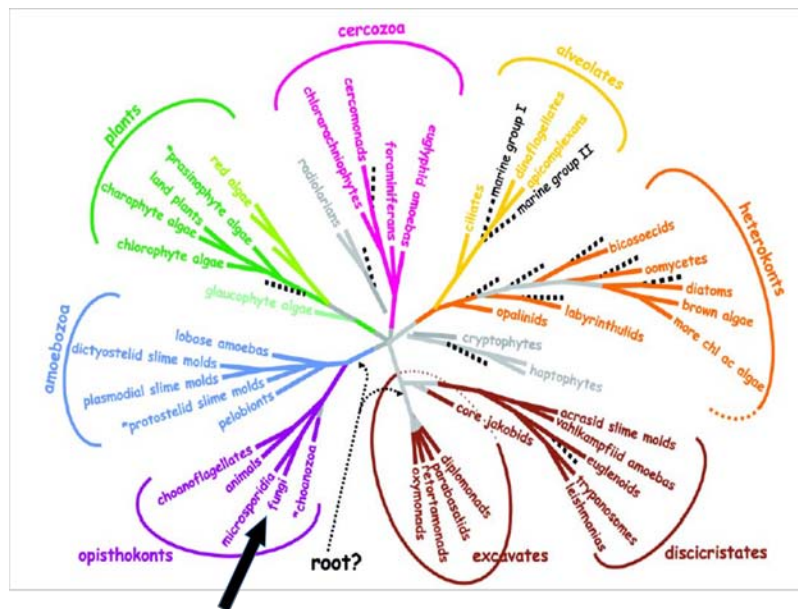


## TP Evolution Moléculaire : Histoire Evolutive d'une protéine d'oomycète

Les oomycètes sont des microorganismes eucaryotes filamenteux, occasionnant d'importants dégâts sur les plantes de grande culture comme le soja ou la pomme de terre. Les analyses de phylogénie moléculaire ont permis de positionner les oomycètes dans l'ordre des Heterokonts, avec pour plus proches voisins les diatomées (*Thalassosira pseudonana*) et les algues brunes (*Ectocarpus siliculosus*). Ainsi malgré leur ressemblance morphologique, les oomycètes sont phylogénétiquement distincts des Fungi (Champignons) qui appartiennent à l'ordre des Opisthokonts. Une classification simplifiée des eucaryotes est présentée ci-dessous. De par leur position distincte par rapport aux champignons, les moyens de lutte phytosanitaire développés contre les champignons, restent peu efficaces envers les oomycètes. Ainsi les chercheurs tentent de mieux caractériser les acteurs moléculaires impliqués dans la virulence de ces microorganismes afin de développer des moyens de lutte plus efficace.



L'équipe du Dr Jones, à partir d'un milieu de culture de l'oomycète *Phytophthora sojae*, parasite du soja, a purifié la protéine Physo\_12. L'équipe souhaite maintenant définir la fonction de cette protéine et son histoire évolutive, afin d'établir si Physo\_12 pourrait être un facteur de virulence du microorganisme, c'est-à-dire une protéine qui faciliterait l'infection/colonisation de l'hôte végétal.

L'ensemble des exercices a pour but de répondre à ces deux objectifs.  
Il est basé sur des travaux publiés par Richards et al., 2011, PNAS

## Exo 1

>Physo\_12

```
MKVLFATALTAAAVAVASAAEFCDQWGQAKSGNYIIYNNLWGSSAANPGGKQCTALDSGSGDSVAWHTTW
SWQGGDKSVKSFANAALFDPVPLSEVKSIPSTMAYTVKSKGKAVTDVAYDLFTSSTAKGEKEFEIMIWL
AALGGAGAISSSTGKPIASTTTIAGTEWSVYKGPNGSMMVYSFVASKQVENFEGDLLEFFNYLVKEQGFKTS
QFLIKVECGTEPFVGTDTVMTVSKYSAAVNTSGGSSTPTQSGESSSTEQT'TTAPAASNTGSSAEQTTPA
PAESNTGSSAEQTTPAPAGSDAGSSEEQTPSTPSTGSSTEQT'TDAPAASNTGSSEETPSTGSSEETPSTG
SSEETPATSDAGSSEETPATSSSTGSSEETPVESSTGSSEQNPGQEPSTPT'TSSSSEETPSTETNPKCVL
RRVRRRE
```

A partir de la séquence en acide aminé de Physo\_12, établissez quelle peut-être la fonction putative de cette protéine. Pour cela, suivez la procédure décrite ci-dessous :

. InterProScan, banque de domaines (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) : identifiez si la protéine Physo\_12, présente des domaines répertoriés dans la banque de domaine HMMPfam. Relevez la position des différents domaines.

. Que signifie IPR002594 et PF01670

. Obtenez de l'information sur les domaines identifiés via InterProScan

. SignalP3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) : définissez si Physo\_12, purifiée à partir du milieu de culture de *Phytophthora sojae*, est prédite comme une protéine sécrétée.

.NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) : Physo\_12 est-elle déjà répertoriée dans les banques de données. Si oui, quelle est son numéro d'accèsion et son 'surnom' dans GenBank ?

. Quelles informations supplémentaires, obtenez vous sur la fiche GenPept de Physo\_12 ? Enregistrez au format fasta, le transcrit de Physo\_12.

. Conclure

## Exo 2

On souhaite maintenant déterminer l'histoire évolutive de Physo\_12. Pour cela, un arbre phylogénétique incluant Physo\_12 doit être réalisé. Il faut donc définir s'il existe des homologues à la protéine Physo\_12, collecter les séquences correspondantes et réaliser l'arbre correspondant.

- Etablissez s'il existe des homologues à Physo\_12, répertoriés dans les banques de données (NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Extraire les séquences d'oomycètes au format fasta
- A quel groupe du vivant appartiennent les homologues les plus proches ?
- Rechercher des homologues de Physo\_12 dans les banques de données fongiques (génomés complets), sur des serveurs dédiés:

- BROAD institute (Fungal Genome Initiative : <http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/projects/fungal-genome-initiative/fungal-genome-initiative>)
- JGI (<http://www.jgi.doe.gov/software/>)
- Recherchez des homologues chez les bactéries (NCBI <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> → Microbes).
  - Sélectionner le génome de *Bacillus licheniformis* (Firmicute, Bacillales) et *Streptomyces avermitilis* (Bacteria, Actinobacteria)
  - Extraire les séquences de bactéries au format fasta.
- Rassembler toutes les séquences extraites (bactéries, oomycètes, champignons) dans un seul fichier, au format fasta. Pensez à renommer les séquences (ex: « >gi|301111712....putative [Phytophthora infestans T30-4] » devient « Phyin »)
- Procédez à l'alignement des séquences protéiques en utilisant le logiciel Clustal X. Faites un arbre phylogénétique et effectuez un 1000 bootstrap. Qu'observez-vous ?
- Faites la même chose avec les séquences protéiques d'ATP synthase. Sauvegardez les arbres (format « .ps »)
- Comparez les deux arbres phylogénétiques. Pourquoi comparer les arbres ? Qu'en concluez-vous ?

#####  
 Liste des espèces

## Opisthokonts

### champignons

*Botrytis cinerea*  
*Magnaporthe grisea*  
*Aspergillus nidulans*  
*Chaetomium globosum*  
*Verticillium dahliae*  
*Fusarium oxysporum*  
*Stagonospora nodorum*  
*Pyrenophora tritici-repentis*  
*Sclerotinia sclerotiorum*  
*Fusarium verticillioides*  
*Cryphonectria parasitica*  
*Fusarium graminearum*  
*Podospora anserine*  
*Trichoderma virens*  
*Nectria haematococca*  
*Phanerochaete chrysosporium*  
*Aspergillus fumigatus*

*Aspergillus clavatus*  
*Aspergillus flavus*  
*Trichoderma reesei*  
*Magnaporthe oryzae*  
*Aspergillus terreus*

## **Heterokonts**

### **Oomycètes**

*Phytophthora infestans*  
*Phytophthora sojae*  
*Phytophthora ramorum*

### **Diatomées**

*Thalassiosira pseudonana*  
*Phaeodactylum tricornutum*

### **Autres**

*Aureococcus anophagefferens*

## **Procaryotes**

### **Firmicute, Bacillales**

*Bacillus licheniformis*

### **Bacteria, Actinobacteria**

*Streptomyces avermitilis*