

RECONSTITUTION DE SCÉNARIS ÉVOLUTIFS A PARTIR DE LA PHYLOGÉNIE DES ALGUES

Objectifs méthodologiques :

- Réaliser des observations macroscopiques et microscopiques, avec ou sans coloration, afin de mettre en évidence des caractères des algues exploitables dans le cadre d'une analyse phylogénétique
- Exploiter des données biochimiques et des clichés de microscopie électronique d'algues pour discuter

Objectifs cognitifs :

- Identifier et expliquer des convergences évolutives
- Argumenter la théorie endosymbiotique des plastes ainsi que les endosymbioses primaires et secondaires des plastes.
- Exploiter des données afin de discuter l'histoire évolutive d'un groupe, sa place dans l'arbre phylogénétique ou la signification évolutive d'un caractère.

Exemples de sujets proposés à l'épreuve de travaux pratiques sur cette partie du programme:

→ Légender les photos (MET et MEB) de l'algue considérée et dire à quel groupe phylogénétique elle appartient à partir de l'arbre fourni. un arbre donné.

→ Construire une matrice de distance à partir de l'étude de séquences

La biodiversité actuelle est la conséquence d'une histoire évolutive démarrée il y a au moins 3,5 milliards d'années. Reconstituer l'histoire du vivant est complexe et s'appuie à la fois sur des données fossiles et sur des données issues des organismes actuels.

La comparaison de ces données permet la reconstitution d'arbres phylogénétiques qui reconstituent les liens de parenté entre les organismes et permet de reconstituer des scénari évolutifs.

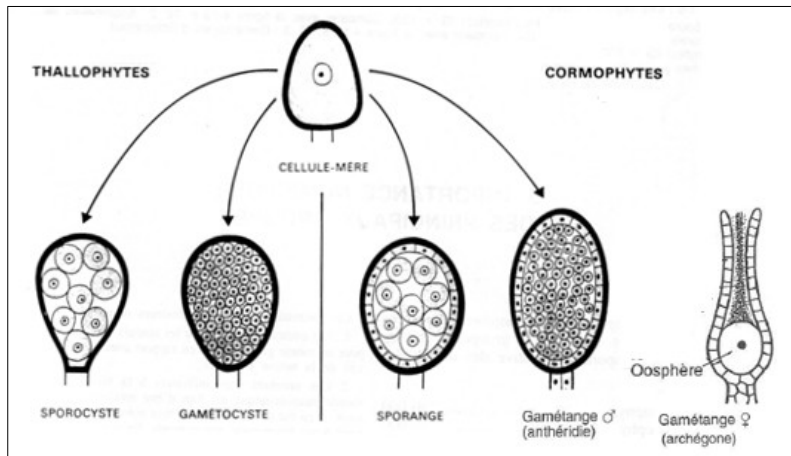
Dans le langage courant le groupe des Algues désigne des organismes vivant dans l'eau ou dans un milieu humide, chorophyllien et qui n'ont ni tige, ni racine, ni feuille, c'est à dire constitués d'un thalle.

Ce groupe « Algues » est donc défini en prenant compte de critères écologiques, trophiques et morphologiques.

Le thalle étant défini comme une structure végétative sans tige, ni feuille, ni racine, constitué de cellules jointives qui ne forment pas de tissus mais des filaments pouvant s'accoler alors en pseudo-tissus comme chez les algues pluricellulaires. Les Algues ont donc été pendant longtemps classées dans un groupe plus large, celui des **Thallophytes** regroupant tous les « végétaux » au sens du terme « non animal » ayant un appareil végétatif simple, non différencié par opposition aux **Cormophytes** qui regroupaient les organismes chlorophylliens ayant un appareil végétatif différencié constitué d'un **cormus** c'est à dire un axe formé de tige et de feuilles avec, souvent des racines.

On regroupait donc parmi les **Thallophytes** : les algues, les champignons et les lichens.

D'un point de vue reproducteur, on opposait également ces 2 groupes :



– Chez les **Thallophytes**, les structures de dissémination sexuées (gamètes) ou non (spores) sont produites à l'intérieur de **gamétocystes** ou de **sporocystes** respectivement. Ces structures sont délimitées par la paroi de la cellule mère ayant subi la méiose (cas des spores) ou non (cas des gamètes).

Document 1 : structure schématique comparée des organes reproducteurs des Thallophytes et des Cormophytes

Chez les **Cormophytes**, les spores sont produites à l'intérieur de **sporangies** et les gamètes à l'intérieur de **gamétanges**. Ces structures possèdent une paroi propre faite de plusieurs couches cellulaires et mises en place au cours des premières divisions de la cellule-mère. La cellule sexuelle femelle, unique est contenue dans un gamétange femelle ou **archégone**. Les Cormophytes sont donc des **Archégoniates**.

Problématique :

Les Algues et plus largement les Thallophytes constituent-ils des groupes monophylétiques et quelle est l'origine de leurs plastides ayant permis l'acquisition de leur type trophique ?

Il s'agit donc ici de reconstituer l'histoire évolutive des Algues au travers de l'étude de deux traits de caractères : l'acquisition des plastides et l'état pluricellulaire sous forme de thalle.

Il faut donc s'appuyer sur l'observation de différentes algues et d'analyser différents caractères permettant de reconstituer une phylogénie et donc un scénario évolutif.

I. Etude macroscopique et microscopiques de quelques Algues appartenant à différents taxons

1. Observation de quelques algues vertes

1.1 organisation de l'appareil végétatif d'une algue verte pluricellulaire, *Ulva lactuca*.

L'ulve laitue ou « laitue de mer » (*Ulva lactuca*) est une algue verte appartenant au clade des Chlorophytes de la Lignée Verte.

Il s'agit d'une algue marine vivant dans la zone de balancement des marées. Sa morphologie aplatie lui donne un aspect foliacé à l'origine de son nom latin et vernaculaire. Cette espèce est très **tolérante** aux excès de sulfates et de nitrates, ce qui lui permet de se développer dans ces milieux, par exemple dans les ports.

La **lame foliacée** présente à sa base un **disque de fixation** permettant à l'algue de se fixer son substrat rocheux.

Document 2 : thalle foliacée d'*Ulva lactuca*

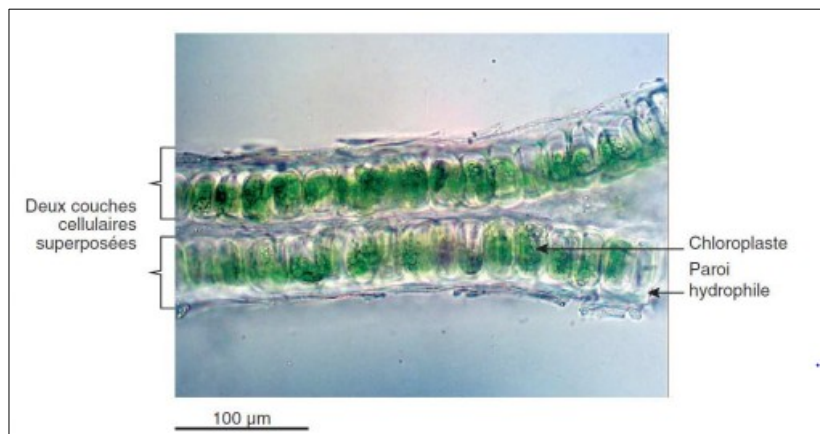


Activité 1 :

- Observer une Ulve dont la lame foliacée a été préalablement déployée
- Réaliser un montage entre lame et lamelle d'un petit fragment de thalle en coupe transversale dans une goutte d'eau et un 2^e montage d'un autre fragment aplati dans une goutte de lugol.
- Observer au microscope et réaliser un dessin légendé.

Le thalle de l'Ulve est ce qu'on appelle un **nématothalle**, c'est à dire qu'il est constitué d'un ensemble de filaments, dans son cas accolés (mais pouvant être ramifié chez d'autres algues) où les cellules (à l'inverse des algues filamenteuses constituées d'un archéthalle pluricellulaire) communiquent par des ponts cytoplasmiques.

L'observation en coupe transversale montre que ce thalle est réduit à deux couches de cellules, toutes semblables. La **matrice extracellulaire** possède des **caractéristiques communes avec celle des Embryophytes** puisqu'elle est composée de **cellulose**. Sa teneur est cependant réduite et cette paroi est également riche en **polysides sulfatés**, molécules particulièrement hydrophile qui donnent un aspect gélifié. Cette organisation de la paroi est à mettre en relation avec la vie intertidale (= dans la zone de balancement des marées) : elle permet de subir les courants et les marées en se déformant sans se déchirer et retenir l'eau à marée basse dans le thalle, ce qui limite la dessiccation.

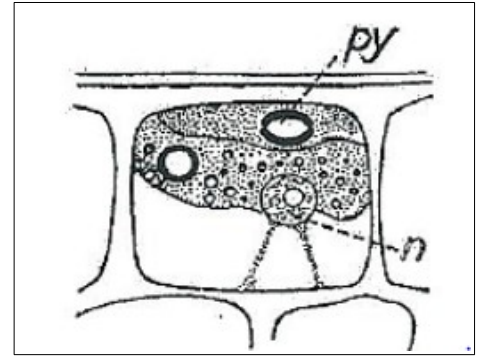


Document 3 : organisation histologique du thalle foliacée d'*Ulva lactuca*

L'observation des cellules montre la présence d'un **unique chloroplaste par cellule**, à l'origine de la couleur verte de l'algue et surtout de son autotrophie au carbone et à l'azote. Les thylakoïdes contenant de la chlorophylle a et b ainsi que des caroténoïdes.

Un ou deux **pyrénoïdes**, points denses se trouvant dans le chloroplaste, renferme la **RubisCO** ainsi que des anhydrases carboniques, ce qui permet de réduire la photorespiration et d'améliorer ainsi le rendement de la photosynthèse. Les pyrénoïdes sont fréquemment entourés de **grains d'amidon** qu'il est alors possible de mettre en évidence par coloration à l'eau iodée.

Le noyau peut être visible mais se retrouve fréquemment masqué dans la préparation par le chloroplaste.



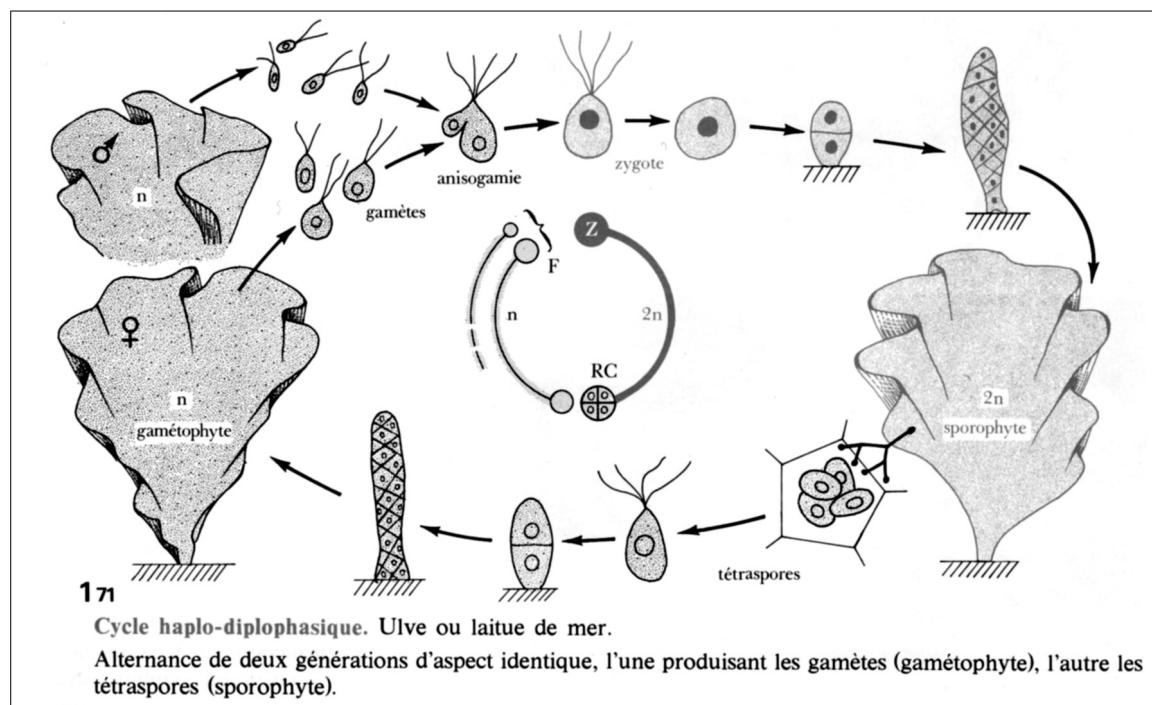
Document 4 : schéma d'interprétation de l'organisation structurale d'une cellule

On n'observe pas de différenciation cellulaire, chaque cellule du thalle peut se diviser d'où la croissance diffuse du thalle en lame.

Il existe une exception à l'absence de différenciation des cellules : les cellules situées sur la marge du thalle sont impliquées dans la reproduction sexuée et forment des gamétophytes ou des sporophytes en fonction de la phase du cycle de développement.

En effet, l'Ulve a un **cycle de développement haplo-diplophasique isomorphe** c'est à dire que le gamétophyte et le sporophyte ne peuvent être distingués que par la nature des produits émis (gamètes ou spores).

Il est à noter que les **cellules reproductrices sont flagellées**, les **gamètes possèdent deux flagelles égaux** alors que les **spores en possèdent 4**. On observe également une **hétérogamie**, les gamètes mâles étant plus petits que les femelles et une **sexualisation des spores** produisant des **gamétophytes mâles** et des **gamétophytes femelles**.



1.2 organisation d'une algue verte unicellulaire, Chlamydomonas → cf TP SVA3.

2. Observation d'algues rouges

Les Algues rouges appartiennent au clade des Rhodophytes de la Lignée Verte.

Elles présentent de **thalles de type cladomiens** ramifiés dérivant des nématothalles.

On distingue les **axes à croissance indéfinie**, les **cladomes**, des **axes à croissance limitée**, les **pleuridies**.

Sur un petit nématothalle, certains filaments prennent une importance particulière, ils s'allongent et augmentent de diamètre, constituant chacun l'axe d'un **cladome primaire**. Sur les côtés de ces axes, se détachent les **pleuridies**, **bouquets de filaments courts** abondamment ramifiés et disposés en verticilles.

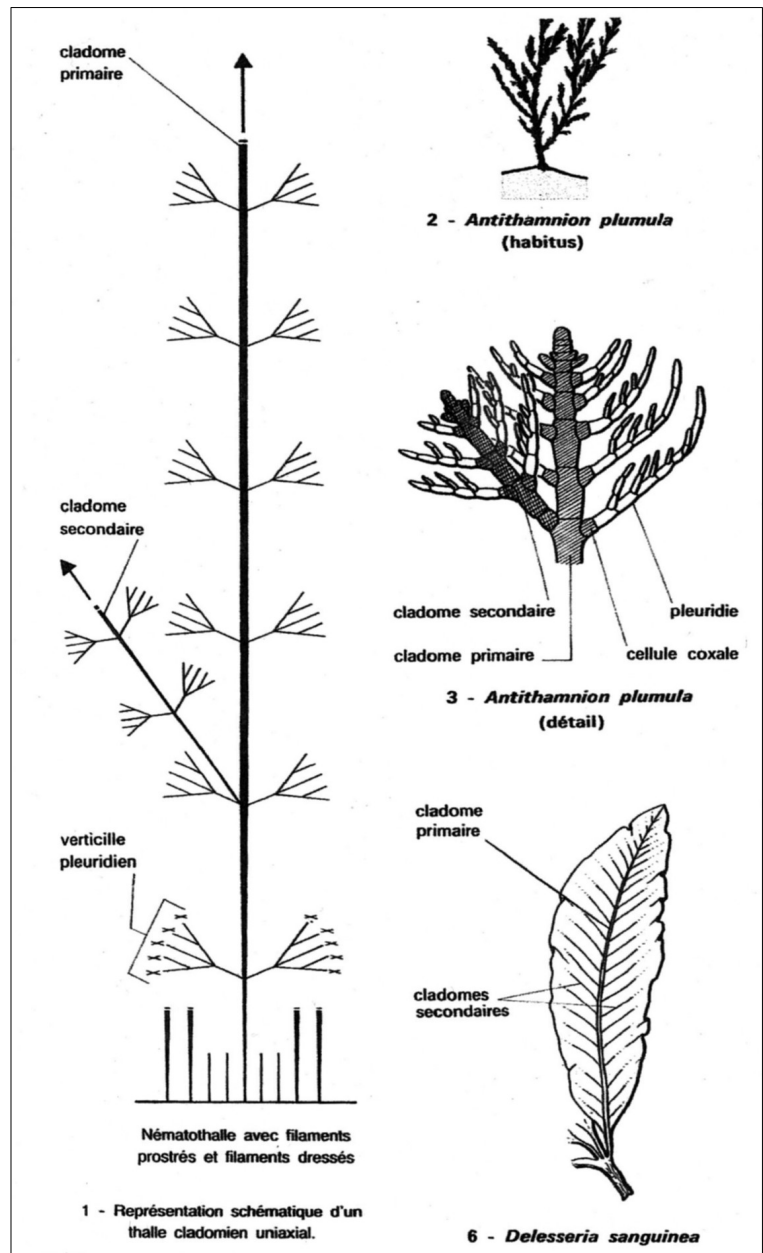
Chaque cladome primaire porte des **cladomes secondaires** de même constitution, remplaçant partiellement les pleuridies ou se formant à leur aisselle.

Il y a ici aussi **télomisation de la croissance**, seule la cellule apicale est responsable de la croissance, celle-ci se divise en une nouvelle cellule apicale et une cellule sous-apicale, qui se divise perpendiculairement pour être à l'origine des pleuridies.

On peut ainsi comparer l'architecture d'un thalle cladomien à celle d'une tige feuillée de Cormophyte :

- comparaison morphologique : le cladome primaire porte des cladomes secondaires situés à l'aisselle de pleuridies comme la tige porte les rameaux secondaires à l'aisselle de feuilles,
- comparaison physiologique : le cladome a une croissance indéfinie comme la tige et les rameaux, tandis que les pleuridies ont une croissance définie comme les feuilles.

Document 6 : les cladothalles de Rhodophytes



Document 7 : observation du thalle de Polysiphonia à l'œil nu et au microscope

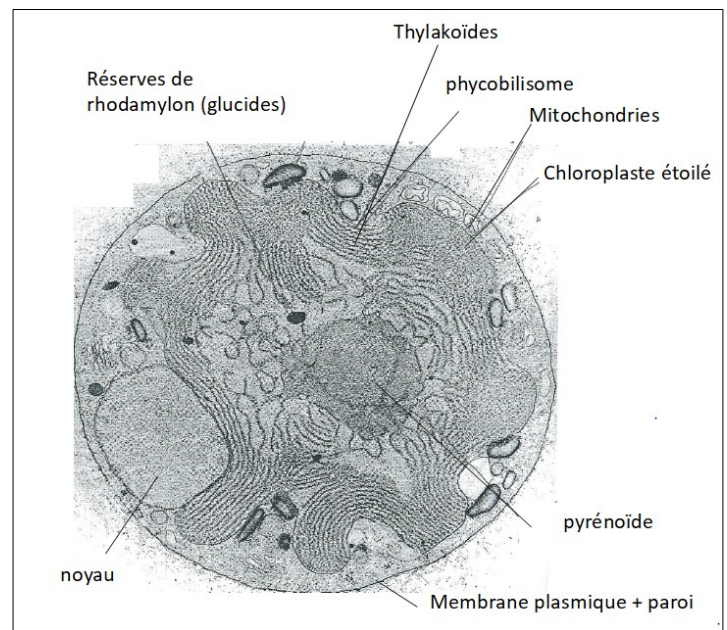
Activité 2 :

- **Légender les photographies du document 6.**
- **Observer une Polysiphonia dont la lame foliacée a été préalablement déployée**
- **Réaliser un montage entre lame et lamelle d'un petit fragment de thalle dans une goutte d'eau et un 2^e montage d'un autre fragment aplati dans une goutte de lugol.**
- **Observer au microscope et réaliser un dessin légendé.**

L'observation microscopique montre que les filaments sont constitués de rangées de cellules autour d'une **matrice extracellulaire formée de parois cellulaires gélifiées et transparentes**. La paroi est **très riche en alginate et en agar**, des polymères osidiques très hydrophiles à l'origine de la souplesse du thalle et de sa résistance à la dessiccation. Ces agars sont très utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme gélifiant.

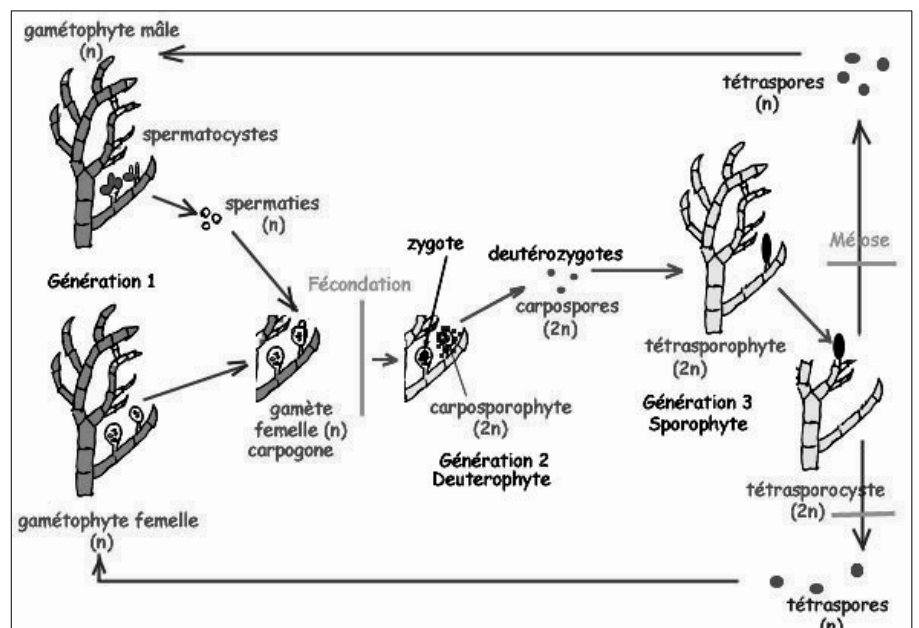
L'observation permet également de mettre en évidence des **chloroplastes avec uniquement de la chlorophylle a**, mais la couleur verte est masquée par un autre pigment, la **phycocérythrine**, du groupe des phycobilines, des pigments retrouvés chez différentes algues et chez les cyanobactéries. Les **réserves** sont stockées dans le cytoplasme sous une forme proche de l'amidon, le **rhodamylon**, colorable également à l'eau iodée.

Document 8 observation au MET d'une cellule de Rhodophyte



Les cycles de développement des Rhodophytes peuvent être di ou trigénétique comme celui d'Antithamnion ! Ces cycles comportent un carposporophyte entre le gamétophyte et le méiosporophyte, parasite du gamétophyte femelle.

Document 9 : cycle de développement d'Antithamnion (à ne PAS connaître mais à comprendre)



3. observation d'algues brunes

3.1 Observation d'une algue brune pluricellulaire, *Fucus vésiculosus*

Fucus vésiculosus appartient au clade des **Phéophytes** et plus largement à celui des **Straménopiles**.

Les algues brunes du genre *Fucus* se récoltent à marée basse et forment une partie du varech, source d'engrais utilisée pour les terrains agricoles près des côtes bretonnes et normandes.

Le thalle est un **cladothalle** plusieurs fois dichotomisé mais sans pleuridies distinctes, en forme de ruban.

Ces rubans possèdent des **renflements ou aérocystes** jouant un rôle dans le port dressé à marée haute.

Document 10 : observation d'un thalle de *Fucus*



Activité 3 :

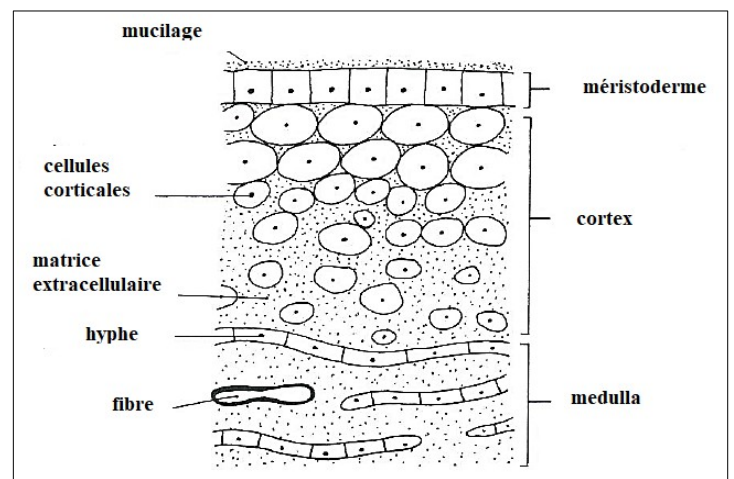
→ Observer un *Fucus* dont le thalle a été préalablement déployé.

→ Réaliser un montage entre lame et lamelle d'un petit fragment de thalle en coupe transversale dans une goutte d'eau et un 2^e montage d'un autre fragment aplati dans une goutte de lugol.

→ Observer au microscope et réaliser un dessin légendé à l'aide du document ci-dessous.

Le thalle présente un début de différenciation et une organisation relativement complexe. Une coupe transversale révèle un **méristoderme** épais et recouvert d'un **mucilage** hydrophile à rôle protecteur, suivi d'un **cortex** formé de cellules contenant de très nombreux chloroplastes. Ces chloroplastes contiennent des **chlorophylles a et c** ainsi que des **fucoxanthines** à l'origine de la couleur brune de l'algue. Les réserves ne sont pas visibles car ce sont ici des **polymères plus courts ou des polyalcools** (ou polyols) **solubles dans les vacuoles**. Ces cellules sont délimitées par des parois très épaisses. La zone médullaire est formée de cellules allongées formant des **hyphes** dans l'axe du thalle.

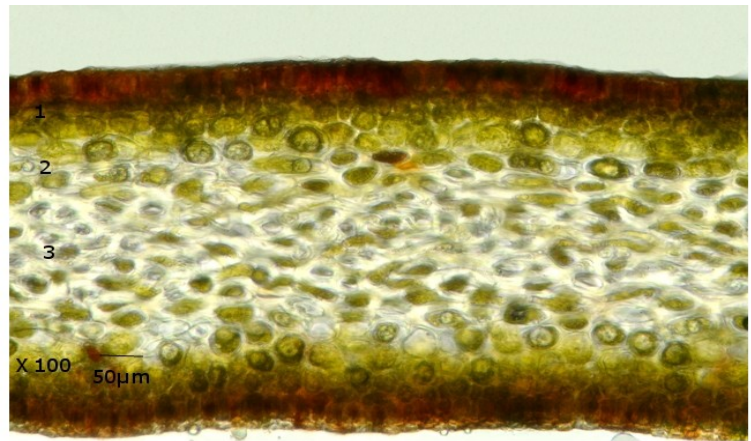
Ces contiennent peu d'organites dont quelques chloroplastes et possèdent des cloisons transversales perforées qui permettent la **conduction des sels minéraux**. Les cellules de la medula baignent dans une matrice extracellulaire gélifiée, l'ensemble formant un **plectenchyme**.



Document 11 : histologie du fucus

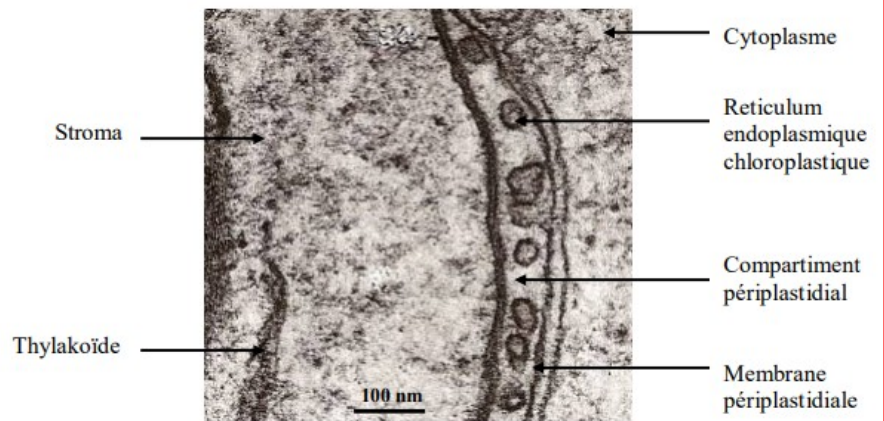
Activité 3 suite :

→ *Légèder cette micrographie à l'inde du document 11*



Document 12 : observation en CT d'un thalle de Fucus

Les chloroplastes des Straménopytes présentent 4 membranes qui témoignent d'une endosymbiose secondaire.



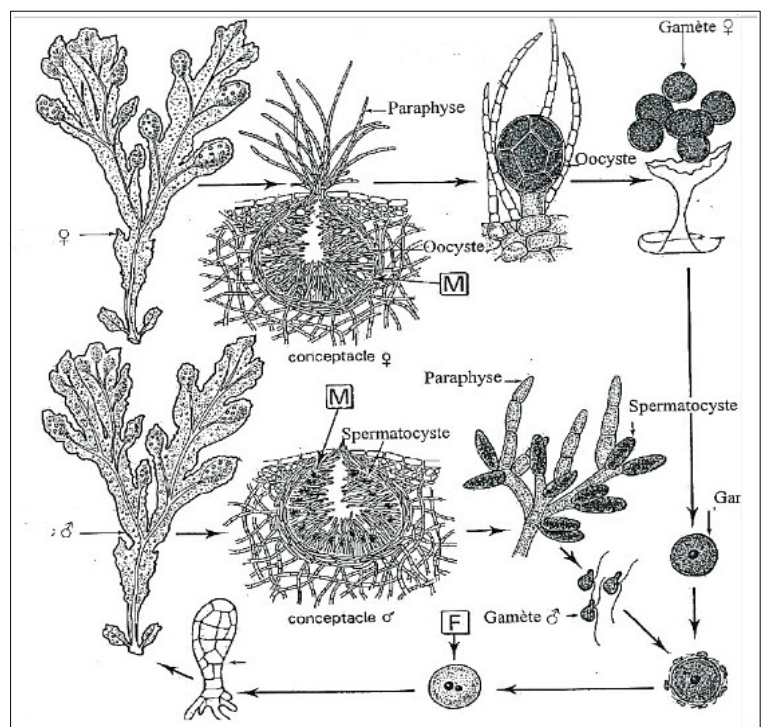
Document 13 : ultrastructure d'une cellule de Cryptophytes possédant des chloroplastes à 4 membranes comparables à ceux des Phéophytes et zoom montrant le détail des membranes plastidiales

Les extrémités du thalle peuvent présenter des **structures reproductrices particulières, les conceptacles**, ouverts sur le milieu extérieur par un ostiole.

Les **conceptacles mâles** contiennent des **filaments légèrement renflés à leur extrémité** qui sont des **gamétocystes mâles** contenant chacun **64 spermatozoïdes**, gamètes flagellés avec 2 flagelles différents, dont l'un est porteur de mastigonèmes.

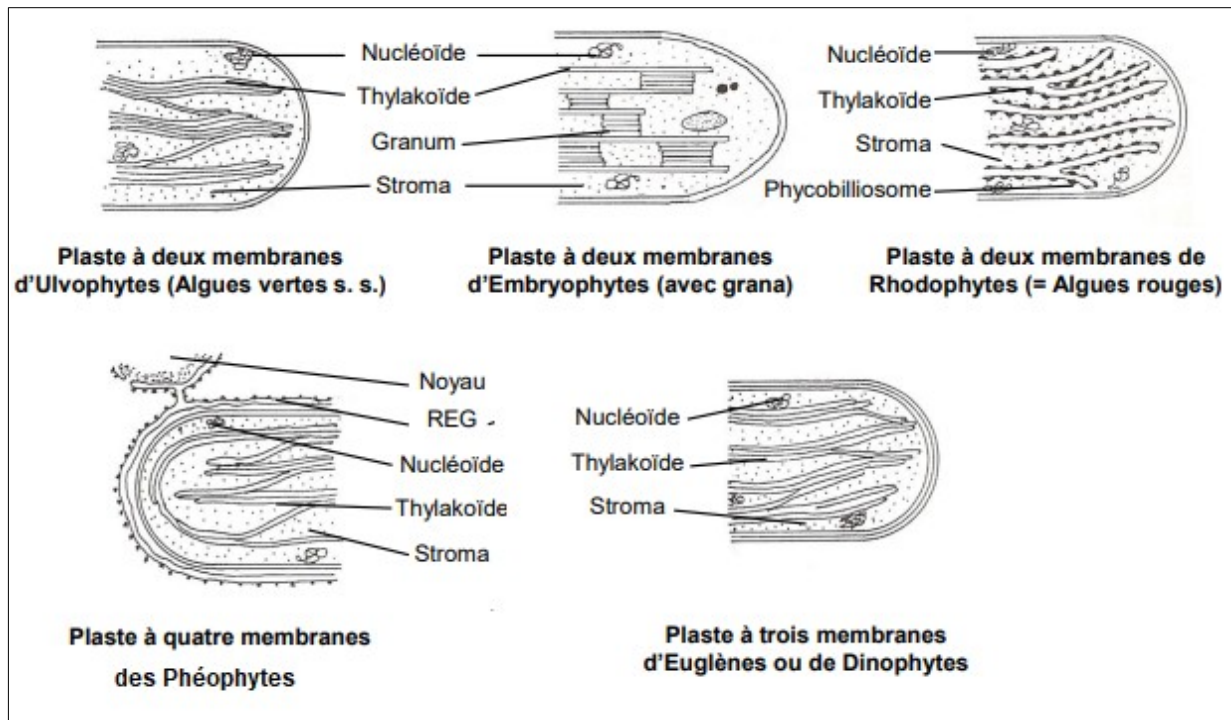
Les **conceptacles femelles** sont des cavités contenant des **filaments stériles non ramifiés ou paraphyses** entre lesquels se trouvent des **gamétocystes femelles** porteurs de 8 oosphères. Le cycle de développement est diplophasique et les gamétophytes mâles et femelles sont indépendants.

Document 14 : cycle de développement du Fucus
(à ne PAS connaître mais à comprendre)



3.2 Observation d'algues brunes unicellulaires, les Diatomées → cf TP SVA3.

4. bilan comparatif des plastides des différentes algues observées



Document 15 : diversité ultrastructurale des plastides des Algues et des embryophytes (pour comparaison)

		Chlorophytes	Rhodophytes	Phéophytes
Chloroplaste	L'enveloppe	2 membranes (endosymbiose primaire)	2 membranes (endosymbiose primaire)	4 membranes (endosymbiose secondaire d'une algue unicellulaire)
	l'agencement des thylakoïdes	groupés par 3 ou par 6, avec des thylakoïdes qui joignent les groupes entre eux.	isolés, avec phycobilisomes	par 3, en bandes séparées entre elles.
	les pigments	chlorophylle a et b, caroténoïdes	chlorophylle, phycobilines	chlorophylle a et c, nombreux caroténoïdes fucoxanthine chez le fucus
	Pyrénoïde*	Intraplastidial, parfois entouré d'amidon	intraplastidial, absent chez certaines	appendu au plaste (en saillie, forme de poire)
	Stigma*	Intraplastidial pour algues unicellulaires, présent dans les gamètes et spores de <i>Ulva lactuca</i>)	absent (pas de formes flagellées chez les Rhodophytes)	intra ou extraplastidial dans les gamètes de <i>Fucus vesiculosus</i>
produits de la photosynthèse		amidon intraplastidial	amidon floridéen (α 1-6 glucane proche de l'amylopectine) extraplastidial	polyosides solubles extraplastidiaux

Document 16 : caractéristiques structurales et biochimiques des trois grands clades d'Algues

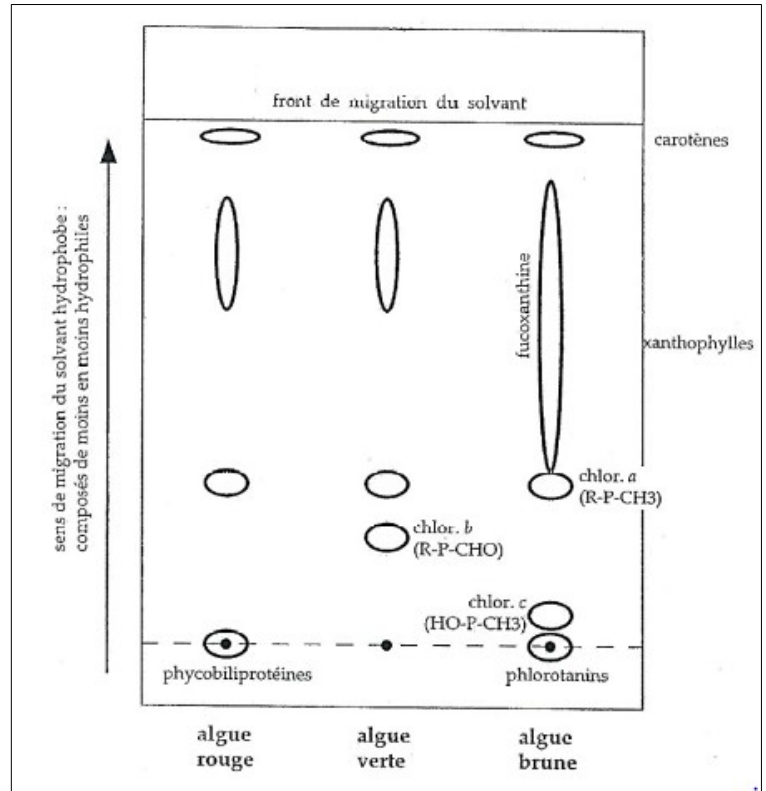
II. Apports de données biochimiques et moléculaires dans la construction d'une phylogénie.

1. Les apports d'une chromatographie sur couche mince des pigments photosynthétiques

Une chromatographie peut être réalisée à partir des pigments des Algues. Il est essentiel de choisir un **solvant apolaire** car les **pigments sont plus ou moins hydrophobes** et donc enchâssés dans la membrane des thylakoïdes. La migration se fait sur du papier Whattmann généralement.

Activité 4 :

→ Déterminer le R_f de chaque pigment photosynthétique.
→ Sachant que les chlorophylles peuvent être utilisées comme critère moléculaires dans la réalisation de phylogénie, que suggère ces résultats concernant le lien de parenté entre les algues vertes, rouges et brunes.



Document 17 : chromatographie des pigments de différentes algues

2. Les apports de la phylogénie moléculaire

2.1 recherche des liens de parentés évolutive entre les chloroplastes et les Eucaryotes, les Eubactéries et les Archées.

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

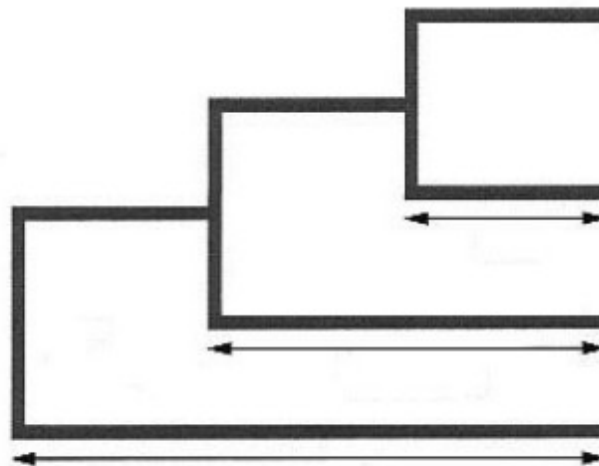
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-												
2 <i>Lemna minor</i>	0,29	-											
3 Lymphocyte B humain	0,33	0,36	-										
4 <i>Escherichia coli</i>	0,05	0,10	0,06	-									
5 <i>C. vibrioforme</i>	0,06	0,05	0,06	0,24	-								
6 <i>Bacillus firmis</i>	0,08	0,06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

Activité 6 :

- Utiliser la matrice de distance pour construire un arbre phylogénétique des plastes, en admettant que :
 Les séquences évoluent à la même vitesse dans toutes les branches de l'arbre (ce qui est un postulat de la méthode UPGMA).
 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 distances 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.

**III. En conclusion,****Activité 7 :**

→ A partir de l'ensemble des données, et en utilisant l'arbre phylogénétique simplifié des Eucaryotes (à la page suivante, expliquer en quoi les Algues constituent un groupe polyphylétique et résumer à l'aide d'un schéma les endosymbioses à l'origine des différents plastes des Algues étudiées.

