

# École d'été du CEF

## Génétique des champignons

De la génétique à la génomique chez les  
champignons filamenteux

LOUIS BERNIER  
FOR-7033, Été 2012



# Plan de la présentation

---

- Rappel: la phylogénie des champignons
- Prérequis pour l'analyse génétique
- Le génome fongique en bref
- Analyse génétique chez les champignons
  - ❖ Obtention de variants phénotypiques/moléculaires
  - ❖ Induction et sélection de mutants
  - ❖ Réalisation et analyse de croisements dirigés
  - ❖ Démonstration pratique (*Ophiostoma novo-ulmi*)

# Évolution des champignons

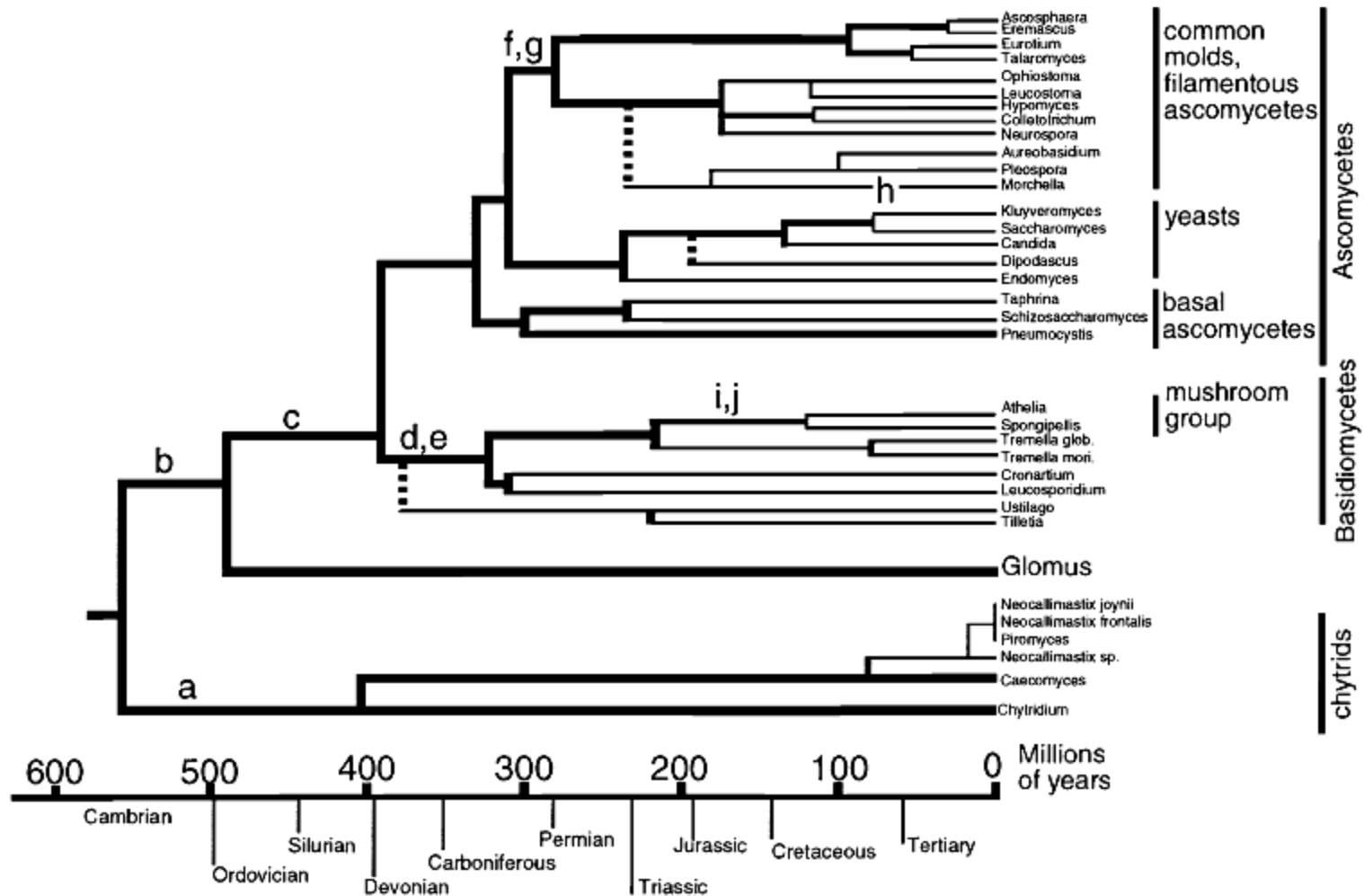


FIG. 5. This tree shows estimated fungal divergence times superimposed on the phylogeny from Fig. 1. Letters on branches indicate the origin of fungus morphological features diagrammed in Fig. 6. Branch lengths on the tree are proportional to the average percent nucleotide substitutions, corrected for lineage-specific differences in substitution rates given in Table 2. When the phylogeny was in conflict with branch lengths, connecting branches have broken lines.

# Génomes de quelques espèces

Espèce	Xsomes	Génome (MB)	Gènes	Gènes/MB
<i>Escherichia coli</i>	1	4,7	4 200	894
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16	12	6 200	517
<i>Neurospora crassa</i>	7	40	10 000	250
<i>Caenorhabditis elegans</i>	6	100	22 000	220
<i>Arabidopsis thaliana</i>	5	120	28 000	233
<i>Populus trichocarpa</i>	19	485	45 000	93
<i>Drosophila melanogaster</i>	4	120	16 000	133
<i>Mus musculus</i>	20	3 400	30 000	8,9
<i>Homo sapiens</i>	23	3 400	25 000	7,4
<b>Conifères</b>	<b>?</b>	<b>&lt;30 000</b>	<b>&gt;50 000</b>	<b>&lt; 2</b>

# Quelles informations peut-on tirer de l'étude du génome des champignons?

---

- Organisation et plasticité du génome
- Héritabilité de traits phénotypiques
- Expression des gènes
- Structure et dynamique des populations
- Évolution
- Interactions interspécifiques

# Les champignons comme modèles pour la génétique des eucaryotes

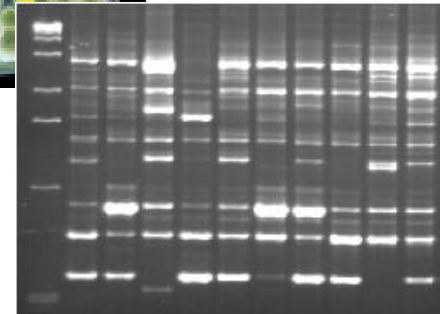
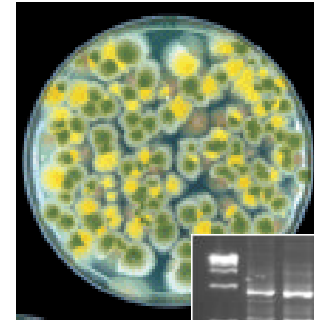
---

- Petit génome
- Cycle biologique rapide
- Existence de différents modes de vie: saprophytisme, parasitisme, symbiose
- Milieux de culture et protocoles expérimentaux bien définis chez plusieurs espèces
- Reproduction sexuée et asexuée
- Phase haploïde facilite analyses génétiques
- Facilité à obtenir populations de grande taille *in vivo* et *in vitro*
- Considérations d'ordre éthique

# Prérequis pour l'analyse génétique

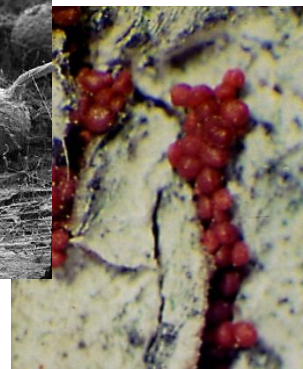
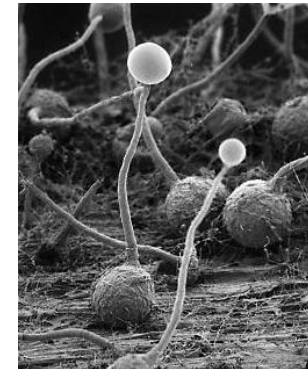
- Variation (polymorphisme)

- ❖ Traits phénotypiques
- ❖ Gènes codants
- ❖ Séquences intergéniques non-codantes

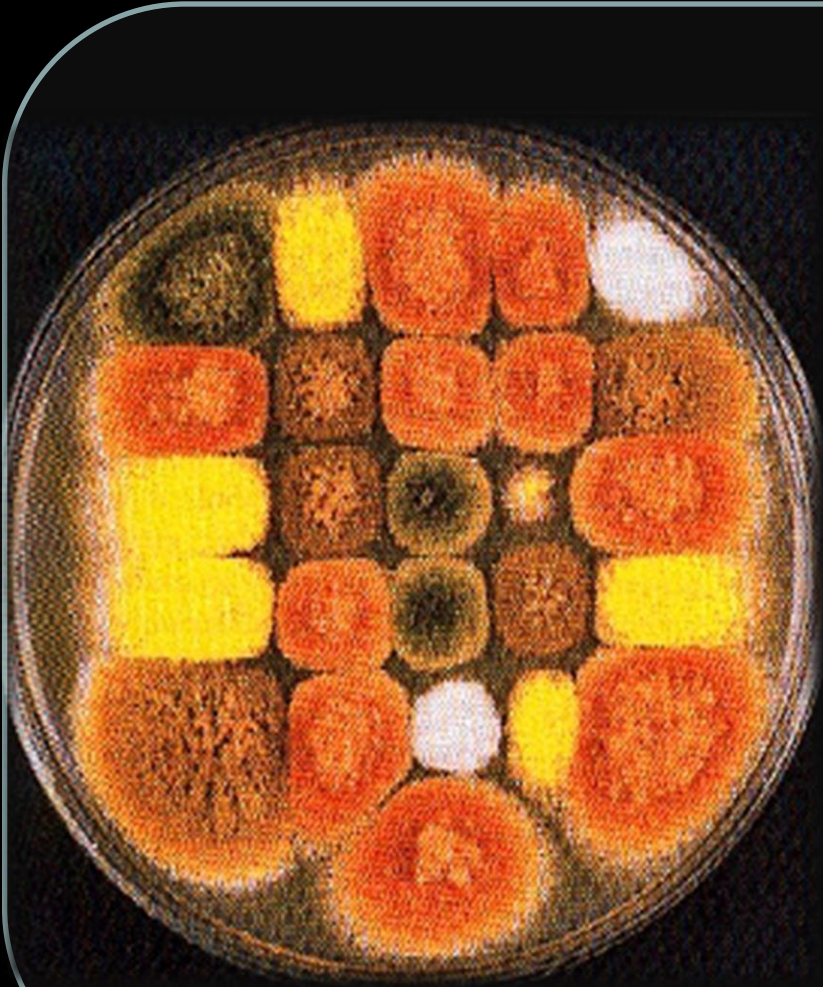


- Descendance (**génétique mendélienne**)

- ❖ Reproduction sexuée ou parasexuée
- ❖ Populations de taille suffisante
- ❖ Temps de génération court



# Où trouver la variation ?



## Populations naturelles

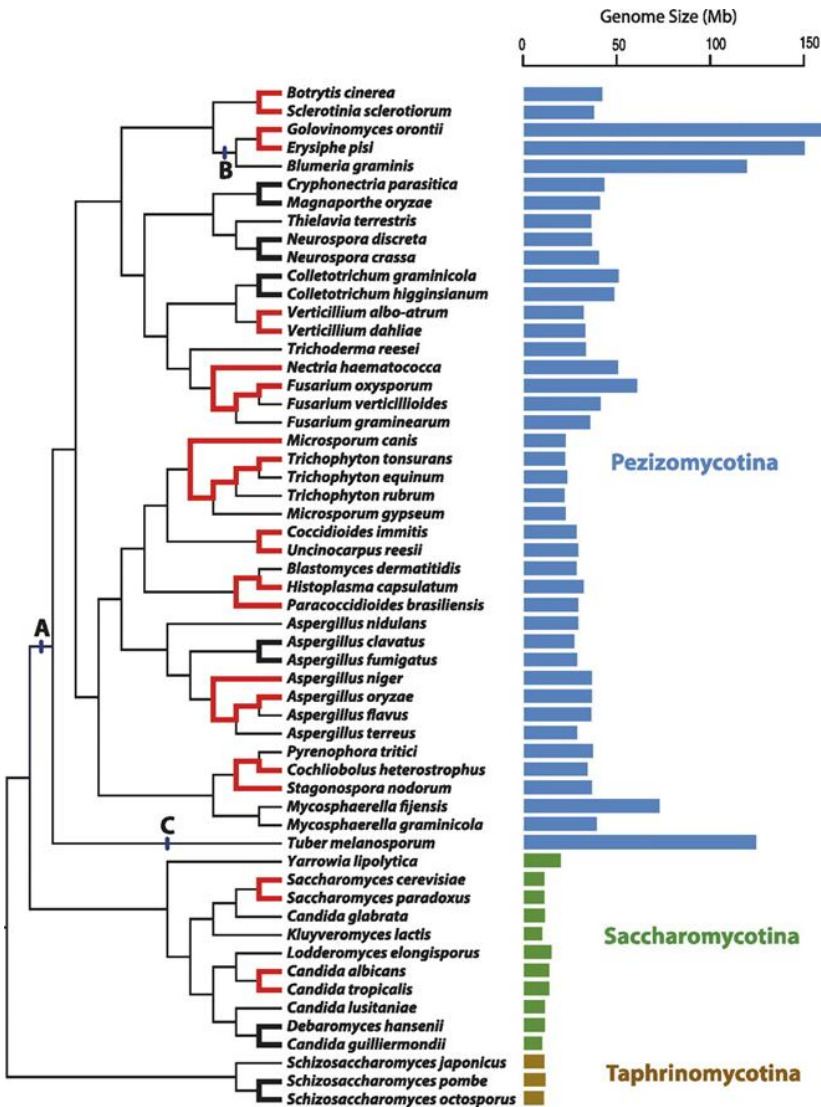
- Variation intraspécifique
  - Intra- et interpopulationnelle
- Variation interspécifique

## Populations artificielles

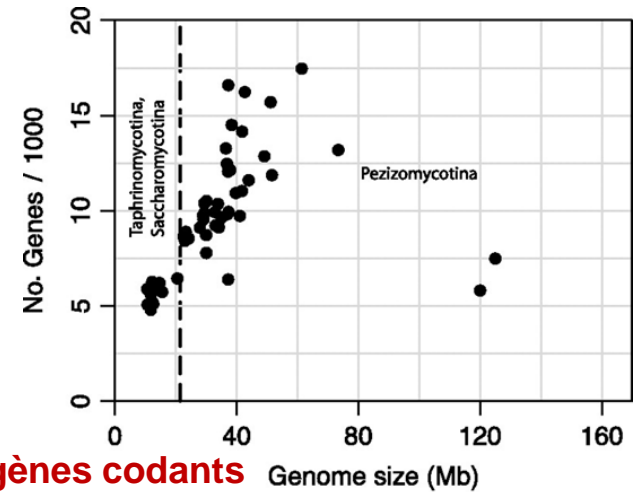
- Induction de mutations



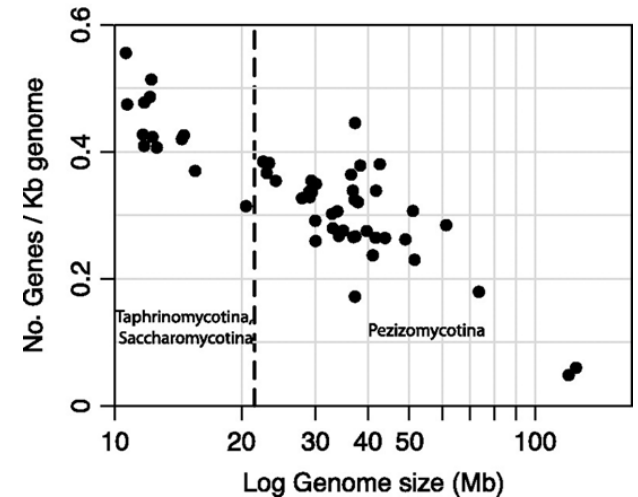
# Diversité dans la taille et la complexité des génomes chez les ascomycètes



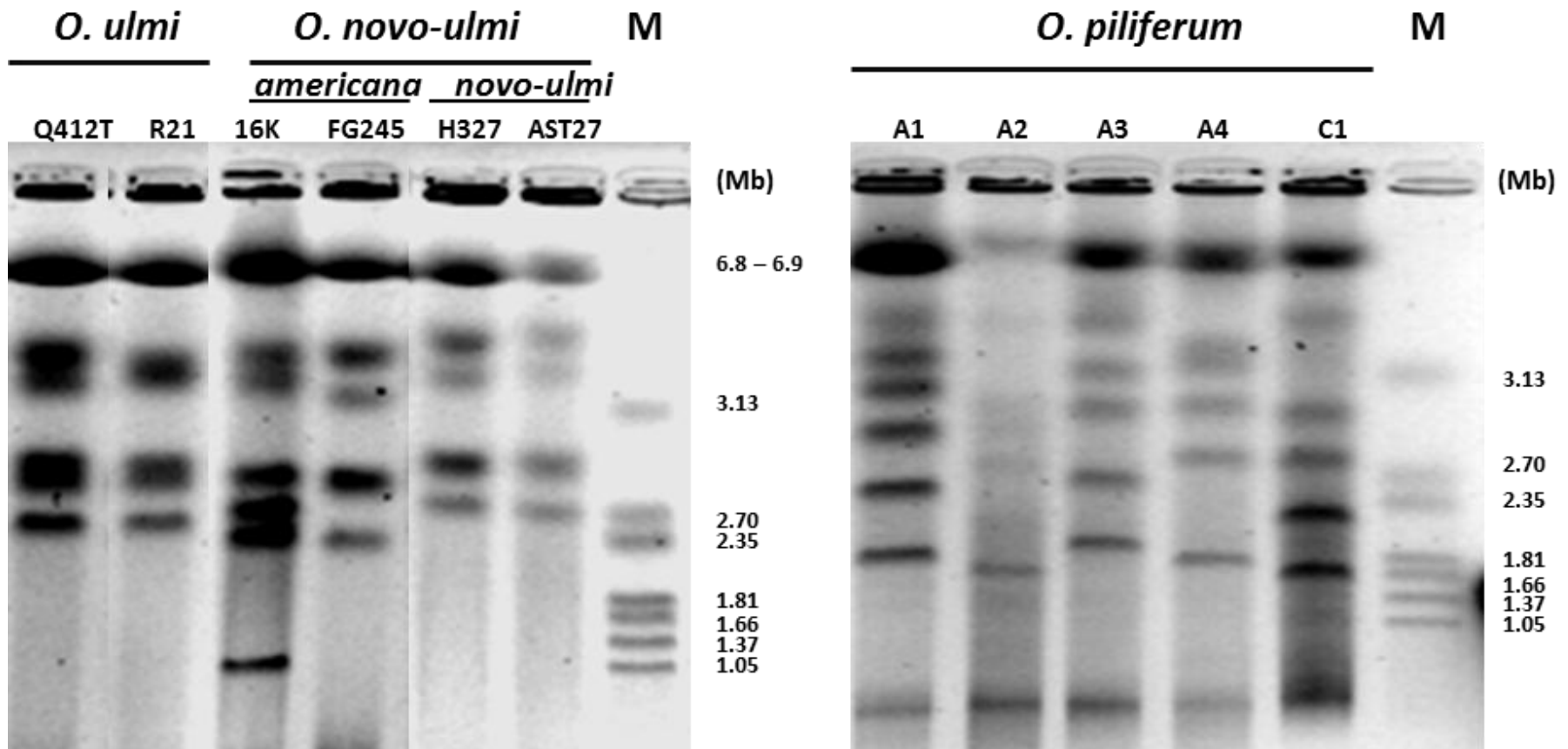
## Nb de gènes codants



## Densité de gènes codants



# Diversité interspécifique et intraspécifique dans l'arrangement u génome



# Analyse génétique

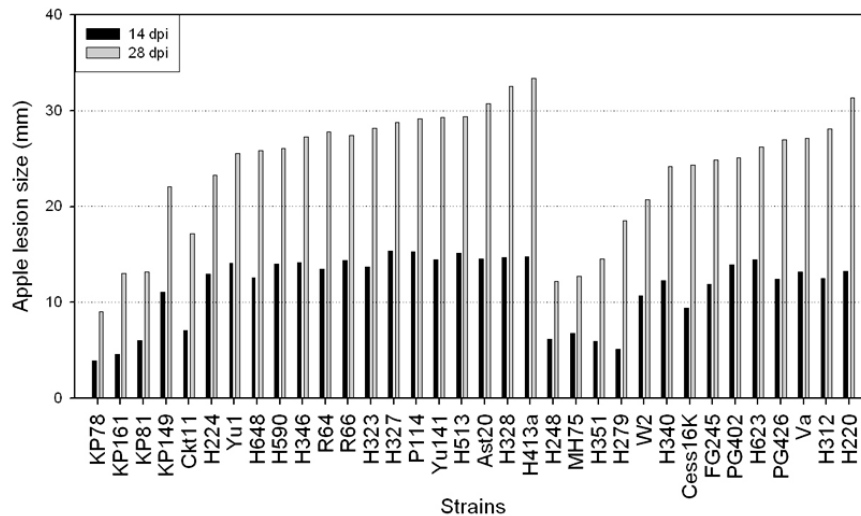
---

- Associer un gène à une fonction
- Pour un trait donné, déterminer si la différence phénotypique observée est contrôlée par un ou par plusieurs gènes
- Localiser le(s) gène(s) impliqué(s)
- Dresser une carte génétique de l'organisme

# Analyse génétique

## Type sauvage *versus* mutants

- Type sauvage: phénotype de référence



- Mutant: individu présentant un type nouveau suite à une altération génétique

# Types de mutants

---

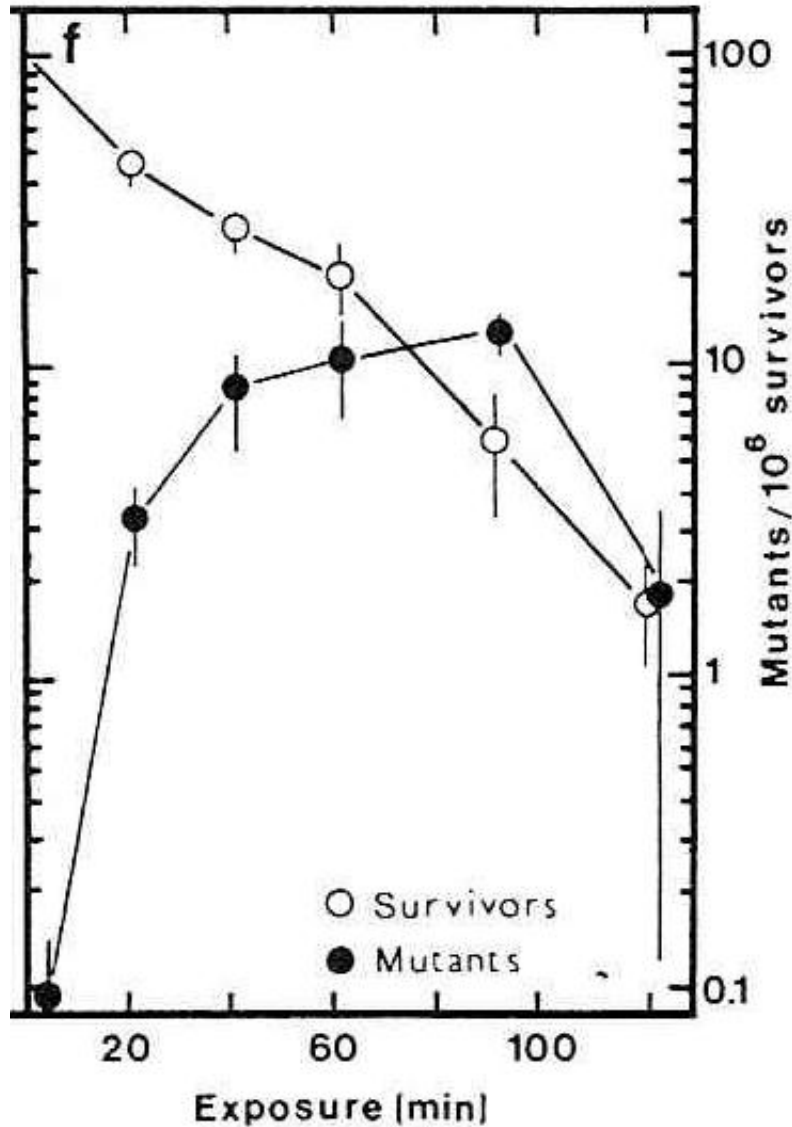
- Morphologiques
  - ❖ Couleur, apparence
- Auxotrophes
- Résistance / Sensibilité accrue
  - ❖ produits antifongiques
  - ❖ radiations, agents mutagènes chimiques
- Virulence\* atténuée / accrue (\*au sens quantitatif)
- Autres traits physiologiques.....
- Mutations neutres

# Approches pour l'induction de mutations

---

- Mutagénèse chimique
  - ❖ MNNG, EMS...
- Mutagénèse physique
  - ❖ UV, rayons X...
- Mutagénèse insertionnelle
  - ❖ Fragments d'ADN
- *RNA interference* (modification de l'expression et non mutation de l'ADN)

# Effets des agents mutagènes



Relation entre le taux de survie et l'induction de mutants d'*O. novo-ulmi* Ben<sup>R</sup> suite à un traitement au MNNG

# Comparaison des types de mutagénèse

Type	Avantages	Désavantages
<b>Chimique</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Facile</li><li>-Efficace</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Mutagénèse aléatoire</li><li>-Mutations cryptiques</li><li>-Toxicité des produits</li><li>-Difficulté à récupérer gène muté</li></ul>



# Comparaison des types de mutagénèse

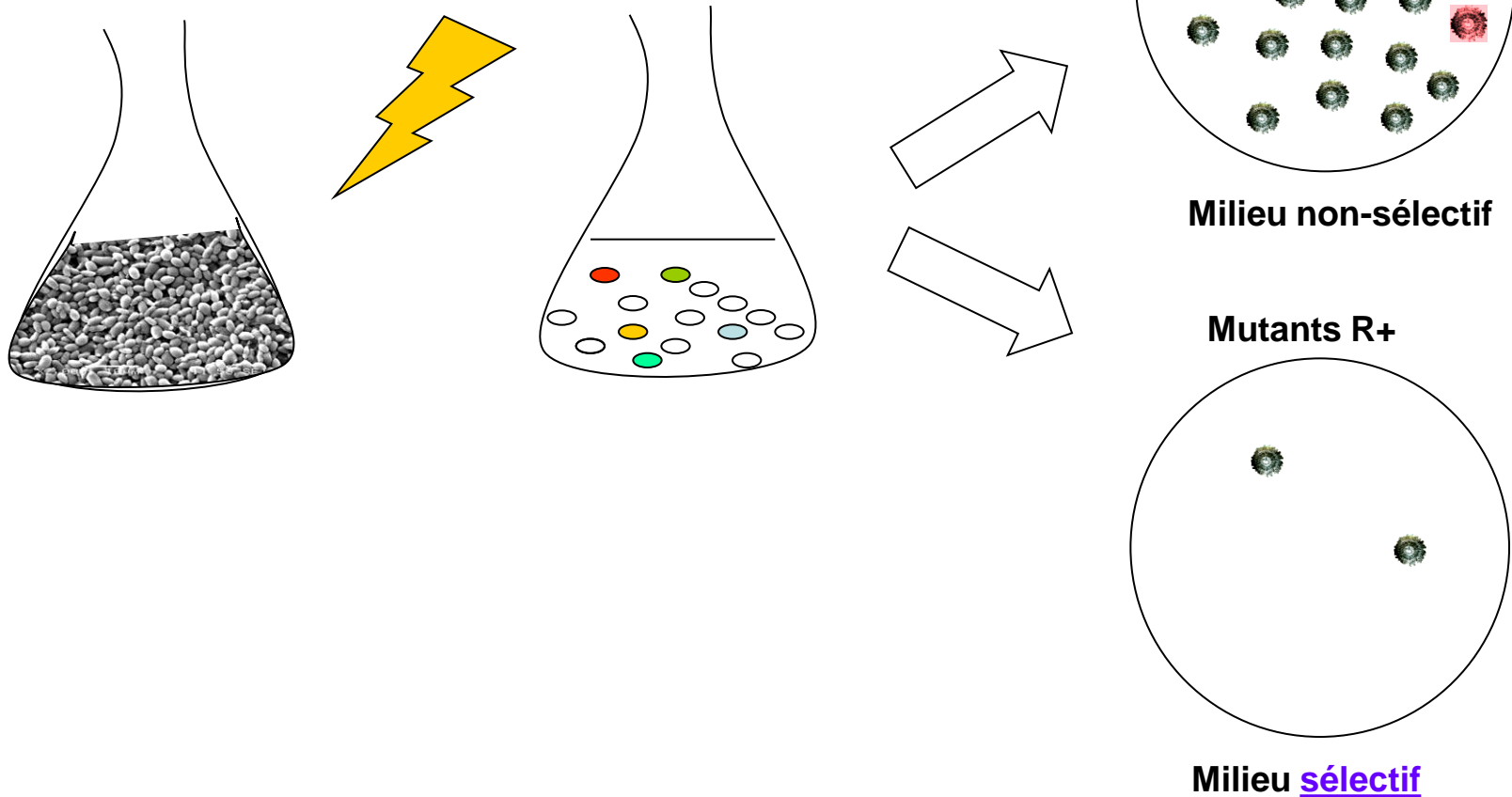
Type	Avantages	Désavantages
<b>Chimique</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Facile</li><li>-Efficace</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Mutagénèse aléatoire</li><li>-Mutations cryptiques</li><li>-Toxicité des produits</li><li>-Difficulté à récupérer gène muté</li></ul>
<b>Physique</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Facile et sans danger</li><li>-Efficace</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Mutagénèse aléatoire</li><li>-Mutations cryptiques</li><li>-Difficulté à récupérer gène muté</li></ul>

# Comparaison des types de mutagénèse

Type	Avantages	Désavantages
<b>Chimique</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Facile</li><li>-Efficace</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Mutagénèse aléatoire</li><li>-Mutations cryptiques</li><li>-Toxicité des produits</li><li>-Difficulté à récupérer gène muté</li></ul>
<b>Physique</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Facile et sans danger</li><li>-Efficace</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Mutagénèse aléatoire</li><li>-Mutations cryptiques</li><li>-Difficulté à récupérer gène muté</li></ul>
<b>Insertionnelle</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Possibilité de mutagénèse dirigée</li><li>-Récupération du gène muté</li><li>-On peut augmenter ou diminuer expression</li><li>-On peut doser l'expression en modifiant le nombre de copies</li><li>-Possibilité d'insérer gènes d'organismes étrangers</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Requiert un système de transformation efficace</li><li>-Mutagénèse dirigée (<i>gene knockout</i>) encore difficile chez bien des champignons</li></ul>

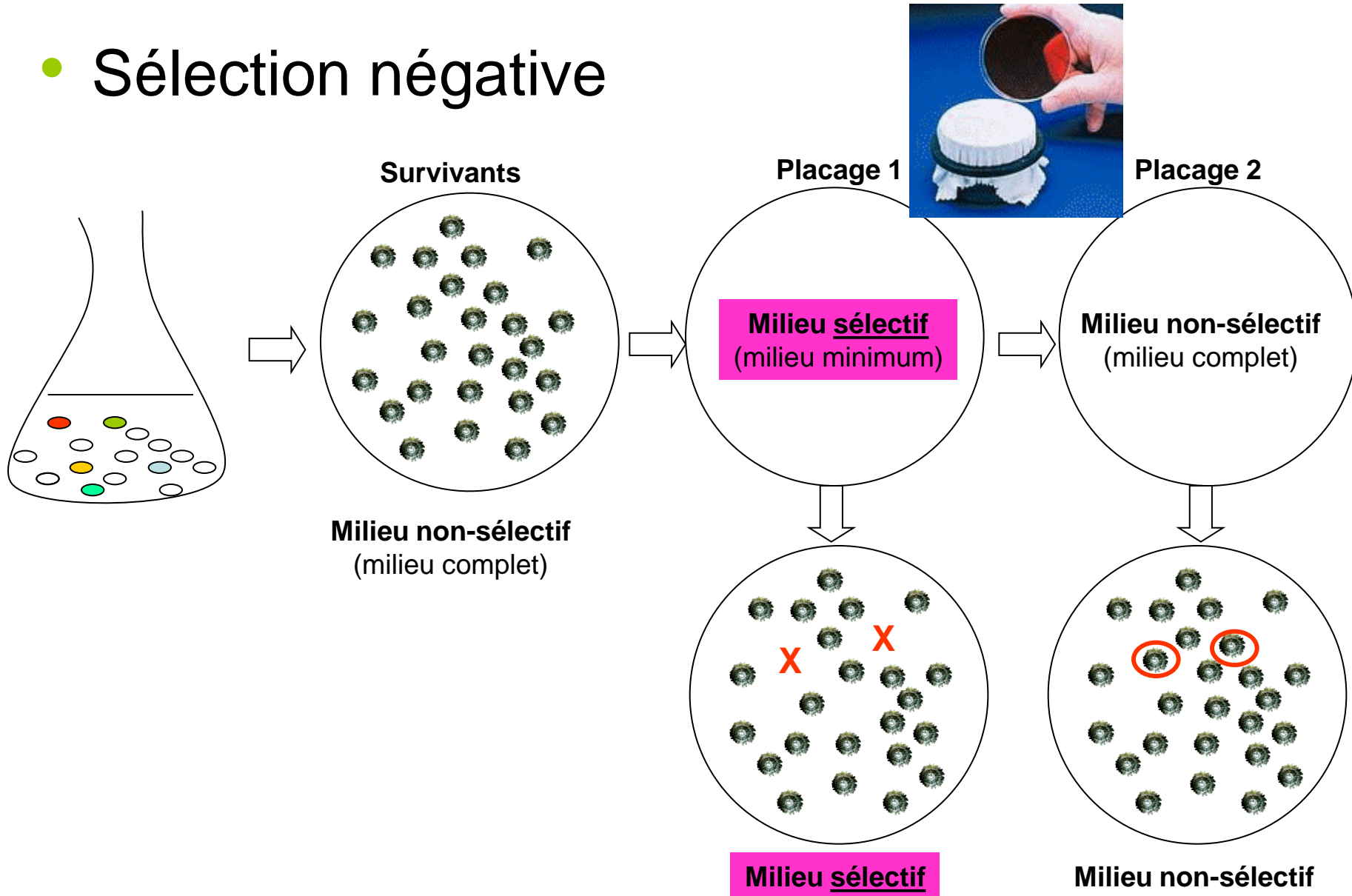
# Comment identifie-t-on les mutants?

- Sélection positive



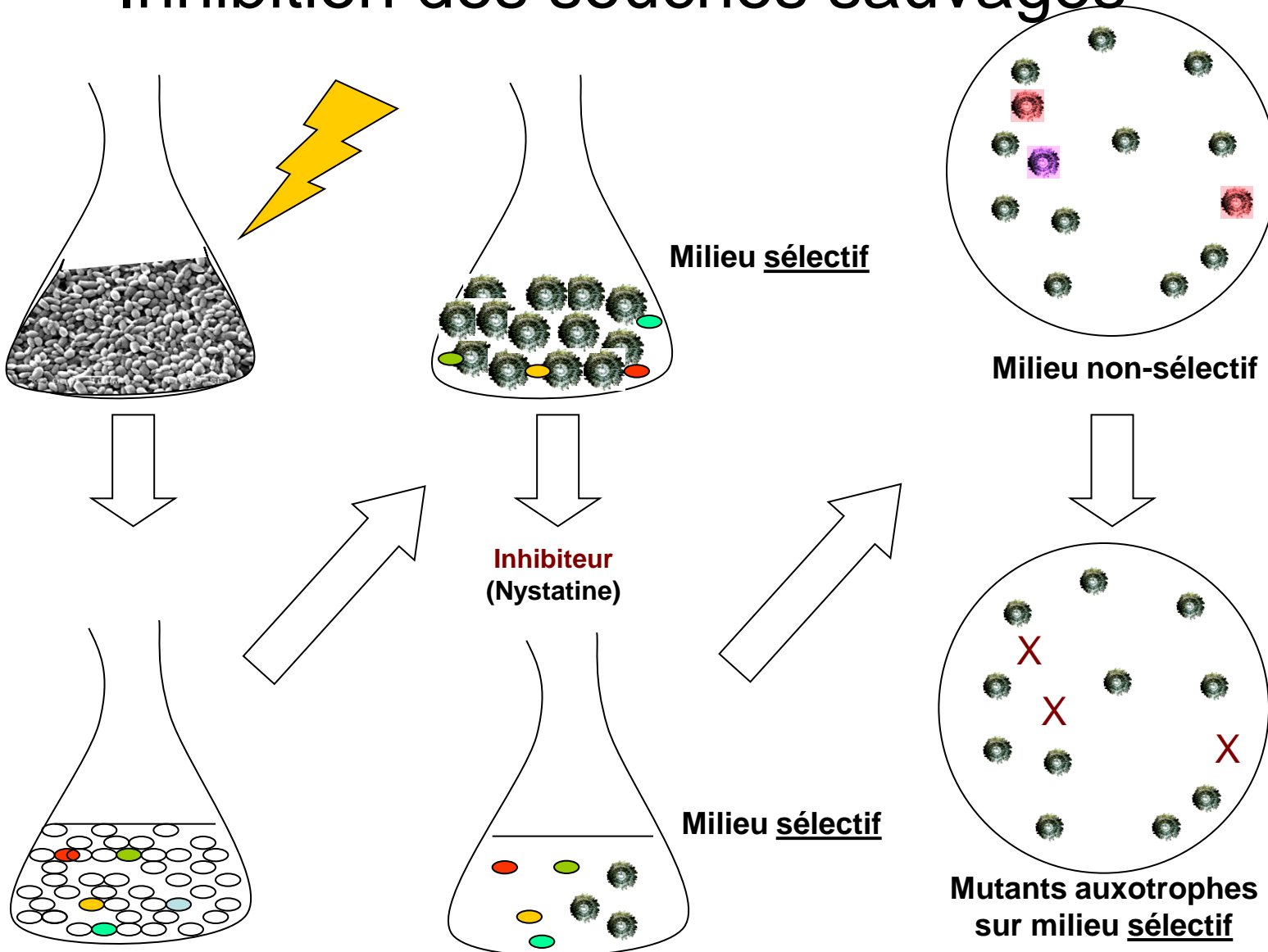
# Comment identifie-t-on les mutants?

- Sélection négative



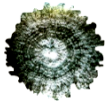
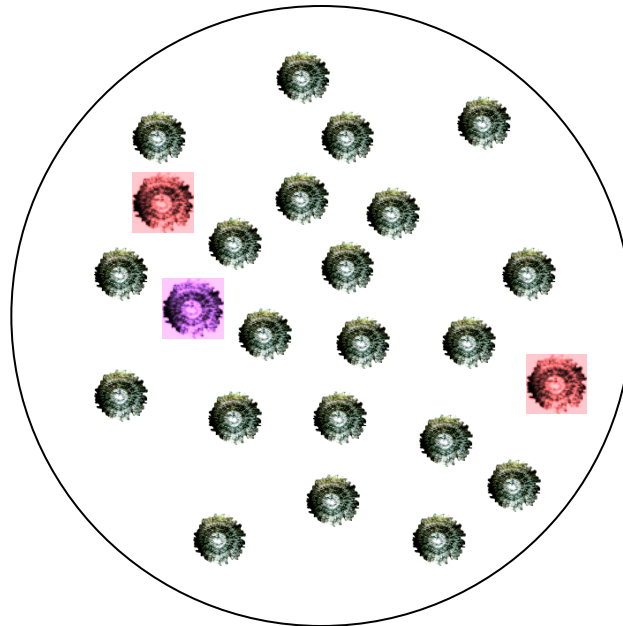
# Enrichissement en mutants

- Inhibition des souches sauvages

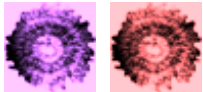


# Étude du phénotype

---



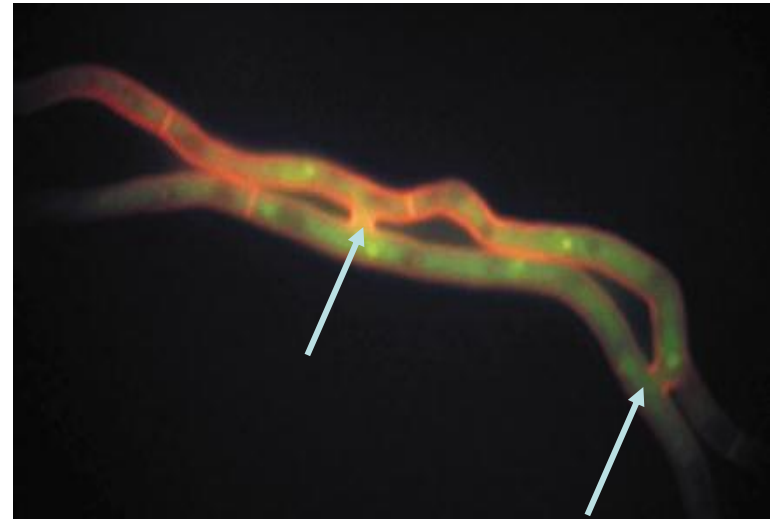
Type sauvage (*wild type*)



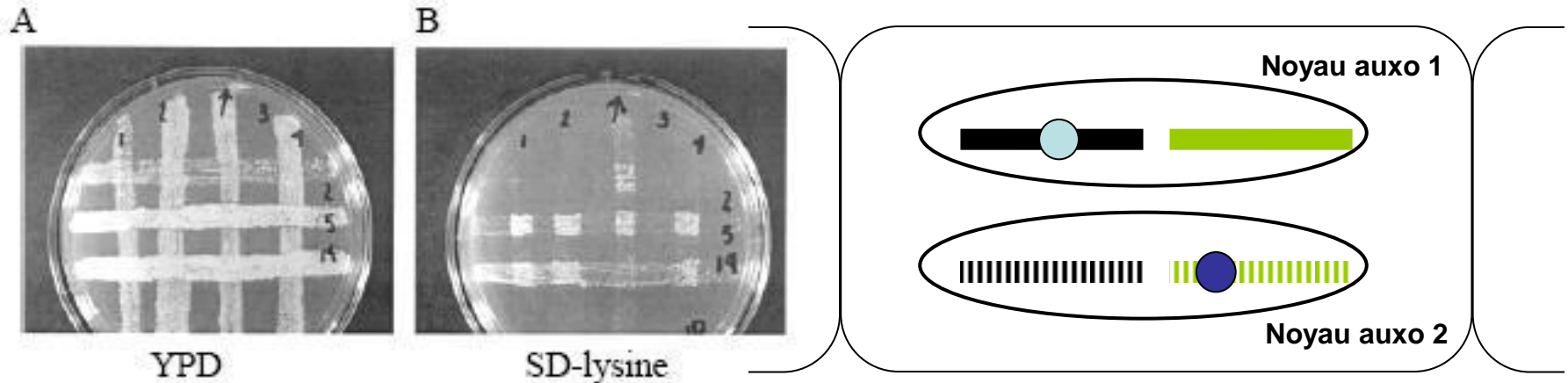
Mutants

# Les mutants et sont-ils semblables ?

- Synthèse d'hétérocaryons
  - ❖ Plasmogamie
  - ❖ Test de complémentation
- Croisements génétiques
  - ❖ Analyse de la descendance



# Test de complémentation



Croissance si les mutations affectent des loci distincts

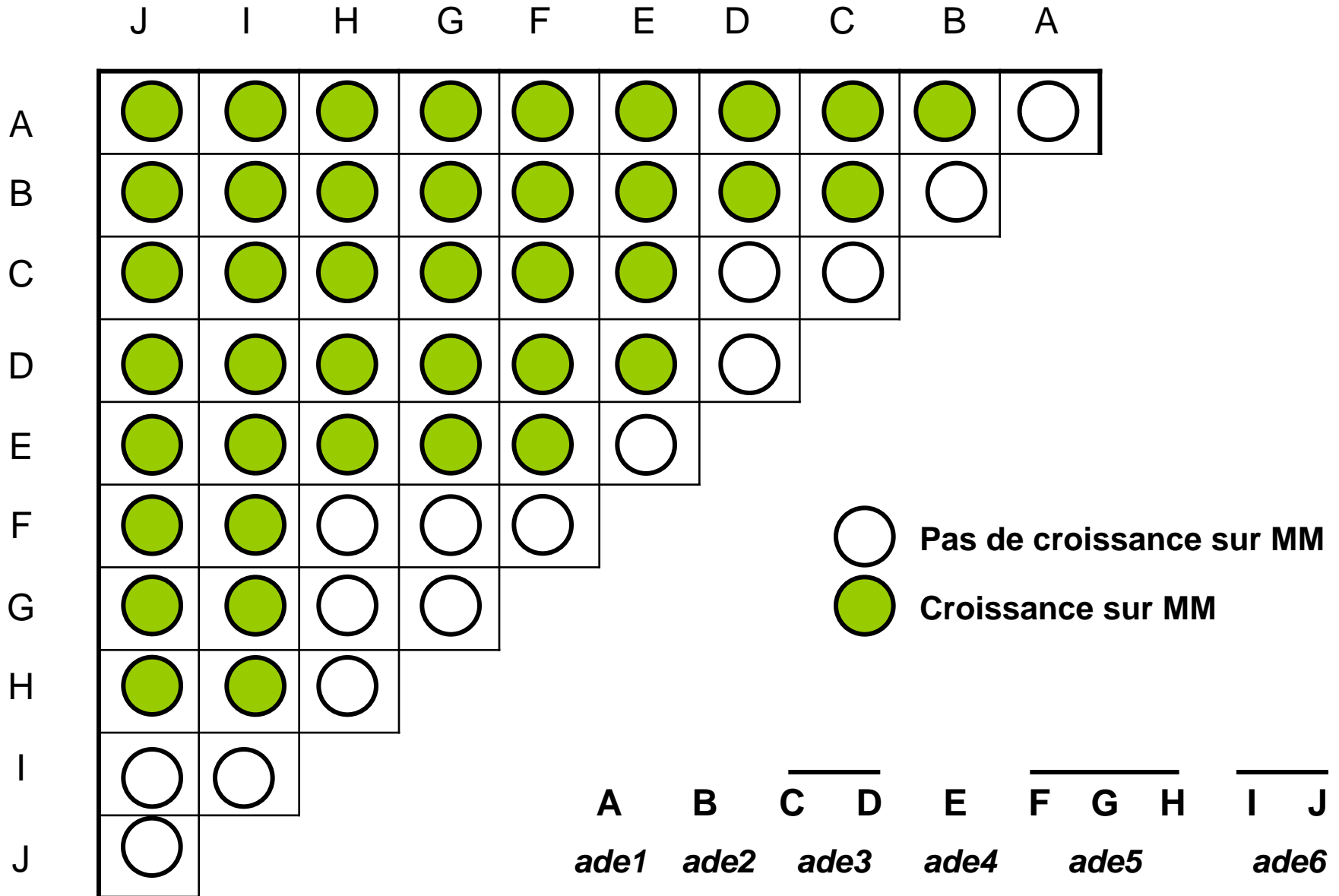
Bandes horizontales  
Souches lys2, lys5 et lys14

Note: l'allèle mutant est non-fonctionnel et récessif

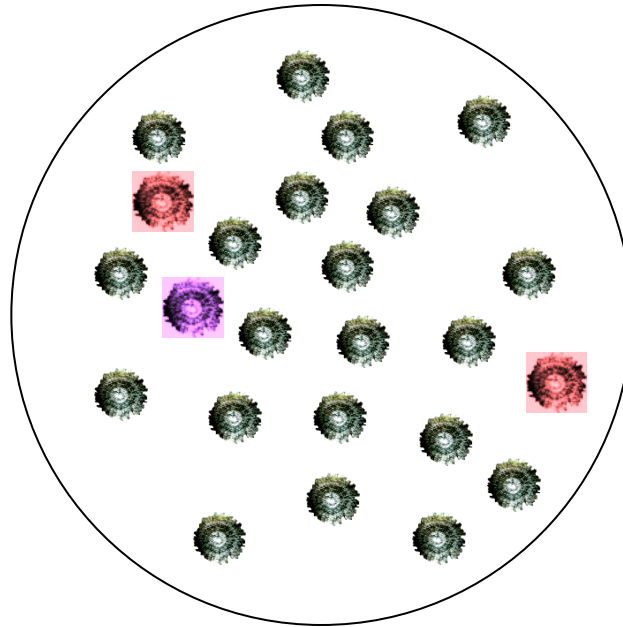
Bandes verticales 1 à 4: inconnus



# Test de complémentation de mutants Ade<sup>-</sup>



# Étude du génotype



Quelle est la cause génétique de  et  ?

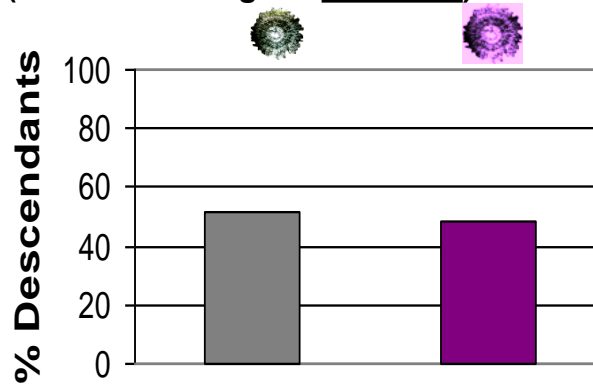
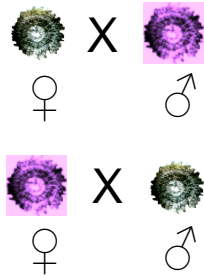
Combien de gènes impliqués dans l'apparition de chaque phénotype mutant ?

Les mutants  et  sont-ils semblables ?

# Quelle est la cause génétique de et ?

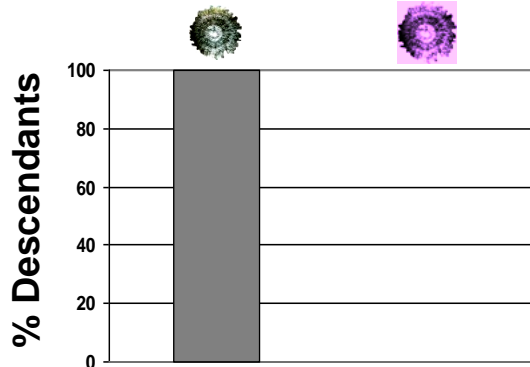
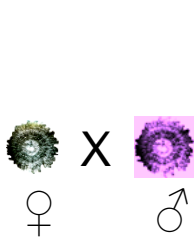
- Analyse de la descendance issue de croisements dirigés

## Ségrégation mendélienne (mutation d'un gène nucléaire)

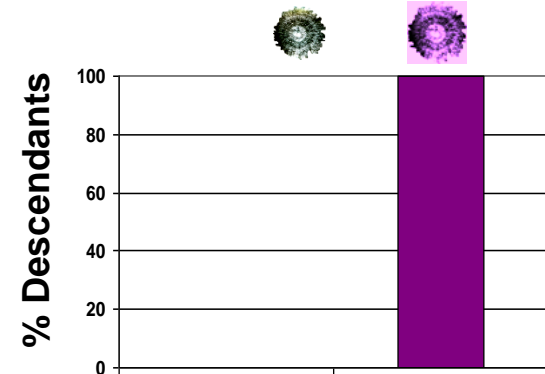
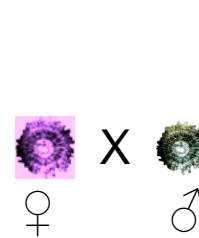


Descendants

## Ségrégation non-mendélienne (mutation d'un gène cytoplasmique)

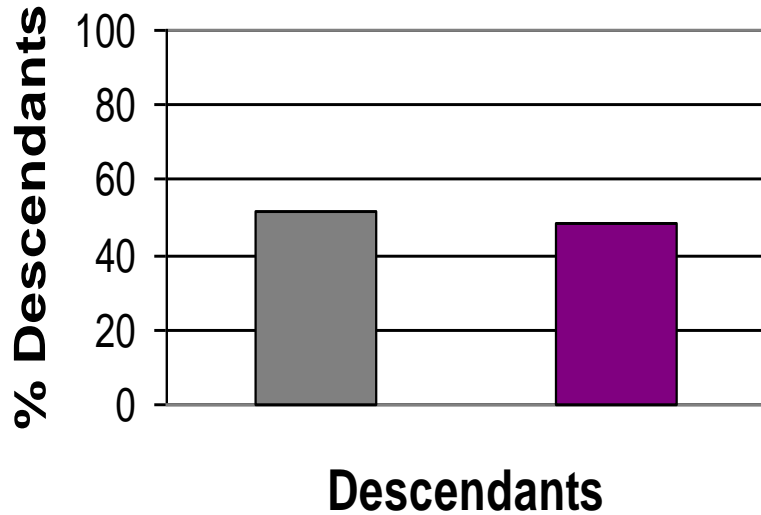


Descendants

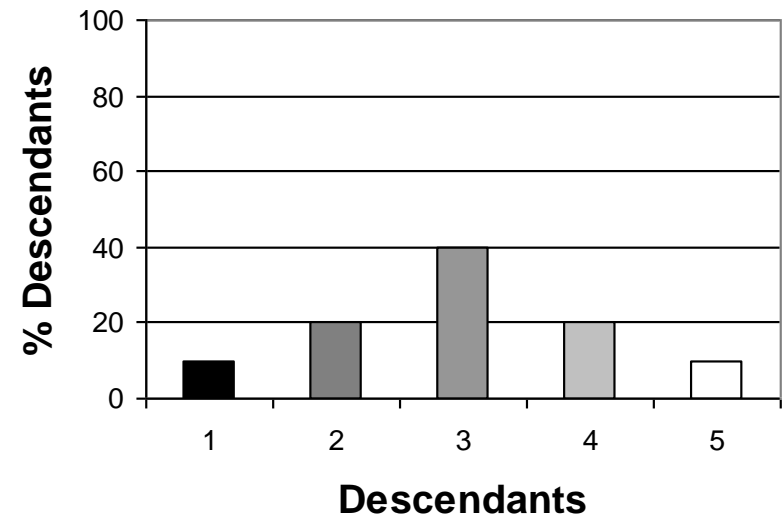


Descendants

# Combien de gènes impliqués.....?



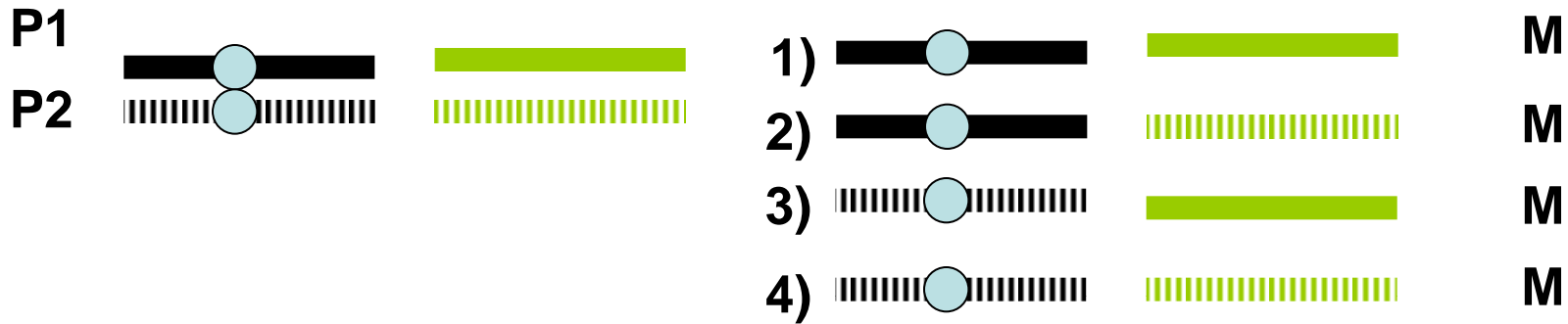
Monogénique



Polygénique

# Les mutants et sont-ils semblables? (*Bis*)

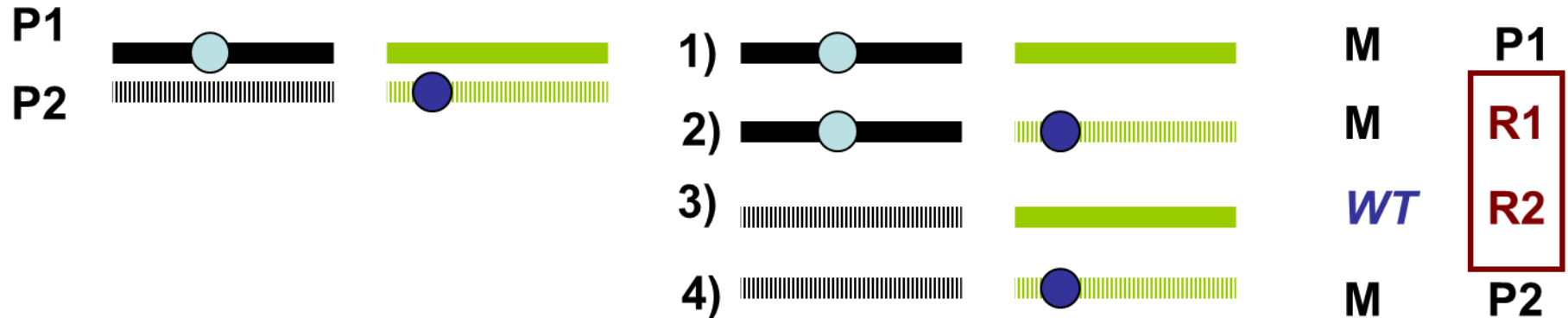
- Descendance de Mutant 1 x Mutant 2
  - ❖ 100% mutants: mutations alléliques



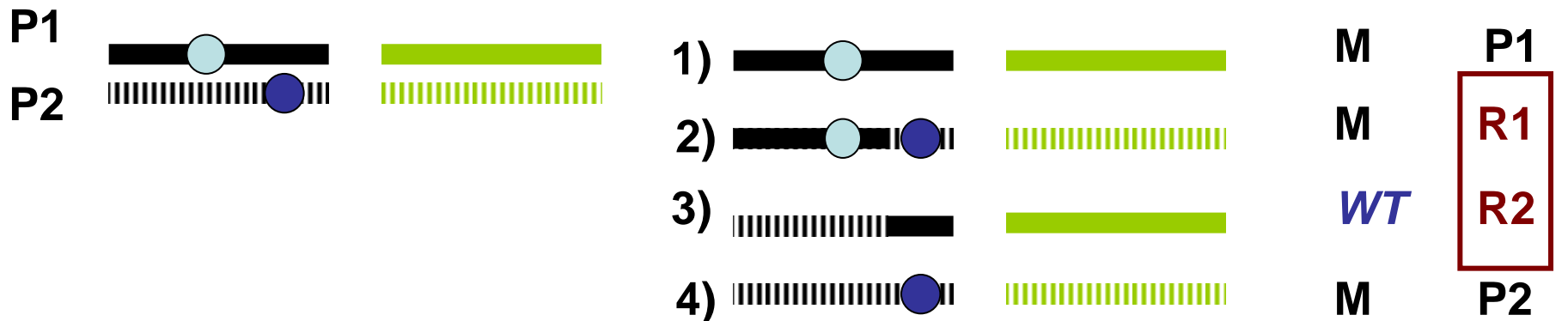
# Les mutants et sont-ils semblables? (*Bis*)

❖  $100\% > X \geq 75\%$  mutants: mutations non-alléliques

## Gènes non liés



## Gènes liés



# Cartographie du génome

- **Utilité**

- ❖ Nombre de chromosomes (groupes de liaison)
- ❖ Ordre des gènes sur chaque chromosome
- ❖ Regroupements de gènes avec fonctions particulières
- ❖ Synténie-Évolution-Clonage positionnel

- **Méthodes**

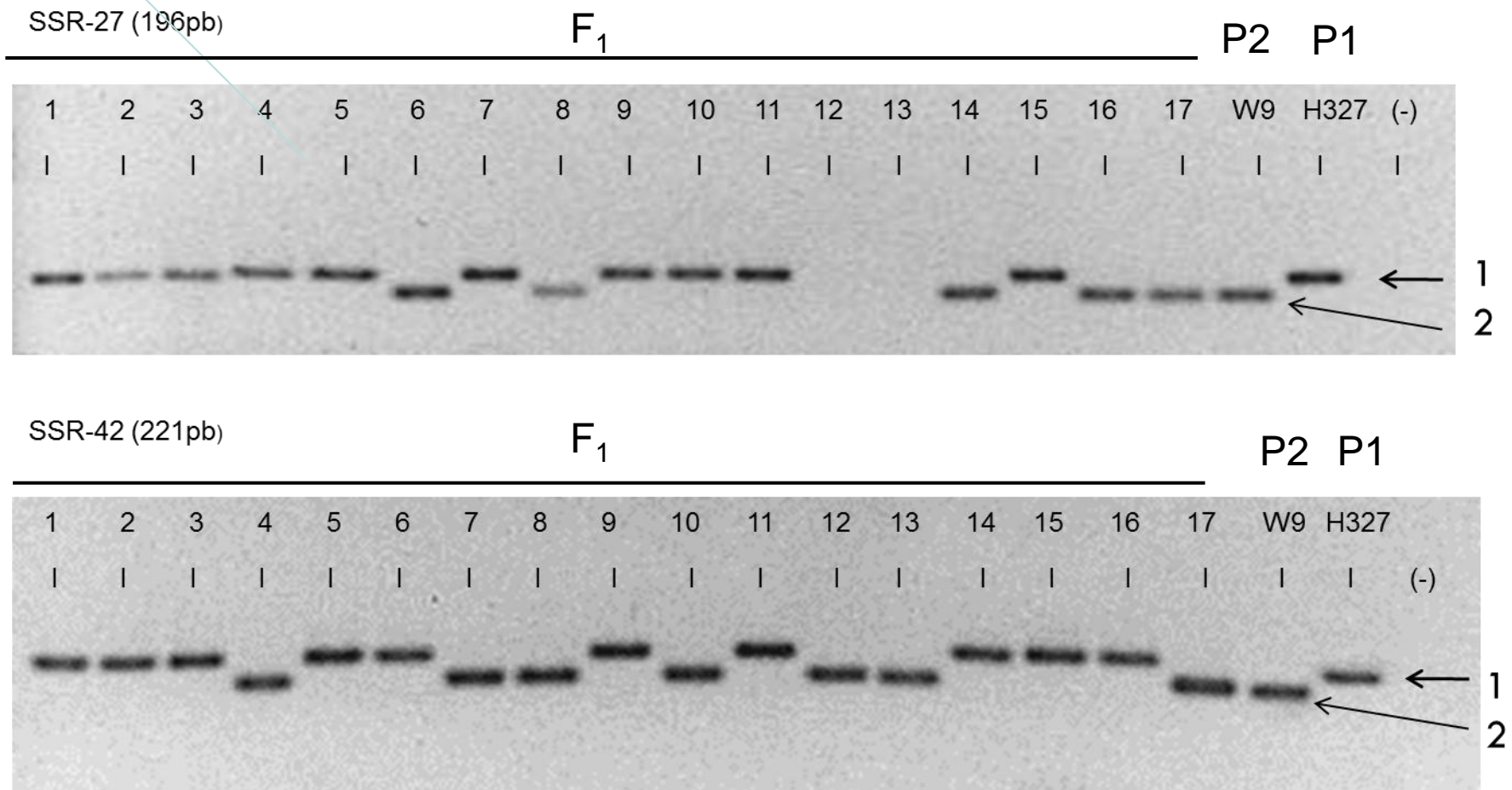
- ❖ Pourcentage de recombinaison
  - Gènes non liés: 50% R
  - Gènes liés:  $\leq 50\%$  R
- ❖ Tests statistiques et modèles:  $\chi^2$ , LOD, algorithmes
- ❖ Approche *classique*: cartographie d'un nouveau gène nécessite analyse de nouveaux croisements
- ❖ Approche *moderne*:
  - un même croisement peut servir à la cartographie simultanée de plusieurs loci
  - combinaison de méthodes génétiques et physiques

# Ségrégation de marqueurs phénotypiques



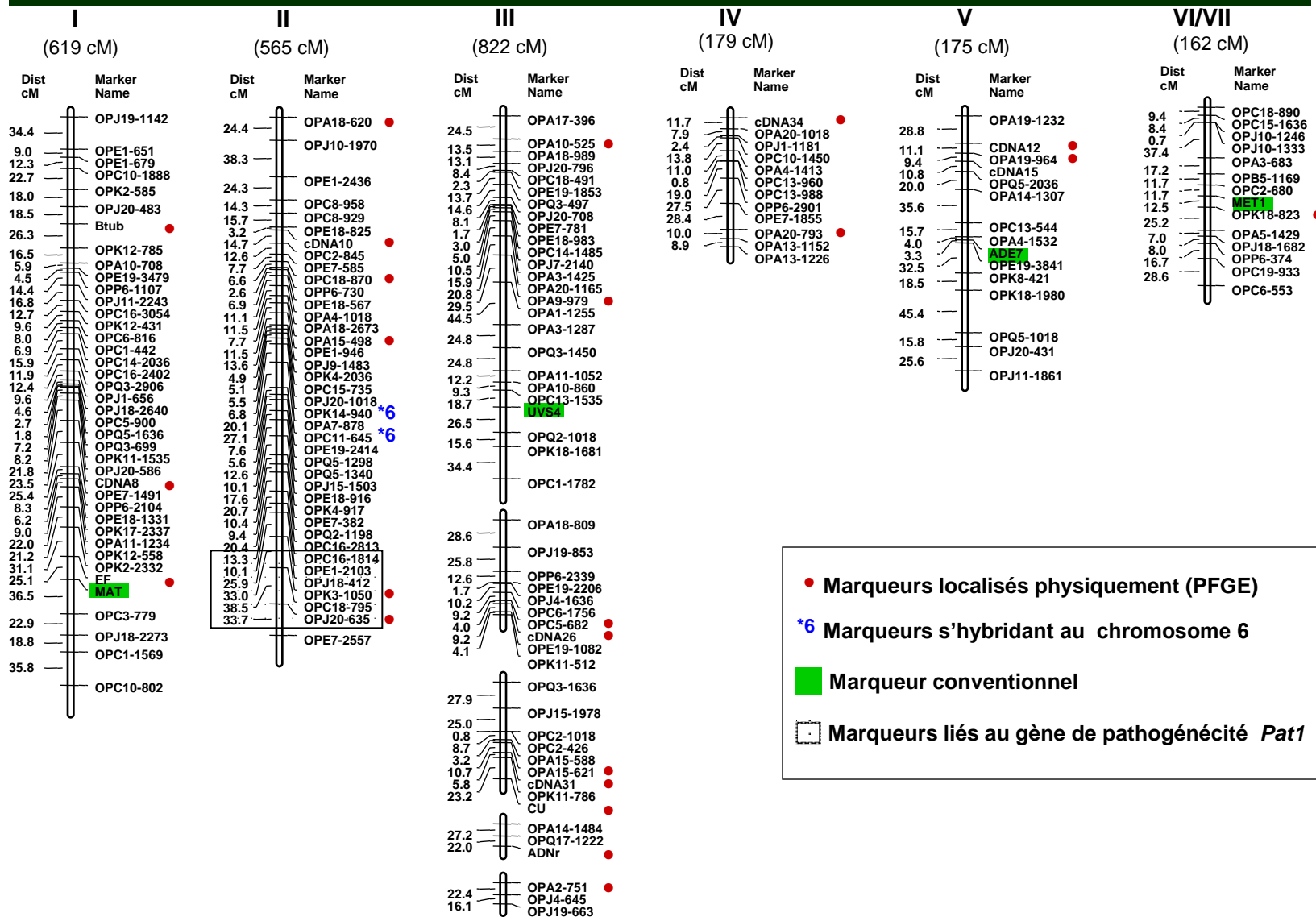
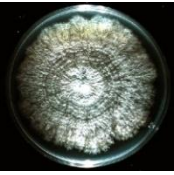


# Ségrégation de marqueurs moléculaires



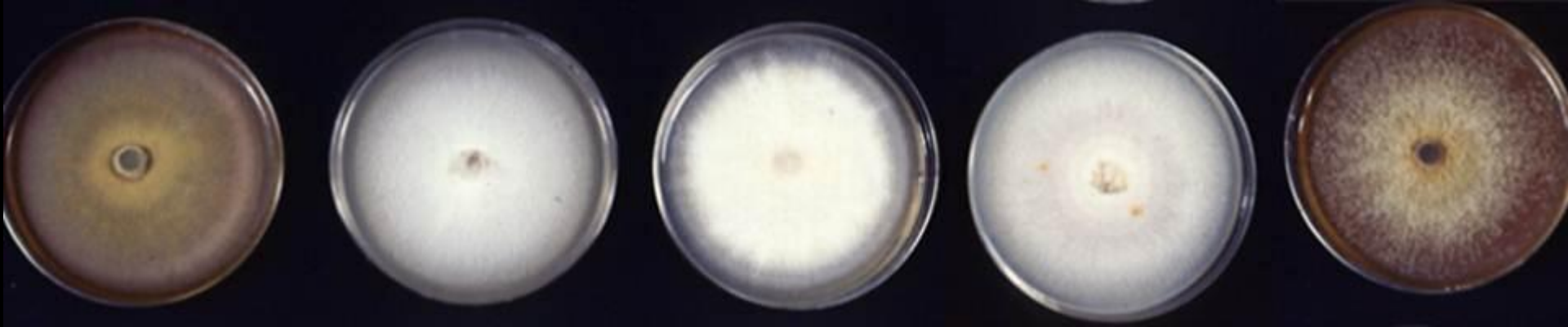
Ségrégation de deux marqueurs de type microsatellite (SSR-27 et SSR-42) au sein de la descendance (F<sub>1</sub>) d'un croisement interspécidique *O. ulmi* W9 x *O. novo-ulmi* H327 (Diez et al., données non publiées)

# Carte génétique *O. ulmi* / *O. novo-ulmi*



- Marqueurs localisés physiquement (PFGE)
- \*6 Marqueurs s'hybridant au chromosome 6
- Marqueur conventionnel
- Marqueurs liés au gène de pathogénécité *Pat1*

Carte établie à partir des données de ségrégation de marqueurs moléculaires (RAPD, gènes clonés) et de marqueurs conventionnels dans la descendance F1 d'un croisement interspécifique *O. novo-ulmi* 416-R-14 x *O. ulmi* Q412T.



# Démonstration

- Lancement d'un croisement sexué
- Extraction d'ascospores (approche en vrac)
- Placage d'individus  $F_1$