

Travaux



Champignon *Microbotryum* produisant ses spores violettes dans les anthères de la plante *Silene latifolia*



Champignons *Penicillium* du fromage



Pommes sauvages et cultivées



Tavelure du pommier causée par le champignon *Venturia inaequalis*

L'équipe utilise depuis 15 ans différentes approches (expérimentations en laboratoire, modélisation, terrain, génétique des populations, génomique) pour **étudier la diversité des champignons et comprendre comment les organismes évoluent et s'adaptent à leur environnement, en utilisant les champignons comme modèles**. La question de l'adaptation est fondamentale pour comprendre le monde vivant, et elle a également une importance appliquée dans le cadre des changements globaux actuels (changements du climat mais aussi mouvements d'organismes à l'échelle de la planète et urbanisation) et des demandes croissantes de nourriture. D'autre part, la diversité microbienne et son évolution sont encore mal connues, alors que les champignons ont une grande importance écologique et économique. En effet, les champignons assurent de nombreux services dans les écosystèmes (comme le recyclage de la matière organique et les symbioses essentielles avec les plantes), ils peuvent être des pathogènes dangereux dans les populations naturelles ou les cultures, et ils ont été domestiqués pour des usages variés, de la fermentation de la nourriture à la production d'antibiotiques.

Dans ce cadre, l'équipe a notamment étudié **les invasions biologiques de champignons pathogènes qui créent de nouvelles maladies émergentes**. Nos travaux sur les invasions biologiques ont été pionniers, montrant que les invasions biologiques peuvent redistribuer la diversité génétique de la région d'origine et permettent des hybridations entre populations précédemment isolées, et donc la création de nouveaux génotypes, possiblement mieux adaptés. Des invasions de champignons pathogènes peuvent cependant se produire à partir d'un nombre très réduit de génotypes tout en causant de graves maladies émergentes sur des cultures ou des plantes naturelles. L'équipe a notamment étudié les invasions du charbon des anthères des caryophyllacées, de le mildiou de la vigne (en collaboration avec F. Delmotte, INRA Bordeaux), et de la nécrose du collet du colza (en collaboration avec T. Rouxel, INRA Bioger), en utilisant des marqueurs génétiques et des méthodes sophistiquées de génétique des populations permettant de tester des scénarios évolutifs. Pour le mildiou de la vigne, *Plasmopara viticola*, nous avons montré que son introduction en Europe depuis les Etats-Unis au début du XXème siècle avait résulté, par « saut de puce », en deux populations différenciées en Europe, séparant l'Europe de l'ouest et l'Europe de l'Est, à cause d'échanges commerciaux et humains réduits. Pour le champignon *Microbotryum violaceum*, responsable d'une maladie castratrice (appelée charbon des anthères) chez les plantes caryophyllacées, l'équipe a montré que l'invasion aux Etats-Unis de la maladie sur le compagnon blanc au début du XXème siècle a pu se faire par l'introduction de seulement 2 individus depuis l'Ecosse. **Ces études ont ainsi globalement permis de mieux comprendre comment se produisent les invasions de pathogènes, ce qui a de grandes conséquences appliquées en agriculture mais aussi pour le maintien de l'équilibre des écosystèmes naturels face aux changements globaux.**

Nous avons aussi développé des études sur les **mécanismes évolutifs plus généraux à l'origine des nouvelles maladies sur des plantes (naturelles ou cultures) causées par des champignons**, en utilisant diverses approches. Dans un premier temps, des modélisations mathématiques ont démontré la possibilité d'un mécanisme évolutif jusque-là inconnu permettant la formation rapide de nouvelles espèces de pathogènes sur de nouveaux hôtes : notre modèle a montré que le cycle de

vie des champignons qui se reproduisent dans leur hôte facilite grandement l'adaptation, la spécialisation et la divergence génétique. Des analyses comparatives réalisées ensuite par l'équipe ont confirmé que les champignons se reproduisant dans leur plante hôte se diversifient plus facilement par adaptation sur de nouveaux hôtes, sans avoir besoin de mettre en place un isolement reproducteur spécifique. Le suivi sur plusieurs années d'une population d'un champignon pathogène responsable de la tavelure du pommier, ayant contourné récemment une résistance de pommiers cultivés, a encore davantage corroboré l'existence et l'importance de ce mécanisme de changement d'hôte. Ce suivi a en effet montré que, comme prédit par le modèle, le fait de se croiser dans les feuilles de son hôte facilitait l'adaptation et la différenciation de chaque population de pathogène sur son hôte, et permettait bien l'émergence rapide de nouveaux pathogènes sur de nouveaux hôtes.

Des études phylogénétiques et des études comparatives menées par l'équipe ont montré d'autre part que les pathogènes se diversifient principalement en changeant d'hôte et non par co-divergence, c'est-à-dire une diversification en suivant celle de ses hôtes, comme il avait pourtant longtemps été admis. Un autre aspect des recherches sur l'émergence de nouvelles maladies a consisté à réaliser des expériences sur le groupe de champignons pathogènes *Microbotryum*, génétiquement proches mais spécialisés sur des plantes différentes. Des croisements expérimentaux ont permis de révéler des espèces cryptiques et de montrer que les incompatibilités génétiques entre espèces, responsables de l'isolement reproducteur, évoluaient linéairement avec la distance génétique et étaient principalement dues à des différences de caryotypes, et non pas à des incompatibilités entre allèles, comme il est plus souvent admis.

Depuis quelques années, l'équipe s'est fortement orientée vers des études génomiques, pour obtenir de nouvelles perspectives sur les mécanismes d'adaptation. Les champignons sont de bons modèles eucaryotes pour ces questions, étant donnés leurs petits génomes, leur phase haploïde accessible, et les données fonctionnelles disponibles. Nous avons pu obtenir un assemblage complet du génome de l'espèce *Microbotryum lychnidis-dioicae*, grâce aux améliorations récentes de la technologie Pacific Biosciences, qui produit de très longues lectures. Cet assemblage a été le premier génome eucaryote publié en étant presque complètement assemblé avec des nouvelles technologies de séquençage. L'analyse du génome de *M. lychnidis-dioicae* a permis de dégager des caractéristiques qui sont en lien avec le mode de vie biotrophe obligatoire de ce champignon. Nous avons montré que le génome de *M. lychnidis-dioicae* possédait notamment un répertoire d'effecteurs potentiels sous forme de petites protéines sécrétées et des expansions de familles de gènes comme des lipases qui pourraient permettre de dégrader les cires cuticulaires de la plante hôte.

Nous avons également séquencé les génomes de cinquante individus pour étudier les bases génomiques de l'adaptation chez *M. lychnidis-dioicae*. En effet, un épisode d'adaptation récent laisse des signatures particulières : par exemple lorsqu'un allèle bénéfique est sélectionné, la fréquence de cet allèle dans la population augmente rapidement, ainsi que celle des allèles qui lui sont liés, créant une baisse locale de la diversité dans le génome. C'est ce qu'on appelle un balayage sélectif. Notre étude de génomique des populations a révélé des balayages sélectifs dans une cinquantaine de régions du génome chez *M. lychnidis-dioicae* (17% du génome est affecté par des balayages sélectifs récents). Dans les régions génomiques des balayages sélectifs, les catégories fonctionnelles les plus représentées sont liées aux fonctions d'interaction avec l'hôte. **Il s'agit d'une des premières études de balayages sélectifs à l'échelle d'un génome complet bien assemblé d'eucaryote, et les résultats montrent qu'une proportion inattendue du génome est impliquée dans un épisode d'adaptation récente et identifie des fonctions clés. Globalement, les résultats des études ci-dessus sont importants pour la compréhension de l'évolution de nouvelles espèces de champignons pathogènes émergents, et de leur adaptation sur de nouveaux hôtes.**

Nous avons également séquencé plusieurs génomes du champignon *M. lychnidis-dioicae* parasitant des plantes dans des régions plus ou moins contaminées autour de Chernobyl et

étudié la fréquence de la maladie, la capacité des spores à germer et à pousser. Nous n'avons trouvé aucune trace de mutations délétères dans les génomes ou de baisse de viabilité qui seraient corrélées avec le taux de radiation, sans doute parce que les pigments rouges du champignon protègent contre les radiations. De fait, de nombreux champignons à pigments sont très résistants et peuvent pousser près du réacteur endommagé. Par contre, la fréquence de la maladie diminuait avec le taux de radiation, sans doute parce que l'abondance des pollinisateurs, qui transportent les spores du champignon, diminuait avec l'augmentation des radiations, car ils y sont très sensibles.

D'autre part, nous avons étudié les facteurs qui influencent la virulence des maladies, c'est-à-dire la sévérité de leurs symptômes, pour essayer de comprendre comment et pourquoi un pathogène s'adapte pour devenir mortel ou au contraire bénin. En utilisant de nouveau les champignons *Microbotryum* comme modèles biologiques, nous avons réalisé une des premières études vérifiant certains attendus théoriques importants : 1) les infections multiples (c'est-à-dire la présence de plusieurs génotypes de pathogène dans un même hôte) augmentent la virulence, tandis que 2) l'apparement entre pathogènes au sein d'un même hôte diminue la virulence grâce à la coopération; 3) les parasites castrateurs sont sélectionnés pour augmenter la survie de leur hôte, pour pouvoir se transmettre plus longtemps.

Tous ces travaux ont permis de mieux comprendre 1) comment émergent les nouvelles maladies dans les agrosystèmes et les écosystèmes naturels, 2) comment s'adaptent les champignons pathogènes à de nouveaux hôtes ou à des changements globaux, 3) quels sont les facteurs contrôlant la virulence des maladies. Ces avancées entraînent des perspectives appliquées, en agriculture et en médecine, mais aussi pour le maintien de la biodiversité.

Un projet développé plus récemment dans l'équipe porte sur **l'étude de la diversité et de la domestication des champignons *Penicillium* du fromage, qui sont d'excellents modèles pour comprendre les processus génomiques d'adaptation des organismes,** grâce à leurs petits génomes, la sélection forte et récente exercée par l'homme pour des caractères connus (couleur, métabolisme, ...), des phénotypes assez simples à étudier expérimentalement et la possibilité de validation fonctionnelle. L'homme fabrique du fromage depuis le Néolithique, et la sélection s'est accentuée et mondialisée plus récemment. Il s'agit donc d'un excellent modèle pour comprendre les mécanismes évolutifs générant une biodiversité, ou la réduisant, et pour comprendre les mécanismes d'une adaptation rapide à un nouvel environnement.

Nous avons analysé les génomes de *Penicillium camemberti*, utilisé pour la production du camembert et du Brie, et *P. roqueforti*, utilisé pour la fabrication des fromages à pâte persillée, et nous les avons comparés à d'autres génomes de *Penicillium* non présents dans l'environnement fromager. Nous avons démontré qu'il s'était produit une adaptation au fromage très rapide à l'échelle évolutive, les populations utilisées pour l'affinage poussant mieux dans les conditions du fromage, riche en sel, en lipides, en protéines, et excluant mieux les autres micro-organismes compétiteurs. Nous avons également montré que l'adaptation rapide au fromage s'était réalisée par de multiples transferts de gènes horizontaux entre espèces du fromage, pourtant très distantes génétiquement. Nous avons notamment mis en évidence des transferts horizontaux très récents comprenant des gènes impliqués dans le métabolisme du lactose et d'autres dans la compétition contre les autres micro-organismes du fromage. Ces régions du génome étaient identiques sur toute leur longueur entre toutes les espèces présentes dans l'environnement fromager, mêmes très éloignées génétiquement, et par contre absentes de tous les autres *Penicillium* et des bases de données publiques. Nous avons d'autre part étudié la diversité génétique au sein de *P. roqueforti*, et nous avons identifié plusieurs groupes génétiques différenciés, dont deux sont inoculés dans le fromage, un est constitué uniquement de souches récoltées sur des milieux autres que le fromage, comme le bois ou l'ensilage, et le dernier est constitué de contaminants alimentaires. **Ces travaux ont permis d'améliorer notre compréhension des processus génomique d'adaptation rapide à**

de nouveaux environnements, en particulier en soulignant l'importance des duplications de gènes et des transferts horizontaux, même chez les eucaryotes.

Un autre projet développé dans l'équipe porte sur **l'étude de la domestication du pommier**. Depuis la découverte en Asie Centrale d'une espèce de pommier sauvage (*Malus sieversii*), portant de relativement grosses pommes (*M. domestica*), il était admis que cette espèce sauvage asiatique avait donné naissance au pommier cultivé. Nous avons montré, à l'aide de marqueurs génétiques hypervariables (microsatellites), que l'histoire de la domestication du pommier était plus complexe : nous avons révélé que les variétés de *M. domestica* portaient dans leurs génomes des traces de flux génétiques récents depuis d'autres espèces sauvages présentes le long des routes de la Soie, par lesquelles le pommier a été ramené en Europe au temps de la Rome Antique lors de ses échanges commerciaux avec l'Asie. En particulier, nous avons détecté de très fréquentes et récentes traces d'introgessions génétiques (c'est-à-dire des imports de fragments génomiques d'une espèce vers une autre par des hybridations entre espèces) dans le génome du pommier domestique venant du pommier sauvage européen, *M. sylvestris*, présent à l'état très disséminé dans nos forêts. Le pommier sauvage européen a donc été un contributeur secondaire, mais important, au génome du pommier domestique actuel, à tel point que les variétés de pommes cultivées actuellement en Europe sont plus proches génétiquement du pommier sauvage européen que de son ancêtre initial asiatique. Réciproquement, le pommier domestique a également introgressé le pommier sauvage européen à tel point qu'il met en danger l'intégrité et les ressources génétiques du pommier sauvage européen. Nous avons montré que les introgressions étaient d'autant plus fréquentes que les régions étaient anthropisées. D'autre part, nous avons montré que les filières commerciales vendent des graines de pommiers sauvages qui sont en fait des hybrides, voire des pommiers domestiqués. Les graines distribuées par l'ONF correspondent bien à des génotypes sauvages, mais avec une base génétique très restreinte ; une très faible diversité génétique est donc replantée actuellement. **Nos travaux ont entraîné la publication de lois de protection du pommier sauvage et la mise en place de vergers conservatoires.**

En utilisant les mêmes marqueurs génétiques, nous avons étudié la structure génétique du pommier sauvage européen à travers sa distribution géographique en Europe. Nous avons montré que cette espèce est structurée en trois groupes génétiques, un groupe s'étendant sur l'ouest de l'Europe, un autre dans les Carpates et un dernier dans les Balkans. Ce type de structure génétique témoigne de l'existence de refuges glaciaires dans le sud de l'Europe lors de la dernière glaciation: le nord de l'Europe ayant été recouvert de glace, les plantes n'ont pu persister que dans les péninsules ibérique, balkanique et des Carpates, entre lesquels il n'y avait plus de flux de gènes, entraînant une différenciation génétique. Lors du réchauffement post-glaciaire, les populations ont recolonisé le nord de l'Europe, en gardant leur structure génétique. Cette connaissance de la structure génétique du pommier sauvage est essentielle pour la mise en place d'une politique de conservation de cette espèce menacée par l'anthropisation, pour conserver sa diversité génétique et son adaptation locale. **Nos travaux ont donc apporté un nouvel aperçu de l'histoire évolutive du pommier domestique, qui a une grande importance économique et culturelle. Nous avons montré que le pommier sauvage européen était mis en danger par des flux de gènes provenant du pommier cultivé et nous avons révélé sa structure génétique, qui reflète des réponses aux changements climatiques passés, qui peuvent contribuer à prédire, voire atténuer, les conséquences des changements climatiques actuels.**