

## DM: Mécanismes de diversification des génomes.

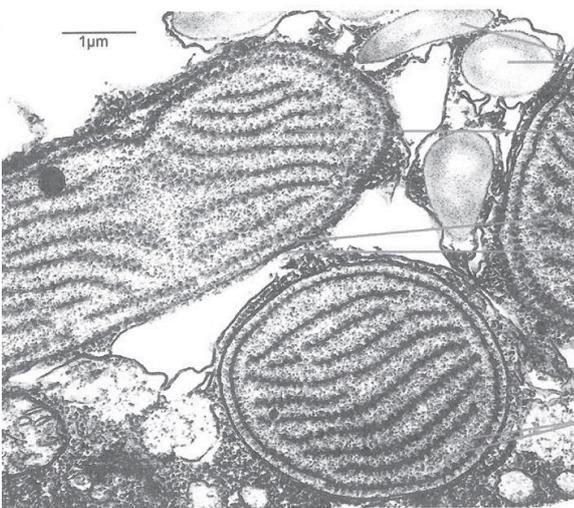
### D'autres mécanismes de diversification des génomes : exemple de l'origine et de l'évolution du génome chloroplastique.

Le génome des cellules eucaryotes est constitué du génome nucléaire et du génome des organites semi-autonomes (mitochondries et chloroplastes).

On s'interroge sur l'origine du génome des chloroplastes dans la lignée verte, groupe monophylétique d'eucaryotes caractérisé par un chloroplaste à double membrane, dont les premiers groupes sont apparus il y a 1,2 à 2 Ga.

**1. A l'aide des documents 1 et 2, proposer une hypothèse sur l'origine du chloroplaste.**

#### Doc 1- Comparaison structurale d'organismes photosynthétiques. CAPES 2009



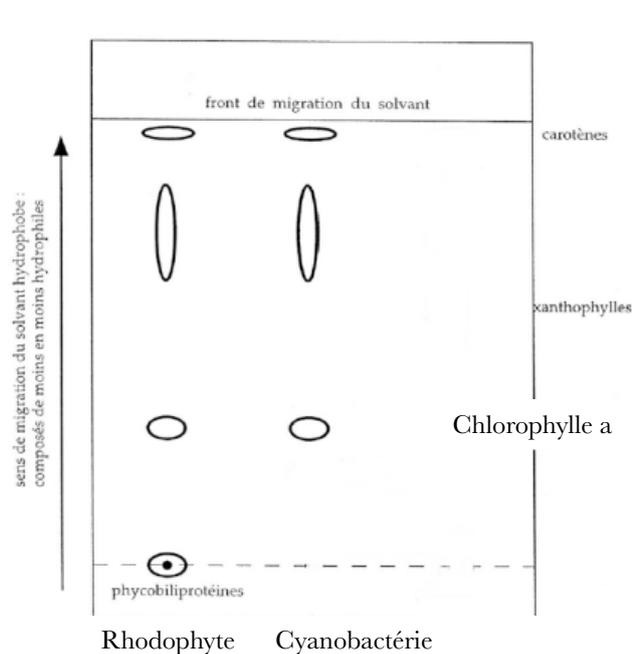
Cliché de MET de chloroplastes de *Griffithsia sp.* (Rhodophyte)



Cliché de MET d'une cellule d'*Oscillatoria splendida* (Cyanobactérie). Les cyanobactéries sont apparues il y a environ 3,8 Ga.

#### Doc 2 – Comparaison de l'équipement pigmentaire d'organismes photosynthétiques par chromatographie.

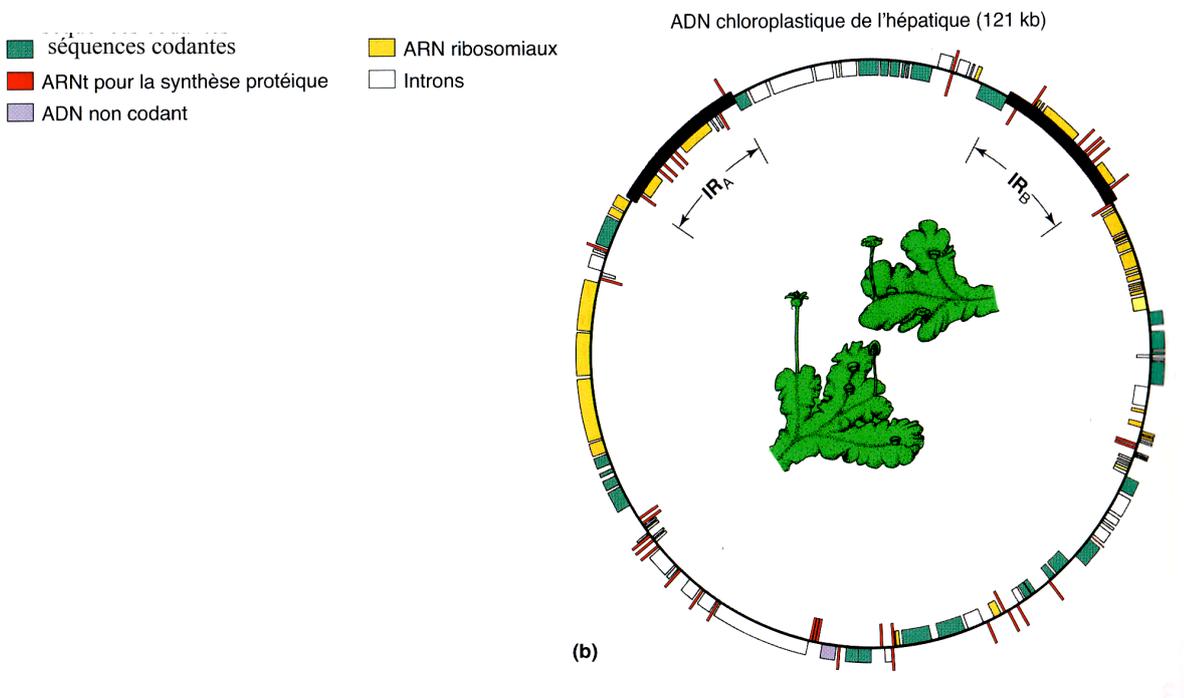
Selosse APBG 2000



**2. A l'aide des documents 3 et 5, comparer les 2 types de génomes en remplissant le tableau**

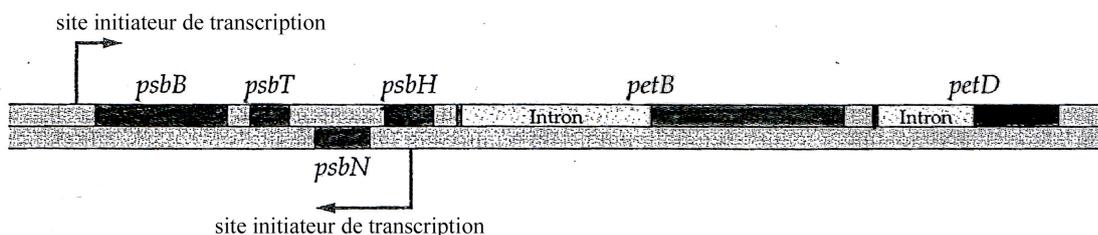
	Génome cyanobactérien (type procaryote)	Génome chloroplastique
Structure du chromosome		
Contenu du génome		
Organisation des séquences codantes		
Rapport taille du génome / nb de gènes		

**Doc 3 – Carte du génome chloroplastique. Griffiths**



**Doc 4 – Organisation des séquences codantes du génome chloroplastique**

Les séquences codantes sont représentées par des boîtes noires sur le brin d'ADN complémentaire du brin transcrit. *psbB*, *psbT*, *psbH*, *petB* et *petD* codent pour des protéines constituant un complexe enzymatique de la membrane du thylakoïde, le complexe b6f. *psbN* code pour une protéine d'un autre complexe enzymatique de la membrane du thylakoïde, le photosystème 2.



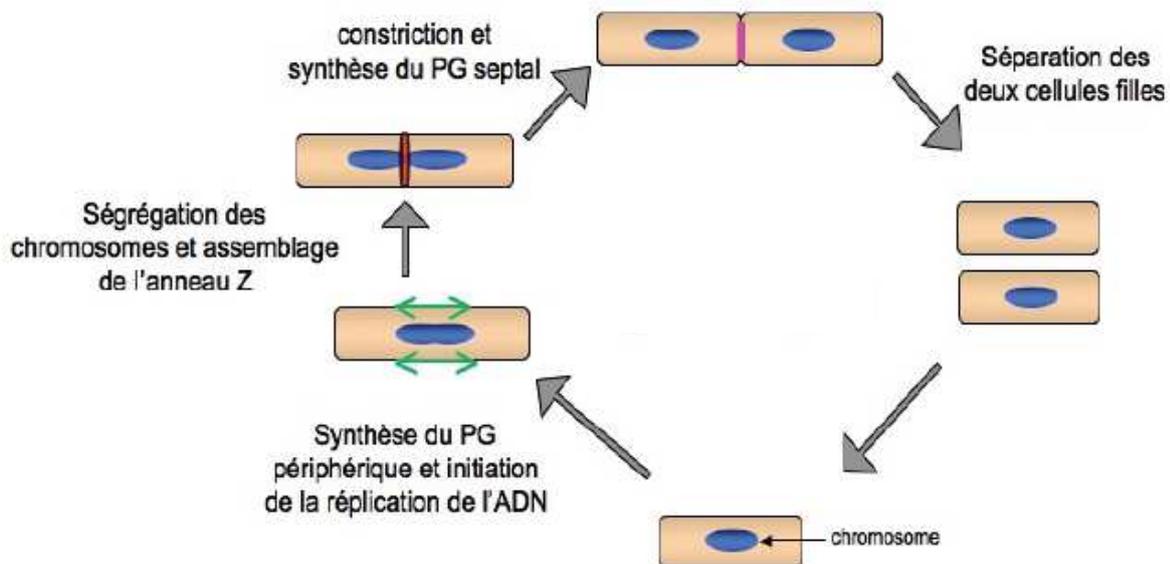
**Doc 5 – Quelques caractéristiques des génomes cyanobactériens et plastidiaux eucaryotes.**

Taxons	Taille du génome (kb)	Nombre total de gènes
<i>Synechocystis</i> sp. (Cyanobacteria)	3573	3168
<i>Anabaena</i> sp. (Cyanobacteria)	6400	Non connu
<i>Cyanophora paradoxa</i> (Glaucocystophyta)	136	170
<i>Porphyra purpurea</i> (Rhodophyta)	191	220
<i>Chlorella vulgaris</i> (Chlorophyta)	151	111
<i>Zea mays</i> (Embryophyta)	140	132

Génomes plastidiaux eucaryotes

La protéine FtsZ (pour « Filamentous temperature sensitive ») est une molécule impliquée dans la division par scissiparité des bactéries : des molécules de FtsZ s’auto-assemblent en un anneau contractile (« anneau Z ») à l’origine de la constriction membranaire au niveau du septum séparant les 2 cellules filles bactériennes.

Modalités de division des bactéries. *Thèse Marbouty-Martial, 2009*  
 PG : peptidoglycane.



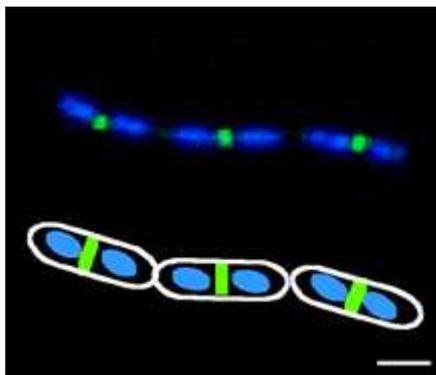
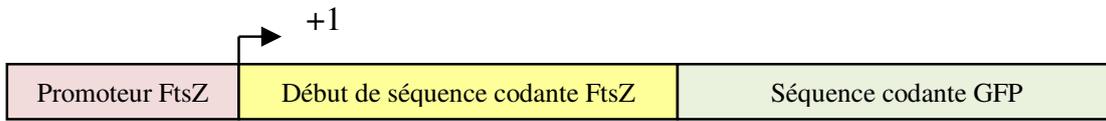
On dispose de la séquence du gène *FtsZ* de la cyanobactérie *Synechocystis*, du génome *d'Arabidopsis thaliana*, une plante modèle en biologie moléculaire, et d’un outil de recherche de séquences avec une forte similarité par alignement (BLAST).

3. Effectuer une recherche de similitude de séquences à l’aide de BLAST. Voir annexe à la fin pour la méthode.
4. Quelle hypothèse proposez-vous pour interpréter le résultat de cette recherche ?

On s'intéresse à la fonction du gène *ftsZ* chez *Arabidopsis thaliana*. Différentes expériences sont réalisées (doc.6).

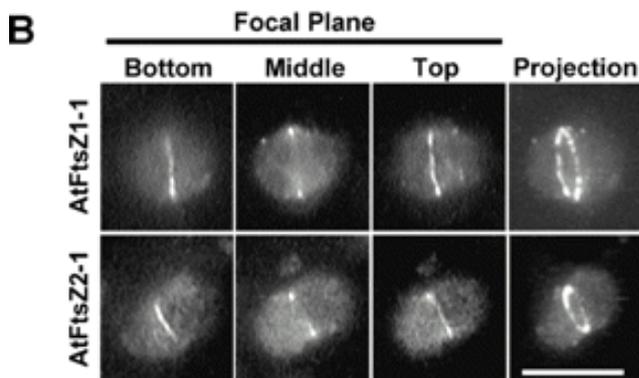
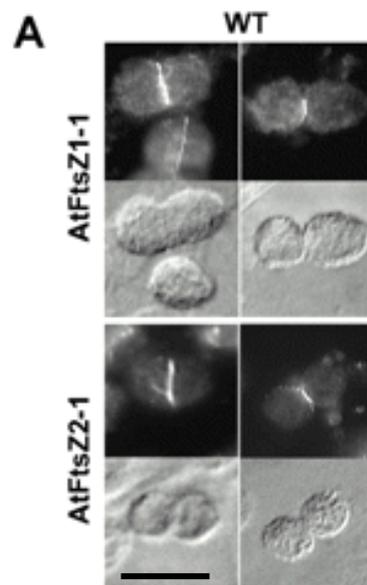
**Doc 6 – Construction d'organismes transgéniques avec le transgène *FtsZ* :: *GFP*.**

Construction du transgène intégré dans une bactérie (gauche) ou chez *Arabidopsis thaliana* (droite)



Observation en microscopie à fluorescence de bactéries transgéniques *FtsZ*::*GFP* dont l'ADN est coloré en bleu (DAPI).

[www.biologie.wustl.edu/levin/petracells.html](http://www.biologie.wustl.edu/levin/petracells.html)



Observation en microscopie à fluorescence de chloroplastes des plantes transgéniques *FtsZ-1*::*GFP* et *FtsZ2*::*GFP*.

A : les clichés en fluorescence (ceux sur fond noir) sont accompagnés de clichés en microscopie à contraste de phase permettant d'observer la forme du chloroplaste.

B : observation en microscopie confocale de différents plans focaux de chloroplaste et reconstitution du chloroplaste (« projection »).

Barre d'échelle : 5 µm.

Vitha et al., JCB Home 2001

5. Quel est l'intérêt de cette technique ?

6. Quelle fonction pouvez-vous supposer pour la protéine *FtsZ* chez les bactéries et chez les chloroplastes d'après l'analyse du document 6 ?

Des lignées transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* sont construites en utilisant un vecteur comportant :

- le promoteur de *FtsZ1*
- un gène antisens de *FtsZ1*
- un gène codant une protéine conférant une résistance à la kanamycine.

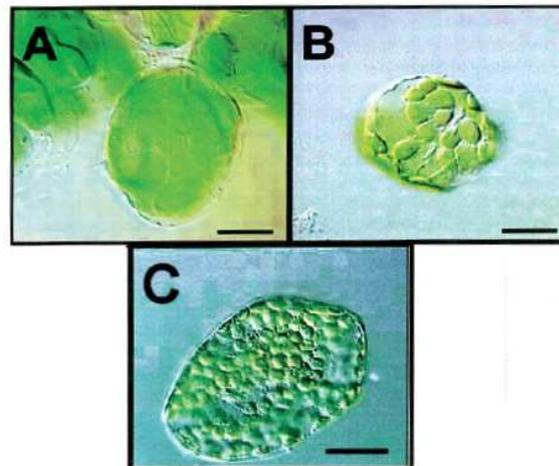
Les plants issus de la transformation par le vecteur sont cultivés sur un milieu contenant de la kanamycine. Puis les cellules de feuilles issues de ces plantes transgéniques sont observées (A et B) et comparées à une plante non transformée (C) en microscopie optique à contraste de phase (donne une impression de relief).

**Doc 7 – Analyse phénotypique de lignées transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* exprimant des ARN antisens spécifiques de *FtsZ1*. (CAPES 2009, Osteryoung et al. 1998)**

Barre d'échelle : 25 µm.

A et B : plantes ayant le gène anti-sens

C : plante témoin



7. Expliquer le principe de cette expérience.

8. Les résultats sont-ils cohérents avec la localisation de la protéine *FtsZ* ?

**Doc 8 – Expérience de traduction in vitro à partir de l'ARNm de *FtsZ1* d'*Arabidopsis*.**

L'ADNc de *FtsZ1* est transcrit in vitro puis traduit in vitro en présence de méthionine radiomarquée au <sup>35</sup>S. Les produits radiomarqués sont soit directement déposés sur gel (piste 1) soit mis en présence pendant 30 min de chloroplastes isolés (piste 2). Pour la piste 2, les chloroplastes sont isolés par centrifugation puis lysés, les protéines récupérées sont déposées sur gel (piste 2).

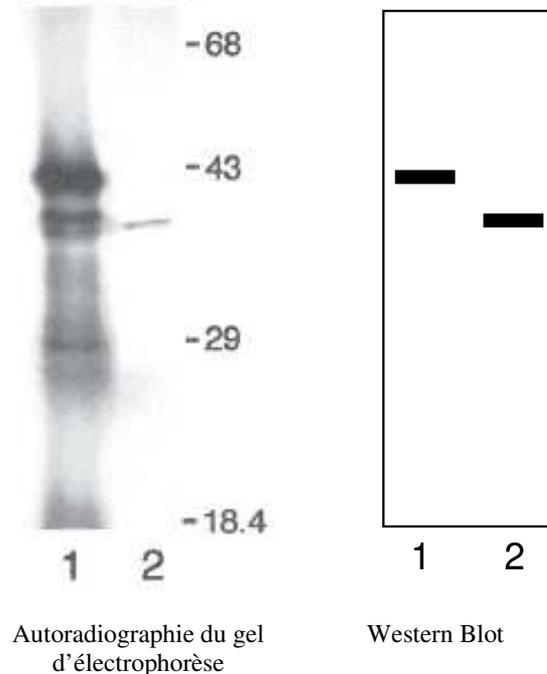
Les protéines déposées sur gel sont analysées en électrophorèses en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Les résultats sont révélés par autoradiographie.

Les valeurs indiquées à droite correspondent à la position des marqueurs de masse moléculaire (en kDa).

Un Western Blot avec un anticorps anti-*FtsZ1* est ensuite effectué.

Rq : la traduction in vitro peut générer de nombreux produits artéfactuels.

(CAPES 2009, Osteryoung et al. 1998)



9. Analyser et interpréter le document 8.

10. Synthétiser l'ensemble des résultats sous forme de schémas pour expliquer l'origine du génome chloroplastique

**Identification de similitude de séquences à l'aide du logiciel BLAST** (*Basic Local Alignment and Search Tool* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

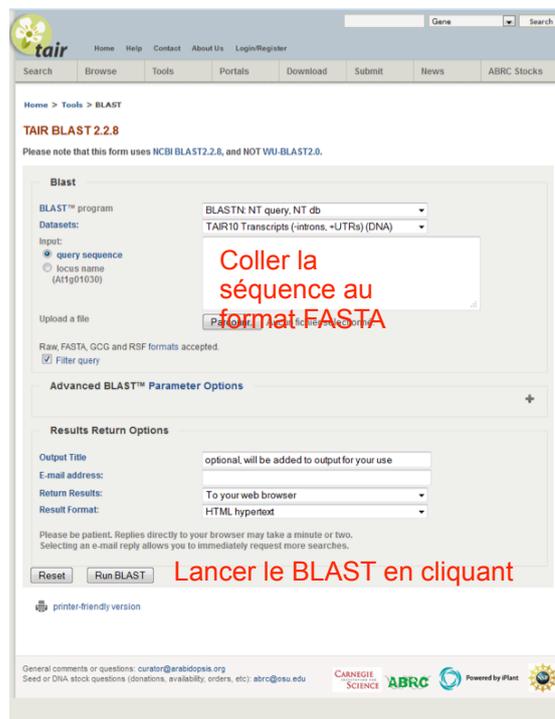
BLAST est un ensemble d'algorithmes et de bases de données permettant d'identifier des séquences (nucléotidiques ou protéiques) présentant une forte similarité avec une séquence initiale.

Le score permet de comparer des alignements et de dire lequel est le « meilleur » (score le plus élevé), c'est-à-dire celui présentant un maximum de similitudes entre séquences.

L'e-value est une valeur statistique qui évalue le nombre de séquences de même score obtenues au hasard. Plus l'e-value est faible (<<1), plus l'homologie des séquences est probable.

En utilisant le lien suivant <https://www.arabidopsis.org/Blast/>, il vous est possible de confronter la séquence du gène FtsZ de la cyanobactérie *Synechocystis*, disponible sur le fichier FtsZ-Synechocystis\_FASTA, avec le génome complet d'*Arabidopsis thaliana*.

Ouvrez le fichier, copiez la séquence de nucléotides et copiez-la dans la fenêtre du site TAIR-BLAST, puis cliquez sur « Run Blast ».



Fasta

```
>gij16329170:c1014530-1012850 Synechocystis sp. PCC 6803 chromosome, complete genome
CACATTGACAAATTTGCTCAATATGCCTAGTGTAGGGACGATAGACCGCTGGGATTTGTGCTTGGGCGAG
GGGATCTCTGTCGTGTAATAAAGGCTCAATACCCTGCTGCTTCGGAAGCGTTGCTCTCCCTGTGGTTGC
TTTTGCGCCCTAAGAATTTGCTCATTGCTCCCTAATACTTCCCCCTGCAATGACGCTCAATAATGA
TTTACCCTAAATAACATAGGTTTACCCTGATGGTCTCAATGATGGAACGGAGGGGTTAGATGATTTA
TTTTCGTCTCCATCGTGACAATGAACCGTTGGAGGCTTTGGTAGAAACACCTACTTTTTGCCAGCCCTA
GTCCTAACCTAAAAGGGATCAGATTGTCCTAGTACATTGCCAAAATTAAGTGATCGGCGTTGGGGG
AGGCGGTTGCAATGCTGTCAACCGTATGATTGCCAGTGGGGTACGGGCATCGACTTTTGGGCAATTAAT
ACCGATTCCAGGCATTAACATAACGAACGCCCGGATTGATTCAAATTGCCAAAACTCACCAGGG
GTTTGGGGCCGGTGGTAATCCGGCGATCGGGCAAAAAGCGGCGGAGGAATCCCGGGATGAAATGCCCG
TTCCTTGAGGGTACGGATTTGGTCTTTACTGCGGGCATGGGGGGCGGCACTGGCACTGGAGCAGCT
CCCATTGTGGCCGAGGTGGCCAAAAGAAATGGGCTGTTGACGGTGGGCATTGTACCCCGTCCATTACCT
TTGAAGGCCGACGACGGGCTAAGCAAGCTGAGGAAGGCATTAATGCTCTCCAATCGGGGTCGATACCCT
AATTGTGATTCCTAATAACCACTTTTGTGGTATTCCCGCCGAAACTCCTCTCCAGGAAGCTTTTCGG
GTAGCCGATGATATTCTGCGCCAGGGGTACAGGGTATTTCCGACATATCATCATCCCGGTTTGGTGA
ATGTGGACTTTGCGGACGTGCGGGCGGTGATGGCCGATGCTGGCTCCGCATTAATGGGCATTGGGGTGGG
TTCGGCAAGTCCCGGGCAAGGAGGCGCCACGGCGGCAATTTCTCTCTTTGTTGGAATCTTCTATC
CAGGAGCTAAAGGAGTCGATTTAATGTCACTGGTGAACCGATGACCTGACGAAGTTAATGTTG
CGGCTGAAATTATCTAAGTGGTGGATGCCGATGCCAACATCATCTTTGGAGCGGTGATTGACGATCG
CCTGCAGGGAGAAATGAGAATTACCGTCAATGCCACGGGCTCAACCGTGA AAAAGAAAAACCCCAAGCA
AAAACCAGCAGCAACCTGTGCTACGCGGCCCCCTGCCGAGTGGAGACAGTGCCATCAACAACAAC
CAGAAGATCCCCTAGGGAAATCCCATGGCCCGGAGTTAGACATTCCTGATTTTCTCCAGAAGCGGCG
TTTTCCCGCCGTTAGGTTCCCAGGATTAAGTGGTGGGAACCAAATAATTGACCAAGAAAGTCTCTTAG
GCTACACTACTAACCTCTAATTGTTGCTCAACCTAAAGAGGTTGATCGATTTGCGCTTTTTGTTTGCTA
GCCTACTAATCCCTTGGTATTGCCTTTGCCGGTGGTGGCCAAATCCGCCACTTTCTATGGCAATCAGTT
T
```