

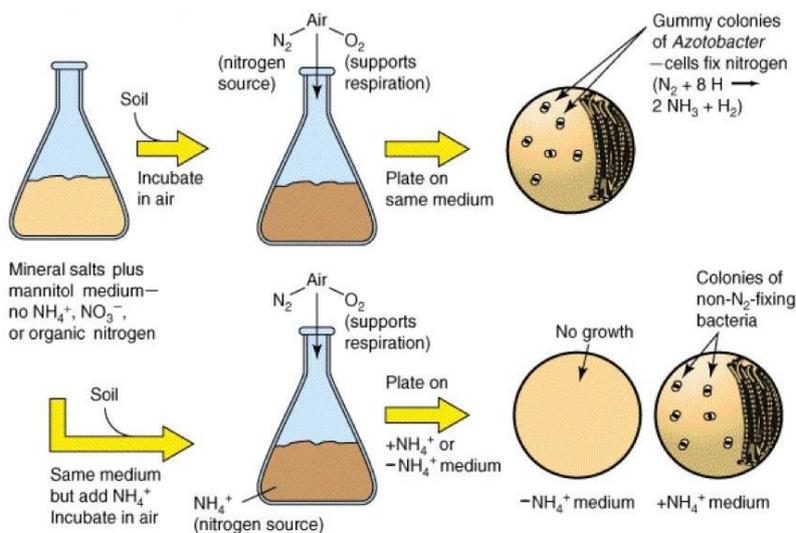
M1 Biologie-Santé, UE Evolution et Biodiversité des Microorganismes

Epreuve sans documents. Durée de l'épreuve : 2h. Le barème de l'examen est sur 34 points qui seront rapportés sur 20 points pour obtenir la note finale.

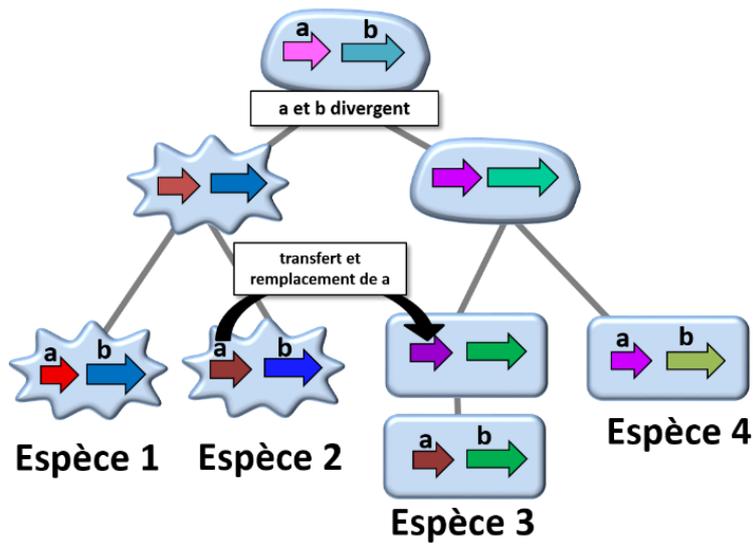
NOM, Prénom : _____

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

Q1. Martinus Beijerinck (1851-1931), microbiologiste hollandais, est l'un des pionniers dans l'exploration de la diversité microbienne grâce à la mise en place et l'utilisation des cultures d'enrichissements. Le schéma ci-dessous illustre deux expériences d'enrichissements de bactéries du sol dont seulement une permet d'isoler *Azotobacter chroococcum*, une bactérie fixatrice d'azote atmosphérique. Expliquez, en vous appuyant sur la figure, le principe de cette expérience et expliquez pourquoi la deuxième expérience ne permet pas d'isoler *Azotobacter chroococcum*. (2 points).



Q2. L'image ci-dessous illustre l'histoire évolutive de quatre espèces depuis leur ancêtre commun. Chacune de ces espèces code une copie du gène a et une copie du gène b.



a) Encerclez le(s) bonne(s) réponse(s) : les gènes **a** des espèces 1 et 4 sont des - paralogues – homologues – orthologues ? **(1 point)**

b) Vous souhaitez étudier l'histoire évolutive de gènes **a** et **b**. A partir d'un alignement de séquences vous obtenez un arbre phylogénétique pour chacun de ces deux gènes. Dessinez l'arbre phylogénétique obtenu pour le gène **a** puis pour le gène **b**. **(1 point)**

d) Quel phénomène naturel explique la topologie de l'arbre obtenu pour le gène **a**? **(0.5 points)**

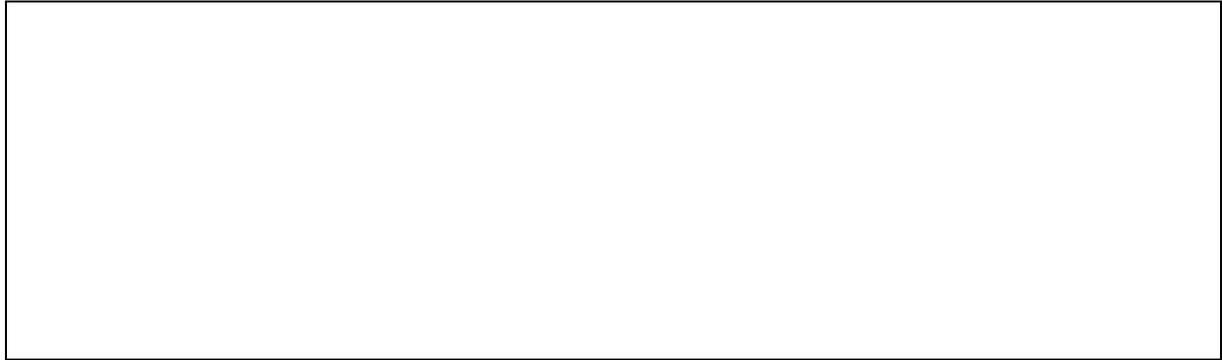
Q3. On considère ici quatre espèces A, B, C et D et on étudie la distribution de six caractères chez ces espèces. Chaque caractère se présente sous deux états : soit il est primitif (en blanc, plésiomorphe) soit il est dérivé (en noir, apomorphe). Dessinez un cladogramme qui rend compte de la phylogénie de

ces espèces et enracinez-le. Identifiez sur ce cladogramme les séquences ancestrales (les nœuds) et encerclez celui qui correspond à la séquence ancestrale la plus ancienne. (2 points)

	A	B	C	D	
1	■	□	□	□	■ apomorphe
2	■	■	□	□	□ plésiomorphe
3	□	■	□	□	
4	■	■	■	□	
5	□	□	■	□	
6	□	□	□	■	

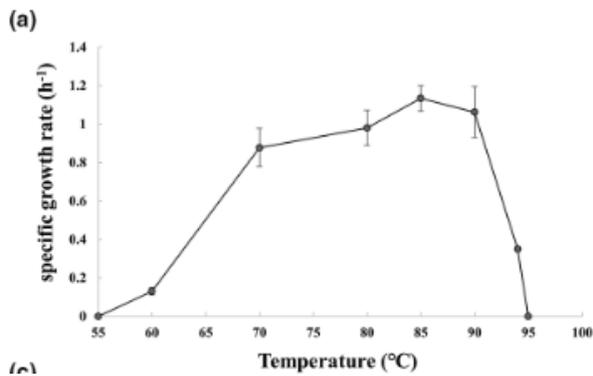
Q4. Expliquez ce que c'est l'hypothèse de l'horloge moléculaire proposée par Linus Pauling et Emil Zuckerkandl en 1969? (1 point)

Q5. Nous avons vu en cours une phylogénie des Eukaryotes selon laquelle les organismes unicellulaires formant un groupe nommé Discoba se placent à la base de tous les autres Eukaryotes (Plantes, Champignons, Animaux etc.). De manière générale les organismes dits « basals » (comme les Discoba) sont importants de point de vue évolutif. Expliquez pourquoi. (2 points)

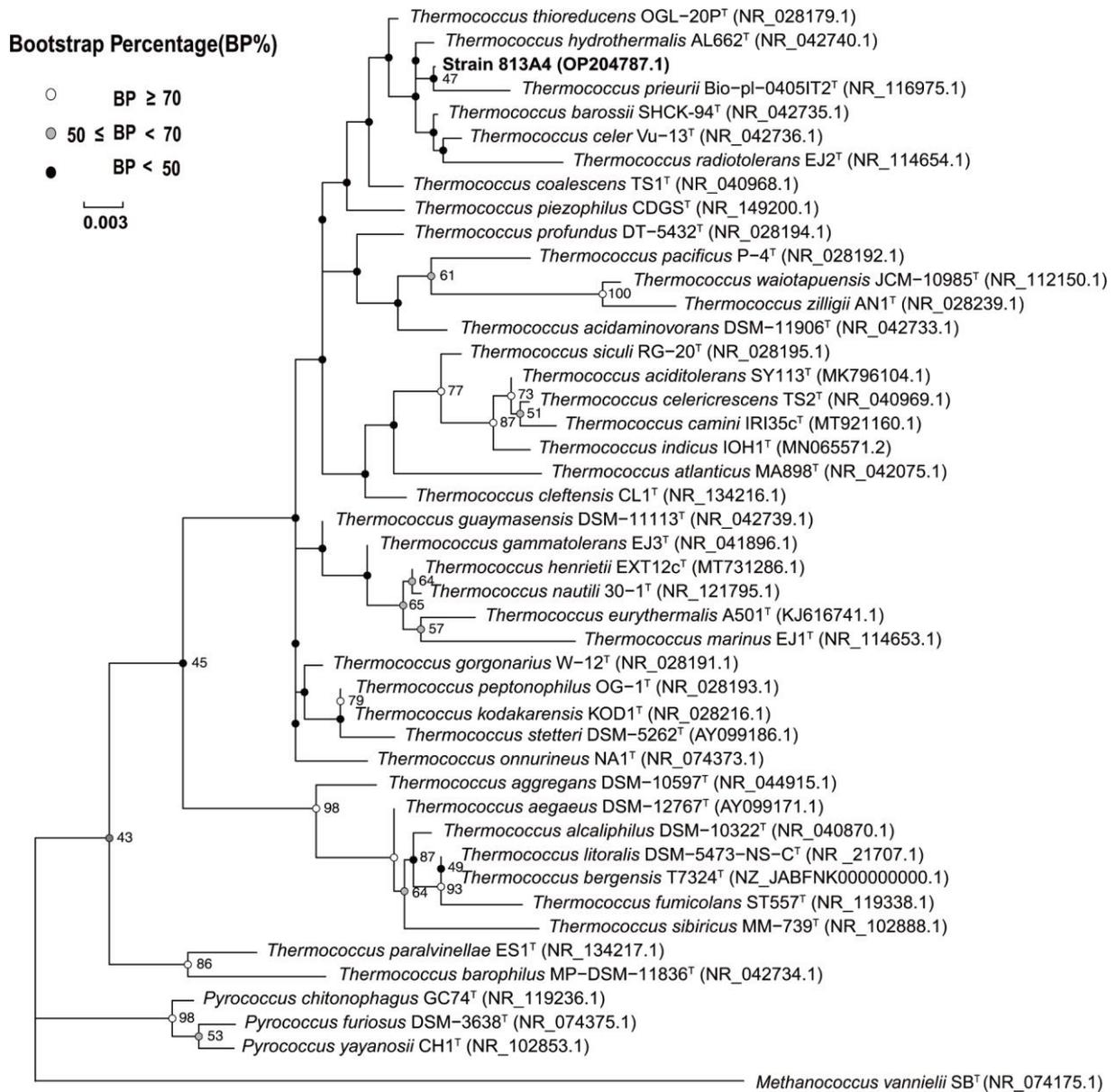


Q6. Une nouvelle archée a été isolée en 2023 à partir d'une cheminée hydrothermale (Yang et al., Int J Syst Evol Microbiol. 2023, doi: 10.1099/ijsem.0.005934).

a) Les résultats de l'étude de la vitesse de croissance de cette archée en fonction de la température sont présentés sur le graphique ci-dessous. Décrivez ces résultats. Ces données sont-elles plausibles au regard du lieu d'isolement de l'archée ? Justifiez. (2 points)



b) Le génome de la souche isolée, 813A4, a été séquencé et le gène codant l'ARN 16S a été utilisé comme marqueur pour inférer l'arbre phylogénétique ci-dessous. Citez 3 caractéristiques de ce gène qui justifient son utilisation en tant que marqueur génétique permettant d'établir la phylogénie des organismes. (1.5 points)



c) Selon l'arbre ci-dessous, à quel genre appartient la souche 813A4 ? Justifiez. (1 point)

d) L'arbre ci-dessous est enraciné. Quel organisme (ou plutôt la séquence de son gène 16S) a été utilisé comme groupe externe ? Justifiez. **(1 point)**

e) Que pouvez-vous dire globalement sur la robustesse de cet arbre phylogénétique ? Justifiez votre réponse. **(2 points)**

NOM, Prénom : _____

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

Les cyanobactéries sont des organismes prometteurs pour la production de biofuels. C'est pourquoi des PhotoBioRéacteurs (PBR) sont à l'étude en utilisant la cyanobactérie *Synechocystis* pour produire du biodiesel. Les cultures pures de *Synechocystis* sont difficiles à obtenir et dans le cadre de PBR à grande échelle, stériliser les milieux de culture n'est pas rentable économiquement. Des bactéries hétérotrophes sont souvent associées aux cyanobactéries car elles sont capables d'oxyder des molécules organiques (lipides, protéines, sucres) produites par les cyanobactéries.

Q1) Certaines cyanobactéries telle que *Anabaena* sont capables de former des hétérocystes. Décrivez en 10 lignes maximum, pourquoi cette différenciation permet du partage de travail et comment est régulée la localisation des hétérocystes au sein des filaments ? **(4 points)**

Une étude visant à suivre l'évolution des communautés bactériennes dans des PBR a été menée. Pour cela la technique t-RFLP et le séquençage haut-débit des gènes codant les ARNr 16S ont été entrepris en parallèle.

Après extraction de l'ADN total, le protocole de t-RFLP suivant a été utilisé :

- 1) Amplification des gènes ARNr 16S avec les amorces 8F (5'-HEX-dye-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1392R (5'-ACACACCGCCCGT-3').
- 2) Vérification de la taille (1400 bp) de l'amplicon sur gel agarose 1%, et purification.
- 3) Digestion par l'enzyme *HhaI* (choisie car elle ne coupe pas le gène ADNr 16S des cyanobactéries)
- 4) Analyse de la taille des T-RFs et de leurs proportions (% de fluorescence totale standardisée) sur séquenceur automatique ABI DNA Analyser. Les fragments fluorescents de plus de 800 bp et de moins de 50 bp ont été exclus de l'analyse.

Après extraction de l'ADN total, le protocole de séquençage haut débit suivant a été utilisé :

- 1) Amplification de la région variable V4 des gènes codant les ARNr 16S bactériens avec les amorces 515F et 806R.

- 2) Purification avec le kit QiaQuick PCR cleanup.
- 3) Séquençage par Illumina MiSeq.
- 4) Analyse des séquences et attribution des OTUs (operatives taxonomic units) par comparaison avec la banque de données Greengenes (banque qui ne répertorie que les ADNr16S)

Q2) Que signifie t-RFLP ? (0.5 point)

Q3) Donnez le principe de cette technique, a quoi sert le Hex-dye en 5' de l'amorce 8F ? (1 point)

Q4) Quelles sont les bactéries qui seront détectées dans les PBRs avec ce protocole de t-RFLP ? (0.5 point)

4 PBRs (A, A2, B et C) ont été étudiés. PBR-A et PBR-A2 ont été ensemencés avec le même inoculum.

Les ADN totaux au moment de l'inoculation, et après 3 jours et 7 jours de culture ont été extrait et traités par le protocole t-RFLP (Table 2) et le protocole séquençage haut-débit (figure 3).

Le tableau 2 ci-dessous résume la taille (colonne t-RF size) des fragments de restriction ainsi que leurs proportions relatives en terme de fluorescence (colonne % total area). (ND = Not Detected).

La figure 3 ci-dessous expose les résultats obtenus avec le séquençage.

Table 2

T-RFs detected in each PBR using the *HhaI* restriction enzyme. PBR-A and PBR-A2 had nearly identical T-RF patterns while PBR-B and PBR-C had unique T-RF patterns.

	Day 0		Day 3		Day 7	
	T-RF size (bp)	% total area	T-RF size (bp)	% total area	T-RF size (bp)	% total area
PBR-A	ND	ND	242, 582	81.6, 5.9	242, 582	87, 11.6
PBR-A2	ND	ND	242, 582	79.3, 11.9	242, 582	68.7, 12.1
PBR-B	204, 570	56, 38.5	135, 204	31.9, 17.8	135, 240	28.2, 71.8
PBR-C	212, 365, 372	65.8, 19.1, 6.6	212, 342, 372	75.1, 5.5, 9.4	212, 342, 372	74.8, 8, 9.1

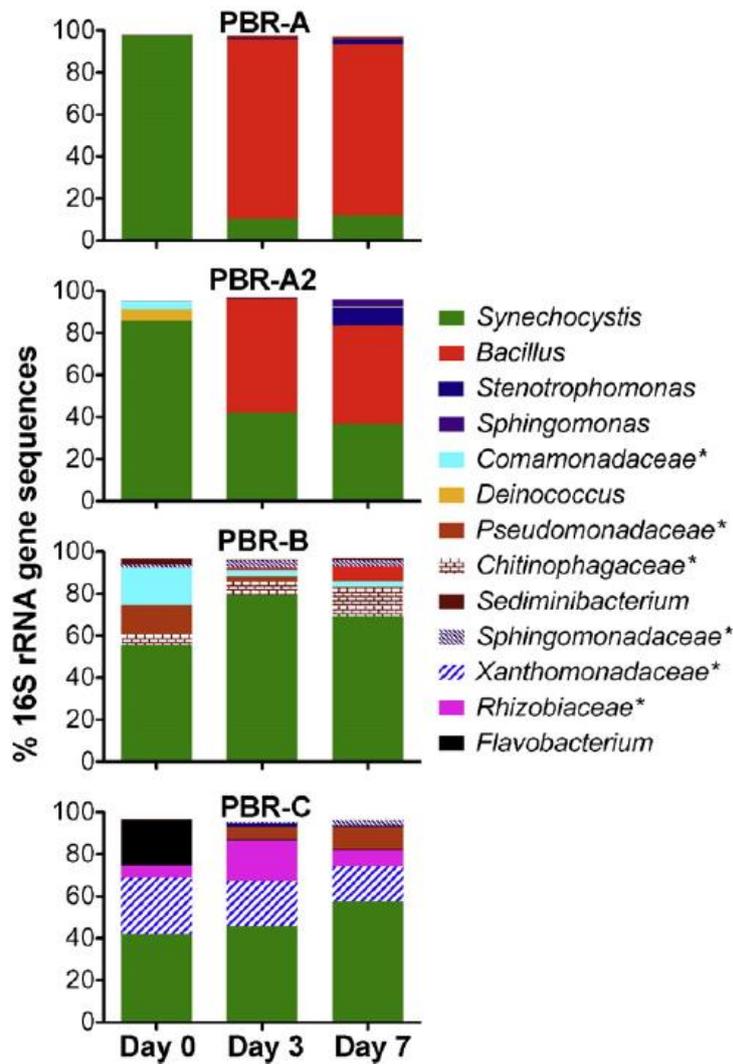


Fig. 3. Bacteria detected in the four PBR experiments through high-throughput sequencing. All taxa are classified at the genus-level unless otherwise indicated. *OTU classified at family-level.

Q5) Analysez le résultat du PBR-A. Pourquoi rien (ND) n'a été détecté au jour 0 en t-RFLP ? A quel fragment de restriction correspond au jour 3 et 7 les *Bacillus* et les *Stenotrophomonas* ? (1 point)

Q6) Analysez le résultat du PBR-A2. Pourquoi rien (ND) n'a été détecté au jour 0 en t-RFLP ? Comparez les profils de PBR-A et PBR-A2, qu'en déduisez-vous ? **(1 point)**

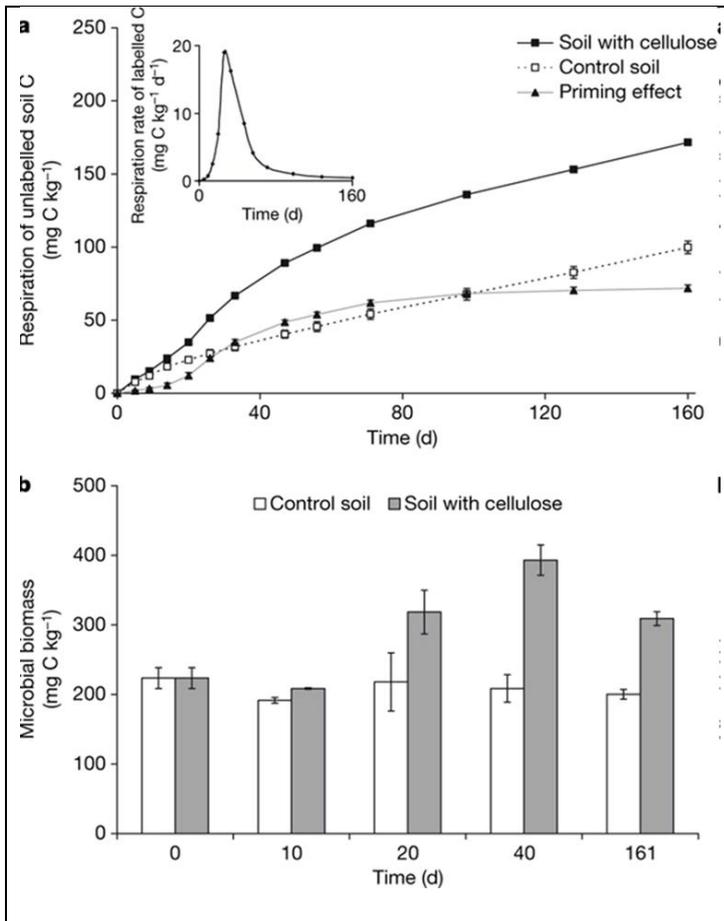
Q7) Analysez le résultat du PBR-B. Mettez en relation les t-RF obtenus avec les OTUs. **(1 point)**

Q8) Analysez le résultat du PBR-C Mettez en relation les t-RF obtenus avec les OTUs. **(1 point)**

NOM, Prénom : _____

Sujet de **Laure BARTHES**/Ecologie microbienne du sol (**3 points**), mettre la réponse dans le cadre

Du sol a été incubé avec de la cellulose marquée au ^{13}C (labelled C). Les chercheurs ont alors suivi le dégagement du CO_2 du sol et sa composition isotopique pour quantifier le dégagement de CO_2 non marqué (unlabelled C) et marqué (labelled C). Ils ont également quantifié la quantité de C contenu dans la biomasse microbienne. Les résultats sont présentés ci-dessous.



Q1 : Quel processus est responsable du dégagement de CO_2 par le sol ? /0.5

Q2 : Quelle est l'origine du CO_2 non marqué ? /0.5

Q3 : Quelle conséquence a l'addition de cellulose dans le sol sur la quantité totale de carbone dans le sol ? /1

Q4 : Comment mesure t'on la quantité de C contenu dans la biomasse microbienne ? Donner le principe de la mesure. /1

NOM, Prénom : _____

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

Q1. Qu'est-ce que la mixotrophie et en quoi est-elle importante dans le fonctionnement des écosystèmes ? (**2 points**)

Q2. Comment déterminer au mieux la diversité microbienne dans un écosystème ? Justifiez. (**2 points**)