

## M1 Biologie-Santé, UE Evolution et Biodiversité des Microorganismes

Epreuve sans documents. Durée de l'épreuve : 2h. Le barème de l'examen est sur 35 points qui seront rapportés sur 20 points pour obtenir la note finale.

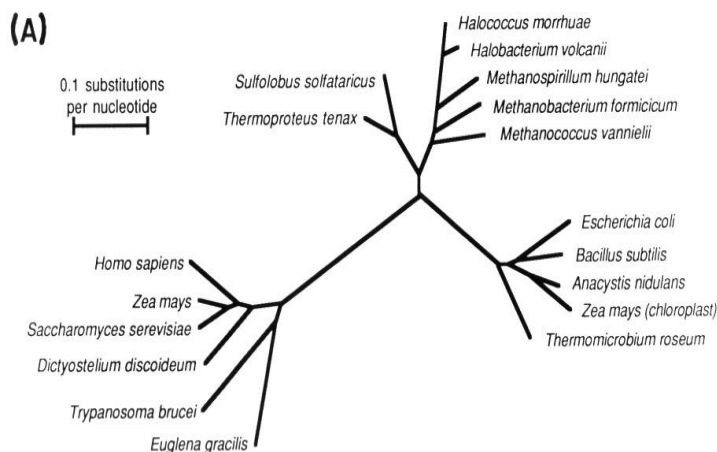
**NOM, Prénom :** \_\_\_\_\_

Sujet T. Basta (17 points), répondre directement sur le sujet

Dans les années 1970, la classification des microorganismes est l'une des questions majeures non-résolues. Les tentatives de classer les bactéries en utilisant les caractères morphologiques ou métaboliques ont toutes échoué. Cependant, l'idée d'utiliser l'information inscrite dans l'ADN pour classer les organismes va émerger. Carl Woese et George Fox utiliseront le séquençage d'ARN ribosomique pour établir la phylogénie des microorganismes y compris au niveau taxonomique le plus élevé.

Q1. Citez au moins trois critères qui ont poussé C. Woese à choisir l'ARN 16S pour établir la phylogénie des Bactéries (1,5 points).

Q2. Voici ci-dessous l'arbre obtenu à la suite de ces travaux.

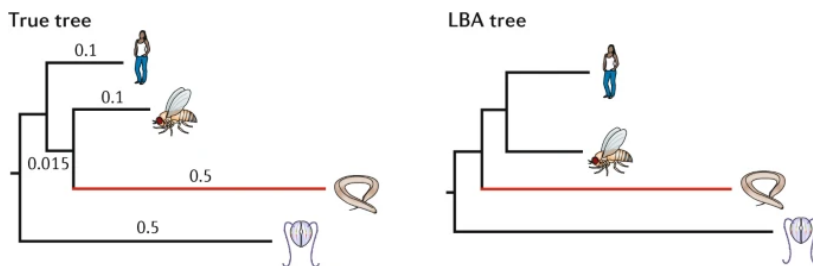


a) A quoi correspond l'échelle (à gauche de l'image, nota bene : il ne suffit pas de traduire ce qui est écrit) ? (1 point)

b) Pouvez-vous identifier le nœud le plus ancien sur cet arbre ? Pourquoi ? (1 point)

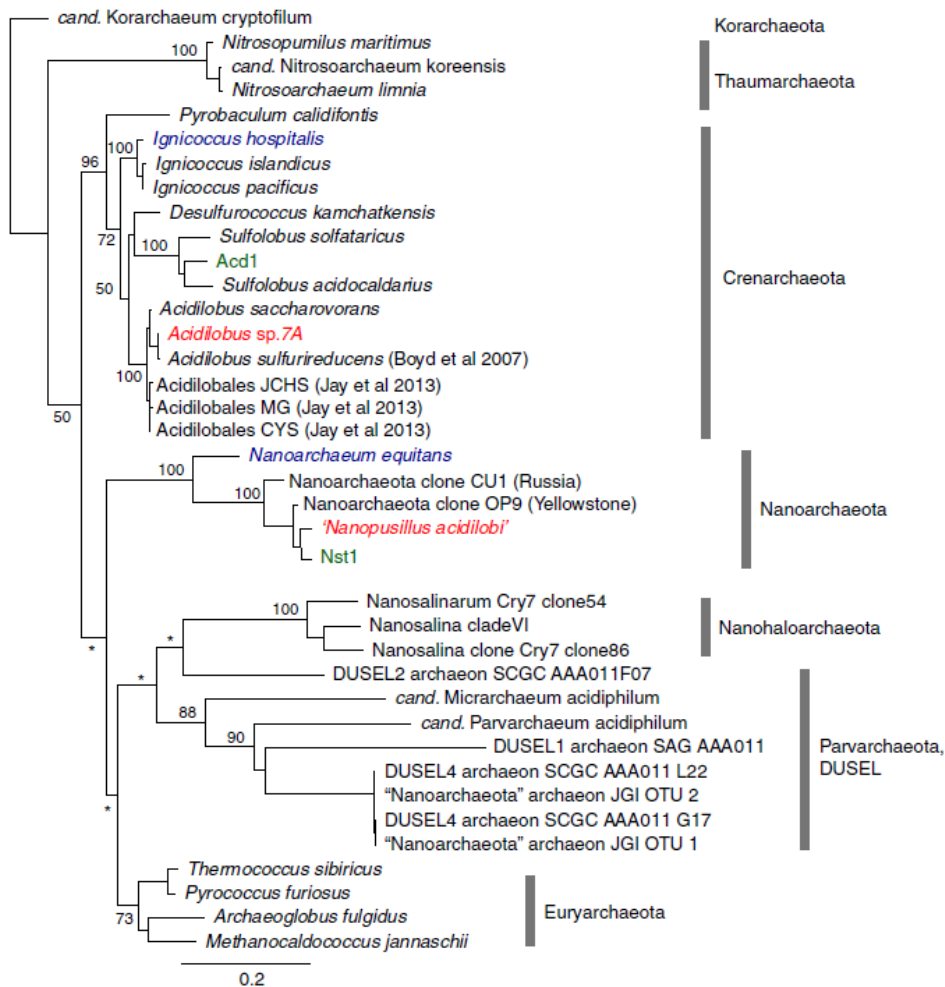
La métagénomique a révolutionné notre compréhension de la diversité du vivant et de son évolution en nous donnant l'accès aux génomes des espèces non-cultivables. L'une de découvertes majeures issue de ces recherches est l'identification de deux superphyla, Candidate Phyla Radiation (CPR) chez les Bactéries et DPANN chez les archées ainsi que des Asgard archées. Quant aux CPR et DPANN, il s'agit des organismes qui semblent être des symbiotes ou épisymbiotes vivant en interaction physique avec leur cellules hôtes.

Q2. Les organismes qui ont évolué pour devenir des épisymbiotes ou parasites ont généralement un taux d'évolution de séquence (vitesse d'accumulation de mutations) plus élevé comparé aux organismes autonomes. Cela se manifeste par de longues branches dans les arbres phylogénétiques. L'inclusion de telles séquences peut introduire un biais lors de la reconstruction d'arbres, que l'on appelle l'artefact d'attraction de longues branches. A quoi correspond cet artefact et quelle est la conséquence pour la reconstruction phylogénétique ? Appuyez-vous sur le schéma ci-dessous pour répondre à la question. True tree = vrai arbre ; LBA tree = l'arbre attraction de longues branches ; (2 points)



Q3. Pour mieux comprendre le rôle des CPR et des DPANN dans les écosystèmes, il est nécessaire d'isoler le couple cellule hôte – épisymbiote. Très peu de ces couples ont été cultivés jusque présent. L'un d'entre eux c'est une Crénarchée *Acidilobus sp. 7A* et une DPANN *Nanopusilus acidilobi*. Les deux

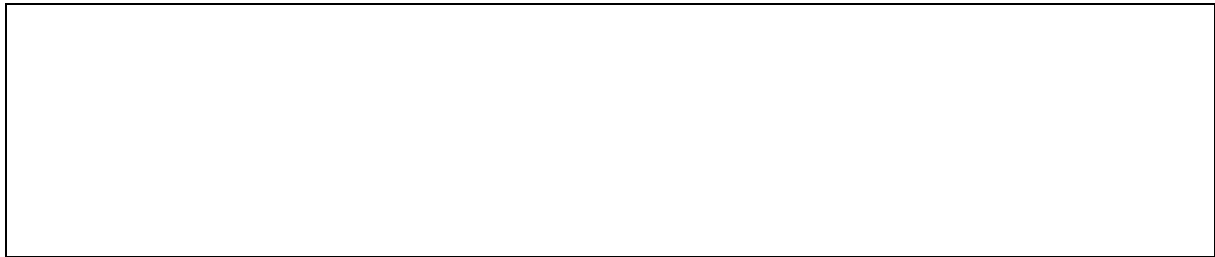
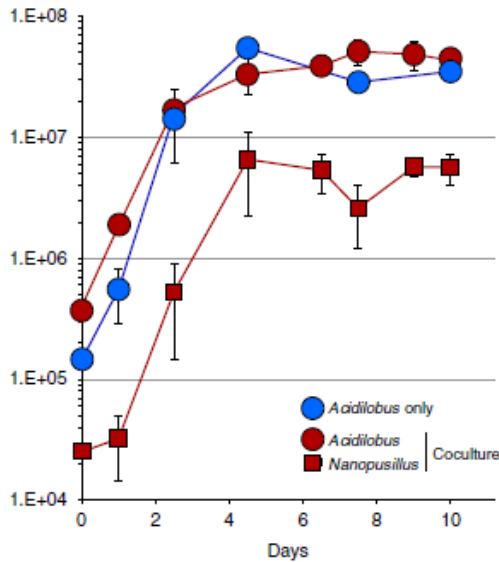
espèces ont été positionnées sur l'arbre phylogénétique ci-dessous, basé sur l'alignement des séquences 16S rADN. L'arbre est enraciné sur la branche qui sépare *Korarchaeum cryptofilum* des autres archées.



a) A quoi correspondent les chiffres associés aux différents nœuds ? La topologie d'arbre est-elle robuste ? (1,5 point)

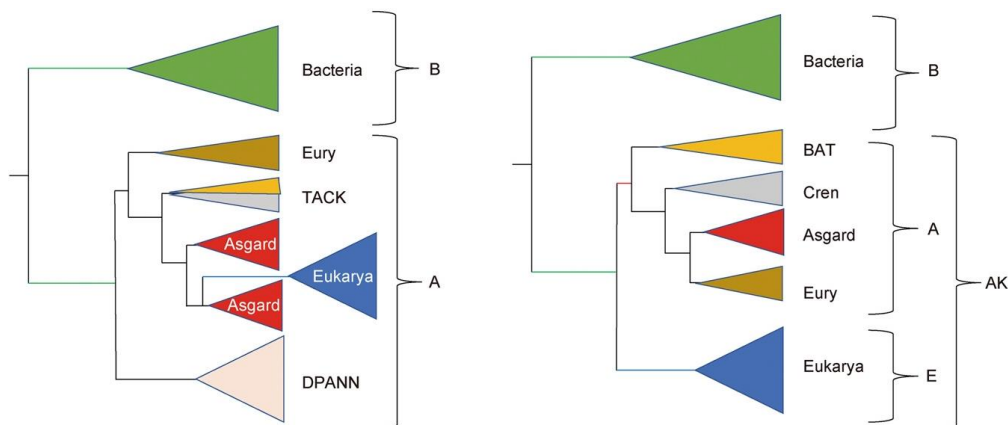
b) *Acidilobus sp. 7A* est-il phylogénétiquement plus proche de *A. saccharovorans* ou de *A. sulfurireducens* ? Justifiez. (1 point)

c) Les auteurs de cette étude ont fait croître la cellule hôte *Acidilobus sp.* en présence ou en absence de *Nanopusillus acidilobi*. Le graphique qui présente ces courbes de croissance est montré ci-dessous. A partir du graphique déduisez le rapport approximatif entre le nombre des cellules de *Acidilobus sp.* et de *Nanopusillus acidilobi* au cours de croissance (l'échelle de l'ordonnée est logarithmique). Dans ces conditions est-il possible de conclure que l'épisympionte n'impacte pas la croissance de la cellule hôte ? Justifiez. (3 points)



Q4. La découverte des archées Asgard en 2017 a bouleversé notre compréhension de l'évolution du vivant.

a) Lequel de deux arbres universelles ci-dessous correspond à la version 2D de l'arbre ? Justifiez. (2 points)



b) Selon l'arbre universel 2D l'ancêtre des eucaryotes était (entourez la bonne réponse) : **(1 point)**

- un eucaryote primitif
- une bactérie
- une archée
- aucune parmi des propositions n'est correcte

Q5. La figure ci-dessous montre un alignement de séquences d'un fragment d'ADN issu de quatre espèces (« species »). La séquence ancestrale de ce fragment d'ADN est indiquée sous l'alignement. Encerclés les résidus qui correspondent aux synapomorphies et dessinez le cladogramme qui rend compte des liens de parenté entre ces quatre espèces. **(3 points)**.

Species 1	ATCTCTATTGGGGATCGGTGGTAGCTAGGAT
Species 2	ATCTCTATTCGGGATCGATGGTAGCTAGGAT
Species 3	ATCTCTACTCGGGATCGATGGTAGCTACGAT
Species 4	ATCTCCACTCGGGATCGATGGTAGCTACGAT

Seq. Ancestrale ATCTCTATTCGGGATCGATGGTAGCTACGAT

**NOM, Prénom :** \_\_\_\_\_

Sujet C. Regeard (10 points), répondre directement sur le sujet

Les myxobactéries sont des bactéries Gram-négatives capables de multicellularité.

**Question 1 :** (0.5 points) La multicellularité chez les myxobactéries est-elle d'origine sorocarpique ou zygotique ?

Elles sont classées en 6 familles, 23 genres et environ 50 espèces. Elles sont ubiquitairement retrouvées dans les sols. Cependant, les études concernant la diversité et l'abondance des myxobactéries dans les sols sont principalement basées sur des techniques d'isolement qui dépendent de leurs cultures dans les conditions de laboratoire. C'est pourquoi des méthodes qui ne nécessitent pas d'étapes de culture doivent être développées.

Le gène *mglA* est impliqué dans le contrôle de la motilité et est hautement conservé chez les myxobactéries. Un protocole de PCR-DGGE a donc été développé, basé sur la séquence de ce gène.

**Question 2 :** (3 pts) Quel est le rôle de la motilité dans le phénomène de différenciation cellulaire chez les myxobactéries (10 lignes max) ?

13 séquences représentatives des gènes *mglA* ont été alignées afin de déterminer des amorces pour l'amplification (tableau 1).

Tableau 1 : Amorces PCR utilisées :

Primer sequences (5'→3')	Tm values	Position <sup>a</sup>	length
<i>mglA1F</i> - CGCGAAATCAACTGCAAGAT	51.84	25~44	20
<i>mglA2F</i> - CAGGTGTTCTACGACGCCA	53.43	244~262	19
<i>mglA1R</i> -GGCAGGTCGCGCTTGTTGTA CTG	60.83	415~437	23
GC- <i>mglA2F</i> -CGCCC GCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGGCAGGTGTTCTACGACGCCA	95.9	244~262	59

<sup>a</sup> Correspond to the sequence number of gene *mglA* in *Myxococcus xanthus* 1622 (CP000113.1) [28].  
doi:10.1371/journal.pone.0108877.t002

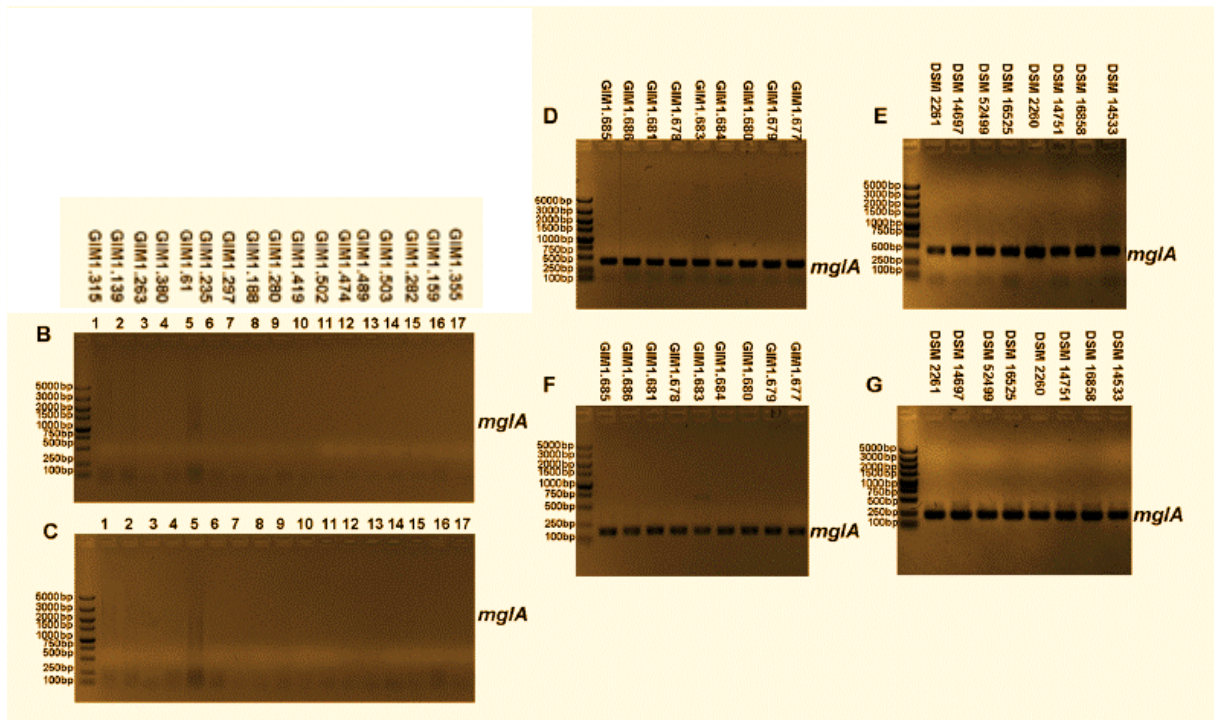
Les amorces ont été testées sur l'ADN extrait des souches bactériennes cultivables listées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Souches utilisées :

Strain	Isolate	Taxonomy	Source <sup>a</sup>
<b>Myxobacteria</b>			
<i>Myxococcus xanthus</i>	GIM1.685	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales	GMI china
<i>Myxococcus fulvus</i>	GIM1.686	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales	GMI china
<i>Myxococcus virescens</i>	GIM1.681	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales	GMI china
<i>Pyxidicoccus fallax</i>	GIM1.678	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales	GMI china
<i>Myxococcus stipitatus</i>	GIM1.683	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales	GMI china
<i>Coralloccoccus exiguus</i>	GIM1.684	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales	GMI china
<i>Cystobacter violaceus</i>	GIM1.680	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales	GMI china
<i>Cystobacter minus</i>	GIM1.679	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales	GMI china
<i>Archangium sp.</i>	GIM1.677	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales	GMI china
<i>Archangium gephyra</i>	DSM 2261	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales	DSMZ Germany
<i>Coralloccoccus macrosporus</i>	DSM 14697	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales	DSMZ Germany
<i>Coralloccoccus coralloides</i>	DSM 52499	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales	DSMZ Germany
<i>Myxococcus fulvus</i>	DSM 16525	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales	DSMZ Germany
<i>Myxococcus virescens</i>	DSM 2260	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales	DSMZ Germany
<i>Cystobacter minus</i>	DSM 14751	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales	DSMZ Germany
<i>Stigmatella erecta</i>	DSM 16858	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales	DSMZ Germany
<i>Byssovorax cruenta</i>	DSM 14533	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales	DSMZ Germany
<b>Other bacteria</b>			
<i>Chryseobacterium soli</i>	GIM1.315	Bacteroidetes; Flavobacteriia; Flavobacteriales;	GMI china
<i>Burkholderia cepacia</i>	GIM1.139	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales;	GMI china
<i>Pediococcus acidilactici</i>	GIM1.263	Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales	GMI china
<i>Lactobacillus plantarum</i>	GIM1.380	Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales	GMI china
<i>Alcaligenes faecalis</i>	GIM1.61	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales	GMI china
<i>Salmonella paratyphi-A</i>	GIM1.235	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;	GMI china
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	GIM1.297	Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;	GMI china
<i>Cellulomonas uda</i>	GIM1.188	Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;	GMI china
<i>Microbacterium imperiale</i>	GIM1.280	Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;	GMI china
<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	GIM1.419	Firmicutes; Bacilli; Bacillales;	GMI china
<i>Sphingobium amiense</i>	GIM1.502	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales;	GMI china
<i>Dokdonellafugitiva</i>	GIM1.474	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales;	GMI china
<i>Georgenia muralis</i>	GIM1.489	Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;	GMI china
<i>Sphingomonas fennica</i>	GIM1.503	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales;	GMI china
<i>Bacillus megaterium</i>	GIM1.282	Firmicutes; Bacilli; Bacillales;	GMI china
<i>Lactobacillus casei</i>	GIM1.159	Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales;	GMI china
<i>Escherichia coli</i>	GIM1.355	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;	GMI china

Les résultats des amplifications sont présentés dans la figure 1 :

Figure 1 : B,D,E) PCR amplification avec les amorces *mglA1f/mglA1r*. C, F,G) PCR amplification avec les amorces *mglA2f/mglA1r*.



**Question 3 :** (1 pt) Analysez les gels B et C, que concluez-vous ?

**Question 4 :** (1 pt) Analysez les gels D, E, F, G, que concluez-vous ?

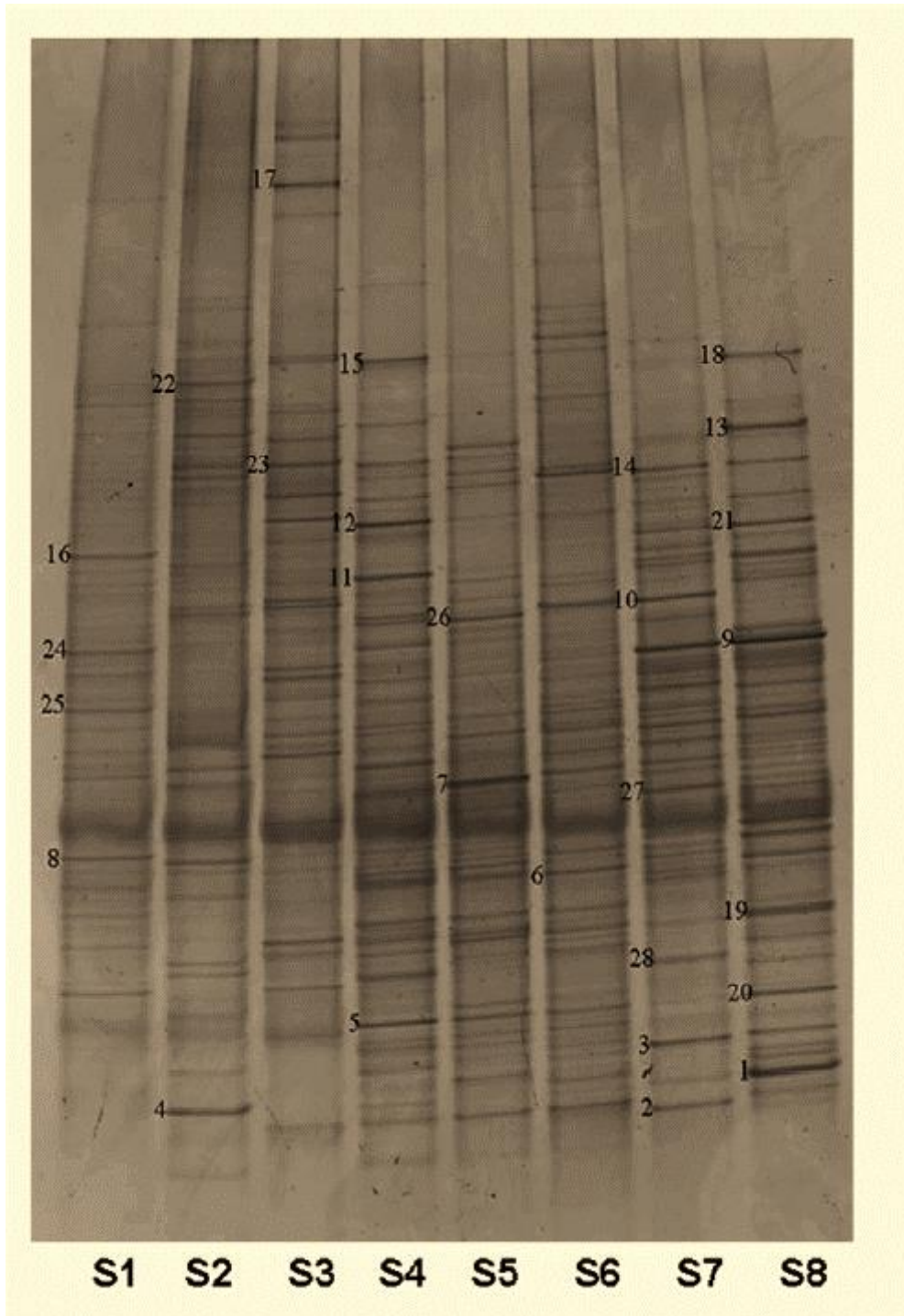
**Question 5 :** (0.5 pts) Expliquez la structure de l'amorce *mgIA2f*.

Le protocole suivant a ensuite été réalisé. 8 échantillons de sols forestiers provenant de différents pays ont été récoltés (S1 à S8). L'ADN total a été extrait et amplifié en utilisant une semi-nested PCR. PCR1 avec les amorces *mgIA1f/mgIA1r* suivie de la PCR2 avec les amorces *mgIA2f/mgIA1r*.



Les amplifications ont ensuite été purifiées et mises à migrer sur un gel DGGE (figure 2) et certaines bandes ont été numérotées, extraites du gel, clonées et séquencées. Les résultats des séquençages sont décrits dans le tableau 3.

*Figure 2* : Résultats de la PCR-DGGE sur 8 échantillons de sols forestiers :



**Tableau 3** : Homologies des séquences provenant des bandes extraites du gel DGGE.

Closest match	Band no. <sup>a</sup> (Similarity)
<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	B15 (85%), B24 (90%)
<i>Anaeromyxobacter</i> sp.	B2 (75%)
<i>Anaeromyxobacter</i> sp. K	B28 (81%)
<i>Corallocccus coralloides</i>	B3 (90%), B6 (77%), B8 (88%), B10 (83%), B11 (81%), B17 (94%), B19 (85%), B26 (84%),
<i>Deinococcus maricopensis</i>	B1 (90%), B4 (91%), B27 (91%)
<i>Myxococcus fulvus</i>	B9 (97%), B14 (97%), B20 (97%), B21 (97%)
<i>Myxococcus xanthus</i>	B12 (99%), B16 (83%)
<i>Polyangium cellulorum</i>	B22 (90%)
<i>Stigmatella aurantiaca</i>	B5 (80%), B7 (87%), B13 (80%), B18 (84%), B23 (84%), B25 (96%)

**Question 6 :** (1 pt) Rappelez le principe de la DGGE, pourquoi cette technique permet-elle de visualiser la biodiversité des myxobactéries du sol ?

**Question 7 :** (1 pt) Est-ce qu'un des sols testés est 100% identique (en terme de diversité des myxobactéries) à un des autres sols testés ?

**Question 8 :** (2 pt) Interprétez les résultats des séquençages, notamment pour B1, B4 et B27.

**NOM, Prénom :** \_\_\_\_\_

Sujet de Laure BARTHES/Écologie microbienne du sol (4 points), mettre la réponse dans le cadre

1) Qu'est-ce que la rhizosphère (définition et caractéristiques) ? /1

2) Traiter au choix une de ces deux questions (a ou b). /3

Question a : Qu'est-ce que le « priming effect » ? Quelle conséquence a ce processus sur la teneur en carbone dans les sols ?

Question b : Expliquer quelles sont les conséquences de l'ajout de matière organique dans le sol avec un C/N très élevé (par exemple de la paille avec un C/N de 80) sur la teneur en azote minéral disponible pour les plantes ?

**NOM, Prénom :** \_\_\_\_\_

Sujet de Ludwig Jardillier/Écologie microbienne des milieux aquatiques (4 points), mettre la réponse dans le cadre

Q1. Quelle est la définition de l'écologie? (1,5 points)

Q2. Qu'est-ce que la mixotrophie? Qu'apporterait-t-elle aux communautés microbiennes? (2,5 points)