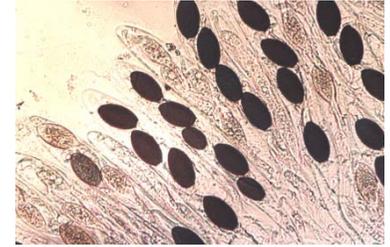


Laboratoire Génétique et Epigénétique  
des Champignons

Fabienne Malagnac

fabienne.malagnac@igmors.u-psud.fr



# Épigénétique, stabilité des génomés & régulation de la physiologie fongique

LIED  
PIERI



université  
PARIS  
DIDEROT  
PARIS 7



# *Saccharomyces cerevisiae* : la pionnière

Séquençage d'une banque de cosmides ordonnés

-> 1 cosmide = 1 laboratoire et des mois de travail !



Chr XI : 29 cosmides pour 667 KB

Séquence complète = 1996

# Séquençage génomique : pour quoi faire ?

## Intérêts

- médicaux -> pathogènes humains
- industriels -> agroalimentaire  
-> phytopathologie
- écologiques -> symbioses  
-> cycle du carbone  
-> bioremédiation
- scientifiques -> organismes modèles  
-> biodiversité & phylogénie

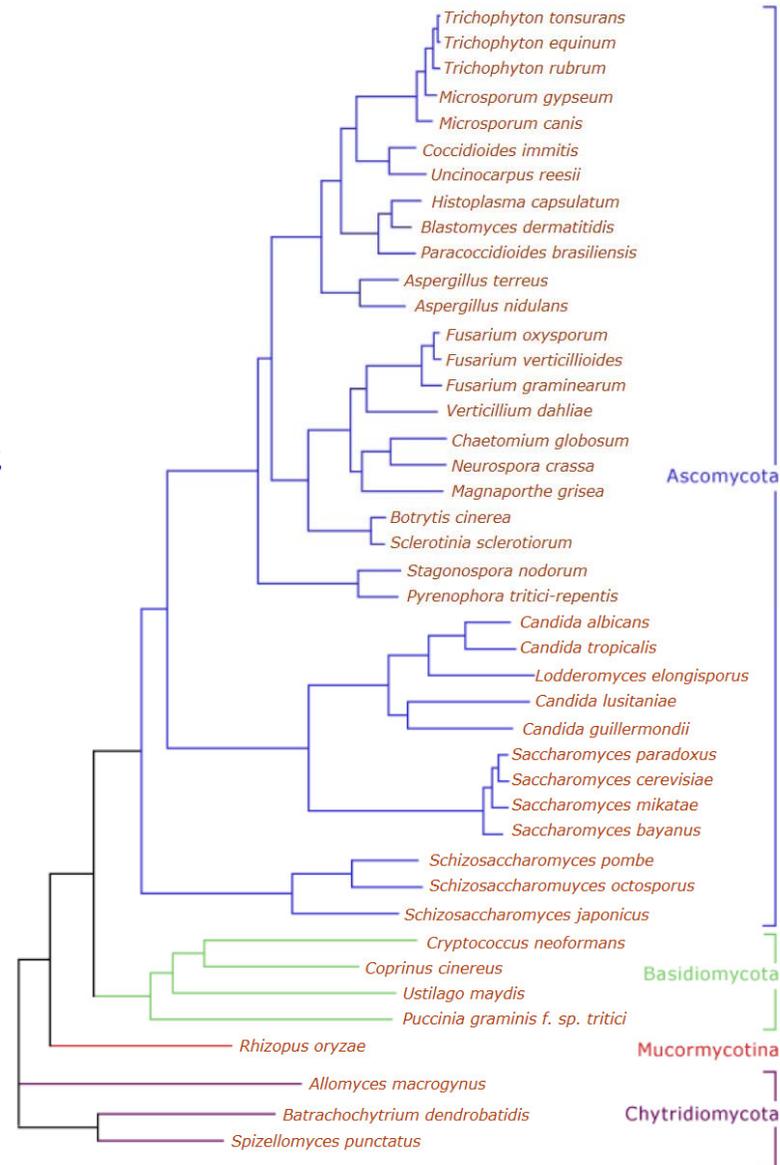
Espèces séquencées ≥ 125    Souches séquencées ≥ 200

# Séquençage génomique : qui ?



Fungal Genome Initiative

~  
50 espèces



# Séquençage génomique : qui ?

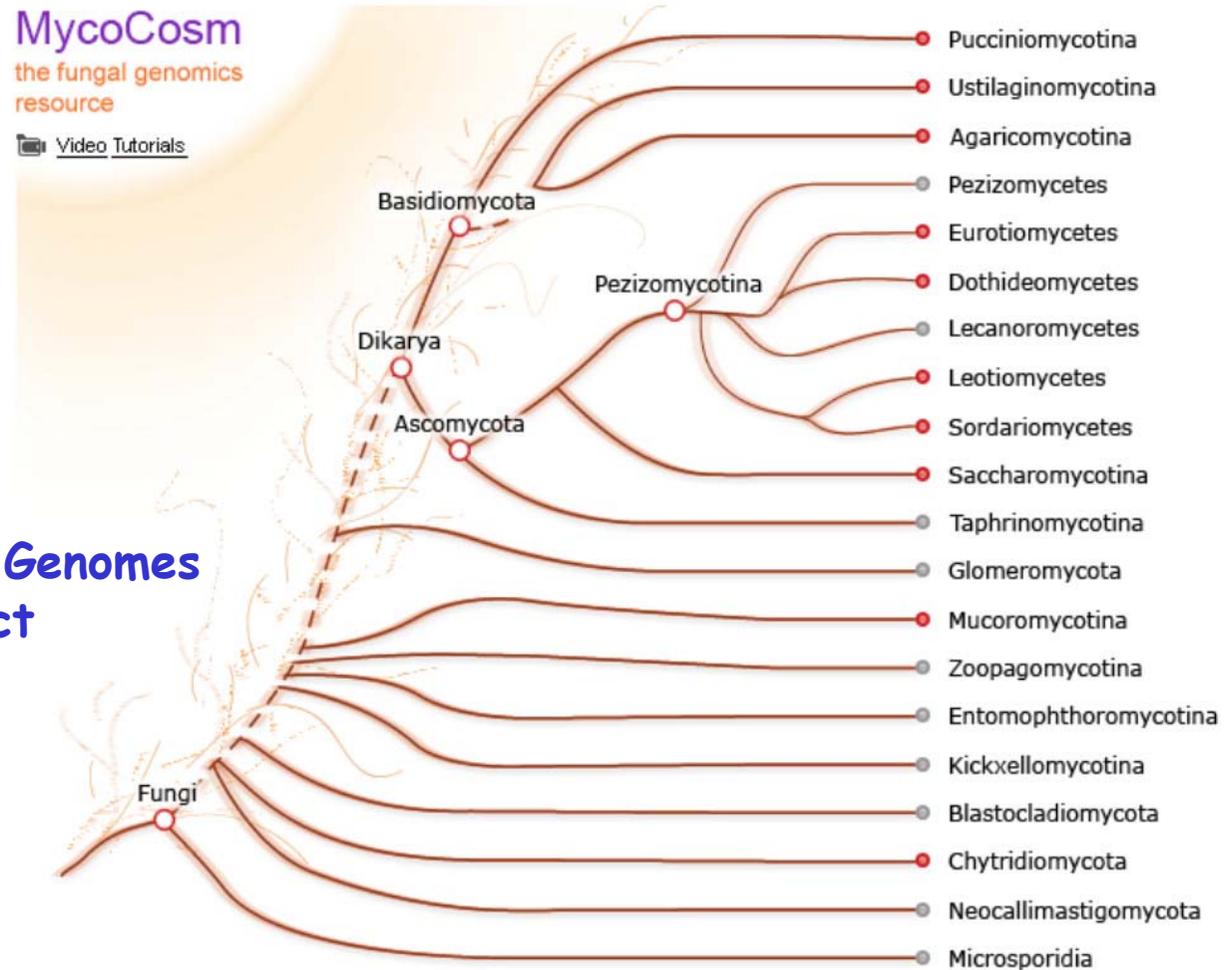


DOE Joint Genome Institute  
Enabling Advances in Bioenergy & Environmental Research



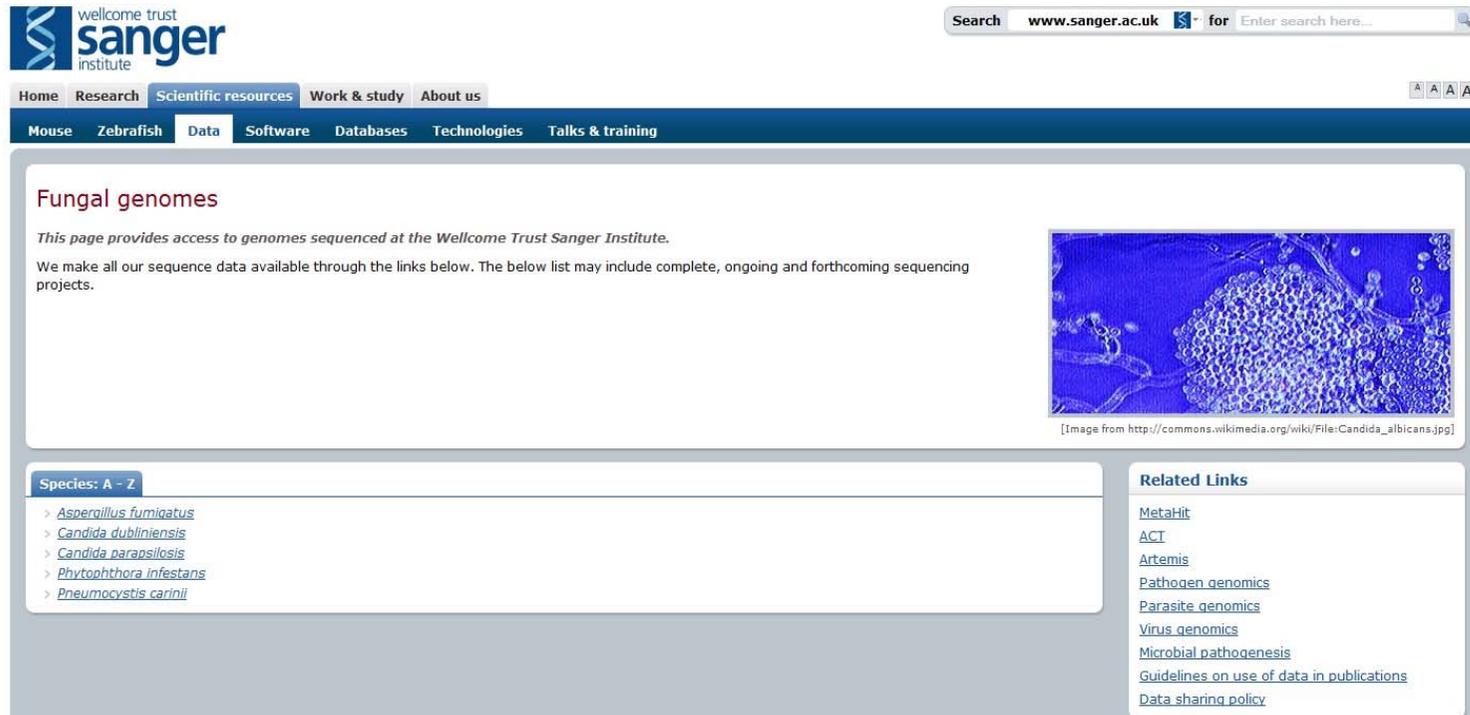
MycoCosm  
the fungal genomics  
resource

[Video Tutorials](#)



1000 Fungal Genomes  
Project

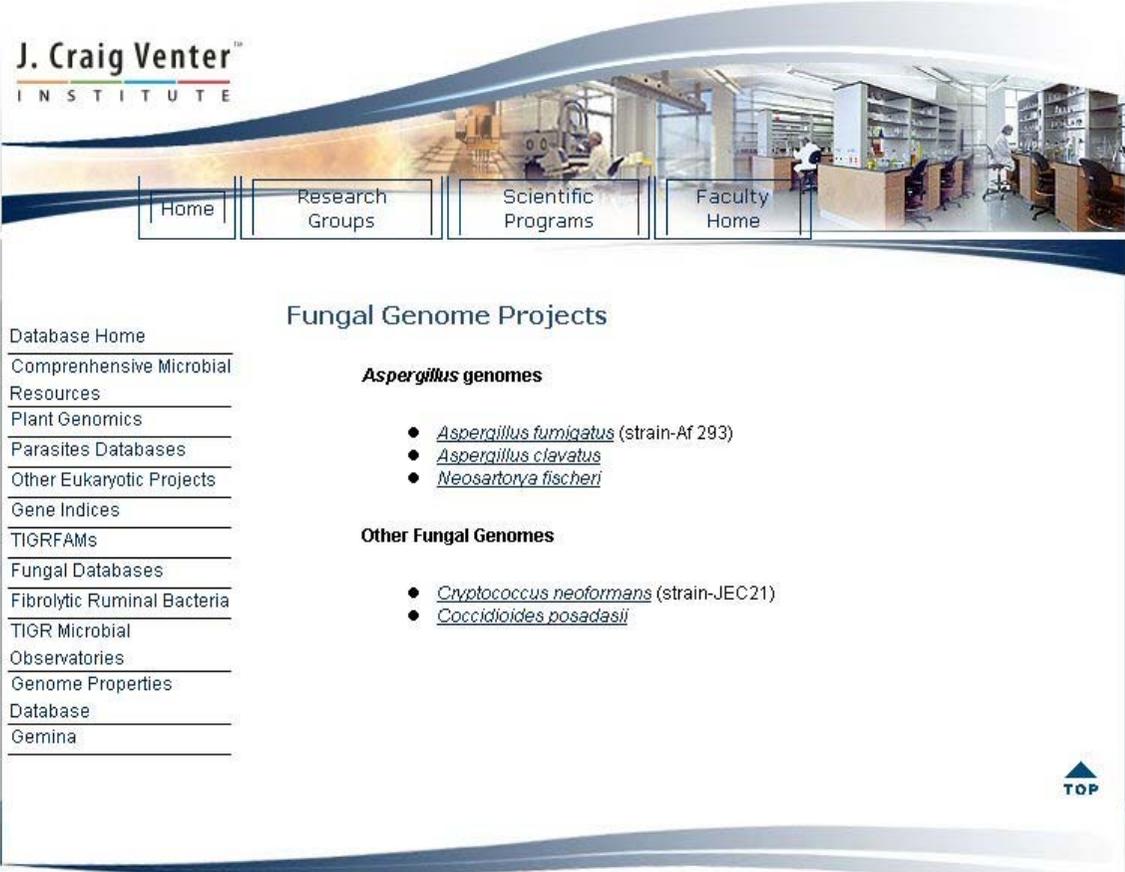
# Séquençage génomique : qui ?



The screenshot shows the Wellcome Trust Sanger Institute website. The header includes the logo and a search bar. The main navigation menu has categories like Home, Research, Scientific resources, Work & study, and About us. A secondary menu lists Mouse, Zebrafish, Data, Software, Databases, Technologies, and Talks & training. The main content area is titled 'Fungal genomes' and contains a paragraph stating: 'This page provides access to genomes sequenced at the Wellcome Trust Sanger Institute. We make all our sequence data available through the links below. The below list may include complete, ongoing and forthcoming sequencing projects.' To the right of this text is a microscopic image of a fungal colony. Below the text is a list of species under the heading 'Species: A - Z', including [Aspergillus fumigatus](#), [Candida dubliniensis](#), [Candida parapsilosis](#), [Phytophthora infestans](#), and [Pneumocystis carinii](#). A 'Related Links' section on the right contains links to MetaHit, ACT, Artemis, Pathogen genomics, Parasite genomics, Virus genomics, Microbial pathogenesis, Guidelines on use of data in publications, and Data sharing policy.

-> pathogènes humains

# Séquençage génomique : qui ?



The screenshot shows the J. Craig Venter Institute website. At the top, there is a navigation bar with links for Home, Research Groups, Scientific Programs, and Faculty Home. Below this, the main content area is titled "Fungal Genome Projects". On the left side, there is a vertical menu with various database and resource links. The main content area lists "Aspergillus genomes" and "Other Fungal Genomes" with specific species names and strain identifiers.

**J. Craig Venter  
INSTITUTE**

Home | Research Groups | Scientific Programs | Faculty Home

Database Home  
Comprehensive Microbial Resources  
Plant Genomics  
Parasites Databases  
Other Eukaryotic Projects  
Gene Indices  
TIGRFAMs  
Fungal Databases  
Fibolytic Ruminant Bacteria  
TIGR Microbial  
Observatories  
Genome Properties  
Database  
Gemina

### Fungal Genome Projects

***Aspergillus* genomes**

- [\*Aspergillus fumigatus\*](#) (strain-Af 293)
- [\*Aspergillus clavatus\*](#)
- [\*Neosartorya fischeri\*](#)

**Other Fungal Genomes**

- [\*Cryptococcus neoformans\*](#) (strain-JEC21)
- [\*Coccidioides posadasii\*](#)

TOP

Contact Us | Data Disclaimer | © 2009 J. Craig Venter Institute

-> métagénomique d'écosystèmes

# Séquençage génomique : qui ?



## Intérêt scientifique

*Podospora anserina*

## Intérêt agronomique

*Botrytis cinerea*

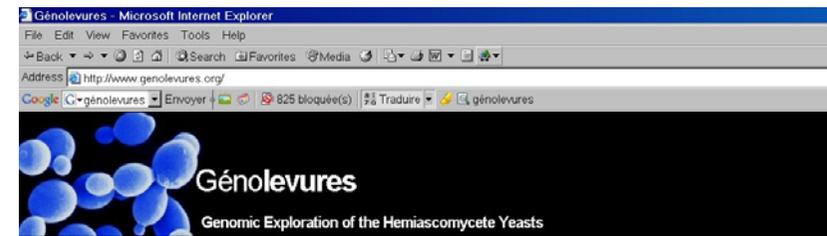
*Hemileia vastatrix*

*Leptosphaeria maculans*

*Melampsora larici-populina*

*Microbotryum violaceum*

*Tuber melanosporum*



## Welcome to Génolevures!

Génolevures provides annotated sequence data and classifications for the genomes of eighteen species of hemiascomycete yeasts, including nine complete genomes. The Génolevures web resources provides [genetic element](#) pages, [orthologs](#) defined by syntenic homology, [protein families](#), a [genome browser](#) for interspecies comparison, and [data sets](#) for downloading.

An [advanced search](#) facility permits a number of criterion-based and full text queries.

Classification data, including protein families and orthologs, and the most up-to-date genome annotations, are for the most part not available in general-purpose sequence data bases such as [EMBL/GenBank/CCRL](#). These data are provided here to the public, but users should cite:

Sherman DJ, Martin T, Nikolski M, Cayla C, Souciet JL, Durans P: Génolevures Consortium (2009). Génolevures: protein families and synteny among complete hemiascomycetous yeast proteomes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 37(Database issue), pp. D500-4. [[NAR full text](#)]

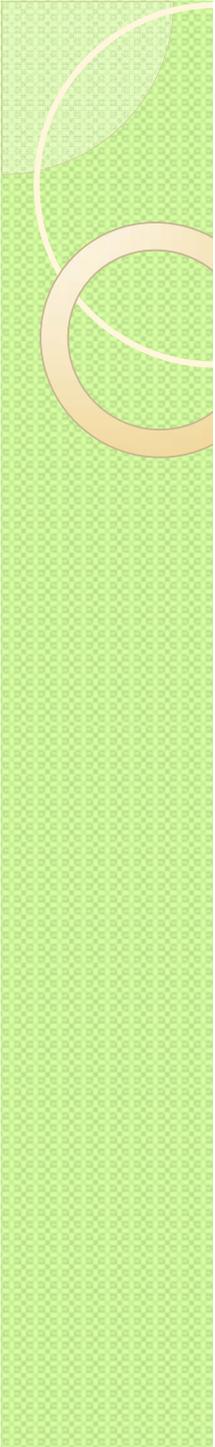
Genetic elements in all genomes (including *S. cerevisiae* and *A. gossypii*) are named following a [systematic nomenclature](#), but gene names and other locus tags are always indicated.

## News & Events

- August 26-29, 2009 [27th International Specialized Symposium on Yeasts](#), Paris (France).

List of [past events](#)

## Examples



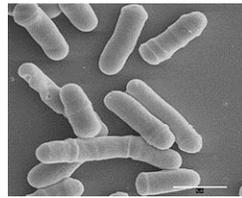
# Séquençage génomique : approches globales

- **Fonction**
  - > Délétions systématiques
- **Réseaux d'interactions**
  - > Double-hybride
  - > Synthétiques létaux
- **Expression**
  - > « omiques »
    - . micro-puces
    - . Protéomes
    - . ARNseq
    - . Méthylome
  - ...

# Principales caractéristiques génomiques des eumycètes

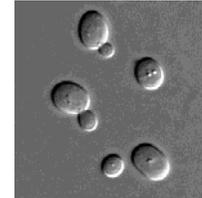
## Ascomycètes

### Taphrinomycotina



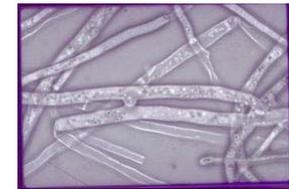
*Schizosaccharomyces pombe*

### Saccharomycotina



*Saccharomyces cerevisiae*

### Pezizomycotina



*Podospora anserina*

Taille en Mb

12,5

12

35,5

Protéines  
prédites

5 144

5 863

10 545

# Principales caractéristiques génomiques des eumycètes

## Basidiomycètes

### Puccinomycotina



*Puccinia graminis*

### Ustilaginomycotina



*Ustilago maydis*

### Agaricomycotina



*Coprinus cinereus*

**Taille en Mb**

**88,64**

**19,68**

**37,5**

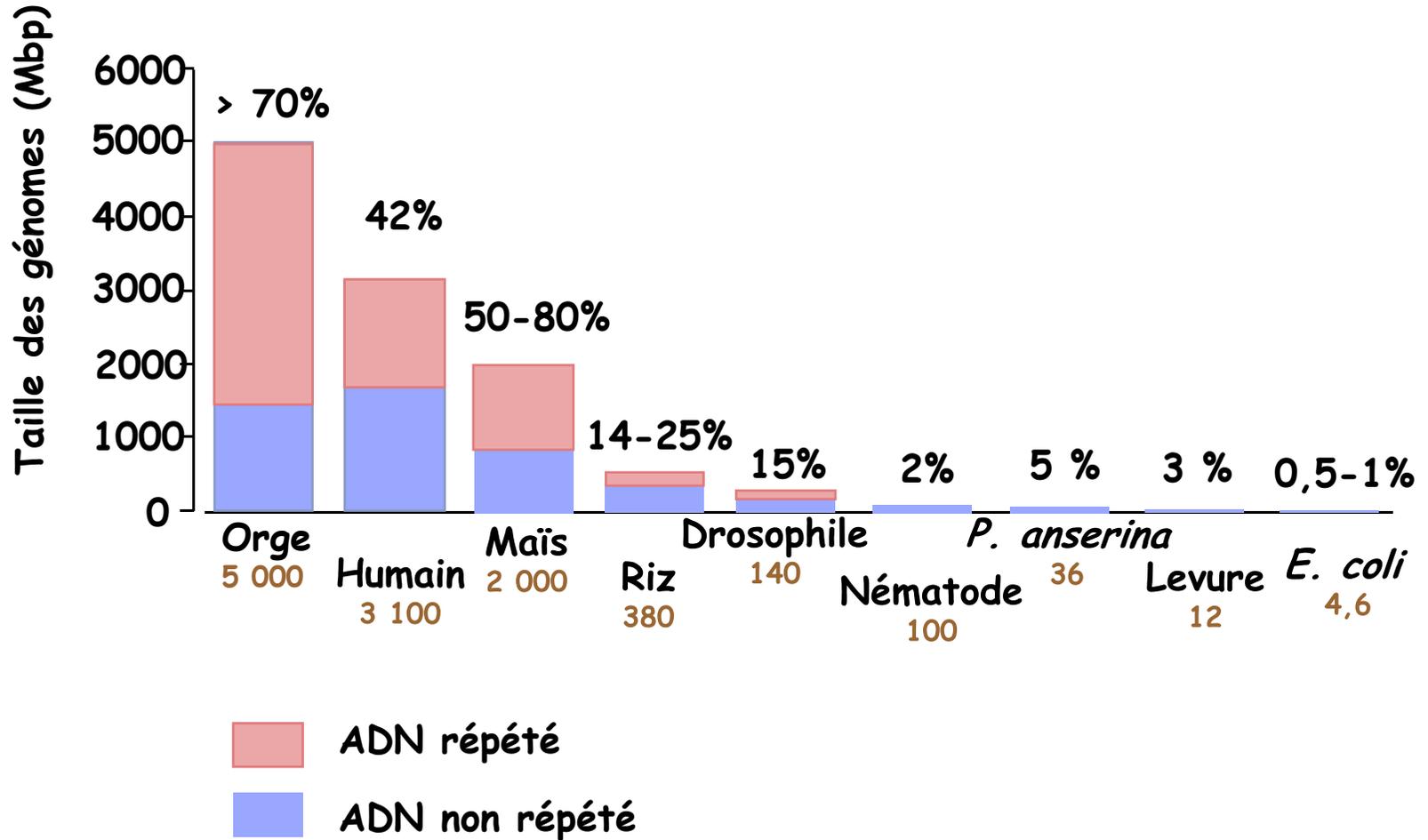
**Protéines  
prédites**

**15 800**

**6 522**

**13 342**

# ADN répété et taille des génomes

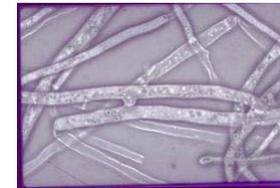


# ADN répété et taille des génomes

## Pezizomycotina



*Tuber  
melanosporum*



*Podospora  
anserina*

Taille en Mb

125

37,5

Protéines  
prédites

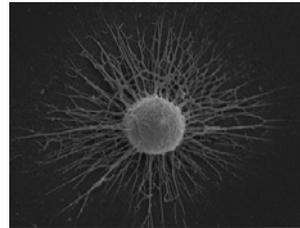
7 496

10 545

**58 % d'ADN répété !**

# Evolution taille des génomes

## Agaricomycotina



*Cryptococcus  
neoformans*



*Coprinus  
cinereus*

Taille en Mb

19

37,5

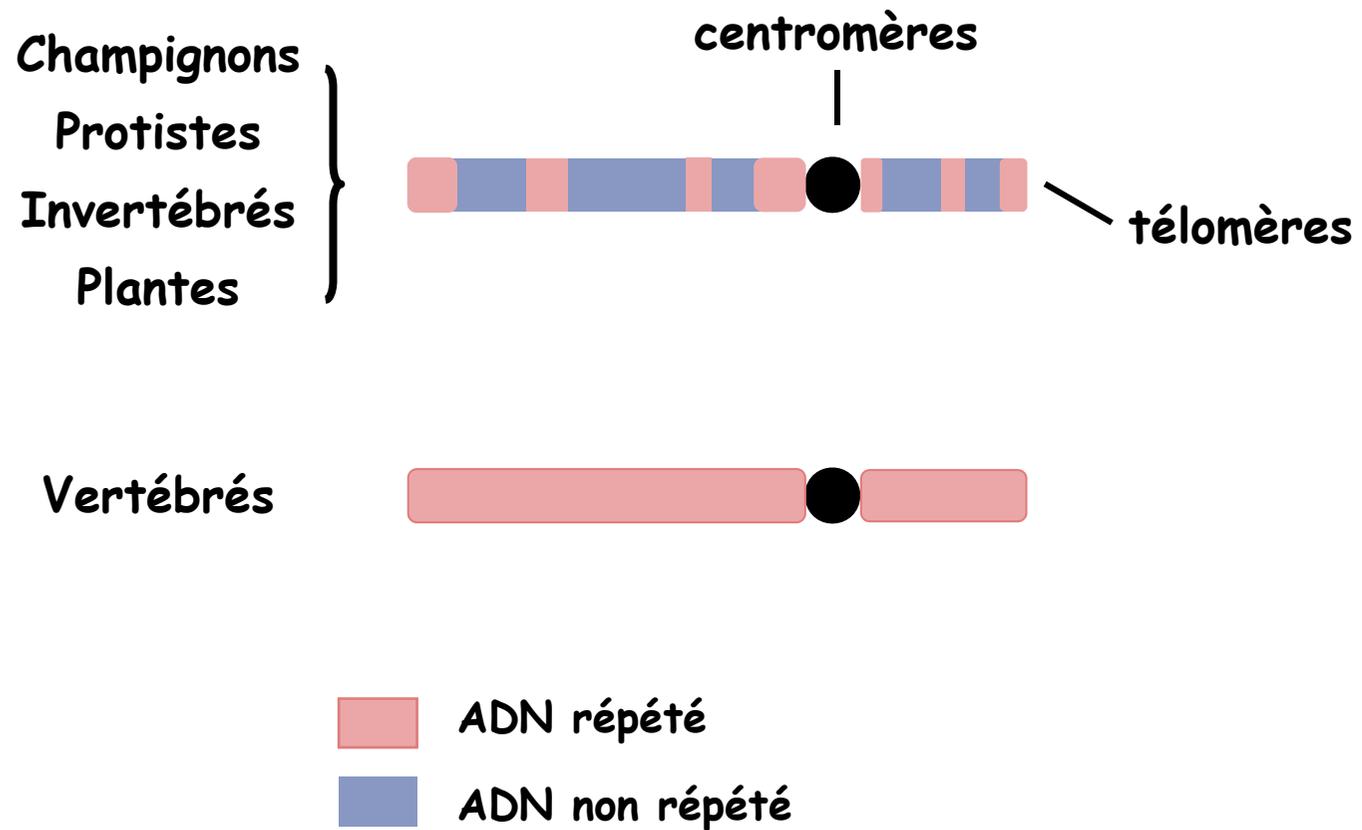
Protéines  
prédites

6 617

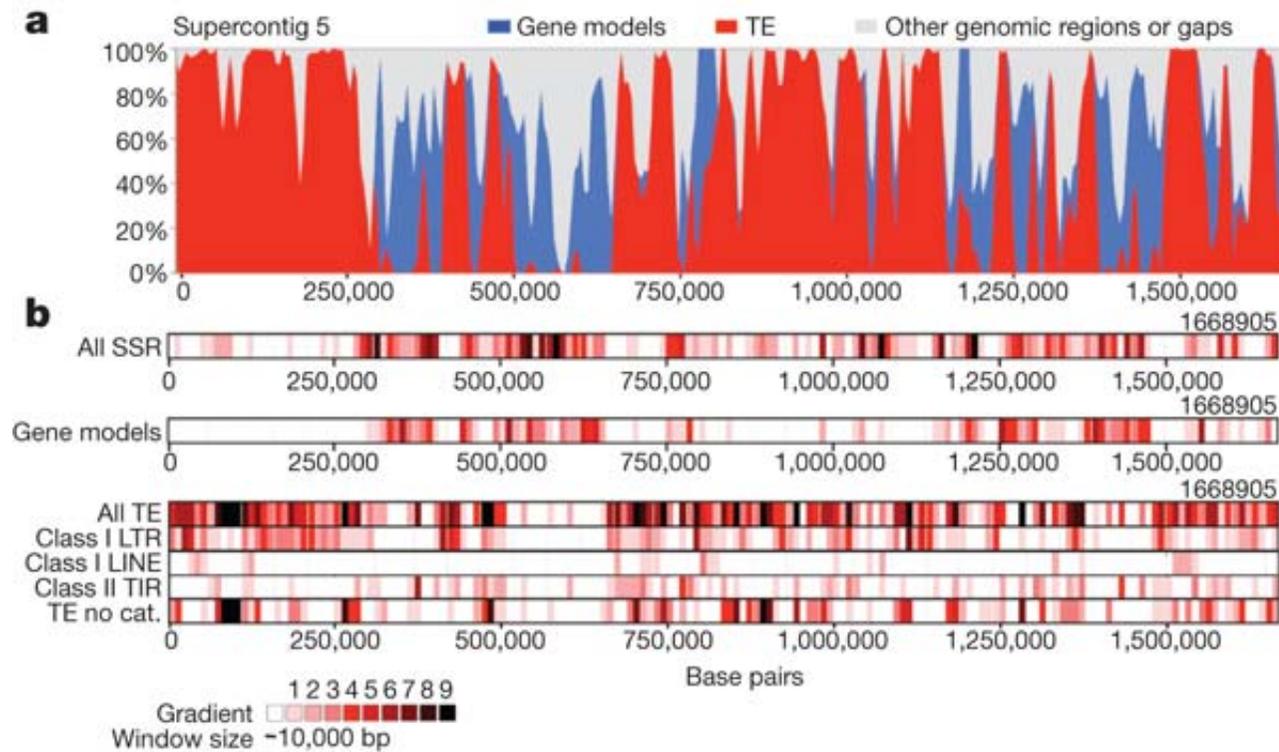
13 342

Evolution régressive d'une espèce pathogène

# Localisation des séquences d'ADN répété dans les génomes d'eucaryotes



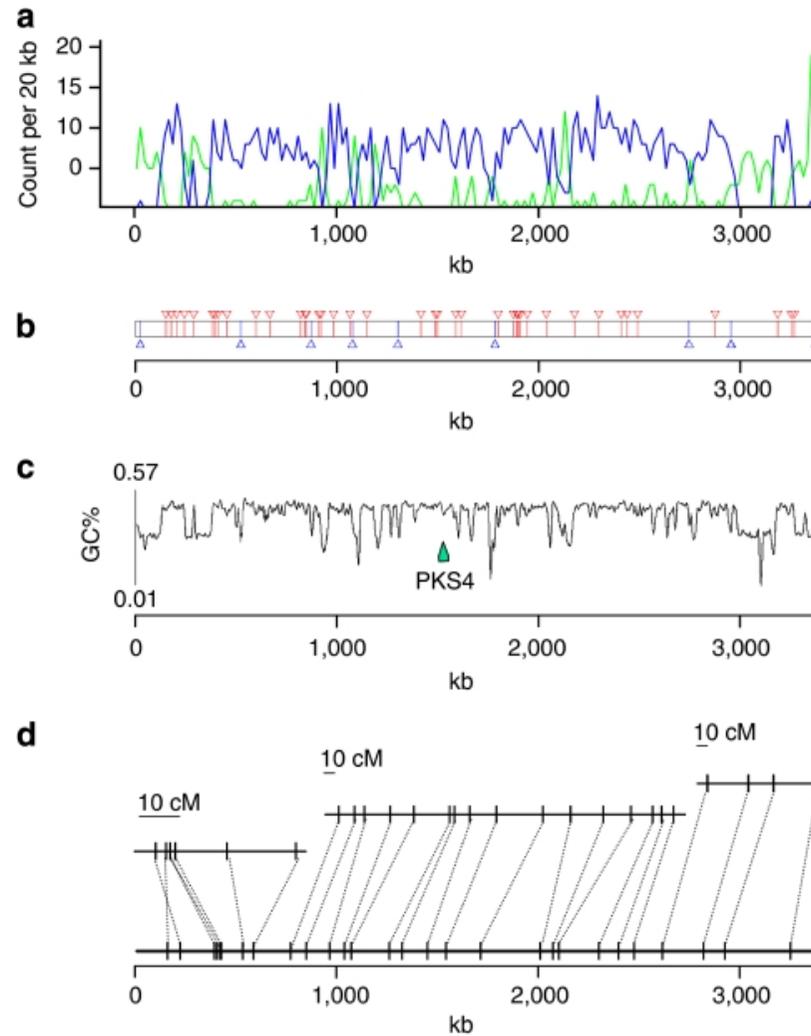
# Paysage génomique chez *Tuber melanosporum*



F Martin *et al.* Nature, 1-6 (2010) doi:10.1038/nature08867

# Paysage génomique chez *Leptosphaeria maculans*

isochores



■ ETs  
■ genes

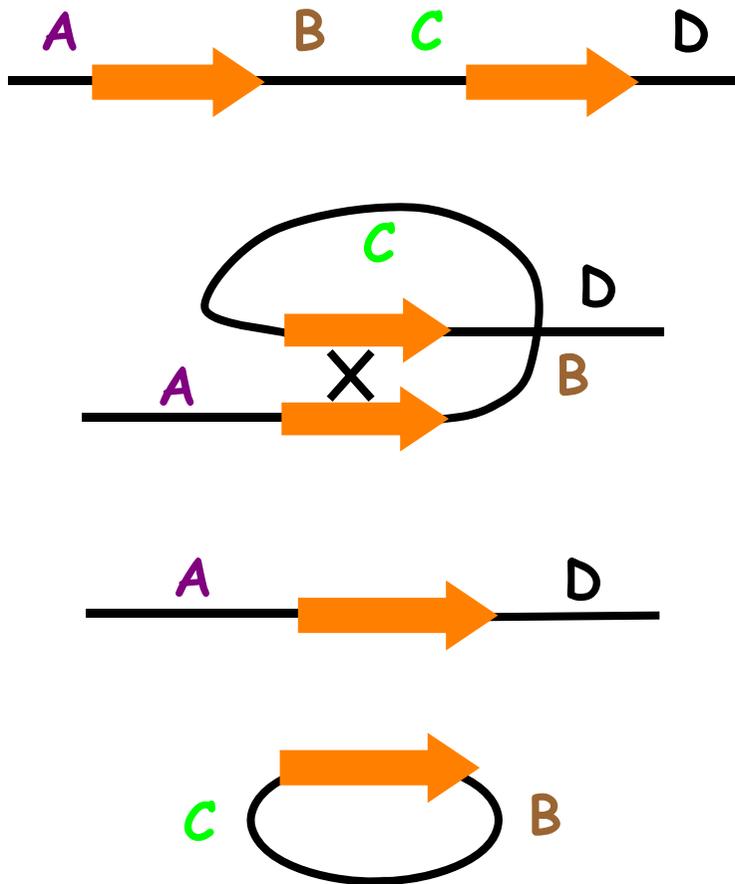
Effecteurs

■ Bloc CG  
■ Bloc AT

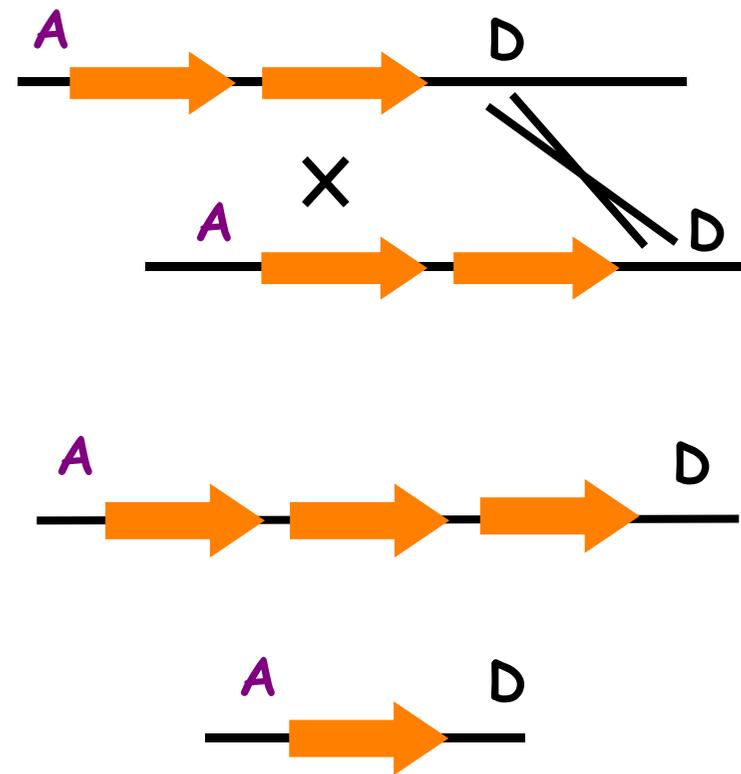
Distorsion  
carte génétique

# ADN répété, facteur d'instabilité chromosomique

## Délétions

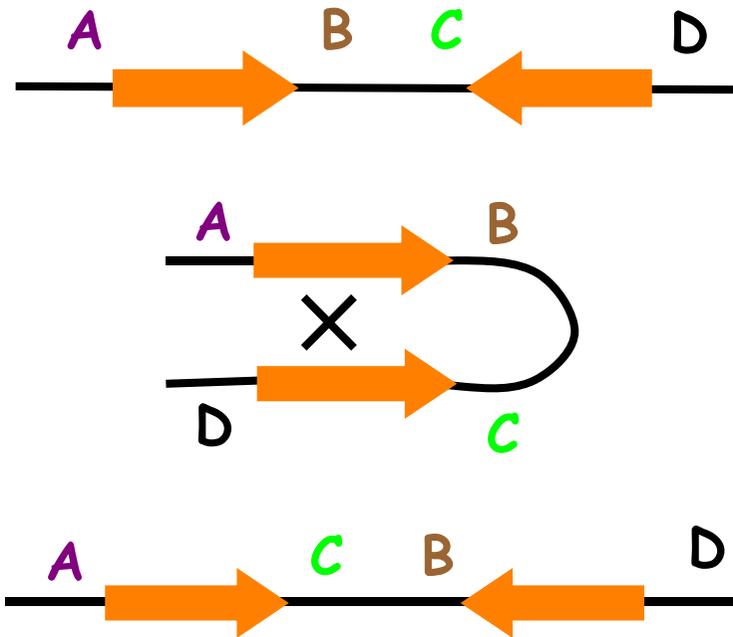


## Amplifications

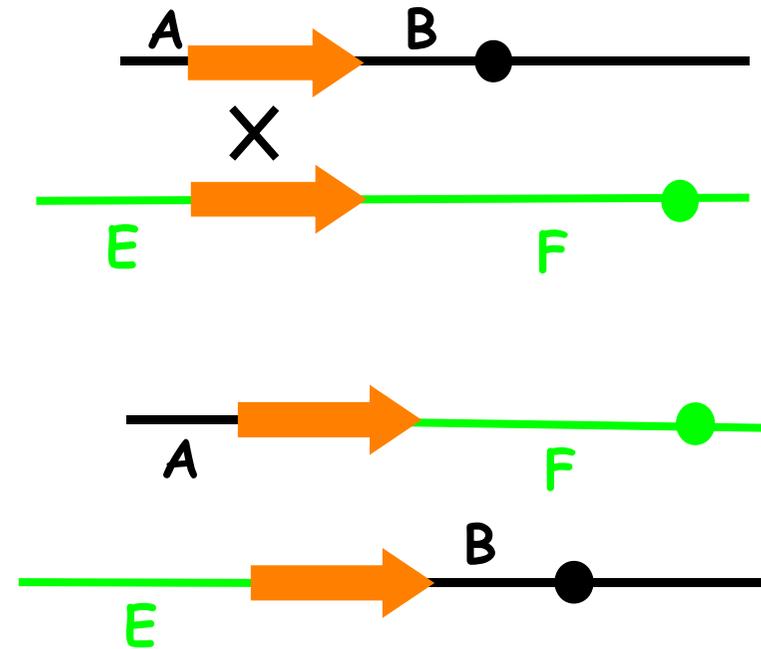


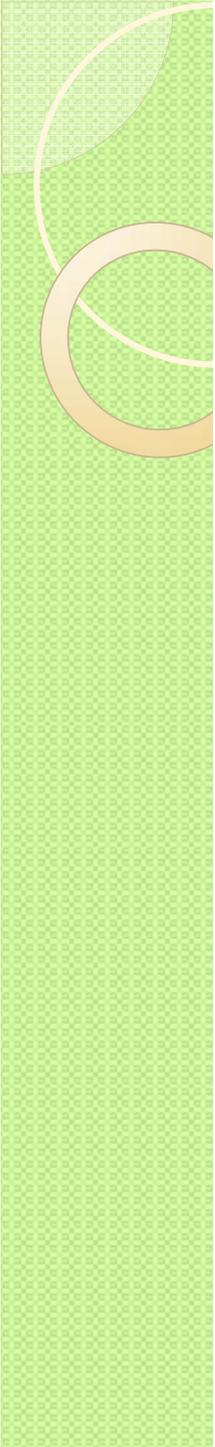
# ADN répété, facteur d'instabilité chromosomique

## Inversions



## Translocations





# ADN répété et balance coûts/bénéfices

- Augmentation « bruit de fond » transcriptionnel (A. Bird)
  - Mobilisation d'enzymes cellulaires
- Instabilité génomique importante
  - Gènes : perte, amplification & modification de leur expression
  - Introduction variabilité génétique chez espèces qui ne recourent pas à la reproduction sexuée

=> **Systemes de defense**



# Extinction post-transcriptionnelle (PTGS)

Interférence à ARN

# *Caenorhabditis elegans* & interférence à ARN

## **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans***

1998

**Andrew Fire<sup>\*</sup>, SiQun Xu<sup>\*</sup>, Mary K. Montgomery<sup>\*</sup>, Steven A. Kostas<sup>\*†</sup>, Samuel E. Driver<sup>‡</sup> & Craig C. Mello<sup>‡</sup>**

*<sup>\*</sup> Carnegie Institution of Washington, Department of Embryology, 115 West University Parkway, Baltimore, Maryland 21210, USA*

*<sup>†</sup> Biology Graduate Program, Johns Hopkins University, 3400 North Charles Street, Baltimore, Maryland 21218, USA*

*<sup>‡</sup> Program in Molecular Medicine, Department of Cell Biology, University of Massachusetts Cancer Center, Two Biotech Suite 213, 373 Plantation Street, Worcester, Massachusetts 01605, USA*

NATURE | VOL 391 | 19 FEBRUARY 1998



**Prix Nobel 2006 Andrew Fire & Graig Mello**

# *Caenorhabditis elegans* & interférence à ARN

Expériences de transgénèses préalables :

- Régulation expression génique par injection ARN anti-sens :

=> Extinction persistante et spécifique de l'expression du gène cible

Hypothèse : hybridation ARNm/ARN anti-sens = ARN double brin

=> Inhibition de la traduction

Mais avec expériences témoins : ARN sens = résultats analogues

- Extinction durable

- Transmissible alors que ARN dégradé rapidement

???

# *Caenorhabditis elegans* & interférence à ARN

## - Injection d'ARN db :

- > Extinction est 100 X plus efficace qu'avec ARN sb
- > Cibles très variées : tous types de protéines
- > Propriété systémique : extinction perdue après dilution extrême de l'ARN db initialement injecté, héritable mitotiquement et méiotiquement
- > Pas d'extinction si ARNdb homologues à régions promotrices ou introniques

=> RNAi = système d'inactivation de l'expression génique fondé sur identité de séquence via ARNdb

UNIVERSEL

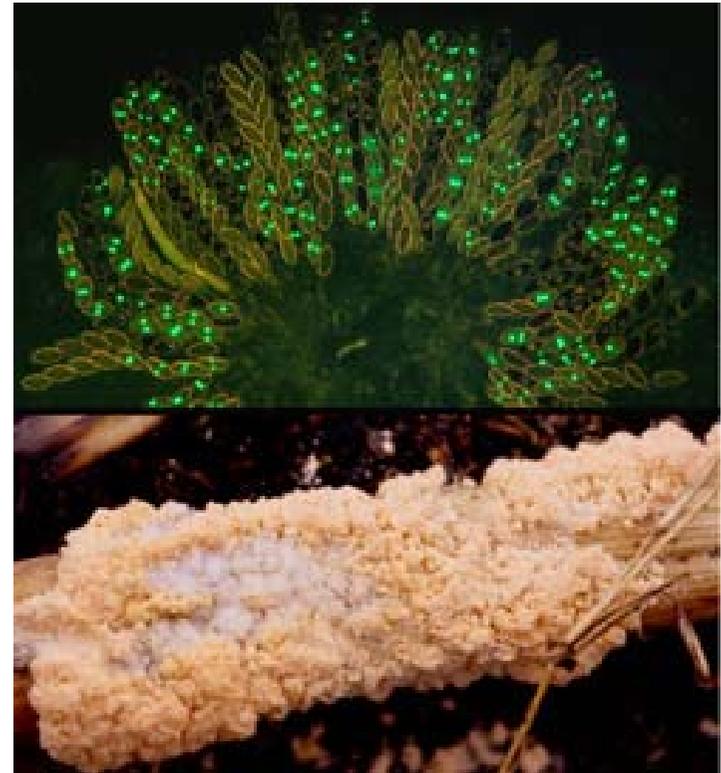
# *Neurospora crassa* & quelling

The EMBO Journal vol.15 no.12 pp.3153–3163, 1996

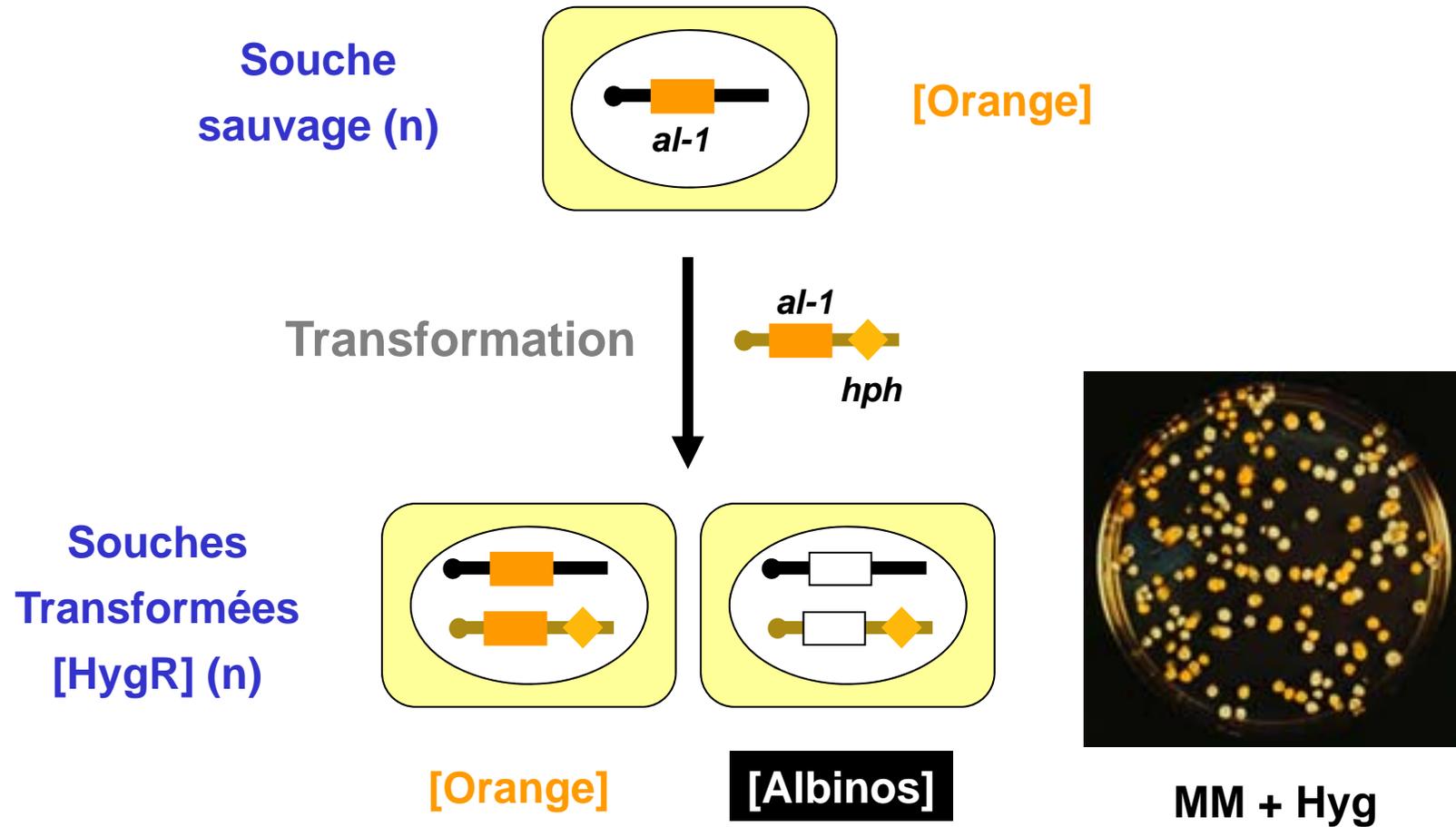
1996

**Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA–DNA interactions or DNA methylation**

**Carlo Cogoni, Jeffrey T.Irelan<sup>1</sup>,  
Marc Schumacher<sup>2</sup>,  
Thomas J.Schmidhauser<sup>2</sup>, Eric U.Selker<sup>1</sup>  
and Giuseppe Macino<sup>3</sup>**

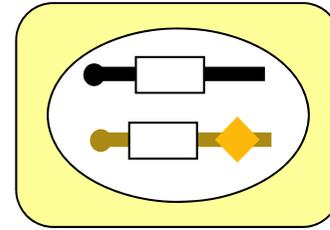


# *Neurospora crassa* & quelling



# *Neurospora crassa* & quelling

Souches  
Transformées  
[HygR]

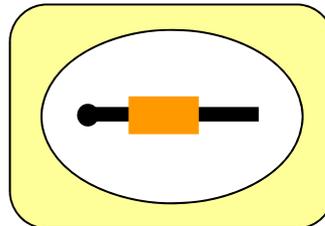


[Albinos]

Ségrégation du transgène  
par croisement

Northern-Blot

Souches  
[HygS]

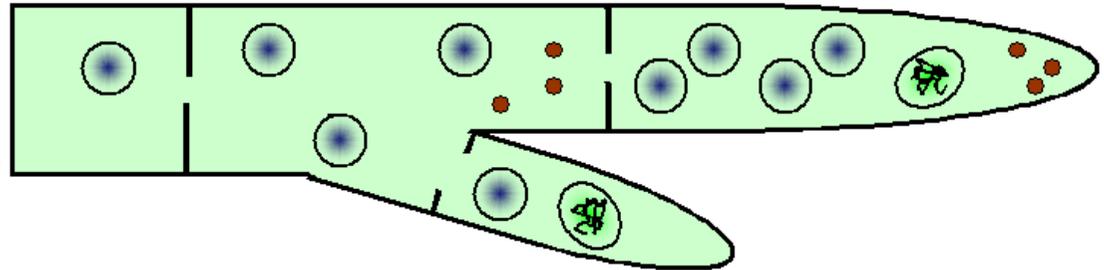


[Orange]

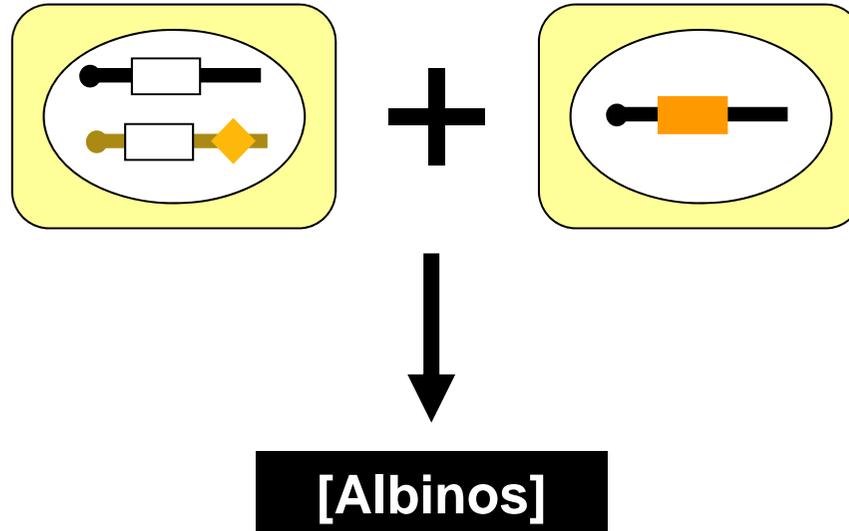
Pas d'ARNm *al-1*  
détectable

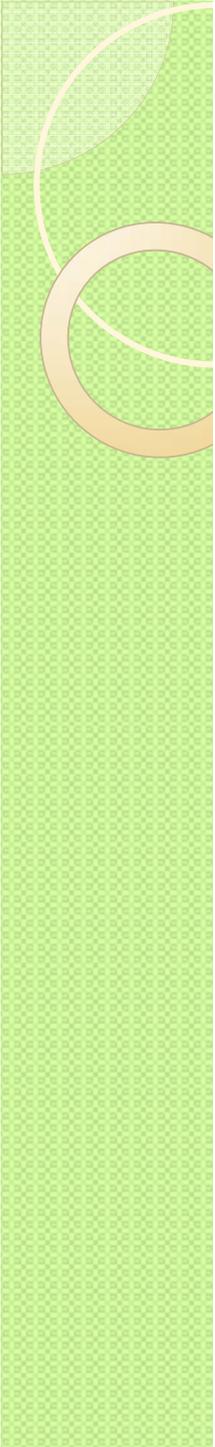
[Albinos]

# *Neurospora crassa* & quelling



Construction  
d'hétérocaryons  
(n)





# *Neurospora crassa* & quelling

## Propriétés du quelling:

- > Dépend de l'homologie de séquence
- > Des portions de gène peuvent induire quelling sauf séquences promotrices
- > Inactivation réversible
- > Affecte la production ou la stabilité des ARNm
- > Dominant
- > Transmissible mitotiquement

# Extinction épigénétique post-transcriptionnel de l'expression génique

Epigénétique, introduit par Conrad Waddington (1942) :  
l'étude des changements héréditaires dans la fonction des gènes, ayant lieu sans altération de la séquence d'ADN

*C. elegans*



Déficients RNAi

*N. crassa*



Déficients quelling

*A. thaliana*

*N. tabacum*



Déficients PTGS

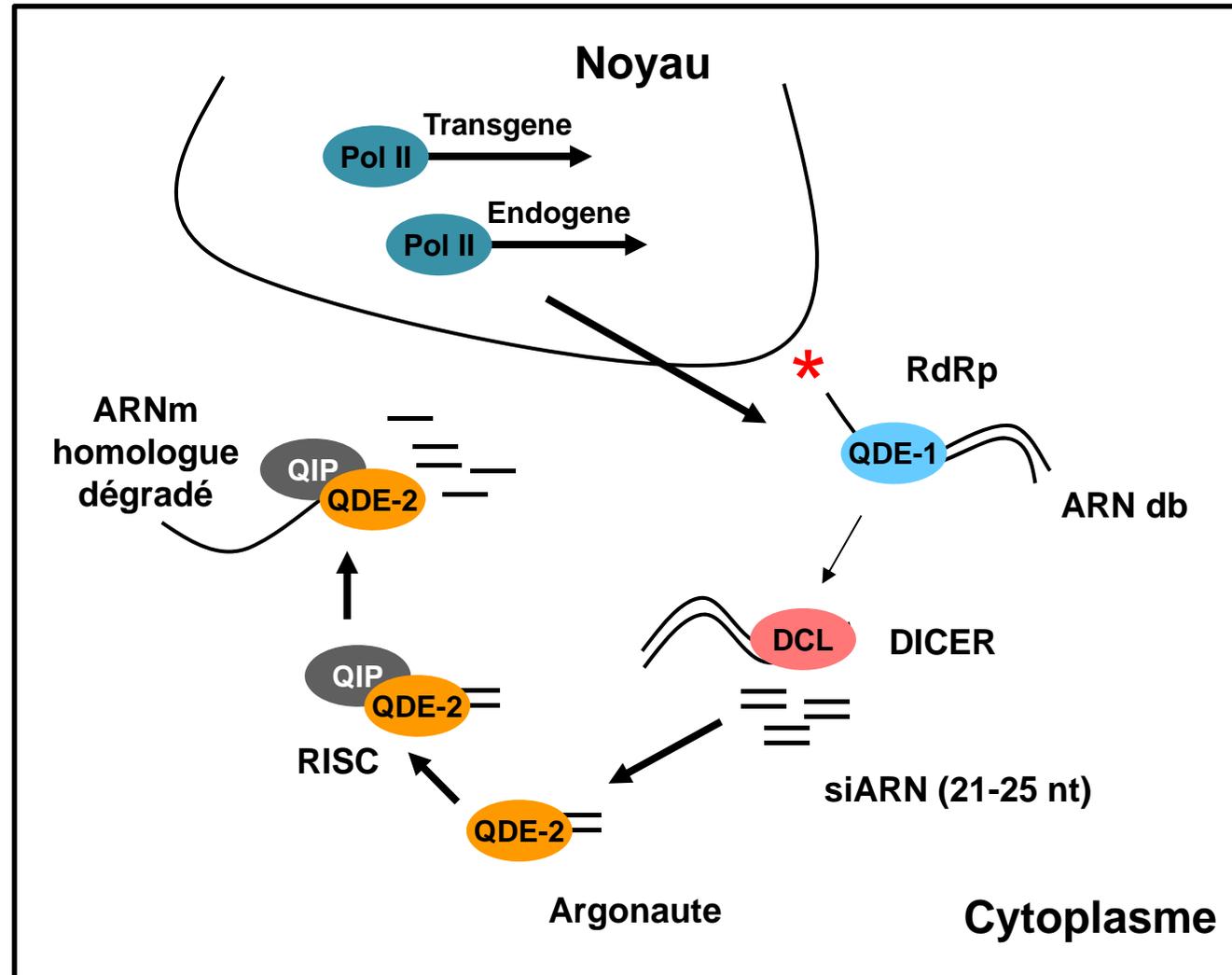
---

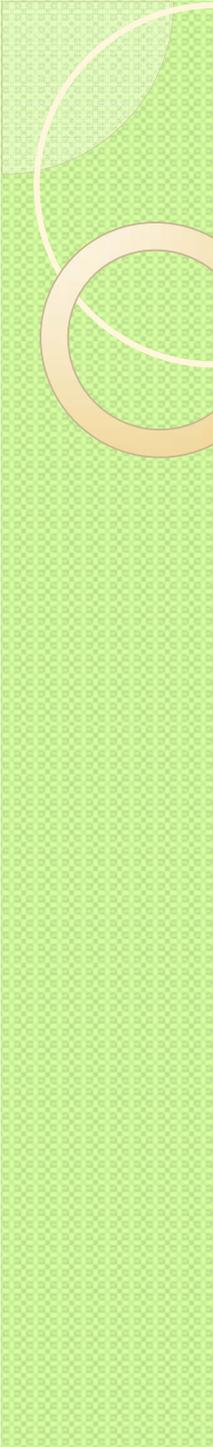
Un seul et même système : interférence à ARN

# Quelques mutants clefs d'élucidation du mécanisme d'action de l'interférence à ARN

Gènes		Fonction	Phénotype mutant <i>C. elegans</i>
<i>C. elegans</i>	<i>N. crassa</i>		
<i>dcr-1</i>	<i>DCL-1</i>	Rnase III ARN db	Stérilité, pléiotropique
<i>ego-1</i>	<i>QDE-1</i>	RdRP	Stérilité, pléiotropique
<i>mut-41</i>	<i>QDE-3</i>	Hélicase ARN	Mutateur, non disjonction chr X
<i>mut-7</i>	<i>QIP</i>	Exonucléase	Stérilité mâle, non disjonction chr X
<i>rde-1</i>	<i>QDE-2</i>	Paz/PIWI (Argonaute) liaison au siRNA	?

# Quelling

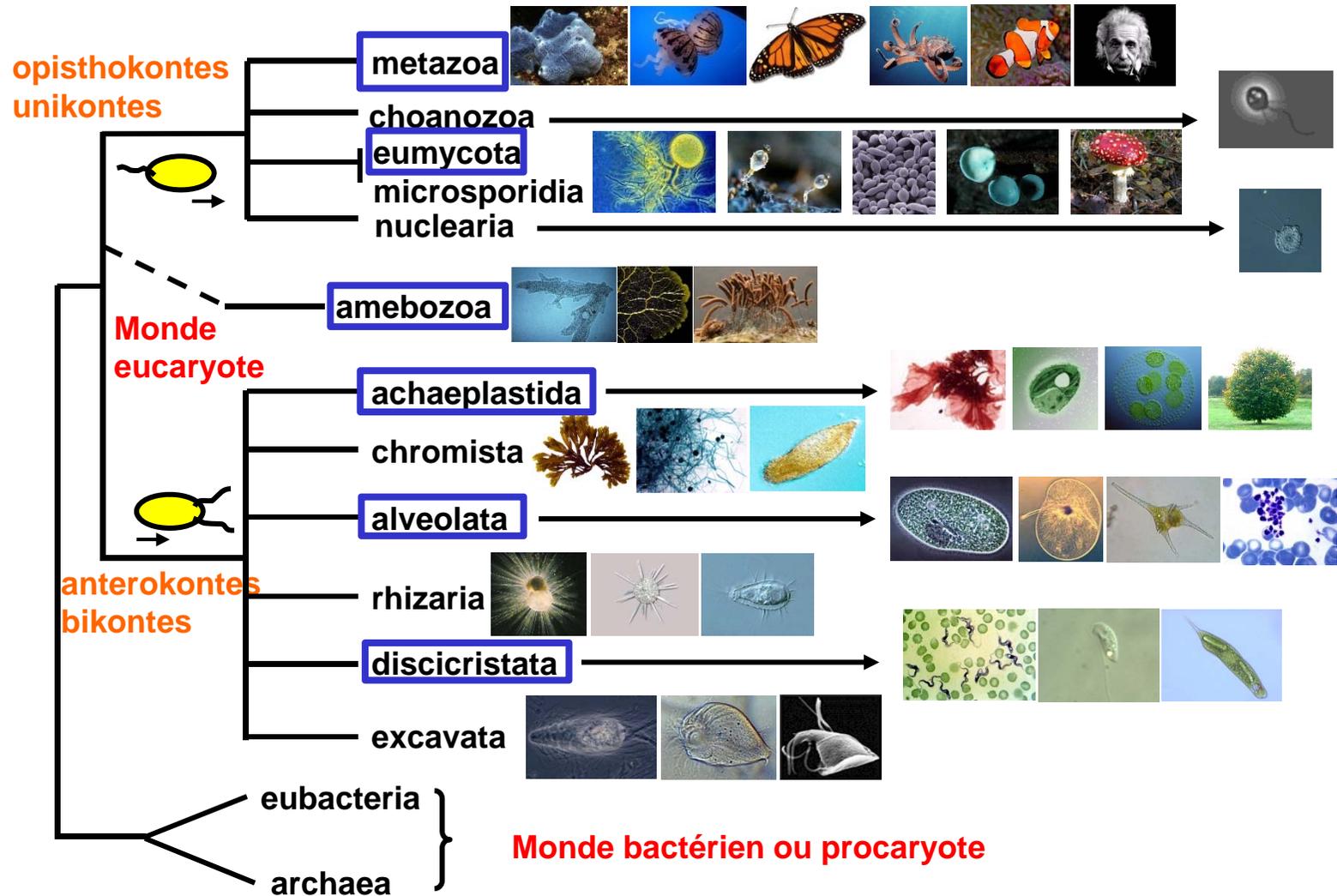




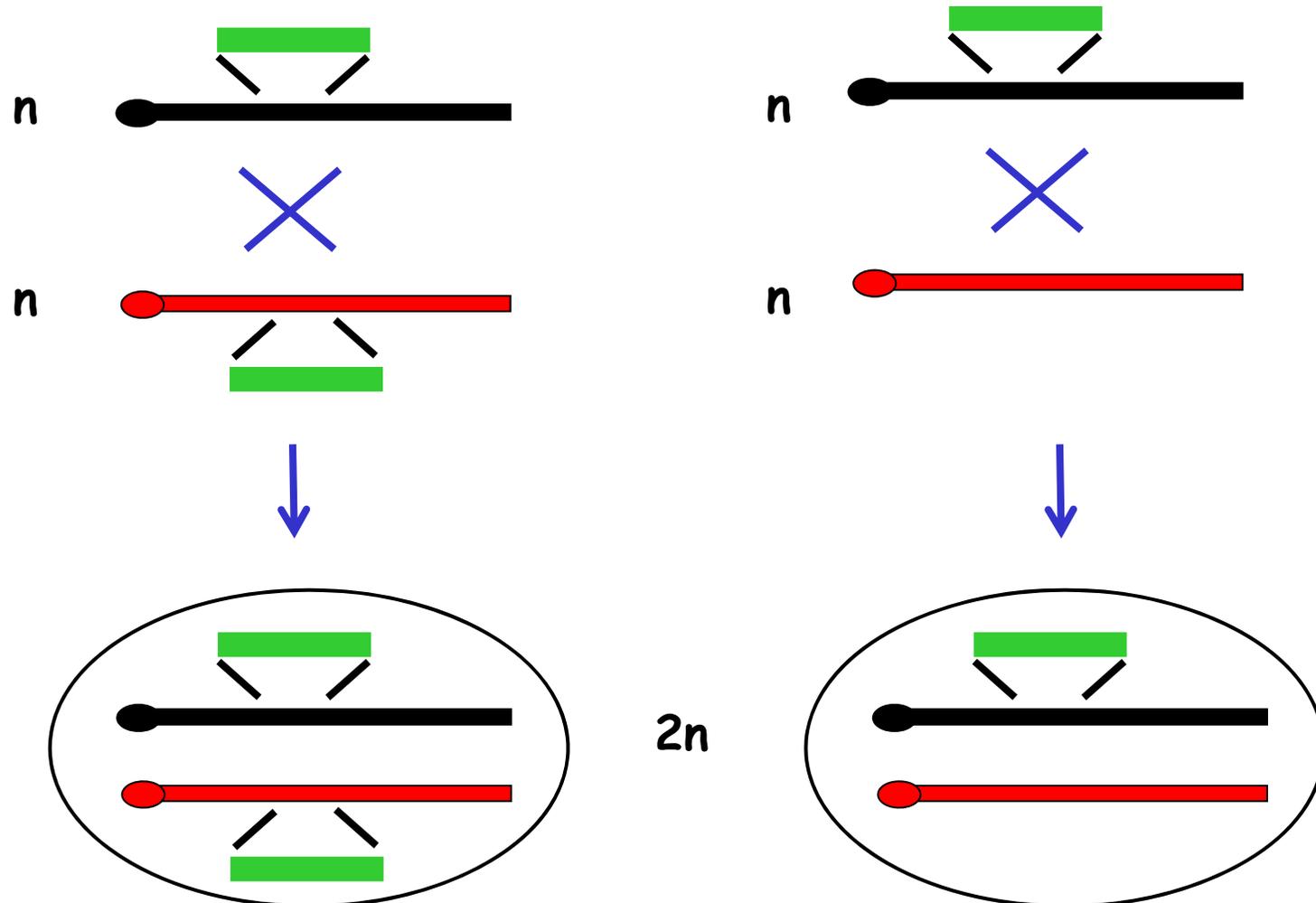
# Origine et rôle(s) de l'interférence à ARN ?

- Evolution à partir d'un système inné de défense contre les virus (ARN / ARNbd)
  - > démontré chez les plantes ~ 90s
- Régulation de l'expression des gènes présents en copies multiples pour limiter :
  - > expansion des transposons/retrotransposons
  - > le « bruit de fond transcriptionnel »
- Devenu processus de régulation de l'expression des gènes au cours du développement (miRNA)

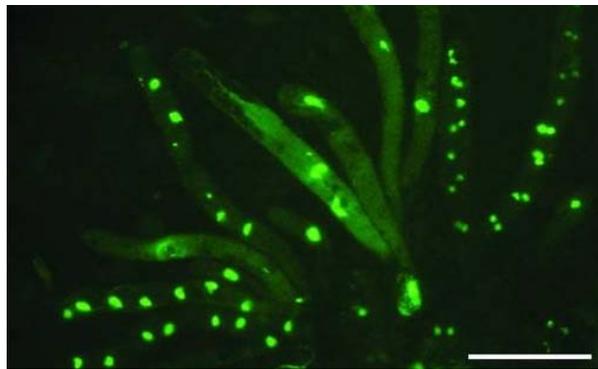
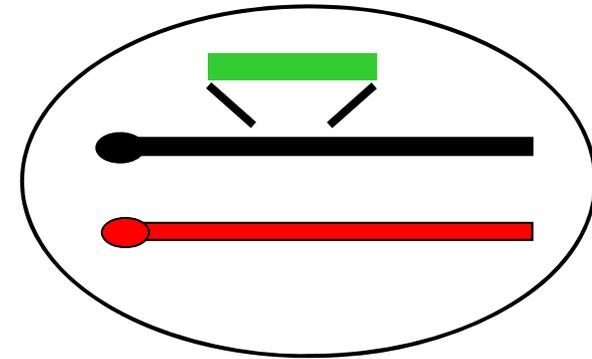
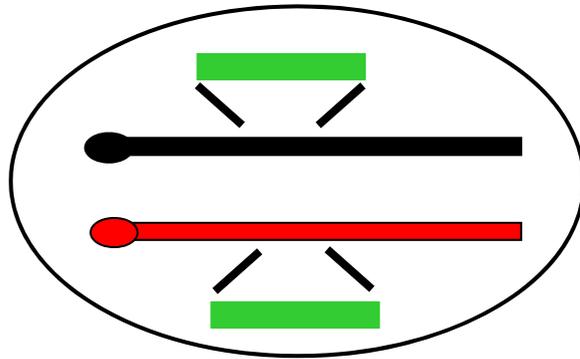
# L'interférence à ARN, un système de contrôle largement répandu



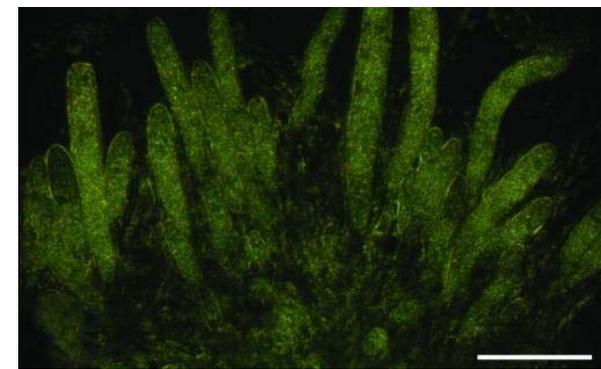
# L'interférence à ARN s'invite pendant la reproduction sexuée chez *N. crassa*



# L'interférence à ARN s'invite pendant la reproduction sexuée chez *N. crassa*



Prophase  
de  
méiose I



**MSUD -> Meiotic Silencing of Unpaired DNA**

Shiu et al., *PNAS* 2006 Feb 14;103(7):2243-8

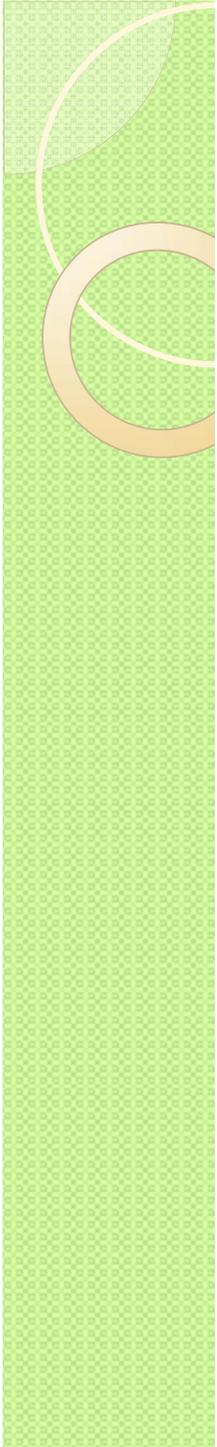
## Mutants de *N. crassa* déficients pour le MSUD

mutants MSUD	mutants Quelling	Fonction
<i>sms-3</i>	<i>DCL-1</i>	Rnase III ARN db
<i>Sad-1</i>	<i>QDE-1</i>	RdRP
<i>Sms-2</i>	<i>QDE-2</i>	Paz/PIWI (Argonaute) liaison au siRNA

Quelling (végétatif) ⇔ MSUD (méiotique)

- Reconnaissance ARNm cibles via siARN guides
- Dégradation via complexe RISC/argonaute

**Mécanisme similaire impliquant acteurs communs**



# Extinction génique transcriptionnelle (TGS)



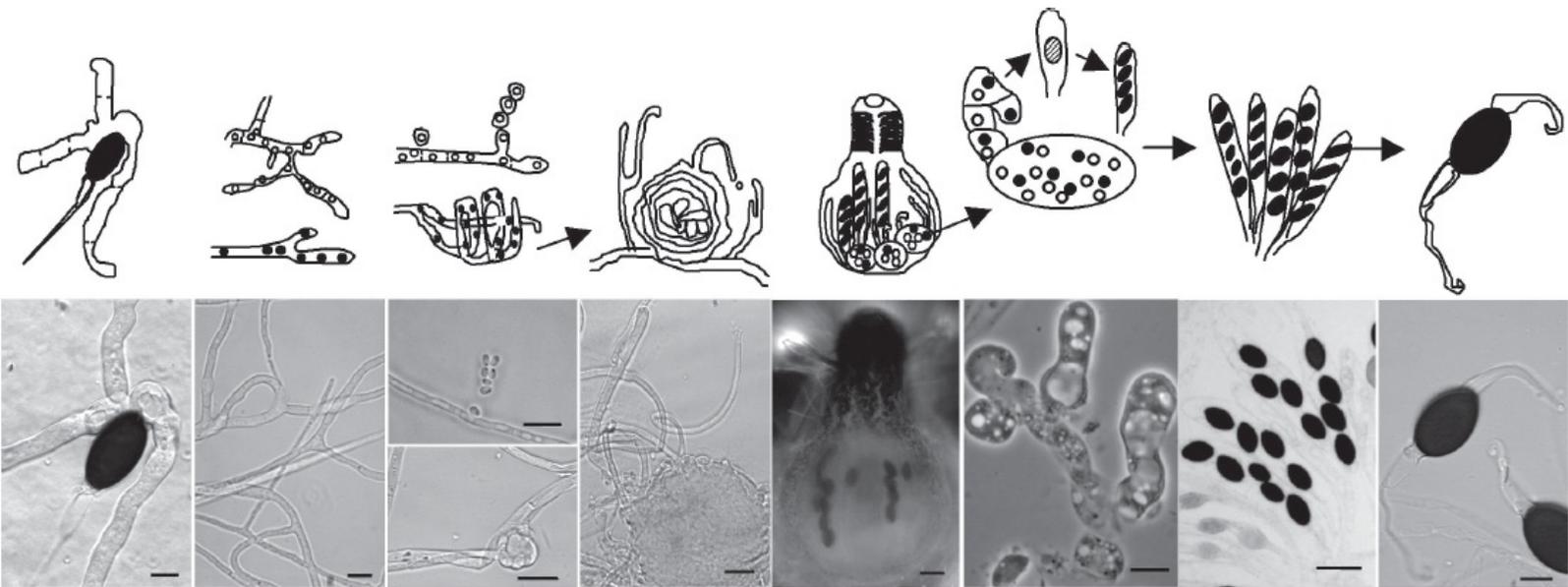
Research Articles

# A Portable Signal Causing Faithful DNA Methylation de Novo in *Neurospora crassa*

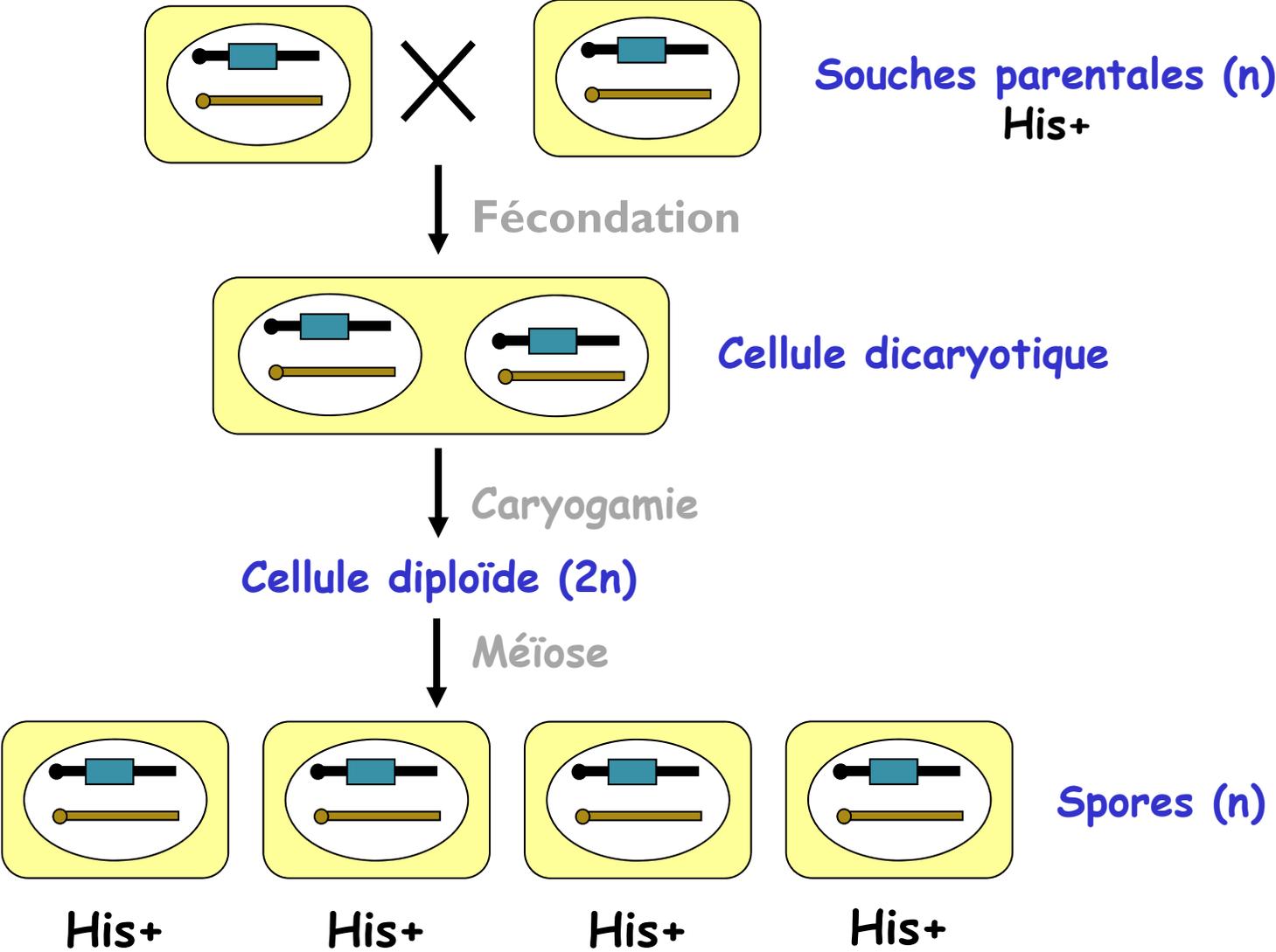
ERIC U. SELKER, BRYAN C. JENSEN, GLADYS A. RICHARDSON

Science **1987** Oct 2;238(4823):48-53.

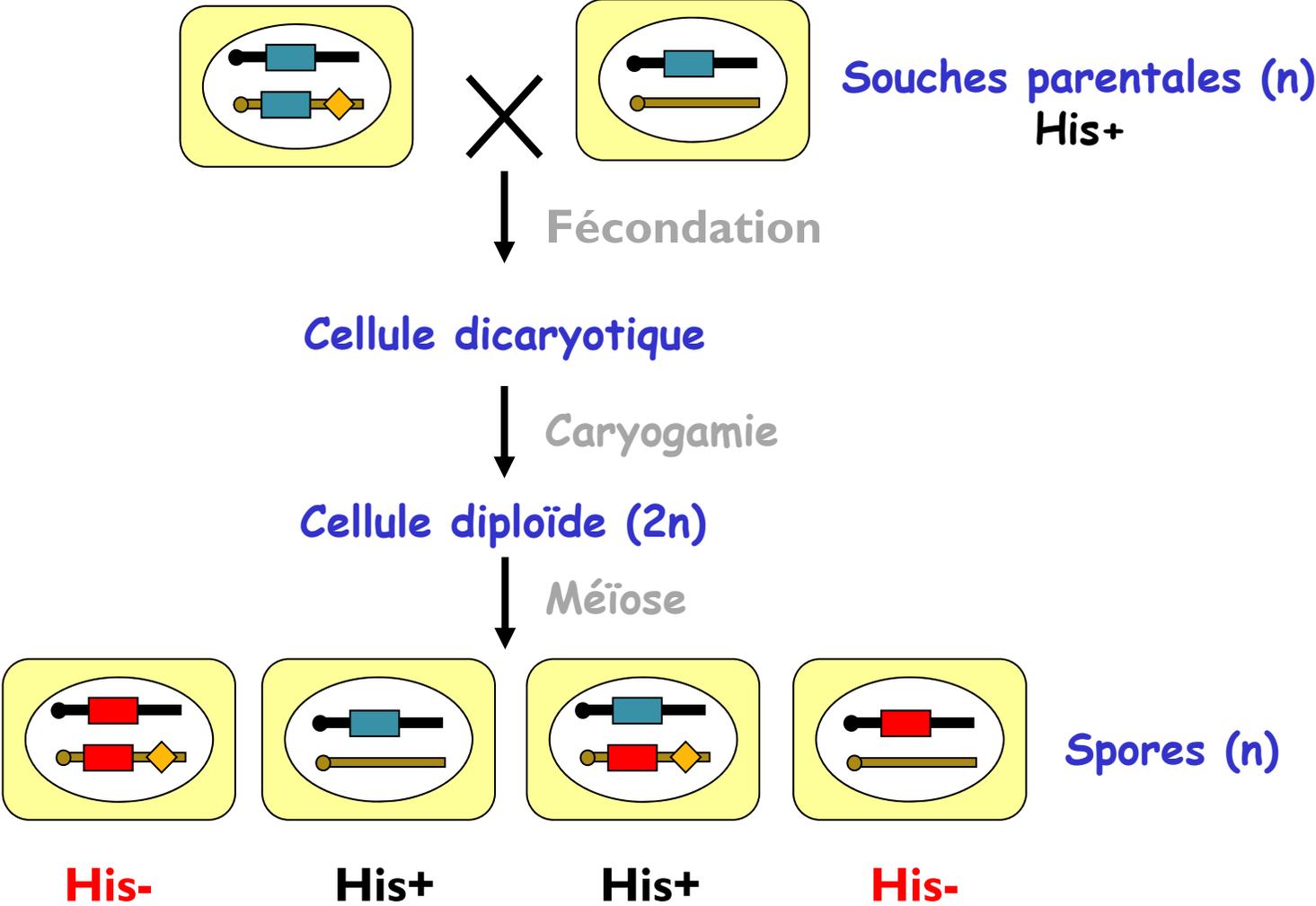
# Reproduction sexuée chez les pezizomycètes



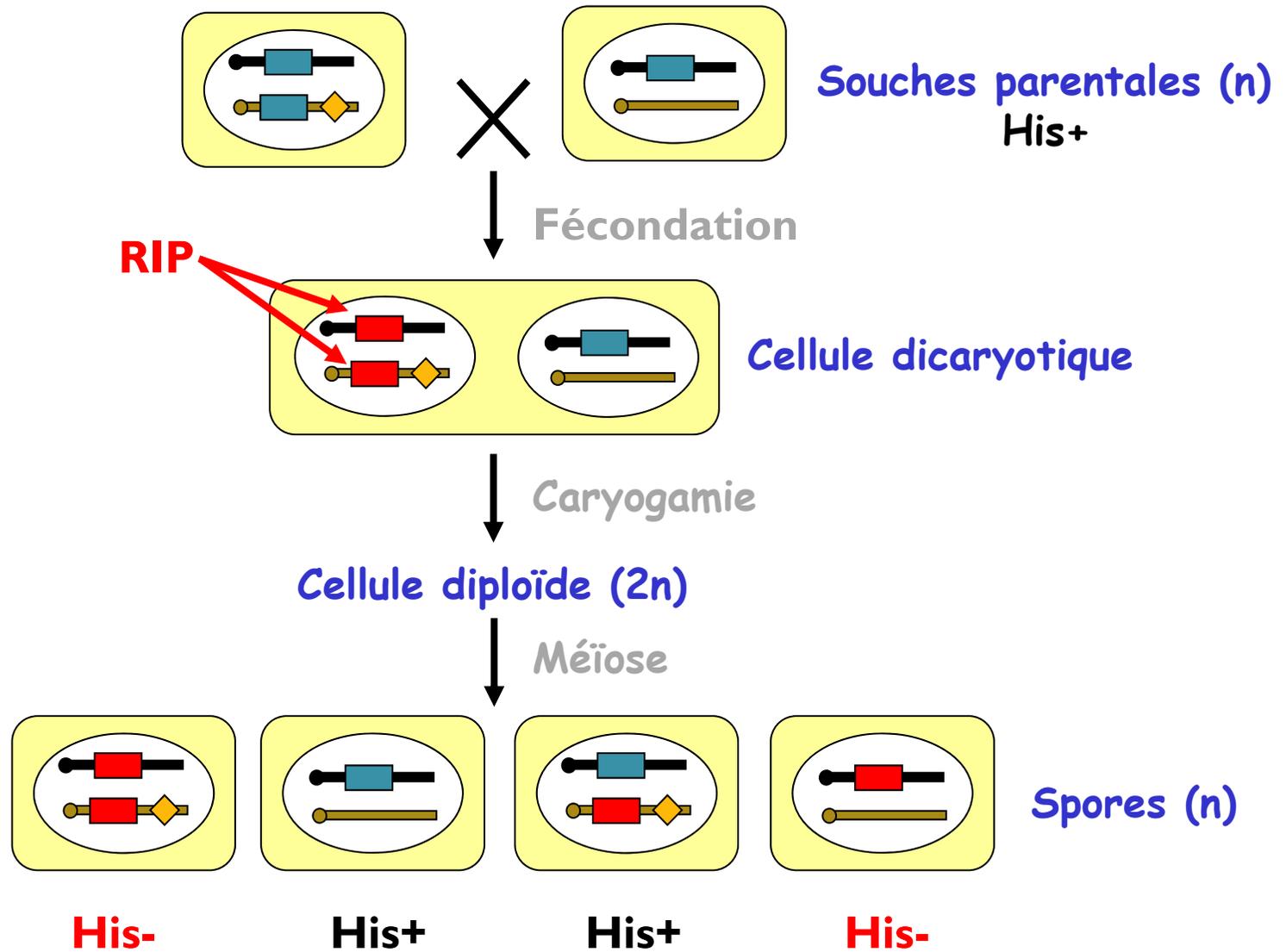
# Repeat Induced Point mutation (RIP) chez *N. crassa*



# RIP chez *N. crassa*



# RIP chez *N. crassa*



# Conséquences du RIP

\* Introduction de mutations dans les séquences « ripées »

-> transitions préférentielles CpA vers TpA = favorise création de pseudo-gènes, introduction codons non sens

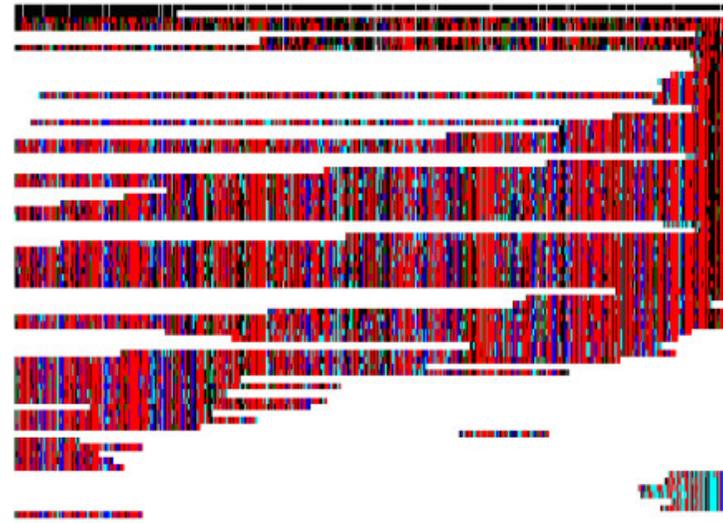
	1 CpA (→TpA)	2 CpC (→TpC)	3 CpG (→TpG)	4 CpT (→TpT)
<i>A. Model: Neurospora crassa Tad de-RIP consensus of 8 elements: 4105 bp, 48.6% GC</i>				
Composition	173	570	310	633
Test element: Tad8 (28.0% GC)				
Top strand C → T	84	14	25	144
Bottom strand C → T	50	9	10	115
Sum	134	23	35	259
Dinucleotides remaining <sup>b</sup>	74	305	124	524
Mutated (%)	77.5	7.3 <sup>c</sup>	60.0 <sup>c</sup>	40.9

Clutterbuck AJ. Fungal Genet Biol. 2011Mar;48(3):306-26

# Conséquences du RIP : cicatrices génomiques

A

transposon  
*Stagonospora nodorum*



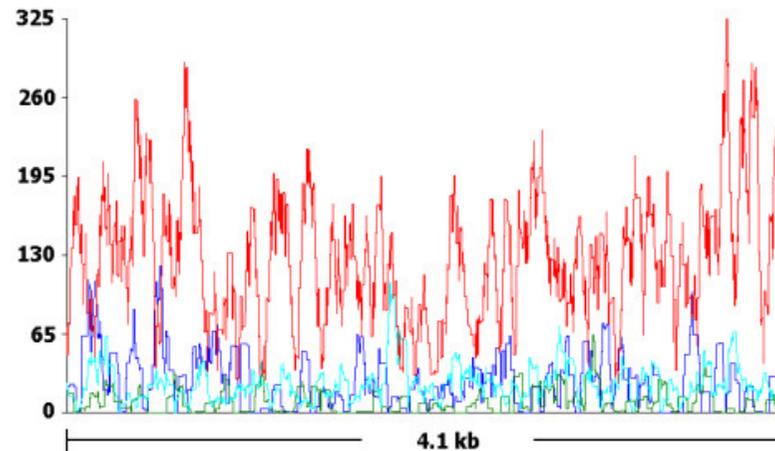
B

CpA ← TpA  
TpG → TpA

CpC ← TpC  
GpG → GpA

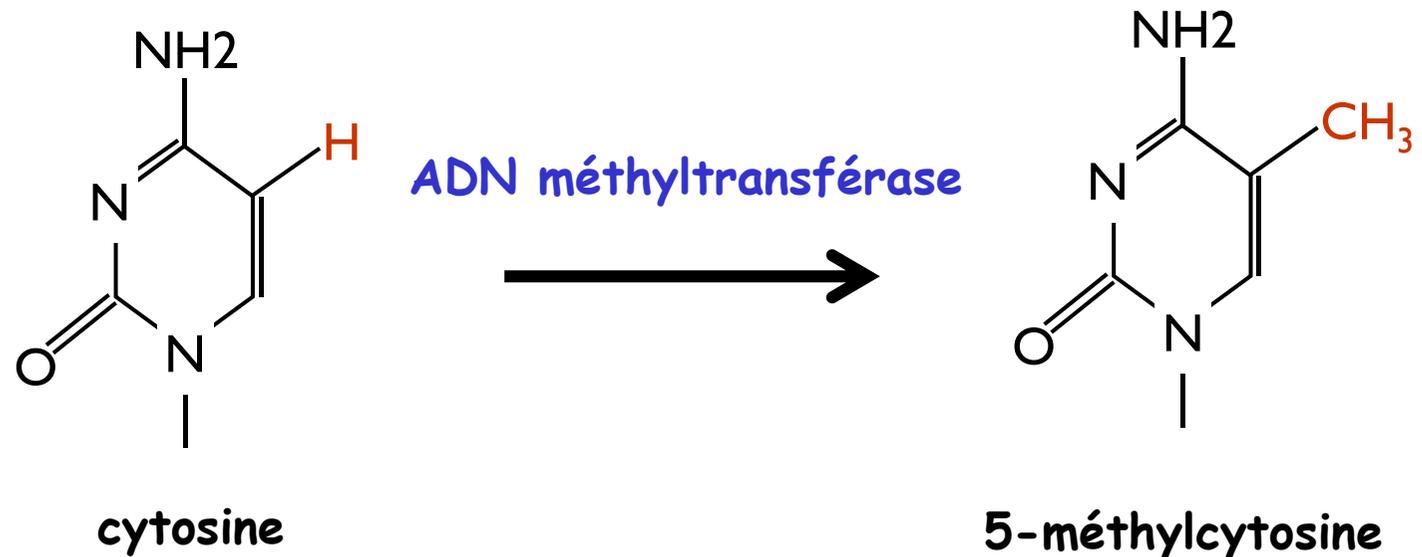
CpG ← TpG  
CpG → CpA

CpT ← TpT  
ApG → ApA



# Conséquences du RIP : méthylation de l'ADN

\* Méthylation des cytosines des séquences « ripées »

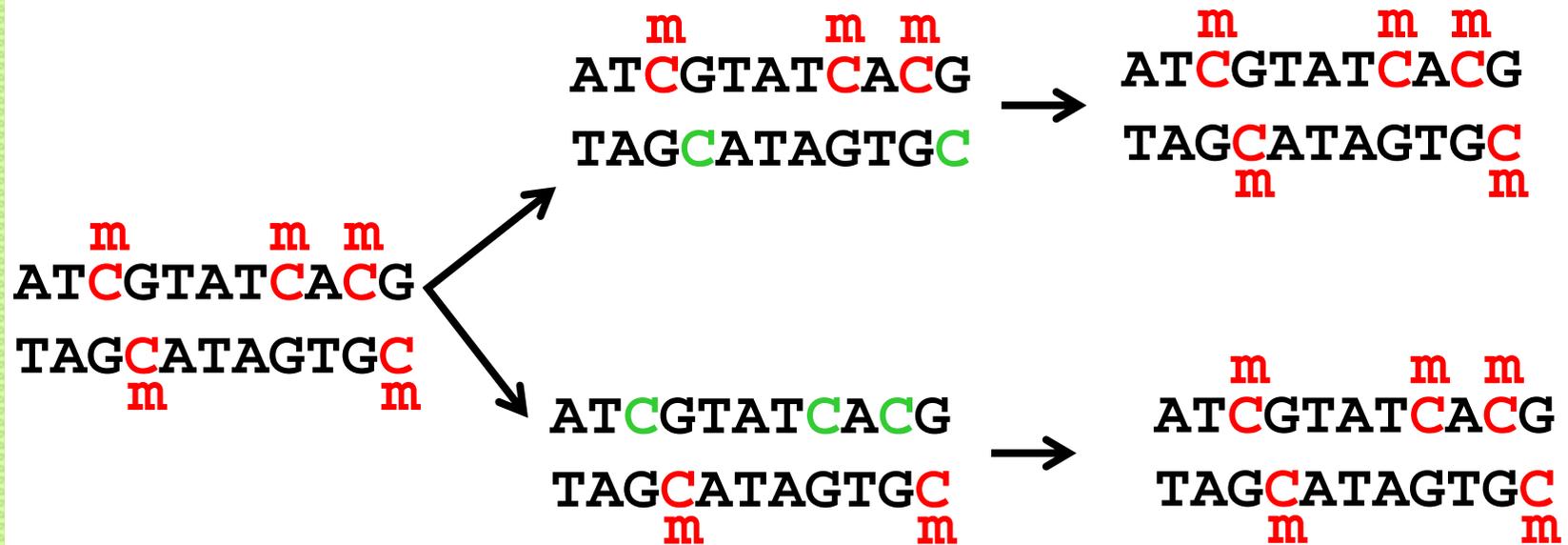


**Modifications des propriétés chimiques de l'ADN =>  
importantes conséquences biologiques  
MAIS réversible = commutateur**

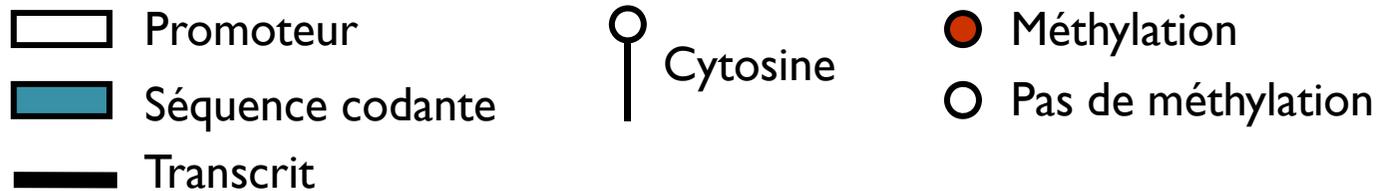
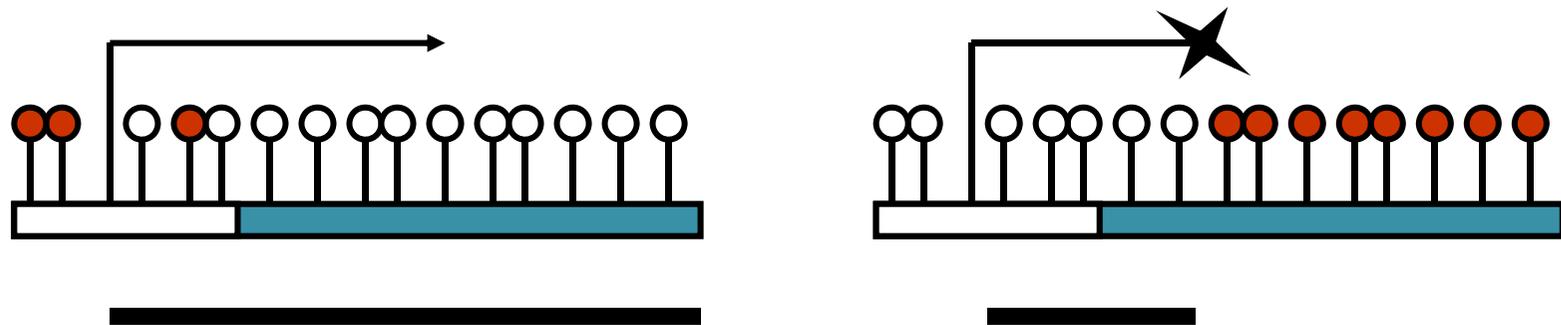


# Méthylation de l'ADN chez les eucaryotes

## Méthylation de maintenance

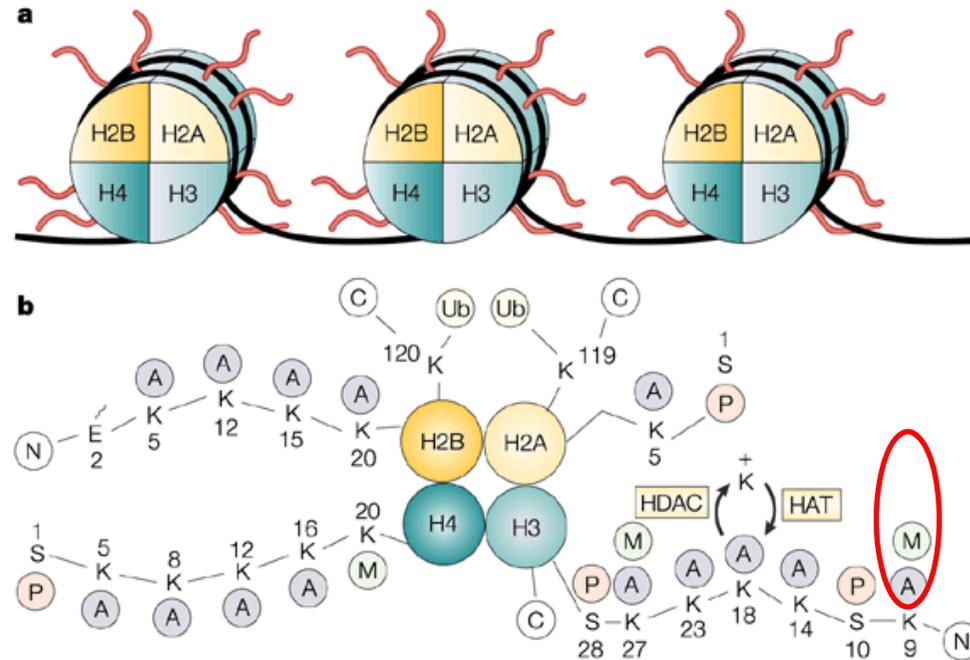


# Conséquences du RIP : méthylation de l'ADN



**Méthylation des cytosines des séquences « ripées »**  
**-> inhibition réversible de l'élongation de la transcription**

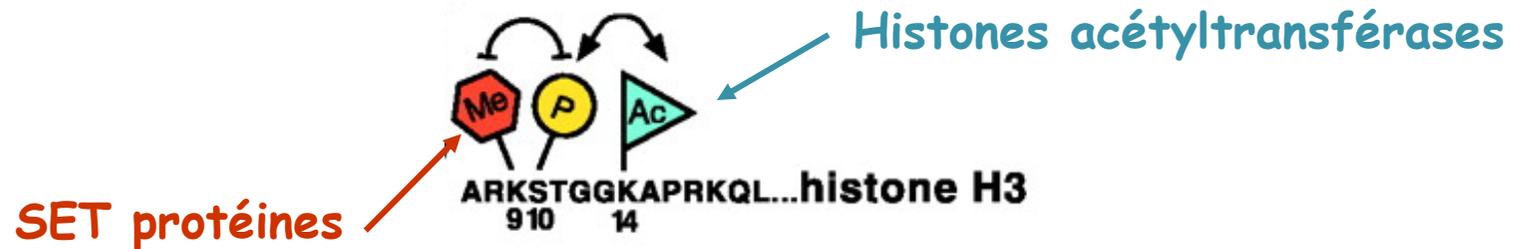
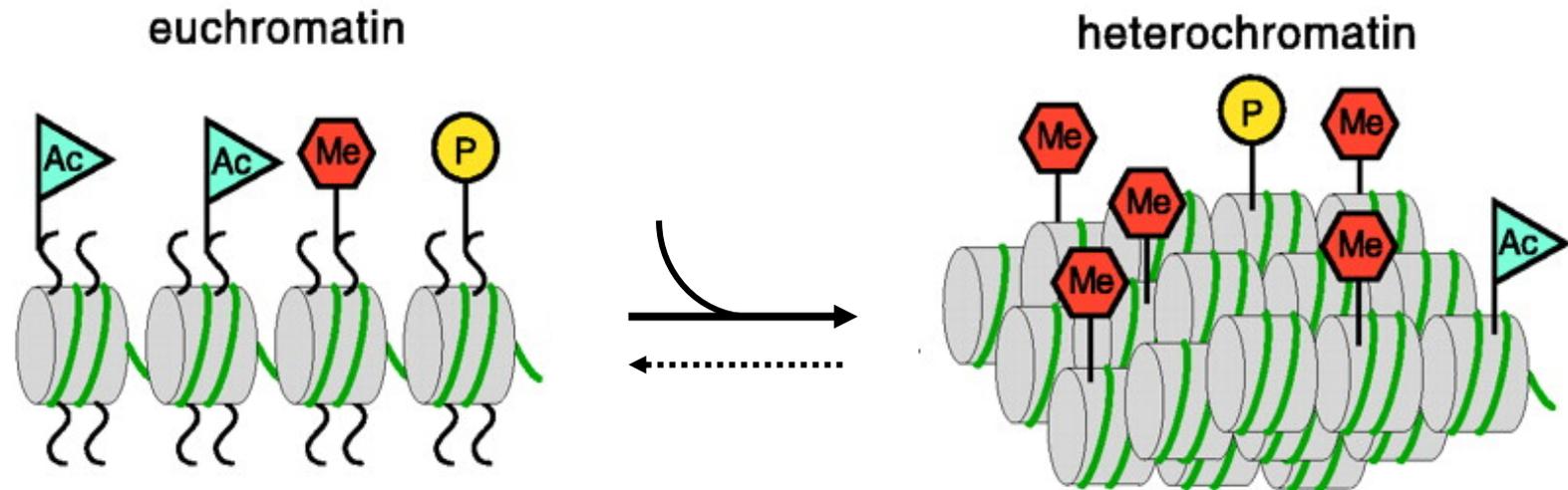
# Structure de la chromatine



Nature Reviews | Cancer

**modifications post-traductionnelles => code des histones**

# Code des histones

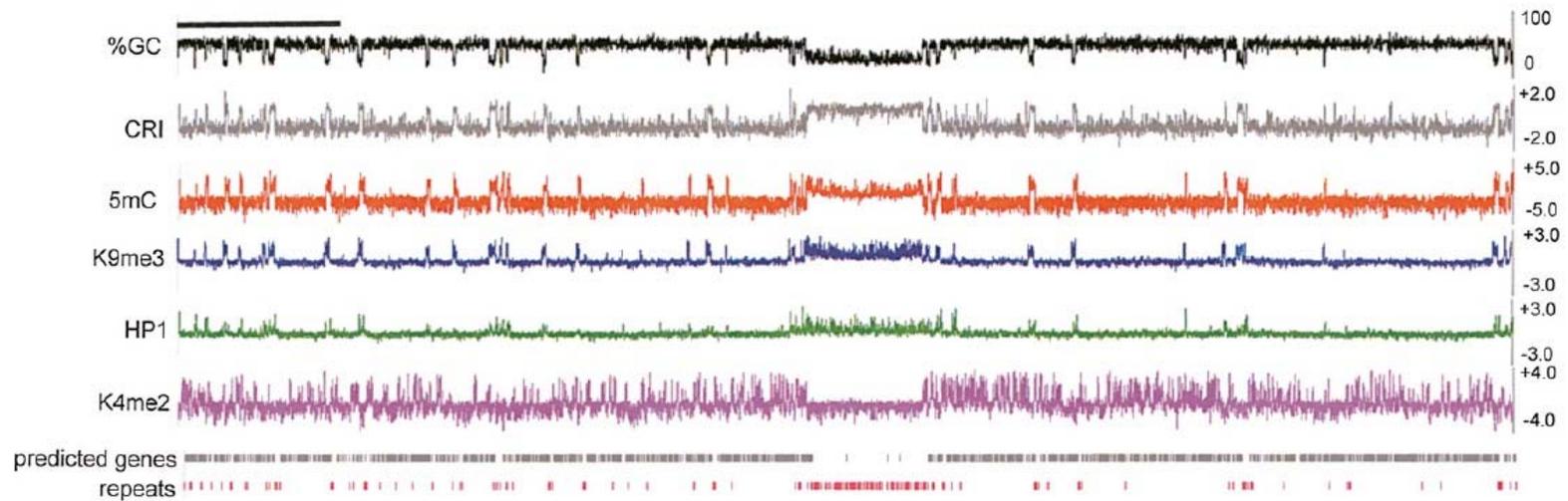


Euchromatine = chromatine « ouverte » -> transcription

Hétérochromatine = chromatine fermée -> pas de transcription

# Conséquences du RIP sur la structure de la chromatine

## Chromosome VII



### Hétérochromatine

### Euchromatine

Index RIP

Histone méthylée  
H3K9me3

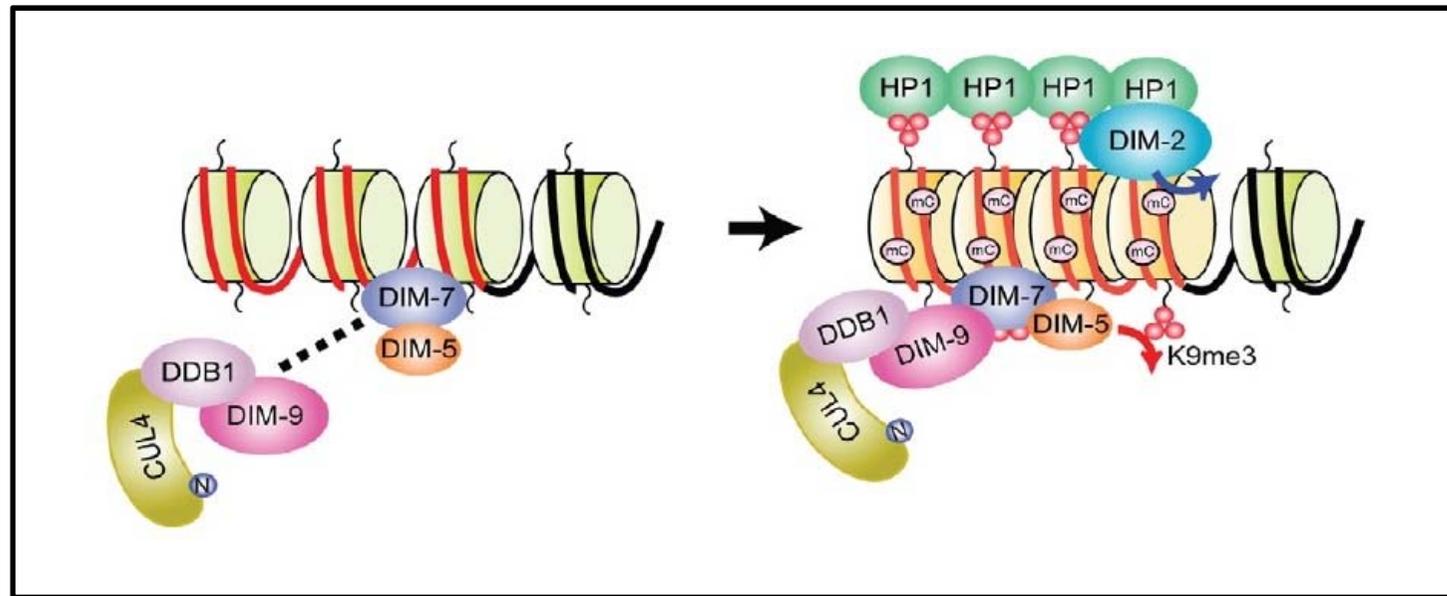
Histone H3K4

Méthylation ADN

Protéine HP1

Lewis Z. Et al., *Genome Res.* 2009 Mar;19(3):427-37

## Extinction de l'expression des gènes « rippés »

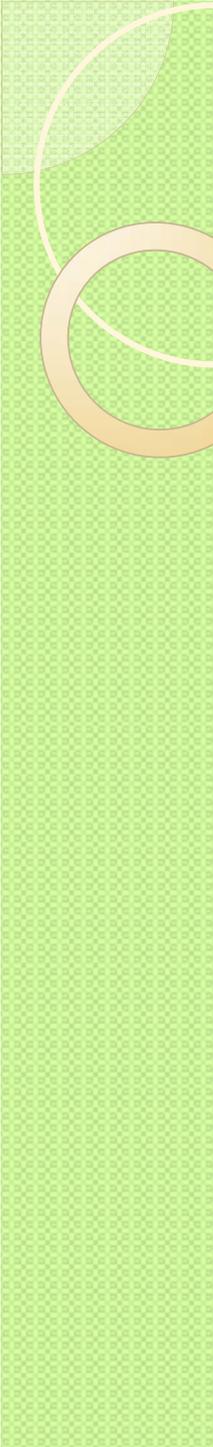


**DIM-5 : Histone méthyltransférase (protéine à domaine SET)**

**HP1 : Hétérochromatine protéine 1**

**DIM-2 : ADN-méthyltransférase (activité de maintenance)**

Lewis et al., PLoS Genet. 2010 Nov 4;6(11):e1001196



Protéine(s) impliquée(s) dans le RIP *per se* ?

## Mécanisme d'action du RIP ?

1 seul gène identifié comme essentiel au RIP:

*RID* (RIP déficient) -> code une protéine à structure  
d'ADN-méthyltransférase

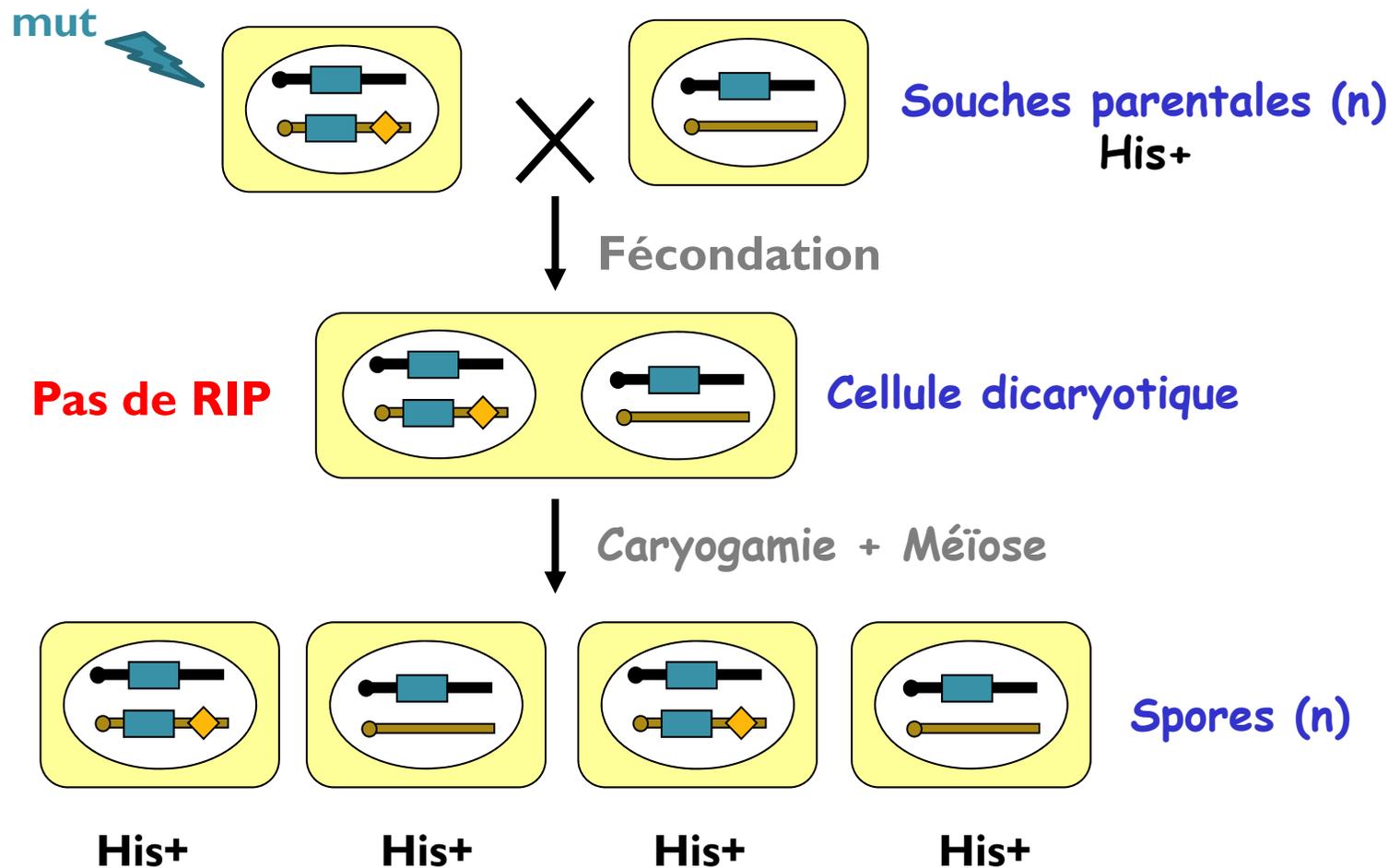
Mutant  $\Delta$ RID : plus de mutation ni de méthylation  
*de novo* des séquences cibles

## Protéine(s) impliquée(s) dans le RIP *per se* ?

<i>N. crassa</i>	Fonction	RIP
<b><i>DCL-1</i></b>	Rnase III ARN db	+
<b><i>QDE-1</i></b>	RdRP	+
<b><i>QDE-3</i></b>	Hélicase ARN	+
<b><i>QIP</i></b>	Exonucléase	+
<b><i>QDE-2</i></b>	Paz/PIWI (Argonaute) liaison au siRNA	+

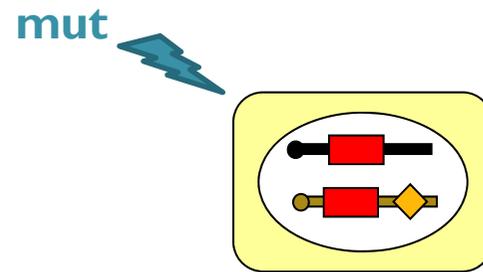
=> Pas de lien fonctionnel entre Quelling et RIP

# Sélection de mutants déficients pour le RIP



-> crible difficile à mettre en place : génétique inverse

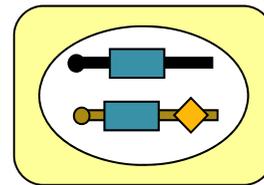
# Sélection de mutants déficients pour le maintien de l'extinction de l'expression des gènes cibles du RIP



**His-**



-> crible positif



**His+**



## RIP : comment ça marche ?

### - Reconnaissance des séquences cibles ?

Pas via un signal diffusible de type « petits ARN » !

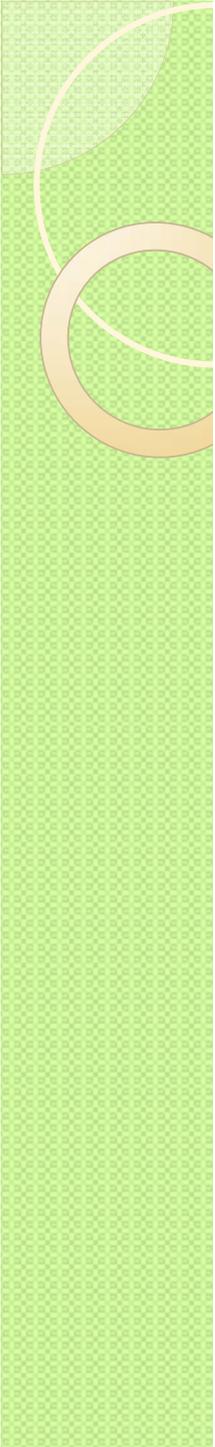
-> RIP (noyau spécifique) a lieu dans cellule dicaryotique

-> Aucune espèces de miARNs ou disiARNs impliqués dans RIP

### - Mécanisme de mutations ?

Pas seulement désamination spontanée des 5mC en T

### - Méthylation puis mutations ou mutation puis méthylation ?



## Conséquences du RIP chez *N. crassa*

- Pas d'élément transposable actif
  - Pas de duplication récente
- => Frein à l'évolution du génome ?

**Mécanisme propre à *N. crassa* ?**

# De nombreuses traces de RIP chez les peizizomycètes

## Preuves expérimentales de mécanismes fonctionnels de type RIP

*Podospora anserina*

*Leptospheria maculans*

*Magnaporthe grisea*

*Fusarium graminearum* / *Gibberella zeae*

*Nectria haematococca*

Cycle de reproduction  
maîtrisé au laboratoire

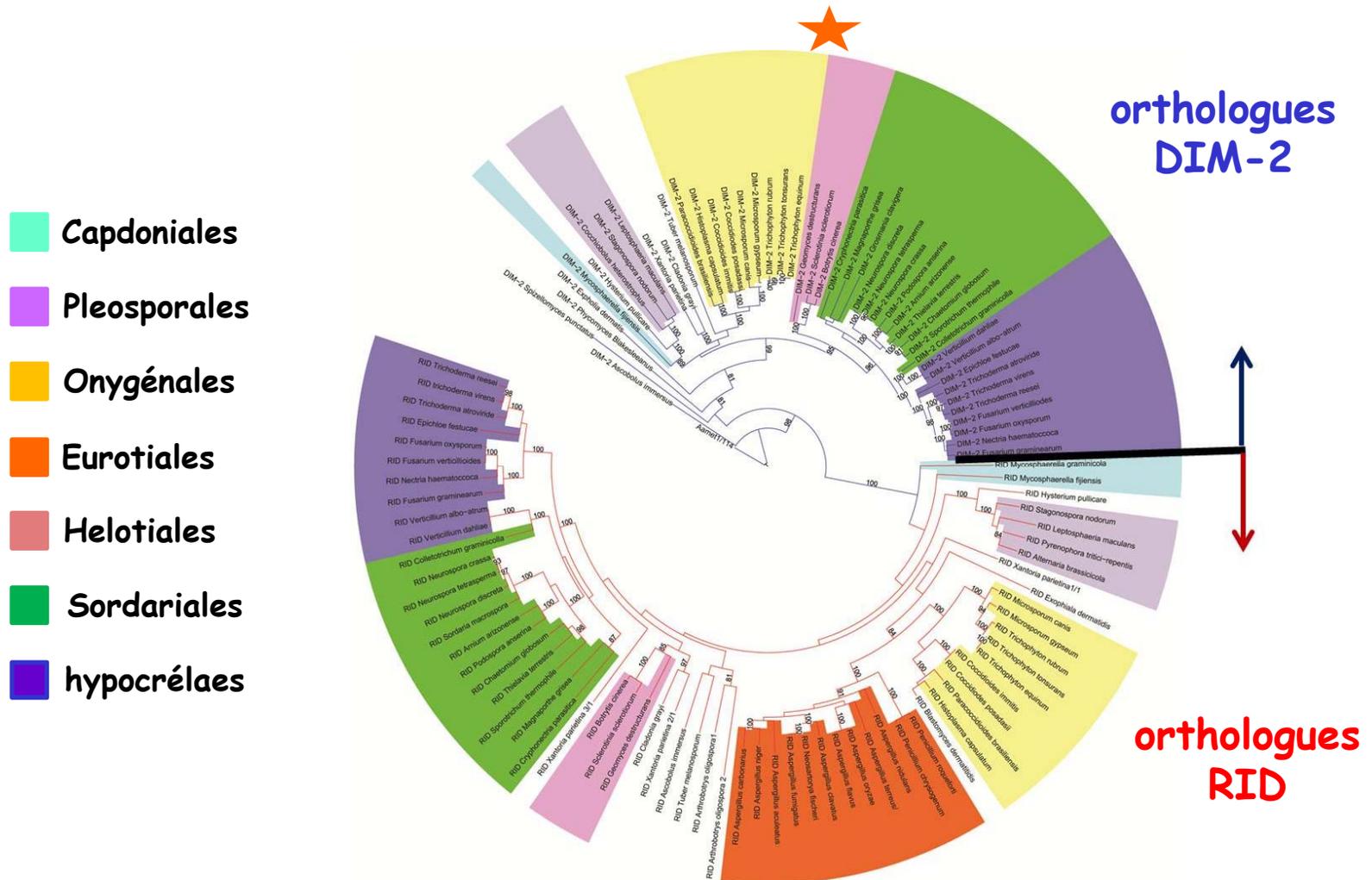
## Preuves *in silico* des génomes fongiques

49 génomes de peizizomycètes examinés : 48 montrent des traces de RIP

Cluterbuck, Fungal Genetics and Biology 48 (2011) 306-26

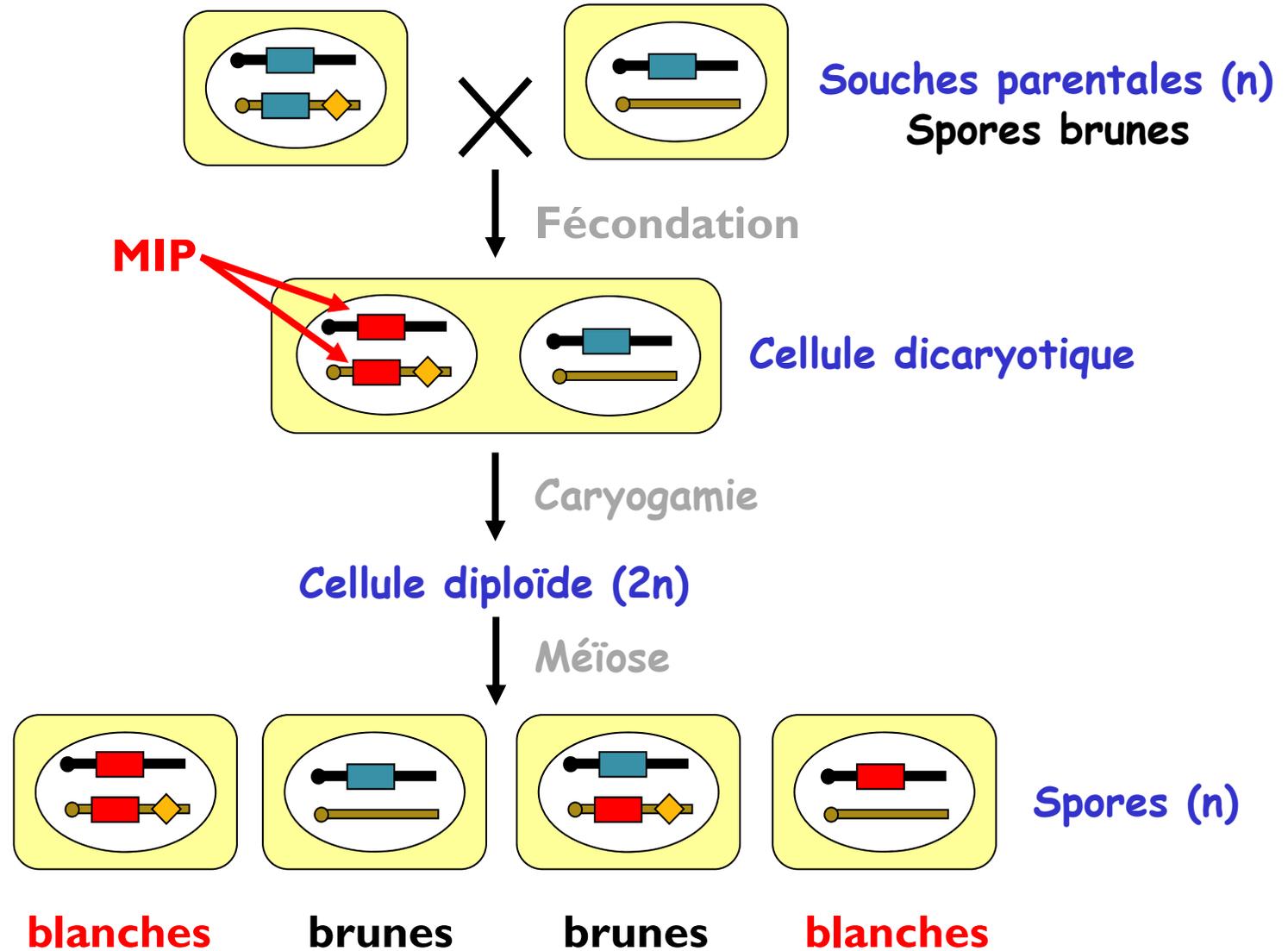
**Pas de RIP chez les levures !**

# Orthologues de RID et DIM-2



65 espèces considérées -> Pas de 5mC pour la majorité d'entre elles

# MIP chez *Ascobolus immersus*





# Conséquence du MIP chez *Ascobolus immersus*

\* Méthylation des résidus cytosines des séquences « mipées »

-> inhibition de l'élongation de la transcription

extinction expression génique

1 seul élément transposable mobile : ascot < 400 pb taille minimale

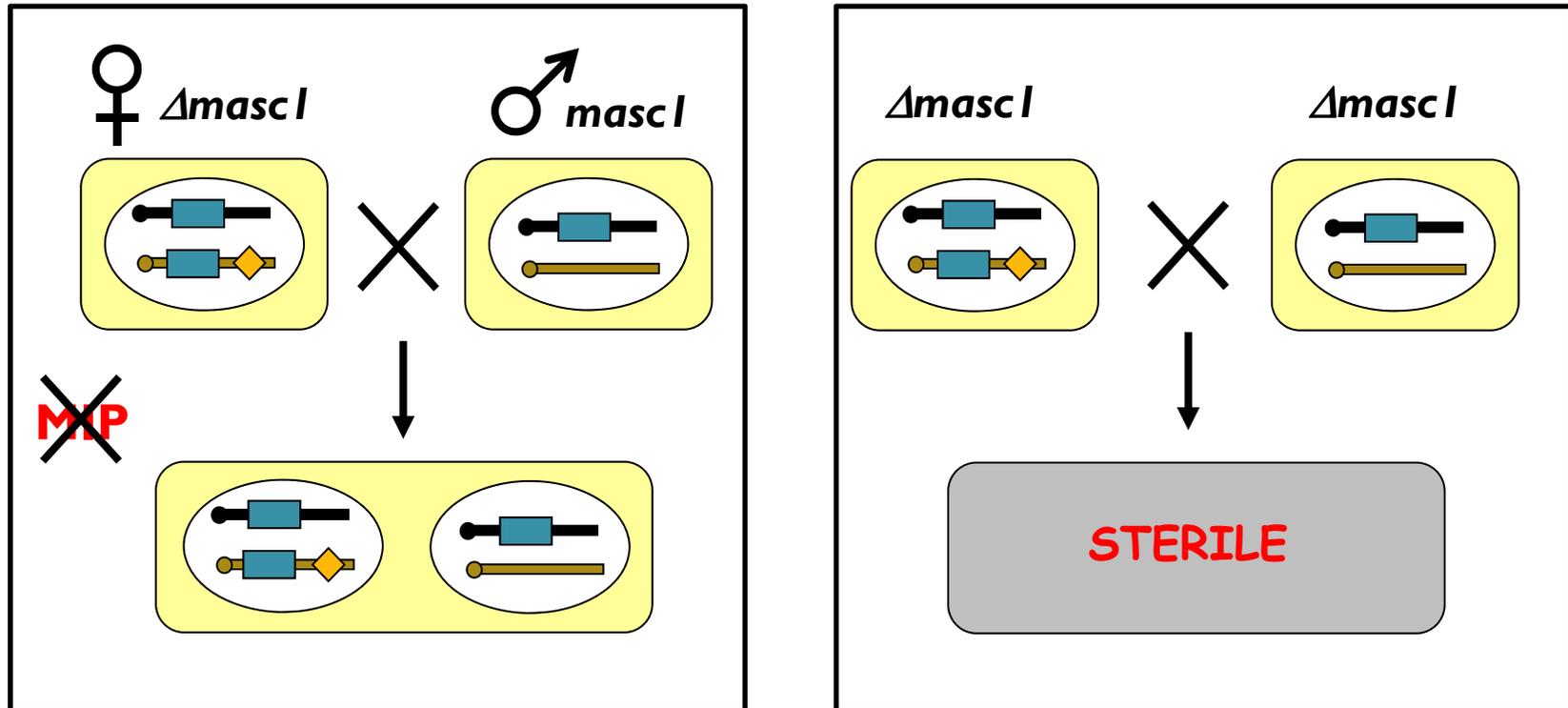
cibles du MIP

\* PAS de mutations introduites dans les séquences « mipées »

-> véritable mécanisme épigénétique !

# MIP et reproduction sexuée chez *A. immersus*

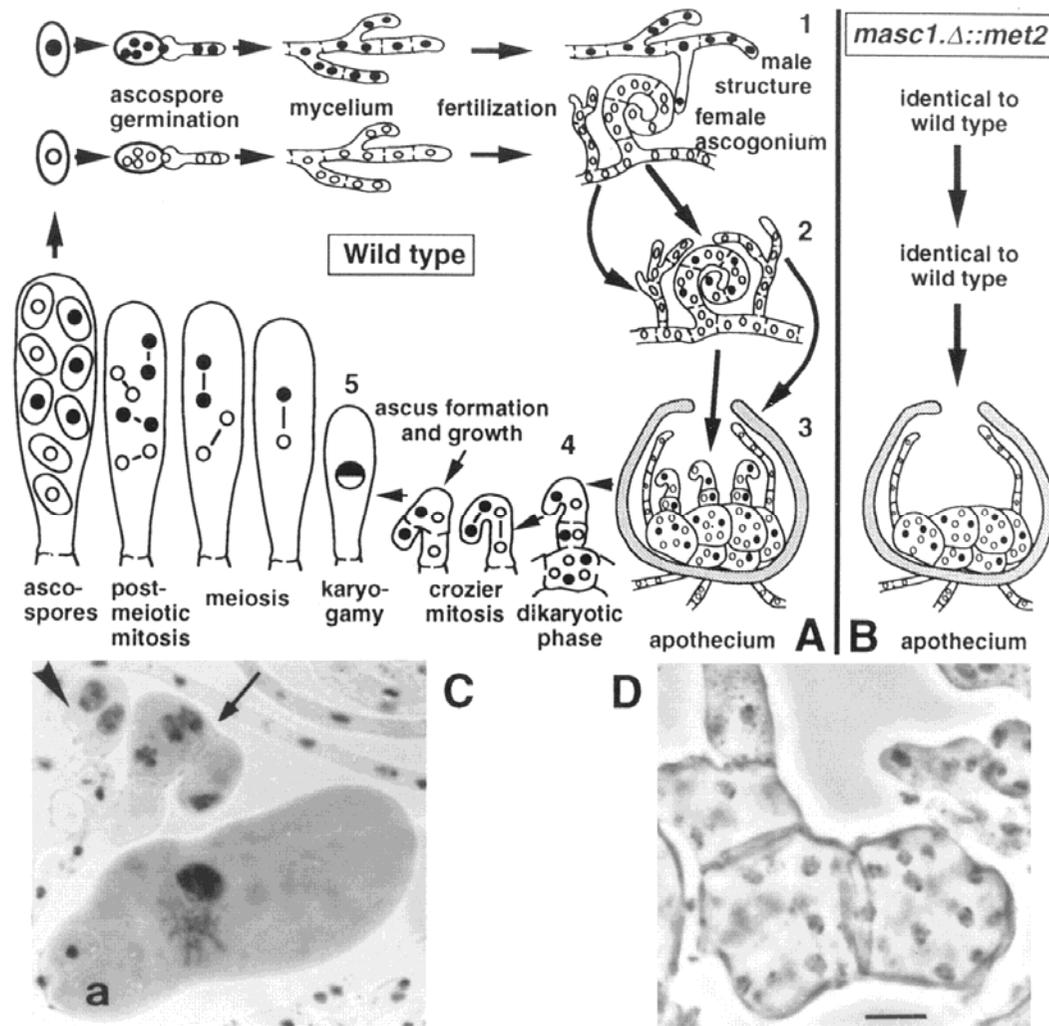
Masc1 protéine à structure d'ADN-méthyltransférase  $\Leftrightarrow$  RID



**Masc1 nécessaire au MIP ET à la reproduction sexuée**

**-> rôle physiologique du MIP ?**

# MIP et reproduction sexuée chez *A. immersus*



-> rôle physiologique du MIP ? OUI !



# RIP et mécanismes apparentés

RIP mécanisme conservé au cours de l'évolution :  
largement présent chez les pezizomycètes

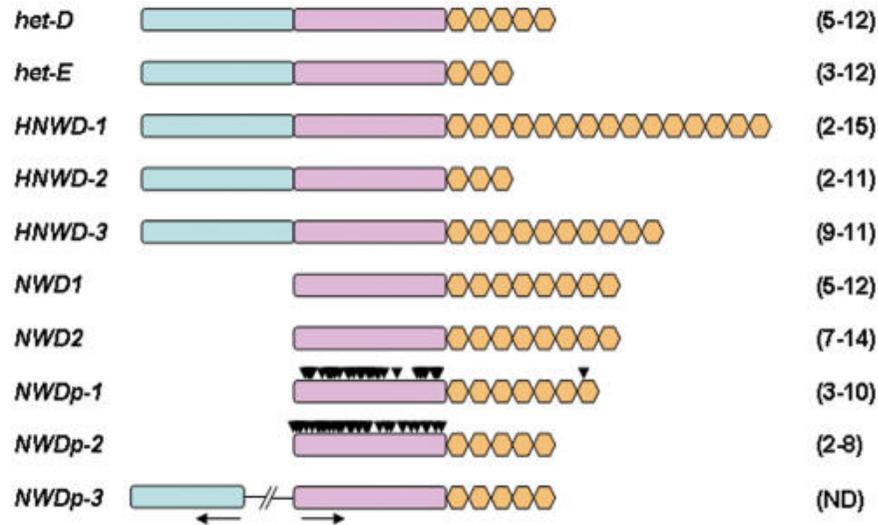
**MAIS**

caractéristiques distinctes du RIP de *N. crassa*

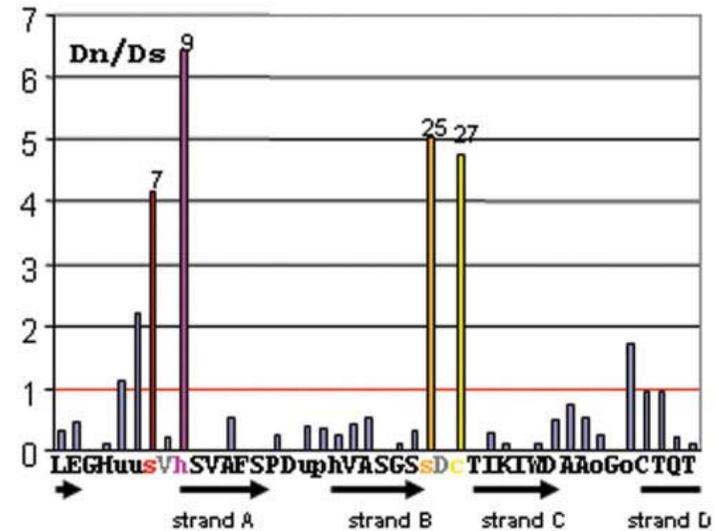
- > moins de mutations introduites
- > très peu d'espèces montrent 5mC

=> Un des moteurs de l'évolution des génomes fongiques

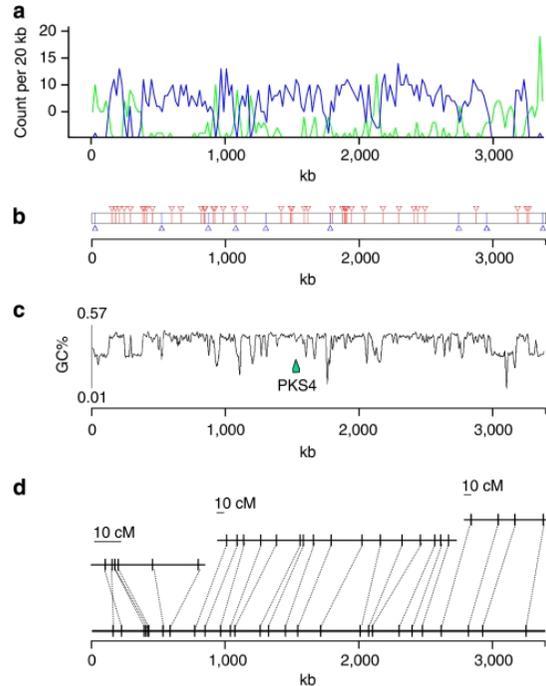
# Répertoire allélique et RIP chez *P. anserina*



**-> création de nouveaux allèles via RIP très modéré**



# Répertoire allélique et RIP chez *L. maculans*



Colza      *L. maculans*

RLm6 / AvrLm6 -> avirulent

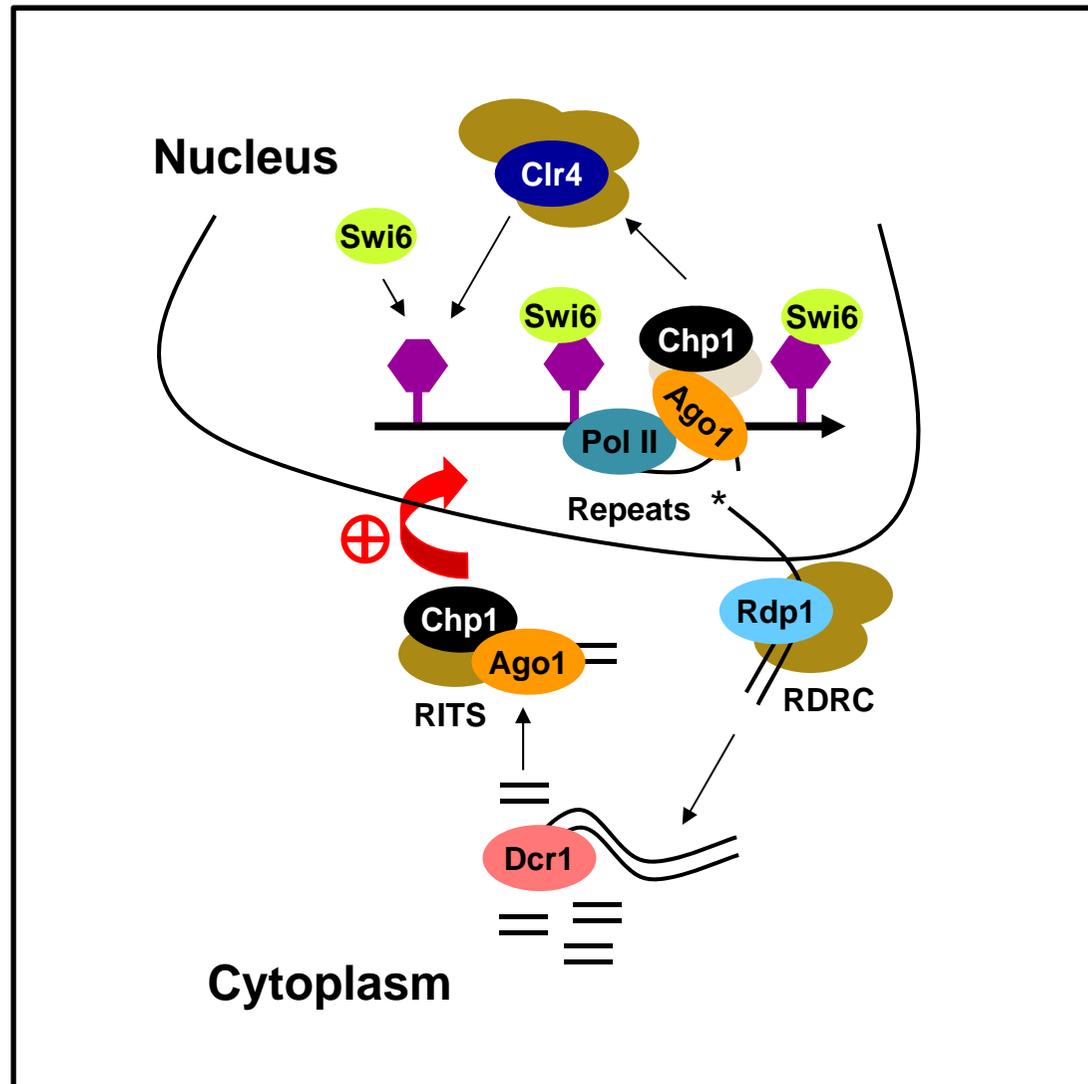
3 ans  
↓

RLm6 / AvrLm6 \* -> virulent

\* Mutations type RIP

Fudal et al., Mol Plant Microbe Interact. 2009 Aug;22(8):932-41

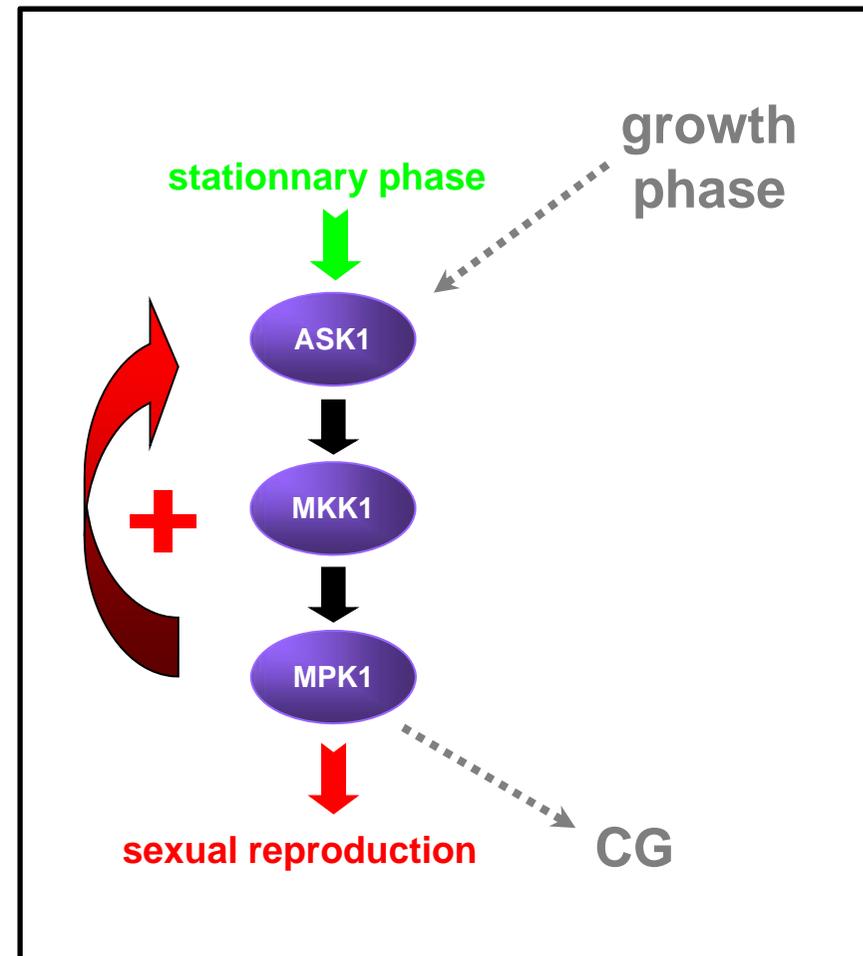
# Chez *S. pombe* TGS et PTGS à l'œuvre



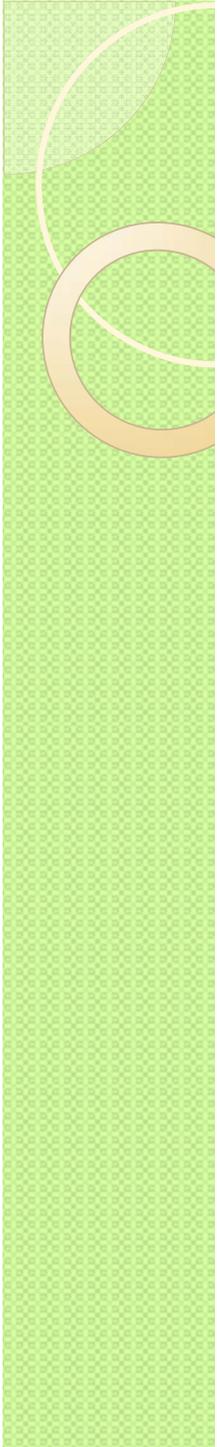
# Epigénétique... cytoplasmique !



Génétiquement identiques  
mais phénotypiquement non  
équivalents !



Mais c'est une autre histoire...



**Et une autre école d'été !**