Banque « Agro – Véto »
A - 0109

BIOLOGIE

Épreuve B

Durée : 3 heures 30 minutes

_____

L'usage d'une calculatrice, d'abaques et de tables est interdit pour cette épreuve.

Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signale sur sa copie et poursuit sa composition en expliquant les raisons des initiatives qu'il a été amené à prendre.

À partir de l'exploitation des documents et de vos connaissances, étudiez quelques caractéristiques des chloroplastes.

- L'exposé sera encadré par une introduction et une conclusion et sera structuré par un plan faisant apparaître explicitement les thèmes abordés et la progression suivie.

- L'exposé doit se limiter aux trois thèmes abordés par les documents, qui font l'objet de trois parties indépendantes.

- Les documents peuvent être découpés et collés sur la copie à condition d'être légendés, commentés ou exploités.

Bibliographie

Bhattacharya et al (1998) *Plant Physiol.* **116** :9-15
Green et al (2000) *Plant Physiol.***124** :331-342
Keeling (2004) *Am. J. Bot.***91**(10) :1481-1493
Mc Fadden et al (1994) *J. Cell Sci.* **107** :649-657
Masuda et al (2008) *Plant Cell Physiol.***49**(2) :135-141
Mujer et al (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** :12333-12338

Thème I – L'origine des plastes : l'apport des données phénotypiques

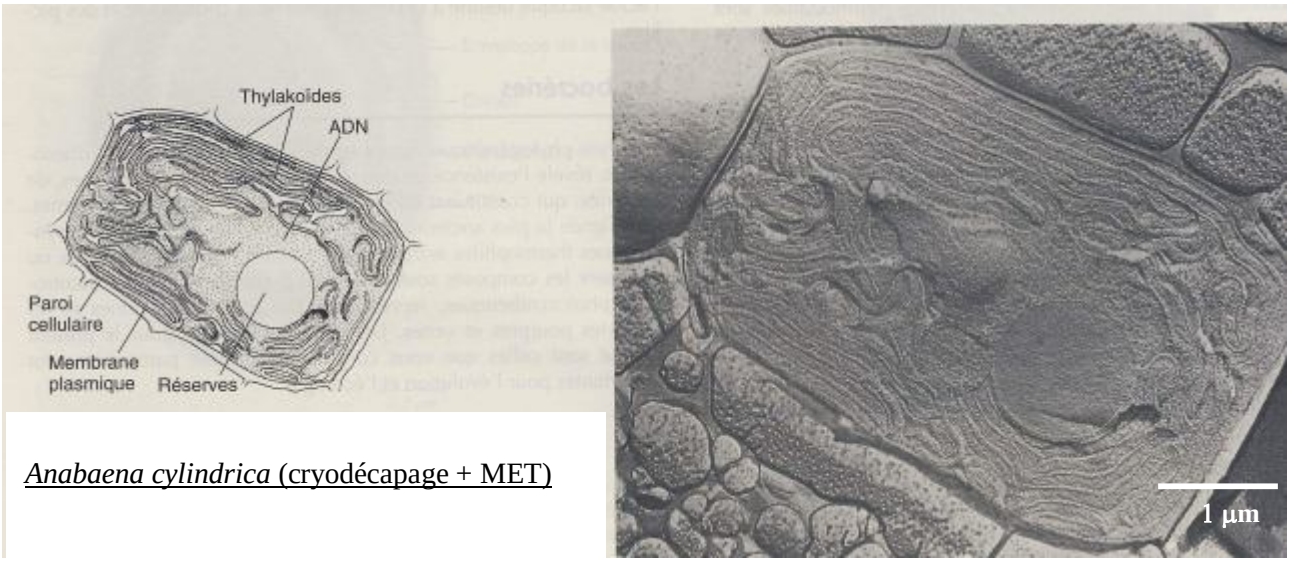
Outre l'analyse de l'ensemble des documents proposés, ***un schéma bilan*** *est attendu rendant compte d'une origine évolutive possible, dans le cadre* ***de la théorie endosymbiotique****, de chaque type de plastes. On insistera tout particulièrement sur la provenance* ***de chacune des membranes*** *des chloroplastes étudiés.*

Annexe 1 - Fiche de présentation des Cyanobactéries

Ces données sont des annexes et n'ont pas à être étudiées pour elles-mêmes.

Parmi les procaryotes, seules les cyanobactéries possèdent des thylakoïdes. Ce système n'existe pas chez les autres procaryotes, même chez ceux qui sont photosynthétiques.

Les cyanobactéries sont des bactéries Gram-négatives, dont l'ultrastructure est rappelée sur la figure suivante :

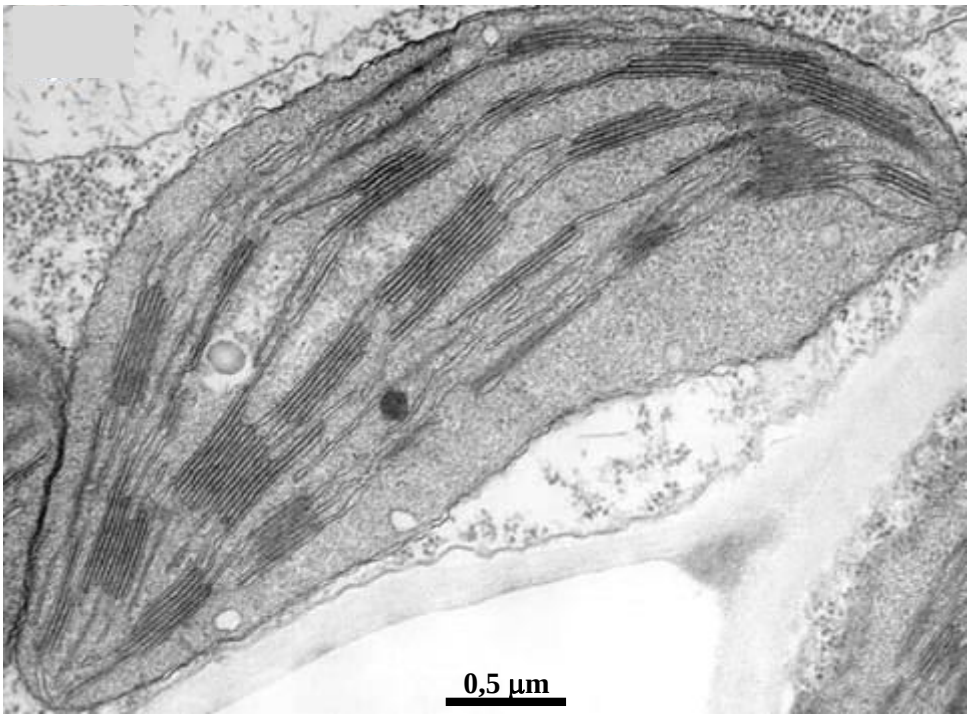


Anabaena cylindrica (cryodécapage + MET)

Organisation des limitantes cellulaires

Document 1 – Les plastes limités par deux membranes

Doc 1.1 – Ultrastructure d'un plaste de Chlorobionte (Angiosperme)



Doc 1.2 – Diversité biochimique de l'enveloppe chloroplastique

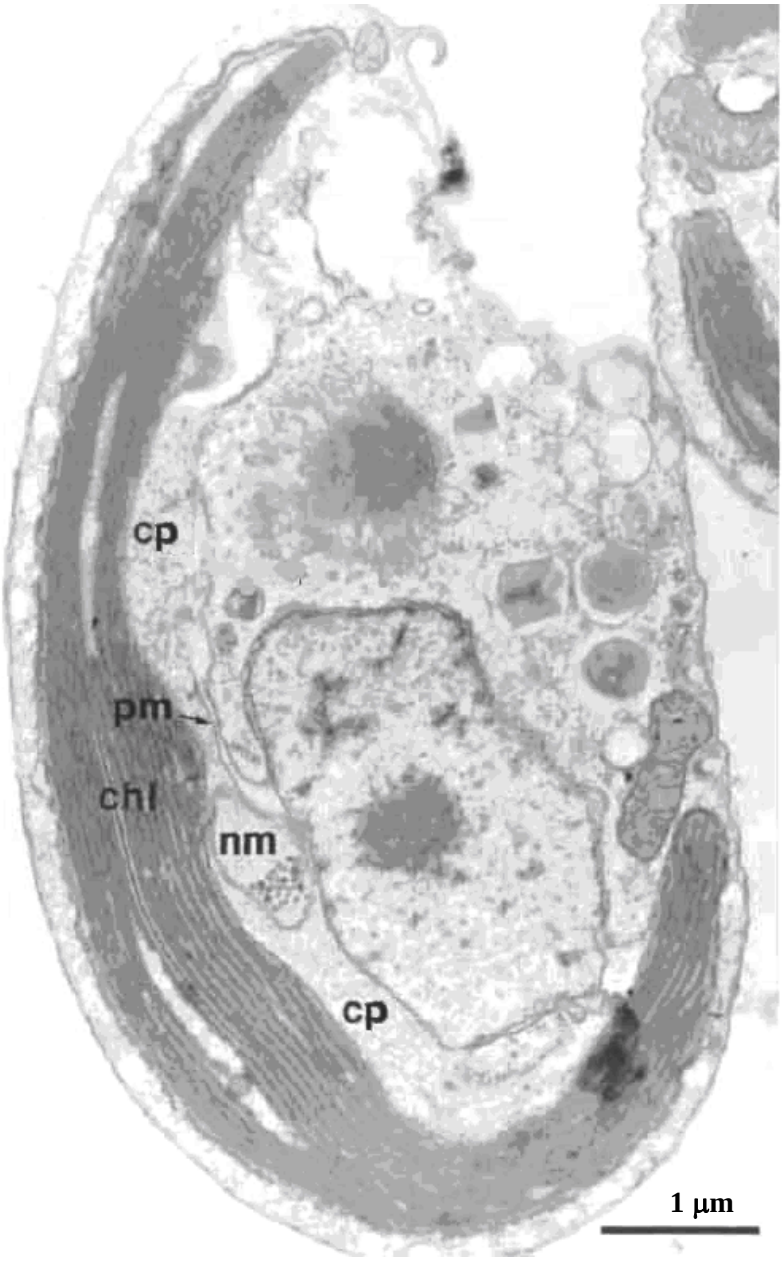
L'enveloppe chloroplastique des plastes limités par deux membranes présente les caractéristiques biochimiques, et en particulier lipidiques, rassemblées dans le tableau suivant :

Groupe **Limitante**	**Glaucophytes**	**Chlorobiontes, Rhodophytes**
Membrane externe • Hémi-membrane externe	Composition procaryote, de type membrane lipopolysaccharidique, avec des lipides typiques des eucaryotes	
• Hémi-membrane interne	Composition procaryote de type membrane lipopolysaccharidique	
Lipoprotéines	Absentes	
Peptidoglycanes	Situé entre la membrane interne et la membrane externe	Absent
Membrane interne	Composition procaryote, de type membrane plasmique	

Document 2 – Les plastes limités par quatre membranes

Annexe 2 - Fiche de présentation des Cryptophytes

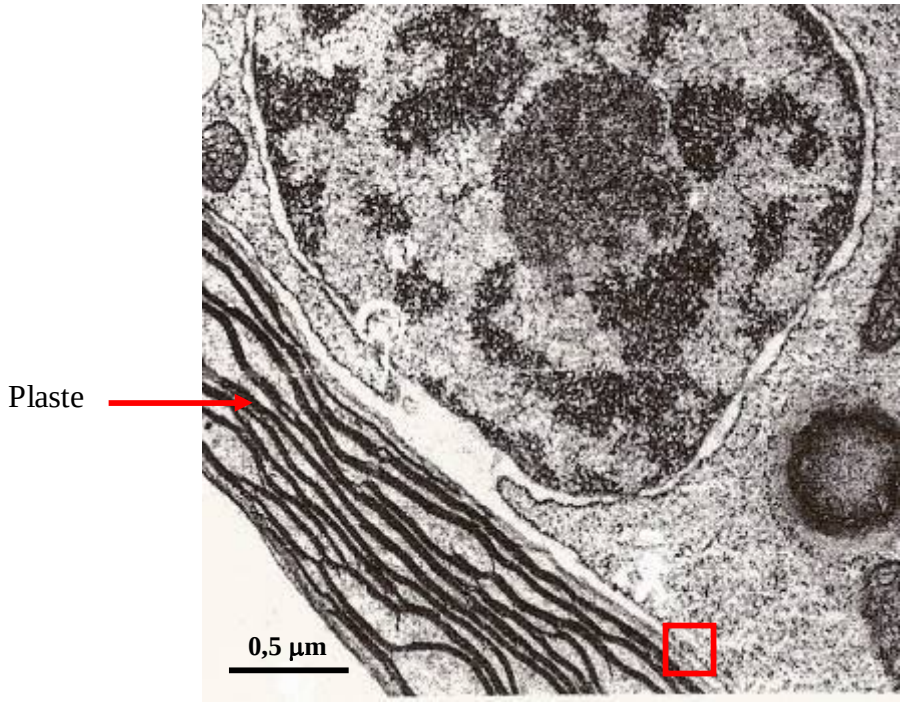
Ces données sont des annexes et n'ont pas à être étudiées pour elles-mêmes.



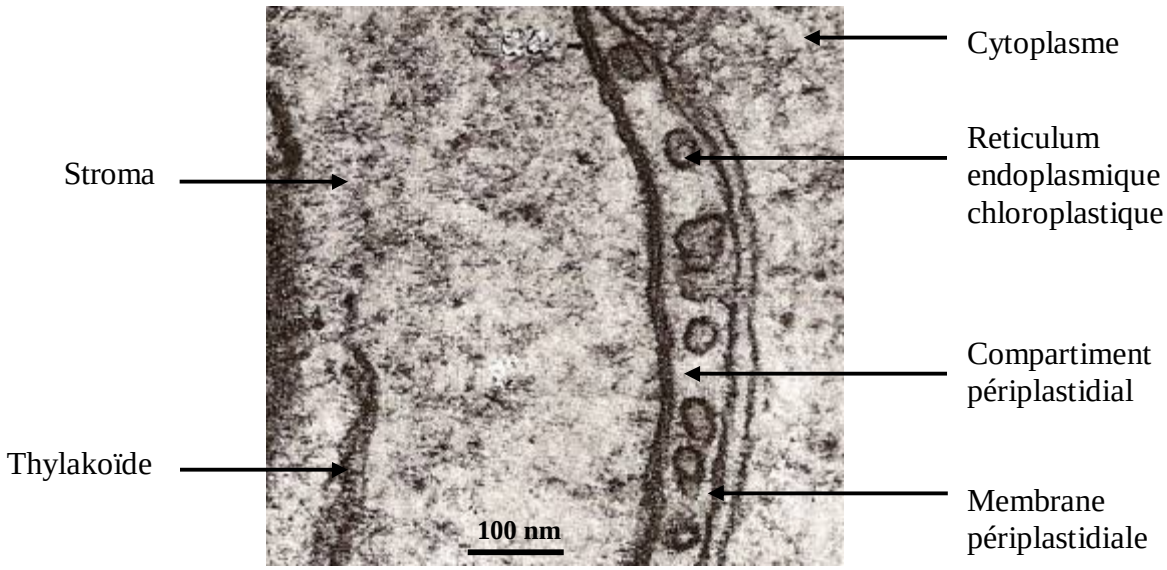
Coupe longitudinale de *Cryptomonas sp.* (MET)

La membrane périplastidiale (**pm**) du chloroplaste (**chl**) est au contact du compartiment périplastidial « **cp** ». Le nucléomorphe « **nm** » est une structure ressemblant à un noyau, délimitée par une enveloppe percée de pores similaires aux pores nucléaires et contenant un petit nombre de chromosomes linéaires bornés par des télomères ayant une séquence très différente de celle des télomères du noyau de la cellule.

Doc 2.1 – Ultrastructure d'un plaste de Cryptophyte (Cryptomonas species)



Doc 2.1-A - Coupe longitudinale de *Cryptomonas sp.* (MET)
Ce cliché ne permet pas de dénombrer les membranes.
Il sera utilisé pour présenter les relations entre membranes du plaste et reste de la cellule.



Doc 2.1-B - Détail des membranes entourant le plaste de *Cryptomonas sp.* (MET)
La région présentée correspond à un zoom sur les membranes de la zone encadrée en rouge sur le cliché précédent

Doc 2.2 – Analyse de la diversité des ribosomes de Cryptomonas

Doc 2.2-A – Analyse de la nature des ribosomes de *Cryptomonas*

Des hybridations *in situ* sont réalisées sur des coupes ultra-fines de *Cryptomonas*, en utilisant des sondes spécifiques d'ARN de la petite sous-unité ribosomique (ARNsr).

Les sondes utilisées sont :

- soit des sondes universelles, détectant tous les ARNsr cytoplasmiques eucaryotes (sonde S1) ou du stroma chloroplastique (sonde S4) ;
- soit des sondes correspondant à deux gènes spécifiques de *Cryptomonas* (sonde S2 et sonde S3).

Le résultat des hybridations est consigné dans le tableau suivant :

	Sonde S1	**Sonde S2**	**Sonde S3**	**Sonde S4**
Noyau	+	+	-	-
Cytosol	+	+	-	-
Stroma	-	-	-	+
Nucléomorphe	Non étudié	-	+	-
Espace périplastidial	+	-	+	-

+ : hybridation positive - : pas d'hybridation

Doc 2.2-B – Analyse de l'origine des ribosomes de *Cryptomonas*

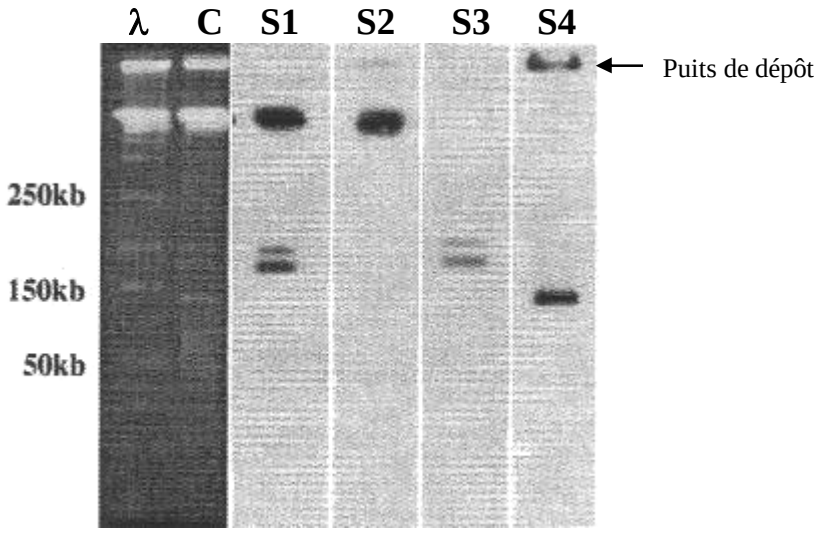
On cherche à localiser les gènes codant les ARNsr dans le génome de *Cryptomonas*. L'ensemble de l'ADN du Cryptophyte est constitué :

- des chromosomes nucléaires, faisant plus de 300kb (10^3 paires de bases) chacun,
- d'un génome d'environ 120 kb, présent dans le stroma chloroplastique,
- de trois chromosomes (de 190, 195 et 220 kb), présents dans le nucléomorphe.

L'ensemble de l'ADN de *Cryptomonas* est purifié et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose en champ pulsé, capable de séparer, sans les casser, de longues molécules d'ADN.

La présence d'ADN est vérifiée par une coloration au bromure d'éthidium (piste C). De l'ADN du phage λ permet de repérer la taille des molécules d'ADN (piste λ).

Le gel est ensuite transféré sur une membrane de nitrocellulose et hybridé successivement avec les sondes radiomarquées S1 à S4. Après autoradiographie, on obtient les résultats présentés sur la page suivante :



Électrophorégramme de l'ADN total de *Cryptomonas*

Doc 2.3 – Caractéristiques des plastes limités par quatre membranes

De tels plastes sont aussi présents dans des groupes autres que les Cryptophytes. La structure de ces plastes révèle les caractéristiques suivantes :

Groupe **Caractéristique**	**Cryptophytes**	**Hétérochontes**	**Chlorarachniophytes**
Membrane externe	En continuité avec le reticulum endoplasmique et l'enveloppe nucléaire Ribosomes accolés sur le feuillet cytosolique		Ni continuité avec le réseau endo-membranaire Ni ribosomes accolés
Ribosomes 70S	Présents dans le stroma		
Compartiment périplastidial	Oui	Non	Oui
• Reticulum endoplasmique chloroplastique	Oui		Non
• Nucléomorphe	Oui		Oui

Bien qu'encore mal connue, la composition de la membrane du **reticulum endoplasmique chloroplastique** présent dans le compartiment périplastidial, serait proche à la fois de celle de la membrane périplastidiale et de celle de l'enveloppe du nucléomorphe.

Thème II – L'origine des chloroplastes : l'apport des phylogénies moléculaires

Il s'agit, dans ce thème, d'étudier l'origine évolutive des plastes en s'appuyant sur des comparaisons de séquences d'ARN, de gènes et de protéines. On travaille donc à l'échelle de l'arbre du vivant.

Document 1 – Comparaison des profils de migration d'oligonucléotides

Par la comparaison de séquences d'ARN ribosomiques, on cherche à établir une relation de parenté évolutive entre les chloroplastes et les Eucaryotes, Eubactéries ou Archées actuels.

- Principe de la méthode

L'ARN ribosomique (ou ARNr) 16S ou 18S de chaque espèce étudiée est soumis à une digestion partielle par l'ARNase T1. Les oligonucléotides produits par cette réaction sont séparés par électrophorèse bidimensionnelle.

Chaque espèce peut donc être caractérisée par le profil de migration des oligonucléotides provenant de son ARNr 16S ou 18S.

En comparant les espèces deux à deux, on calcule un coefficient d'association entre les ARN des deux espèces, compris entre 0 et 1 et qui est **d'autant plus grand que la ressemblance entre leurs ARNr est importante**.

- Résultats

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**
1 *Saccharomyces cerevisiae*	-												
2 *Lemna minor*	0,29	-											
3 Lymphocyte B humain	0,33	0,36	-										
4 *Escherichia coli*	0,05	0,10	0,06	-									
5 *C. vibrioforme*	0,06	0,05	0,06	0,24	-								
6 *Bacillus firmis*	0,08	0,06	0,07	0,25	0,22	-							
7 *C. diphteriae*	0,09	0,10	0,07	0,28	0,22	0,34	-						
8 *Aphanocapsa*	0,11	0,09	0,09	0,26	0,20	0,26	0,23	-					
9 Chloroplaste *(L. minor)*	0,08	0,11	0,06	0,21	0,19	0,20	0,21	0,31	-				
10 *M. thermoautotrophicum*	0,11	0,10	0,10	0,11	0,06	0,11	0,12	0,11	0,14	-			
11 *M. ruminantium*	0,11	0,10	0,10	0,12	0,07	0,13	0,12	0,11	0,12	0,51	-		
12 *Methanobacter sp.*	0,08	0,13	0,10	0,07	0,06	0,06	0,09	0,10	0,10	0,25	0,25	-	
13 *M. barkeri*	0,08	0,07	0,07	0,12	0,09	0,12	0,10	0,10	0,12	0,30	0,24	0,32	-

Pour les **Eucaryotes** (lignes 1 à 3), on a analysé l'ARNr 18S.
Pour les **Procaryotes**, Eubactéries (lignes 4 à 8) et Archées (lignes 10 à 13) ainsi que pour le **chloroplaste** (ligne 9), on a analysé l'ARNr 16S.

Parmi les Eubactéries, *Aphanocapsa* est la seule cyanobactérie.

Tous les ARN 16S des stroma chloroplastiques étudiés dans le thème I donnent des résultats similaires à ceux obtenus avec les chloroplastes de l'Angiosperme *Lemna minor*, la lentille d'eau (ligne 9).

Document 2 – Établissement d'une phylogénie des plastes

On cherche à préciser les modalités d'acquisition, au cours de l'évolution, des chloroplastes par les eucaryotes photosynthétiques. On se limite aux Eucaryotes possédant des plastes à deux ou quatre membranes.
Les plastes à deux membranes se rencontrent dans la **lignée verte**, qui regroupe les Glaucophytes, les Chlorobiontes et les Rhodophytes.

Question 1 – Vous disposez des séquences partielles **des gènes d'ARNr 16S** du stroma de plastes d'organismes de la lignée verte ou du cytoplasme de cyanobactéries.

Pour faciliter la lecture, les séquences sont données sous la forme d'un tableau dans lequel la séquence *d'Arabidopsis thaliana* sert de référence :

1														
C	**T**	**G**	**A**	**C**	**G**	**G**	**A**	**G**	**G**	**A**	**A**	**T**	**G**	**C**
_	_	_	_	_	_	_	_	_	C	_	_	_	A	_
_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	A	_
_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
16														
C	**G**	**C**	**G**	**T**	**G**	**G**	**A**	**G**	**G**	**T**	**A**	*****	**G**	**A**
T	_	G	_	_	_	*	_	_	C	G	T	G	_	_
_	_	_	_	_	_	*	_	_	_	G	T	A	_	_
_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	T	_	_
31														
A	**G**	**G**	**C**	**C**	**C**	**A**	**C**	**G**	**G**	**G**	**T**	**C**	**C**	**T**
_	_	_	_	T	_	T	T	C	C	_	_	T	G	G
C	_	_	_	T	T	G	T	_	_	_	_	T	G	_
_	_	_	_	T	_	G	_	_	_	_	_	T	G	_
46														
G	**A**	**A**	**C**	**T**	**T**	**C**	**T**	**T**	**T**	**T**	**C**	**C**	**C**	**A**
C	_	_	_	C	C	_	_	_	_	_	T	T	_	_
_	_	_	_	C	_	_	_	_	_	_	_	_	T	_
A	_	_	_	C	_	_	_	_	_	_	_	T	_	_
61														
G	**A**	**G**	**A**	**A**	**G**	**A**	**A**	**G**	*****	*****	*****	**C**	**A**	**A**
_	G	_	_	G	T	_	T	A	C	C	A	A	_	_
_	G	_	_	G	_	_	_	T	_	_	_	_	_	_
_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	A	_	_
76														
T	**G**	**A**	**C**	**G**	**G**	**T**	**A**	**T**	**C**	**T**	**G**	**G**	**G**	**G**
_	_	_	A	_	_	_	_	C	T	_	_	A	A	C
_	_	_	_	_	_	_	_	C	_	_	A	A	_	_
_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	A	A	A	_
91									**100**					
A	**A**	**T**	**A**	**A**	**G**	**C**	**A**	**T**	**C**	*Arabidopsis thaliana (Chlorobionte)*				
_	_	_	_	G	_	_	_	_	_	*Anabaena sp. (Cyanobactérie)*				
_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	*Cyanophora paradoxa (Glaucophyte)*				
_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	*Porphyra purpurea (Rhodophyte)*				

Un nucléotide absent est signalé par un astérisque.
Un nucléotide identique à celui de la séquence d'*Arabidospsis thaliana* est indiqué par un tiret.

1.1 – À partir de ces séquences, remplissez les **cases blanches** de la matrice de distance fournie.

Principe de construction de la matrice de distance :

- La comparaison s'effectue sur un total de 100 nucléotides.
- Un nucléotide absent (signalé par un astérisque) est compté comme une différence dans la séquence.
- La distance est égale au pourcentage de nucléotides qui diffèrent entre les séquences des deux espèces considérées.

Matrice de distance à remplir et à coller sur votre copie

	Arabidopsis	*Anabaena*	*Cyanophora*	*Porphyra*
Arabidopsis	0,00	-	-	-
Anabaena		0,00	-	-
Cyanophora			0,00	-
Porphyra				0,00

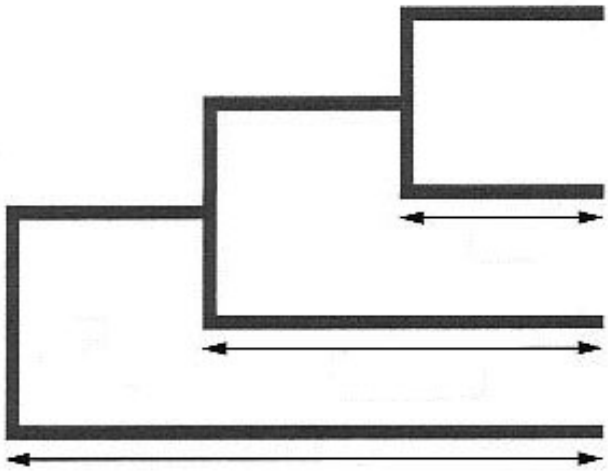
1.2 – Utilisez cette matrice pour construire un arbre phylogénétique des plastes, en admettant que :

- Les séquences évoluent à la même vitesse dans toutes les branches de l'arbre.
- Les pourcentages calculés reflètent les différences pour la séquence totale de l'ARN 16S.

Principe de la méthode de construction de l'arbre :

- Dans la matrice des distances, trouver les taxons i et j pour lesquels la distance d_{ij} est la plus petite.
- Mettre la racine à égale distance de i et de j, soit à $d_{ij}/2$.
- Créer un nouvel ensemble U incluant i et j. Si i et j sont les deux derniers ensembles, l'arbre est complet.
- Recalculer une matrice de distance en prenant comme distance de U à chaque taxon k, la moyenne des distance d_{ki} et d_{kj} : $d_{Uk} = (d_{ki} + d_{kj}) / 2$
- À partir de cette nouvelle matrice (dans laquelle il y a une entrée de moins car i et j ont été agglomérés en un ensemble U), retourner à la première étape.

Arbre à compléter et à coller sur votre copie



Question 2 – On dispose, depuis l'année 2000, d'analyses de **séquences** de gènes et protéines **nucléaires** confortant l'hypothèse d'une origine monophylétique pour les Chlorobiontes, les Rhodophytes et les Glaucophytes, les Glaucophytes étant le premier groupe à diverger à partir de l'ancêtre commun direct aux trois taxons.

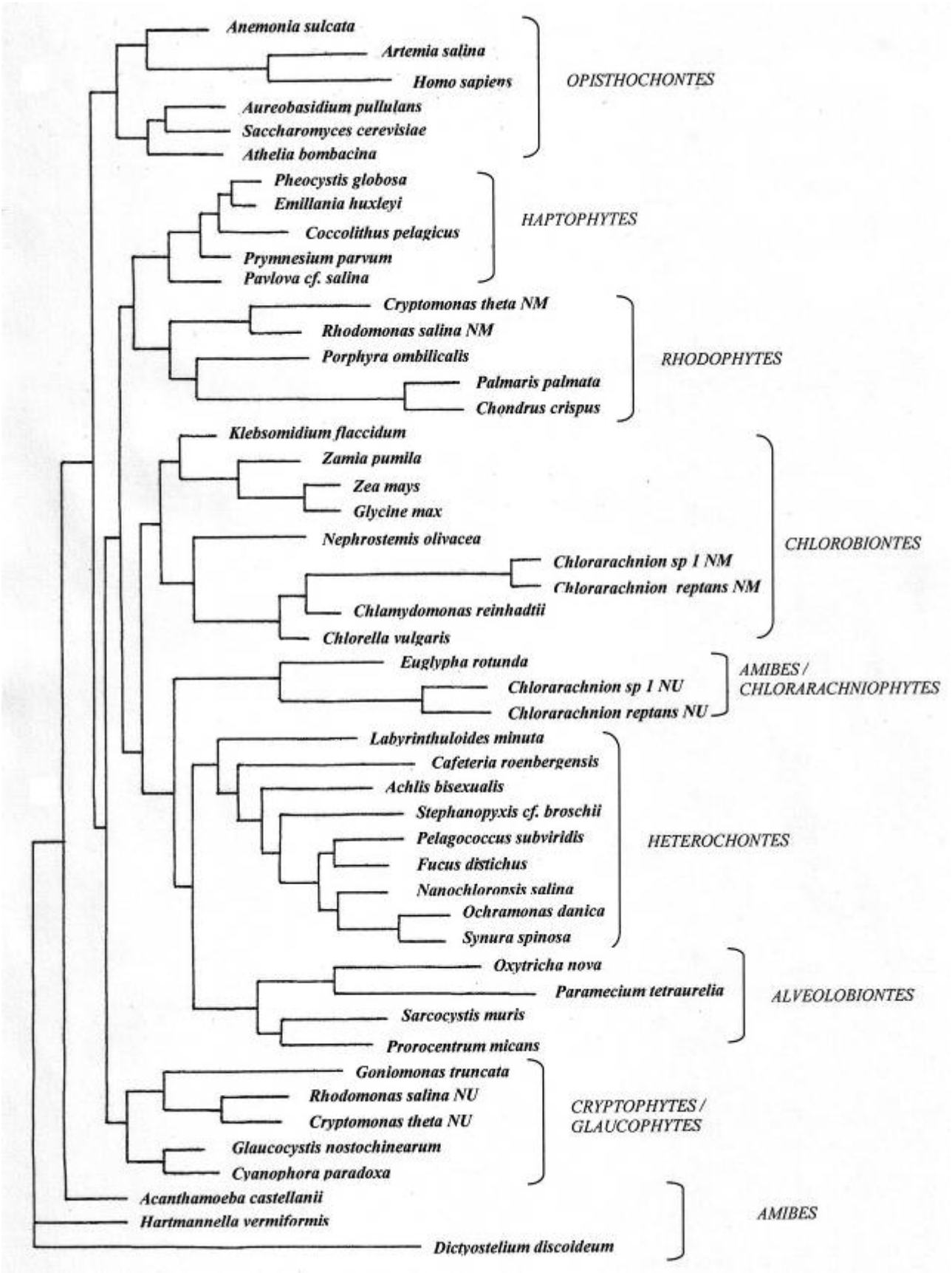
En mettant en relation ces données issues de l'analyse des **séquences nucléaires** avec l'arbre que vous avez construit à partir des **séquences d'ARNr 16S** (cf question 1.2) :

- Déduire le caractère monophylétique ou polyphylétique **des plastes de la lignée verte**.
- Conclure quant à l'unicité ou à la multiplicité des évènements d'endosymbiose dite « primaire », à l'origine de ces plastes.

Question 3 – On admet que le caractère monophylétique ou polyphylétique déterminé à partir des **ARNr 16S** pour les plastes de la lignée verte s'applique aussi aux plastes de *Cryptomonas theta* et à ceux de *Chlorarachnion sp 1*.

En mettant en relation cette information avec la phylogénie construite avec les **ARNr nucléaires** (cf ***doc 2.Q3*** page 12), préciser si les séquences génétiques du stroma, du nucléomorphe et du noyau de *Cryptomonas theta* et de *Chlorarachnion sp 1* appartiennent au même clade.

Question 4 – Que pouvez-vous en conclure quant à l'origine des plastes de *Cryptomonas theta* et de *Chlorarachnion sp 1* : sont-ils issus d'un ou plusieurs événements d'endosymbiose ? Vous préciserez le nombre minimal de ces événements d'endosymbiose et l'appartenance phylogénétique des organismes impliqués dans ce processus.



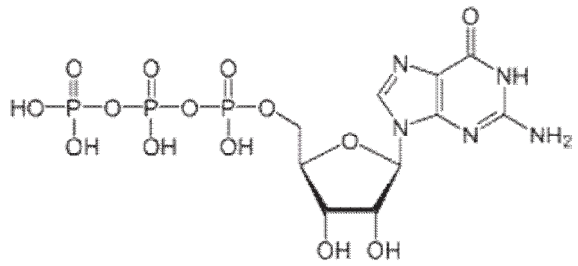
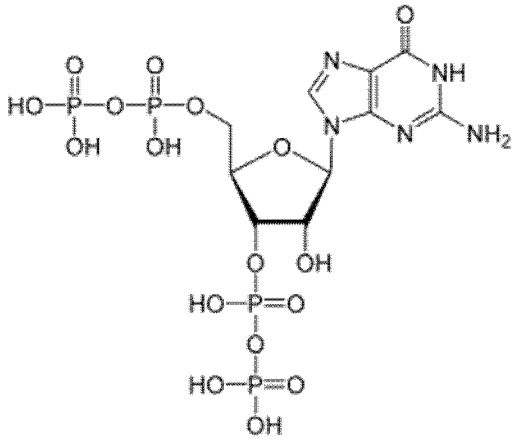
Doc 2.Q3 **- Arbre phylogénétique des Eucaryotes, construit à partir des séquences des gènes nucléaires codant les ARNr des petites sous-unités ribosomiques (1995)**

NM signifie « nucléomorphe », défini page 4 (thème I).
NU signifie « noyau »

Thème III – Contrôle de la fécondation des Angiospermes par une protéine chloroplastique

Par l'analyse des documents proposés on cherchera à caractériser la protéine CRSH et à présenter son rôle dans la fécondation des Angiospermes.

Le ppGpp est une molécule ubiquitaire chez les bactéries. Ce nucléotide intervient en particulier en tant que médiateur de la réponse au stress métabolique. Sa synthèse bactérienne nécessite l'intervention de l'enzyme RelA.

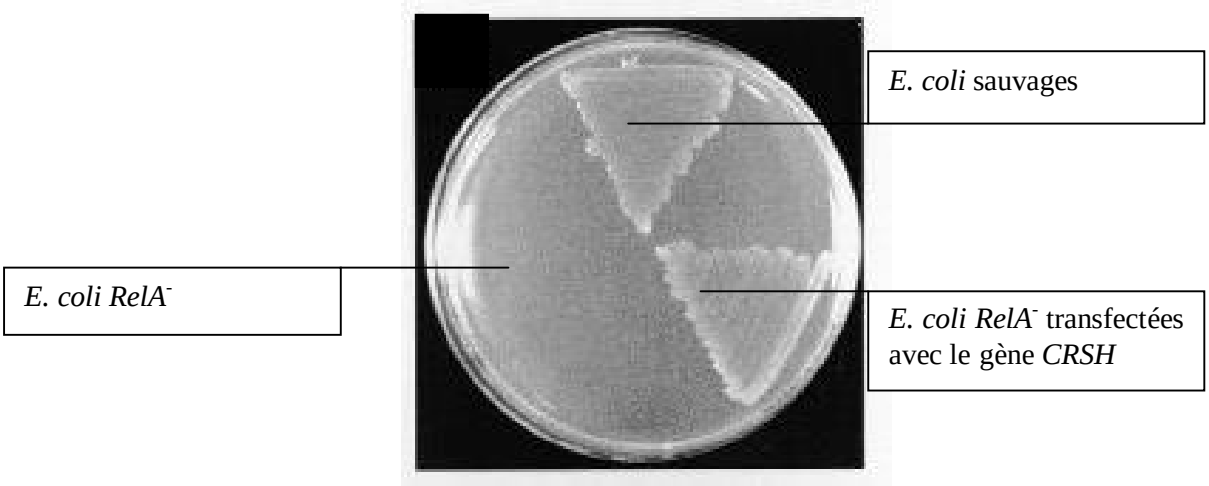
GTP (Guanosine 5'-triphosphate)	ppGpp (Guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate)
	

On a identifié une protéine appelée CRSH chez *Arabidopsis thaliana*, Angiosperme dicotylédone capable de s'autoféconder.

Document 1 – Rôle de la protéine CRSH

Doc 1.1 – Cultures de bactéries

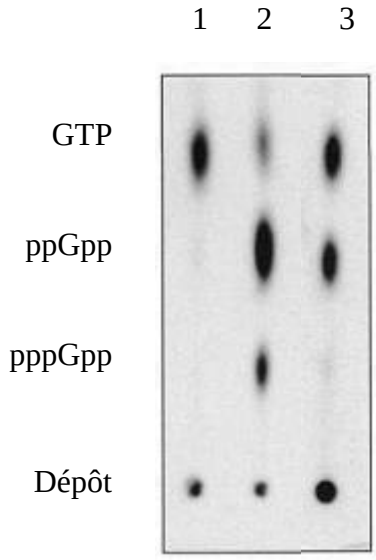
Le gène codant la protéine CRSH est introduit dans une souche bactérienne d'*E. coli RelA*$^-$ dont le gène codant l'enzyme RelA a été inactivé.



Photographie d'une boîte de Pétri ensemencée avec diverses bactéries maintenues en condition de stress métabolique pendant 5 jours

Doc 1.2 – Activité de la protéine CRSH

La protéine CRSH est isolée afin d'étudier son activité *in vitro*.
On utilise pour cela une solution de GTP radioactif (α-^{32}P). Après une incubation de cette solution dans différentes conditions pendant quelques minutes, on sépare ses constituants nucléotidiques par chromatographie.

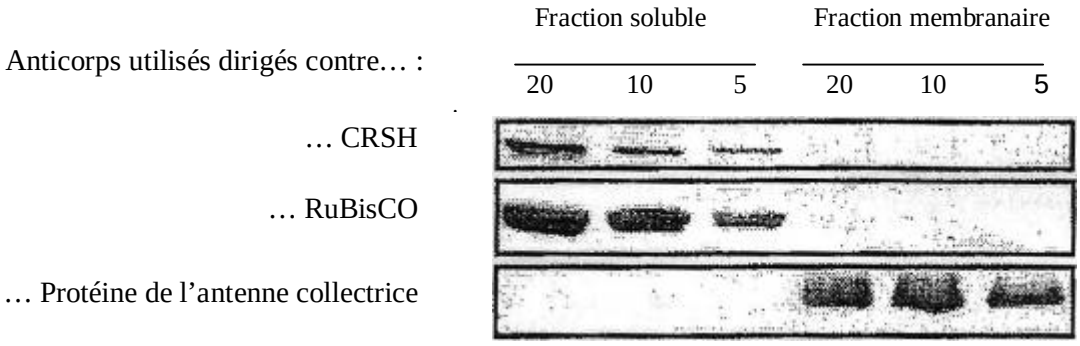


Autoradiographie du chromatogramme

1 : incubation en absence de protéine
2 : incubation avec RelA
3 : incubation avec CRSH
pppGpp : guanosine 5'-triphosphate 3'-diphosphate

Document 2 – Localisation de la protéine CRSH

Les protéines chloroplastiques sont extraites sous la forme de deux fractions : l'une soluble, l'autre membranaire. On dépose 20, 10 ou 5 µg de protéines de chaque fraction sur un gel. Ces protéines sont ensuite séparées par électrophorèse et le gel est placé en présence d'anticorps dirigés chacun contre une protéine spécifique (technique du *Western blotting*).

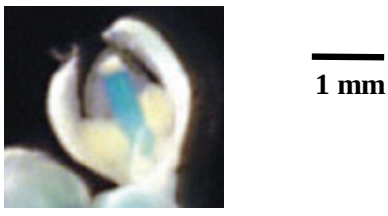


Document 3 – Étude de plants transgéniques d'*Arabidopsis thaliana*

Doc 3.1 – Premiers plants transgéniques : surexpression du gène CRSH

On utilise la technique du *gène reporter* : en l'occurrence, le gène codant la protéine GUS est placé sous le contrôle du promoteur du gène *CRSH*. L'activité de la protéine GUS est révélée par une couleur bleue. Cette construction génétique est introduite chez *A. thaliana*.

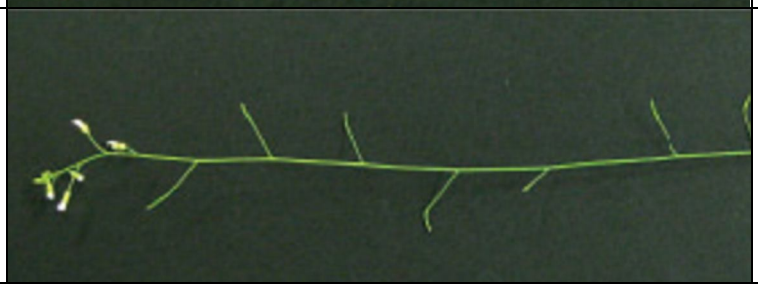
CL d'une fleur d'un plant d'A. thaliana transfecté avec la construction génétique



Doc 3.2 – Seconds plants transgéniques : inactivation du gène CRSH

On étudie de nouveaux *A. thaliana* transgéniques, dont le gène *CRSH* a été inactivé.

Doc 3.2A – Phénotypes observés après fructification

	1 cm	Pourcentage de graines par rapport au plant sauvage
A. thaliana sauvage ou *A. thaliana* transgénique pour lequel le pollen a été déposé directement sur le pistil		100 %
A. thaliana transgénique		0,5 %

Doc 3.2B – Caractéristiques du développement floral

Stades floraux	1	2	3	Stade floral auquel intervient la déhiscence des anthères
A. thaliana sauvage				2
A. thaliana transgénique				Sénescence de la fleur

Barre d'échelle blanche : 0,5 mm