

CONCOURS G2E

BIOLOGIE

Durée : 3 heures

Les calculatrices programmables et alphanumériques sont interdites. Les téléphones portables et autres "smartphones" doivent être éteints au cours de l'épreuve et ne doivent en aucun cas être utilisés même à titre de montre.

L'usage de tout ouvrage de référence et de tout document est strictement interdit.

Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il en fait mention dans sa copie et poursuit sa composition. Dans ce cas, il indique clairement la raison des initiatives qu'il est amené à prendre.

Les candidats doivent respecter les notations de l'énoncé et préciser, dans chaque cas, la numérotation de la question posée.

La rédaction se fera uniquement à l'encre bleue ou noire et l'utilisation du blanc correcteur est interdite. Une grande attention sera apportée à la clarté de la rédaction et à la présentation des différents schémas.

Il n'est pas nécessaire de rédiger une introduction et une conclusion.

Les découpages et collages sur la copie sont interdits. Tout document à légender ou à annoter sera fourni en annexe et devra être rendu en fin d'épreuve avec votre copie.

Attention : le sujet de biologie est composé de 2 parties indépendantes dont la numérotation est continue afin d'éviter toute confusion lors de vos réponses. Le jury vous conseille de les composer en 1h30 chacune afin de répondre à toutes les questions.

Remarque importante : les questions suivent une problématique progressive, le jury vous conseille donc de les aborder dans l'ordre du sujet.

BIOLOGIE 1 (durée conseillée 1h30)**LE PHOSPHATE ET LES VÉGÉTAUX****Partie 1 (6 points)****Conséquence d'une carence en Phosphate sur le développement****1.1. Exploitation du phosphate dans les sols**

Les sols sont organisés verticalement et sont décrits en horizons. L'horizon A est dit horizon de surface, contient de la matière organique. L'horizon B est enrichi, par infiltration des eaux de surface, en éléments fins ou amorphes : argiles, oxydes de fer et d'aluminium, parfois humus. L'élément Phosphore (P) est présent sous différentes formes dans les sols. La forme biodisponible est le Phosphate inorganique (H_2PO_4^- et HPO_4^{2-} noté Pi).

Le document 1 décrit l'organisation d'un sol où poussent des végétaux.

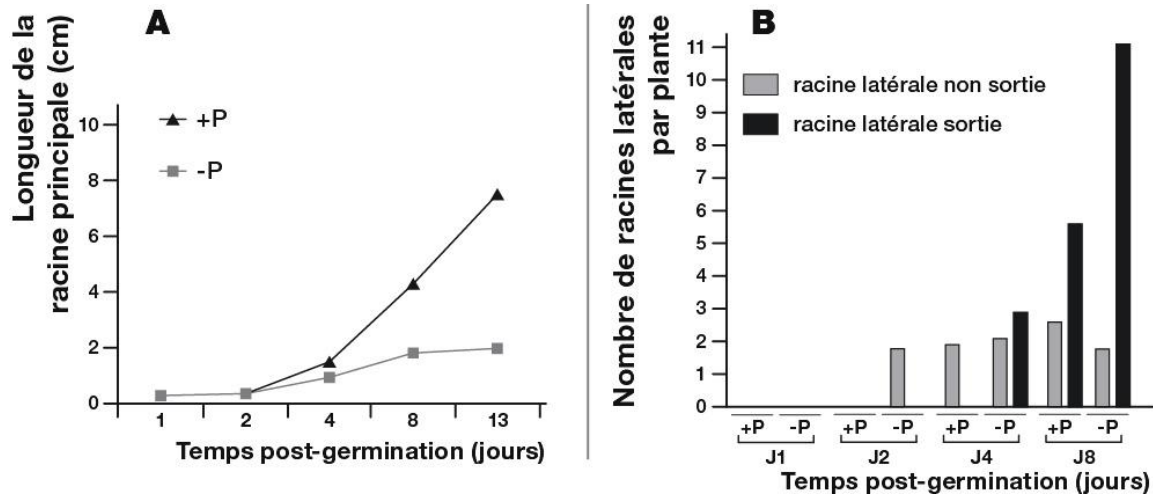
Document 1 : Composition minérale d'un sol d'Australie **disp** = biodisponible

Horizon	Épaisseur (cm)	pH	C (%)	N total (g.kg^{-1})	P total (mg.kg^{-1})	P disp (mg.kg^{-1})	K disp (mg.kg^{-1})	Ca disp (cmol.kg^{-1})
A	5,5	5,8	3,16	0,80	66,6	< 3,6	93,0	2,53
B	78,8	6,6	0,38	0,26	47,3	< 2,3	87,4	< 1,20

Question 1.a. Analyser le document 1 dans la perspective de nutrition végétale en phosphate.

Question 1.b. Fournir le nom de trois molécules biologiques distinctes où l'élément Phosphore peut être présent. Préciser la structure chimique de l'une d'elles au choix.

On utilise le végétal Arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*) comme modèle d'étude de la croissance.



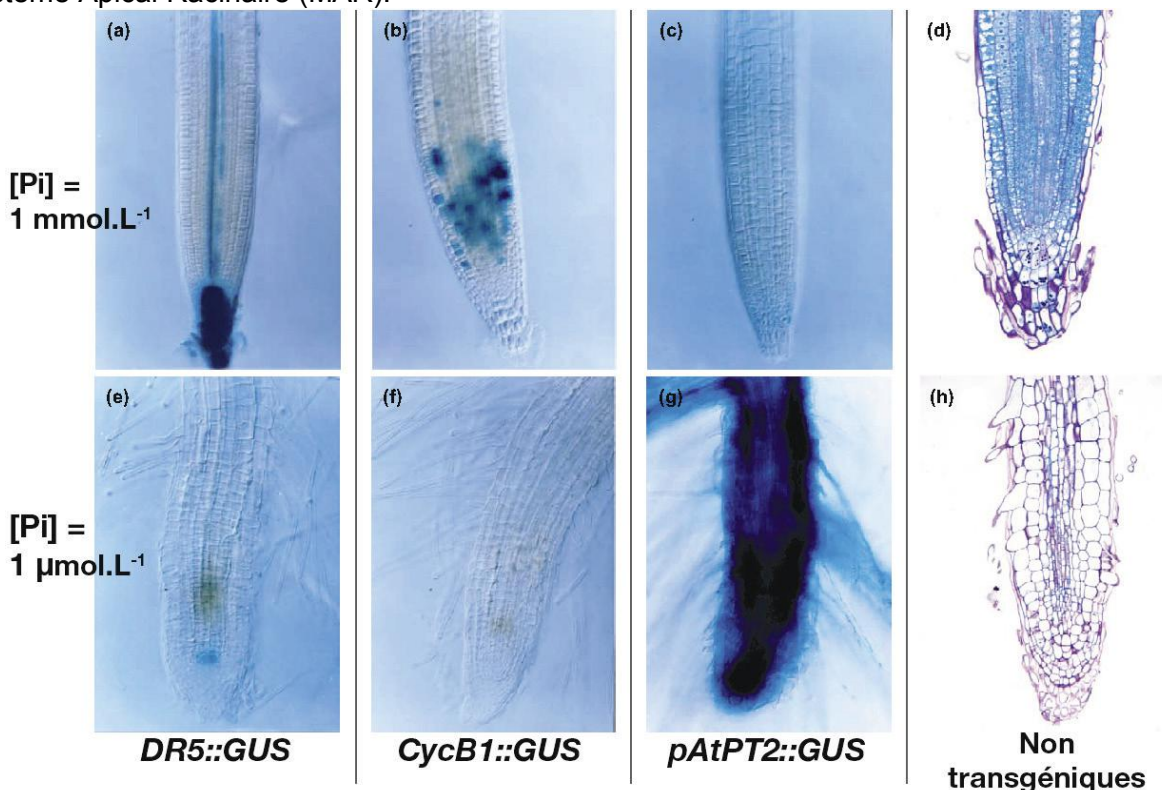
Document 2 : Caractères de l'appareil racinaire selon la disponibilité en Phosphate dans le sol

Le sol contrôle, noté « +P », contient du phosphate inorganique à une concentration de 1 mmol.L⁻¹.

Le sol carencé, noté « -P », contient du phosphate inorganique à une concentration de 10 µmol.L⁻¹.

Question 2. Analyser le document 2 afin d'expliquer la réaction du végétal à un sol pauvre en phosphate.

On construit différents individus transgéniques d'*A. thaliana* afin de caractériser le fonctionnement du Méristème Apical Racinaire (MAR).



Document 3 : Observations de l'apex racinaire selon la disponibilité en Phosphate dans le sol

La lignée *DR5::GUS* contient le gène codant la β-D-glucuronidase associé à un promoteur inductible par l'auxine. L'enzyme catalyse un substrat expérimental incolore en un produit bleu foncé.

La lignée *CycB1::GUS* contient le gène codant la β-D-glucuronidase associé à un promoteur inductible par la cycline B1, protéine synthétisée par la cellule lors de son entrée en mitose.

La lignée *pAtPT2::GUS* contient le gène codant la β-D-glucuronidase associé à un promoteur du gène codant pour le transporteur de phosphate d'*A. thaliana*, *pAtPT2*.

Question 3. Analyser le document 3 afin d'expliquer le fonctionnement du méristème apical racinaire dans un sol pauvre en phosphate.

1.2. Exploitation du phosphate dans les sols par les racines protéoïdes

Certains taxons végétaux différencient des racines protéoïdes ou *cluster roots* (CR), comprenant des groupes denses de courtes racines latérales.

Le document 4 analyse le comportement du lupin (*Lupinus luteus*) qui différencie des racines protéoïdes dans différentes conditions.

Toutes les plantes ont été cultivées dans un sol contenant 2 mmol.L^{-1} de phosphate pendant 4 semaines. Elles sont ensuite transférées et cultivées pendant 8 semaines sur un sol contenant la concentration indiquée en phosphate inorganique (Pi).

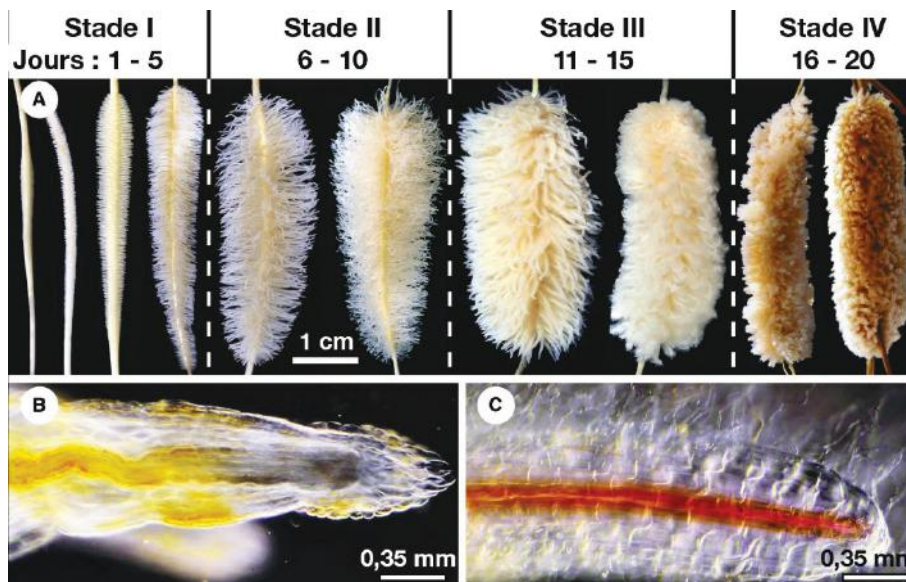
Document 4 : Effet de la présence de phosphate dans le sol sur le lupin

Pi ajouté ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Nombre de racines protéoïdes par plante	Masse sèche de la tige (g)	Concentration en P dans le limbe de la plus jeune feuille mature (mg.g^{-1} de masse sèche)
0	$32,2 \pm 4,5$	$2,5 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,2$
1	$14,3 \pm 6,1$	$3,4 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,2$
2,5	$0,2 \pm 0,4$	$4,2 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,2$
5	0	$4,7 \pm 0,4$	$4,1 \pm 0,6$
10	0	$4,9 \pm 0,3$	$6,5 \pm 0,2$
25	0	$5,0 \pm 0,3$	$9,8 \pm 0,2$

Les valeurs sont fournies avec l'écart-type à la moyenne.

Question 4. Analyser le document 4 afin de proposer une hypothèse expliquant la présence des racines protéoïdes. Que pouvez-vous en déduire sur l'utilisation du phosphate au cours du développement du lupin ?

Le document 5 montre les différents stades de développement d'une zone racinaire où se différencient des racines protéoïdes.



Les stades I à IV sont décrits à partir du premier jour d'émergence de racines latérales.

La photo B correspond à un zoom au stade I.

La photo C correspond à un zoom au stade III.

Document 5 : Chronologie de développement de racines protéoïdes de lupin dans un sol contenant $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de phosphate inorganique.

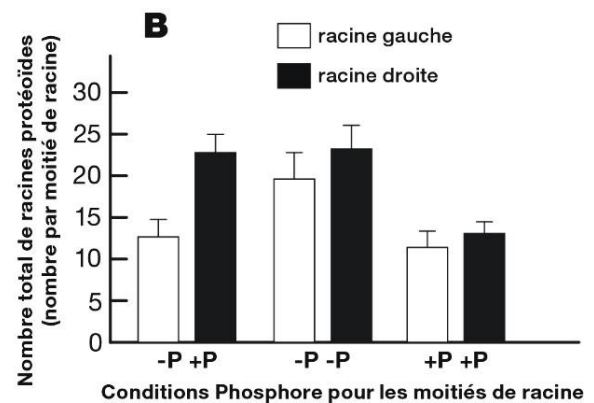
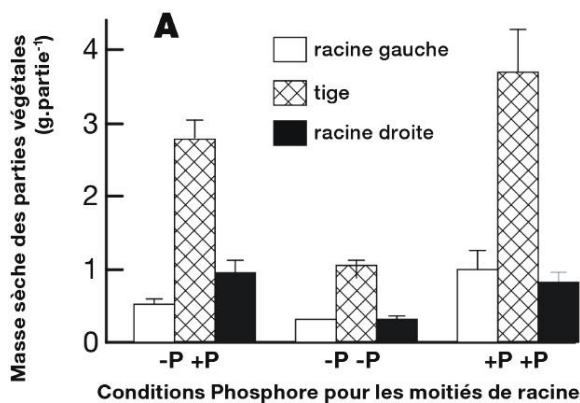
Question 5. Analyser le document 5 afin de proposer une hypothèse de développement des racines protéoïdes. L'observation des racines des photos B et C sur toute leur longueur est conseillée.

En quoi les différents stades constituent-ils une adaptation à la vie en milieu carencé ?

Partie 2 (2 points)
Action des racines protéoïdes lors d'une carence en Phosphate

2.1. Développement d'un végétal protéoïde selon la disponibilité du phosphate

On conçoit un système de culture à racines séparées (*split-root*) lors d'une culture de lupin. Les graines germent dans un sol favorable durant 6 jours. Elles sont alors transplantées dans un milieu sans Pi durant 18 jours. Enfin, on transplante les lupins en plaçant une moitié des racines dans un environnement de composition connue et la seconde moitié dans un autre environnement. L'appareil aérien du végétal est donc approvisionné par deux milieux. Au bout de 16 jours, on mesure les masses sèches des différentes parties des végétaux (**document 6-A**) et le nombre de racines protéoïdes par plante (**document 6-B**).



Document 6 : Mesures de masses sèches de tiges et racines de lupin et du nombre de racines protéoïdes dans un système de culture à racines séparées.

La condition « -P +P » signifie que la racine gauche est dans un sol carencé en Pi, tandis que la racine droite est dans un sol riche en Pi. Les barres représentent l'écart-type.

Le compartiment « -P » est alimenté avec 0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Pi, le compartiment « +P » avec 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Pi.

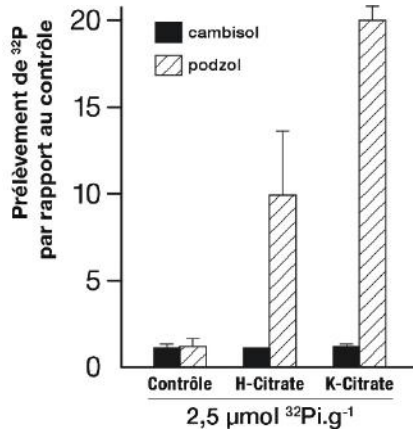
Question 6.a. Analyser les résultats obtenus dans le document 6-A et 6-B dans le système de culture à racines séparées afin de préciser l'importance du Pi.

Question 6.b. Analyser la condition « -P +P » du document 6-B pour discuter du paradoxe par rapport au document 2.

2.2. Effet des racines protéoïdes

On utilise des plants de maïs (*Zea mays*) âgés de 14 jours cultivés dans un sol contenant du phosphate radioactif ($\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$). On modifie le sol contrôle en ajoutant des dérivés d'acide citrique. Le document 7 décrit les quantités de radioactivités mesurées dans la tige de plants de maïs.

Document 7 : Quantités de radioactivité mesurées dans la tige de plants de maïs, mis en contact pendant 24 heures avec du phosphate radioactif.



Quantités de phosphate biodisponibles : $2,5 \mu\text{mol.g}^{-1}$ de sol.

Contrôle = ajout d'eau distillée.

H-citrate = acide citrique ($\text{H}_3\text{Citrate}$).

K-citrate = citrate de potassium ($\text{K}^+ \text{H}_2\text{Citrate}^-$).

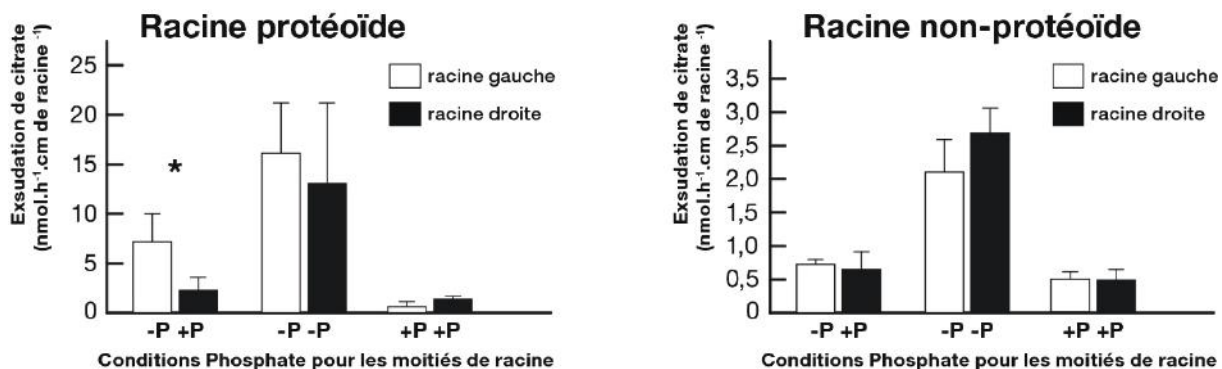
Cambisol = sol en début de formation ; favorable à la culture végétale ; pH = 5,90.

Podzol (= podzisol) = sol lessivé acide ; pH = 4,33.

Les barres représentent l'écart-type.

Question 7. Proposer une fonction pour l'acide organique. Proposer son mode d'action.

Le document 8 décrit les quantités de l'anion citrate libérées dans le sol par des plants de lupin par les zones protéoïdes et par les zones non protéoïdes.



Document 8 : Flux de l'anion citrate au niveau de racines de lupin dans un système *split root*.

Les barres représentent l'écart-type. Un astérisque pointe des résultats significativement différents.

Le compartiment « -P » est alimenté avec $0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Pi, le compartiment « +P » avec $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Pi.

Question 8. Analyser le fonctionnement des racines de lupin selon les quantités de phosphate disponibles. Proposer une hypothèse sur la régulation de l'exsudation de citrate dans la configuration « -P +P ».

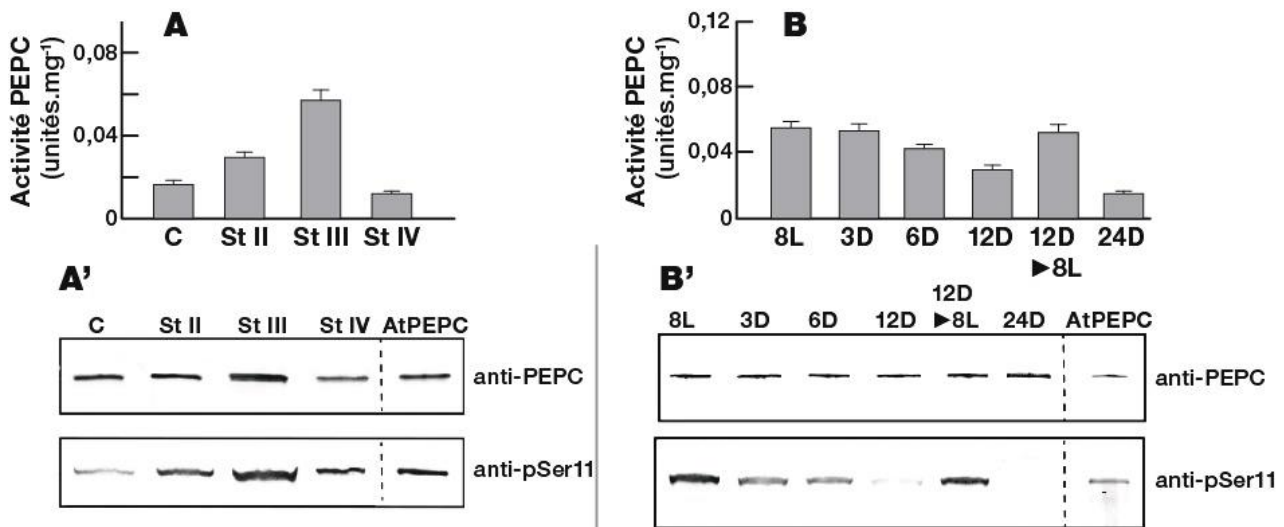
Partie 3 (2 points)

Régulation de l'activité des racines protéoïdes

La Phospho Enol Pyruvate (PEP) carboxylase (PEPC) est une enzyme cytosolique végétale qui catalyse la réaction irréversible de β -carboxylation du Phospho Enol Pyruvate (PEP) pour former de l'oxaloacétate et du phosphate inorganique.

L'oxaloacétate est le précurseur de l'aspartate, du citrate et du malate.

On cultive des plants de lupin sur un sol pauvre en phosphate ($1 \mu\text{mol.L}^{-1} \text{K}_2\text{HPO}_4$). Après 6 semaines de culture, on récolte les plantes et on extrait puis mesure l'activité et la présence (par immunodétection) de la PEPC dans les racines selon leur stade de développement (**document 9-A et 9-A'**) ou leurs conditions d'éclairement (**document 9-B et 9-B'**).



Document 9 : Fonctionnement de la PEPC au niveau des racines protéoïdes

A – Activité enzymatique et développement

Les zones racinaires analysées sont distinguées par le stade (St II, III, IV) de développement des racines protéoïdes (= CR = *cluster roots*) du **document 5**.

Les barres représentent l'écart-type.

C = contrôle = pas de racines protéoïdes

B - Activité enzymatique et éclaircissement

Les racines analysées sont distinguées par les conditions d'éclairement du végétal.

8L = 8 heures continues d'éclairement

3D = 3 heures continues d'obscurité

6D = 6 heures continues d'obscurité

12D▶8L = 12 heures continues d'obscurité suivies de 8 heures continues d'éclairement

A' et B' – Immunodétection après une électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) et un transfert sur membrane (Western blot).

AtPEPC correspond à un puits chargé avec de la PEPC purifiée extraite d'*Arabidopsis thaliana*.

Anti-PEPC = anticorps dirigé contre la PEPC

anti-pSer11 = anticorps dirigé contre la sérine phosphorylée en position 11 de la PEPC

Au-dessus de chaque puits est indiquée la condition expérimentale subie par l'extrait chargé dans ce puits.

Question 9-a. Analyser le document 9-A et 9-A' afin de caractériser le fonctionnement de la PEPC.

Question 9-b. Décrire la régulation de l'activité de la PEPC par la lumière (document 9-B et 9-B') et formuler une hypothèse sur cette régulation.

Le Phospho Enol Pyruvate fait partie de la séquence métabolique de la glycolyse.

Question 9-c. Écrire l'équation-bilan de la glycolyse et sa localisation.

Question 10. Réaliser un schéma-bilan du fonctionnement des racines protéoïdes en utilisant les analyses des différents documents.

BIOLOGIE 2 (durée conseillée 1h30)

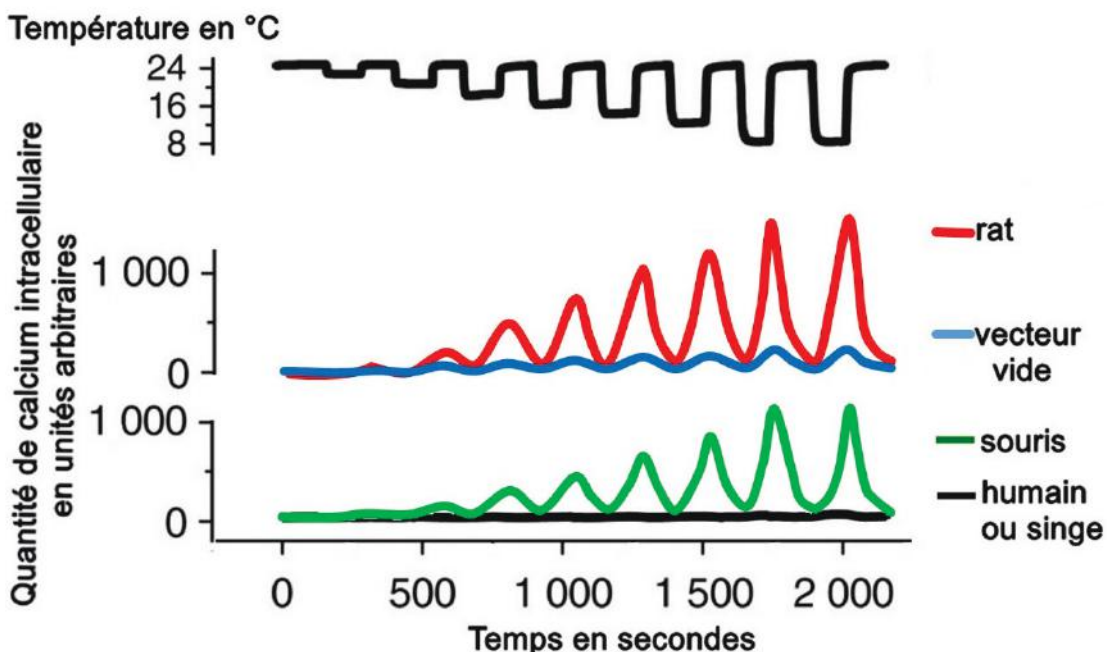
ÉTUDE DU RÉCEPTEUR AU FROID TRPA1

Partie 4 (4 points)

Fonctionnement du canal TRPA1 chez les rongeurs et les primates

Le canal ionique TRPA1 a été découvert chez certaines espèces comme étant un récepteur au froid, qui laisse entrer du calcium dans les neurones sensoriels. Cette étude a pour but d'étudier le fonctionnement et le rôle de ce canal chez différentes espèces animales.

On a introduit, dans des cellules non neuronales en culture, le gène du récepteur TRPA1 de différentes espèces. Les espèces étudiées sont le rat, la souris, le singe rhésus et l'homme. Le gène est transféré au sein d'un vecteur qui permet son expression et la traduction de la protéine. On insère dans certaines cellules le vecteur «vide» sans le gène TRPA1. La quantité de calcium intracellulaire est mesurée grâce à une molécule qui est fluorescente en présence de calcium. On refroidit les cellules par paliers, en partant d'une température de 24°C pour terminer à 8°C.



Document 11 : Évolution de la quantité de calcium intracellulaire en fonction de la température, dans des cellules exprimant le récepteur TRPA1 de différentes espèces, ou ayant reçu un vecteur vide. Les résultats pour les primates (humain ou singe) sont les mêmes.

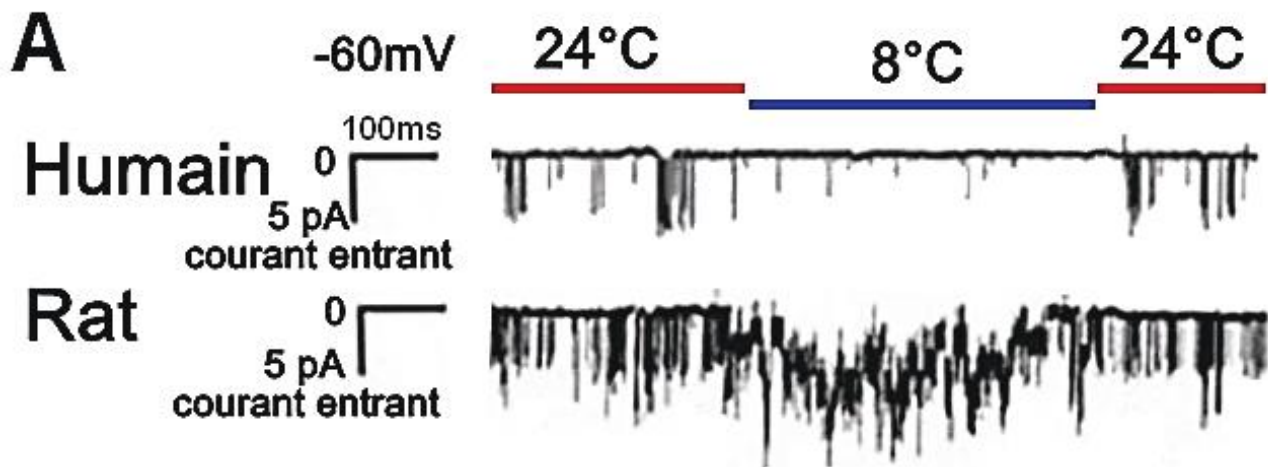
Question 11-a. En 5 lignes maximum, définir ce qu'est un canal ionique à ouverture contrôlée. Donner un exemple, et l'illustrer par un schéma.

Question 11-b. En 5 lignes maximum, expliquer le rôle du vecteur vide dans cette expérience.

Question 11-c. À partir du document 11, déterminer le(s) rôle(s) du récepteur TRPA1 chez les rongeurs et les primates. Quelle hypothèse pouvez-vous formuler pour expliquer la différence entre ces deux groupes ?

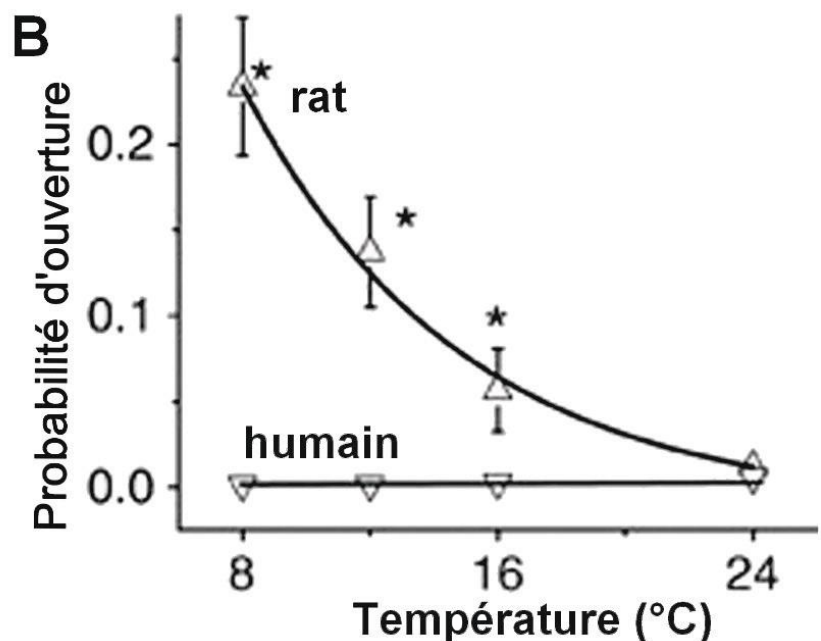
Les résultats de l'expérience précédente ne permettent pas de conclure sur l'origine de l'augmentation du calcium intracellulaire. En effet, ce dernier peut provenir soit d'une entrée de calcium dans la cellule à partir de l'extérieur, soit d'une libération de calcium à partir du réticulum endoplasmique. Il est donc nécessaire de compléter ce travail.

On réalise sur les membranes plasmiques des mêmes cellules que précédemment, des enregistrements en voltage imposé, par la méthode de patch-clamp. Le voltage est fixé à -60mV durant toute la durée de l'expérience, et on fait varier la température, de 24 à 8°C. On quantifie la probabilité d'ouverture des canaux à une température donnée, en mesurant leur temps d'ouverture total, divisé par le temps total.



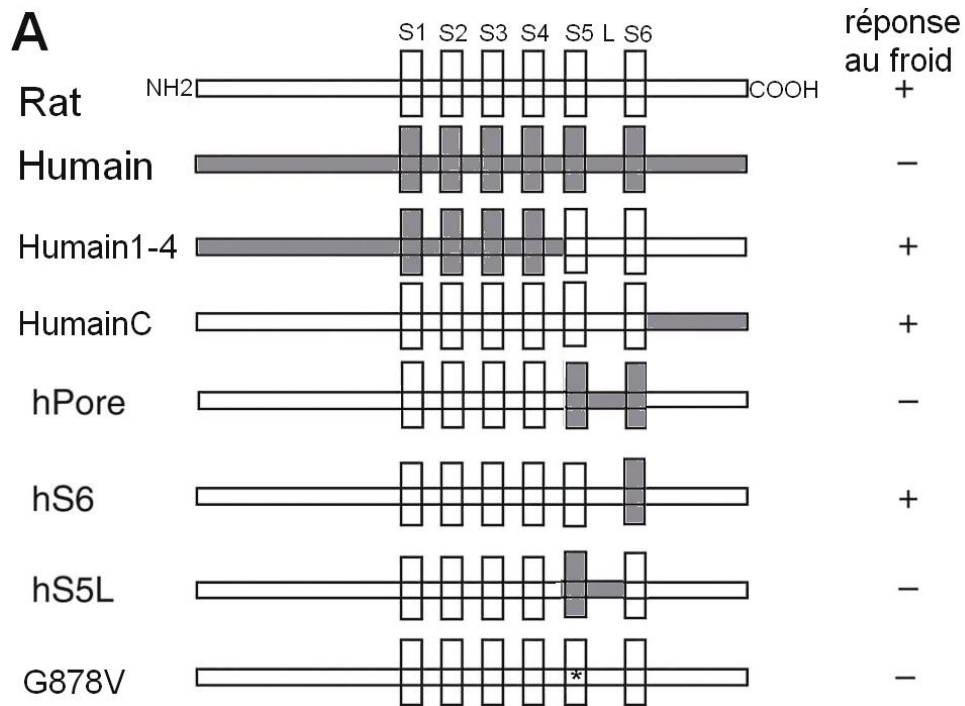
Document 12 : A - Enregistrement en patch clamp de cellules exprimant le récepteur TRPA1 de rat ou humain, à 24 ou 8°C. Les courants sont en picoampères (pA), et le temps en millisecondes.

B - Probabilité d'ouverture des canaux en fonction de la température (de 8 à 24°C). Ce graphique a été construit à partir de nombreux tracés comme celui de la figure A. Les barres sont des écarts-types et les étoiles signalent des différences statistiquement significatives entre le rat et l'humain.

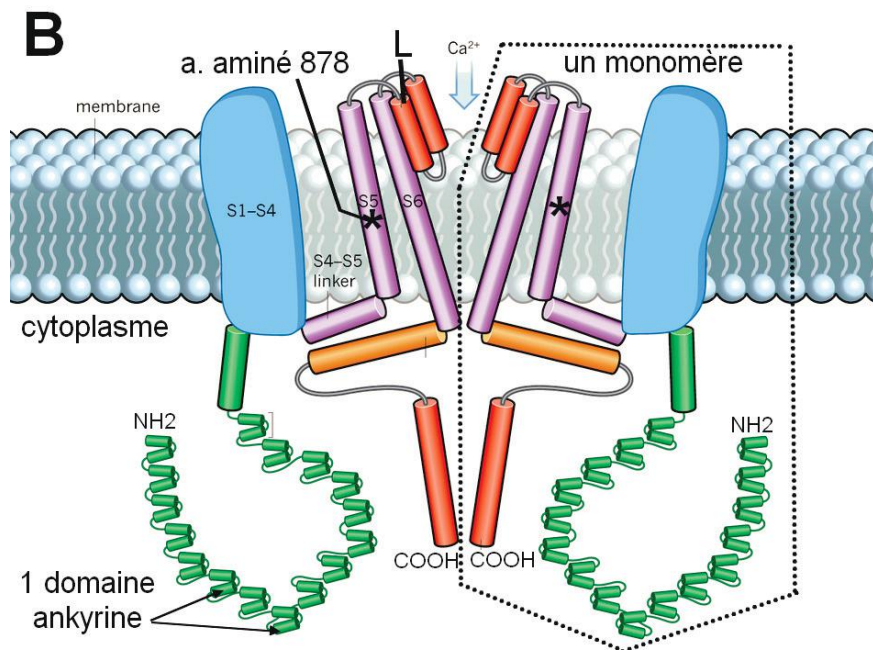


Question 12. Expliquer ce qu'on enregistre en 12-A. À l'aide du document 12-B proposer un mécanisme expliquant les différences entre rat et humain observées dans le document 11.

Afin de déterminer quelle est la partie de la protéine responsable de la sensibilité au froid, on a construit des protéines chimères comportant des portions de séquences du récepteur de rat et des portions de séquence du récepteur humain. On a par ailleurs séquencé les deux récepteurs et on a mis en évidence une mutation sur l'acide aminé 878. Chez le rat, cet acide aminé est toujours le glutamate (G), alors que chez l'homme c'est la valine (V). Pour chacune de ces protéines (chimère ou mutée), on teste sa réponse au froid. Les résultats sont donnés dans le document 13-A. La localisation de ces séquences dans le récepteur est précisée dans le document 13-B.



Document 13 : A. Réponse au froid, mesurée par la même technique que précédemment. Cette réponse existe (+) ou non (-) pour des protéines TRPA1 chimères, contenant des séquences de rat (en blanc) et des séquences humaines (en gris), ou une mutation ponctuelle (*). S désigne une hélice alpha transmembranaire. L est la zone de lien entre les hélices 5 et 6. G878V désigne la mutation de l'acide aminé 878, qui est normalement un glutamate chez le rat, en une valine.



Document 13-B : Structure du récepteur TRPA1. Le récepteur TRPA1 est un dimère formé de deux sous-unités identiques. Les hélices alpha S1 à S4 ne sont pas dessinées séparément. L, «linker», désigne la même séquence que dans le document 13-A. L'étoile désigne l'acide aminé 878 de l'hélice 5. En vert, les domaines ankyrine étudiés dans la partie 6.

Question 13. Analyser chaque construction du document 13-A afin de déterminer quelle partie de la protéine est responsable de la réponse au froid. Par analogie avec le fonctionnement des canaux du potentiel d'action nerveux, proposer une hypothèse sur le fonctionnement des canaux TRPA1 du rat, en utilisant la figure 13-B.

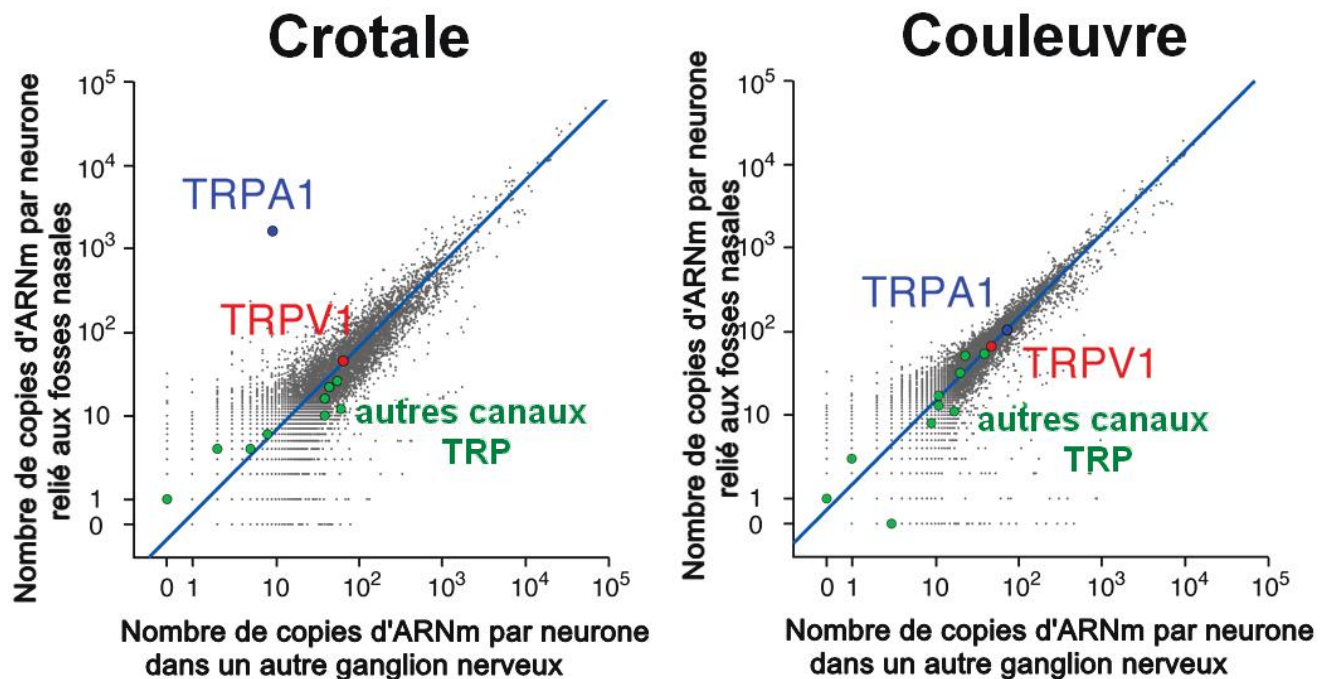
Partie 5 (3 points)

La détection des infrarouges chez les serpents et le canal TRPA1

Certains serpents, comme le crotale, peuvent détecter les proies à « sang chaud » (hétérothermes) grâce à un organe sensible aux infrarouges (IR). Les couleuvres, elles, n'ont pas cette capacité. Il a été démontré chez d'autres espèces que les serpents, que des canaux de type TRP jouent un rôle important dans la perception de la chaleur.

Deux hypothèses pourraient expliquer une perception différente chez ces deux serpents : soit ils produisent des canaux différents, soit ils expriment les mêmes canaux mais avec des niveaux d'expression différents.

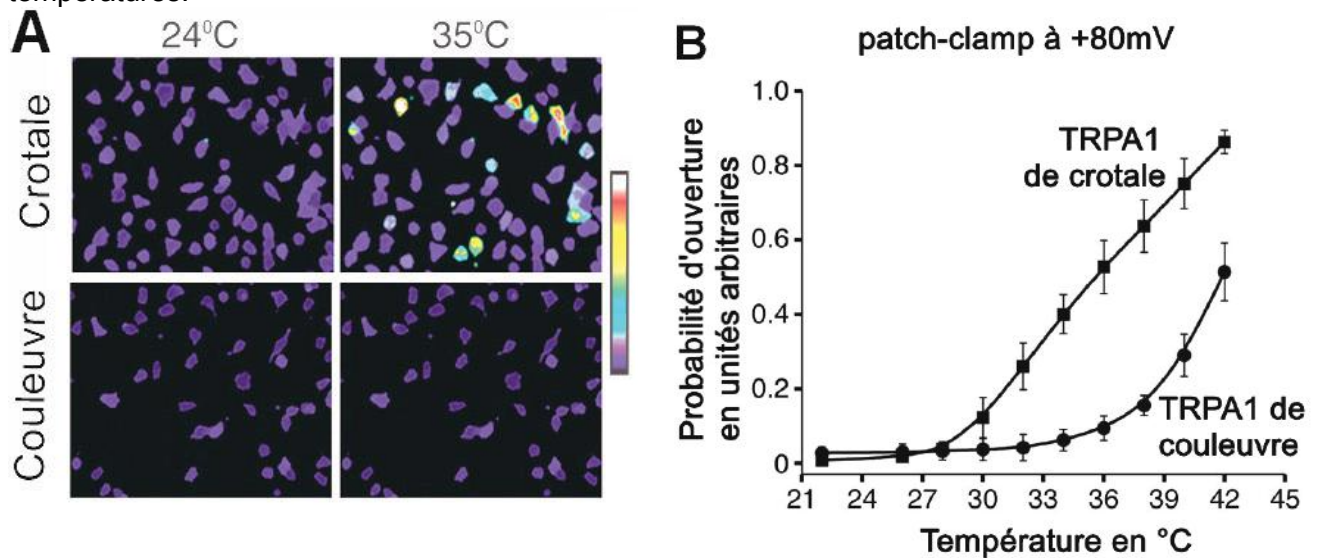
Pour répondre à cette question, des chercheurs ont analysé l'ensemble des ARNm (transcriptome) de neurones. Ils ont comparé le transcriptome des neurones reliés aux fosses nasales sensibles ou non aux infrarouges, au transcriptome d'autres neurones sans lien avec cette fonction.



Document 14 : Comparaison du nombre de copies d'un même ARNm par neurone sensoriel des fosses nasales sensibles ou non aux infrarouges et dans un autre type de neurones, chez le crotale et la couleuvre. TRPA1 (en bleu) comme TRPV1 (en rouge) sont des canaux TRP, mais il en existe encore d'autres (en vert).

Question 14. Laquelle des deux hypothèses évoquées précédemment est validée par le document 14 ?

Comme dans la partie 4, on fait s'exprimer dans des cellules non neuronales les canaux TRPA1 de crotale ou de couleuvre. Les cellules ont été remplies avec un composé fluorescent en présence de calcium. Par ailleurs, on mesure en patch-clamp les courants dans ces cellules, pour différentes températures.



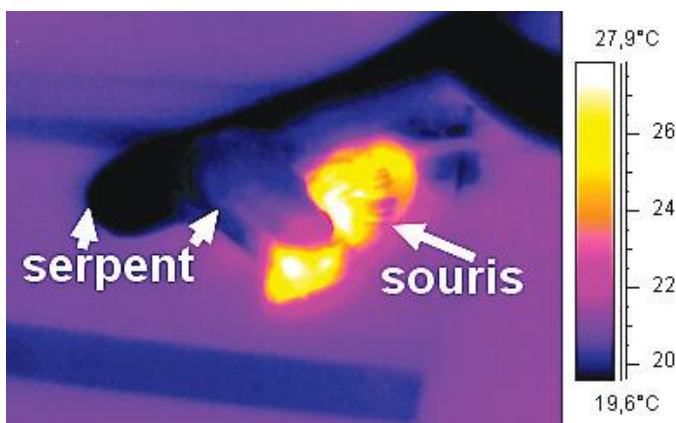
Document 15 :

15-A Fluorescence proportionnelle à la quantité de calcium dans des cellules exprimant le canal TRPA1 de crotale ou de couleuvre, pour différentes températures. La quantité de calcium est convertie en un code couleur, allant d'une quantité indétectable (violet), jusqu'aux valeurs maximales (rouge).

15-B. Courant enregistré en patch-clamp à partir de ces cellules exprimant l'un ou l'autre des canaux TRPA1.

Question 15-a. En quoi la fonction de cette protéine chez les serpents est-elle différente de celle des rongeurs ?

Question 15-b. Laquelle des deux hypothèses évoquées précédemment est validée par les documents 15-A et 15-B ? Conclure sur la validité des deux hypothèses.

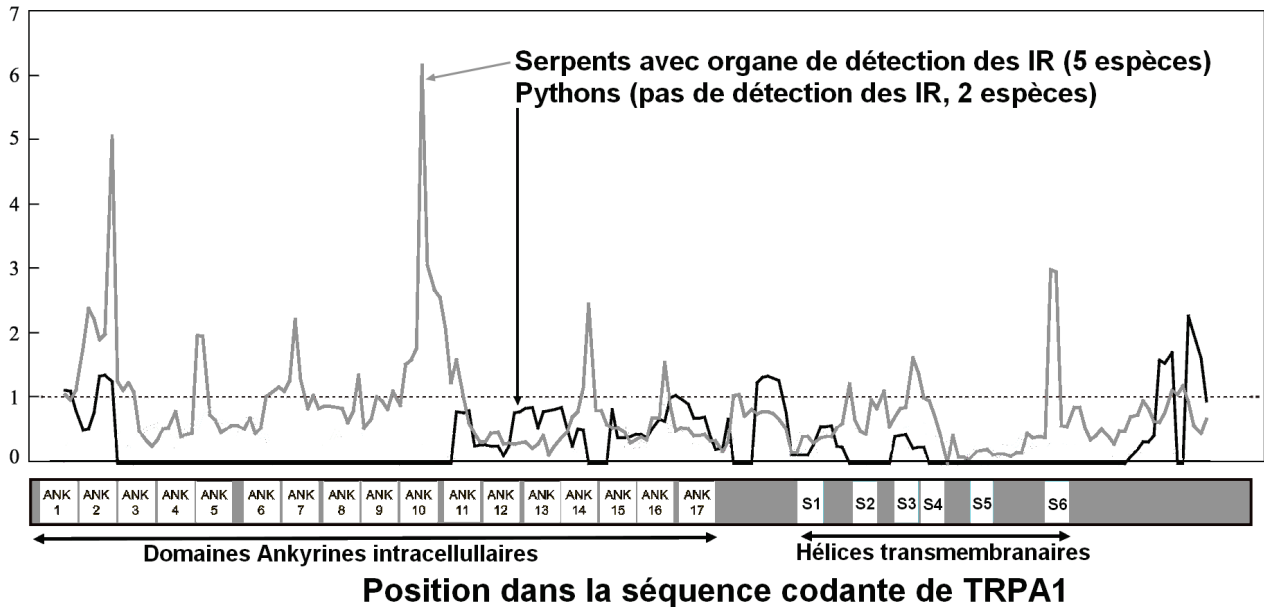


15-C. Photographie avec une caméra infrarouge d'un serpent attrapant une souris, avec à droite la correspondance entre les couleurs de la photographie et les températures.

Question 15-c. En vous appuyant sur le document 15-C, expliquez en quoi les canaux TRPA1 peuvent contribuer à un comportement de prédation différent chez le crotale et la couleuvre.

Partie 6 (3 points) Évolution du canal TRPA1

On a comparé les séquences du gène TRPA1 chez des serpents détectant ou non les infrarouges et chez les mammifères. Pour chaque nucléotide, on regarde si une substitution d'un nucléotide aboutit à l'insertion du même acide aminé dans la protéine (mutation synonyme) ou à un autre (mutation non synonyme).



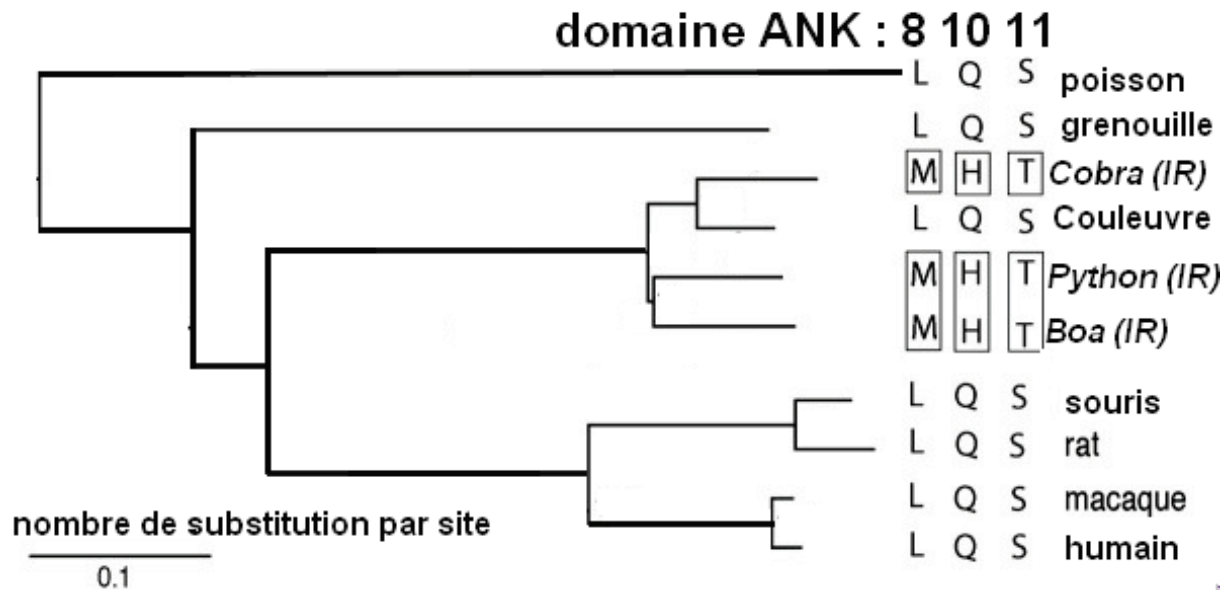
Document 16 : Comparaison de la séquence du gène TRPA1 de serpents, exprimée par le rapport entre le nombre de mutations synonymes sur le nombre de mutations non synonymes. La correspondance avec la protéine est figurée en dessous. « ANK » désigne un domaine intracellulaire de type ankyrine (en vert sur le document 13-B). S désigne une des six hélices alpha transmembranaires.

Question 16-a. Donner une autre appellation pour une mutation synonyme. Donner également une autre appellation pour une mutation non synonyme.

Question 16-b. Par quel(s) mécanisme(s) évolutifs peut-on obtenir une valeur supérieure à 1 dans le document 16 ?

Question 16-c. Déterminer quelles sont les deux parties de la protéine TRPA1 qui sont les plus susceptibles d'être responsables de la détection des infrarouges. En 5 lignes maximum, comparer votre réponse à celle de la partie 4 et indiquer en quoi les éléments de détection de la température diffèrent chez les serpents et les rongeurs.

Les chercheurs ont construit un arbre de comparaison de séquences pour le gène TRPA1. On précise la nature de 3 acides aminés, situés dans des domaines de type ankyrine. Les regroupements des espèces dans cet arbre de comparaison de séquence reflètent fidèlement celles de la classification phylogénétique.



Document 17 : Arbre de comparaison de séquence pour le gène TRPA dans son ensemble, avec la nature de 3 acides aminés présents respectivement dans les domaines de type ankyrine 8, 10 et 11. Les serpents capables de détecter les infrarouges sont notés en italique et «IR». Dans cet arbre, aucune autre espèce que celles notées IR ne peut détecter les infrarouges. L – Leucine, Q – Glutamine, S – Serine, M – Méthionine, H – Histidine, T – Thréonine. La longueur des branches de l'arbre représente le nombre de mutations par acide aminé dans les domaines de type ankyrine.

Question 17-a. En supposant que les 3 acides aminés du document 17 sont à eux seuls responsables de la sensibilité aux infrarouges, proposer deux scénarios évolutifs basés sur le document 17 et expliquant l'évolution de cette aptitude chez les serpents. Préciser s'il s'agit d'une évolution convergente ou divergente.

Question 17-b. Ajouter à l'arbre du document 17 reproduit en annexe tous les éléments permettant de comprendre l'évolution du récepteur TRPA1, chez toutes les espèces étudiées dans l'ensemble du sujet. Dessiner exclusivement le scénario d'évolution divergente.

Bibliographie :

Hocking P.J. et coll., *Plant and Soil* 258 : 135-150 (2004) ; Lambers H. et coll., *Annals of Botany* 98 : 693-713 (2006) ; Lamont B.B., *Plant and Soil* 248 : 1-19 (2003) ; Lopez-Bucio J. et coll., *Curr. Op in Plant Biology* 6 : 280-287 (2003) ; Palomo L. et coll., *Soil Biology and Biochemistry* 38 : 683-692 (2006) ; Perez-Torres et coll., *The Plant Cell* 20 : 3258-3272 (2008) ; Shane M.W. et coll., *Plant physiol.*, 161 : 1634-1644 (2013) ; Shane M.W. et coll., *Annals of Botany* 118 : 637-643 (2016) ; Shen J. et coll., *Plant Science* 168 : 837-845 (2005) ; Chen J. et coll., *Nat Commun.* 4 : 2501 (2013) ; Clapham D.E. et coll. *Nature* 520 : 439-441 (2013) ; Gracheva E.O. et coll., *Nature* 464(7291) : 1006-11 (2010) ; Geng J. et coll., *PLoS One* 6 : e28644 (2011) ; Yokoyama et coll., *Mol Biol Evol.* 28(1) : 45-8 (2011).