

# Les outils de la biologie moléculaire au service de l'étude des champignons

Par Thomas Isarno

Fédération mycologique de l'Est - INRA  
Champenois - 21 novembre 2015

Cette journée faisait suite aux dernières rencontres organisées en novembre 2011. Le but était de consolider les connaissances et de faire part des nouvelles évolutions dans le domaine.

## L'ADN, histoire de la découverte et propriétés - François Le Tacon

Après quelques généralités sur l'ADN, sa découverte, sa structure et sa fonction, nous entrons dans le vif du sujet, à savoir les gènes et le séquençage. Nous apprenons que dans le génome (plusieurs milliards de base) tout l'ADN n'est pas exprimé et qu'il existe des séquences codantes et des séquences non-codantes. Les séquences codantes sont même en minorité, environ 5%. L'expression d'un gène conduit à la synthèse d'une protéine au travers de la transcription (ADN en ARN) et de la traduction (ARN en protéine). La régulation de l'expression des gènes intervient par le biais de modifications des gènes, on dit aussi des modifications épigénétiques, notamment la méthylation.

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'enchaînement des nucléotides sur un fragment d'ADN donné. Au départ le séquençage était fait par la méthode de Sanger, mais récemment les techniques ont évolué d'une manière importante permettant d'aller à des vitesses de séquençage de 100 à 100 fois plus rapides (Illumina) que les méthodes classiques. D'une manière pratique le séquençage procède selon la méthode suivante:

- Extraire l'ADN
- Fragmentation à l'aide d'enzymes de restriction
- Multiplication des fragments (par PCR). Ceci est très important pour obtenir un matériel suffisant pour le séquençage
- Séquençage proprement dit
- Assemblage des données

Il existe différentes méthodes. La méthode BAC procède par une carte génétique. La méthode Shotgun (ou aléatoire) procède par de petites séquences qui sont assemblées par la suite à l'aide d'algorithmes. La méthode shotgun est très rapide, mais l'assemblage peut être complexe du fait de multiples séquences répétées. Dans ce cas il est nécessaire de repasser par la carte génétique.

## Le transcriptome - Annegret Kohler

Pas tous les gènes ne sont actifs en même temps. L'expression d'un génome à un moment donné peut être étudiée en considérant l'ensemble des ARN messager dans une cellule, aussi appelé le Transcriptome. Cela permet d'identifier les gènes actifs. Cela permet aussi de déterminer combien de gènes sont nécessaires pour une fonction donnée.

L'ARN est difficile à étudier contrairement à l'ADN qui est très stable. Le rôle de l'ARN est de passer le message, il est donc vite dégradé par les ribonucléases que l'on trouve partout (air, peau). Il convient donc de stabiliser l'ARN par des mesures particulières (Gants, congélation immédiate des échantillons dans l'azote liquide).

L'étude de l'ARN se fait à l'aide de la transcriptase inverse qui permet de convertir un fragment d'ARN en ADN complémentaire qui est lui plus stable et plus facile à étudier et surtout à multiplier par PCR.

Deux exemples sont donnés avec l'étude du transcriptome de la truffe noire et de *Pisolithus microcarpus*.

## **Evolution des génomes des champignons symbiotiques/saprophytes -**

### **Francis Martin**

Comment utiliser la génomique pour comprendre l'évolution des champignons ? Dans un gramme de sol forestier on peut trouver 100 espèces de champignons différents ainsi que des millions de bactéries.

L'INRA s'intéresse aux macromycètes pour comprendre les cycles forestiers, notamment le piégeage du carbone.

Il existe un continuum entre les saprotrophes et les mycorhiziques purs. Il existe 5 grands groupes:

- Pourriture blanche : dégradent la lignine et la cellulose
- Pourriture brune : dégradent juste la cellulose
- Décomposeurs de litières. Ceux là n'ont pas les "dents" assez dures...
- Symbiotes ectomycorhiziques
- Pathogènes : détruit son hôte.

On peut recréer des filiations évolutives entre les grands groupes. Les mycorhiziens étaient les premiers. D'abord les endomycorhiziens (400 Mi d'années), puis les ectomycorhiziens (250 millions d'années) ensuite, plus récemment (50 millions d'années), sont apparus les mycorhiziens ericoïdes.

Les ectomycorhiziens ont un petit génome (840-200 millions de bases) ce qui constitue un avantage pour le séquençage. On peut utiliser le génome comme une machine à remonter le temps (arbre de vie). Il existe un programme de séquençage international : 100 fungal Genome Project. Il s'agit d'une collaboration internationale coordonnée par le JGI en Californie (Joe Spatafora en est l'initiateur).

Comment expliquer l'émergence de la symbiose ectomycorhizique. En fait une telle symbiose comporte beaucoup d'avantages par rapport aux saprotrophes comme les pourritures blanches. Les ectomycorhiziens ont besoin de beaucoup moins d'enzymes. En revanche la dépendance aux éléments nutritifs est plus importante.

## **Le génome des champignons pathogènes - Sébastien Duplessis**

Le pathogène se nourrit de son hôte. De tels organismes sont apparus dans divers règnes. Il en existe plusieurs types:

- Nérotrophe : se nourrit de son hôte mort
- Biotrophe : se nourrit de son hôte vivant
- Hémibiotrophe : combine les deux types précédents.

Les modes d'entrée sont soit naturels, soit via une pénétration active. Pour les plantes la maladie est une exception. Il existe des niveaux de résistance face aux pathogènes.

- Récepteurs à la surface des cellules : il s'agit de la résistance basale. Dans ce cas c'est bien souvent la chitine qui est détectée et induit une réponse. A ce stade le pathogène peut empêcher cette réponse immunitaire par les effecteurs.
- Récepteurs à l'intérieur de la cellule : dans ce cas là ce sont les effecteurs qui sont détectés.

Les pathogènes fongiques ont un rôle important sur l'homme comme conséquence directe sur son alimentation. La génomique comparative permet de comprendre ce qui fait un pathogène et quels sont les mécanismes évolutifs qui entrent en jeu. Ce travail est en cours et de nombreux gènes ont été identifiés mais on ne comprend pas encore bien à quoi ils servent.

### Identification moléculaire des espèces et des isolats - Claude Murat.

Comment se forment les espèces : une nouvelle espèce se forme lorsqu'une population se sépare en deux. La spéciation est un processus lent mais il existe des exceptions notamment le moustique du métro de Londres (150 ans) ainsi que *Gastrosuillus laricinus* qui s'est séparé de *Suillus grevillei* en 60 ans.

La notion d'espèce biologique est un des problèmes les plus importants dans la biologie de l'évolution. Il existe de nombreux concepts d'espèces (Mayden en 1997 dénombre pas moins de 22 concepts différents).

Comment peut-on identifier les espèces biologiques : dans les années 40 on a commencé à pratiquer des tests d'inter fertilité. Mais tous les champignons n'ont pas de reproductions sexuées.

Approche par le génome : identification phylogénétique. Un petit bout de génome est séquencé. Les espèces appartiennent au plus petit groupe (notion de cluster).

### Séquençage haut débit et description des communautés fongiques - Marc Buée



Le séquençage haut débit permet maintenant des résultats impossibles avant. Les coûts sont dérisoires et les résultats rapides. On peut analyser une population fongique donnée en prélevant directement des échantillons de sol. Ainsi on ne dépend plus des fructifications. Séquences importantes pour l'étude:

- ADN ribosomique:
  - 18S : ce sont des séquences très conservées car très réparées. Ce sont des outils importants pour séparer les genres entre eux.
  - ITS (Intergenal Transcribe Signal) : ces séquences sont peu réparées par le système donc très utiles pour différencier des espèces entre elles.

- IGS/Microsatellites : ce sont des séquences non codantes. Il n'existe pas de système SOS de réparation. Ces séquences sont donc très variables d'un individu à l'autre dans une même espèce.

Grâce à l'analyse du sol on peut même procéder à de la PCR quantitative.

**Deux autres prises de parole ont terminé cette belle et intéressante journée**

### **Phylogénie moléculaire du genre *Tuber* - François Le Tacon**

D'après le conférencier il y aurait beaucoup trop d'espèces décrites, environ plus de 600. Il en existerait beaucoup moins dans la réalité, plutôt 160-180 espèces.

### **Analyse des populations de *Tuber melanosporum* dans une truffière - Herminia de la Varga**



Une étude a été réalisée au sein d'une truffière. Pour cela on a étudié les individus d'une même espèce. Séquences microsatellites. On a même pu observer deux types de reproduction sexuée dans la même truffière.

Remerciements à :

- Mrs. François Le Tacon et Daniel Sugny pour l'organisation de cette journée
- Aux différents conférenciers, chercheurs au centre INRA Nancy/Lorraine basé à Champenoux, cités dans les textes ci-dessus, pour tout le mal qu'ils se sont donné pour que l'Assemblée puisse comprendre et assimiler le contenu de leurs interventions.