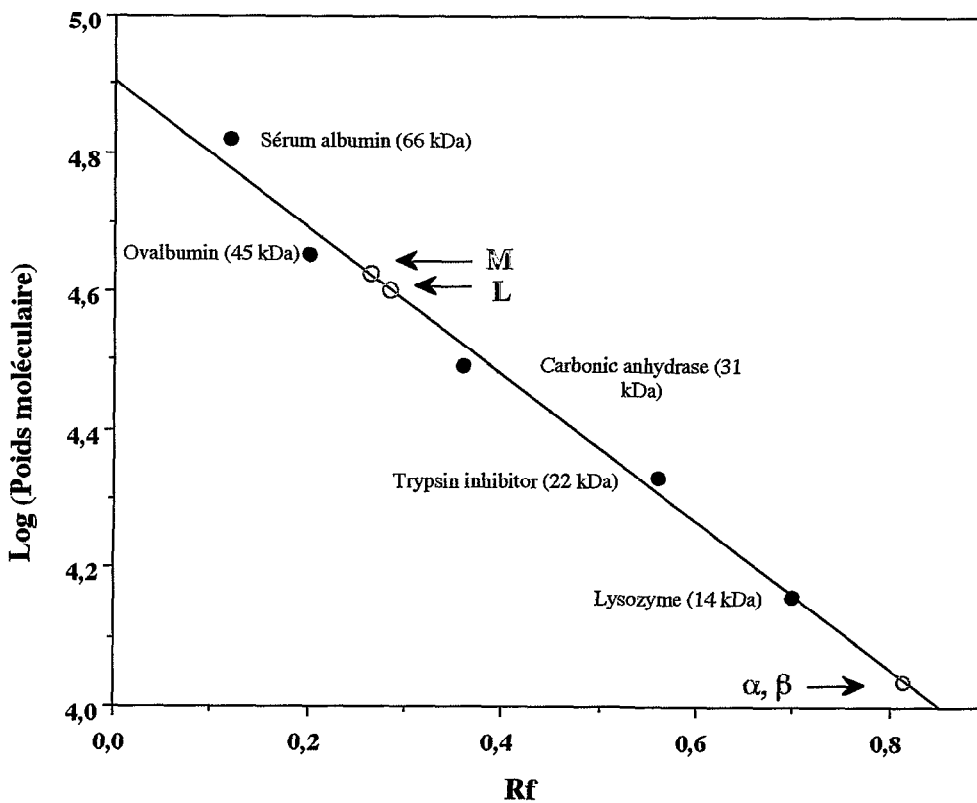
## **7- La canthaxanthine n'est pas localisée sur le complexe RC-LH**

Le gradient discontinu de saccharose a été mis au point dans le but de séparer le complexe photosynthétique RC-LH de la canthaxanthine, très majoritaire dans le cas des bactéries oranges. La Figure 10 montre que deux fractions sont obtenues; l'une est de couleur orange et correspond à la présence de canthaxanthine; ce qui est confirmé par le spectre d'absorption, ainsi que par celui de l'extrait de cette fraction après réduction au borohydrure de sodium (Fig. 10A); l'autre fraction est rose et le spectre d'absorption correspondant confirme qu'il s'agit du complexe RC-LH de la bactérie (Fig. 10B). **Donc, la canthaxanthine n'est pas localisée sur le complexe RC-LH des *Bradyrhizobium* photosynthétiques oranges.** Dans le cas des bactéries roses (type BTAi1), il n'est pas nécessaire de faire un gradient isopicnique de saccharose car elles ne synthétisent pas de canthaxanthine. Le spectre d'absorption des complexes purifiés des souches ORS278 et BTAi1 font également apparaître des bandes à 495, 510 et 550 nm caractéristiques de la spirilloxanthine (Fig. 10B). Après extraction des pigments par un mélange acétone-méthanol (Clayton, 1966) suivi d'une chromatographie sur couche mince (cf. Matériels et méthodes), on observe qu'un seul caroténoïde est libéré, et qu'il s'agit bien de la spirilloxanthine, par comparaison avec un extrait de caroténoïdes totaux de la même souche (Lorquin *et al.*, 1997b). La structure de la spirilloxanthine ainsi purifiée par CCM est confirmée définitivement par son spectre d'absorption qui montre ses bandes caractéristiques à 460, 490 et 525 nm dans le méthanol (Foppen, 1971; Lorquin *et al.*, 1997b). En définitive, la spirilloxanthine est le seul caroténoïde localisé sur le complexe RC-LH des *Bradyrhizobium* photosynthétiques d'*Aeschynomene*.

*Note : Les bandes d'absorption de la spirilloxanthine associée au complexe sont différentes de celles de la molécule purifiée dans le méthanol. Cette différence tient au fait qu'elle est entourée de protéines, et surtout que le spectre s'effectue dans un tampon contenant du Triton X-100 et qui décale légèrement les longueurs d'onde.*



**Planche I.** Profil d'électrophorèse SDS-PAGE réalisé sur un gel à 15% (cf. Matériels et méthodes) . (1) et (4) protéines standards; (2), complexe RC-LH purifié de la souche ORS278; (3), extrait total de chromatophores. M et L, polypeptides du centre réactionnel;  $\alpha$ ,  $\beta$ , polypeptides de l'antenne LH. (\*), indique l'emplacement d'une protéine révélée par coloration au TMBZ (cf. texte). Cette bande correspond à un poids moléculaire de 14,4 kDa.



**Fig 13.** Courbe standard correspondant à l'électrophorèse SDS-PAGE (cf. Planche I) et indiquant les poids moléculaires des protéines.



## **8- Protéines *puf* et cytochrome *c***

### **8.1 Poids moléculaires des protéines *puf***

Les résultats de la migration sur gel SDS-PAGE des protéines du complexe RC-LH de la souche ORS278 sont illustrés sur la Planche 1. En ce qui concerne la souche BTAi1, nous n'avons pu les déterminer. La courbe standard (Fig. 13) a permis de déterminer les poids recherchés. Le gel montre environ 7 à 8 polypeptides de poids moléculaires variant de 10 à 80 kDa. Parmi eux, deux unités ayant des masses de 41,5 et 43,8 kDa semblent correspondre aux polypeptides L et M du centre réactionnel. Une très large bande d'environ 11 kDa pourrait correspondre à un agglomérat de protéines  $\alpha$  et  $\beta$  de l'antenne LH, et qui ne se séparent pas bien. Toutes les protéines de poids moléculaire supérieur à 45 kDa sont des contaminants.

Ces résultats sont comparés à ceux obtenus par séquençage des gènes de l'opéron *puf* (Eric GIRAUD, communication personnelle). Les valeurs trouvées dans ce cas sont les suivantes : L (31,5 kDa), M (35 kDa),  $\alpha$  (7 kDa) et  $\beta$  (8,2 kDa). Il faut noter ici que, généralement les poids moléculaires obtenus par électrophorèse SDS-PAGE sont toujours plus élevés que ceux obtenus par le séquençage des gènes. En effet, la présence de SDS et de tampon contribue à ces différences (F. Reiss-Husson, communication personnelle).

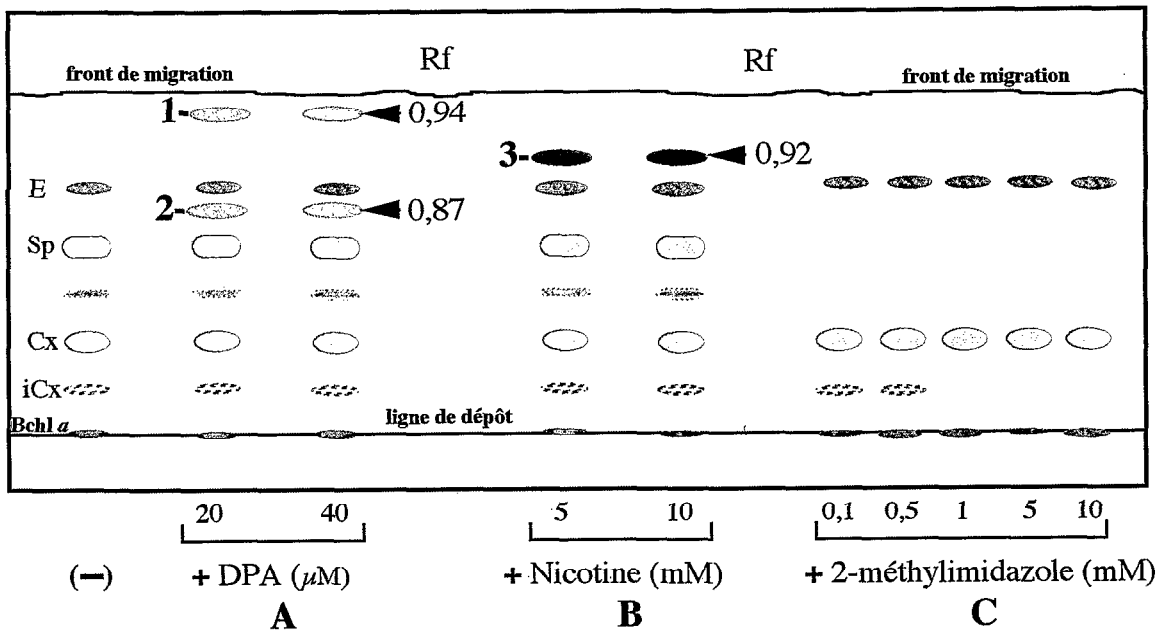
### **8.2 Le complexe RC-LH ne contient pas d'hème *c***

Généralement, les cytochromes de type *c* ne perdent pas leurs hèmes durant leur migration en électrophorèse SDS-PAGE; ils peuvent ainsi être détectés par leur activité peroxydasique directement sur le gel, en utilisant le 3,3',5,5'-tétraméthylimidazole (TMBZ) comme substrat (Goodhew *et al.*, 1986). Les hèmes oxydent ce substrat qui est ensuite précipité en faisant apparaître une coloration bleue. Après migration des protéines totales du complexe RC-LH, aucune activité hémique n'a été détectée sur le gel. Par contre, une bande bleue a été mise en évidence sur le profil des protéines totales des chromatophores (Planche 1). Cette bande correspond à une protéine de 14,4 kDa. Il pourrait s'agir d'un cytochrome soluble (comme le cytochrome  $c_2$ ) ou encore un cytochrome membranaire (complexe  $b/c_1$ ) et qui interviendraient dans le transport des électrons hors du complexe photosynthétique RC-LH (cf. Fig. 1, Introduction).

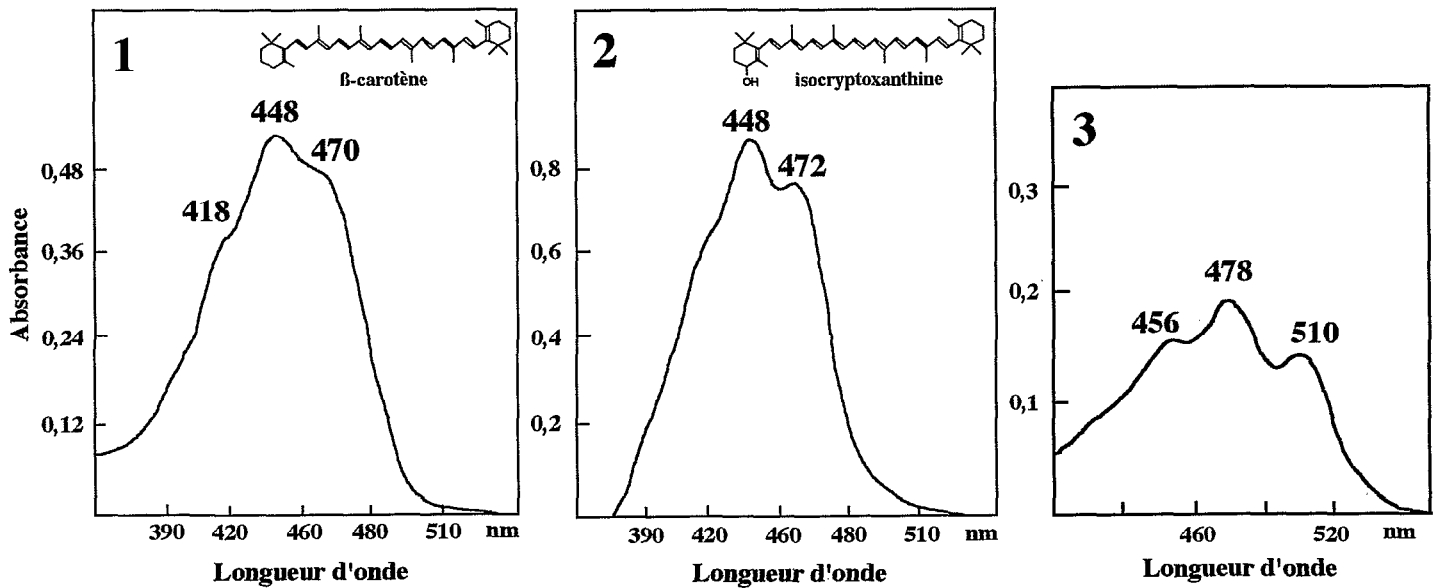
Une étude complémentaire à celles portant sur la caractérisation du complexe RC-LH a également été menée sur la biosynthèse de la spirilloxanthine et de la canthaxanthine.

## **9- Recherche du mécanisme de biosynthèse des caroténoïdes**

La Diphénylamine (DPA), la Nicotine et la 2-méthylimidazole sont des inhibiteurs de la synthèse des caroténoïdes. Alors que le DPA agit au niveau des étapes de déshydrogénation (Liaacn-Jansen *et al.*, 1961; Britton *et al.*, 1976), la Nicotine a une action sur la cyclisation



**Fig. 14.** Chromatographie sur couche mince des caroténoïdes de la souche ORS278 en absence (-) et en présence (+) d'inhibiteurs dans la culture. **A**, Diphénylamine (DPA); **B**, Nicotine; **C**, 2-méthylimidazole. Conditions : Gel de silice 60 (épaisseur 0,2 mm). Solvant, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt (95:5). E, échinénone; Sp, spirilloxanthine; Cx, canthaxanthine; iCx, isomères de la canthaxanthine; Bchl *a*, bactérochlorophylle *a* (Lorquin *et al.*, 1997b). 1, 2, 3, voir spectres d'absorption à la Fig. 15.



**Fig. 15.** Spectres d'absorption des caroténoïdes. 1,  $\beta$ -carotène et 2, isocryptoxanthine apparus dans la culture en présence de diphénylamine; 3, voir texte.

(Shimada *et al.*, 1985). La 2-méthylimidazole, elle, est moins connue, et intervient aussi au niveau de la cyclisation (An *et al.*, 1989). Pour mettre en évidence des caroténoïdes qui interviennent dans la biosynthèse (intermédiaires), différentes concentrations de ces molécules ont été testées : elles sont introduites soit en début de culture, soit 48 heures après pour permettre à la bactérie de démarrer sa croissance. Après extraction, purification par CCM et analyse chimique des pigments (cf. Matériels et méthodes), les résultats obtenus sont les suivants (Fig. 14).

En premier lieu, le 2-méthylimidazole inhibe totalement la synthèse de spirilloxanthine à une concentration de 100  $\mu\text{M}$  (Fig. 14, voir C). Aucun caroténoïde différent de ceux déjà connus pour cette souche n'est apparu. Cependant, une concentration encore plus faible en 2-méthylimidazole pourrait mettre en évidence un dérivé nouveau. La canthaxanthine, quant à elle, n'est pas inhibée par ce composé, même à 10 mM.

Le DPA à 20 ou 40  $\mu\text{M}$  inhibe faiblement la synthèse des caroténoïdes, mais fait apparaître deux composés jaunes ( $R_f$  0,94 et 0,87; Fig. 14, voir A). Ces composés présentent dans le méthanol des bandes d'absorption en spectrophotométrie qui sont : composé 1 (418, 448, 478 nm), composé 2 (422, 448, 472 nm). La comparaison de leur temps de rétention en HPLC (1, Rt 24,7 min; 2, Rt 9,55 min), ainsi que leur co-élution avec des molécules standards du commerce montrent en définitive que le composé 1 est le  $\beta$ -carotène, et que le composé 2 correspond à l'isocryptoxanthine (Fig. 15).

La Nicotine inhibe très faiblement la synthèse des caroténoïdes, du moins aux concentrations testées. Un composé 3 orange foncé ( $R_f$  0,92, Fig. 14, voir B) est cependant mis en évidence. Son spectre dans le méthanol présente un tri-épaulement (456, 478, 510 nm) (Fig. 14). Conformément à la littérature (Foppen, 1971), il pourrait à première vue s'agir du lycopène, de la rhodopine, de la rhodovibrine ou de l'anhydrorhodovibrine. Une analyse plus approfondie basée sur des méthodes chimiques et spectrales (infrarouge, RMN, spectrophotométrie de masse) conduira à partir de la molécule purifiée à son identification, l'HPLC ne permettant pas de différencier ces composés faute de témoins.

En définitive, il n'a pas été possible dans l'immédiat d'identifier des intermédiaires dans la voie de biosynthèse de la spirilloxanthine. Par contre, la canthaxanthine, comme on l'attendait, est synthétisée à partir du  $\beta$ -carotène; l'isocryptoxanthine mis en évidence ici n'est autre que le précurseur de l'échinénone (Fig. 5, cf. Introduction).

**DISCUSSIONS  
ET PERSPECTIVES**

Les travaux présentés dans ce mémoire contribuent à l'avancée des connaissances sur les symbioses *Bradyrhizobium* photosynthétiques-*Aeschynomene*. Parmi les quatre vingt *Bradyrhizobium* photosynthétiques isolés au Sénégal (Lorquin *et al.*, 1993), la souche ORS278 isolée de nodules caulinaires d'*Aeschynomene sensitiva*, a été prise comme modèle. Cette souche a été choisie pour les raisons suivantes : (i) elle synthétise de la canthaxanthine, caroténoïde à haute valeur et dont la présence constitue une originalité, (ii) nos recherches sont complémentaires aux études sur les gènes de ces bactéries et qui sont effectuées au Laboratoire des Symbiotes Tropicales et Méditerranéennes de Montpellier (France). Ainsi, le système photosynthétique de ORS278 a été caractérisé en apportant une description structurale ainsi que quelques éléments du mécanisme de biosynthèse des pigments impliqués dans la photosynthèse.

La souche ORS278 est aérobie stricte et, ni le TMAO, ni le nitrate ne permettent de restituer la respiration en anaérobiose. Il faut noter que le système respiratoire des bactéries aérobies se distingue de celui des bactéries anaérobies par une composition différente en cytochromes (Takamiya, 1989).

La lumière intermittente stimule considérablement la synthèse de canthaxanthine et de bactériochlorophylle, alors que ces pigments sont faiblement produits à l'obscurité.

Les teneurs en bactériochlorophylle *a* enregistrées sont faibles (Lorquin *et al.*, 1997), et vont logiquement dans le sens d'une faible quantité de complexe photosynthétique dans ces souches. Plusieurs purifications successives ont donc été nécessaires. On a enregistré que, dans le complexe RC-LH de la souche ORS278, la concentration en Bchl rapportée à la teneur en protéines (3 nM Bchl *a*/mg protéines) est dix fois plus faible que dans celui de *Rhodocyclus gelatinosus* (Agalidis *et al.*, 1990). Les chromatophores, sur le modèle de travail de Varga et de ses collaborateurs (1985), ont pu être isolés grâce à l'action simultanée du lysozyme et de la sonication. L'étape cruciale de la purification réside dans l'élimination de la canthaxanthine, très majoritaire dans ces souches. Un gradient isopicnique de saccharose constitue la seule technique efficace pour séparer un ensemble protéique relativement fragile d'une molécule de petite taille.

Le complexe photosynthétique de la bactérie semble avoir une taille très importante (supérieure à 2000 kDa) au regard de son comportement sur une colonne de filtration sur gel. Il est constitué d'un centre réactionnel (RC) sur lequel est attaché une seule antenne (LH), et se présente donc comme une entité unique. Ses caractéristiques spectrales sont classiques; il est nommé RC-B870 et est similaire à celui de certaines bactéries pourpres non sulfato-réductrices (Berger *et al.* 1992), ainsi qu'à celui de la bactérie marine *Erythrobacter longus* (Harashima, 1989). Il a été calculé que le complexe RC-B870 de la souche ORS278 contient 2% de centre RC par rapport à l'antenne LH, résultat similaire à ceux de la littérature (Agalidis *et al.*, 1990). Un seul caroténoïde, la spirilloxanthine, pigment typique des bactéries

de la famille des *Rhodospirillaceae*, y est associé, ce qui est logique. Son centre réactionnel est composé de deux polypeptides L et M et ne contient pas de cytochrome *c* tétrahémique. D'après l'analyse par séquençage des gènes de l'opéron *puf*, l'antenne LH est formée de deux polypeptides  $\alpha$  et  $\beta$  (E. Giraud, communication personnelle), alors que dans notre étude nous n'avons pas pu séparer correctement ces deux protéines. Chez certaines bactéries photosynthétiques, la sous-unité H et le cytochrome tétrahémique *c* sont absents (Kiley et Kaplan, 1988). La présence du polypeptide H n'est pas forcément nécessaire dans ces cas là car sa fonction pourrait être assurée par les polypeptides L et M. En ce que concerne l'absence du cytochrome tétrahémique, sa fonction peut être effectuée par un des cytochromes solubles, par exemple le cytochrome *c*<sub>2</sub>. D'ailleurs, une protéine de 14,4 kDa et présente dans les extraits de chromatophores a été révélée par le TMBZ ; elle pourrait être un cytochrome périplasmique *c*<sub>2</sub> (Kiley et Kaplan, 1988). La détermination précise de ce cytochrome par des études complémentaires est en cours.

A ce stade de la caractérisation du complexe, deux résultats sont d'une importance capitale :

**1- Le complexe purifié est fonctionnel et stable.** Par spectroscopie, il est en effet capable d'engendrer des changements réversibles d'absorbance sous l'effet de la lumière. Cette réversibilité témoigne du bon fonctionnement des mécanismes d'oxydo-réduction des cofacteurs (bactériochlorophylle, bactériophéophytine, quinones).

**2- La canthaxanthine n'appartient pas au complexe RC-B870.** Ce résultat va dans le sens des études réalisées sur d'autres bactéries photosynthétiques aérobies, dans lesquelles les caroténoïdes majoritaires ne sont pas localisés sur le complexe Bchl-protéines (Shimada *et al.*, 1985; Yurkov *et al.*, 1993; Saitoh *et al.*, 1995). Notons qu'il a été montré tout récemment que les gènes *crtE*, *crtI* et *crtB* intervenant dans la biosynthèse de la canthaxanthine sont différents des gènes *crtE*, *crtI* et *crtB* participant à la formation de la spirilloxanthine (E. Giraud, communication personnelle). Par conséquent, les études de localisation cellulaire et de génétique convergent dans le même sens : un transfert de gènes pourrait être à l'origine de la présence de canthaxanthine dans ces souches. Il n'a pas été possible dans ce travail d'identifier des caroténoïdes intervenant dans la biosynthèse de la spirilloxanthine; la question de savoir si ce caroténoïde est formé par la 'voie normale' ou la 'voie alternative' est toujours posée. Une étude plus poussée en utilisant la 2-méthylimidazole à de faibles concentrations est envisagée. Par contre, la canthaxanthine, elle, est formée classiquement à partir du  $\beta$ -carotène (Harashima, 1989).

D'autres propriétés qui viennent compléter les deux points importants évoqués ci-dessus ont également été rapportées.

En premier lieu, la production de canthaxanthine est stimulée 1,5 fois en lumière continue, comparativement à celle d'une culture réalisée en lumière intermittente. Dans le même temps, la bactériochlorophylle est détruite. La canthaxanthine aurait donc un rôle de protection contre les singulets d'oxygène, les radicaux libres oxygénés ou encore les radicaux libres provenant de la désactivation des états triplets de la bactériochlorophylle (Frank et Cogdell, 1993). Cette sensibilité à la lumière pourrait ressembler à une stratégie d'adaptation de la bactérie à de fortes oxygénations comme c'est le cas chez *Roseobacter denitrificans* (Nishimura *et al.*, 1996). Des études complémentaires seront effectués prochainement et porteront sur le comportement de la bactérie en fortes tensions d'oxygène.

L'effet de la lumière sur la formation des pigments photosynthétiques par la bactérie dans le nodule a été étudiée. Les résultats indiquent que **la bactériochlorophylle est synthétisée dans le nodule caulinaire, alors qu'elle ne l'est pas dans le nodule racinaire.** La synthèse des pigments pourrait être corrélée à la localisation de la bactérie à l'intérieur du nodule. Par exemple, dans les nodules caulinaires de *Sesbania rostrata*, les bactéroïdes d'*Azorhizobium caulinodans* qui est non photosynthétique sont localisés dans une zone de prolifération délimitée à l'extérieur par plusieurs assises cellulaires (Dreyfus *et al.*, 1988). Ainsi, l'intensité lumineuse incidente dans cette zone est nulle. Dans les nodules aériens des *Aeschynomene*, par contre, les bactéroïdes prolifèrent dans la zone délimitée par quelques assises cellulaires, juste sous l'épiderme caulinaire (Alazard, 1985). Ces zones de prolifération bactérienne sont donc soumises à de fortes intensités lumineuses, permettant ainsi la synthèse des pigments photosynthétiques.

L'activité photochimique du complexe RC-LH de la souche ORS278 en culture pure nous laisse penser que sa fonctionnalité dans le bactéroïde caulinaire est très probable. A ce sujet, les travaux d'Evans et ses collaborateurs (1990) mais aussi ceux de Hungria (1993) ont permis de mettre en évidence une activité photosynthétique de la souche BTAi1 dans le nodule d'*Aeschynomene indica* : en effet, une photo-induction de la fixation de CO<sub>2</sub> ainsi qu'une photo-inhibition de l'absorption d'O<sub>2</sub> ont été observées.

La fixation d'azote est un procédé très cher demandant 16 molécules d'ATP et 8 électrons pour réduire une molécule de NH<sub>3</sub>. Le système photosynthétique du bactéroïde peut utiliser la lumière dans la région 800-900 nm qui correspond à une zone de longueur d'onde non absorbée par les chloroplastes. L'énergie sous forme d'ATP générée par le microsymbionte au cours de la photo-phosphorylation, peut compenser ainsi les trop fortes demandes d'énergie provenant des chloroplastes. Au moment où la disponibilité en photosynthétats devient un facteur limitant pour la fixation d'azote, la photosynthèse par les rhizobia peut constituer alors un système qui soulagerait la plante (Fleischman *et al.*, 1995).

Les travaux préliminaires sur la nodulation des *Aeschynomene* ont montré que les *Bradyrhizobium* photosynthétiques présentent une efficacité supérieure à celle des souches non photosynthétiques isolées des mêmes plantes (Lorquin *et al.*, 1993). Ces résultats vont donc dans le sens de l'hypothèse de fortes potentialités de fixation d'azote offertes aux plantes nodulées par les souches photosynthétiques de *Bradyrhizobium* sp. (*Aeschynomene*). Nous devrions confirmer prochainement ces observations à l'aide de bactéries mutantes obtenues par génie génétique (*puf* (-) ou *Bchl*(-)), ce qui permettra de déterminer si la lumière a un rôle sur la symbiose et la fixation de l'azote.

\*  
\* \*



**REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

**Agalidis, I., E. Rivas, et F. Reiss-Husson.** 1990. Reaction center light harvesting B875 complexes from *Rhodocyclus gelatinosus* : characterisation and identification of quinones. *Photosynthesis Research* **23**:249-255.

**Alazard, D., et M. Becker.** 1985. Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:732-734.

**Alazard, D., et E. Duhoux.** 1988. Diversity of stem nodulation sites in *Aeschynomene* sp. *J. Plant Physiol.* **132**:123-125.

**Alazard, D.** 1990. Nitrogen fixation in pure cultures by rhisobia isolated from stem nodules of tropical *Aeschynomene* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**:177-182.

**Allen, O. N., et E. K. Allen.** 1981. *The Leguminosae : a source book of characteristics, uses and nodulation.* pp. 21-25. University of Wisconsin Press.

**An, G. H., D. B. Schuman, et E. A. Jonson.** 1989. Isolation of *Pfaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:116-124.

**Becker, M., et T. George.** 1995. Nitrogen fixation response of stem- and root-nodulating *Sesbania* species to flooding and mineral nitrogen. *Plant Soil.* **175**:189-196.

**Blankenship, R. E.** 1992. Origin and early avolution of photosynthesis. *Photosynthesis Research.* **33**:91-111.

**Blankenship, R. E.** 1994. Protein structure, electron transfer and evolution of procaryotic photosynthetic reaction centers. *Antonie van Leeuwenhock* **65**:311-329.

**Berger, G., S. Andrianambinintsoa, J. Kleo, S. Grison, D. Dejonge, et J. Breton.** 1992. Dissociation and reconstitution studies by high performance liquid chromatography of the light harvesting complexe of *Rhodospirillum rubrum*.. *J. Liquid Chromatography.* **15**:585-602.

**Boivin, C., I. Ndoye, Molouba, P. de Lajudie, N. Dupuy, et B. Dreyfus.** 1997. Stem nodulation in legumes: diversity, mechanisms, and unusual characteristics. *Crit. Rev. Plant. Sci.* **16**:1-30.

**Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dey binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248-254.

**Britton, G., R. K. Singh, T. W. Goodwin, et A. Ben-Aziz.** 1976. The carotenoids of *Rhodomicrobium vanielii* (*Rhodospirillaceae*) and the effect of diphenylamine on the carotenoid composition. *Phytochemistry* **14**:2427-2433.

**Britton, G.** 1983. *The biochemistry of natural pigments.* Cambridge : Cambridge University Press.

**Burke, D. H., M. Alberté, G. A. Armstrong, et J. E. Hearst.** 1991. The complete nucleotide sequence of the 46 kb photosynthetic gene cluster of *Rhodobacter capsulatus*. EMBL Data Library, accession number Z11165.

**Chang, C. H., O. El-kabbani, D. Tiede, J. Norris, et M. Schiffer.** 1991. Structure of the membrane-bound protein photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* **30**:5352-5360.

**Chen, W. X., G. H. Yan, et J. L. Li.** 1988. Numerical taxonomic study of fastgrowing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst.Bacteriol.* **38**:392-397.

- Chen, W. X., G. Li, Y. Qi, E. T. Wang, H. L. Yuan, et J. L. Li. 1991. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. Int. J. Syst. Bacteriol. **41**:275-280.
- Chen, W. X., G. H. Yan, et J. L. Li. 1995. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid alpine environment in Xinjiang, People's Republic of China. Int. J. Syst. Bacteriol. **45**:153-159.
- Clayton, R. K. 1966. Spectroscopic analysis of bacteriochlorophyll *in vitro* and *in vivo*. Photochemistry and Photobiology **5**:669-677.
- Clayton R. K., et B. Clayton. 1981. B850 pigment-protein complex of *Rhodospseudomonas spheroides*: Extinction coefficient, circular dichroism and the reversible binding of bacteriochlorophyll. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**:5583-5587.
- Cogdell, R. J., et R. J. Frank. 1987. How carotenoids function in photosynthetic bacteria. Biochim Biophys. Acta. **895**:63-79.
- Cogdell, R. J., et N. W. Isaacs. 1995. Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. Nature **374**:517-521.
- Czygan, F. C. 1968. Sekundär-Carotinoide in Grünalgen. I. Chemie, vorkommen und faktoren welche die bildung dieser polyene beeinflussen. Archiv für Mikrobiologie **61**:81-102.
- Davidson E., et F. Daldal. 1987. *fb*s operon, encoding the Rieske Fe-S protein, cytochrome *b*, and cytochrome *c*<sub>1</sub> apoproteins previously described from *Rhodospseudomonas sphaeroides* is from *Rhodospseudomonas capsulata*. J. Mol. Biol. **195**:25-29.
- Deisenhofer J., O. Epp, K. Mikki, R. Huber, et H. Michel. 1985. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of *Rhodospseudomonas viridis* et 3 Å resolution. Nature **318**:618-624.
- de Lajudie, P., A. Willems, B. Pot, Dewetting, G. Maestrojuan, M. Neyra, M. D. Collins, B. Dreyfus, K. Kersters, et M. Gillis. 1994. Polyphasic taxonomy of *Rhizobia*: Emendation of genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb nov., *Sinorhizobium sahari* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **44**:715-733.
- Dénarié, J., et G. Truchet. 1979. La symbiose *Rhizobium* Légumineuses : rôle perspectif des partenaires. Physiol. Vég. **17**:643-667.
- Dénarié, J., F. Debellé, et J. C. Promé. 1996. *Rhizobium*. Lipochitoooligosaccharide nodulation and morphogenesis. Ann. Rev. Biochem. **65**:503-535.
- Dreyfus, B. L., C. Elmerich, et J. R. Dommergues. 1983. Freelifving *Rhizobium* strain able to grow on N<sub>2</sub> as the sole nitrogen source. Appl. Environ. Microbiol. **45**: 711-713.
- Dreyfus, B. L., D. Alazard, Y. R. Dommergues. 1984. Stem-nodulating rhizobia. pp. 161-169. In Current Perspectives in Microbial Ecology (eds). M. J. Klug and C. A. Reddy. Washington DC : American Society Microbiology.
- Dreyfus, B. L., G. Rinaudo, et Y. R. Dommergues. 1985. Observations on the use of *Sesbania rostrata* as green manure in paddy fields. Mircen. J. **1**:11-121.
- Dreyfus, B. L., J. L. Garcia, et M. Gillis. 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinaudans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. Int. J. Syst. Bacteriol. **38**:89-98.

**Drews, G.** 1978. Structure and development of the membrane system of photosynthetic bacteria. pp. 161-207. *In* Current Topics in Bioenergetics. Sanadi, D. R. and L. P. Vernon (eds). Photosynthesis: Part B, vol. 8, Academic Press, New York.

**Eaglesham, A. R. J., J. M. Ellis, D. E. Evans, M. H. Fleischman, et R. W. F. Hardy.** 1990. The first photosynthetic N<sub>2</sub>-fixing *Rhizobium*:: Characteristics. pp. 805-811. *In* Nitrogen fixation: Achievements and objectives. Gresshoff, P. M., R. L. Stacey and W. E. Newton (eds). Chapman & Hall, New York.

**Eardly, B. D., L. A. Mareron, N. H. Smith, D. A. Jonson, M. D. Rumbaugh, et R. K. Selander.** 1990. Genetic structure of natural population of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:187-194.

**Eimhjellen, K. E., O. Aasmundrud, et A. Jensen.** 1963. A new bacterial chlorophyll. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **10**:232-236.

**Evans, W. R., D. E. Fleischman, H. E. Calvert, R. V. Pyati, G. M. Alter, et N. S. Subba.** 1990. Bacteriochlorophyll and photosynthetic reaction centers in *Rhizobium* strain BTAi1. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3445-3449.

**Fleischman, D. E., W. R. Evans, et I. M. Miller.** 1995. Bacteriochlorophyll-containing *Rhizobium* species. pp. 123-136. *In* Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Blankenship, R. E., M. T. Madigan, and C. E. Bauer (eds). Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

**Fleming, G. R., et R. van Grondell.** 1997. Femtosecond spectroscopy of photosynthetic light-harvesting systems. *Current Opinion in Structural Biology* **7**:738-748.

**Foppen, F. H.** 1971. Tables for the identification of carotenoid pigments. *Chromatogr. Rev.*, **14**:133-298.

**Frank, H. A., et R. J. Cogdell.** 1993. The photochemistry and function of carotenoids in photosynthesis. pp. 252-326. *In* Carotenoids in Photosynthesis. London, Chapman & Hall.

**Frickel, F.** 1985. Retinoids: an overview of some natural carotenoid metabolites and their synthetic analogs. *Pure Appl. Chem.* **57**:709-716.

**Fuerst, J. A., J. A. Hawkins, A. Holmes, L. J. Sly, C. J. Moore, et E. Stackebrandt.** 1993. *Porphyrobacter neustonensis* gen. nov., sp. nov. an aerobic bacteriochlorophyll-synthesizing budding bacterium from fresh water. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:125-134.

**Gabellini, N., V. Harnisch, J. E. Mc Carly, G. Hauska, et W. Sebard.** 1985. Cloning and expression of the *fbc* operon encoding the FeS protein, cytochrome *b* and cytochrome *c*<sub>1</sub> from the *Rhodospseudomonas sphaeroides b/c1* complex. *EMBO.* **4**:549-553.

**Gest, H., et J. L. Favinger.** 1983. *Heliobacterium chlorum*, an anoxygenic brownish-green photosynthetic bacterium a 'new' form of bacteriochlorophyll. *Arch. Microbiol.* **136**:11-16.

**Gest, H.** 1993. Photosynthetic and quasi-photosynthetic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **112**:1-6.

**Gibbons, A. M., et K. F. Gregory.** 1972. Relatedness among *Rhizobium* and *Agrobacterium* species determined by three methods of nucleic acid hybridization. *J. Bacteriol.* **11**:129-141.

**Gibson, A. H.** 1963. Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. I. The effect of temperature on recently nodulated *Trifolium subterraneum* (L.) plants. *Austr. J. Biol. Sci.* **16**:28-42.

- Goodhew, C. F., K. R. Brown, et G. W. Pettigrew. 1986. Haem staining in gels, a useful tool in the study of bacterial *c*-type cytochromes. *Biochimica et Biophysica Acta*. **852**:288-294.
- Goodwin, T. W., et H. G. Osman. 1954. Studies on carotenogenesis: Spirilloxanthin synthesis by washed cells of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem. J.* **56**:222-227.
- Goodwin, T. W. 1980. The biochemistry of the carotenoids. pp. 257-345. vol. 1, plants, 2nd ed. Chapman & Hall, Ltd., London.
- Hagerup, O. 1928. En hydrofil Baelgplante (*Aeschynomene aspera* L.) med bacterieknoide paa staengelen, *Dansk. Bot. Arkiv.* **14**:1-9.
- Harashima, K., T. Shiba, T. Totsuka, U. Simidu, et N. Taga. 1978. Occurrence of bacteriochlorophyll *a* in a strain of an aerobic heterotrophic bacterium. *Agric. Biol. Chem.* **42**:1627-1628.
- Harashima, K., M. Nakagawa, et N. Murata. 1982. Photochemical activities of bacteriochlorophyll in aerobic grown cells of aerobic heterotrophs, *Erythrobacter* species (OCh 114) and *Erythrobacter longus* (OCh 101). *Plant Cell Physiol.* **23**:185-193.
- Harashima, K., T. Shiba, N. Murata. 1989. Aerobic photosynthetic bacteria. Harashima K., T. Shiba and N. Murata (eds). Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- Harachima, K. 1989. Photosynthesis and photosynthetic apparatus. pp. 125-148. *In* Aerobic Photosynthetic Bacteria. Harashima K., T. Shiba and N. Murata (eds). Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- Hungria, M., J. M. Ellis, W. F. Hardy, et A. R. J. Eaglesham. 1993. Light-stimulated <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> uptake and acetylene reduction by bacteriochlorophyll containing stem nodule isolate BTAi1. *Biol. Fertil. Soils* **15**:208-214.
- Iba, K., K. Takamiya, Y. Toh, et M. Nichimura. 1988. Roles of bacteriochlorophyll and carotenoid synthesis in formation of intracytoplasmic membrane systems and pigment-protein complexes in an aerobic photosynthetic bacterium, *Erythrobacter* sp. strain OCh 114. *J. Bacteriol.* **170**:1843-1847.
- Jarvis, B. D. W., H. L. Dower, et J. P. W. Young. 1992. Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* species and related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**:93-96.
- Jordan, D. C. 1982. Transfert of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**:136-139.
- Jordan, D. C. 1984. Family III. *Rhizobiaceae* Cnn. 1938. pp. 234-254. *In* : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1). Kreig, N. R. and J. J. Holt (eds). The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
- Kaplan, S. 1978. Control and kinetics of photosynthetic membrane development. pp. 805-840. *In* The Photosynthetic Bacteria. Clayton R. K. and W. R. Sistrom (eds). New York, Plenum Press.
- Kiley, T. J., et S. Kaplan. 1988. Molecular genetics of photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiological Review* **52**:50-69.
- Kiley, P. J., A. Varga, et S. Kaplan. 1988. Physiological and structural analysis of light-harvesting mutants of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **170**:1103-1115.

- Klug, G.** 1993. Regulation of expression of photosynthesis genes in anoxygenic photosynthetic bacteria. *Arch. Microbiol.* **159**:397-404.
- Knaff, D. B.** 1993. The cytochrome *bc<sub>1</sub>* complexes of photosynthetic bacteria. *Photosynth. Research* **35**:117-133.
- Krinsky, N. I., et T. H. Goldsmith.** 1960. The carotenoids of a flagellated alga, *Euglena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **91**:271-279.
- Kuykendall, L. D., B. Saxena, T. E. Devine, et S. E. Udell.** 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982) and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* **38**:501-505.
- Ladha, J. K., et R. B. So.** 1994. Numerical Taxonomy of photosynthetic rhizobia nodulating *Aeschynomene* species. *Int. J. Syst. Bact.* **44**:62-73.
- Liaaen-Jensen, S., G. Cohen-Bazire, et R. Y. Stanier.** 1961. Biosynthesis of carotenoids in purple bacteria : A reevaluation based on considerations of chemical structure. *Nature* **44**:1168-1172.
- Liaaen-Jensen, S., et A. Jensen.** 1971. Quantitative determination of carotenoids in photosynthetic tissues. pp. 586-602. *In* San Pietro, A. (ed), *Methods in Enzymology*, vol. 23, Academic Press, New York and London.
- Lindström, K.** 1989. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:365-367.
- Lorquin, J., F. Molouba, N. Dupuy, S. NDiaye, D. Alazard, M. Gillis, et B. L. Dreyfus.** 1993. Diversity of photosynthetic *Bradyrhizobium* strains from stem nodules of *Aeschynomene* species. pp. 683-689. *In* New Horizons in Nitrogen Fixation. Palacios, R., J. Mora, W. E. Newton (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston.
- Lorquin J., G. Lortet, M. Ferro, N. Mear, B. Dreyfus, J. C. Promé, et C. Boivin.** 1997a. Nod factors from *Sinorhizobium saheli* and *S. teranga* bv. *sesbaniae* are both arabinosylated and fucosylated, a structural feature specific to *Sesbania rostrata* symbionts. *Mol. Plant-Microbe Int.* **10**:879-890.
- Lorquin, J., F. Molouba, et B. L. Dreyfus.** 1997b. Identification of the carotenoid pigment canthaxanthin from photosynthetic *Bradyrhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1151-1154.
- Lorquin, J., G. Lortet, M. Ferro, N. Méar, B. Dreyfus, J. C. Promé, et C. Boivin.** 1997c. *Sinorhizobium teranga* bv. *acaciae* ORS1073 and *Rhizobium* sp. ORS1001, two taxonomically distant related *Acacia* nodulating strains, produce similar Nod factors that are O-carbamoylated, N-methylated and mainly sulfated. *J. Bacteriol.*, **179**:3079-3083.
- Loureiro, M. F., S. M. De Faria, E. K. James, A. Pott, et A. A. Franco.** 1994. Nitrogen-fixing stem nodules of the legume, *Discolobium pulchellum*. *Benth. New Phytol.* **128**:283-295.
- Madigan, M., et H. Gest.** 1978. Growth of photosynthetic bacterium anaerobically in darkness, supported by "oxidant-dependent" sugar fermentation. *Arch. Microbiol.* **117**:119-122.
- Marrs, B. L.** 1981. Mobilisation of the genes for photosynthesis from *Rhodospseudomonas capsulata* by a promiscuous plasmid. *J. Bacteriol.* **146**:1003-1012.

Martinez-Romero, E., L. Segova, F. M. Mercante, A. A. Franco, P. Graham, et M. A. Pardo. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* spp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:417-426.

McDermott, G., S. M. Prince, A. A. Freer, A. M. Hawthornthwaite-Lawless, M. Z. Papiz, G. R. Fleming, et R. van Grondelle. 1995. Femtosecond spectroscopy of photosynthetic light-harvesting systems. *Current Opinion in Structural Biology* 7:738-748.

McDowell, L. M., D. Gaul, C. Krmaier, D. Holten, et C. C. Schenck. 1991. Investigation into the source of electron transfer asymmetry in bacterial reaction centers. *Biochemistry* 30:8315-8322.

McEwan, A. G., A. J. Greenfield, H. G. Wetzstein, J. B. Jackson, et S.J. Ferguson. 1985. Nitrous oxide reduction by members of the family *Rhodospirillaceae* and nitrus oxide reductase of *Rhodopseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.* 164:823-830.

Misawa, N., M. Nakagawa, K. Kobayashi, S. Yamano, Y. Isawa, K. Nakamura, et K. Harashima. 1990. Elucidation of the *Erwinia uredovora*. Carotenoid biosynthetic pathway by fonctional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172:6704-6712.

Nelis, H. J., et A. P. De Leenheer. 1991. Microbial sources of carotenoid pigment used in floods and feeds. *J. Appl. Microbiol.* 70:181-191.

Nishimura, J., M. Shimadzu, et H. Iizuka. 1981. Bacteriochlorophyll formation in radiation-resistant *Pseudomonas radiora*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 27:427-430.

Nishimura, K., H. Shimada, H. Ohta, T. Masuda, Y. Shioi, et K. I. Takamiya. 1996. Expression of the *puf* operon in an aerobic photosynthetic bacteria. *Plant Cell Physiol.* 37:153-159.

Nour, S. M., M. P. Fernandez, P. Normand, et J. C. Cleyet-Marel. 1994. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:511-522.

Okamura, M. Y., L. A. Steiner, et G. Feher. 1974. Characterization of reaction center from photosynthetic bacteria. 1. Subunit structure of the protein mediating the primery photochemistry in *Rhodopseudomonas sphaeroides* R-26. *Biochemistry* 13:1394-1403.

Okamura, K., F. Mitsumori, O. Ito, K. Takamiya, et M. Nishimura. 1986. Photophosphorylation and oxidative phosphorylation in intact cell and chromatophores of an aerobic photosynthetic bacterium, *Erythrobacter* sp. strain OCh 114. *J. Bacteriol.* 168:1142-1146.

Pfennig, N. 1978. General physiology and ecology of photosynthetic bacteria. pp. 3-18. *In* The Photosynthetic Bacteria. Clayton. P. K., and W. R. Sistrom (eds). Plenum Press. New York and London.

Picorel, R., G. Bélanger, et G. Gingras. 1983. Antenna holochrome B800 of *Rhodospirillum rubrum* S1. Pigment, phospholipid, and polypeptide composition. *Biochemistry* 22:2491-2497.

Pitt, G. A. J. 1971. Vitamin A. pp. 717-742. *In* Carotenoids. Isler O., H. Gutman and U. Solms (eds). Basel, Birkheuser Verlag.

Polhill, R. M., et P. H. Raven. 1981. Advances in legume systematics. Part I. *Kew Royal Botanic Gardens*.

Rees, D. C., H. Komiya, T. O. Yeates, J. P. Allen, et G. Feher. 1989. The bacterial photosynthetic reaction center as a model for membrane proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **58**:607-633.

Rinaudo, G., S. Orenge, M. P. Fernandez, H. Meugnier, et R. Bardin. 1991. DNA homologies among members of the genus *Azorhizobium* and other stem and root-nodulating bacteria isolated from the tropical legume *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:114-120.

Rock, C. D., et J. A. D. Zeevaat. 1991. The *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:7496-7499.

Saitoh, S., S. Takaichi, K. Shimada, et Y. Nishimura. 1995. Identification and subcellular distribution of carotenoids in the aerobic photosynthetic bacterium, *Pseudomonas radiora* strain MD-1. *Plant Cell Physiol.* **36**:819-823.

Sato, K. 1978. Bacteriochlorophyll formation by facultative methylotrophs *Protaminobacter ruber* and *Pseudomonas* M1. *FEBS Lett.* **85**:207-210.

Satoh, T., Y. Hoshino, et H. Kitamura. 1976. *Rhodopseudomonas sphaeroides* forma sp. *denitrificans*, a denitrifying strain as a subspecies of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Arch. Microbiol.* **108**:265-269.

Schola, M. H., et G. H. Elkan. 1984. *Rhizobium fredii* sp. nov. a fast-growing species that effectively nodulate soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**:484-486.

Segovia, L., J. P. W. Young, et E. Martinez-Romero. 1992. Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* biovar *Phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:374-377.

Shiba, T., U. Shimizu, et N. Taga. 1979. Another aerobic bacterium with contains bacteriochlorophyll *a*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **45**:801.

Shiba, T. 1991. *Roseobacter litoralis* gen. nov., and *Roseobacter denitrificans* sp. nov., aerobic pink-pigmented bacteria which contain bacteriochlorophyll *a*. *System. Appl. Microbiol.* **14**:140-145.

Shimada, K., H. Hayash, et M. Tasumi. 1985. Bacteriochlorophyll-protein complexes of aerobic bacteria, *Erythrobacter longus* and *Erythrobacter species* OCh 114. *Arch. Microbiol.* **143**:244-247.

Shioi, Y. 1986. Growth characteristics and substrate specificity of aerobic photosynthetic bacterium, *Erythrobacter* sp. (OCh 114). *Plant Cell Physiol* **27**:567-572.

Siefermann-Harms, D. 1987. The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiol. Plantarum* **69**:561-568.

Straley, S. C., W. W. Parson, D. C. Mauzerall, et R. K. Clayton. 1973. Pigment content and molar extinction from *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Biochim. Biophys. Acta* **305**:597-609.

Suwanto, A., et S. Kaplan. 1989. Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 genome: presence of two circular chromosomes. *J. Bacteriol.* **171**:5850-5859.

Tadros, M. H., R. Frank, B. Dörge, N. Gad'on, J. Y. Takemoto, et G. Drews. 1987. Orientation of the B800-850, B870, and reaction center polypeptides on the cytoplasmic and periplasmic surfaces of *Rhodobacter capsulatus* membranes. *Biochemistry* **26**:7680-7687.



**Tai, S., et S. Kaplan.** 1985. Intracellular localization of phospholipid transfer in *Rhodopseudomonas sphaeroides* and a possible role in membrane biogenesis. *J. Microbiol.* **164**:181-186.

**Takamiya, K.** 1989. Cytochrome and respiratory systems. pp. 73-93. *In* *Aerobic Photosynthetic Bacteria*. Harachima K., T. Shiba and N. Murata (eds). Japan Scientific Societies Press, Tokyo.

**Taylor, D. P., S. N. Cohen, W. G. Clark, et B. L. Marrs.** 1983. Alignment of the genes and restriction maps of the photosynthetic region of the *Rhodopseudomonas capsulata* chromosome by a conjugation-mediated marker rescue technique. *J. Bacteriol.* **154**:580-590.

**t'Mannetje, L.** 1967. A re-examination of the taxonomy of the genus *Rhizobium* and related genera using numerical analysis. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* **33**:477-491.

**Varga, A. R., et A. Staehelin.** 1985. Pigment-protein complexes from *Rhodopseudomonas palustris* : Isolation, characterisation, and reconstitution into liposomas. *J. Bacteriol.* **161**:921-927.

**Vincent, J. M.** 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

**Wang, S., S. Lin, X. Lin, N. W. Woodbury, et J. P. Allen.** 1994. Comparative study of reaction centers from purple photosynthetic bacteria : Isolation and optical spectroscopy. *Photosynthesis Research.* **42**:203-215.

**Yen, H. C., et B. L. Marrs.** 1976. A map of genes for carotenoid and bacteriochlorophyll biosynthesis in *Rhodopseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.* **126**:619-629.

**Yildiz, F. H., H. Gest, et C. E. Bauer.** 1992. Conservation of the photosynthesis gene cluster in *Rhodospirillum cencetum* . *Mol. Microbiol.* **6**:2683-2691.

**Young, J. P. W., H. R. Downer, et B. D. Eardly.** 1991. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTA11 by polymerase chain reaction-based sequencing of 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* **173**:2271-2277.

**Xu, L. M., C. Ge, Z. Cui, J. Li, et H. Fan.** 1995. *Bradyrhizobium liaonengense* sp. nov., isolated from the nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:706-711.

**Zilincas Braun, B.** 1974. Light absorption, emission and photosynthesis. pp. 346-390. *In* *Algal Physiology and Biochemistry*, vol. 10., WDP Stewart eds. Osney Mead, Oxford.

**Zsebo, K. M., J. E. Hearst.** 1984. Genetic-physical mapping of a photosynthetic gene cluster from *R. capsulata*. *Cell* **37**:937-947.

**ANNEXE**

### 1. Composition du milieu YM (Vincent, 1970)

---

Mannitol .....	10 g
Glutamate de Na.....	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5 g
NaCl (50 mg/ml).....	1 ml
Solution T à 10 g/l (MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O).....	10 ml
Solution U à 40 g/l (CaCl <sub>2</sub> ).....	1 ml
Solution V à 4 g/l (FeCl <sub>3</sub> ).....	1 ml
Extrait de levure.....	1 g
Eau qsp .....	1 000 ml
Agar.....	20 g

---

### 2. Composition du milieu de Jensen (Vincent, 1970)

---

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (20 g/l) + MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O (20 g/l).....	10 ml
NaCl (20 g/l).....	10 ml
CaHPO <sub>4</sub> (50 g/l).....	20 ml
FeCl <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O (4 g/l) ou 11,1 ml de FeCl <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O en solution .....	10 ml
Oligo-élément s de Jensen.....	1 ml
Eau qsp .....	1 000 ml

---

### 3. Coloration des hèmes par le TMBZ (Goodhew *et al.*, 1986)

#### - Acétate de Na 0,5M

Acétate de Na, 3 H <sub>2</sub> O	34 g
H <sub>2</sub> O	qsp 500 ml

#### - Acide acétique 0,5 M

Acide acétique (96%, v/v)	29 ml
H <sub>2</sub> O	qsp 500 ml

#### - Tampon acétate de Na, pH 5,0

Acide acétique 0,5 M	148 ml
Acétate de Na 0,5 M	352 ml
H <sub>2</sub> O	qsp 1000ml

#### - Solution de lavage

Isopropanol	160 ml
Tampon acétate de Na, pH 5,0	140 ml

- Solution de TMBZ

TMBZ	91 mg
Méthanol	160 ml

Dissoudre avec agitation magnétique à l'obscurité, puis ajouter 140 ml de tampon acétate de Na, pH 5,0.

#### 4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

##### 4.1 Solution stocks

- Solution de monomère (40% T; 2,5% C)

Acrylamide	39 g
Bis-acrylamide	1 g
H <sub>2</sub> O	qsp 100 ml

- Tampon de migration (Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8)

Tris (hydroxyméthylaminométhane)	36,3 g ajusté à pH 8,8 avec HCl 37%
H <sub>2</sub> O	qsp 200 ml

- Tampon de concentration (Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8)

Tris (hydroxyméthylaminométhane)	3,0 g ajusté à pH 6,8 avec HCl 37%
H <sub>2</sub> O	qsp 50 ml

- Tampon d'échantillons (Tris- HCl 60 mM, pH 6,8, SDS 2 %, Dithiotréitol 40 mM)

Tris (hydroxyméthylaminométhane)	0,36 g ajusté à pH 6,8 avec HCl 37%
SDS (10% p/v dans l'eau distillée)	10 ml
DTT	0,31 g
H <sub>2</sub> O	qsp 50 ml

- Tampon des réservoirs (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, Glycine 0,129 M, SDS 1%)

Tris (hydroxyméthylaminométhane)	1,51 g
Glycine	7,21 g
SDS	0,5 g
H <sub>2</sub> O	qsp 500 ml

- Solution de bleu de Bromophénol

Bleu de Bromophénol (100 mg/ml)	0,5 ml
H <sub>2</sub> O	qsp 100 ml

##### 4.2 Préparation du gel de migration 15 %

- Solution de monomère	3,75 ml
- Tampon de migration	1,25 ml
- SDS (10% p/v dans l'eau distillée)	100 µl
- H <sub>2</sub> O	4,86 ml
- TEMED	5,8 µl

- Persulfate d'ammonium (à 10% p/v) 31,7 µl

#### 4.3 Préparation du gel de concentration

- Solution de monomère 0,75 ml

- Tampon de concentration 2,5 ml

- SDS (10%, p/v dans l'eau distillée) 100 µl

- H<sub>2</sub>O 6,6 ml

- TEMED 12 µl

- Persulfate d'ammonium (à 10%, p/v) 40 µl

#### 4.4 Préparation des échantillons

- Protéines de complexe purifié

Protéines précipitées + 7 µl de tampon d'échantillon + 3 µl de bleu de Bromophénol

- Protéines de chromatophores

Protéines précipitées + 4 µl de tampon d'échantillon + 6 µl de bleu de Bromophénol

Ces mélanges sont ensuite chauffés 5 min à 100°C (bain marie).

**Nom** : WADE

**Prénom** : Tatiana

née KRASOVA

**Titre** : Etude de la photosynthèse bactérienne chez un *Bradyrhizobium* d'*Aeschynomene*. Photoactivité et caractérisation du complexe capteur de lumière.

**Mots-clés** : *Bradyrhizobium*, *Aeschynomene sensitiva*, Complexe Photosynthétique, Bactéριοchlorophylle, Canthaxanthine, Cytochrome.

### **Résumé**

Le système photosynthétique d'un *Bradyrhizobium*, caulinaire d'*Aeschynomene sensitiva*, la souche ORS278, est décrit dans ce travail. La bactérie est aérobie stricte; les pigments sont formés à l'obscurité et leur synthèse est stimulée par la lumière intermittente. Le complexe membranaire Bactéριοchlorophylle-protéines, capteur de lumière de la bactérie, est purifié à l'aide de détergents et par chromatographie. Il est stable et les analyses spectroscopiques montrent qu'il est fonctionnel photochimiquement : le transfert des électrons et les mécanismes d'oxydo-réduction engendrés par les photons sont bien réversibles. Ainsi, quelques éléments de sa structure ainsi que des propriétés physiologiques intéressantes ont été apportés. Ce complexe est formé (i) d'un centre réactionnel (RC) ( $\lambda_{\max}$  800 nm) composé de deux polypeptides L et M et ne contenant pas de cytochrome *c* tétrahémique; (ii) d'une seule antenne collectrice (LH) ( $\lambda_{\max}$  870 nm) composée de deux polypeptides  $\alpha$  et  $\beta$ ; (iii) comme toutes les souches de la famille des *Rhodospirillaceae*, la spirilloxanthine y est associée. Ainsi, il se présente comme une seule entité nommée complexe RC-B870. La canthaxanthine, caroténoïde majoritaire et original dans cette souche, a une localisation cellulaire différente du complexe RC-B870. Elle a un rôle de photoprotection et sa synthèse ne dépend pas de ce complexe : sa production est encore augmentée en lumière continue alors que la bactéριοchlorophylle est détruite.

Les *Bradyrhizobium* photosynthétiques d'*Aeschynomene* semblent être destinés plutôt à la nodulation de tige car la bactéριοchlorophylle est synthétisée dans le nodule caulinaire et non dans le nodule racinaire.