



HAL
open science

Caractérisation de deux acteurs d'une voie de régulation rétrograde induite par un stress mitochondrial chez *Podospora anserina*

Elodie Bovier

► **To cite this version:**

Elodie Bovier. Caractérisation de deux acteurs d'une voie de régulation rétrograde induite par un stress mitochondrial chez *Podospora anserina*. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112156 . tel-00769947

HAL Id: tel-00769947

<https://theses.hal.science/tel-00769947>

Submitted on 4 Jan 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN BIOLOGIE DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD

Présentée et soutenue publiquement par

Elodie BOVIER

Le 11 septembre 2012

**Caractérisation de deux acteurs d'une voie de régulation
rétrograde induite par un stress mitochondrial chez
*Podospora anserina***

*Laboratoire Sénescence et mitochondries chez P. anserina
Centre de Génétique Moléculaire – UPR3404 - CNRS*

Membres du Jury

Pr Fabrice CONFALONIERI
Dr Agnès DELAHODDE
Pr Philippe SILAR
Dr Ludivine WALTER
Dr Hakim MIREAU
Pr Annie SAINSARD-CHANET

Professeur
Directeur de recherche
Professeur
Maître de Conférences
Chargé de recherche
Professeur

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Directeur de thèse

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN BIOLOGIE DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD

Présentée et soutenue publiquement par

Elodie BOVIER

Le 11 septembre 2012

**Caractérisation de deux acteurs d'une voie de régulation
rétrograde induite par un stress mitochondrial chez
*Podospora anserina***

*Laboratoire Sénescence et mitochondries chez P. anserina
Centre de Génétique Moléculaire – UPR3404 - CNRS*

Membres du Jury

Pr Fabrice CONFALONIERI
Dr Agnès DELAHODDE
Pr Philippe SILAR
Dr Ludivine WALTER
Dr Hakim MIREAU
Pr Annie SAINSARD-CHANET

Professeur
Directeur de recherche
Professeur
Maître de Conférences
Chargé de recherche
Professeur

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Jour J plus quelques uns,

Il faut un peu de temps pour réaliser que ces 4 années de travail ont abouti.

Cette thèse ne se serait pas faite dans de si bonnes conditions sans de nombreuses personnes.

En tout premier lieu, pour tout ce que j'ai appris, en science mais pas que, pour cette disponibilité malgré les nombreuses charges et pour la gentillesse, la compréhension la complicité et la confiance donnée, un très grand merci à Annie. J'ai pas mal hésité avant de me lancer dans cette aventure avec vous, mais pas une seconde je n'ai regretté mon choix !! En plus d'une sacrée expérience, ça a été une très belle rencontre. Merci !

La vie au labo n'aurait pas été si riche sans Carole, toujours prête à répondre à mes questions, à me guider dans la BM et podo et à animer toutes les pauses café !

Je n'oublie pas Riyadh, comme un grand frère dans cette aventure, jusqu'au bout pour me détendre avant l'heure H, ni Adeline, la « petite dernière », plus motivée tu meurs, su29 est entre de bonne mains ! ! Merci pour les pauses clope, piégées ou pas sur le balcon

Anita, tes boites, tes tubes m'ont permis d'avoir tous ces résultats, et ta bonne humeur de tous les jours a été un véritable soleil !

J'ai rejoint le « gris » parisien pour presque 5 ans, mais cette équipe, mon équipe, a été comme une famille, ma famille, pendant ces 4 années loin du soleil et de la mer !

Je tiens vraiment à remercier Fabrice, « parrain » de cette histoire, pour ses conseils au cours de cette thèse et pour ceux prodigués dès le master. Ça a été un plaisir d'être votre étudiante, et encore plus de finir avec vous comme président de mon jury !

J'ai appris beaucoup et surtout que la science ne peut se faire seul, isolé, alors merci à l'ensemble du département « mito » pour tout ce que j'ai appris sur cette petite chose, à Philippe de m'avoir montré comment marcher sur le génome accompagné d'Artemis, à Karine et Frédérique pour l'analyse du transcriptome, à Françoise avec qui j'ai exploré les spectres des métabolites, à Yves pour toutes les analyse de bio-info sur ces fichus motifs, aux membres de mon jury pour la discussion que nous avons eu.

Merci aussi aux « Sélénos » et aux « *C. elegans* », les pots, les midis, les rires et les chameaux ont donné du funky à tout ça !

Cette période n'a pas été un long fleuve tranquille, et si je n'ai pas lâché la pagaie c'est qu'il y avait un sacré soutien !

Au CGM (CégéM for ever !), je remercie Yona, sans toi toutes ces heures, ces we auraient été bien plus vides, moins désaltérants aussi;), merci aussi d'avoir catalysé cette super ambiance entre tous !! Cindy, la petite pharmacienne toujours prête pour une pause clope et pour râler sur GATC ! Marion & Zahia, les « grandes », déjà passées par là, le mot juste pour rassurer, remotiver, ne pas oublier les garçons quand même, les droso Antoine et Mathieu ... c'est cool que vous ayez quitté votre 3è étage !! Manue et Antoine, merci pour l'assoc' les bbq et les bibifoc ! A tous un grand Merci !!

Un grand merci à mes coupines de master Aurélie et Dr Mathilde, les filles c'était super chouette de vous avoir ici, de vous embrigader dans mon sud (... et aussi de squatter vos machines à laver !), Apéro ?

Hors CGM (!!!), une « cavalerie » était là toujours prête à me soutenir, quitte à faire semblant de tout comprendre, mais vraiment curieuse de mon sujet, un grand merci, vous avez été une vraie force ! En vrac, Loraine & Guillaume (Super les punta cana !), la version brune Flo & Jo, Vanessa, Dimitry, Emma & John (à toi Johnny !), Antoine, Guillaume (Vive les brigades d'intervention !). J'ai une sacré chance d'avoir des amis tels que vous tous !!! MERCI !!

Merci à vous, parisien ... ou pas (la petite deviendra grande, qui sait, Fringe...).

Les mots les plus difficiles à trouver sont ceux pour mes parents, « parce que tu le vaux bien » ce leitmotiv que vous impulsiez m'a accompagnée, soutenue. Votre présence de tous les instants depuis le début, votre amour m'ont portée, mission accomplie j'ai eu mon diplôme ! Ma pitchoune, ma chérie... quelle force de t'avoir près de moi, peu importe les kilomètres. Y a pas à dire tu es une vraie tite grande sœur ! Je vous aime et n'ai pas de mots suffisamment forts pour vous remercier

Didi devient grande, cette expérience humaine et scientifique m'a construite, fortifiée, je n'en oublierais rien. Je vais m'éloigner un peu, mais c'est sur le virus de la recherche a pris !

Sommaire

Introduction	9
A. La régulation rétrograde	11
B. Plusieurs voies de régulation rétrograde mitochondriale coexistent chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
1. Première mise en évidence d'une réponse nucléaire à la fonction mitochondriale chez <i>S. cerevisiae</i> : la voie RTG	14
1.1 Il existe une réponse transcriptionnelle à l'état fonctionnel de la mitochondrie.....	14
1.2 Les protéines Rtg1p, Rtg2p et Rtg3p sont les acteurs principaux de cette voie de régulation	17
1.3 La voie RTG permet une adaptation métabolique	18
1.4 La voie RTG est liée au contrôle qualité des mitochondries : l'autophagie	19
1.5 La voie RTG, une voie adaptative à un dysfonctionnement mitochondrial mais non universelle	21
2. La réponse globale à un dysfonctionnement mitochondrial montre des réponses indépendantes des facteurs RTG.....	23
2.1 <i>ATO3</i> , exemple d'un gène régulé par un dysfonctionnement mitochondrial indépendamment des facteurs RTG.....	23
2.2 La régulation rétrograde PDR dépendante est responsable de la résistance multiple aux drogues.....	25
2.2.1 Pdr1p et Pdr3p sont les régulateurs majeurs de la résistance multiple aux drogues	25
2.2.2 La régulation rétrograde PDR dépendante : Une fonction dans l'adaptation membranaire ?.....	26
C. Régulations rétrogrades chez les plantes	29
1. La régulation rétrograde mitochondriale	29
1.1 La chaîne respiratoire mitochondriale des cellules végétales	29
1.2 L'oxydase alternative est le prototype de la régulation rétrograde mitochondriale	30
1.2.1 L'Oxydase alternative: une voie alternative aux fonctions développementales	30

1.2.2 L'oxydase alternative : une voie alternative permettant une adaptation à différents stress	31
1.2.3 L'oxydase alternative est une cible type de la régulation rétrograde mitochondriale.....	32
1.2.4 La régulation rétrograde de l'AOX est une réponse adaptative complexe	33
1.2.5 Le promoteur du gène <i>AOX1</i> contient plusieurs éléments régulateurs	34
1.3 Un signal mitochondrie noyau encore mal connu	36
1.3.1 Rôle des ROS dans la transduction du signal	36
1.3.2 Rôle du NO et de l'éthylène dans la transduction du signal.....	36
1.3.3 Rôle du citrate dans la transduction du signal.....	36
1.3.4 Rôle du calcium dans la transduction du signal	37
1.3.5 Rôle de l'acide salicylique dans la transduction du signal	38
2. La régulation rétrograde plastidiale	40
2.1 Première évidence d'une communication du plaste vers le noyau : l'étude du mutant <i>albostrians</i> de l'orge.....	41
2.2 Identification des mutants GUN – implication de la voie de biosynthèse des tétrapyrroles.....	44
2.3 Régulation rétrograde en réponse à l'état d'oxydo-réduction des chloroplastes.....	46
2.4 L'effet de l'expression des gènes plastidiaux et de l'import protéique sur l'expression de gènes nucléaires.....	48
2.4.1 L'expression des gènes plastidiaux.....	48
2.4.2 L'import des protéines.....	48
2.5 Des régulations rétrogrades plastidiales distinctes mais partageant certains effecteurs	49
3. Coordination des métabolismes mitochondriaux et chloroplastiques par la régulation de cible de la régulation rétrograde mitochondriale	52

D. Il existe un lien causal entre fonction respiratoire et phénomène de sénescence **54**

1. Première mise en évidence d'un lien causal entre fonction respiratoire et longévité chez <i>Podospora anserina</i>	54
1.1 <i>Podospora anserina</i> , un organisme modèle.....	54
1.2 Première mise en évidence d'un lien causal entre fonction respiratoire et longévité.....	56
1.2.1 Chaîne respiratoire de <i>Podospora anserina</i>	56

1.2.2 Des dysfonctionnements de la chaîne respiratoire conduisent à une augmentation de la longévité de <i>P. anserina</i>	58
2. Le lien causal entre fonction respiratoire et longévité est un phénomène conservé.....	60
2.1 Des dysfonctionnements de la fonction respiratoire conduisent à une augmentation de la longévité chez <i>Caenorhabditis elegans</i>	60
2.2 Des dysfonctionnements de la fonction respiratoire conduisent à une augmentation de la longévité chez <i>Drosophila melanogaster</i>	62
E. Objectifs de la thèse	64
Résultats	67
A. Les facteurs de transcription RSE2 et RSE3 activent l'expression de l'oxydase alternative, des enzymes de la néoglucogenèse et contrôlent la longévité de <i>Podospora anserina</i>	69
1. Article 1 - Identification des facteurs de transcription RSE2 et RSE3.....	69
1.1 Résumé des résultats obtenus	69
1.2 Article 1: "Mutations in Two Zinc Cluster Proteins Activate Alternative Respiratory and Gluconeogenic Pathways and Restore Senescence in Long-lived Respiratory Mutants of <i>Podospora anserina</i> "	72
2. Résultats annexes	91
2.1 Comparaison fonctionnelle entre RSE2/RSE3 et Rds2/Ert1 de <i>S. cerevisiae</i>	91
2.1.1 La perte de fonction de rse2 et de rse3 ne modifie pas le phénotype des souches sur kétoconazole.....	92
2.1.2 La perte de fonction de rse2 et de rse3 ne présente pas de phénotype particulier sur calcofluor	93
2.2 Comparaison fonctionnelle entre RSE2/RSE3 et AcuM/AcuK de <i>A. nidulans</i>	94
B. Analyse génétique et fonctionnelle des acteurs de la régulation rétrograde mitochondriale : RSE2 et RSE3.....	99
1. Article 2- Analyse génétique et fonctionnelle des facteurs de transcription RSE2 et RSE3	99
1.1 Résumé des résultats obtenus	99
1.2 Article 2 – "Genetic and functional investigation of the Zn ₂ Cys ₆ transcription factors RSE2 and RSE3 that control gluconeogenesis and alternative respiration in <i>Podospora anserina</i> "	102

2. Résultats annexes	129
2.1 Analyse de la reprogrammation de l'expression du génome nucléaire en fonction de l'état allélique des facteurs de transcription RSE2 et RSE3 par une approche transcriptomique.....	129
2.2 Recherche du motif CGG(N) ₇ CGG dans les séquences régulatrices des gènes différentiellement exprimés.....	133
2.3 Les gènes <i>gdh</i> et <i>gogat</i> impliqués dans le métabolisme azoté ne sont pas des cibles de la régulation rétrograde médiée par RSE2 et RSE3.....	135
2.3.1 <i>gdh</i> et <i>gogat</i> ne sont pas des cibles de la régulation rétrograde mitochondriale en réponse à un dysfonctionnement respiratoire	135
2.3.2 L'association des délétions Δ <i>gdh</i> et Δ <i>gogat</i> est létale	136
2.3. Conservation et composition des séquences protéiques de RSE2 et RSE3	138
3. Analyse métabolomique de la réponse à un traitement à l'antimycine et du mutant gain de fonction <i>rse2-1</i> (<i>rse2</i> ^{Y326D})	141
3.1 Méthodologie.....	141
3.2 Analyse métabolomique de la réponse à un traitement à l'antimycine.....	142
3.3 La mutation <i>rse2</i> ^{Y326D} est suffisante pour induire cette reprogrammation	144
C. Etude préliminaire d'un suppresseur faible du mutant <i>cox5::ble</i>	146
1. Caractérisation d'un suppresseur faible du mutant <i>cox5::ble</i> indépendant des facteurs RSE2 et RSE3	146
1.1 Description phénotypique.....	146
1.2 L'effet suppresseur de <i>su38</i> et <i>su57</i> ne passe pas par l'induction du gène <i>aox</i>	147
2. Caractérisation du gène <i>med13</i>	148
Discussion	151
Annexes	163
Bibliographie.....	177

Index des figures

Figure 1:	La régulation rétrograde mitochondriale ou chloroplastique en réponse aux stress	13
Figure 2:	Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale de <i>S. cerevisiae</i>	14
Figure 3:	Les gènes <i>CIT1</i> et <i>CIT2</i> codent deux formes de citrate synthase appartenant au cycle de Krebs et au cycle du glyoxylate respectivement	16
Figure 4:	Modèle de la régulation rétrograde proposé par Liu et Butow	17
Figure 5:	Régulation des gènes codant les intermédiaires des cycles de Krebs et du glyoxylate par les systèmes HAP et RTG en réponse au fonctionnement mitochondrial chez <i>S. cerevisiae</i>	19
Figure 6:	Mitophagie	21
Figure 7:	Régulation transcriptionnelle lors du passage de la phase acide à la phase alcaline	24
Figure 8:	Résumé de la régulation rétrograde par les facteurs PDR	28
Figure 9:	Chaîne respiratoire mitochondriale de la cellule végétale	30
Figure 10:	Le promoteur du gène <i>AOX1</i>	35
Figure 11:	Le NO et le citrate sont deux messagers de l'induction de la régulation rétrograde	37
Figure 12:	Régulation de l'expression du gène <i>AOX</i> , cible type de la régulation rétrograde	39
Figure 13:	Métabolisme énergétique simplifié du chloroplaste	40
Figure 14:	Régulation de l'expression de la protéine LHCB dans la voie de photosynthèse	42
Figure 15:	Représentation schématique des croisements orientés entre les souches <i>albosteriens</i> et sauvage	43
Figure 16:	Positionnement des mutants insensibles à la régulation rétrograde plastidiale sur la voie de biosynthèse des tétrapyrroles	45
Figure 17:	Résumé de la régulation rétrograde plastidiale	51
Figure 18:	Mycélium d'une souche sauvage et image du réseau hyphal composant le mycélium de <i>Podospira anserina</i>	54

Figure 19:	Chaîne respiratoire mitochondriale de <i>P. anserina</i>	57
Figure 20:	Aspect mycélien et croissance des souches sauvage, <i>cox5::ble</i> et <i>cox::ble, gpd-aox</i>	58
Figure 21:	Courbes de survie et aspect mycélien des souches sauvage, et des mutants perte de fonction pour les complexes I ou IV de la chaîne respiratoire de <i>P. anserina</i>	59
Figure 22:	Résumé de la régulation de la longévité de <i>C. elegans</i> par des dysfonctionnements de la chaîne respiratoire	62
Figure 23 :	Arbre phylogénétique des orthologues de RSE2 et RSE3 chez quatre ascomycètes	91
Figure 24 :	Phénotype de <i>S. cerevisiae</i> sur kétoconazole	92
Figure 25 :	Phénotype sur kétoconazole	93
Figure 26 :	Phénotype sur calcofluor	94
Figure 27 :	Phénotype sur deux sources de carbone néoglucogénique : l'acide oléique et l'acétate	95
Figure 28 :	Phénotype du mutant <i>cox5::ble</i> sur deux sources de carbone néoglucogénique : l'acide oléique et l'acétate	96
Figure 29 :	Phénotype de la souche $\Delta sir2$ en fonction de la source de carbone	98
Figure 30 :	Analyse globale du transcriptome comparant les souches <i>rse2-1</i> , <i>rse3-1</i> , <i>rse2-1 rse3-1</i> , $\Delta rse2$, $\Delta rse3$ et $\Delta rse2 \Delta rse3$ à la souche sauvage	131
Figure 31 :	Recherche d'un enrichissement en CGG(N) ₇ CGG dans les séquences régulatrices des gènes différentiellement exprimés dans l'analyse transcriptomique	135
Figure 32 :	Niveau de transcrits des gènes <i>gogat</i> et <i>gdh</i> estimé par RT-qPCR en réponse à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire	136
Figure 33 :	Phénotype de germination d'une spore sauvage (<i>gdh</i> ⁺ ; <i>gogat</i> ⁺) et d'une spore double mutante $\Delta gdh \Delta gogat$ à trois jours	137
Figure 34 :	Conservation et composition des séquences protéiques de RSE2	139
Figure 35 :	Conservation et composition des séquences protéiques de RSE3	140
Figure 36 :	Niveau des métabolites dans une souche sauvage sur antimycine comparé à une souche sauvage en condition standard	143
Figure 37 :	Niveau des métabolites dans le mutant gain de fonction <i>rse2</i> ^{Y326D} comparé à une souche sauvage en condition standard	145

Figure 38 :	Phénotype de deux revertants issus de mutant <i>cox5::ble</i>	146
Figure 39 :	Aspects phénotypiques du suppresseur <i>su57</i>	147
Figure 40 :	Structure du gène Pa_4_6670	148

Index des Tableaux

Tableau 1:	Régulation de différentes isoformes d'AOX chez le maïs, le soja et Arabidospis	33
Tableau 2:	Phénotype des différentes combinaisons alléliques des gènes <i>rse2</i> et <i>rse3</i> associées aux mutants <i>cyc1-1</i> ou <i>cox5::ble</i> .	71
Tableau 3:	Gènes appartenant aux profils d'expression retenus	132
Tableau 4:	Tableau 4: Descendance de la spore dicaryotique $\Delta gdh/\Delta gdh$; $\Delta gogat/gogat+$	137

Index des Annexes

Annexe 1:	Régulation transcriptionnelle et flux métabolique autour du cycle de Krebs chez <i>S. cerevisiae</i>	153
Annexe 2:	Le cycle de vie de <i>P. anserina</i>	154
Annexe 3:	Modalité de ségrégation de 2 gènes indépendants chez <i>P. anserina</i>	156
Annexe 4:	Phénotype de croissance sur tween 80	158
Annexe 5 :	Voie d'assimilation de l'ammonium et synthèse de glutamate par les enzymes GOGAT et GDH	159
Annexe 6 :	Classification des espèces utilisées pour les alignements de séquences protéiques	160
Annexe 7 :	Alignement des séquences protéiques des orthologues de RSE3 des Pézizomycotina	161
Annexe 8 :	Liste des métabolites retrouvés lors des analyses métabolomiques	175

Introduction

*Ma thèse porte sur l'analyse de deux facteurs de transcription, RSE2 et RSE3, qui participent à une voie de communication intra cellulaire, la régulation rétrograde mitochondriale, chez le champignon filamenteux *Podospora anserina*. Cette introduction portera sur les régulations rétrogrades mitochondriale et chloroplastique et sera axée sur l'état des connaissances chez les différents modèles eucaryotes. L'accent sera mis sur son importance dans la capacité adaptative des organismes en réponse aux variations environnementales et à divers dysfonctionnements, enfin je présenterai le lien entre cette régulation rétrograde et la longévité des organismes.*

A. La régulation rétrograde

La cellule eucaryote est une entité compartimentée, dont le fonctionnement dépend de la coordination entre chacune de ses sous unités. Divers organites la composent, trois sont porteurs d'une information génétique : le noyau qui contient l'essentiel de l'information génétique et deux types d'organites particuliers, les mitochondries et les plastes. Ces deux organites sont issus de deux processus d'endosymbiose au cours de l'évolution de la cellule eucaryote. Le premier processus a été l'internalisation d'une α -protéobactérie qui donnera la mitochondrie chez tous les eucaryotes (Dyall, 2004), le second l'internalisation d'une cyanobactérie qui donnera la lignée des plastes chez les organismes eucaryotes photosynthétiques (glaucophytes, algues rouges et vertes, plantes terrestres) (Keeling, 2010). Aujourd'hui chacun de ces organites, dit semi-autonome, possède son propre génome qui contient un nombre variable de gènes, une partie du génome primitif ayant été transféré au noyau de la cellule eucaryote (Timmis *et al.*, 2004; Kleine *et al.*, 2009 ; Gross and Bhattacharya, 2011 pour revues) et leur cycle de division est asynchrone par rapport à la division cellulaire. Les gènes portés par ces organites ont une transmission non mendélienne et présentent le plus souvent une hérédité monoparentale.

La mitochondrie et le plaste, dont l'archétype est le chloroplaste, sont le siège de métabolismes centraux pour la cellule. La mitochondrie est notamment le siège de la respiration cellulaire au travers du processus de phosphorylation oxydative, qui permet la production d'énergie (par la production d'ATP) et qui est couplé au cycle de Krebs, carrefour du métabolisme carboné. Les chloroplastes sont notamment le siège de la photosynthèse, processus qui leur permet d'utiliser l'énergie lumineuse pour produire de la matière organique. Les mitochondries (et les chloroplastes) sont constituées de composants ayant une double origine, la majorité d'origine

nucléaire et un nombre limité d'origine mitochondriale (ou chloroplastique), ce qui implique une coordination de l'expression des génomes nucléaires et mitochondriaux (ou nucléaire et chloroplastiques) lors de la biogénèse de ces organites. Il existe donc un flux d'information et de matériel, du noyau vers la mitochondrie (ou le chloroplaste). Le contrôle de ce flux a été appelé le contrôle antérograde (Woodson *et al.*, 2011; Ryan and Hoogenraad, 2007). Mais, il existe aussi des signaux des mitochondries (ou des chloroplastes) vers le noyau. Ces signaux sont capables de moduler l'expression du génome nucléaire en réponse à l'état fonctionnel de la mitochondrie (ou du chloroplaste). Cette signalisation vers le noyau est appelée communication rétrograde mitochondriale (ou chloroplastique) (Woodson *et al.*, 2011; Ryan and Hoogenraad, 2007; Liu and Butow, 2006). Ce contrôle rétrograde couvre une grande variété de réponses cellulaires allant du maintien de l'homéostasie cellulaire, en ajustant l'expression du génome nucléaire au fonctionnement de la mitochondrie (ou du chloroplaste) à la plasticité adaptative en réponse aux stress perturbant le bon fonctionnement de ces organites. L'induction d'une régulation rétrograde mitochondriale (ou chloroplastique) aura comme conséquence une reprogrammation de l'expression du génome nucléaire en réponse à divers stress biotiques ou abiotiques subits (Figure1).

La suite de cette introduction portera spécifiquement sur la régulation rétrograde mitochondriale et sur la régulation rétrograde chloroplastique induites en réponse à des dysfonctionnements de ces organites essentiels.

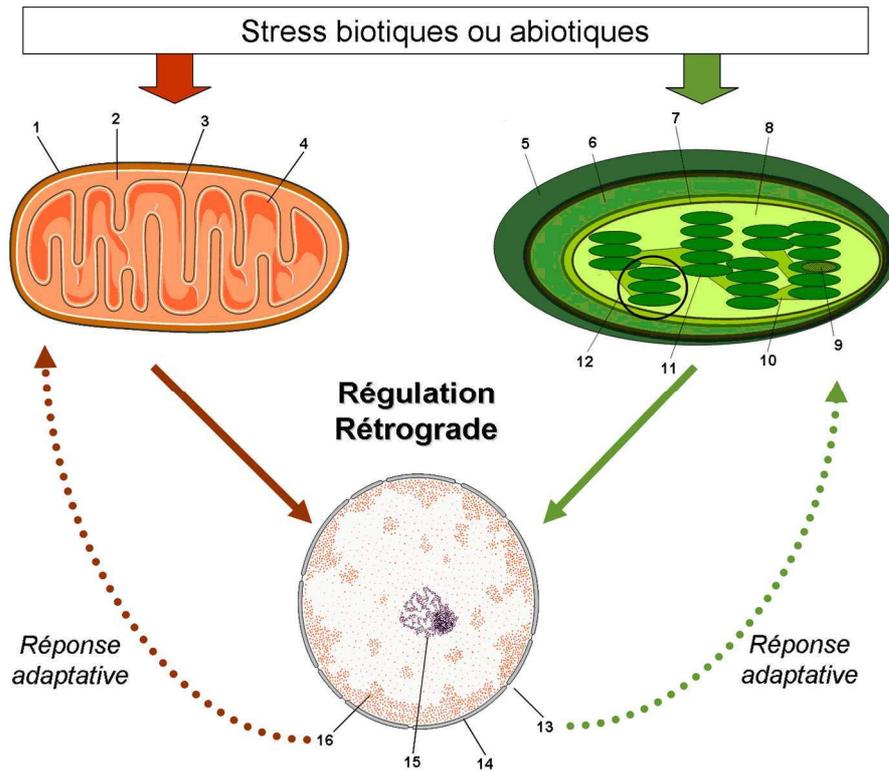


Figure 1: La régulation rétrograde mitochondriale ou chloroplastique en réponse aux stress

La mitochondrie (en orange) et le chloroplaste (en vert) perçoivent les stress biotiques ou abiotiques qui vont perturber leur état fonctionnel. Ils transmettent alors un (ou plusieurs) signal au noyau (flèches pleines) *via* la régulation rétrograde. La nature de ces signaux et des voies de transduction sont très imparfaitement connus. En réponse, le noyau reprogramme l'expression de ses gènes permettant ainsi une réponse adaptative au signal perçu (flèches discontinues).

La mitochondrie est composée d'une membrane externe (1) et d'une membrane interne qui forme des invaginations appelées crêtes (3). Ces membranes délimitent l'espace intermembranaire (2) et la matrice mitochondriale (4).

Le chloroplaste est lui aussi composé de deux membranes, une externe (5), une interne (7) et un espace intermembranaire (6). Dans l'espace délimité par la membrane interne se trouvent le stroma (8) et les thylakoïdes (11) regroupés en piles nommées grana (12), ils sont reliés par des lamelles (10). L'espace intérieur délimité par les membranes des thylakoïdes est appelé lumen (9).

Les structures du noyau représentées sont : 13, le pore nucléaire ; 14 l'enveloppe nucléaire ; 15 le nucléole et 16 la chromatine.

B. Plusieurs voies de régulation rétrograde mitochondriale coexistent chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

1. Première mise en évidence d'une réponse nucléaire à la fonction mitochondriale chez *S. cerevisiae* : la voie RTG

1.1 Il existe une réponse transcriptionnelle à l'état fonctionnel de la mitochondrie

En 1987, les travaux de l'équipe de R. Butow ont mis en évidence des gènes nucléaires différemment exprimés en fonction du génotype mitochondrial (Parikh *et al.*, 1987). Le génome mitochondrial code notamment certaines sous unités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (Cytbp du complexe III ; Cox1p, Cox2p et Cox3p du complexe IV ; Atp6p, Atp8p et Atp9p de l'Atp synthase chez *S. cerevisiae*). La chaîne respiratoire de *S.cerevisiae* a la particularité de ne pas avoir de complexe I auquel se substituent deux NADH déshydrogénases externes et une interne (voir Figure2).

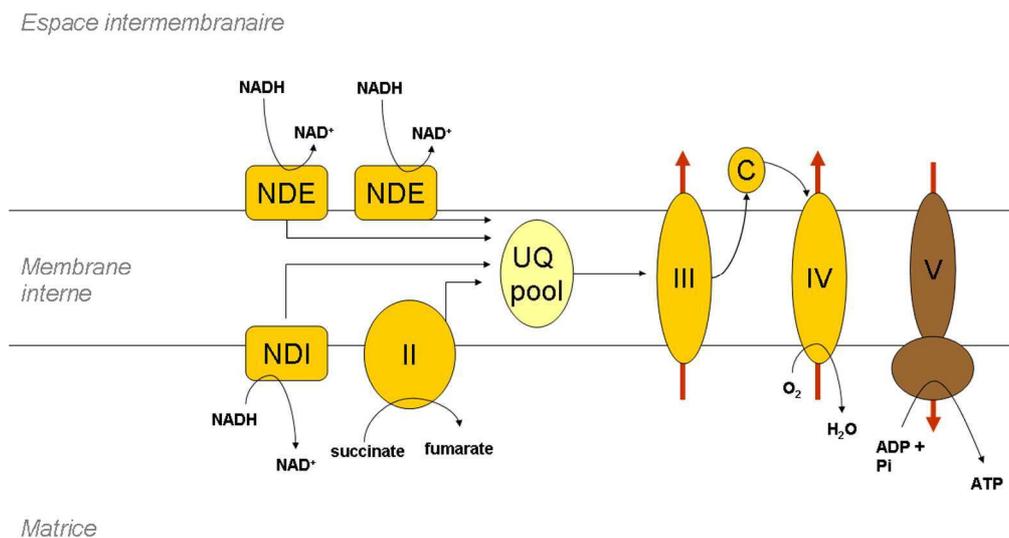


Figure 2: Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale de *S. cerevisiae*

La chaîne respiratoire est localisée dans la membrane interne de la mitochondrie et est constituée de plusieurs complexes multi-protéiques permettant la production d'ATP grâce à un transfert d'électrons (flèches noires) couplé à la mise en place d'une force protomotrice. Chez *S. cerevisiae* il n'existe pas de complexe I. L'oxydation du NADH se fait via une NADH déshydrogénase interne (NDI) et deux externes (NDE). Les électrons produits par l'oxydation du NADH et du FADH₂ sont transférés au complexe III *via* le pool des quinones (UQ pool), puis en direction du complexe IV (cytochrome oxydase), la force protomotrice nécessaire au fonctionnement de l'ATP synthase (complexe V) se fait par l'éjection de protons dans l'espace intermembranaire au niveau des complexes III et IV (flèches rouges).

Les travaux de l'équipe de R. Butow ont porté sur des souches de génotypes mitochondriaux différents : une souche *mit-* portant une délétion du gène *COX3*, une souche ρ^- portant une grande délétion (700 paires de bases) du génome mitochondrial, une souche ρ^0 dépourvue d'ADN mitochondrial et une souche ρ^+ possédant un génome mitochondrial intact. A l'exception de cette dernière, toutes ces souches se caractérisent par une perte de la fonction respiratoire. Deux catégories de transcrits différentiellement régulés par rapport à la souche sauvage ont été discriminés: d'une part des transcrits induits chez tous les mutants, répondant donc à la déficience respiratoire et d'autre part des transcrits « petite spécifique » qui ne sont pas induits dans la souche *mit-*. Ces données montrent donc qu'il existe deux types de réponse, une face au dysfonctionnement mitochondrial et une spécifique à la nature de ce dysfonctionnement. Bien que cette analyse n'ait pas permis d'identifier les transcrits différentiellement régulés, elle montre que pour un même phénotype respiratoire, le noyau répond différemment selon le génotype mitochondrial. La suite de l'étude a consisté à quantifier les transcrits de différentes sous unités de la chaîne respiratoire codées par le génome nucléaire: les sous unités α et β de l'ATP synthase, le cytochrome c et la sous unité IV de la cytochrome oxydase. Seul le transcrit de la sous unité VI de la cytochrome oxydase a été clairement identifié comme répondant à l'état du génome mitochondrial dans cette étude (Parikh *et al.*, 1987). Ce sont ces modifications de l'expression du génome nucléaire en réponse à la perturbation de la fonction respiratoire mitochondriale qui ont été appelées « régulation rétrograde » chez *S. cerevisiae*.

La suite des recherches sur cette régulation rétrograde a permis de définir un gène type de cette voie rétrograde, le gène *CIT2* (CITrate synthase 2). Il existe deux isoformes de citrate synthase chez *S. cerevisiae*, une mitochondriale codée par le gène *CIT1* appartenant au cycle de Krebs (ou cycle des acides tricarboxyliques, TCA) et une autre peroxyssomale codée par le gène *CIT2* et appartenant au cycle du glyoxylate (Kim *et al.*, 1986). Le cycle du glyoxylate (Figure 3), présent chez les plantes, les champignons et certaines bactéries, est une variante du cycle de Krebs. Il est responsable de la conversion de composés à deux carbones (C2) en composés à quatre carbones (C4). De ce fait, il permet à la cellule d'utiliser des composés carbonés simples (comme l'acétate) quand des sources de carbone complexes (comme le glucose) ne sont pas disponibles, mais aussi d'utiliser les produits générés par la beta oxydation des acides gras pour approvisionner la néoglucogenèse. Le cycle du glyoxylate convertit l'isocitrate en glyoxylate et en succinate et non pas en α -cétoglutarate comme le fait le cycle de Krebs. Le cycle de Krebs a

un rôle de biosynthèse et de production d'équivalents réducteurs consommés par la chaîne respiratoire, et plusieurs de ses intermédiaires sont des précurseurs de voies anaboliques. Si ces précurseurs sont consommés dans les voies anaboliques, il est nécessaire de réapprovisionner le cycle. Ainsi lorsque le malate (et/ou l'oxaloacétate) produits par le cycle de Krebs sont utilisés comme substrat néoglucogénique, le cycle du glyoxylate peut réalimenter le cycle de Krebs en succinate (Figure 3). Ce type de voie métabolique permettant le réapprovisionnement du cycle de Krebs est dite anapleurotique. Les cycles du glyoxylate et des acides tricarboxyliques sont induits transcriptionnellement au cours du « schift diauxique » (passage d'un métabolisme fermentaire à un métabolisme respiratoire) (Une partie de la régulation métabolique au cours du shift diauxique est illustré dans l'annexe 1) (DeRisi, 1997).

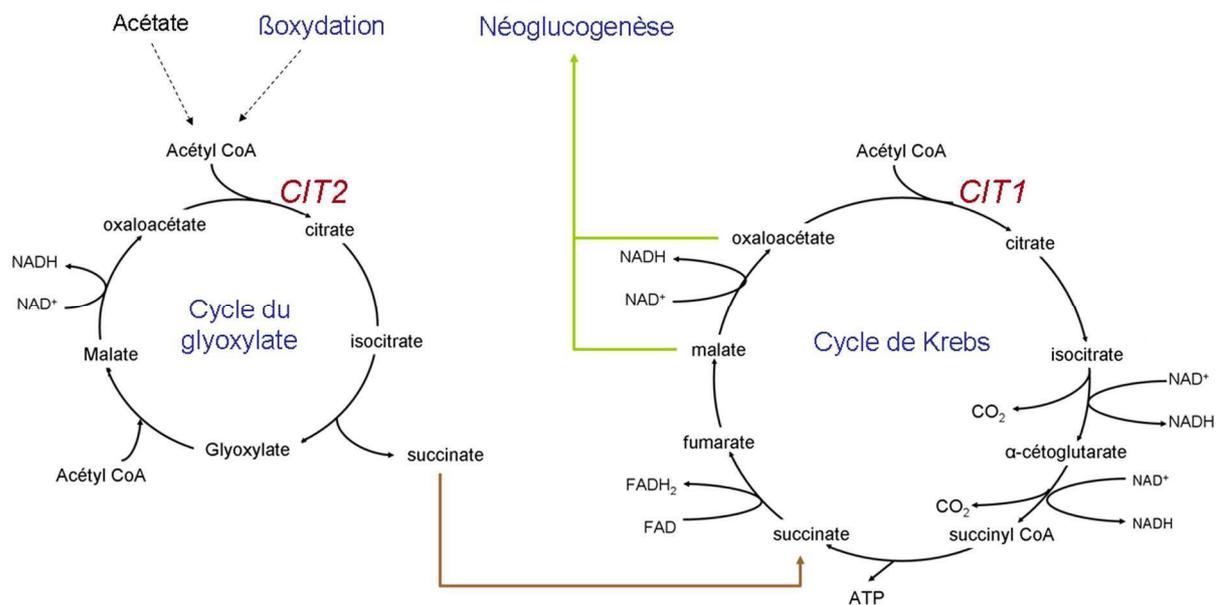


Figure 3: Les gènes *CIT1* et *CIT2* codent deux formes de citrate synthase appartenant au cycle de Krebs et au cycle du glyoxylate respectivement

Le cycle de Krebs est mitochondrial tandis que le cycle du glyoxylate est peroxysomal chez *S. cerevisiae*. Le cycle du glyoxylate est la voie responsable de la conversion de composés en C2 (comme l'acétate ou les produits de la bêta-oxydation) en intermédiaires métaboliques tel que le succinate qui peut alors entrer dans le cycle de Krebs (flèche marron) et alimenter la néoglucogénèse (flèche verte).

Le gène *CIT2* n'est pratiquement pas exprimé dans des conditions fermentescibles mais sa transcription est augmentée d'un facteur 30 dans des cellules ρ^0 et il est aussi induit en contexte ρ^+ lorsqu'il y a inhibition de la chaîne respiratoire par l'antimycine A (un inhibiteur du complexe III). La transcription du gène *CIT2* répond donc à un état fonctionnel de la mitochondrie (Liao *et al.*, 1991).

1.2 Les protéines Rtg1p, Rtg2p et Rtg3p sont les acteurs principaux de cette voie de régulation

La régulation rétrograde impliquée dans l'induction de *CIT2* a depuis été particulièrement étudiée. Trois acteurs de cette régulation rétrograde, Rtg1p, Rtg2p et Rtg3p, ont été caractérisés (Liao and Butow, 1993; Jia *et al.*, 1997). La construction d'un système rapporteur utilisant la séquence promotrice du gène *CIT2* a permis d'isoler plusieurs autres régulateurs positifs (Sekito *et al.*, 2000, 2002; Liu and Butow, 1999). *RTG1* et *RTG3* codent des facteurs de transcription de la famille des bHLH/Zip. Ils reconnaissent, en hétérodimère, une séquence spécifique (la Rbox composée d'un site GTAC) de la région promotrice de leurs cibles, dont *CIT2* (Rothermel *et al.*, 1997) (Figure 4).

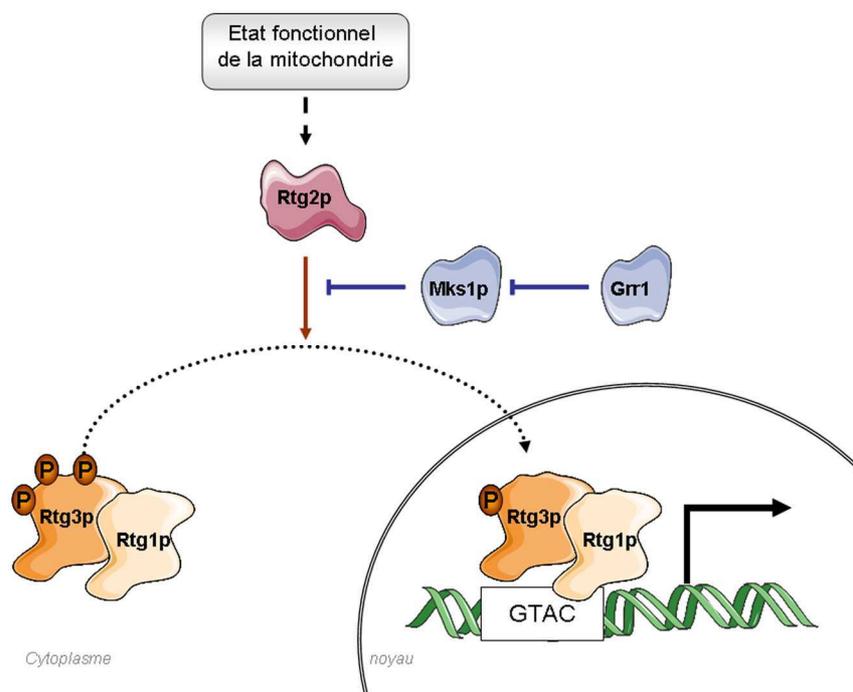


Figure 4: Modèle de la régulation rétrograde proposé par Liu et Butow

Rtg1p et Rtg3p agissent en hétérodimère et reconnaissent une séquence spécifique (GTAC) de la région promotrice de leurs cibles, dont *CIT2*. Cet hétérodimère est activé par la déphosphorylation du facteur Rtg3p ; déphosphorylation nécessitant la protéine Rtg2p et conduisant à la translocation du complexe Rtg1p/Rtg3p vers le noyau. Deux régulateurs de cette voie ont aussi été identifiés: Mks1p qui favorise la phosphorylation de Rtg3p et Grr1, qui conduit à la dégradation de Mks1p par ubiquitination (D'après le modèle proposé par Liu and Butow, 2006).

L'hétérodimère Rtg1p/Rtg3p est activé par la déphosphorylation du facteur Rtg3p conduisant à la translocation du complexe Rtg1p/Rtg3p du cytoplasme au noyau (Sekito, 2000). La protéine codée par *RTG2* est une protéine cytoplasmique avec, en N-terminal, un domaine de liaison à l'ATP. Il a été montré que Rtg2p est nécessaire à la déphosphorylation de Rtg3p (Figure 4) (Liu and Butow, 2006 pour revue).

1.3 La voie RTG permet une adaptation métabolique

L'induction du gène *CIT2* par les facteurs RTG en conditions (génétique ou environnementale) de dysfonctionnement mitochondrial permet d'alimenter le cycle de Krebs en succinate. De façon inattendue, la perte de fonction des facteurs RTG conduit à des phénotypes caractéristiques d'un défaut du cycle du glyoxylate et/ou du cycle de Krebs chez *S. cerevisiae*. En effet ces mutants ne peuvent pas pousser sur acétate (composé en C2, assimilable par le cycle du glyoxylate) et sont auxotrophes pour le glutamate (dont le précurseur est l' α -cétoglutarate produit par le cycle de Krebs) sur milieu minimum fermentescible (Liu and Butow, 1999). La souche double mutante *CIT1/CIT2* est également auxotrophe pour le glutamate alors que les simples mutants ne le sont pas. L'incapacité à pousser sur acétate, mais non l'auxotrophie pour le glutamate, est supprimée lorsque le gène *CIT1* est surexprimé chez les mutants de la voie RTG, ce qui suggère que chez ces mutants l'auxotrophie vis-à-vis du glutamate n'est pas due à une perte d'induction du gène *CIT1* mais à d'autres défauts du cycle de Krebs (Liu and Butow, 1999). Chez *S. cerevisiae*, dans des conditions de répression catabolique, lors du métabolisme fermentaire, des composants du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire mitochondriale sont réprimés au niveau transcriptionnel. Cette répression est levée par les facteurs de transcription HAP lors du shift diauxique (passage d'un métabolisme fermentaire à un métabolisme oxydatif) ou en conditions de respiration obligatoire (les variations se produisant au niveau transcriptionnel et au niveau des flux métaboliques du métabolisme carboné sont résumées dans l'annexe 1). Par contre, lorsque la fonction respiratoire est réduite, la régulation des gènes *CIT1*, *ACO1*, *IDH1* et *IDH2* qui codent les premières étapes du cycle de Krebs basculent d'un contrôle *via* les facteurs HAP (qui contrôlent ces gènes lorsque le métabolisme est oxydatif) à un contrôle *via* les facteurs RTG. La voie RTG représente donc une voie de régulation génique majeure en cas de dysfonctionnement mitochondrial (Liu and Butow, 1999). L'hypothèse proposée par les auteurs (Liu and Butow, 1999) est que cette voie de régulation rétrograde permet d'assurer, à partir de l' α -cétoglutarate, une synthèse suffisante de glutamate nécessaire aux différents processus biosynthétique, et de réapprovisionner le cycle de Krebs en succinate pour éviter que ce dernier ne se bloque. Ce réapprovisionnement se fait par l'induction du cycle du glyoxylate (*via* *CIT2*). En retour, le niveau de glutamate contrôle négativement la voie RTG établissant ainsi une boucle de contrôle négative entre le niveau de glutamate et les facteurs RTG (Figure 5).

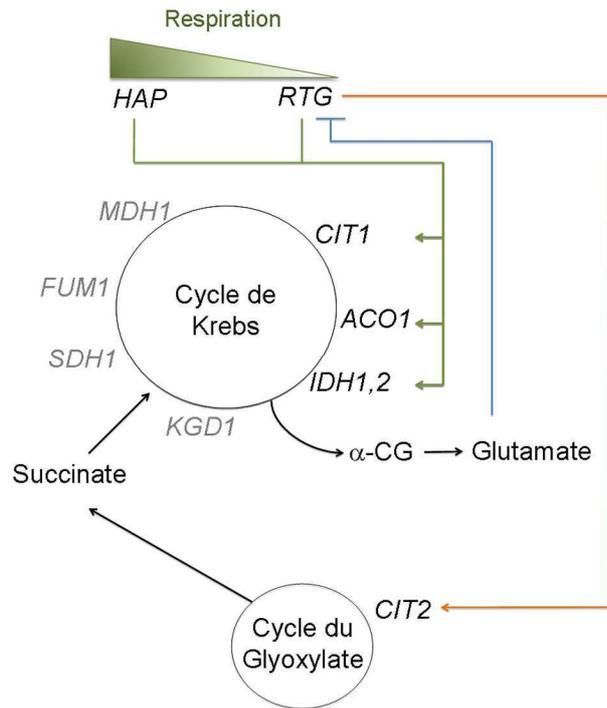


Figure 5: Régulation des gènes codant les intermédiaires des cycles de Krebs et du glyoxylate par les systèmes HAP et RTG en réponse au fonctionnement mitochondrial chez *S. cerevisiae*

Moins le métabolisme oxydatif est efficace (représentée par le triangle vert), plus l'expression des gènes *CIT1*, *ACO1*, *IDH1* et *IDH2* est dépendante du système RTG et moins elle est dépendante des facteurs HAP. Le glutamate est un répresseur général de la voie de régulation RTG dépendante (en bleu). Le gène *CIT2* est la cible type de la voie RTG de régulation rétrograde. L'induction de cette enzyme (en orange), et donc du cycle du glyoxylate, permet de réapprovisionner le cycle de Krebs en condition de dysfonctionnement mitochondrial. (D'après (Liu and Butow, 1999)).

1.4 La voie RTG est liée au contrôle qualité des mitochondries : l'autophagie

Récemment, un lien a été établi entre la mitophagie et la voie RTG. La mitophagie est un processus autophagique sélectif. Les mécanismes d'autophagie peuvent être classés par leur mécanisme moléculaire et leur spécificité. La macro-autophagie est un mécanisme général, aspécifique qui recycle diverses parties du cytoplasme (macromolécules et organites) en les séquestrant dans des intermédiaires cytosoliques à double membrane : les autophagosomes. Ces derniers vont ensuite fusionner avec le compartiment lytique de la cellule (la vacuole chez *S. cerevisiae*, les champignons filamenteux et les plantes et le lysosome dans les cellules animales). L'autophagie est induite dans des conditions de carences nutritionnelles (Abeliovich and Klionsky, 2001 pour revue). La micro-autophagie par contre, n'implique pas la formation d'autophagosomes mais se fait par une invagination directe de la membrane de la vacuole (ou du lysosome) séquestrant les composés à proximité et les libérant dans le lumen. Trois types de micro-autophagie spécifique ont été décrites : la micropexophagie (ciblent les peroxysomes), la

« piecemeal autophagie » ciblant le noyau et la mitophagie ciblant les mitochondries (Li *et al.*, 2012 pour revue). La mitophagie est induite notamment lors d'une carence azotée sur milieu respiratoire (lactate) mais non sur milieu fermentescible (glucose) (Kissová *et al.*, 2007, 2004). Elle nécessite la présence de la protéine Uth1p. Cette protéine, localisée dans la membrane externe mitochondriale, permet la co-localisation des mitochondries et de la vacuole et la mise en place du processus de mitophagie. La perte de fonction de cette protéine conduit à une résistance accrue à des conditions de mort cellulaire par autophagie (*i.e.* croissance sur rapamycine) et sa surexpression conduit à la mort cellulaire (Kissová *et al.*, 2004). La mitophagie a une fonction de contrôle-qualité des mitochondries en permettant l'élimination des mitochondries endommagées et évitant ainsi à celles-ci de relarguer des facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome c, ce qui conduirait à la mort cellulaire par apoptose. Il a été montré (Tal *et al.*, 2007) qu'en phase stationnaire sur lactate, une souche sauvage de *S. cerevisiae* présente naturellement un processus de mitophagie même en absence de carence. Ce processus dépend d'une phosphatase intermembranaire mitochondriale codée par le gène *AUP1* et semble impliqué dans le maintien d'un potentiel de survie (fitness) des cultures en phase stationnaire. La perte de fonction de Aup1p (mutant $\Delta aup1$) conduit à un défaut de mitophagie, une perte significative de viabilité en phase stationnaire et aussi à un défaut de la voie RTG (Tal *et al.*, 2007).

Il a été montré récemment (Journo *et al.*, 2009) que lors du processus de mitophagie, il y a modification de l'état de phosphorylation de Rtg3p, translocation de ce dernier vers le noyau et induction transcriptionnelle du gène *CIT2*. Chez le mutant $\Delta aup1$ il n'y a pas de modification de l'état de phosphorylation ni translocation vers le noyau de Rtg3p, et il n'y a ni induction de *CIT2* ni mise en place du processus de mitophagie. Aup1p est donc requise pour la translocation nucléaire de Rtg3p en phase stationnaire sur lactate, pour l'induction des cibles de la voie RTG et pour la mise en place de la mitophagie (Figure 6). Par ailleurs, un mutant nul Rtg3p présente des défauts dans le processus de mitophagie, ce qui montre une interaction fonctionnelle entre régulation rétrograde par les facteurs RTG et mitophagie en phase stationnaire. Cependant, ce mutant ne présente pas de défaut dans le processus plus général de macro-autophagie ni dans un autre processus autophagique sélectif (la voie Cvt). L'ensemble de ces données montrent donc que le processus de mitophagie est contrôlé par la protéine Aup1p et par la voie RTG (Tal *et al.*, 2007; Journo *et al.*, 2009).

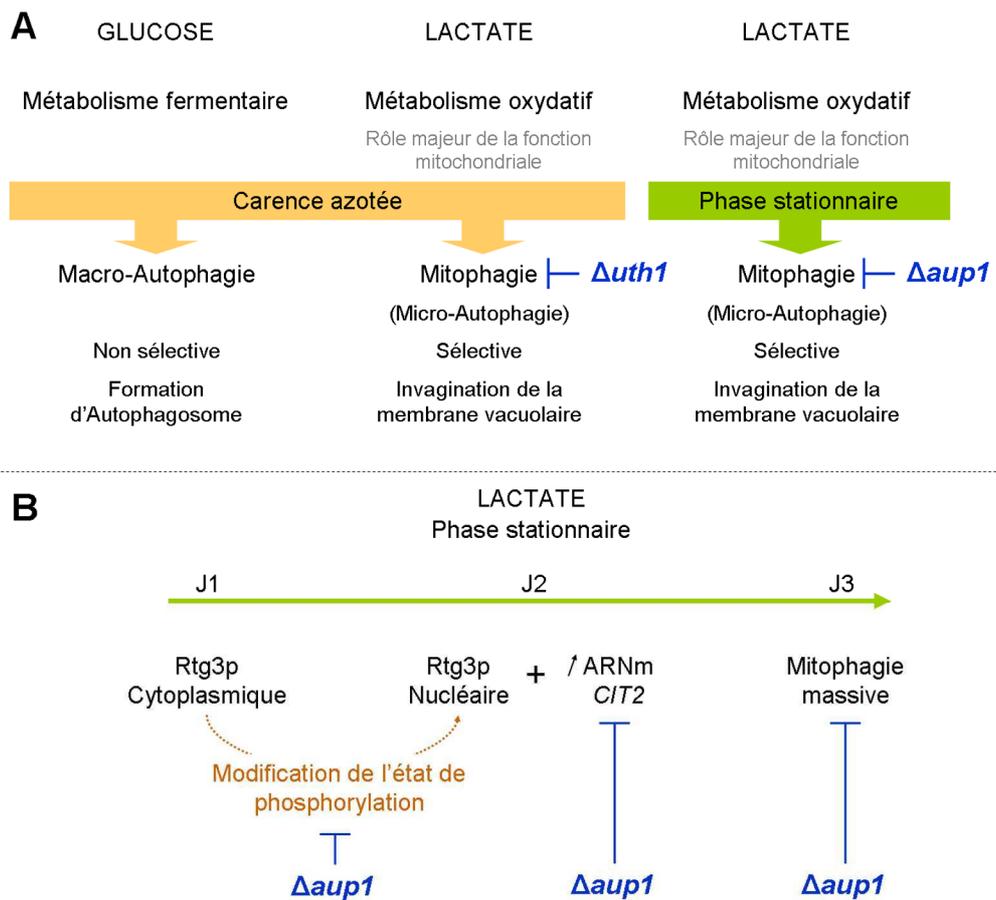


Figure 6: Mitophagie

A. Il existe différents processus autophagiques qui diffèrent par leur sélectivité et les vésicules formées. En métabolisme fermentaire c'est la macro-autophagie qui est induite lors d'une carence azotée tandis qu'en métabolisme oxydatif (lactate) c'est la mitophagie (micro-autophagie) qui est induite. La mitophagie est contrôlée par la protéine Uth1p, nécessaire à la sélectivité de ce processus. Elle est aussi induite sans carence sur lactate, lors de la phase stationnaire de croissance. Dans ces conditions, la protéine Aup1p est nécessaire à la mise en place de ce processus qui permet de maintenir le potentiel de survie des cultures.

B. Interconnection entre la voie rétrograde médiée par les facteurs RTG et la mitophagie en phase stationnaire sur lactate. Au deuxième jour (J2) de la phase stationnaire il y a translocation de la protéine Rtg3p dans le noyau, et induction transcriptionnelle du gène *CIT2*. La mitophagie massive est observée au troisième jour de la phase stationnaire (J3). La perte de fonction du gène *AUP1* empêche la modification de l'état de phosphorylation de Rtg3p et sa translocation nucléaire, et inhibe l'induction transcriptionnelle du gène *CIT2*.

Le lien fonctionnel entre mitophagie et régulation rétrograde par les facteurs RTG a été démontré en phase stationnaire sur lactate (métabolisme oxydatif), la corégulation de ces deux mécanismes s'observe aussi en présence d'antimycine (inhibiteur du complexe III) et chez des mutants d'ATP synthase, c'est à dire dans des conditions où la fonction mitochondriale est perturbée (Priault *et al.*, 2005).

1.5 La voie RTG, une voie adaptative à un dysfonctionnement mitochondrial mais non universelle

La voie RTG est donc induite en conditions de dysfonctionnement mitochondrial et permet à la cellule de s'adapter aux perturbations métaboliques par l'induction de voies anapleurotiques (induction du gène *CIT2*) et par la mise en place d'un contrôle-qualité des mitochondries (action de la mitophagie pour éliminer les mitochondries déficientes et/ou pour recycler leurs complexes protéiques).

Cependant, cette voie particulièrement bien décrite, ne peut être généralisée. En effet la régulation rétrograde est dépendante du fond génétique de la souche utilisée et la souche W303-1B, contrairement à la souche PSY142 (Epstein *et al.*, 2001), ne présente pas de régulation rétrograde du gène *CIT2* (Traven *et al.*, 2001). Ces deux études transcriptomiques sur différentes souches montrent toutefois qu'en cas de dysfonctionnement mitochondrial, et ce de manière générale, il y a induction des voies anapleurotiques permettant d'approvisionner la mitochondrie en citrate et acétylCoA (Traven *et al.*, 2001; Epstein *et al.*, 2001). On peut imaginer qu'il existe plusieurs voies rétrogrades suivant le fond génétique qui agiraient en parallèle (Liu and Butow, 2006).

2. La réponse globale à un dysfonctionnement mitochondrial montre des réponses indépendantes des facteurs RTG

L'analyse comparée des souches délétées pour les gènes de la voie RTG a montré que seule une fraction des gènes régulés en conditions de dysfonctionnement mitochondrial est sous le contrôle de la voie RTG, ce qui suggère d'autres voies de signalisation mitochondrie/noyau (Epstein *et al.*, 2001).

2.1 *ATO3*, exemple d'un gène régulé par un dysfonctionnement mitochondrial indépendamment des facteurs RTG

Ato3p est une protéine membranaire de la famille des YaaH, impliquée dans la communication inter-colonies via les « pulses d'ammonium » (Palkova *et al.*, 2002). Sur un substrat solide, les colonies de levures modifient alternativement le pH du milieu (acide/basique et réciproquement). Ce processus est dû à la production et à l'émission d'ammonium dans le milieu. L'hypothèse proposée est que cette émission crée un gradient alcalin temporel perçu par les colonies voisines qui, en réponse, amplifient leur production d'ammonium. Ce signal « ammonium » conduit ainsi à une inhibition de la croissance des colonies et pourrait prévenir la compétition entre colonies pour les nutriments (Palková *et al.*, 1997). Six stades ont été définis lors de la transition entre la phase acide et la phase alcaline et une analyse transcriptomique comparant ces stades a été menée (Palkova *et al.*, 2002). Cette analyse a montré que la fonction mitochondriale ainsi que le métabolisme central sont régulés différemment en fonction de ces phases. Ainsi, l'émission d'ammonium dans le milieu est corrélée à une induction des transporteurs de la famille YaaH dont *ATO3*, à une répression de gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative et dans le cycle de Krebs et à une activation de la voie peroxysomale (Figure 7).

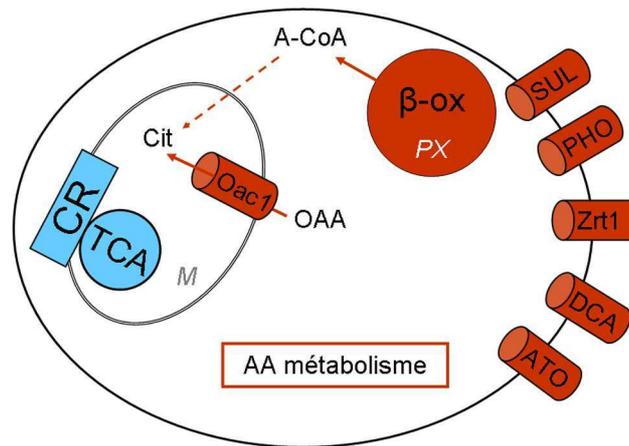


Figure 7: Régulation transcriptionnelle lors du passage de la phase acide à la phase alcaline

Lors de la transition de phase acide/alcaline, les fonctions mitochondriales telles que la chaîne respiratoire (CR) et le cycle des acides tricarboxyliques (TCA) sont réprimées transcriptionnellement (en bleu). A l'inverse le métabolisme des acides aminés (AA) et la β -oxydation des acides gras (β -ox) sont induits ainsi que plusieurs groupes de transporteurs : SUL (transporteurs de sulfate), PHO (transporteurs de phosphate), Zrt1 (transporteur de zinc), DCA (transporteurs d'acides carboxyliques, ATO (membres de la famille YaaH, dont Ato3) et Oac1 qui permet le maintien du pool d'oxalo-acétate (OAA) dans la mitochondrie pour donner du citrate (cit) (en rouge). M mitochondrie, PX peroxysomes. (d'après Palkova *et al.*, 2002).

Cette oscillation entre pH acide / pH basique semble correspondre à des oscillations entre phases de croissance, avec un métabolisme oxydatif et une déplétion des nutriments et un métabolisme alternatif, avec une synthèse d'acides aminés en phase stationnaire. Il semble donc qu'en phase stationnaire, on ait une diminution de l'activité mitochondriale sur milieu solide, avec pour exception notable, l'induction de gènes impliqués dans la régénération du NADH (*ALD4* et *5*, *ICL2*) et dans le maintien d'un pool d'oxalo-acétate mitochondrial (*OAC1*, *CIT3* et *ICL2*) (Palková *et al.*, 1997; Palkova *et al.*, 2002).

ATO3 est significativement induit dans une souche ρ^0 comparée à une souche ρ^+ . Cependant cette induction n'est pas sous le contrôle de la voie RTG (elle est toujours présente chez un mutant $\Delta rtg2$) (Guaragnella and Butow, 2003). Deux régulateurs de l'expression de *ATO3* ont été décrits : Gcn4p dont l'absence réduit considérablement l'expression d'*ATO3* aussi bien chez les souches ρ^+ que chez les souches ρ^0 , et Ssy1p, qui appartient au réseau de senseurs des acides aminés SPS (Ssy1-Ptr3-Ssy5), dont la perte de fonction réduit fortement l'expression d'*ATO3* chez les ρ^0 (Guaragnella and Butow, 2003).

On peut noter que cette régulation rétrograde indépendante des facteurs RTG est, comme celle *via* les facteurs RTG, responsable d'une adaptation métabolique (induction d'un métabolisme alternatif et synthèse d'acide aminés) en réponse à une diminution de l'activité mitochondriale.

De plus, cette modification métabolique semble permettre la survie à long terme en phase stationnaire (tout comme la mitophagie contrôlée par la voie RTG) (Palkova *et al.*, 2002).

2.2 La régulation rétrograde PDR dépendante est responsable de la résistance multiple aux drogues

2.2.1 Pdr1p et Pdr3p sont les régulateurs majeurs de la résistance multiple aux drogues

La résistance multiple aux drogues (MDR pour Multi Drug Resistance, (Akiyama *et al.*, 1985)) se caractérise par une résistance des cellules à un grand nombre de drogues non apparentées. Le mécanisme le plus répandu repose sur la famille des transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette) qui catalysent l'efflux des drogues hors de la cellule (Leppert *et al.*, 1990). Les acteurs majeurs impliqués dans la MDR chez *S. cerevisiae* sont les régulateurs transcriptionnels Pdr1p et Pdr3p (Pleiotropic Drug Resistance). Ils contrôlent notamment l'expression de transporteurs ABC tel que Pdr5p, et de transporteurs MFS (Major Facilitator Superfamily) (Balzi *et al.*, 1987; Carvajal *et al.*, 1997; Delaveau *et al.*, 1994; Nourani *et al.*, 1997; Delahodde *et al.*, 1995). Des mutations spontanées qui activent ces « masters régulateurs » que sont Pdr1p et Pdr3p conduisent à un phénotype de multi-résistance par l'efflux des drogues *via* les transporteurs induits et/ou par la modification de leur diffusion passive au travers des membranes biologiques (Carvajal *et al.*, 1997; Nourani *et al.*, 1997). *PDR1* et *PDR3* codent deux protéines paralogues qui sont des facteurs de transcription appartenant à la famille des Zn₂Cys₆ protéines dont le prototype est le facteur de transcription Gal4p. Ces facteurs de transcription se lient à une séquence consensus appelée PDRE (Pdr1p/Pdr3p Response Element) nécessaire à la régulation positive de *PDR5*. Cette séquence est aussi présente dans la région promotrice du gène *PDR3* et permet son autoactivation transcriptionnelle (Balzi *et al.*, 1987; Delaveau *et al.*, 1994; Nourani *et al.*, 1997; Kolaczowska and Goffeau, 1999; Delahodde *et al.*, 1995). *In vivo*, ces protéines sont phosphorylées (Pdr3p présente deux états de phosphorylation) et localisées dans le noyau. Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que Pdr1p et Pdr3p pouvaient former des homo ou des hétérodimères (Mamnun *et al.*, 2002).

2.2.2 La régulation rétrograde PDR dépendante : Une fonction dans l'adaptation membranaire ?

Des analyses transcriptomiques ont montré que l'absence d'une chaîne respiratoire fonctionnelle (souche ρ^0) et l'absence de la sous unité F_0 de l'ATP synthase conduisait à l'induction de *PDR3* lui-même responsable d'une induction de *PDR5*. Ce résultat identifie donc Pdr3p comme un acteur de la régulation rétrograde différent de la voie RTG (Hallstrom and Moye-Rowley, 2000; Zhang and Moye-Rowley, 2001). Afin d'identifier les protéines qui participent à la transduction du signal mitochondrial à la protéine Pdr3p, des mutants n'induisant pas Pdr5p en contexte ρ^0 ont été recherchés (Zhang *et al.*, 2005). Ces études ont permis d'identifier la protéine Lge1p qui joue un rôle dans l'ubiquitination de la lysine 123 de l'histone H2B. Cependant ce n'est pas cette activité d'ubiquitination qui participe à la transduction du signal rétrograde : la délétion de la lysine 123 d'H2B n'a pas d'effet sur l'induction de *PDR3* et *PDR5* en contexte ρ^0 . L'hypothèse proposée est que Lge1p aide au recrutement de Pdr3p sur son propre promoteur lors de son autoactivation en réponse au signal mitochondrial (Zhang *et al.*, 2005).

Contrairement à la voie RTG, il ne semble pas que la voie PDR modifie le métabolisme suite à un dysfonctionnement mitochondrial. Une hypothèse intéressante implique les membranes lipidiques. Deux types de données vont en ce sens :

(i) Dans la membrane plasmique, les phospholipides sont distribués de façon asymétrique : le feuillet interne est enrichi en aminophospholipides (phosphatidylserine (PS) et phosphatidyléthanolamine (PE) tandis que le feuillet externe est enrichi en sphingomyéline et glycophospholipides (Devaux, 1991). La régulation de cette asymétrie n'est pas bien comprise. Cependant il a été montré que les protéines Pdr1p et Pdr3p y contribuent (Kean *et al.*, 1997). En effet des allèles gain de fonction des gènes *PDR1* et *PDR3* (*pdr1-11* et *pdr3-11* respectivement) présentent une augmentation de PE dans le feuillet externe de la membrane plasmique et modifie ainsi l'asymétrie. Bien que la fonction de cette asymétrie membranaire reste méconnue, sa perturbation conduit à des défauts d'endocytose, défauts également observés chez les mutants *pdr1-11* et *pdr3-11* (Kean *et al.*, 1997). De plus, il a été montré que les transporteurs ABC, Yor1p et Pdr5p, sujets à la régulation par Pdr1p et Pdr3p, étaient directement impliqués dans la fonction d'efflux d'un analogue fluorescent de la PE (M-C₆-NBD-PE) (Decottignies *et al.*, 1998). D'autres transporteurs (de la famille des P-type ATPase) comme Dnf1p et Dnf2p contribuent aussi à la distribution des phospholipides dans la membrane

plasmique et ce de manière indépendante des transporteurs ABC, Yor1p et Pdr5p (Pomorski *et al.*, 2003). Il semble donc que Pdr1p et Pdr3p, en contrôlant l'expression des transporteurs ABC Pdr5p et Yor1p participent au contrôle de l'asymétrie membranaire, plus précisément dans l'efflux de la PE vers le feuillet externe de la membrane plasmique.

(ii) La surexpression du gène *PSD1* (phosphatidylsérine décarboxylase) qui code une protéine localisée dans la membrane interne mitochondriale et qui joue un rôle dans la synthèse de la PE, est responsable d'une induction forte (400%) de l'expression de *PDR5* et ce de manière Pdr3p dépendante (Gulshan *et al.*, 2008). Cette surexpression (de la protéine entière ou uniquement de la partie N-terminale, non catalytique) est responsable de la délocalisation de Psd1p. De même l'association à la membrane de Psd1p est altérée en contexte ρ^0 . L'hypothèse proposée est que Psd1p, en fonction de son association à la membrane mitochondriale, permet la transduction du signal mitochondrial vers Pdr3p et son auto-activation, et ainsi la mise en place de la régulation rétrograde par la voie PDR (l'activation de cette voie en contexte ρ^0 est pratiquement nulle dans une souche perte de fonction pour *PDS1*). Psd1p est donc une protéine bifonctionnelle impliquée dans la biosynthèse de la phosphatidylsérine et dans la régulation de la multirésistance (Gulshan *et al.*, 2008).

(iii) L'effet « membranaire » de cette régulation rétrograde est soutenu par le fait qu'outre les transporteurs ABC *PDR5* et *YOR1*, les cibles de Pdr1p et Pdr3p sont des enzymes impliquées dans la biosynthèse des phospholipides. Ces cibles sont *LAC1*, une des sous unités de la céramide synthase (Kolaczkowski *et al.*, 2004), *IPT1* codant pour l'inositol phosphotransférase (Hallstrom *et al.*, 2001) et *RSB1* codant pour un transporteur membranaire (Panwar, 2006) qui permet l'efflux d'intermédiaires de la voie de biosynthèse des phospholipides, les LCB (Long Chain Base), dont l'accumulation peut se révéler toxique. Cette régulation rétrograde est résumée dans la figure 8.

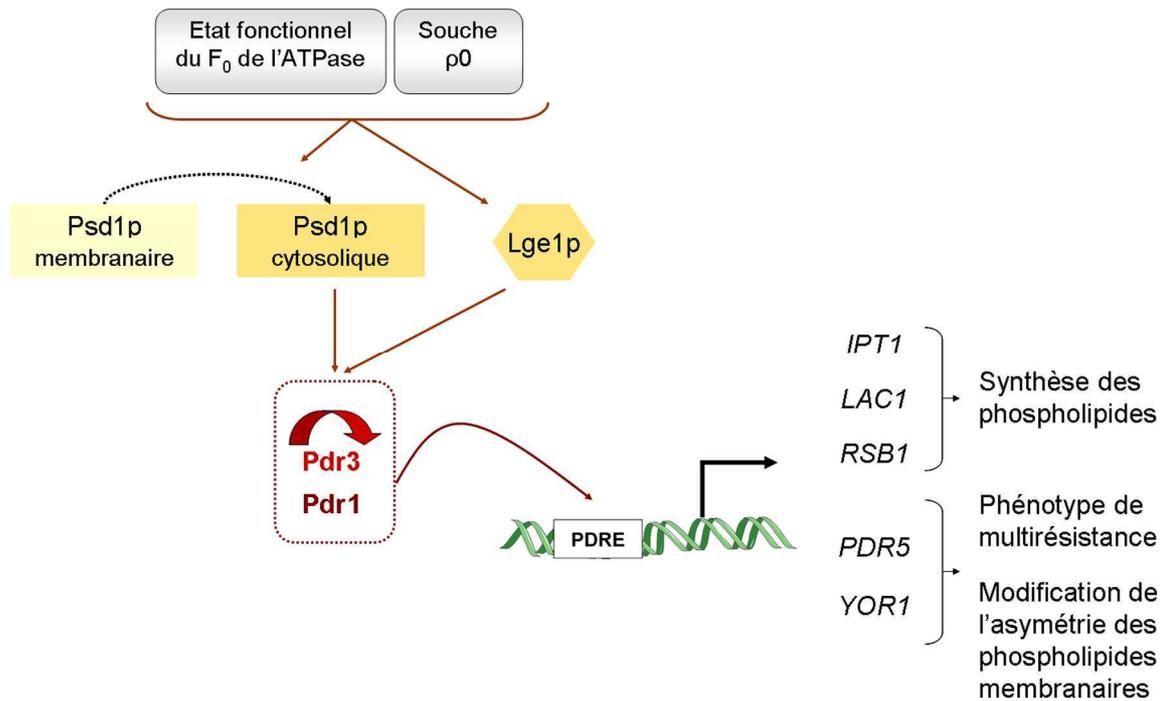


Figure 8: Résumé de la régulation rétrograde par les facteurs PDR

Lors de perturbations de la chaîne respiratoire au niveau du F_0 de l'ATP synthase ou en contexte ρ^0 , un signal conduisant à la translocation de Psd1 (et/ou de la protéine Lge1) active le facteur de transcription Pdr3p, et donc la voie médiée par Pdr1p et Pdr3p. Il y a alors activation de la transcription de leurs différentes cibles, par la reconnaissance d'une séquence spécifique appelée PDRE. Pdr3p est responsable d'une boucle d'autoactivation *via* sa séquence PDRE. Psd1p et Lge1p ne sont pas les seuls médiateurs du signal mitochondrial. Parmi les cibles de cette régulation rétrograde, se trouvent les gènes *IPT1*, *LAC1*, *RSB1* impliqués dans la synthèse des phospholipides et les transporteurs ABC dont *PDR5* et *YOR1* impliqués dans le phénotype de multirésistance aux drogues et dans le maintien de l'asymétrie membranaire.

Il semble donc que le dysfonctionnement d'une sous unité membranaire (F_0 de l'ATP synthase) ou de la fonction respiratoire (souche ρ^0) transmette un message qui conduit à la délocalisation de la protéine de la membrane interne mitochondriale Psd1p permettant d'une part l'activation de la transcription de *PDR5* et *YOR1* responsables d'un phénotype de multi résistance et d'une asymétrie des phospholipides membranaires (ces deux phénotypes pouvant être liés) (Shahi and Moye-Rowley, 2009)) et d'autre part l'activation de la voie de biosynthèse des phospholipides (composants majeurs des membranes biologiques).

C. Régulations rétrogrades chez les plantes

La cellule végétale comporte deux types d'organites sujets à la régulation rétrograde, la mitochondrie et les plastes, dont l'archétype est le chloroplaste. Il existe donc deux types de régulations rétrogrades chez les plantes: une mitochondriale et une chloroplastique. Les plantes sont des organismes sessiles, soumis à de nombreux stress environnementaux auxquels ils doivent s'adapter. Les régulations rétrogrades mitochondriale ou chloroplastique sont des mécanismes adaptatifs particulièrement importants qui permettent de modifier l'expression du génome nucléaire en réponse aux variations de l'environnement. De plus, les métabolismes de ces organites sont interconnectés, ce qui conduit à une communication rétrograde tripartite (mitochondrie, plaste et noyau).

1. La régulation rétrograde mitochondriale

1.1 La chaîne respiratoire mitochondriale des cellules végétales

La chaîne respiratoire des cellules végétales est composée des complexes « classiques » de toute chaîne respiratoire eucaryote. Sa particularité réside dans l'existence de deux voies « alternatives ». La première est composée de NAD(P)H déshydrogénases qui permettent une entrée « alternative » des électrons et la seconde d'une oxydase alternative (AOX) qui permet une sortie « alternative » des électrons. Il existe 3 types d'hydrogénases externes capables d'oxyder le NAD(P)H cytosolique et deux hydrogénases internes capables d'oxyder le NAD(P)H matriciel. L'oxydase alternative est une quinol oxydase capable de transférer directement les électrons à l'oxygène. Aucune de ces enzymes alternatives, NAD(P)H déshydrogénases et oxydase alternative, ne participe à la mise en place du gradient de protons puisqu'elles ne sont pas des pompes à protons (Figure 9).

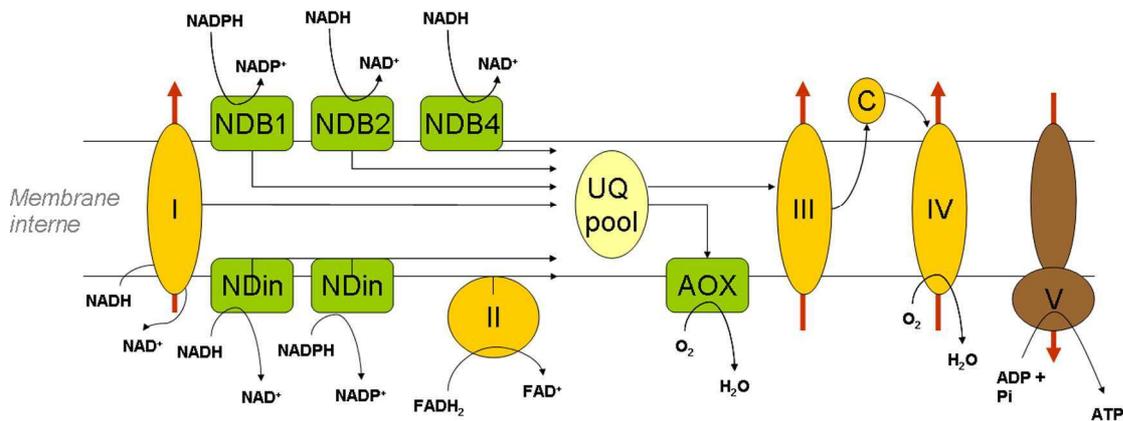


Figure 9: Chaîne respiratoire mitochondriale de la cellule végétale

La chaîne respiratoire aboutit à la production d'ATP *via* l'ATP synthase (complexe V) grâce à un transfert d'électrons des complexes I et II vers le complexe III *via* le pool des quinones (UQ pool), puis en direction du complexe IV. Ce transfert d'électron est couplé à la mise en place d'un gradient de protons nécessaire au fonctionnement de l'ATP synthase. Cette chaîne présente également des voies alternatives (en vert): trois NAD(P)H déshydrogénases externes (NDB1, NDB2 et NDB4), deux NAD(P)H déshydrogénases internes (NDin) permettant de se dispenser du complexe I, et l'oxydase alternative (AOX) branchée au niveau du pool des quinones permettant de se dispenser des complexes III et IV.

D'après (Taiz and Zeiger, 2010; Elhafez *et al.*, 2006)

1.2 L'oxydase alternative est le prototype de la régulation rétrograde mitochondriale

1.2.1 L'oxydase alternative: une voie alternative aux fonctions développementales

L'oxydase alternative, codée par une petite famille multigénique dont le nombre varie en fonction des espèces, est l'enzyme responsable de la respiration résistante au cyanure (KCN) observée bien avant la mise en évidence de cette protéine (Meeuse, 1975 pour revue). En effet, en présence d'inhibiteurs des complexes III (antimycine A) et IV (cyanure, NO et CO), se met en place une respiration alternative sensible au SHAM (salicylhydroxamic acid), un inhibiteur spécifique de l'oxydase alternative. La première fonction biologique connue de cette voie alternative a été une fonction thermogénique. Cette fonction permet chez les Gouets, lors de l'anthèse, de volatiliser des composés pour attirer les pollinisateurs. Cette thermogénèse a été décrite dès 1778 par Lamarck chez l'espèce *Arum italicum* (ou Gouet d'Italie), qui reporte que la température de l'inflorescence s'élève à plus de 20°C alors que la température ambiante est

inférieure à 15°C. La capacité thermogénique de cette respiration alternative réside dans le découplage de la phosphorylation oxydative.

Cette voie alternative est aussi activée lors du processus de maturation des fruits climactériques (dont la maturation est dépendante de l'éthylène et associée à une augmentation de la respiration cellulaire). Chez ces fruits, au moment de la maturation, il y a une augmentation de la respiration corrélée à une synthèse d'éthylène et de HCN et une augmentation significative de la température. Il semble que l'induction de l'oxydase alternative à ce stade permette aux fruits d'être résistants au HCN et que cette induction s'accompagne d'un accroissement de la température (Meeuse, 1975; Rhoads and McIntosh, 1991; Vanlerberghe and McIntosh, 1997). De nombreux exemples de régulation de l'expression du gène AOX au cours du développement ont été décrits chez de nombreuses espèces : augmentation de l'expression de l'oxydase alternative chez la mangue (*Mangifera indica* L.) au cours de la maturation (Cruz-Hernández and Gómez-Lim, 1995), augmentation au niveau des cellules du méristème lors de la croissance racinaire du soja (Hilal *et al.*, 1997), régulation différenciée des deux isoformes lors de l'embryogenèse somatique chez *Daucus carotta* (Frederico *et al.*, 2009) et régulation post transcriptionnelle des isoformes AOX1a et AOX2 lors de la croissance racinaire adventive chez l'olivier (*Olea europaea*) (Santos Macedo *et al.*, 2012, 2009). Le rôle de cette respiration alternative pourrait être de permettre une optimisation du métabolisme respiratoire (production énergétique, régulation thermogénique) dans la régulation adaptative de la croissance et du développement (Arnholdt-Schmitt *et al.*, 2006).

1.2.2 L'oxydase alternative : une voie alternative permettant une adaptation à différents stress

Les plantes sont soumises à divers stress biotiques ou abiotiques et la régulation de la respiration alternative contribue à l'adaptation à ces différents stress (température, sécheresse, stress alcalin, attaque de pathogènes). Le point commun à ces différents stress est une inhibition, ou un ralentissement de la respiration *via* la voie des cytochromes et une induction de l'oxydase alternative (Purvis and Shewfelt, 1993; Purvis, 1997). Cette induction permet de maintenir le transfert des électrons vers l'oxygène même en absence de la voie des cytochromes et de limiter la production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en évitant une sur-réduction des quinones. Plusieurs données montrent effectivement qu'il existe un lien entre induction de l'AOX et production d' H₂O₂ :

- (i) L'ajout d' H_2O_2 est bien responsable d'une induction de l'AOX sur des mitochondries isolées de pétunia (*Petunia hybrida*) (Wagner and Wagner, 1995) et des cultures cellulaires de tabac (*Nicotianum tabacum*) (Vanlerberghe and McIntosh, 1996).
- (ii) Lorsque la plante est attaquée par des pathogènes, elle met en place des systèmes de défense dont le messager secondaire est l'acide salicylique (SA). Celui-ci est responsable d'une inhibition des catalases et donc d'une augmentation du niveau d' H_2O_2 qui s'accompagne d'une induction de l'AOX (Chen *et al.*, 1993).
- (iii) Lorsque l'AOX est présente et fonctionnelle, elle prévient la formation d'ions superoxydes (O_2^-) au niveau de la chaîne respiratoire (cultures cellulaires de péricarpe de poivron vert, *Capsicum annuum* L.) (Purvis, 1997).
- (iiii) Des cultures de tabac porteuses d'un transgène sens ou antisens du gène *AOX1*, responsable respectivement d'une surexpression ou d'une perte d'expression de l'AOX, montrent une corrélation entre quantité d'AOX et production de ROS. En effet en présence d'antimycine (inhibiteur du complexe III), les cellules surexprimant l'AOX poussent plus vite et produisent significativement moins de ROS que les cellules sauvages, tandis que les cellules portant le transgène antisens, responsable d'une perte d'expression de l'AOX, produisent significativement plus de ROS et meurent (Maxwell *et al.*, 1999).

1.2.3 L'oxydase alternative est une cible type de la régulation rétrograde mitochondriale

L'induction transcriptionnelle par un traitement à l'antimycine A (inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire) du gène *AOX1* a été montrée chez le tabac, le pétunia, le soja, le maïs (*Zea mays*) et chez *Arabidopsis thaliana*. Une induction de l'AOX a également été décrite en présence d'inhibiteurs des complexes respiratoires I, IV et V chez *A. thaliana* et le maïs (Vanlerberghe and McIntosh, 1997, 1994; Vanlerberghe and McIntosh, 1992; Karpova *et al.*, 2002; Wagner and Moore, 1997; Saish *et al.*, 2001; Saisho *et al.*, 1997; Djajanegara *et al.*, 2002), ainsi que dans des conditions de perturbations du métabolisme carboné mitochondrial (augmentation de la concentration en malate ou en citrate). Cette réponse a été observée chez le tabac, le soja et *A. thaliana* (Vanlerberghe and McIntosh, 1997; Djajanegara *et al.*, 2002; Zarkovic *et al.*, 2005).

L'induction de la régulation rétrograde mitochondriale, suivie ici par l'expression du gène *AOX*, répond à des dysfonctionnements mitochondriaux touchant la phosphorylation oxydative et le

métabolisme carboné comme cela a été observé chez la levure *S. cerevisiae* en suivant l'expression du gène *CIT2*.

1.2.4 La régulation rétrograde de l'AOX est une réponse adaptative complexe

Chez les plantes, l'oxydase alternative est codée par plusieurs gènes dont le nombre varie d'un organisme à l'autre. En général il existe trois à cinq isoformes qui peuvent se distinguer notamment par la substitution d'une cystéine conservée en serine (Cys-127 de la protéine AOX1a chez *A. thaliana*). Cette substitution pourrait empêcher la dimérisation par liaison covalente de l'AOX, sans bloquer toutefois une dimérisation par liaison non covalente (Djajanegara *et al.*, 1999; Umbach *et al.*, 2002; Karpova *et al.*, 2002). Chacune de ces isoformes semble régulée différemment en fonction du signal ou du tissu et ce, chez plusieurs espèces (Tableau 1).

Espèce	isoforme	Signal d'induction	Tissus spécifiques
Maïs	AOX1	AA (inhibiteur du complexe III de la CR)	-
	AOX2	Mutant et inhibiteur du complexe I de la CR	-
		Mutant de la traduction mitochondriale	-
	AOX3	Mutant et inhibiteur du complexe IV de la CR	-
		Mutant de la traduction mitochondriale	-
		Mutants CMS	Fleurs mâles
Soja	AOX1	AA (inhibiteur du complexe III de la CR)	-
		Citrate	-
		Stress (AS, basse température)	-
		Dysfonctionnement chloroplastique (NF)	-
	AOX2	Peu régulée	-
AOX3	Niveau constitutif non régulé	Tissus photosynthétiques	
Arabidopsis	AOX1a	Réponse rapide :	-
		Stress (Glucose, cystéine, mannitol, AS)	-
		Dysfonctionnement mitochondrial (inhibiteur de la CR, citrate)	-
		Dysfonctionnement chloroplastique (NF)	-
	AOX1c	Non régulé	-
	AOX2	Réponse lente :	-
		Stress (Glucose, cystéine, mannitol, AS)	-
Dysfonctionnement mitochondrial (inhibiteur de la CR, citrate)		-	
		Dysfonctionnement chloroplastique (NF)	-

Tableau 1: Régulation de différentes isoformes d'AOX chez le maïs, le soja et Arabidopsis

AA: antimycine A (inhibiteur du complexe III), AS: Acide salicylique (molécule signal de stress), CMS: Cytoplasmic male-sterile, mutations correspondant à des réarrangements du génome mitochondrial responsables d'une stérilité mâle (les dysfonctionnements mitochondriaux n'apparaissent que lors du développement des organes reproducteurs mâle (anthères)), CR: chaîne respiratoire mitochondriale, NF: Norfluazon (cause des dysfonctionnements chloroplastiques). D'après (Karpova *et al.*, 2002; Djajanegara *et al.*, 2002; Clifton *et al.*, 2005).

Il a été proposé que la corégulation de certaines isoformes de l'oxydase alternative avec les NAD(P)H déshydrogénases alternatives en réponse à des dysfonctionnements mitochondriaux permette de recycler le NAD et de maintenir le flux de carbone apportant une flexibilité importante dans l'adaptation à ces dysfonctionnements (Clifton *et al.*, 2005; Rhoads and Subbaiah, 2007). La régulation rétrograde des voies alternatives de la chaîne respiratoire semble donc être une adaptation fine à différents dysfonctionnements mitochondriaux.

1.2.5 Le promoteur du gène *AOX1* contient plusieurs éléments régulateurs

La construction d'un système rapporteur luciférase pour évaluer l'activation du gène *AOX1a* chez *A. thaliana* a permis de disséquer le promoteur de cette isoforme. Il contient deux régions aux fonctions différentes (Figure 10) (Dojcinovic *et al.*, 2005; Zarkovic *et al.*, 2005) : une région en 3' qui n'est pas impliquée dans la régulation rétrograde mais dans la régulation de l'expression du gène au cours du développement (promoteur basal), une région de 93pb en 5' appelée MRR (Mitochondrial Retrograde Regulation) impliquée dans la régulation rétrograde (réponse transcriptionnelle à l'antimycine et au MFA (inhibiteur du TCA). Cette région lie des protéines *in vitro* et possède plusieurs régions *cis*-régulatrices : deux domaines CCAATbox (liant des facteurs de transcription de la famille de Hap, impliqués dans la régulation du métabolisme carboné), deux domaines Gbox like (liant des facteurs de transcription de la famille bZip, avec un rôle développemental) et un domaine WRKY (liant des facteurs de transcription, impliqué dans la résistance aux pathogènes et la réponse au stress). Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que chacun de ces motifs identifiés dans la région MRR joue un rôle dans la réponse rétrograde mais à des niveaux différents pour l'antimycine et le MFA (Zarkovic *et al.*, 2005; Dojcinovic *et al.*, 2005). Un autre système reporteur (GUS) a mis en évidence un domaine fortement répresseur (le domaine B) dont la délétion conduit à une induction forte et constitutive de l'AOX (Figure 10) (Giraud *et al.*, 2009). Le début de ce domaine correspond à la fin du site reconnu par ABI4 qui est un facteur de transcription impliqué dans la réponse à l'acide abscisique (ABA) qui est une hormone de stress chez les plantes. ABI4 est un répresseur de l'induction de l'AOX qui se lie en amont et en aval de la région B. A la suite d'un traitement à l'ABA cette répression est levée et il y a expression de l'AOX (Giraud *et al.*, 2009).

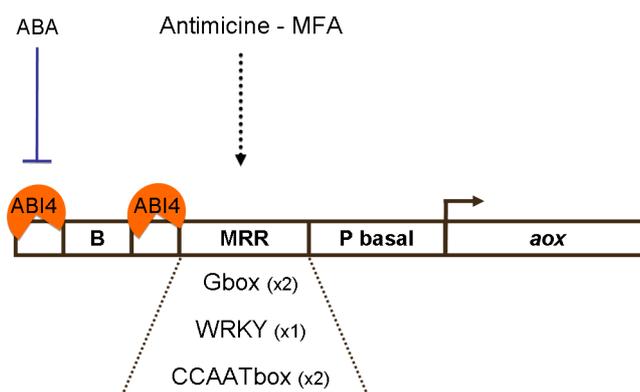


Figure 10: Le promoteur du gène *AOX1*

La séquence promotrice du gène *aox1* est composée d'une région MRR (qui répond à l'antimycine et au MFA) qui porte plusieurs régions cis-régulatrices (2 domaine Gbox, 1 domaine WRKY et 2 domaines CCAATbox), d'un domaine répresseur (B) encadré de deux séquences reconnues par le facteur de transcription ABI4 (en orange) qui inhibe la transcription (cette inhibition est levée par l'ABA) et d'un promoteur basal impliqué dans la régulation de l'AOX au cours du développement.

Plusieurs arguments semblent indiquer qu'il existe une boucle de régulation entre l'AOX et ABI4 (diminution significative d'ABI4 chez des mutants *aox1a*, répression d'ABI4 en réponse à un traitement par un inhibiteur du complexe I, la roténone, corrélé à une induction de l'AOX (Clifton *et al.*, 2005)). Cette analyse conforte l'idée que la régulation rétrograde responsable de la régulation de l'AOX est fortement interconnectée avec la réponse aux stress, et elle met en évidence le premier acteur moléculaire (ABI4) de l'expression du gène AOX.

La construction des mutants *mrrd* par mutagenèse dirigée de la région régulatrice MRR à permis de disposer de mutants perte de fonction pour la régulation rétrograde (Zarkovic *et al.*, 2005). Certains de ces mutants sont insensibles à la régulation rétrograde induite par l'antimycine mais présentent toujours une réponse au MFA. Ces deux réponses (à l'antimycine et au MFA) impliquent des mécanismes complexes impliquant la liaison de multiples facteurs de transcription, sur différents domaines cis-régulateurs (Zarkovic *et al.*, 2005; Dojcinovic *et al.*, 2005). L'analyse transcriptomique des réponses à l'antimycine, au MFA, à l'ozone (stress anoxique) et à l'H₂O₂ a montré qu'il existe des gènes régulés de la même manière par l'ensemble des traitements, des gènes répondant spécifiquement à l'antimycine, d'autres à l'H₂O₂. Ces résultats montrent que la réponse rétrograde est composée d'une réponse générale et de réponses plus spécifiques au signal (Rhoads and Subbaiah, 2007).

1.3 Un signal mitochondrie noyau encore mal connu

Plusieurs hypothèses non exclusives ont été proposées sur la nature du signal de la mitochondrie au noyau au cours de la régulation rétrograde mitochondriale. Elles impliquent différents messagers secondaires tels que les ROS, le NO, l'éthylène, le citrate, le calcium, l'hormone ABA.

1.3.1 Rôle des ROS dans la transduction du signal

Comme dit précédemment, les ROS semblent être des acteurs majeurs de la régulation rétrograde mitochondriale : induction de l'AOX en réponse au traitement par l' H_2O_2 , concentration de ROS augmentée dans de nombreuses conditions de régulation rétrograde mitochondriale (stress anoxique, réponse aux pathogènes, inhibition des complexes III et IV de la chaîne respiratoire par des molécules chimiques ou au cours d'une attaque pathogène). Cependant leur niveau d'implication et leur rôle restent imparfaitement compris.

1.3.2 Rôle du NO et de l'éthylène dans la transduction du signal

Le NO et l'éthylène sont deux messagers régulateurs des mécanismes de défense des plantes contre les attaques pathogènes. L'étude de la réponse à l'anoxie par fumigation à l'ozone (O_3) chez le tabac montre clairement un rôle du NO et de l'éthylène dans la transduction du signal conduisant à l'induction de l'AOX (Ederli *et al.*, 2006). Le NO, produit par la plante lors du traitement à l'ozone, peut à lui seul conduire à l'induction de l'AOX, si la production de NO est inhibée, il n'y a plus aucune régulation de l'AOX. De plus, le NO conduit à l'accumulation d'éthylène et si cette accumulation est bloquée l'induction de l'AOX est significativement plus faible en présence d'ozone. Le NO et l'éthylène semblent donc être des messagers secondaires de la transduction du signal de la mitochondrie au noyau. Il est intéressant de noter que ce stress à l'ozone entraîne aussi une accumulation d' H_2O_2 dans les cellules et qu'on ne peut exclure que, dans ces conditions, les ROS jouent également un rôle dans la transduction du message à côté du NO et de l'éthylène (Ederli *et al.*, 2006).

1.3.3 Rôle du citrate dans la transduction du signal

Chez plusieurs espèces, des perturbations du métabolisme carboné mitochondrial conduisent à l'induction de la régulation rétrograde (Vanlerberghe and McIntosh, 1997; Zarkovic *et al.*, 2005; Djajanegara *et al.*, 2002). Un lien a été récemment fait entre la concentration en citrate et la

production de NO intracellulaire, tous deux responsables de l'induction de la régulation rétrograde mitochondriale (Gupta *et al.*, 2012). Chez *A. thaliana* il a été montré qu'en conditions d'hypoxie, la cellule produit plus de NO, *via* la nitrate réductase (NR) et que ce NO produit est un inhibiteur de l'aconitase (enzyme du cycle de Krebs, responsable de la conversion du citrate en isocitrate). Il y a alors augmentation significative des intermédiaires du cycle de Krebs dont le citrate, induction transcriptionnelle de l'AOX et réorientation du métabolisme carboné vers les voies de biosynthèse des acides aminés. Aucune de ces modifications (augmentation des intermédiaires du cycle de Krebs, induction de l'AOX et réorientation métabolique) n'est observée chez le mutant *nia* (perte de fonction pour les deux gènes codant la nitrate réductase), mutant chez lequel l'hypoxie ne conduit pas à une augmentation de la concentration de NO. Ces résultats suggèrent que l'induction de la régulation rétrograde mitochondriale par le NO se fait par l'accumulation de citrate résultant de l'inhibition de l'aconitase. Toutefois on ne peut exclure que le NO, qui est un inhibiteur du complexe IV de la chaîne respiratoire soit, à lui seul, un messager de cette communication rétrograde mitochondriale induite en conditions d'hypoxie (Figure 11).

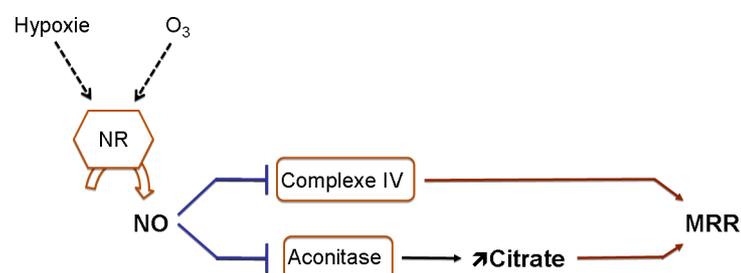


Figure 11: Le NO et le citrate sont deux messagers de l'induction de la régulation rétrograde

En conditions d'hypoxie, la concentration cellulaire du NO est augmentée par l'action de la nitrate réductase (NR). Le NO est responsable de l'induction de la régulation rétrograde mitochondriale (MRR) soit directement par l'inhibition du complexe IV de la chaîne respiratoire, soit par l'inhibition de l'aconitase, qui se traduit par l'augmentation du citrate intracellulaire, signal qui induirait la régulation rétrograde.

1.3.4 Rôle du calcium dans la transduction du signal

En conditions d'anoxie, on observe une augmentation du Ca^{2+} cytosolique localisé à proximité de la mitochondrie (Butow and Avadhani, 2004). Cette augmentation n'est plus observée en présence d'un inhibiteur d'un transporteur membranaire mitochondrial de calcium, le ruthénium, corrélativement il n'y a pas d'induction de l'AOX ni des gènes répondant aux conditions d'anoxie (l'alcool déshydrogénase *ADH1* et la sucrose synthase *SH1* par exemple).

Ces données suggèrent qu'en condition d'anoxie, la mitochondrie libère du Ca^{2+} dans le cytosol et que ce Ca^{2+} cytosolique joue un rôle de messenger dans l'induction de la régulation rétrograde mitochondriale.

1.3.5 Rôle de l'acide salicylique dans la transduction du signal

La régulation rétrograde mitochondriale, induite lors des attaques de pathogènes, semble être un élément important dans la réponse à ces attaques. L'acide salicylique (SA) est un élément majeur dans la signalisation conduisant à la réponse hyper sensible (Lennon *et al.*, 1997). Comme dit précédemment, le SA, par inhibition des catalases, conduit à une augmentation d' H_2O_2 et à une induction de l'AOX. Mais il a été montré aussi chez le tabac qu'à certaines doses, le SA pouvait conduire à une inhibition de la chaîne respiratoire et à une induction de l'AOX (Norman *et al.*, 2004). Cependant ce résultat n'a pas été observé sur des feuilles d'*A. thaliana* (Norman *et al.*, 2004; Rhoads and Subbaiah, 2007). Le SA pourrait donc être un candidat potentiel dans la diversité des molécules de signalisation conduisant à l'induction de la régulation rétrograde mitochondriale.

La diversité des organismes chez lesquels la régulation rétrograde mitochondriale et l'induction de l'AOX, cible type de cette régulation, a été étudiée, a permis d'appréhender la diversité des mécanismes de cette régulation rétrograde mitochondriale. La mitochondrie est un organite central dans le métabolisme, elle est au cœur de la résistance aux stress biotiques ou abiotiques puisque cible de nombre d'entre eux. La régulation rétrograde mitochondriale permet la reprogrammation adéquate du génome nucléaire permettant ainsi à la cellule végétale de répondre au stress auquel elle est soumise. La dissection du promoteur de l'AOX, ainsi que l'étude des conditions d'induction de cette enzyme ont permis de mettre en évidence de potentielles molécules de signalisation et des éléments cis-régulateurs contrôlant l'expression de l'AOX. L'ensemble de ces éléments sont résumés dans la figure 12.

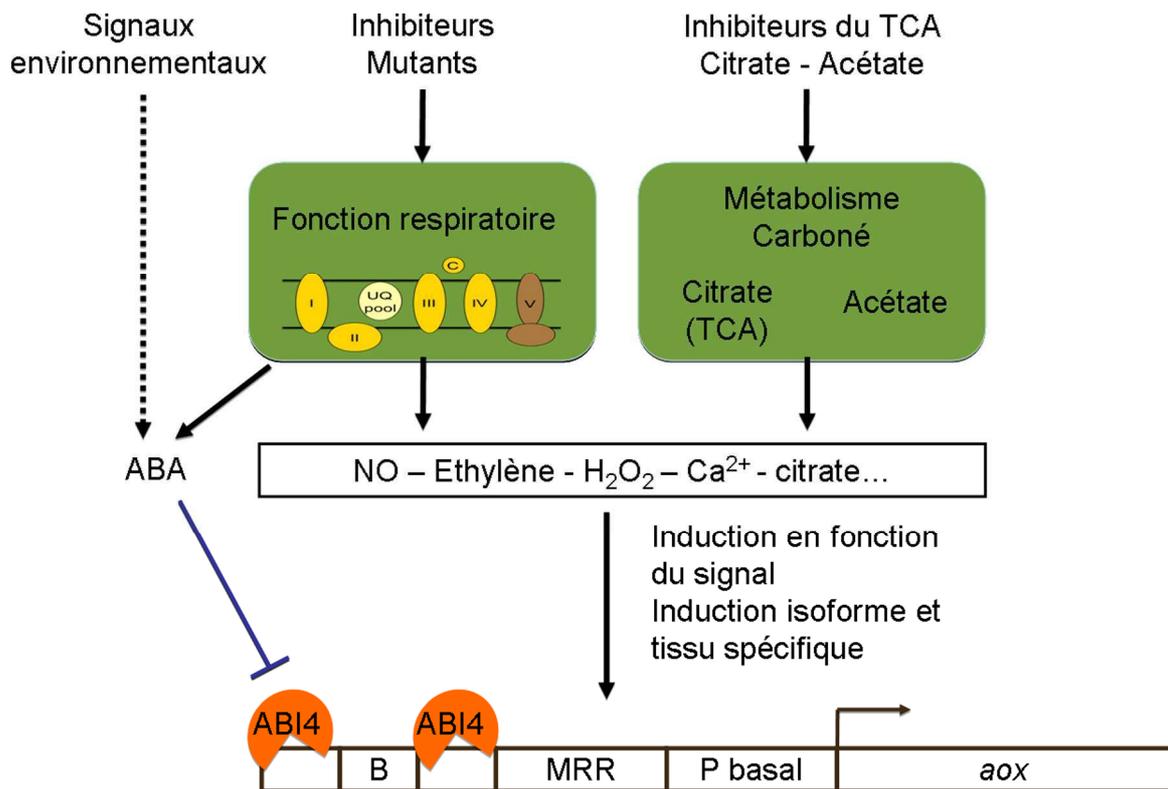


Figure 12: Régulation de l'expression du gène AOX, cible type de la régulation rétrograde

L'induction de l'AOX se fait lors de stress environnementaux, de dysfonctionnements de la chaîne respiratoire mitochondriale ou de perturbations du métabolisme carboné mitochondrial. Différentes molécules signal potentielles sont représentées. L'induction de l'AOX se fait en fonction du signal perçu/envoyé par la mitochondrie, que ce soit au niveau de l'isoforme induite ou de la localisation tissulaire de cette induction. Quatre éléments ont été décrits dans la séquence promotrice du gène *aox*: deux séquences reconnues par le facteur de transcription ABI4 (qui inhibe la transcription, et cette inhibition est levée par l'ABA) ; un domaine répresseur (B) ; une région MRR nécessaire à la réponse à l'antimycine et au MFA, ; et un promoteur basal impliqué dans la régulation de l'AOX au cours du développement.

Cette diversité dans la réponse à un dysfonctionnement mitochondrial n'est pas observée seulement pour l'AOX. Récemment une méta-analyse transcriptomique chez *A. thaliana* analysant l'effet de divers dysfonctionnements mitochondriaux (inhibiteurs ou mutants) a montré qu'il y avait une réponse commune à ces dysfonctionnements et des réponses spécifiques suivant le dysfonctionnement (Schwarzländer *et al.*, 2012). Les catégories fonctionnelles cibles de la régulation rétrograde mitochondriale montrent qu'en plus d'une réponse ciblée sur la perturbation mitochondriale, il y a une réponse cellulaire plus globale dans l'adaptation au stress (interactions plante-pathogène), une réorientation métabolique (biosynthèse protéique) et une communication inter-organites (réponse à la lumière et photosynthèse).

2. La régulation rétrograde plastidiale

Les plastes sont un groupe divers d'organites retrouvés chez certains parasites et chez les plantes. Le chloroplaste est l'archétype de ce groupe et se retrouve dans les cellules des tissus photosynthétiques. Ces organites sont le siège de la photosynthèse, réaction photochimique permettant de capter l'énergie lumineuse des photons pour former de l'ATP et du NADPH. La photosynthèse se déroule à la lumière, et lors de la phase nocturne, l'ATP et le NADPH produits permettent au cycle de Calvin de produire de la biomasse à partir du CO₂ atmosphérique (Figure 13).

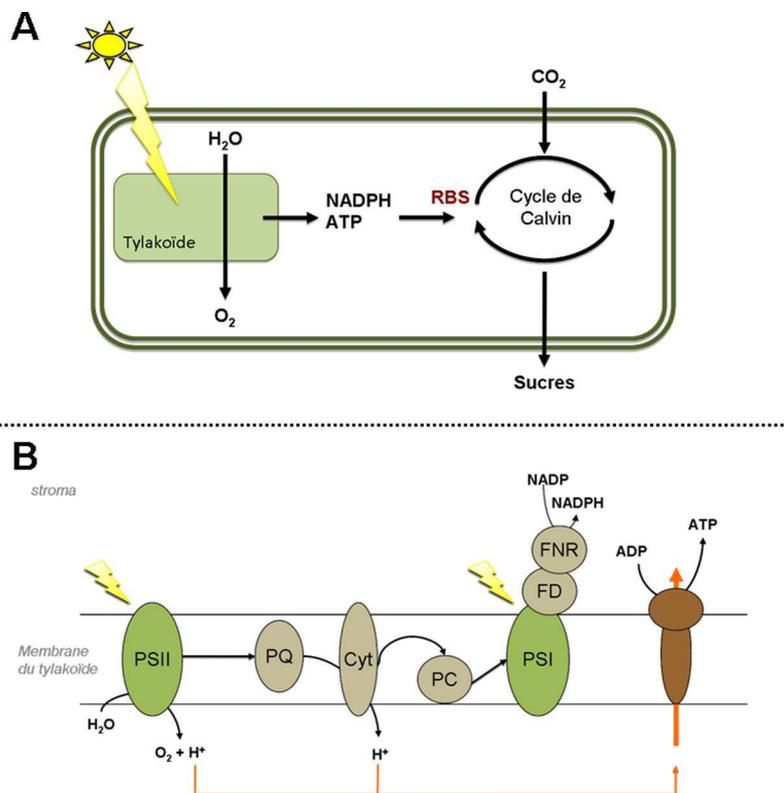


Figure 13: Métabolisme énergétique simplifié du chloroplaste

(A) Le NADPH et l'ATP produits par la photosynthèse, lors de la phase diurne, seront utilisés par le cycle de Calvin lors de la phase nocturne (première étape catalysée par la Rubisco (RBS)). Ce cycle permet la transformation du CO₂ atmosphérique en biomasse (sucres).

(B) Chaîne de transfert d'électrons au cours de la photosynthèse. La photosynthèse se déroule dans la membrane du tylakoïde. L'énergie lumineuse (jaune) est captée par les antennes des photosystèmes (PSII et PSI). Le transfert d'électrons du PSII au PSI (via les plastoquinones, PQ, le cytochrome, Cyt, et la plastocyanine, PC) met en place un gradient de protons utilisé par l'ATP synthase (en marron) pour produire de l'ATP dans le stroma du chloroplaste. La réduction du NADP en NADPH se fait au niveau du PSI lors du transfert d'électrons du PSI à la ferrédoxine (FD) puis à la ferrédoxine-NAD réductase (FNR).

La régulation rétrograde plastidiale permet la coordination de l'expression du génome nucléaire en fonction de l'état développemental et métabolique du chloroplaste. En effet, les proplastides

se différencient en chloroplastes, avec un métabolisme photosynthétique actif, lorsqu'il y a perception d'un signal lumineux. A l'inverse, lorsque la croissance se fait à l'obscurité et que la différenciation n'a pas eu lieu, on parle d'étioplastes. Cette différenciation passe par une reprogrammation du génome nucléaire permettant la synthèse des sous unités des complexes protéiques impliqués dans l'activité photosynthétique, mais aussi des enzymes impliquées dans la biosynthèse des pigments photoprotecteurs que sont les caroténoïdes. Outre cette fonction développementale, la régulation rétrograde plastidiale permet aussi de répondre à des perturbations, environnementales, chimiques ou mutationnelles, à l'état fonctionnel du chloroplaste, tout comme la régulation rétrograde mitochondriale. Trois types de régulations rétrogrades plastidiales ont été définies en fonction du signal à l'origine de la communication avec le noyau : 1) la régulation rétrograde liée à la voie de biosynthèse des tetrapyrroles, 2) la régulation rétrograde liée à l'état RedOx et donc à la production de ROS par le métabolisme chloroplastique, 3) l'effet de l'expression des gènes plastidiaux et de l'import protéique sur l'expression des gènes nucléaires (Inaba *et al.*, 2011). Ces trois voies de régulation rétrograde peuvent se rejoindre dans leur signalisation, voire interagir avec la régulation rétrograde mitochondriale pour adapter les deux métabolismes énergétiques à des variations environnementales.

2.1 Première évidence d'une communication du plaste vers le noyau : l'étude du mutant *albostrians* de l'orge.

Le mutant *albostrians* est un mutant de l'orge (*Hordeum vulgare*) qui présente des feuilles vertes, blanches ou striées. Ces tissus aux phénotypes différents ont le même génotype nucléaire (*as/as*), et ne diffèrent que dans la proportion de chloroplastes fonctionnels ou de plastes indifférenciés, les étioplastes. La mutation *as* (*albostrians*) est une mutation nucléaire récessive responsable d'une perte des ribosomes plastidiaux.

L'hypothèse de l'existence d'une communication du plaste vers le noyau liée à son état fonctionnel a tout d'abord été formulée suite à l'observation d'une diminution significative de l'activité enzymatique de la glyceraldéhyde-phosphate déshydrogénase (codée par le génome nucléaire) dans les feuilles blanches en comparaison des feuilles vertes de ce mutant. Il a alors été postulé que le plaste régulait la synthèse cytoplasmique des protéines qui lui étaient adressées selon son état fonctionnel (Bradbeer *et al.*, 1979).

La différenciation des proplastes en chloroplastes est induite par la lumière. Ce signal lumineux résulte notamment en une induction transcriptionnelle de la famille multigénique *cab*, codant la protéine LHCB (Light Harvesting Chlorophyll a/b binding protein of photosystem II), composant principal de l'antenne chlorophyllienne du complexe photosynthétique II (PSII). Cette protéine va s'associer aux chlorophylles a et b, synthétisées dans le chloroplaste par la voie des tétrapyrroles, pour donner la forme fonctionnelle de l'enzyme. Cette association prévient la dégradation de la protéine LHCB (des mutants du maïs déficients en chlorophylle répondent au signal lumineux et induisent transcriptionnellement le gène *LHCB* mais aucune protéine n'est détectée puisque dégradée rapidement) (Espineda *et al.*, 1999). Les caroténoïdes, synthétisés dans le chloroplaste, sont des pigments photoprotecteurs prévenant la photo-oxydation de la chlorophylle par la lumière. Des mutants du maïs déficients en caroténoïdes, contrairement aux mutants affectés dans le taux de chlorophylle, ne répondent pas au signal lumineux responsable de l'induction transcriptionnelle des gènes de la famille *cab*, notamment *LHCB* (Figure 14).

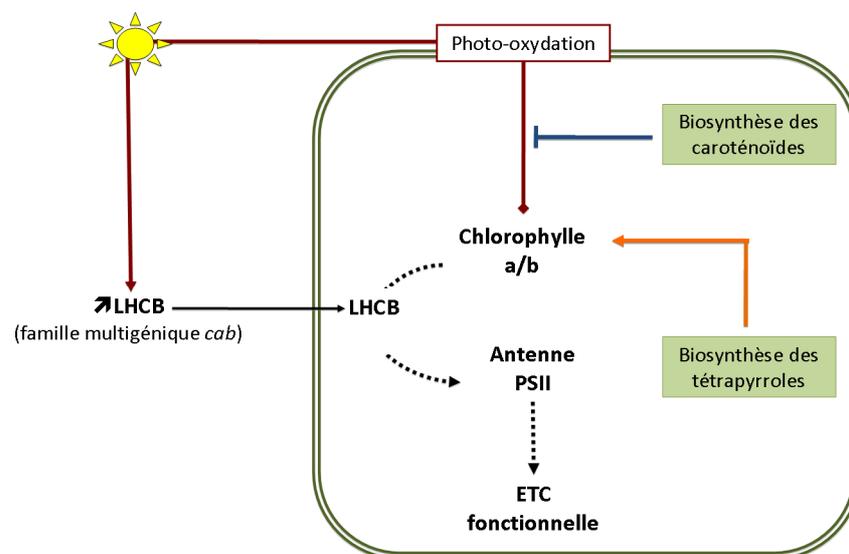


Figure 14: Régulation de l'expression de la protéine LHCB dans la voie de photosynthèse

LHCB est induite transcriptionnellement par la lumière. Son association avec les chlorophylles a/b la stabilise et permet son intégration comme sous unité fonctionnelle de l'antenne du complexe PSII de la chaîne de transport des électrons (ETC) de la voie de photosynthèse. Les chlorophylles sont des pigments sensibles à la photo-oxydation par la lumière et ils en sont protégés par les caroténoïdes. Les voies de biosynthèse des chlorophylles et des caroténoïdes sont localisées dans le plaste (en vert). Le plaste se différencie en chloroplaste lorsque son métabolisme photosynthétique est efficace.

L'induction de la régulation rétrograde plastidiale est responsable de la perte de l'induction des gènes *LHCB* et *RCBS* en réponse à la lumière. Cette perte d'induction est donc un marqueur de

l'activation de la régulation rétrograde plastidiale. Ces deux gènes nucléaires sont, comme le gène *AOX* dans la régulation rétrograde mitochondriale, les cibles types de cette voie de régulation. Cette régulation rétrograde plastidiale peut aussi être observée par traitement au norfluazon (NF). Le NF est un traitement herbicide ayant pour conséquence un photoblanchiment des tissus photosynthétiques, il inhibe une des étapes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes (Mayfield and Taylor, 1984). Dans les feuilles blanches du mutant *albosterians* il n'y a pas d'induction transcriptionnelle des gènes *LHCB* et *RBCS* alors que l'expression des autres gènes nucléaires codant des protéines plastidiales dont la fonction n'est pas photosynthétique, n'est pas altérée (Hess *et al.*, 1994; Emanuel *et al.*, 2004). Le phénotype plastidial résultant de la mutation récessive *as* se transmet maternellement (Figure 15). Suivant que la femelle est sauvage avec des chloroplastes fonctionnels et le mâle *albosterians* ou que la femelle est *albosterians* sans chloroplastes fonctionnels et le mâle sauvage, les F1 possèdent tous des chloroplastes fonctionnels (Partie A de la figure 15) ou des chloroplastes non différenciés (Partie B de la figure 15).

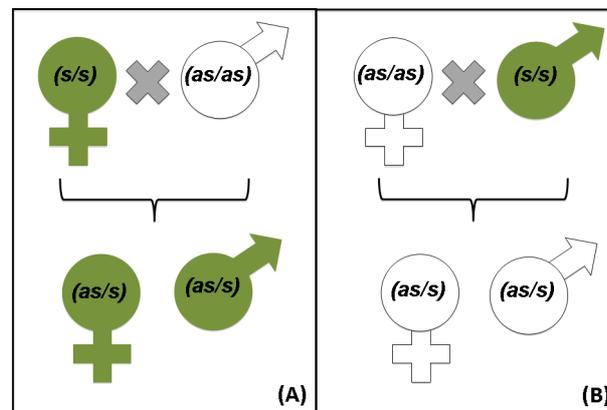


Figure 15: Représentation schématique des croisements orientés entre les souches *albosterians* et sauvage

Les génotypes nucléaires sont donnés entre parenthèse (*s* : allèle sauvage, *as* allèle mutant *albosterians*), le phénotype plastidial est indiqué par la couleur du symbole femelle ou mâle (vert : chloroplastes fonctionnels, blanc : chloroplastes indifférenciés). Ces deux croisements donnent des descendance au génotype nucléaire identique mais au phénotype chloroplastique différent du fait de l'héritabilité maternelle du phénotype chloroplastique.

La seule différence entre ces F1 (qui présentent tous le génotype nucléaire *s/as*) est donc l'état différencié ou non du plaste hérité du parent femelle. Les auteurs ont observé que seulement chez les descendants « verts », il y a induction transcriptionnelle des gènes *LHCB* et *RBCS* en réponse à la lumière. Le signal régulant l'expression de ces gènes nucléaires a donc bien pour

origine l'état fonctionnel, ou développemental, du plaste (Hess *et al.*, 1994). Depuis il a été montré que le développement du plaste ne régulait pas uniquement l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme photosynthétique mais aussi les ARN polymérases plastidiale et mitochondriale codées par le génome nucléaire et, par voie de conséquence les gènes plastidiaux (et mitochondriaux) transcrits par ces ARN polymérases (Emanuel *et al.*, 2004).

La régulation rétrograde plastidiale mise en évidence par ces expériences permet donc au plaste de transmettre son stade développemental en réponse au signal lumineux au noyau afin que l'expression génique de ce dernier conduise à une machinerie photosynthétique fonctionnelle.

2.2 Identification des mutants GUN – implication de la voie de biosynthèse des tétrapyrroles

Des mutants ne répondant plus au signal rétrograde plastidial ont été recherchés chez *A. thaliana*. Dans une plante transgénique portant un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur du gène *LHCB* (le gène *cab3* d'*A. thaliana*), des mutants exprimant le gène rapporteur malgré le traitement au NF ont été isolés (Susek *et al.*, 1993). Ces mutants sont insensibles à la régulation rétrograde : la régulation positive de *LHCB* n'est plus affectée par les dysfonctionnements chloroplastiques contrairement à une souche sauvage dans les mêmes conditions. Les mutants ainsi isolés ont été appelés GUN (Genome UNcoupled protein) puisqu'ils touchent un gène nécessaire pour coupler l'expression nucléaire à l'état fonctionnel du chloroplaste (Susek *et al.*, 1993;). Six mutants *gun* ont été identifiés (Susek *et al.*, 1993; Mochizuki *et al.*, 2001; Woodson *et al.*, 2011) et quatre d'entre eux sont impliqués dans le métabolisme des tétrapyrroles. Les tétrapyrroles appartiennent à un groupe prosthétique qui, lorsqu'ils sont liés à leurs apoprotéines, permettent l'absorption lumineuse, le transfert d'électrons et les liaisons à l'hydrogène. Ils sont présents dans tous les règnes et sont des composants essentiels aux processus biologiques de production énergétique tels que la respiration et la photosynthèse. Cependant leurs propriétés chimiques les rendent sensibles aux dommages photo-oxydatifs. Ils sont alors responsables d'une production importante de ROS et donc de dommages pouvant conduire à la mort cellulaire. La régulation de cette voie de biosynthèse est donc particulièrement importante pour la cellule, (Mochizuki *et al.*, 2010 pour revue). La voie de biosynthèse des tétrapyrroles conduit d'une part à la production d'hème et de phytychromobiline (chromophore du photorécepteur de la cellule végétale) et d'autre part

à la formation de la chlorophylle. Les mutants *gun* affectent chacune de ces deux branches. *GUN2* et *GUN3* codent respectivement l'hème oxygénase et la phytyltransférase (Mochizuki *et al.*, 2001) ; *GUN4* code une protéine nécessaire à l'activation de la Mg-chélatase qui catalyse la formation de Mg-protoporphyrine IX (Mg-ProtoIX) à partir de protoporphyrine IX (ProtoIX) (Larkin *et al.*, 2003) et *GUN5* code une sous unité de cette Mg-chélatase (Mochizuki *et al.*, 2001) (Figure 16).

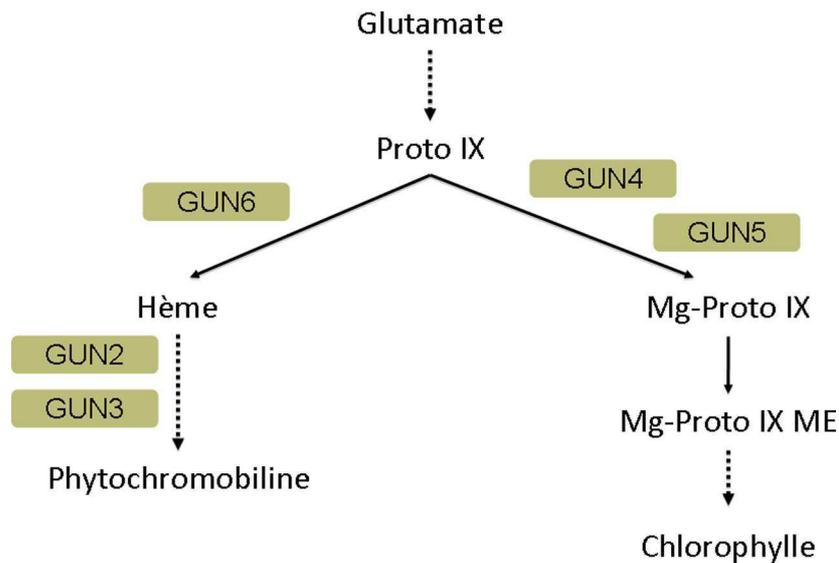


Figure 16: Positionnement des mutants insensibles à la régulation rétrograde plastidiale sur la voie de biosynthèse des tétrapyrroles

GUN : Genome UNcoupled protein ; ProtoIX : protoporphyrine IX, Mg-ProtoIX : Mg-protoporphyrine IX, Mg-ProtoIX ME : Mg-protoporphyrineIX monométhyl-ester

Récemment un nouveau mutant présentant le phénotype GUN (expression des gènes *LHCB* et *RCBS* malgré un traitement au NF) a été décrit : le mutant *gun6* (Woodson *et al.*, 2011). La mutation *gun6* est localisée dans la région régulatrice du gène de la ferrochélatase 1 (FC1), et est responsable de la surexpression de ce gène. L'enzyme FC1 permet l'insertion du fer dans la protoporphyrine IX pour former l'hème (Figure 16). Les expériences de biochimie faites sur ce mutant montrent que c'est l'augmentation de la biosynthèse de l'hème, par accroissement du flux de la voie de biosynthèse des TPP vers cette branche, qui pourrait être responsable de la régulation positive des gènes *LHCB* et *RCBS* (Woodson *et al.*, 2011).

En conclusion, le rôle exact de ces composés, Mg-protoIX, Mg-proto-IXME et hème, reste incertain même si leur implication dans la régulation rétrograde a bien été démontrée.

Cinq sur six des mutants *gun* appartiennent à cette voie de biosynthèse qui semble donc jouer un rôle clé dans la régulation rétrograde plastidiale. Il a été proposé qu'un des intermédiaires de cette voie soit un messenger entre le chloroplaste et le noyau (Strand *et al.*, 2003; Ankele *et al.*, 2007). En effet, des graines d'*A. thaliana* traitée au NF accumulent l'intermédiaire Mg-ProtoIX alors que les mutants *gun* ne présentent pas ce phénotype. De plus des conditions permettant une accumulation de Mg-ProtoIX ME abolissent les phénotypes des mutants *gun2* et *gun5* (Strand *et al.*, 2003). De même, chez l'algue photosynthétique *Chlamydomonas reinhardtii*, l'induction du gène *LHCB* est également bloquée par des défauts de la voie de biosynthèse des tétrapyrroles (Johanningmeier, 1988). Les intermédiaires Mg-ProtoIX et Mg-ProtoIX ME semblent donc être de bons candidats comme messagers de cette régulation rétrograde.

Cependant, des résultats contradictoires ont été reportés chez *A. thaliana*, (i) le mutant KO du gène codant la Mg-ProtoIX méthyl-transférase présente une diminution importante de Mg-ProtoIX associée à une diminution et non une augmentation de l'expression du gène *LHCB* (Pontier *et al.*, 2007), (ii) la visualisation *in vivo* dans le cytosol de l'intermédiaire Mg-ProtoIX en conditions de stress suggèrent une exportation de celui ci du plaste vers le cytosol (Ankele *et al.*, 2007), (iii) par contre le traitement au NF semble ne pas conduire à une accumulation de Mg-ProtoIX mais à une répression des gènes de la voie de biosynthèse des tétrapyrroles (Mochizuki *et al.*, 2008; Moulin *et al.*, 2008). Mais ces apparentes contradictions peuvent être dues à des différences de méthodologie ou de temporalité d'observation puisque récemment il a été montré une accumulation transitoire de Mg-ProtoIX dans les chloroplastes et le cytosol également chez *A. thaliana* (Zhang *et al.*, 2011).

2.3 Régulation rétrograde en réponse à l'état d'oxydo-réduction des chloroplastes

L'état d'oxydo-réduction de la chaîne de transport des électrons du chloroplaste donne des informations importantes sur les conditions environnementales de la plante puisque celui-ci dépend de l'intensité lumineuse perçue. Dans des conditions d'excès de lumière, différentes espèces réactives de l'oxygène sont produites par chacun des photosystèmes (Apel and Hirt, 2004) : le PSII est une source d'oxygène singulet (1O_2) tandis que le PSI produit du O_2^- , rapidement converti en H_2O_2 . Un déséquilibre d'excitation entre les photosystèmes I et II est responsable d'une modification de l'état Redox de la chaîne de transport d'électrons conduisant à une régulation des composés de l'appareil photosynthétique. Une analyse

transcriptomique chez *A. thaliana* a montré que ce signal affecte la régulation de gènes plastidiaux et nucléaires et ce, indépendamment de la régulation rétrograde passant par les protéines GUN. Les acteurs de cette régulation rétrograde induite par le statut redox de l'appareil photosynthétique restent cependant méconnus (Fey *et al.*, 2005).

La voie de signalisation des ROS la mieux caractérisée est celle induite par l' $^1\text{O}_2$ (Meskauskiene *et al.*, 2001; Camp *et al.*, 2003). Elle conduit à un arrêt de la croissance puis à la mort cellulaire. Le mutant *flu* d'*A. thaliana* (régulateur négatif de la voie de biosynthèse des chlorophylles codant une protéine plastidiale de fonction inconnue) accumule en excès un précurseur de la chlorophylle dans le noir (la protochlorophyllide) (Meskauskiene *et al.*, 2001). Ce précurseur, lorsqu'il est excité par la lumière, est responsable d'une accumulation d' $^1\text{O}_2$. Quand on transfère le mutant *flu* de l'obscurité à la lumière il y a accumulation d' $^1\text{O}_2$, arrêt de la croissance et mort cellulaire (Meskauskiene *et al.*, 2001; Camp *et al.*, 2003). Des intermédiaires de cette voie de régulation ont été identifiés: les protéines EXECUTER1 et EXECUTER2. Ces protéines sont localisées dans le plaste, et leur perte de fonction conduit à la suppression de l'arrêt de croissance et de la mort cellulaire chez le mutant *flu*. De la même manière, un mutant de la protéine EXECUTER1, en présence d'un inhibiteur du PSII (conduisant à la production d' $^1\text{O}_2$) n'active pas la réponse au stress conduisant à la mort cellulaire observée dans une souche sauvage. Cette régulation nécessite en réponse au signal d' $^1\text{O}_2$, une action concertée des deux protéines EXECUTER puisqu'il faut associer les pertes de fonction de ces deux protéines pour supprimer totalement la régulation positive de gènes nucléaires en réponse à l' $^1\text{O}_2$. Ces gènes appartiennent aux catégories fonctionnelles de signalisation, de transcription et de réponse aux stress (Wagner *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2007).

Ces résultats montrent que la mort cellulaire en réponse à l' $^1\text{O}_2$ (du mutant *flu* ou par traitement à un inhibiteur du PSII) n'est pas due aux dommages photo-oxydatifs causés par l' $^1\text{O}_2$ mais qu'elle est contrôlée génétiquement par une régulation rétrograde ayant pour intermédiaires les protéines EXECUTER1 et EXECUTER2 (Lee *et al.*, 2007).

2.4 L'effet de l'expression des gènes plastidiaux et de l'import protéique sur l'expression de gènes nucléaires

La biogénèse des plastes nécessite une coordination de l'expression des génomes nucléaires et plastidiaux et dépend de l'import des protéines codées par le noyau.

2.4.1 L'expression des gènes plastidiaux

Lorsqu'il y a inhibition de l'expression des gènes plastidiaux lors de la synthèse protéique (par la lincomycine ou le chloramphénicol), l'expression des gènes nucléaires *LHCB* et *RBCS* est réprimée, mais ce phénotype n'est observé que dans les premiers jours de développement du semis (Oelmüller *et al.*, 1986). Il existe donc une réponse nucléaire à l'expression des protéines plastidiales. Un des acteurs de cette réponse est la protéine GUN1 puisque cette réponse est abolie chez un mutant *gun1*, à l'inverse des mutants *gun2*, *gun4* et *gun5* (Gray *et al.*, 2003). Ce mutant a été isolé comme les autres mutants *gun* sur le crible d'une non-réponse de l'expression du gène *LHCB* au traitement au NF (Susek *et al.*, 1993). *gun1*, contrairement aux quatre autres mutants GUN isolés, ne code pas une enzyme de la voie de biosynthèse des tétrapyrroles, mais une protéine plastidiale de la famille des PPR (pentatricopeptide protein) (Koussevitzky *et al.*, 2007). Les protéines PPR sont des protéines présentes chez les eucaryotes (jusqu'à 450 gènes chez *A. thaliana*) et sont impliquées dans de multiples aspects du métabolisme des ARNs dans les organites (plastides et mitochondries) (Lurin *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2012). GUN1 possède aussi un domaine SMR (small mut-S-related) qui est retrouvé dans des protéines impliquées dans la réparation et la recombinaison de l'ADN (Koussevitzky *et al.*, 2007). GUN1 est un acteur de deux mécanismes de régulation rétrograde (réponse au norfluazon / au photoblanchiment et expression des gènes plastidiaux).

2.4.2 L'import des protéines

Un mutant du complexe externe de la machinerie d'import (TOC) d'*A. thaliana*, le mutant *ppi2*, présente un phénotype albinos et une répression des gènes photosynthétiques codés par le génome nucléaire dont *LHCB* et *RCBS* (Bauer *et al.*, 2000). Le gène *RCBS* fusionné à un promoteur constitutif n'est plus soumis à cette régulation négative chez le mutant *ppi2* (Smith *et al.*, 2004). Le mécanisme de rétrocontrôle négatif se situe donc au niveau transcriptionnel. Une analyse transcriptomique montre que 2000 gènes sont différentiellement exprimés chez le

mutant *ppi2*, et 30% des gènes réprimés codent des protéines plastidiales, notamment liées à la photosynthèse (Kakizaki *et al.*, 2009). La reprogrammation du génome nucléaire en réponse à un dysfonctionnement de la machinerie d'import est indépendante de l'accumulation de Mg-protoIX. Le signal de cette régulation rétrograde ne passe donc pas par cette voie de biosynthèse. Par contre chez le double mutant *gun1ppi2* il y a dérégulation des gènes nucléaires photosynthétiques, ce qui signifie que la perte de fonction de la protéine GUN1 chez le mutant *ppi2* restaure la régulation rétrograde plastidiale. La protéine GUN1 est donc un régulateur positif de la régulation rétrograde (Kakizaki *et al.*, 2009). Un autre acteur de cette voie a également été identifié par cette analyse, il s'agit du facteur de transcription GLK1 qui régule le développement chloroplastique par la régulation de l'appareil photosynthétique (Fitter *et al.*, 2002). L'expression de *GLK1* est réprimée chez le mutant *ppi2* et sa surexpression supprime le phénotype de ce mutant d'import. Le gène *GLK1* est aussi réprimé dans une souche sauvage traitée au norfluazon ou à la lincomicyne alors qu'il est sur exprimé chez un double mutant *gun1 gun5*. GLK1 est donc une cible et un acteur des réponses au dysfonctionnement de l'import des protéines, de l'appareil photosynthétique et de l'expression des gènes plastidiaux (Kakizaki *et al.*, 2009; Waters and Langdale, 2009).

2.5 Des régulations rétrogrades plastidiales distinctes mais partageant certains effecteurs

Trois types de dysfonctionnements plastidiaux conduisent à une reprogrammation du génome nucléaire : Un stress photo-oxydatif, une perturbation de la balance RedOx (accumulation de $^1\text{O}_2$) et une perturbation de l'expression des protéines plastidiales. Plusieurs acteurs de ces voies ont été décrits :

- Les protéines GUN2, GUN3, GUN4 et GUN5 (ainsi que les produits Mg-protoIX et Mg-protoIX-Me) qui appartiennent à la voie de biosynthèse des tétrapyrroles, ces protéines permettent de répondre au stress photo-oxydatif et sont impliquées dans la différenciation des proplastés en chloroplastes
- Les protéines EXECUTER1 et EXECUTER2 qui sont impliquées dans l'arrêt de croissance et la mort cellulaire en réponse à un stress à $^1\text{O}_2$ (produit par des perturbations de la chaîne de transport d'électrons photosynthétique)
- La protéine GLK1, régulateur positif de l'expression des gènes *LHCB* et *RCBS*, qui est impliquée dans la réponse à des dysfonctionnements d'import protéique et qui est régulée négativement

en condition de stress photo-oxydatif et de perturbation de l'expression des protéines plastidiales

- Le facteur de transcription ABI4 qui est impliqué dans la réponse au stress photo-oxydatif (le mutant *abi4* a un phénotype de type GUN en réponse au NF), dans la réponse à un excès de lumière et donc au stress redox de la chaîne de transport d'électrons photosynthétique (*abi4* retarde la réponse transcriptionnelle à une lumière intense) et dans la réponse à l'expression des gènes plastidiaux (*abi4* diminue la réponse à un traitement à la lincomycine)

- La protéine GUN1 qui est un régulateur négatif de GLK1 et un régulateur positif de ABI4, est au carrefour de la transduction du signal d'induction des réponses au stress photo-oxydatif passant par la voie de biosynthèse des tétrapyrroles, au stress redox de l'appareil photosynthétique (*gun1* retarde la réponse transcriptionnelle à une lumière intense) et aux perturbations de l'import et de l'expression des protéines plastidiales (*gun1* diminue la réponse à un traitement à la lincomycine et la perte de fonction de la protéine GUN1 chez le mutant *ppi2* restaure la régulation rétrograde plastidiale) (Koussevitzky *et al.*, 2007; Kakizaki *et al.*, 2009)

L'ensemble de ces données est résumé dans la figure 17. Il est intéressant de noter qu'ABI4 est un acteur commun avec la régulation rétrograde mitochondriale puisque ABI4 est un répresseur de l'induction de l'AOX.

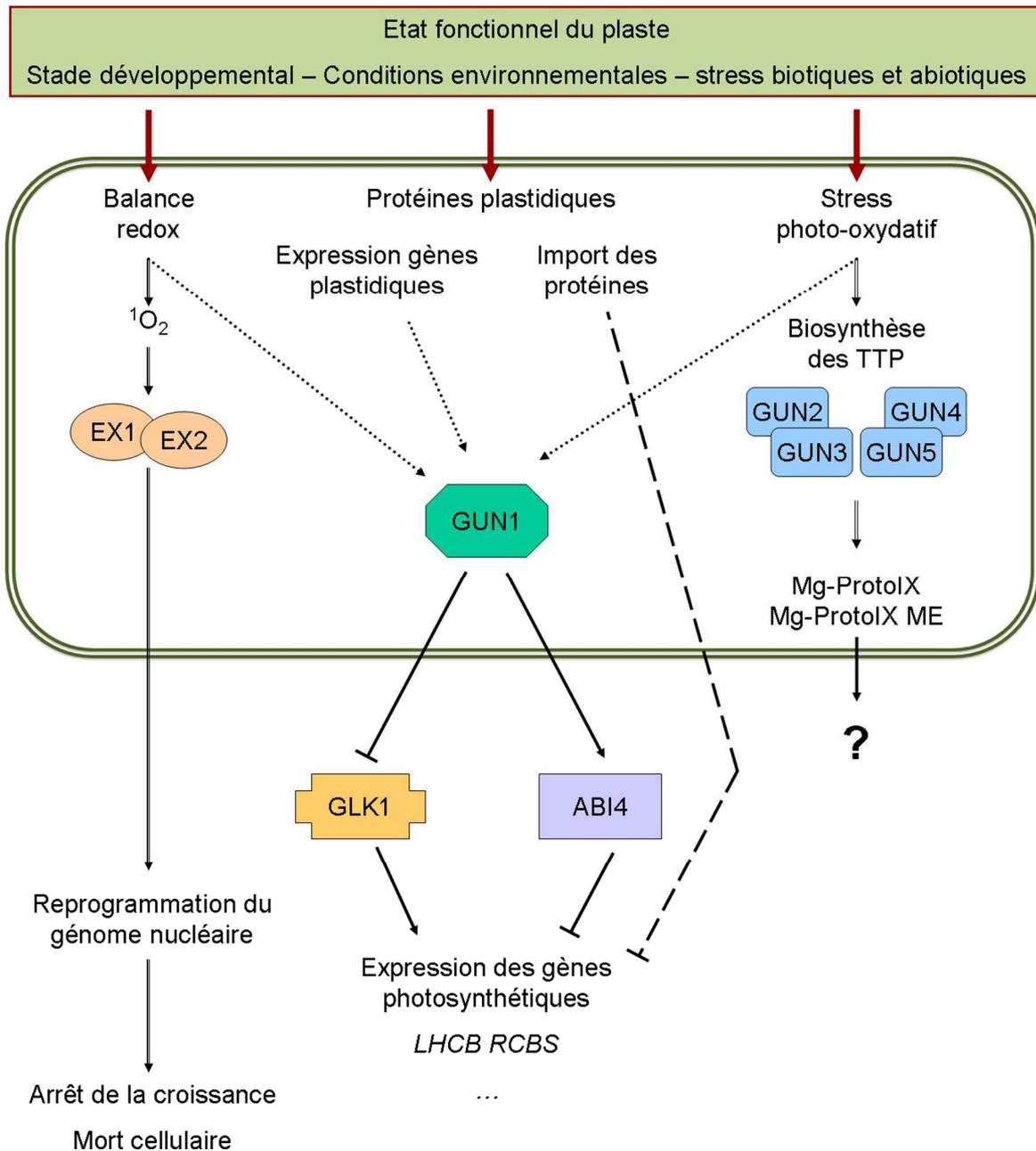


Figure 17: Résumé de la régulation rétrograde plastidiale

La régulation rétrograde plastidiale répond à différents signaux (stade développemental, conditions environnementales et stress). Ces signaux sont responsables de différentes perturbations (de la balance redox de la chaîne de transport d'électrons, de l'expression et de l'import des protéines plastidiales et d'un stress photo-oxydatif). Plusieurs effecteurs ont été caractérisés, les protéines EXECUTER qui induisent un arrêt de la croissance et une mort cellulaire, les protéines GUN2, 3, 4 et 5 qui sont responsables de la biosynthèse des tétrapyrroles (TPP) et d'une augmentation de Mg-protoIX et Mg-protoIX ME (la fonction précise de ces composés dans la régulation rétrograde plastidiale reste encore à définir). L'ensemble des signaux, à l'exception de la voie EXECUTER, convergent vers la protéine GUN1 qui régule négativement et positivement les facteurs de transcription GLK1 et ABI4 respectivement. Ces facteurs de transcription régulent l'expression des gènes photosynthétiques dont *LHCB* et *RCBS*.

3. Coordination des métabolismes mitochondriaux et chloroplastiques par la régulation de cible de la régulation rétrograde mitochondriale

Les métabolismes du chloroplaste et de la mitochondrie sont interconnectés. La mitochondrie permet l'optimisation du métabolisme photosynthétique en aidant à dissiper les équivalents redox produits par le chloroplaste, en optimisant l'assimilation du carbone par la photosynthèse et en protégeant le chloroplaste de la photo-inhibition (Raghavendra and Padmasree, 2003 pour revue). Il doit donc exister une communication entre la mitochondrie et le chloroplaste. Il a été montré qu'un mutant portant des délétions de l'ADN mitochondrial, le mutant *nsc2* du maïs, montre des défauts dans le développement de ses chloroplastes (fixation de CO₂ plus faible et perturbations dans la composition des thylakoïdes) (Roussel *et al.*, 1991). Inversement, l'étude du mutant *albosterians* (voir paragraphe 2.1) a mis en évidence que l'état fonctionnel du plaste influençait l'expression des gènes mitochondriaux (Emanuel *et al.*, 2004). On observe dans ce mutant une augmentation du nombre de copies du génome mitochondrial et de la transcription des gènes mitochondriaux dans les cellules des feuilles blanches par rapport aux cellules des feuilles vertes. Ces phénotypes sont aussi observés lors d'un traitement au NF (Hedtke *et al.*, 1999). Cette communication mitochondries / chloroplastes se fait aussi *via* la régulation de l'expression de gènes nucléaires codant des protéines à destination d'un organite donné en réponse à une signalisation provenant de l'autre organite. Par exemple plusieurs études ont montré une régulation des gènes codant les enzymes de voies alternatives respiratoires mitochondriales en réponse à un signal lumineux avec un effet protecteur du métabolisme chloroplastique. Ainsi, chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L. cv. Desiree), il y a une induction des gènes codant l'oxydase alternative et une des NADH déshydrogénases (NAD1) en réponse à la lumière de manière coordonnée avec le développement du chloroplaste (Svensson and Rasmusson, 2001).

L'oxydase alternative joue un rôle dans la photo-protection de la plante. Dans des conditions d'excès de lumière, différents mécanismes sont activés (photo-respiration et transport d'équivalent redox dans le cytosol par exemple) qui ont pour conséquence d'augmenter les équivalents réducteurs dans le cytosol. L'oxydase alternative en oxydant ces excès d'équivalents réducteurs produits par la photosynthèse a un rôle photo-protecteur (Yoshida *et al.*, 2006; Yoshida and Noguchi, 2009; Yoshida *et al.*, 2007). L'AOX doit donc être induite pour permettre une meilleure efficacité de la photosynthèse. Ainsi l'expression de l'oxydase

alternative est activée par la lumière et l'inhibition de cette enzyme a un impact négatif sur la photosynthèse. De même l'activité *in vivo* de l'AOX est liée à l'efficacité de la photosynthèse ainsi qu'à sa tolérance à la photo-inhibition (Padmasree and Raghavendra, 1999; Bartoli, 2005; Clifton *et al.*, 2006; Dinakar *et al.*, 2010; Florez-Sarasa *et al.*, 2011). Ce rôle photo-protecteur de l'AOX est également impliqué dans le mécanisme d'adaptation rapide à court terme aux changements d'intensité lumineuse (Yoshida, Watanabe, Hachiya, *et al.*, 2011; Yoshida, Watanabe, Terashima, *et al.*, 2011)

Il existe donc une régulation en réponse à un stress d'origine chloroplastique de gènes cibles de la régulation rétrograde mitochondriale (AOX et NADH alternatives). Les mécanismes de cette interconnexion restent inconnus.

D. Il existe un lien causal entre fonction respiratoire et phénomène de sénescence

1. Première mise en évidence d'un lien causal entre fonction respiratoire et longévité chez *Podospora anserina*

1.1 *Podospora anserina*, un organisme modèle

Podospora anserina est un champignon filamenteux appartenant à l'embranchement des ascomycètes, sa reproduction est uniquement sexuée (cycle de vie en annexe). C'est un organisme multicellulaire à organisation syncytiale. Le mycélium est formé d'un réseau d'hyphes cloisonnés mais percés de pores. Cette structure le situe donc à la frontière entre les eucaryotes unicellulaires et pluricellulaires (Figure 18).

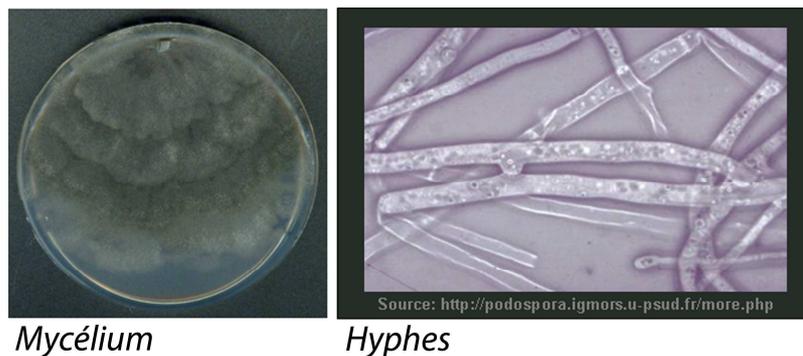


Figure 18: Mycélium d'une souche sauvage et image du réseau hyphal composant le mycélium de *Podospora anserina*

L'étude génétique et moléculaire de *P. anserina* est aisée, son génome est entièrement séquencé depuis 2008 et annoté (Espagne *et al.*, 2008) et (<http://podospora.igmors.u-psud.fr/>). Ce génome dont la taille est d'environ 34 Mb contient environ 11000 gènes répartis sur 7 chromosomes nucléaires et un chromosome mitochondrial (~ 95 kb).

P. anserina est un système modèle pour un grand nombre de problèmes biologiques : développement sexué et identité nucléaire (Debuchy *et al.*, 2010), étude des prions (Saupe, 2011) étude de plusieurs formes de dégénérescence cellulaire (Silar *et al.*, 2001) dont le phénomène de sénescence (Lorin *et al.*, 2006; Osiewacz *et al.*, 2010). En effet *P. anserina* présente la particularité d'avoir une croissance végétative systématiquement limitée par un processus appelé sénescence. Ce processus a été décrit pour la première fois par G. Rizet dans les années 50 (Rizet, 1953). Il s'agit d'un processus naturel qui se définit comme l'incapacité du

mycélium issu d'une spore à maintenir une croissance végétative ininterrompue. À partir de la germination d'une spore, la croissance mycélienne se poursuit à vitesse constante puis diminue brusquement jusqu'à la mort des cellules apicales. Ce processus est systématique et a été observé chez toutes les souches géographiques étudiées. Toute souche de *Podospora* peut donc se définir par sa longévité qui dépend de son génotype et des conditions environnementales. Il a été montré que la sénescence était due à l'apparition aléatoire et systématique d'un élément cytoplasmique infectieux, le « déterminant de la Sénescence » qui se propage et s'amplifie dans les cellules du front de croissance jusqu'à atteindre une concentration seuil, conduisant à la mort des cellules apicales (Marcou, 1961; Smith and Rubenstein, 1973). Parmi les composants cytoplasmiques possibles pouvant être à l'origine du déterminant, la mitochondrie a longtemps été suspectée. En effet l'emploi de drogues affectant le métabolisme mitochondrial modifie la longévité (Esser and Tudzynski, 1977; Belcour and Begel, 1980). Par ailleurs, la sénescence est toujours associée à une instabilité de l'ADN mitochondrial (ADNmt) et à l'apparition dans la mitochondrie de molécules d'ADN circulaires multimériques extra-chromosomiques appelé senDNAs (ADNs caractéristiques de la sénescence) issues de différentes régions de l'ADNmt (Belcour *et al.*, 1981, 1982). Parmi ces senDNAs, l'un d'entre eux, le senDNA α , correspond précisément à l'amplification du premier intron (intron α) du gène *co1* codant une sous unité de la cytochrome oxydase (Jamet-vierny, 1980; Kück *et al.*, 1981; Vierny *et al.*, 1982). Il est toujours présent dans les souches sauvages sénescences. Etant donné la corrélation entre présence de senDNAs et sénescence, ceux-ci (et particulièrement le senDNA α) ont été proposés comme étant le déterminant de la sénescence. Cependant, il a été montré qu'il est possible de transmettre par anastomose des senDNAs sans pour autant transmettre l'état sénescence, remettant en cause la nature du déterminant (Jamet-Vierny *et al.*, 1999). Par ailleurs la sélection au laboratoire d'un mutant mitochondrial précisément délété de l'intron α qui présente toujours un phénomène de sénescence a clairement démontré que cet intron n'est pas le déterminant (Begel *et al.*, 1999).

1.2 Première mise en évidence d'un lien causal entre fonction respiratoire et longévité

C'est au laboratoire, chez *P. anserina*, qu'une relation causale entre longévité et fonction respiratoire a été établie pour la première fois. Depuis, une telle relation a été observée chez d'autres organismes.

1.2.1 Chaîne respiratoire de *Podospora anserina*

P. anserina est un organisme aérobic strict, qui possède, comme de nombreux autres champignons, les plantes (voir §C.1.1), certains protozoaires et certains animaux (McDonald and Vanlerberghe, 2004; Veiga *et al.*, 2003), des « voies respiratoires alternatives » en plus des composants « classiques » d'une chaîne respiratoire. Il s'agit d'une part d'une oxydase alternative (AOX) qui, comme décrit chez les plantes dans le §C.1.1, est une protéine localisée à l'interface de la membrane mitochondriale interne et de la matrice, capable de transférer directement les électrons de l'ubiquinol à l'oxygène (Figure 19). Ce transfert n'est pas couplé à une translocation de protons et l'utilisation de cette voie alternative permet de se dispenser des deux derniers sites de translocation de protons (les complexes III et IV). Cette protéine joue un rôle central dans la respiration insensible au cyanure et a tout d'abord été mise en évidence chez les plantes (§C.1.2). Récemment, cette protéine a également été identifiée chez certains métazoaires (échinodermes, urochordés). Le gène est absent des génomes de vertébrés et d'arthropodes (McDonald *et al.*, 2009). Le rôle de l'AOX a fait l'objet et fait toujours l'objet de nombreux débats. Chez les plantes, comme précédemment dit (§C.1.2), son expression dans les organes floraux des plantes thermogéniques facilite la production de chaleur permettant l'attrait des insectes pollinisateurs (Wagner *et al.*, 2008; Meeuse, 1975). Elle pourrait aussi avoir un rôle dans le maintien d'une balance Redox dans les conditions diurnes où la chaîne mitochondriale « classique » est inhibée par le fort taux d'ATP produit par la photosynthèse (Rustin and Queiroz-Claret, 1985), elle est aussi responsable, dans des plantes transgéniques de tabac, de limiter la quantité de ROS produits par les mitochondries en évitant l'hyper-réduction du pool des quinones (Amirsadeghi *et al.*, 2006). Chez les autres organismes, le rôle de l'AOX n'est pas clair mais son rôle « antioxydant » est souvent évoqué.

Les autres « alternatives » présentes chez *P. anserina* sont des NAD(P)H déshydrogénases, deux externes capables d'oxyder le NADH cytosolique, et une interne (NDI1) capable d'oxyder le NADH matriciel (Figure 19). Ces protéines sont présentes chez les plantes (Figure 9), les

champignons et chez de nombreuses bactéries (Rasmusson *et al.*, 2008; Howitt *et al.*, 1999), et sont absentes chez les animaux. Le rôle de ces NAD(P)H déshydrogénases est évident chez les organismes dépourvus de complexe I tel *S. cerevisiae* (Figure 2). Chez tous les autres organismes, leur rôle est mal connu. Elles semblent impliquées dans la protection contre les ROS en court circuitant le complexe I, site important de production de radicaux libres. De plus, on pense que la présence de ces alternatives non protomotrices (AOX et NAD(P)H déshydrogénases) permet de moduler rapidement le flux d'électrons et la production d'ATP suivant les conditions environnementales (Moore *et al.*, 2002). La chaîne respiratoire de *P. anserina* est schématisée figure 19.

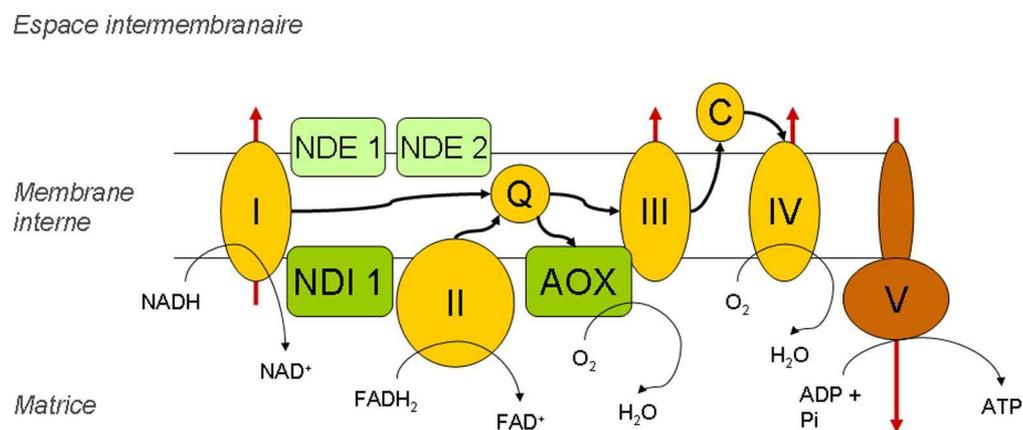


Figure 19: Chaîne respiratoire mitochondriale de *P. anserina*

La chaîne respiratoire aboutit à la production d'ATP via l'ATP synthase (complexe V) grâce à un transfert d'électrons des complexes I et II vers le complexe III via le pool des quinones (Q), puis en direction du complexe IV, entraînant un gradient de protons nécessaire au fonctionnement de l'ATP synthase. Cette chaîne présente également des voies alternatives : une NADH déshydrogénase interne (NDI1), permettant de se dispenser du complexe I, et l'oxydase alternative (AOX) branchée au niveau du pool des quinones permettant de se dispenser des complexes III et IV.

Ces alternatives présentent des régulations transcriptionnelles différentes. En effet, dans des conditions de croissance standard, le gène *aox* codant l'AOX n'est pratiquement pas exprimé. Il est induit en présence d'inhibiteurs des complexes III ou IV ou de mutations de ces complexes (Lorin *et al.*, 2001; Sellem *et al.*, 2007). Par contre le gène *ndi1* codant la NADH déshydrogénase interne, NDI, est exprimé constitutivement à un faible niveau (Maas *et al.*, 2010).

1.2.2 Des dysfonctionnements de la chaîne respiratoire conduisent à une augmentation de la longévité de *P. anserina*

Un faisceau de données obtenues au cours des années suggérait que chez *P. anserina*, il existe un lien entre respiration et longévité. Parmi ces données, on peut citer (i) l'augmentation de longévité corrélée à la présence d'inhibiteurs de la synthèse des protéines mitochondriales (kanamycine, neomycine,...) et d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire (CN) (Esser and Tudzynski, 1977), (ii) L'augmentation de longévité de mutants mitochondriaux portant une délétion de l'ADNmt couvrant une partie du premier exon et du premier intron du gène *co1* (Vierny *et al.*, 1982; Belcour and Vierny, 1986).

Cependant la démonstration d'un lien causal entre respiration et longévité a été apportée en 2000 par la construction d'un mutant perte de fonction du complexe IV (mutant *cox5::ble*) (Dufour *et al.*, 2000). Un mutant perte de fonction du complexe III (mutant *cyc1-1*) a également été obtenu (Sellem *et al.*, 2007). Ces deux mutants présentent un phénotype mycélien grêle, une vitesse de croissance très ralentie, une stérilité femelle et sont dits « éternels » puisque leur longévité est supérieure à deux ans tandis qu'elle est d'environ deux semaines pour une souche sauvage (Figure 21). Chez ces deux mutants, il y a induction transcriptionnelle du gène *aox* et cette induction est nécessaire à la viabilité de ces mutants puisque les génotypes *cox5::ble Δaox* et *cyc1-1 Δaox* sont létaux. De façon surprenante, il a été montré que la surexpression constitutive de l'AOX chez ces mutants porteurs d'un transgène *gpd-aox* où le gène *aox* est sous le contrôle d'un promoteur fort rétablissait un phénotype mycélien et une vitesse de croissance améliorée et restaurait le processus de sénescence (Figure 20) (Lorin *et al.*, 2001; Sellem *et al.*, 2007).

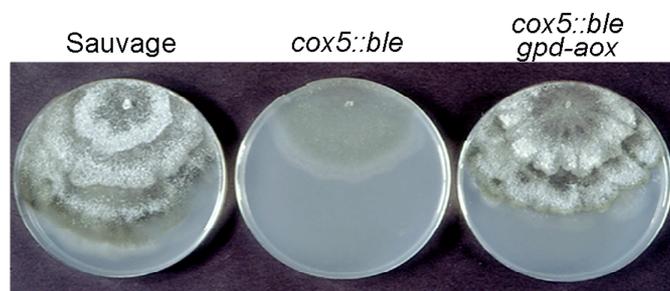


Figure 20: Aspect mycélien et croissance des souches sauvage, *cox5::ble* et *cox5::ble, gpd-aox*

Les cultures ont été mises en croissance 10 jours sur le milieu standard (M2). La souche *cox5::ble* a un complexe IV non fonctionnel, elle survit grâce à l'induction du gène *aox*. La souche *cox5::ble, gpd-aox* porte en plus un transgène surexprimant le gène *aox*, elle présente une amélioration de sa croissance, de son phénotype mycélien ainsi qu'une restauration du processus de sénescence (d'après Lorin *et al.*, 2001).

Plusieurs hypothèses non exclusives ont été émises pour expliquer ces données. L'une postule que la surexpression de l'AOX conduit à une augmentation du flux d'électrons via la voie alternative et que cette augmentation du flux est accompagnée d'une translocation de protons augmentée au niveau du complexe I, résultant en une amélioration du potentiel de membrane et de la production d'ATP. Selon cette hypothèse, la longévité dépendrait directement du métabolisme énergétique. Une autre postule que chez les mutants *cox5::ble gpd-aox* et *cyc1-1 gpd-aox* il n'est pas nécessaire de mettre en route une régulation rétrograde mitochondriale puisque l'AOX est constitutivement exprimée alors que ce n'est pas le cas chez les mutants *cox5::ble* et *cyc1-1*. Selon cette hypothèse, la régulation rétrograde mitochondriale contrôlerait l'expression de gènes (autres que le gène *aox*) impliqués dans le contrôle de la longévité.

Grace à l'existence de la NADH déshydrogénase interne (NDI1), un mutant perte de fonction du complexe I (*nuo19.3::nat*) a pu être construit. Ce mutant présente un phénotype mycélien sauvage, est femelle stérile et sa longévité est d'environ quatre mois (augmentation de 800%) (Figure 21). Là encore, cette souche est viable grâce à NDI1 et le génotype *nuo19.3::nat Δndi1* est léthal. La même stratégie de surexpression de la voie alternative concernée a été effectuée, encore une fois le résultat est spectaculaire puisque la souche *nuo19.3::nat gpd-ndi1* est indistinguable de la souche sauvage : la fertilité femelle et le processus de sénescence sont complètement restaurés (Maas *et al.*, 2010).

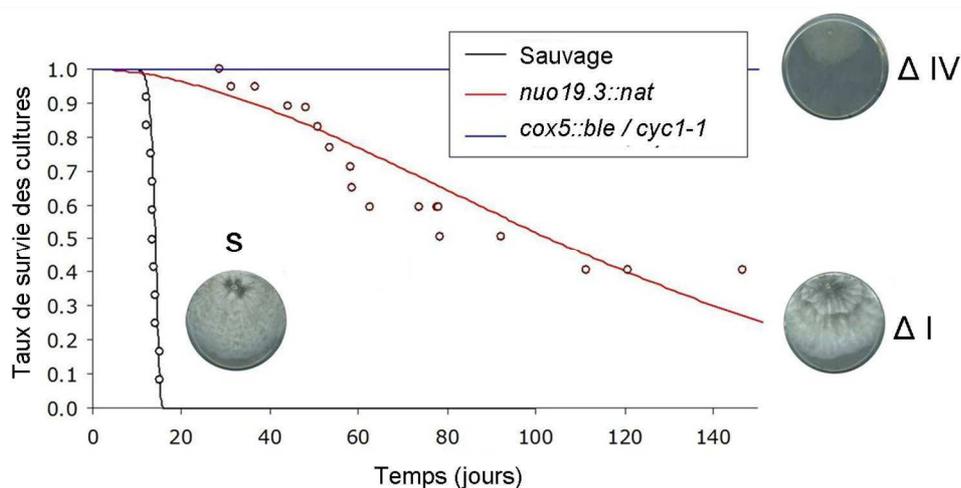


Figure 21: Courbes de survie et aspect mycélien des souches sauvage, et des mutants perte de fonction pour les complexes I ou IV de la chaîne respiratoire de *P. anserina*

Chez le mutant *nuo19.3::nat*, le gène *ndi1* est constitutivement exprimé et n'est pas induit. Cependant de façon inattendue, le gène *aox* est induit chez ce mutant bien que son expression ne soit pas nécessaire : le phénotype de la souche *nuo19.3::nat Δaox* est indistinguable de celui de la souche *nuo19.3::nat* (Sellem, communication personnelle). De même, le gène *aox* est induit chez des mutants (PaAnt^{M106P} et PaAnt^{A121P}) de la translocase mitochondriale ATP/ADP, alors que la délétion du gène *aox* n'entraîne aucune modification phénotypique de ces mutants (El-Khoury and Sainsard-Chanet, 2009). Il semble donc que, chez ces mutants, le dysfonctionnement mitochondrial est perçu par le noyau qui « répond » à cette signalisation, entre autre, par l'expression du gène *aox*. Et ce, même si celle-ci n'est pas fonctionnellement nécessaire.

2. Le lien causal entre fonction respiratoire et longévité est un phénomène conservé

2.1 Des dysfonctionnements de la fonction respiratoire conduisent à une augmentation de la longévité chez *Caenorhabditis elegans*

Une inactivation systématique de 5690 gènes chez *C. elegans* a été réalisée dans le but d'identifier les gènes qui contrôlent la longévité chez cet organisme (Lee *et al.*, 2003). Les résultats ont révélés que parmi les gènes dont l'inactivation entraîne une augmentation de la longévité, les gènes à fonction mitochondriale sont très largement représentés. Par ailleurs, des expériences d'inactivation ciblées contre des sous unités des complexes I, III, IV et V de la chaîne respiratoire (*nuo2*, *cco1*, *cyc1* et *atp3* respectivement) ont également révélé un accroissement de longévité corrélé à une diminution de la production d'ATP, une taille diminuée, un développement plus lent et une baisse de la fertilité (Dillin, 2002). Ces expériences, contrairement à celles faite chez *P. anserina* ne sont pas des pertes de fonction totale, qui aurait été létale puisqu'il n'existe pas de voies alternatives chez *C. elegans*, mais une diminution significative de l'expression des complexes et donc de la respiration. Il est à noter que l'accroissement de longévité n'est observé que lorsque le traitement RNAi est effectué au cours du développement, et non lors de la phase adulte et que cet accroissement s'observe également si le RNAi est levé lors de la phase adulte. Les auteurs proposent que *C. elegans* possède un système « senseur » qui a la mémoire du statut respiratoire au cours du développement. Ce système, une fois activé, serait responsable de l'accroissement de longévité

(Dillin, 2002). Ce système senseur peut être l'induction d'une voie de régulation rétrograde induite par un dysfonctionnement mitochondrial au cours du développement. Des analyses transcriptomiques sur les mutants RNAi des complexes III et IV (Cristina *et al.*, 2009) montrent en effet une réorientation métabolique (induction des voies anapleurotiques (cycle du glyoxylate et oxydation des acides gras par exemple), une induction de la glycolyse (permettant d'augmenter la synthèse d'ATP) et une induction des gènes de réponse au stress. Cette réorientation métabolique semble jouer directement sur l'augmentation de longévité de ces mutants puisque la perte de fonction d'une des enzymes du cycle du glyoxylate (GEI-7) associée au mutant RNAi *cyc-1*, supprime l'accroissement de longévité (Cristina *et al.*, 2009). Il a aussi été montré que les ROS avaient un rôle dans cet accroissement de la longévité. En effet le mutant RNAi-*isp-1* (sous unité du complexe III), présente une longévité augmentée, une faible élévation des ROS. Par ailleurs, l'augmentation de longévité du mutant *isp-1(qm150)*, est supprimée par la perte de fonction d'HIF1 (Hypoxia-Inducible Factor1)(Lee *et al.*, 2010). Enfin, un traitement au paraquat à faible concentration (qui génère des ions superoxyde dans la mitochondrie) augmente la longévité d'une souche sauvage et cette augmentation de longévité requiert HIF1. L'hypothèse proposée est donc qu'une perturbation de la fonction respiratoire conduit à une augmentation des ROS, eux mêmes activateurs d'HIF1 et que cette activation a pour conséquence une augmentation de la longévité (Hwang and Lee, 2011; Lee *et al.*, 2010). Un autre acteur de la réponse à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire est le facteur de transcription CEH-23 (Walter *et al.*, 2011). Celui ci est requis chez les mutants RNAi *isp-1* et chez le double mutant *isp-1; ctb-1* pour l'accroissement de longévité mais pas pour les autres phénotypes (défauts de développement et de fertilité). De plus, la surexpression de CEH23 dans une souche sauvage est également responsable d'une augmentation de longévité sans modification du développement (Walter *et al.*, 2011). L'ensemble de ces données est résumé dans la figure 22.

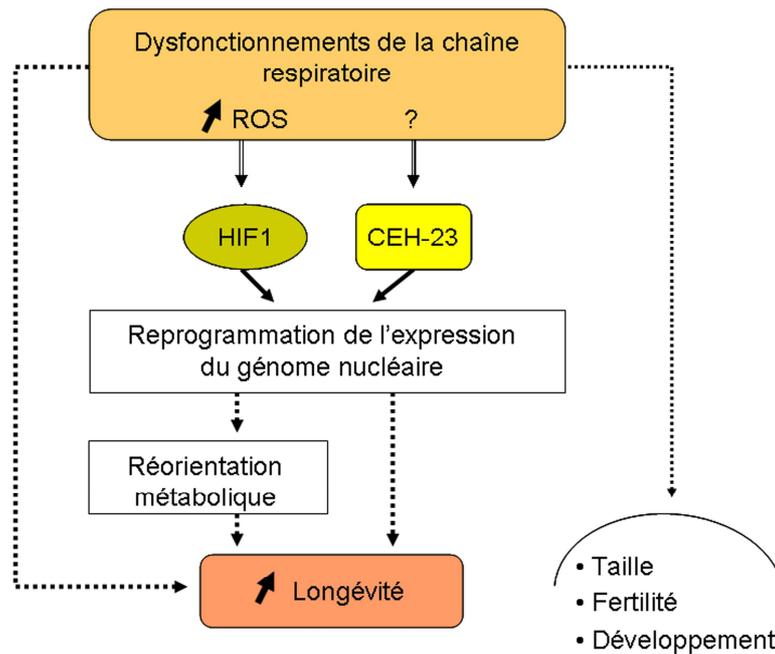


Figure 22: Résumé de la régulation de la longévité de *C. elegans* par des dysfonctionnements de la chaîne respiratoire

Des perturbations de la chaîne respiratoire (RNAi ou mutation) sont responsables d'un accroissement de la longévité de *C. elegans* ainsi que d'une diminution de la taille, d'un retard de développement et d'une baisse de la fertilité. Il a été montré que la régulation de la longévité pouvait passer par le facteur HIF1, induit par une augmentation des ROS, ou le facteur CEH-23. Dans les deux cas il y a une reprogrammation de l'expression du génome nucléaire. Des analyses transcriptomiques ont montré que cette reprogrammation conduisait à une réorientation métabolique, qui, au moins pour l'induction du cycle du glyoxylate, est responsable d'une augmentation de la longévité. Les autres phénotypes observés chez les mutants de la chaîne respiratoire ne sont pas régulés par HIF1 et CEH-23. On ne peut exclure d'autres voies de régulation impliquées dans ce contrôle de la longévité. D'après (Tóth *et al.*, 2008; Dillin, 2002; Walter *et al.*, 2011; Cristina *et al.*, 2009)

Il a aussi été observé que l'augmentation de longévité du mutant RNAi-*atp3* dépend de la voie d'induction de l'autophagie et qu'elle est supprimée en contexte mutant *atg-18* ce qui indique que, comme chez *S. cerevisiae* (§B.1.4), il existe chez *C. elegans* une interconnexion entre la réponse à un dysfonctionnement mitochondrial et l'autophagie (Tóth *et al.*, 2008).

2.2 Des dysfonctionnements de la fonction respiratoire conduisent à une augmentation de la longévité chez *Drosophila melanogaster*

De la même manière que chez *C. elegans*, des approches par RNAi contre des sous unités des complexes respiratoires ont été effectuée chez la drosophile (Copeland *et al.*, 2009; Rera *et al.*, 2010). Les résultats de la première (Copeland *et al.*, 2009) montrent une augmentation de la longévité lorsqu'il y a perturbation de la chaîne respiratoire au niveau des complexes I (CG9172 et CG9762), III (CG17856), IV (CG18809) et V (CG5389). Contrairement à ce qui est observé chez *C. elegans*, ces mutants ne présentent pas de modification de leur niveau d'ATP ni de leur

fertilité et l'augmentation de longévité est observée indifféremment du stade (larvaire ou adulte) où il est effectué (Copeland *et al.*, 2009). A l'inverse, la seconde étude (Rera *et al.*, 2010) montre ne montre aucun accroissement de la longévité mais un retard de développement, une augmentation de la mortalité au cours du développement, une diminution de la fécondité et de la fertilité et une diminution le poids de l'individu. Les RNAi étaient dirigés contre d'autres sous unités des complexes de la chaîne respiratoire (complexe : CG9140, complexe III : CG4769, Complexe IV : CG11015). Les résultats chez la drosophile sont moins probants que chez *C. elegans*, cependant on peut penser que l'accroissement de longévité dépende de la nature et de l'intensité du dysfonctionnement mitochondrial. Certaines perturbations au niveau de la chaîne respiratoire peuvent avoir un phénotype délétère et être également responsable d'une diminution de la longévité, c'est le cas pour les dysfonctionnements du complexe II, et ce chez la drosophile comme chez *C. elegans*. L'hypothèse proposée est que ces perturbations conduisent à un stress oxydatif délétère pour la survie de l'individu (Huang and Lemire, 2009; Walker *et al.*, 2006).

E. Objectifs de la thèse

Les études précédemment citées montrent qu'il existe une relation de causalité qui semble conservée entre le fonctionnement de la chaîne respiratoire et la longévité, et que ce lien pourrait se faire par l'induction d'une régulation rétrograde en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial. Les études des régulations rétrogrades mitochondriales et chloroplastiques montrent qu'en réponse à un dysfonctionnement de ces organites, essentiels dans les processus énergétiques cellulaires, il y a une reprogrammation de l'expression génique. Cette reprogrammation n'est pas seulement une réponse directe au dysfonctionnement, mais du fait de la diversité des cibles (fonction énergétique, métabolisme central ou alternatif, réponse au stress,...), elle participe à la plasticité adaptative des espèces en réponse à l'environnement. La réorientation métabolique, souvent observé en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial, pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la longévité.

Le champignon filamenteux *Podospora anserina* constitue un système modèle simple pour l'étude de ces mécanismes, du fait des nombreuses études déjà réalisées sur le phénomène de sénescence chez cet organisme et de l'identification d'un gène cible d'une régulation rétrograde mitochondriale : le gène *aox*.

Par une recherche de supprimeurs de la très grande longévité d'un mutant du complexe IV (*cox5::ble*), des mutations dans 2 gènes codant 2 facteurs de transcription RSE2 et RSE3 ont été identifiées. Ces mutations, qui confère un état « activé » aux facteurs de transcription RSE2 et RSE3, sont responsables d'une expression constitutive de l'AOX mais aussi d'enzymes clés de la néoglucogenèse et elles sont responsable de la restauration du processus de sénescence chez le mutant *cox5::ble*. Les relations d'interaction entre RSE2 et RSE3 ont été explorées par la construction de souches perte de fonction et de souches surexprimant ces facteurs de transcription. Pour aller plus loin dans la compréhension de la réponse nucléaire dépendant de RSE2 et RSE3 à un dysfonctionnement mitochondrial, j'ai réalisé des analyses transcriptomiques et métabolomiques. Ces analyses ont permis d'identifier un groupe de régulation et d'avoir une vision plus globale de la réorientation métabolique en condition de dysfonctionnement mitochondrial. J'ai aussi utilisé la puissance du crible « supprimeur de *cox5::ble* » utilisé pour saturer ce crible en mutations gain de fonction dans les gènes *rse2* et *rse3*. Cette analyse a montré que RSE2 et RSE3 sont les régulateurs majeurs de l'oxydase alternative. Elle a aussi permis de proposer l'existence de régions régulatrices dans les séquences protéiques de RSE2

et RSE3. Ces régions ont été validées par des approches de mutagenèse dirigée. L'ensemble de ces résultats devraient apporter de nouvelles données dans la compréhension de la régulation rétrograde mitochondriale en réponse à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire ainsi que dans son implication dans le contrôle de la longévité chez *P. anserina*, et peut être chez d'autres organismes puisque ce mécanisme semble conservé.

Enfin, lors de la saturation du crible j'ai isolé un mutant d'une des protéines composant le médiateur (un complexe protéique conservé, découvert chez la levure et coactivateur de la transcription). Ce mutant est responsable d'un phénotype très pigmenté ainsi que d'une diminution significative de la longévité de *P. anserina*.

Résultats

A. Les facteurs de transcription RSE2 et RSE3 activent l'expression de l'oxydase alternative, des enzymes de la néoglucogenèse et contrôlent la longévité de *Podospora anserina*

1. Article 1 - Identification des facteurs de transcription RSE2 et RSE3

1.1 Résumé des résultats obtenus

Comme il a été dit précédemment, des mutants perte de fonction des complexes respiratoires III et IV (*cyc1-1* et *cox5::ble* respectivement), viables grâce à l'induction de l'AOX, sont responsables d'une importante modification phénotypique de *P. anserina* : mycélium grêle, croissance lente, stérilité femelle et accroissement spectaculaire de la longévité (Dufour *et al.*, 2000; Sellem *et al.*, 2007). Il a aussi été montré qu'une surexpression de l'AOX chez ces mutants était responsable d'une amélioration du phénotype mycélien et d'une restauration du processus de sénescence (Lorin *et al.*, 2001).

Dans le but de mieux comprendre le(s) lien(s) entre l'expression de l'AOX, un rôle potentiel d'une régulation rétrograde en réponse à un dysfonctionnement respiratoire et le contrôle de la longévité chez *P. anserina*, des révertants des mutants respiratoires *cyc1-1* et *cox5::ble* ont été isolés (ils présentent une amélioration de la croissance végétative et une restauration du processus de sénescence). Trois mutations ont ainsi été identifiées dans les séquences codant deux facteurs de transcription appartenant à la famille des Zn_2Cys_6 . Ces facteurs de transcription, décrits uniquement chez les champignons ascomycètes, appartiennent à la famille plus large des Zn protéines. Cette famille, dont le prototype est le facteur de transcription Gal4p chez *S. cerevisiae*, interagit avec l'ADN en reconnaissant en monomère, homodimère ou hétérodimère un motif spécifique dans la séquence amont des gènes cibles. Leur région C-terminale contient généralement le domaine d'activation (MacPherson *et al.*, 2006 pour revue).

- les mutations *rse2-1*, *rse2-2* et *rse3-1* sont des gain de fonction pour l'expression de l'AOX :

Une approche par clonage positionnel et gènes candidats à partir des révertants a permis d'identifier les gènes *rse2* et *rse3*. Ces gènes codent deux protéines zinc-cluster. Les allèles *rse2-1*, *rse2-2* et *rse3-1* sont tous responsables d'une amélioration significative de la croissance

mycélienne des mutants *cyc1-1* et *cox5::ble* ainsi que d'une restauration du processus de sénescence chez ces souches (RSE pour Restaurateur de SEnescence) (Figure 1 de l'article, page 78 et Tableau 1 de l'article, page 77).

Ces allèles sont des gain de fonction pour l'expression du gène codant l'oxydase alternative et sont responsables de son expression constitutive à un niveau comparable au niveau induit dans les souches *cyc1-1* et *cox5::ble* (Figure 2 et 3 de l'article, pages 78 et 79).

- RSE2 et RSE3 régulent l'expression des gènes *aox*, *fbp* et *pck* en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial

Les gènes *rse2* et *rse3* ont des orthologues chez *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* ainsi que chez la levure *S. cerevisiae*. Les orthologues de *N. crassa* codent les facteurs de transcription AOD2 et AOD5, tous deux nécessaires à l'expression du gène *aox* (Chae, Nargang, *et al.*, 2007), les orthologues d'*A. nidulans* codent les facteurs de transcription AcuK et AcuM, activateurs de l'expression des gènes codant les enzymes clés de la néoglucogenèse : FBP (fructose-1,6-biphosphatase) et PCK (phosphoeolpyruvate carboxykinase) (Hynes *et al.*, 2007). Les orthologues de *S. cerevisiae* codent les facteurs de transcription Rds2p et Ert1p également impliqués dans la régulation des gènes *fbp* et *pck* (Turcotte *et al.*, 2010; Soontorngun *et al.*, 2007). J'ai montré que la régulation des gènes *aox*, *fbp* et *pck* par RSE2 et RSE3 est conservée chez *P. anserina*. En effet, les allèles *rse2-1* et *rse3-1*, qui induisent constitutivement l'expression du gène *aox* sont aussi responsables de l'activation transcriptionnelle des gènes *fbp* et *pck*. Cette activation est également observée en présence d'un inhibiteur de la chaîne respiratoire (antimycine A), qui est une condition physiologique d'induction du gène *aox* par les facteurs de transcription RSE2 et RSE3 (Figure 5 de l'article, page 81). Il existe donc une corégulation des gènes *aox*, *fbp* et *pck* en condition de dysfonctionnement respiratoire. Ces résultats semblent montrer que la régulation de ces trois gènes, *aox*, *fbp* et *pck*, se fait, au moins en partie, *via* les facteurs de transcription RSE2 et RSE3.

- RSE2 et RSE3 sont tous deux nécessaires à l'expression de l'AOX

La construction des souches $\Delta rse2$ et $\Delta rse3$ a permis de montrer que comme chez *N. crassa*, les facteurs de transcription RSE2 et RSE3 sont tous deux nécessaires à l'induction de l'AOX. En effet, la délétion de l'un d'entre eux, quelque soit l'état allélique du second, est létale lorsqu'elle est associée à *cyc1-1* ou *cox5::ble* (Tableau 2)

souches	Phénotype associé à <i>cyc1-1</i> ou <i>cox5::ble</i>	Expression de l'AOX
Sauvage	Mycélium grêle, stérilité femelle, très grande longévité	Inductible
<i>rse2-1</i> <i>rse3-1</i>	Mycélium dense, stérilité femelle, restauration du processus de sénescence	Constitutive
$\Delta rse2$ $\Delta rse3$	Létalité	Non inductible
$\Delta rse2 rse3-1$ <i>rse2-1</i> $\Delta rse3$	Létalité	Non inductible

Tableau 2: Phénotype des différentes combinaisons alléliques des gènes *rse2* et *rse3* associées au mutant *cyc1-1* ou *cox5::ble*.

Dans une souche sauvage, le gène *aox* n'est induit qu'en condition de dysfonctionnement respiratoire, il est constitutivement exprimé dans les souches gain de fonction *rse2-1* et *rse3-1*. Il ne peut être induit en l'absence d'une des protéines codées par les gènes *rse2* et *rse3*.

Ces résultats, associés aux expériences de retard sur gel effectuées chez *N. crassa* qui montrent que les deux doigts de zinc des facteurs AOD2 et AOD5 sont nécessaires pour lier une séquence spécifique CGG(N)₇CGG appelée AIM (Aox Induction Motif) conservée dans la région 5' régulatrice du gène *aox* chez les ascomycètes (Chae, Lin, *et al.*, 2007; Chae, Nargang, *et al.*, 2007), appuient l'hypothèse d'un mode d'action hétérodimérique de ces facteurs de transcription. Ce mode d'action hétérodimérique serait conservé chez les champignons filamenteux et pourrait expliquer que les orthologues AcuM et AcuK soient tous deux nécessaires à la régulation des enzymes FBP et PCK (Hynes *et al.*, 2007).

- RSE2 et RSE3 contrôlent la longévité de *P. anserina* même en l'absence de dysfonctionnement mitochondrial

En contexte de dysfonctionnement respiratoire (mutants *cyc1-1* ou *cox5::ble*), les allèles *rse2-1*, *rse2-2* et *rse3-1* sont responsables de la restauration du processus de sénescence. De façon surprenante, ces allèles sont aussi responsables d'une diminution de la longévité de *P. anserina* en absence de dysfonctionnement respiratoire. Inversement, les allèles $\Delta rse2$ et $\Delta rse3$ sont, eux, responsables d'une augmentation de la longévité de *P. anserina* (Figure 6 de l'article, page 82). Cette régulation de la longévité de *P. anserina* par RSE2 et RSE3 ne se fait pas *via* la régulation de l'AOX. En effet, une souche surexprimant le gène *aox*, la souche *gpd-aox* (gène *aox* sous le contrôle d'un promoteur fort) ou une souche délétée pour ce gène (Δaox) ne

présente pas de modification de longévité (Figure 6 de l'article, page 82). La modification de longévité des souches *rse2-1* et *rse3-1*, $\Delta rse2$ et $\Delta rse3$ dépend donc d'autres cibles (directes ou indirectes) de ces facteurs de transcription.

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'un article :

"Mutations in Two Zinc Cluster Proteins Activate Alternative Respiratory and Gluconeogenic Pathways and Restore Senescence in Long-lived Respiratory Mutants of *Podospora anserina*"
Genetics, 2009, 182(1):69-78

1.2 Article 1 : "Mutations in Two Zinc Cluster Proteins Activate Alternative Respiratory and Gluconeogenic Pathways and Restore Senescence in Long-lived Respiratory Mutants of *Podospora anserina*"

Mutations in Two Zinc Cluster Proteins Activate Alternative Respiratory and Gluconeogenic Pathways and Restore Senescence in Long-lived Respiratory Mutants of *Podospora anserina*

Carole H. Sellem^{*,1}, Elodie Bovier^{*,†,1}, Séverine Lorin^{*,†,2} and Annie Sainsard-Chanet^{*,†,3}

^{*}CNRS, Centre de Génétique Moléculaire, UPR 2167, Gif-sur-Yvette F-91198, France and
[†]Université Paris-Sud, Orsay F-91405, France

Genetics. 2009 May;182(1):69-78

Manuscript received January 16, 2009
Accepted for publication February 23, 2009

ABSTRACT

In *P. anserina*, inactivation of the respiratory chain results in a spectacular lifespan extension. This inactivation is accompanied by the induction of the alternative oxidase. Although the functional value of this response is evident, the mechanism behind it is far from understood. By screening suppressors able to reduce the lifespan extension of cytochrome deficient mutants, we identified mutations in two Zinc cluster proteins RSE2 and RSE3, which are conserved in other ascomycetes. These mutations led to the overexpression of the genes encoding the alternative oxidase and the gluconeogenic enzymes, fructose-1, 6 biphosphatase and pyruvate carboxykinase. Both RSE2 and RSE3 are required for the expression of these genes. We also show that even in absence of a respiratory deficiency, the wild type RSE2 and RSE3 transcription factors are involved in lifespan control and that their inactivation retards aging. These data are discussed with respect to aging and the regulation of the alternative oxidase and carbon metabolism.

Supporting information is available online at

<http://www.genetics.org/cgi/content/full/genetics.109.100834/DC1>.

¹These authors contributed equally to this work.

²Present address: INSERM, U756, Châtenay-Malabry, F-92290, France.

³Corresponding author: Centre de Génétique Moléculaire du CNRS,
Allée de la Terrasse, Gif-sur-Yvette F-91198, France.
E-mail:annie.sainsard@cgm.cnrs-gif.fr

The filamentous fungus *Podospora anserina* is a model organism in which lifespan control has been extensively investigated. As in the other organisms studied, it was clear from the beginning that lifespan is controlled by numerous external and genetic factors. Among these factors, mitochondrial activity seems to play a determinant role (reviewed in LORIN *et al.* 2006). But whereas mutations that compromise mitochondrial function in humans (reviewed in WALLACE 2005) and mice (KUJOTH *et al.* 2007, 2005, 2006; TRIFUNOVIC *et al.* 2005, 2004) lead to a variety of pathological lifespan-shortening diseases, in *P. anserina* these lead to a spectacular life extension. In this organism, all wild type cultures exhibit an unavoidable arrest of vegetative growth that is systematically associated with large rearrangements in the mitochondrial DNA (mtDNA). Inactivation of the respiratory complex III (mutant *cyc1-1*) (SELLEM *et al.* 2007) or complex IV (mutant *cox5::ble*) (DUF0UR *et al.* 2000) results in an extreme increase of lifespan (more than 30-fold) associated with a reduction in ROS levels and an increased stability of the mtDNA. Also, in *C. elegans*, a class of mutants (*Mit* mutants) with disruptions (either genetic or mediated by RNA interference) in genes essential for the mitochondrial electron transport chain (ETC) are long-lived (reviewed in REA 2005, 2007). How can loss of genes critical for mitochondrial activity result in life extension in *P. anserina* and *C. elegans*? One characteristic shared by *C. elegans Mit* mutants and *P. anserina* respiratory mutants is the activation of compensatory metabolic pathways in an attempt to supplement deficits due to their altered ETC function. Such pathways could produce “less toxicity” by reducing mitochondrial ROS production or activating antioxidant mechanisms for example. In *P. anserina*, inactivation of genes essential for complex III or IV activity leads to the induction of an alternative oxidase (AOX). This oxidase catalyzes the transfer of electrons directly from the ubiquinol pool to oxygen and does not couple this transfer to proton translocation (AFFOURTIT *et al.* 2002, MOORE *et al.* 2002). Some phenotypic traits

of the *cox5::ble* and *cyc1-1* mutants can be attributed to these characteristics. They display a reduction in growth rate and loss of fertility (two processes with high energy consumption) and a reduction in ROS production. In these mutants, only complex I is conserved as a site of proton gradient formation for ATP synthesis leading to a reduction of the energy yield associated with respiration. Furthermore the alternative oxidase is generally considered having an antioxidant role, preventing over-reduction of the mitochondrial quinone pool known to favor superoxide production (MAXWELL *et al.* 1999). The reasons for the spectacular long-lived phenotype of these mutants are more puzzling. One hypothesis proposed that the reduction of ROS and/or ATP production might be sufficient to account for lifespan extension. Another invoked a mitochondria to nucleus signaling pathway (LORIN *et al.* 2001). The AOX is encoded in the nucleus and imported into mitochondria. In fungi, AOX expression has been extensively studied in *Neurospora crassa* and *P. anserina*. The protein is not detectable under standard growth conditions. Its expression is strongly induced by mutations or chemicals that inhibit the ETC and significant regulation occurs at the level of transcription (AFFOURTIT *et al.* 2002; CHAE *et al.* 2007a, 2007b; DESCHENEAU *et al.* 2005; LAMBOWITZ *et al.* 1989; LI *et al.* 1996; LORIN *et al.* 2001; TANTON *et al.* 2003). In the same way in higher plants, AOX expression depends on developmental signals, stress conditions and inhibition of the respiratory chain (reviewed in CLIFTON *et al.* 2006). This nuclear-encoded enzyme is produced in response to respiratory chain dysfunction, which implies the existence of one or more pathways for transducing signals from the mitochondria to the nucleus to control the expression of the gene. The mechanisms by which mitochondria communicate with nucleus have been referred to as retrograde signaling (BUTOW and AVADHANI 2004; LIU and BUTOW 2006; RHOADS and SUBBAIAH 2007). In *Saccharomyces cerevisiae*, one retrograde pathway (the RTG pathway) has been extensively studied and shown to be an

important determinant for lifespan (KIRCHMAN *et al.* 1999).

In an attempt to clarify the relationships between AOX expression, retrograde signaling and lifespan in *P. anserina*, we isolated fast-growing, short-lived revertants from the long-lived respiratory *cox5::ble* and *cyc1-1* deficient mutants. We identified three mutations localized in two Zinc cluster transcription factors that control AOX expression both in *P. anserina* (this work) and *N. crassa* (CHAE *et al.* 2007b). Interestingly, these two mutations activate the expression of the alternative oxidase and also of gluconeogenic genes.

MATERIALS AND METHODS

***P. anserina* strains, growth conditions, transformation and genetic analysis:** Except strain *TS24* used for positional cloning, all the strains used in this study were derived from the *s* wild type strain (RIZET 1952). The *gpd-aox* strain contains a transgenic copy of the *aox* gene under the control of the strong constitutive *P. anserina* *gpd* promoter associated with a hygromycin resistance cassette (LORIN *et al.* 2001). The long-lived *cox5::ble* and *cyc1-1* strains have been described in DUFOUR *et al.* (2000) and SELLEM *et al.* (2007) respectively. The Δ *PaKu70* strain inactivated for the *KU70* mammalian ortholog, provides an efficient method to produce deletion mutants (EL-KHOURY *et al.* 2008). The *TS24* strain used for positional cloning was obtained from the progeny of crosses between the *P. anserina* *S* (RIZET 1952) and the *P. comata* *T* (ATCC 36713) strains. *TS24* exhibits the wild type, fertile *P. anserina* phenotype and retained, on chromosome III, at least 12 simple sequence repeat markers (SSR) characteristic of the *P. comata* strain. The germination medium contains ground corn meal (50g/l), agar (12.5g/l) and ammonium acetate (4.4g/l). Minimal standard medium (M2) contains 1% dextrin as carbon source (ESSER 1974). When necessary, hygromycin, phleomycin, nourseothricin and antimycin A were added to the medium at 75 μ g/ml, 10 μ g/ml, 50 μ g/ml and 10 μ g/ml respectively. Lifespans were measured on M2 medium in 30ml/30cm race tubes at 27°C in the dark, on three to five subcultures derived from two to five independent spores for a given genotype. Transformation experiments were conducted as previously described (BERGES and BARREAU 1989) on protoplasts obtained by incubation with 40 mg/ml glucanex (Laffort).

Genetic methods for *P. anserina* have been described (ESSER 1974). For the construction of double mutant strains, the appropriate single mutants of opposite mating types were crossed. The Δ *rse2* Δ *rse3* strain carrying the two alleles inactivated by the same cassette conferring nourseothricin resistance and the double mutant strain *rse2-1 rse3-1* carrying the 2 alleles that both confer the ability to grow without delay on a medium supplemented with antimycin A were identified by analysing the segregation of the cassette or the resistance to antimycin A in isolated asci.

SSR markers and localisation of gene *rse2*: Twelve single sequence repeats (SSR) markers overlapping 2 Mb on the long arm of chromosome III were retained for the linkage analysis because they were found polymorphic between the *P. anserina* and *P. comata* isolates. The characteristics of these markers are presented in Supplemental Material Table1. To position gene *rse2*, crosses between (*TS24*) *rse2*⁺(*comata* origin) and (*s*) *rse2-1* (*anserina* origin) parental strains provided us with a collection of monocaryotic spores for which linkage analysis was performed. The nature of the *rse2* allele was determined by growth on antimycin A, the nature of the twelve SSR markers was identified by PCR analysis. PCR amplifications were performed on rapid mini-preparations of DNA extracted from mycelium grown 24h after the germination of each spore.

Nucleic acid and protein manipulation: Southern blots were done using total DNA extracted by the minipreparation method (LECELLIER and SILAR 1994). Western blot analysis of the AOX protein was performed on isolated mitochondria as previously described (SELLEM *et al.* 2007). Immunochimistry was performed with an anti-AOX mouse monoclonal antibody generated against the AOX of *Sauromatum guttatum* (ELTHON *et al.* 1989). Additionally, blots were reprobated with an anti- β ATPase rabbit antibody (a gift from J. Velours) as a standardization control. The bound antibodies were detected using an enhanced chemiluminescence detection system (Pierce Supersignal West picchemiluminescent substrate).

Quantitative RT-PCR: Total RNA from various strains grown for 48h on standard medium (1% dextrin) covered with cellophane disc, was extracted using the RNeasy plant kit (Qiagen) with RLT buffer and DNAase I according to manufacturer's instructions except that mycelium was broken with glass beads in a Fastprep apparatus (40 sec, intensity 6.5). For qPCR

analysis, 2 µg of RNA was reverse transcribed and random primed with oligo (dT)₂₀ using the Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) according to the instructions of the supplier. Pairs of primers for PCR were developed for the *aox* (5'-GATGTCTGTTCCCATCGAC-3'/5'GAGGAAATGTTGGCAGTGGT-3'), *gpd* (5'-CACCGA GGACGAGATTGTCT-3'/5'-TCAGGGAGATACCAGC CTTG-3'), *fbp* (5'-CACCGGTGACTTTACGCTCC-3'/5'-GGAGAATTGGAGGGCGTGGC-3') and *pck* (5'-ACCAAACCATCCGACATGC-3'/5'-GGTCTTGTTA CTGTGTTGA-3') genes to give products of about 40-50bp in length. One primer of each set was designed across an exon/intron boundary to avoid amplification of any contaminating genomic DNA. The product of the first-strand cDNA reaction was diluted ten-fold before real-time PCR analysis. Amplifications were performed in duplicate in a LightCycler (Roche) using the LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I kit (Roche) with no-reverse transcriptase controls to estimate the contribution of contaminating DNA. Amplification efficiencies were measured for each primer pair and every set of amplification reactions. For each strain, the levels of *aox*, *fbp* and *pck* transcripts were normalized using the *gpd* transcript level which was used as a standard because its expression remained stable in all the strains and conditions examined. At least three independent experiments were performed from one to three different RNA preparations. For a given strain and a given gene, results are expressed as the level of expression of this gene in this strain relative to the level of expression of this gene in the wild type strain.

Cloning of *rse2* and *rse3* genes: PCR amplifications of the *rse2* and *rse3* mutated genes were performed with pairs of primers 5'-GGCTCGAGGACGGGAACCGGAAG-3' /5'G GGGAC TAGTCGAAGGGGCGGCATTGTG-3' and 5'CCCCA TGGCCGAGTAAATACTGGATTTTG-3' /5'-CCCAG ATCTGCCGCGTGACCAGGACC-3' and cloned in the *XhoI/Spe1* sites of the PBCHygro vector (SILAR 1995) or in the *NcoI/BglIII* sites of the pAPI508 vector (EL-KHOURY *et al.* 2008) respectively. Transformation of wild type protoplasts resulted in hygromycin or nourseothricin resistant strains purified through genetic crosses with the wild type. Resistance to hygromycin and nourseothricin co-segregated with the improved growth phenotype (associated with *rse2-1* or *rse3-1* alleles) on medium containing antimycin A.

Inactivation of *rse2* and *rse3* genes: Seven hundred nucleotides of the 5' and 200 nucleotides of the 3' region of the *rse3* wild type gene were amplified with the primers 5'-GAAAGCGGCCGCGTGACCAG GACCAAG-3' /5'-GGGCCATGGCTCTATCTGGACGGGACGGC-3' and 5'-GGGAGATCTGGAGTGCAGTTATACTTGG-3' /5'-CACGCGGCCGCTTTCGCCTCTTCTTTAAAC-3' respectively as described in EL-KHOURY *et al.* 2008 and cloned in the *BglIII/NcoI* sites of the pAPI508 vector containing the nourseothricin resistance cassette. Protoplasts of the $\Delta KU70$ strain were transformed and nourseothricin resistant transformants were isolated and purified through genetic cross with the wild type. Nourseothricin resistance co-segregated with antimycin sensitivity. Following the same strategy, *rse2* was inactivated using the primers 5'-AGGAAAAAGCGGCCGCTGGGAAAGGGGAAGGAAG-3' /5'-GAAGATCGCAGTCGTTCCGGCTT TGT-3' for the 5' region and 5'-AGGAAGCTTGGT GGGAGCATCGACAAA-3' / 5'-AGGAAAAAGCG GCCGCAATCCGCCTCTCGGTCTT-3' for the 3' region and cloned in the *HindIII/BglIII* sites of the pAPI508 vector.

Protein alignments: Protein alignments were carried out using muscle3.6 (<http://www.drive5.com/muscle/>). The results were inspected by eye and the percentage of identity was obtained using BioEdit7.0.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

RESULTS

Mutations in two genes *rse2* and *rse3* restore senescence in a *cox5::ble* and *cyc1-1* context: Inactivation of complex III (*cyc1-1*) or complex IV (*cox5::ble*) leads to a spectacular increase in lifespan associated with several phenotypic defects: alteration in germinating mycelium, poorly coloured thin growing mycelium, reduction of the growth rate and female sterility (DUF0UR *et al.* 2000, SELLEM *et al.* 2007). To shed light on the parameters responsible for these different characteristics and especially the long-lived phenotype, we used a genetic approach and searched for suppressor mutations able to improve the phenotype of these mutants.

TABLE 1. Phenotypic properties of the *cox5::ble* and *cyc1-1* respiratory deficient mutants and of the *rse2-1* and *rse3-1* suppressors

	WT	<i>cox5::ble</i>	<i>cyc1-1</i>	<i>cox5::ble</i> <i>rse2-1</i>	<i>cyc1-1</i> <i>rse3-1</i>	<i>rse2-1</i>	<i>rse3-1</i>
Mycelium aspect	aerial	thin	thin	thin	aerial	aerial	aerial
Ascospore coloration	black	black	colourless ^a	black	colourless ^a	black	black
Germination rate ^b	+++	+	+	++	++	+++	+++
Growth rate ^c (cm day ⁻¹)	0.60 ±0.03	0.21 ±0.01	0.21 ±0.01	0.48 ±0.10	0.48 ±0.11	0.50 ±0.04	0.51 ±0.04
Female fertility	fertile	sterile	sterile	sterile	sterile	fertile	fertile

^a This phenotype exhibits a variable penetrance (Sellem *et al.*, 2007)

^b germination rate is given as +++ for wild type thalli ; + for tiny and slow growing thalli and ++ for thalli of intermediate phenotype on germination medium

^c Growth rates are mean values ± standard deviation

Spontaneous revertants were obtained independently as sectors of aerial fast growing mycelium from *cox5::ble* and *cyc1-1* cultures. Most of the cultures grown in race tubes led to such sectors. Two of them, sectors 2 and 3 were isolated from *cox5::ble* and *cyc1-1* cultures respectively. They were crossed with wild type in order to test the genetic basis of the reversion and to obtain pure revertant strains (the sectors probably contain a mixture of mutant and revertant nuclei). The presence of extragenic suppressors was revealed by the recovery in the progeny of these crosses of three types of ascospores: ascospores that germinate to give sparse mycelium as the original mutant, ascospores that germinate normally and ascospores displaying an intermediate germinating mycelium. These gave rise to a growing mycelium similar to that of the initial sectors. Genetic analysis of the two pure revertant strains revealed that the two suppressor mutations named *rse2-1* and *rse3-1* were unlinked to the original *cox5::ble* and *cyc1-1* mutations.

The characteristics of the revertants and of the strains carrying the suppressor mutations dissociated from the initial respiratory mutation are shown on Figure 1 and Table 1. As shown in Table 1, the *rse2-1* or *rse3-1* mutations do not restore a wild type phenotype to the *cox5::ble* and *cyc1-1* mutants; however they considerably

improve the germination of the ascospores (germinating thalli of *cox5::ble rse2-1* and *cyc1-1 rse3-1* appeared more dense and grew better than germinating thalli of *cox5::ble* and *cyc1-1*), they improve the aspect of the growing mycelium that appears more aerial and coloured and they restore a growth rate of 0.48 ± 0.1 cm/day compared with 0.21 ± 0.01 cm/day for the mutants.

In contrast they do not restore female fertility to the *cox5::ble* and *cyc1-1* mutants or normal ascospore pigmentation to *cyc1-1*. As *P. anserina* crosses yield dicaryotic ascospores, the recovery of heterocaryotic *cox5::ble rse2-1 /cox5::ble rse2+* and *cyc1-1 rse3-1 /cyc1-1 rse3+* ascospores allowed us to test the dominance/recessivity of the suppressors and to conclude that they are dominant with respect to the improved phenotypes.

Interestingly, analysis of longevity of the *cox5::ble rse2-1* and *cyc1-1 rse3-1* strains revealed that the two suppressors also restored the senescence phenomenon associated with mtDNA instability (hence the name *rse* for Restorator of SENescence). Longevity of the revertants was about 90 days (60 ± 10 cm) compared to about 17 days (11.3 ± 1.6 cm) for the wild type strain and more than 2 years (> 300 cm) for the *cox5::ble* and *cyc1-1* mutants. An analysis of the mtDNA content of the senescent revertant cultures revealed a systematic accumulation of mtDNA rearrangements and a strong reduction of

intact mitochondrial DNA as in senescent wild type cultures (data not shown).

Recombination between *cox5::ble* and *rse3-1* on one hand and between *cyc1-1* and *rse2-1* on the other hand revealed that the two mutations *rse2-1* and *rse3-1* indifferently are both able to suppress complex III and complex IV loss-of-function mutations.

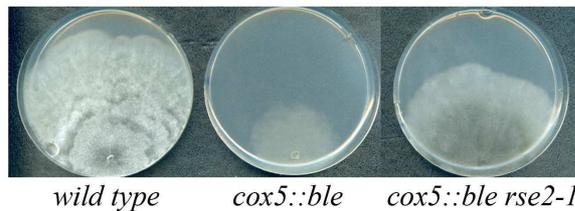


FIGURE 1. — Mycelium aspect of the wild type, *cox5::ble* and *cox5::ble rse2-1* strains. Petri plates of M2 medium were inoculated with an explant of each strain and incubated for 10 days at 27°C. The wild type strain exhibits a dense, aerial, colored mycelium and is fast-growing whereas the *cox5::ble* mutant exhibits a thin, poorly colored and is slow growing. The *cox5::ble rse2-1* revertant exhibits an intermediate phenotype

The two mutations *rse2-1* and *rse3-1* are responsible for the constitutive expression of the alternative oxidase: We previously showed that constitutive overexpression of the alternative oxidase in the *cox5::ble* and *cyc1-1* mutants improved mycelium aspect, growth rate and also restored the senescence process. This was demonstrated by expressing a fusion (*gpd-aox*) between the *gpd* promoter and the *aox* coding sequence in these mutants (LORIN *et al.* 2001; SELLEM *et al.* 2007). Because of the similarities between the effects of the *gpd-aox* transgene and the *rse2-1/ rse3-1* mutations, the level of expression of the alternative oxidase was examined in strains carrying these mutations. The *gpd-aox* strain was used as a control. The Western blot analysis shown on Figure 2 corroborated previous results (LORIN *et al.* 2001) showing that AOX is undetectable in the wild type grown under standard conditions whereas it is induced in long-lived respiratory mutants (*cyc1-1* for example in the Figure) and very strongly expressed in the *gpd-aox* strain. Our results show that it is also expressed in the strains carrying the *rse2-1* or *rse3-1* mutations. However, the AOX level of

expression seems to be lower in *rse2-1* and *rse3-1* strains than in strains carrying the *gpd-aox* transgene and this is independent of the *cyc1-1* or *cox5::ble* mutations.

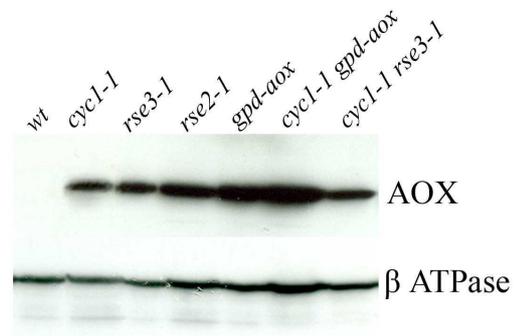


FIGURE 2. — Western blot analysis of the AOX protein. Mitochondria (10 µg of mitochondrial protein) were extracted from the wild type (WT), *cyc1-1*, *rse3-1*, *rse2-1*, *gpd-aox*, *cyc1-1 gpd-aox*, *cyc1-1 rse3-1* strains and loaded on a 12% SDS-PAGE acrylamid gel. The AOX was revealed with a mouse antisera against *Sauromatum guttatum* AOX provided by T. Elthon. As an internal control, the blot was reprobed with a rabbit anti β-ATPase provided by J. Velours.

These results were confirmed by (q)RT-PCR experiments shown in Figure 3. Expression levels of the *aox* gene were normalized to the *gpd* gene and the *aox* mRNA copy number was given a value of 1 in the wild type strain. *Aox* mRNA copy number increased about 20 fold in *rse3-1*, 40 fold in *rse2-1* and 60- to 80 fold in *gpd-aox* strains. In the *cox5::ble* (and *cyc1-1*) strain, *aox* transcript levels were increased about 20-fold compared to wild type. These levels were increased about 3-fold in presence of *rse2-1* or *rse3-1* mutations and about 5-fold in presence of the *gpd-aox* transgene.

Altogether, these results are in accordance with data obtained by Western blot. The expression of the *aox* gene in *rse2-1* and *rse3-1* strains was also confirmed by testing the ability of these strains to grow onto a medium containing antimycin A. Antimycin A inhibits the complex III resulting in an induction of the alternative oxidase in wild type cells, thereby allowing them to grow in presence of the drug after a delay (necessary for the induction) whereas the *gpd-aox*, *rse2-1* and

rse3-1 strains grow without delay on this medium because of the constitutive expression of AOX. Heterocaryotic strains *rse2-1/rse2+* and *rse3-1/rse3+* also grow without a delay on medium containing antimycin A, confirming the dominance of these mutations. The double mutant *rse2-1 rse3-1* was constructed by genetic cross and it exhibited a phenotype very similar to that of each simple mutant indicating the absence of a synergistic effect between the two mutations.

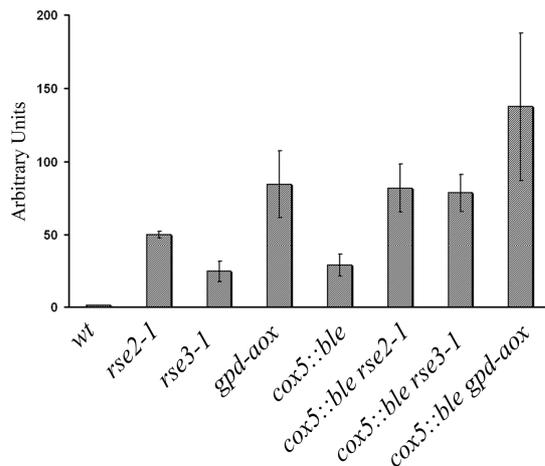


FIGURE 3. — Relative abundance of *aox* transcripts. For each strain, the levels of *aox* and *gpd* transcripts were determined by quantitative RT-PCR performed from 1 to 3 different RNA preparations (1 to 3 replicates). For each experiment, the level of *aox* transcripts was normalized using the level of *gpd* transcripts as a reference. The diagram shows in each strain, the level of *aox* transcripts relative to the level of *aox* transcripts in the wild type. The error bars correspond to standard error.

The *rse2* and *rse3* genes encode two Zinc-cluster transcription factors: Since the strains carrying the wild type *rse2+* and *rse3+* or the mutated *rse2-1* and *rse3-1* alleles differ by their growth with or without delay on a medium containing antimycin A, the segregation of these alleles can be easily analyzed through crosses. Genetic analysis showed that *rse2* and *rse3* were localized on chromosomes III and IV respectively, near *ura5* for *rse2*, near *sir2* for *rse3*.

Taking advantage of the genome sequence of *P. anserina* (ESPAGNE *et al.* 2008) and of the

characterisation on each of the seven chromosomes, of marker polymorphisms between the geographic strains *P. anserina* and *P. comata*, segregation analysis of gene *rse2* with the markers linked to gene *ura5* was undertaken. A total of 198 monocaryotic spores derived from the cross *rse2-1 (anserina)* X *rse2+(comata)* were generated. The *rse2-1/rse2+* segregation was determined by growth on antimycin A and each spore was genotyped for 12 simple sequence repeat markers covering 2 Mb. All the polymorphic markers and the *rse2* gene segregated in a 1:1 ratio. Of the 12 molecular markers, two always remained in parental association with the *rse2* alleles. They covered about 250 Kb containing 67 predicted open reading frames (ORFs), 3 of them encoded putative transcription factors of which one (Pa_3_6340) was a zinc-cluster transcription factor containing the canonical motif CX2CX6CX5-12CX2CX6-8C. Genomic DNA was prepared from the *rse2-1* and the wild type strains. PCR products that contained ORF Pa_3_6340 were generated and sequenced. The *rse2-1* gene was shown to contain a single T to G substitution changing a Tyr into an Asp codon at position 300. Sequence comparisons revealed that this protein is homologous to the recently reported AOD2 protein from *N. crassa*, which acts synergistically with another transcription factor of the zinc-cluster family, AOD5 (CHAE *et al.* 2007b). This prompted us to search by BLAST the homolog of this protein in the *P. anserina* genome. The protein most related to AOD5 was Pa_4_8760 (54.7% identity) located on chromosome IV to which the *rse3-1* mutation was genetically assigned. Sequencing of the corresponding gene in the wild type and the *rse3-1* strains revealed a G to T substitution changing a Gly into a Val codon at position 642 in the *rse3-1* strain. The structure of the two genes and the position of the mutations are shown in Figure 4.

To confirm that the Y300D mutation in the *rse2-1* strain and the G642V mutation in the *rse3-1* strain are responsible for the constitutive expression of the AOX and the restoration of senescence in strains deficient for the III/IV respiratory complex, we took

advantage of the dominance of the 2 suppressor mutations. The mutated genes were cloned in plasmids pBCHygro (SILAR *et al.* 1995) and pAPI508 (EL-KHOURY *et al.* 2008) and introduced into a wild type strain by transformation. Hygromycin and nourseothricin resistant transformants resulting from a non-homologous integration were selected for each transformation. These $rse2^+(rse2^{Y300D})$ and $rse3^+(rse3^{G642V})$ transformants, which carried an endogenous wild type allele and an ectopic mutant allele were crossed with the $cox5::ble$ strain and the progeny was analyzed. This revealed that the introduction of the Y300D mutation in the $rse2$ gene, or of the G642V mutation in the $rse3$ gene is sufficient to cause the overexpression of the alternative oxidase and restore senescence in a $cox5::ble$ context.

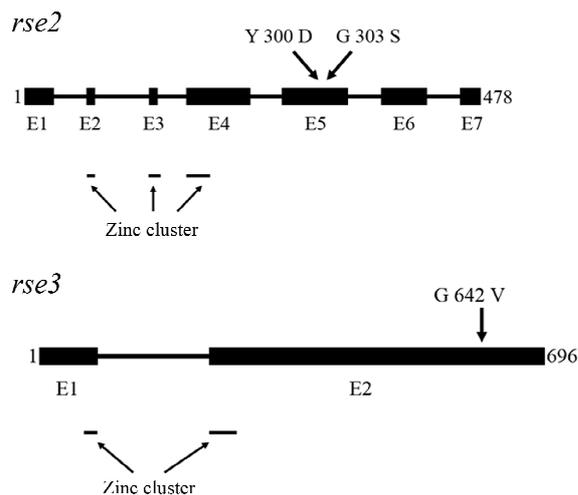


FIGURE 4. — Structure of the $rse2$ and $rse3$ genes. The amino acids mutated in the $rse2$ gene (upper part) and the $rse3$ gene (lower part), are indicated. Exons (E) are shown as solid boxes and introns as solid lines. The first and the last amino acids of each protein are indicated. Sites within exons that contain a motif identified as a possible zinc cluster are indicated by thin lines below the genes.

The $rse2$ and $rse3$ genes of eight other revertants derived from $cox5::ble$ or $cyc1-1$ cultures were sequenced. Seven revertants carried wild type alleles for $rse2$ and $rse3$. The other had a single base pair substitution changing a Glycine to Serine at position 303 in the $rse2$ gene, only 3 amino acids from the $rse2^{Y300D}$ mutation (Figure 4).

The $rse2$ and $rse3$ gene products also activate the expression of gluconeogenic genes:

Data base searches showed that the $rse2$ and $rse3$ gene products are conserved in several ascomycetes (see Supplemental Material Figures 1 and 2). RSE2 is homologous to AOD2 from *N. crassa* (53% identity), AcuM from *Aspergillus nidulans* (34% identity) and RDS2 from *S. cerevisiae* (28.8% identity). Recently it was shown that RDS2 in *S. cerevisiae* (SOONTORNGUN *et al.* 2007), AcuM and AcuK in *A. nidulans* (HYNES *et al.* 2007) act as activators of the expression of genes encoding central enzymes in the gluconeogenic pathway, in particular phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK) and fructose-1, 6-biphosphatase (FBPase). PCK catalyzes an early step in gluconeogenesis and converts oxaloacetate to phosphoenolpyruvate, FBPase catalyzes the final step in hexose monophosphate formation by dephosphorylating fructose-1,6-biphosphate to yield fructose-6-phosphate. This prompted us to examine the expression of the genes encoding these two enzymes in the $rse2^{Y300D}$, $rse3^{G642V}$ and the wild type strains by quantitative RT-PCR. BLAST program was used to search the *P. anserina* predicted protein sequences with the *S. cerevisiae* PCK and FBPase proteins as query. Two CDS potentially encoding PCK (Pa_4_3160) and FBPase (Pa_4_9360) were detected. RNA was isolated from the $rse2^{Y300D}$, $rse3^{G642V}$ and wild type strains grown on standard medium (containing 1% dextrin) and the abundance of transcript levels of the genes encoding Pa_4_9360 (*Papck*) and Pa_4_9360 (*Pafbp*) were examined in the three strains. The expression of the *aox* gene was determined in parallel and the level of transcripts expressed from the constitutive *gpd* gene was used as a reference control. Figure 5 shows the expression level of each gene in a given strain compared to the expression level of the *gpd* gene in the wild type strain. These experiments corroborate the results shown in Figure 3, an increase of *aox* mRNAs levels of about ~ 40-fold in $rse2^{Y300D}$ and ~ 20-fold in $rse3^{G642V}$. They also reveal that the expression of *Papck* and *Pafbp* is greatly increased in the mutant stains: ~

20-fold for *Papck* in *rse2*^{Y300D} and ~ 5-fold in *rse3*^{G642V}, ~ 5-fold for *Pafbp* in *rse2*^{Y300D} and ~ 2-fold in *rse3*^{G642V}.

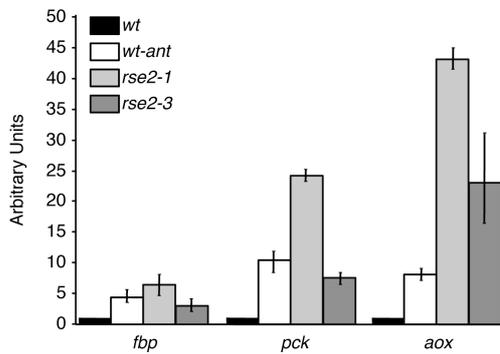


FIGURE 5. — Quantification of *fbp*, *pck* and *aox* expression. Total RNA was extracted from cultures of the wild type strain grown under normal conditions (wt: black) or in the presence of antimycin A (10µg/mL) (wt-ant:white), and from cultures of the *rse2*^{Y300D} (grey light) and *rse3*^{G642V} (grey dark) mutants grown under normal conditions. qPCR reactions were performed on cDNA to quantify the level of *fbp*, *pck* and *aox*, *gpd* transcripts in each strain. Experiments were performed at least three times. As in Figure 3, in each experiment, the level of *fbp*, *pck* and *aox* transcripts was normalized using the level of *gpd* transcripts as reference. The diagram shows the level of *fbp*, *pck* and *aox* transcripts in the different strains and culture conditions relative to the level of these transcripts in the wild type. The error bars correspond to standard error.

To be sure that the activation of the *Papck* and *Pafbp* genes in the mutant strains does not result from a qualitative change of the properties of the mutated transcription factors, the expression level of the two genes and of the *aox* gene was also tested in a wild type strain grown onto antimycin A. As shown in the Figure 5, the expression of the *aox*, *Papck* and *Pafbp* genes is increased about 5-fold, 10-fold, 3-fold respectively in the wild type strain grown on antimycin A indicating that *Papck* and *Pafbp* are indeed co-regulated with the *aox* gene.

Genes *rse2* and *rse3* are non-essential in respiratory competent strains grown in standard conditions but are both essential for the induction of the alternative oxidase: In order to determine the function

of these transcription factors more clearly, strains deleted for the *rse2* and *rse3* genes were constructed by replacement with a cassette conferring resistance to nourseothricin (EL-KHOURY *et al.* 2008). The correct replacement was verified by Southern blot analysis (data not shown). Using *rse2::nat* ($\Delta rse2$) and *rse3::nat* ($\Delta rse3$) as parents in genetic crosses, we subsequently isolated the double-deleted strain $\Delta rse2 \Delta rse3$. All these strains were viable and displayed no impairment of growth, pigmentation and fertility on standard synthetic M2 medium. These results demonstrate that *rse2* and *rse3* are non-essential genes in respiratory competent strains grown in standard conditions. However none of these strains, including the simple $\Delta rse2$ and $\Delta rse3$ deletions are able to induce the *aox* gene. This was demonstrated in two ways. First, all the deleted strains are unable to grow on a medium containing antimycin A even after the lag necessary for the wild type to begin growth. Second, the association by genetic cross of mutations *cox5::ble* and $\Delta rse2$ or *cox5::ble* and $\Delta rse3$ led to “lethal” spores that were unable to germinate. These results indicate that the inactivation of either of the two genes, *rse2* and *rse3*, prevents the expression of the *aox* gene under inducing conditions and therefore that the two proteins RSE2 and RSE3 are both required for *aox* induction. Finally, we constructed the $\Delta rse2 rse3$ ^{G642V} and *rse2*^{Y300D} $\Delta rse3$ strains in which the deleted allele of one gene is associated with the mutated allele of the other. None of these strains were able to grow on a medium containing antimycin A, demonstrating that even when one of the two proteins is present in its mutant form, the other protein is still required to induce the alternative oxidase.

The RSE2 and RSE3 transcription factors are involved in lifespan control even in the absence of mitochondrial dysfunction: As stated above, the modification of the transcriptional pattern in the *rse2*^{Y300D} and *rse3*^{G642V} strains reveal that the suppressor mutations modify the expression or the activity of the RSE2 and RSE3 products. We

examined the abundance of *rse2* and *rse3* transcript levels in the wild type, *rse2^{Y300D}* and *rse3^{G642V}* strains by quantitative RT-PCR experiments. Transcripts of both genes were virtually unchanged in the three strains (data not shown). This strongly supports the hypothesis of a modification of the activity and not of the abundance of the RSE2 and RSE3 products in the *rse2^{Y300D}* and *rse3^{G642V}* strains. In a respiratory deficient context, *cox5::ble* or *cyc1-1*, the *rse2^{Y300D}* and *rse3^{G642V}* mutations are responsible for a severe reduction of the lifespan. We investigated whether in respiratory competent strains, the *rse2^{Y300D}* and *rse3^{G642V}* mutations and the resulting gene expression modifications also lead to a modified lifespan.

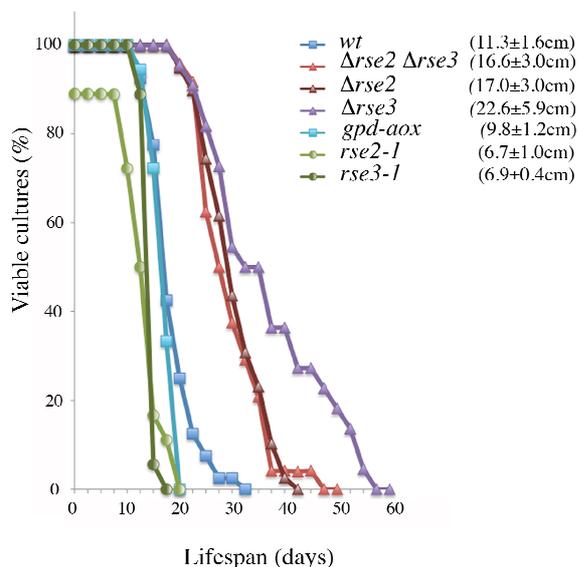


FIGURE 6. — Lifespan analyses. For each genotype at least 18 sub-cultures (representing the two mating types) were grown on M2 medium at 27°C in race tubes. Data were plotted as cumulative survival in time using Kaplan-Meier estimates. In parentheses is the mean longevity in centimeters.

As shown in Figure 6, the *rse2^{Y300D}* and *rse3^{G642V}* strains displayed a decreased lifespan compared to wild type (about 12 days versus 17 days) whereas deletion of either of the *rse* genes results in an increased lifespan (about 30 days for *Δrse2* and 35 days for *Δrse3*). These results suggest that the RSE products contribute to shortening lifespan and that the gene expression modifications due to the *rse2^{Y300D}* and *rse3^{G642V}* mutations

accentuate this effect. It is very unlikely that the decreased lifespan of the *rse2^{Y300D}* and *rse3^{G642V}* strains results from the overexpression of the AOX, since as previously shown (LORIN *et al.* 2001 and Figure 6), we confirmed that the *gpd-aox* strain carrying the *gpd-aox* transgene displays the same longevity as the wild type.

DISCUSSION

Characterization of mutations in two conserved Zinc-cluster proteins that control the expression of the alternative oxidase and gluconeogenic genes: We report in this study the characterization of mutations in two transcription factor genes, *rse2* and *rse3* (for Restorator of Senescence), each encoding a Zinc-cluster protein controlling the induction of the alternative oxidase and the expression of gluconeogenic genes. These mutations were selected in a screen for suppressors of the long-lived respiratory mutants *cox5::ble* and *cyc1-1*. They partially suppress the detrimental effects and restore the senescence process in these mutants. The three mutations reported here are located in two different genes, several others suppressors non allelic to *rse2* and *rse3* were obtained but have not yet been studied in detail. Thus, the screen seems not exhaustive. The two gene products contain Zn(2) Cys(6) binuclear cluster DNA-binding domains. Database searches and recent published data reveal that these genes are present in other ascomycetes. RSE2 correspond to AOD2 from *N. crassa*, AcuM from *A. nidulans* and RDS2 from *S. cerevisiae*. RSE3 correspond to AOD5 from *N. crassa* and AcuK from *A. nidulans*. The organization of the homologous genes is remarkably conserved between the three fungi. It is interesting to note that the introns that interrupt the Zinc finger motif in *rse2* and *rse3* are also conserved in genes *aod2* and *acuM* and in genes *aod5* and *acuK* (data not shown).

We show here that the mutations *rse2^{Y300D}* and *rse3^{G642V}* confer higher levels of mRNA of the alternative oxidase and gluconeogenic genes compared to the wild type strain and are dominant, strongly

suggesting that they correspond to gain-of-function mutations. The mutations *rse2*^{Y300D} and *rse2*^{G303S} are not located in a conserved predicted functional domain (SCHJERLING and HOLMBERG 1996); however, their clustering pinpoints one region in RSE2 with potential significance for the function of this transcription factor and indicates that the integrity of this region is necessary to keep the transcription factor in a less active form. Both the affected residues Y300 and G303 are conserved in *aod2* (*N. crassa*), *RDS2* (*S. cerevisiae*) and *acuK* (*A. nidulans*) and lie in a region of the protein very conserved between the four organisms. In the same way, the G642 of *rse3* is conserved in *aod5* (*N. crassa*) and *acuK* (*A. nidulans*) and belongs to a short region very conserved between the three organisms (see Supplemental Material, Figures 1 and 2). The question how these single amino acid substitutions modulate the activity of the RSE2 and RSE3 transcription factors is unresolved. Though the levels of *rse2* and *rse3* mRNA in the mutant strains are unchanged, hypotheses such as an increased protein stability conferred by the mutations cannot be excluded. However some other interesting possibilities can be proposed. For instance the *rse3*^{G642V} mutation in the C-ter of RSE3 could make the transactivation domain more accessible or increase its intrinsic activation properties (SCHJERLING and HOLMBERG 1996). The mutations *rse2*^{Y300D} and *rse2*^{G303S} in RSE2 could reveal a latent activation domain or could change an interaction with an inhibitory protein. The hypothesis in which conserved motifs in Zinc cluster proteins could have an inhibitory role is based on several studies in *S. cerevisiae* showing that deletion of these motifs render these proteins constitutively active (MACPHERSON *et al.* 2006).

Regarding the relationships between RSE2 and RSE3, the observation that the $\Delta rse2 rse3^+$, $\Delta rse3 rse2^+$, $\Delta rse2 rse3$ ^{G642V} and *rse2*^{Y300D} $\Delta rse3$ strains are unable to induce the alternative oxidase, unambiguously demonstrate that the two proteins are required for this induction even when one of them is present in a mutated form. This result agrees with observations reported in *N.*

crassa in which neither the *aod2* nor *aod5* mutants are able to induce AOX (DESCHENEAU *et al.* 2005) and in *A. nidulans* in which neither the *acuK* nor *acuM* mutants are able to induce PCK (HYNES *et al.* 2007). In *N. crassa*, electrophoretic mobility shift assays showed that AOD2 and AOD5 act synergistically to bind an alternative oxidase induction motif (AIM) present in the promoter of the *aod-1* gene which encodes the alternative oxidase. These data support the hypothesis that the two proteins interact with each other (CHAE *et al.* 2007b). The AIM motif consists of one pair of CGG repeats separated by 7bp and is essential for the inducible expression of the *aod-1* gene. It is present in the upstream sequence of the *aox* gene of *P. anserina* and other Sordariales (CHAE *et al.* 2007a), however, it is absent from the 900 bp upstream coding sequence of the *Papck* and *Pafb* genes whose expression is also controlled by RSE2 and RSE3. Several explanations can be proposed for this observation. One possibility is that there is a cryptic motif that we have not spotted in the promoter of these genes. Another one is that activation of these genes requires other factors interacting with RSE2 and RSE3 and determining DNA-binding specificity. A third hypothesis is that RSE2 and RSE3 are indirect activators of the gluconeogenic genes by regulating the production of an inducing molecule.

RSE2, RSE3 and the control of longevity in

***P. anserina*:** We have previously shown that in *P. anserina*, inactivation of genes encoding components of the cytochrome pathway leads to the induction of the alternative oxidase and to a spectacular increase of lifespan (DUFOUR *et al.* 2000; SELLEM *et al.* 2007). We have also shown that the introduction of the *gpd-aox* transgene in the long-lived *cox5::ble* and *cyc1-1* leads to an increased expression of the alternative oxidase in comparison with the induced expression of this enzyme in the non-transgenic *cox5::ble* mutant and to the restoration of senescence associated with an improvement of the phenotype (LORIN *et al.* 2001; SELLEM *et al.* 2007). The very great longevity of the cytochrome deficient mutants

could be due to the reduction of ROS and/or ATP production resulting from the induction and the use of the alternative oxidase. However in addition to the induction of the alternative oxidase, other changes in nuclear expression could cause the very great longevity of these mutants (DUFOUR *et al.* 2000; LORIN *et al.* 2001). In this study we show that in response to a block of the cytochrome pathway, there is induction of the *aox* gene but also of the *pck* and *fbp* gluconeogenic genes and that this induction is under the control of the two Zinc cluster proteins RSE2 and RSE3. These results therefore question the reasons of the very great lifespan of the respiratory deficient mutants of *P. anserina* and the role of the different pathways that are induced in the control of longevity. The observation that gain-of-function mutations of genes *rse2* and *rse3* lead to a decreased lifespan whereas deletion of these genes, in particular *rse3*, results in an increased lifespan, strongly suggests that some (direct or indirect) targets of the RSE2 and RSE3 proteins contribute to shortening lifespan. Though the *aox* gene is greatly induced in the *rse2*^{Y300D} and *rse3*^{G642V} mutants, it seems unlikely that the reduction of lifespan of these mutants results from this induction since the *gpd-aox* transgenic strains show no reduction of lifespan. The *aox* gene is therefore probably not involved in the control of lifespan in a respiratory competent context. In contrast, in a *cox5::ble* or *cyc1-1* context, we found a correlation between the mycelium phenotype, longevity and AOX levels. Increased *aox* gene expression leads to a reduction in life extension and counters the detrimental phenotypic effects due to the *cox5::ble* or *cyc1-1* mutations. This positive correlation between the AOX amount and the improvement of the phenotype of *cox5::ble* and *cyc1-1* mutants supports our proposed mechanism, that increasing the electron flow through the alternative pathway is accompanied by an increased oxygen consumption and an increased ATP formation at the first coupling site (LORIN *et al.* 2001, 2006).

Many studies have demonstrated the central role for metabolic regulation in the

aging process. While it is impossible to highlight all such studies, it is worth noting that a simple reduction of available glucose in the media results in life extension in *P. anserina* (MAAS *et al.* 2004) and yeast (LIN *et al.* 2000). More relevant to our discussion is that in *S. cerevisiae*, a metabolic shift from glucose metabolism and fermentation toward respiration plays a central part in this life extension (LIN *et al.* 2002). In the same way, caloric restriction induces a metabolic reprogramming characterized by a transcriptional shift toward energy metabolism and up-regulation of gluconeogenesis in mouse skeletal muscle (LEE *et al.* 1999). Recently, transcript profiling data from *C. elegans* dauer larvae and long-lived *daf-2* mutant adults revealed increased expression of genes encoding gluconeogenic enzymes (MCELWEE *et al.* 2006). It is therefore possible that gluconeogenesis is a conserved pathway in the control of longevity in a wide spectrum of organisms.

A block of the respiratory cytochrome pathway is expected to lead to a wide spectrum of transcriptional changes in the cell. Our study shows that the two Zinc cluster proteins RSE2 and RSE3 are involved in this transcriptional response by activating the expression of the genes encoding the alternative oxidase and major enzymes of gluconeogenesis. In order to identify the other genes whose expression is regulated by RSE2 and RSE3, transcriptome profiling of the strains carrying the different alleles (wild type, gain of function, deleted) of genes *rse2* and *rse3* will be conducted. This should allow to gain insights into the physiological role of these Zinc cluster proteins and especially their role in the cellular response to a defect in the respiratory function. We are convinced that these data will clarify the parameters involved in the control of lifespan in *P. anserina*.

Acknowledgments

We thank Eric Migeon for help with the positional localisation of gene *rse2*, Antoine Boivin and Ryad El-Khoury for help with the DNA constructions for deletion of genes *rse2* and *rse3* and useful discussion. We acknowledge Chris Herbert, Marc Maas and Linda Sperling for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Association Française contre les Myopathies and grants from the European Community's Sixth Framework programme (LSHM-CT-200-512020).

LITERATURE CITED

- AFFOURTIT, C., M. S. ALBURY, P. G. CRICHTON, and A. L. MOORE, 2002 Exploring the molecular nature of alternative oxidase regulation and catalysis. *FEBS Lett* **510**: 121-126.
- BERGES, T., and C. BARREAU, 1989 Heat shock at an elevated temperature improves transformation efficiency of protoplasts from *Podospora anserina*. *J Gen Microbiol* **135**: 601-604.
- BUTOW, R. A., and N. G. AVADHANI, 2004 Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell* **14**: 1-15.
- CHAE, M. S., C. C. LIN, K. E. KESSLER, C. E. NARGANG, L. L. TANTON, L. B. HAHN, and F. E. NARGANG, 2007a Identification of an alternative oxidase induction motif in the promoter region of the *aod-1* gene in *Neurospora crassa*. *Genetics* **175**: 1597-1606.
- CHAE, M. S., C. E. NARGANG, I. A. CLEARY, C. C. LIN, A. T. TODD, and F. E. NARGANG, 2007b Two zinc-cluster transcription factors control induction of alternative oxidase in *Neurospora crassa*. *Genetics* **177**: 1997-2006.
- CLIFTON, R., A. H. MILLAR, and J. WHELAN, 2006 Alternative oxidases in *Arabidopsis*: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochim Et Biophys Acta* **1757**: 730-741.
- DESCHENEAU, A. T., I. A. CLEARY, and F. E. NARGANG, 2005 Genetic evidence for a regulatory pathway controlling alternative oxidase production in *Neurospora crassa*. *Genetics* **169**: 123-135.
- DUFOUR, E., J. BOULKAY, V. RINCHEVAL, and A. SAINARD-CHANET. 2000. A causal link between respiration and senescence in *Podospora anserina*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 4138-4143.
- EL-KHOURY, R., C. H. SELLEM, E. COPPIN, A. BOIVIN, M. F. P. M. MAAS, R. DEBUCHY, and A. SAINARD-CHANET, 2008 Gene deletion and allelic replacement in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Curr Genet* **53**: 249-258.
- ELTHON, T. E., R. L. NICKELS, and L. MCINTOSH, 1989 Monoclonal Antibodies to the Alternative Oxidase of Higher Plant Mitochondria. *Plant Physiol* **89**: 1311-1317.
- ESPAGNE, E., O. LEPINET, F. MALAGNAC, C. DA SILVA, O. JAILLON, B. M. PORCEL A. COULOUX, J.-M. AURY, B. SEGURENS, J. POULAIN, V. ANTHOUARD, S. GROSSETETE, H. KHALILI, E. COPPIN, M. DEQUARD-CHABLAT, M. PICARD, V. CONTAMINE, S. ARNAISE, A. BOURDAIS, V. BERTEAUX-LECELLIER, D. GAUTHERET, R. P. DE VRIES, E. BATTAGLIA, P. M. COUTINHO, E. G. DANCHIN, B. HENRISSAT, R. EL-KHOURY, A. SAINARD-CHANET, A. BOIVIN, B. PINAN-LUCARRE, C. H. SELLEM, R. DEBUCHY, P. WINCKLER, J. WEISSENBACH, and P. SILAR, 2008 The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserina*. *Genome Biol* **9**: R77.
- ESSER, K. 1974 *Podospora anserina*. In: King RC (ed) Handbook of genetics. Plenum Press, New York, pp 531-551.
- HYNES, M. J., E. SZEWCZYK, S. L. MYRRAY, Y. SUZUKI, M. A. DAVIS, and H. M. SEALY-LEWIS, 2007 Transcriptional control of gluconeogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **176**: 139-150.
- KIRCHMAN, P. A., S. KIM, C. Y. LAI, and S. M. JAZWINSKI, 1999 Interorganelle signaling is a determinant of longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **152**: 179-190.
- KUJOTH, G. C., P. C. BRADSHAW, S. HAROON, and T. A. PROLLA, 2007 The role of mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *PLoS Genet* **3**: e24.
- KUJOTH, G. C., A. HIONA, T. D. PUGH, S. SOMEYA, K. PANZER, S. E. WOHLGEMUTH, T. HOFER, A. Y. SEO, R. SULLIVAN, W. A. JOBLING, J. D. MORROW, H. VAN REMMEN, J. M. SEDIVY, T. YAMASOBA, M. TANOKURA, R. WEINDRUCH, C. LEEUWENBURGH, and T. A. PROLLA, 2005 Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science (New York, N.Y.)* **309**: 481-484.
- KUJOTH, G. C., C. LEEUWENBURGH, and T. A. PROLLA, 2006 Mitochondrial DNA mutations and apoptosis in mammalian aging. *Cancer Res* **66**: 7386-7389.
- LAMBOWITZ, A. M., J. R. SABOURIN, H. BERTRAND, R. NICKELS, and L. MCINTOSH, 1989 Immunological identification of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Mol Cell Biol* **9**: 1362-1364.
- LECELLIER, G., and P. SILAR, 1994 Rapid methods for nucleic acids extraction from Petri dish-grown mycelia. *Curr Genet* **25**: 122-123.
- LEE, C. K., R. G. KLOPP, R. WEINDRUCH, and T. A. PROLLA, 1999 Gene expression profile of aging

and its retardation by caloric restriction. *Science* (New York, N.Y.) **285**: 1390-1393.

LIN, S. J., M. KAEBERLEIN, A. A. ANDALIS, L. A. STURTZ, P. A. DEFOSSEZ, V. C. CULOTTA, G. R. FINK, and L. GUARENTE, 2002 Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* **418**: 344-348.

LIN, S. J., P. A. DEFOSSEZ, and L. GUARENTE, 2000 Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* (New York, N.Y.) **289**: 2126-2128.

LI, Q., R. G. RITZEL, L. L. MCLEAN, L. MCINTOSH, T. KO, H. BERTRAND, F.E. NARGANG, 1996 Cloning and analysis of the alternative oxidase gene of *Neurospora crassa*. *Genetics* **142**: 129-140.

LIU, Z., and R. A. BUTOW. 2006. Mitochondrial retrograde signaling. *Annu Rev Genet* **40**: 159-185.

LORIN, S., E. DUFOUR, J. BOULAY, O. BEGEL, S. MARSY, and A. SAINSARD-CHANET, 2001 Overexpression of the alternative oxidase restores senescence and fertility in a long-lived respiration-deficient mutant of *Podospora anserina*. *Mol Microbiol* **42**: 1259-1267.

LORIN, S., E. DUFOUR and A. SAINSARD-CHANET, 2006. Mitochondrial metabolism and aging in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Biochim Et Biophys Acta* **1757**: 604-610.

MAAS, M. F. P. M., H. J. DE BOER, A. J. M. DEBETS, and R. F. HOEKSTRA, 2004 The mitochondrial plasmid pAL2-1 reduces calorie restriction mediated life span extension in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genet Biol* **41**: 865-871.

MACPHERSON, S., M. LAROCHELLE, and B. TURCOTTE, 2006 A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol Mole Biol Rev* **70**: 583-604.

MAXWELL, D. P., Y. WANG, and L. MCINTOSH, 1999 The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 8271-8276.

MCELWEE, J. J., E. SCHUSTER, E. BLANC, J. THORNTON, and D. GEMS, 2006 Diapause-associated metabolic traits reiterated in long-lived *daf-2* mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* **127**: 458-472.

MOORE, A. L., M. S. ALBURY, P. G. CRICHTON, and C. AFFOURTIT, 2002 Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger? *Trends in Plant Sci* **7**: 478-481.

REA, S. L., 2005 Metabolism in the *Caenorhabditis elegans* Mit mutants. *Exp Gerontol* **40**: 841-849.

REA, S. L., N. VENTURA, and T. E. JOHNSON, 2007 Relationship between mitochondrial electron transport chain dysfunction, development, and life extension in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol* **5**: e259.

RHOADS, D. M., and C. C. SUBBAIAH, 2007 Mitochondrial retrograde regulation in plants. *Mitochondrion* **7**: 177-194.

RIZET G., 1952 Les phénomènes de barrage chez *Podospora anserina*. I. Analyse génétique des barrages entres les souches S et s. *Rev Cytol Biol Veget* **13**: 51-92

SCHJERLING, P., and S. HOLMBERG, 1996 Comparative amino acid sequence analysis of the C6 zinc cluster family of transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res* **24**: 4599-4607.

SELLEM, C. H., S. MARSY, A. BOIVIN, C. LEMAIRE, and A. SAINSARD-CHANET, 2007 A mutation in the gene encoding cytochrome c1 leads to a decreased ROS content and to a long-lived phenotype in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genet Biol* **44**: 648-658.

SILAR P., 1995 Two new easy to use vectors for transformation. *Fungal Genet Newsl* **42**: 73.

SOONTORNGUN, N., M. LAROCHELLE, S. DROUIN, F. ROBERT, and B. TURCOTTE, 2007 Regulation of gluconeogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by activator and repressor functions of Rds2. *Mol Cell Biol* **27**: 7895-7905.

TANTON, L. L., C. E. NARGANG, K. E. KESSLER, Q. LI, and F. E. NARGANG, 2003 Alternative oxidase expression in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **39**: 176-190.

TRIFUNOVIC, A., A. HANSSON, A. WREDENBERG, A. T. ROVIO, E. DUFOUR, I. KHVOROSTOV, J. N. SPELBRINK, R. WIBOM, H. T. JACOBS, and N. G. LARSSON, 2005 Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 17993-17998.

TRIFUNOVIC, A., A. WREDENBERG M. FALKENBERG, J. N. SPELBRINK, A. T. ROVIO,, C. E. BRUDER, M. BOHLOOLY, S. GIDLOF, A. OLDFORS, R. WIBOM, J. TORNELL, H. T. JACOBS, and N. G. LARSSON, 2004 Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* **429**: 417-423.

WALLACE, D. C., 2005 A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* **39**: 359-407.

Supplementary data

PaRSE2	1	MTATEAME ----- RTAGNET ----- KDIK-SESNTKPKDHHAPSTDDQQOHN
NcAOD2	1	MTGTEATE ----- KPNGKEAGT ----- KDITKSGSDTKPKDHHPTPADDDVQ ---
AnACUM	1	MTEKNTQPGSAPDQYAGNGTA ENTGPSKTLDGNKVGSRVDS MAK ENAQKS P ASKTESTPA
ScRDS2	1	----- MSAN SG -----
PaRSE2	42	QHNHHTTHQTPKRRKVS HACLYCRRSHMTCDLARPCTRCV KRNIGHLCHDEPRDQGSN
NcAOD2	42	----- KAPKRRKVNHACLYCRRSHMTCDLERPCTRCI KRNIGHLCHDEPRD TESR
AnACUM	61	G ----- TRTS PKRRKVNHACVYCRRSHMTCDSERPCTRCI KRNIGHLCHDEPR EP- SK
ScRDS2	7	----- VKRASKAFKTC LCFRSHVVCDKORPCSRV KRDIAHL CRE D --- DI AVP
PaRSE2	102	KSKSVVAPSTTHGSASQSDI LGRGNMNQTAADALRLASFDGSLSSGT GSAA S AAF D AAAAL
NcAOD2	93	KAKSVLGTSTLHDS ES OPDI GRN---- ATDKAMRPPGFDSGMGNG ----- SVQVAGAAAV
AnACUM	114	RSRSEHEQSAADDEEGSSNNEYSK ----- VHAMPRKVDIQDAAGQO ----- ILADGSLGL
ScRDS2	54	NEMPSQHESSPN D NNIQ K YAN MAHTGIP SDYQNE P VNKSG ST YG -- EEL S PKLD SSL VN
PaRSE2	162	GQSNQLOLVOP T AVSGL OG STLGSSMNQFP ----- HEV
NcAOD2	144	GRGAPLOLVOPG SV AGIQ AS ALGGSMNQFAG L PDS W LTTQ N HYHDM HN FHPNY M V - APEV
AnACUM	163	TPSS - MNAVOPG MS SS TS SONMSVTSQ COL LGYN D WVGGQ Q OFQ DM BFHP S YMFNA PE V
ScRDS2	112	DTTSLLLPQOPV F VSE NV GS EF SS LN EF LS MT EN----- PL
PaRSE2	195	SSEFDVLLN Y L RAN IFED P VAA P DGO ----- NOGRPTIP G FP ----- S
NcAOD2	203	TNEFILL NE FLS AG LL EE S AF MS D DHGL IL GAN Q SAV S GLPN AN NG N N ASS N KG NS SS
AnACUM	222	TNEVILL G DF L S N SL D D GS IF Q N ED MORM YS D PT L IN S MA V L G ----- GP
ScRDS2	148	LTQ TS LS SS S AS N V H LE NG S Q TT Q SP L E YQ ND NRR DE I G V AR Q EN R ----- SP
PaRSE2	232	SSMP PP ATAP G AS L P T AN SE Q S AAV SK----- DKTR - EY YL Q AA D PS GN AD AD DR M L O
NcAOD2	263	TSGML PP SAT OG T S M L P SS DOT T A IG KP AST N LD N ARD AY YL Q AA D PS GN D T PE ER M OR
AnACUM	268	STSL Q Q S OT L Q P Q S Q ON Q GD T AS G AT IGN --- DK ARE TY Y M T A AD P AG S D P PE ER M NK
ScRDS2	196	TIM SG SS NS S IS K G D K Q D Q E K E S R I L A N A N E NS A PT P K E OFF L T A AD P S T EM T PE H R L KL
PaRSE2	285	VLTAK VE AG LL Q PF NY IK GY Q S L OT Y L NE H V S FG S R OK IL R OL D RF R PK F RE K M O GR D H M
NcAOD2	323	LLRA K Y E AG LL K PF NY IL G Y K RL S D Y L D GH V SP T SK OK IL K Q L DR F RP K FR E K I Q L L T D M
AnACUM	325	LLKA K Y D AG LL R PF NY V K GY AR LS AY ME K N L OV SS R OK I A R Q LD K FR P K F DR M Q L D I
ScRDS2	256	VINAK LE AG LL K P V Y A K GY AR L Q D Y M D K Y M N Q SS K OR IL K PL ST IR PA F RT I AR SL K D V
PaRSE2	345	FL T I NE M Q I ES SL ME Y DR V F AS MA V P ACC WR RT GE I FR GN K E MA E LI D V P VE D LR NG K T K
NcAOD2	383	DL LM V EM W FER L LE Y DR V F AS MA V P ACC WR RT GE I FR GN K E MA E LI G V P VE SL R GG Q I A
AnACUM	385	EL L V EM W FER S LM E Y D R V F AS MA V P ACC WR RT GE I FR GN K E MA E LI G V P TE LL RD G K L A
ScRDS2	316	DL V L VE S F ER M L LS Y DR V F T SM S MP AC L CR RT GE I Y R AN KE F AS L V D CT V D DL RD G K L A
PaRSE2	405	L HE I L T EE S V V RY W EE F GT I A F DP L HD T LL T ACT L K S P N KS - SK K V V N CC FS F R I KK D N A
NcAOD2	443	L HE I L T EE S N V RY W EE F GT I A F DP A HD T LL T AC S L K N P ND D K G T K V V N CC FS F R I RR D D H
AnACUM	445	L HE I IV E D OL V S Y W E K FG A I A FD N T Q K A ML T S CT L K N P N A T S P T EG I P CC FS F T I RR D N H
ScRDS2	376	I Y E LM T EE S AV N F W E K Y G S I A F D K G Q KA V L T S CS LR--- TK D G IR K RP CC FS T I RR DR Y
PaRSE2	464	Q VP G ----- L I I G----- N F I PH D P-----
NcAOD2	503	K IP S ----- L I V G----- N F L PH D P-----
AnACUM	505	N IF L T--- P L I L V RL L LL E I S Y Q R NG I P NR K KH S SR F Q D Q T Q S L S V C R G AL K Q L TR F A I Q
ScRDS2	433	N I P I C I V G----- N F I PL S -----
PaRSE2	----	
NcAOD2	----	
AnACUM	562	K LL F
ScRDS2	----	

Supplemental Figure 1. Alignment of RSE2 with homologues from *Neurospora crassa* (Nc), *Aspergillus nidulans* (An) and *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). Black and grey highlights indicate identical and similar residues, respectively. Black circles indicate the zinc cluster domain. Stars indicate the position of the mutations Y300D and G303S

PaRSE21 1 **MPEDGGPF**FGSE**AAEASGAMSETE**NEYDDE**EPHKDEDD**-**RMSEONTTPD**GVDAGGEV**KKK**
 NcAOD5 1 **MPDDVGP**---**AAAEVSGAVSESD**NEYDE**TEVTKDDDD**E**KMAERSVASE**GVETNGD**QKKK**
 AnACUK 1 **ME**TE**TGK**---**GATAPPAES**-**SGVEQDTAAV**GAPAD**QPPK**TNANAT**SN**ANGED**Q**PANG**QK**

PaRSE21 60 **YDPK**DPLR**PRRKKARRAC**YAC**QRAHLTCGDERPCQRCIKRGL**OD**S**CD**GVRKKAKYLHDA**
 NcAOD5 58 **YDPK**DPLR**PRRKKARRAC**YAC**QRAHLTCGDERPCQRCIKRGL**A**EAC**OD**GVRKKAKYLHDA**
 AnACUK 56 **ANPKDPS**R**PRRKKARRAC**F**ACQRAHLTCGDERPCQRCIKRGL**OD**ACH**D**GVRKKAKYLHDA**

PaRSE21 120 **PPEALRPV**L**GPN**--**YNPNAPSSRHGG**ORE**HS**-**VSTDA**-**STV**R**TF**FS**HSNAS**O**Y**PV**YSSTQ**
 NcAOD5 118 **PPEALRPV**L**GPN**--**YNPA**AA**VSVRNGHRE**PS**TAGSDAGSS**IG**TFYSOS**--**TOY**PV**FSSAA**
 AnACUK 116 **PDGALMP**FG**IGGM**N**FYN**N**SM**NG**VPSGGINM**GANT**VNSAAS**T**ONS**SA**NFY**PT**Q**SN**YSL**

PaRSE21 176 **SIP**H**GLTESL**PF**NS**Q**OSPVSPT**F**Q**OT-----**SSNP**P**ISGMVAPP**V**S**
 NcAOD5 174 **TQL**GS**T**PE**N**L**PF**F**Q**OSP**V**SPT**F**Q**P**-----**SSNP**OL**GSIGV**SS**V**S
 AnACUK 176 **YQ**EN**F**IN**HQ**NS**F**F**Q**OSP**V**SPT**F**SL**K**T**N**PT**PR**NT**AP**NNNN**N**N**ALT**SS**MP**Q**P**AT**T**G**V**SN**AP**

PaRSE21 217 **S**-**PM**T**PF**G**-L**P**F**D**PSD**P**N**I**F**N**F****N**D**GL**N**F**G**S****H**Y**G**A**M**E**F**G**M**L**G**H**M**S**S**A**A**D**T**P**P**O**E**S**G**M**G**O
 NcAOD5 213 **S**-**PM**N**S**F**FP**AL**F**D**PS**N**PA**I**F**N**F****N**L**E**G**L**N**F**G**S****Q**Y**G**A**M**E**F**G**M**L**G**H**M**S**S**G**A**A**E**T**P**P**R**D**P**S**MA**Q
 AnACUK 235 **NQ**S**Q**N**P**F**AG**P**F**D**PSD**P**AF**N**F****N**D**SS**N**F**E**N**R**Y**G**A**M**E**F**G**M**L**G**H**M**A**T**G**A**G**D**S**P**D**S**G**T**H**R**G**S

PaRSE21 275 **Q**--**PGD**V**H**F**G**-**AG**L**F**G**S**-----**H**F**D**N**--R**M**L**P**E**F**L**G**L**D**A**G**A**N**----**G**I**Y**----**S
 NcAOD5 272 **Q**G**-T**S**D**V**G**F**N**P**S**G**V**F**G**N**L**N**----**Q**F**E**K**V**D**N**T**G**L**I**S**D**F**L**T**L**D**A**H**S**N**-----**G**L**I**Y**----**S
 AnACUK 295 **M**G**R**S**G**S**T**O**F**A**S**T**P**I**G**G**T**T**T**F**G**E**S**P**Q**N**Q**Q**P**F**M**F**G**D**P**L**L**N**E**W**P**S**G**O**T**S**G**O**P**H**V**N**V**G**V**P**O**S**S**

PaRSE21 311 **Q**G**N**L**O**H**G**-----**L**P**H**A**Y**A**I**P**A**G**P**T**S**L**O**S**P**S**T**E**N**N**S**P**O**P**T****T**F**G**F**D**D**R**P**S**P**T**M**S**O**Y**P**----**
 NcAOD5 319 **Q**G**N**L**O**H**G**-----**L**P**H**A**Y**A**I**P**A**G**P**T**S**L**O**S**P**S**T**E**N**N**S**P**O**P**T****G**F**G**F**E**S**P**T**A**T**N**Y**T**G**V**P**GA**A**G**
 AnACUK 355 **Q**G**N**V**I**P**G**H**L**S**K**P**D**A**P**H**A**F**A**I**E**S**G**P**N**N**F**T**S**P**G**A**A**T**-S**P**Q**I**N**S**G**G**V**E**D**A**N**A**F**N**N**V**V**T**K**-----

PaRSE21 361 **N**A**P**G**A**K**S**S**S**N**S**R**F**S**K**--**T**R**K**I**D**K**V**A**I**L**O**--**K**R**O**R**D**P**S**Y**I**D**T**V**R**K**S**F**D**Y**V**G**S**F**H**K**L**F**E**V**L**
 NcAOD5 373 **N**Q**P**G**S**Q**Q**P**R**A**Q**R**P**K**T**P**A**L**G**K**L**G**P**O**S**V**L**G**--K**R**O**R**D**P**S**S**I**Y**E**A**V**K**E**P**F**O**Y**V**A**S**F**H**K**L**I**S**L**L
 AnACUK 410 **-S**N**L**S**V**N**G**Q**Q**R**E**P**T**I**S**T**P**S**L**K**H**E**S**L**O**M**N**K**R**E**R**R**N**P**S**A**V**Y**E**S**V**K**E**P**Y**A**Y**T**S**R**F**H**S**L**T**A**F**I

PaRSE21 417 **S**S**R**F**S**O**P**H**A**A**R**I**A**K**S**L**A**A**I**R**P**A**L**A**S**T**R**N**L**T**T**O**D**L**I**F**M**E**Q**C**F**O**R**T**L**F**E**Y**E**D**F**M**T**O**S**S**S**P**T**
 NcAOD5 431 **Q**N**R**F**S**G**A**S**T**I**S**I**V**R**S**L**A**S**I**R**P**S**F**M**S**C**M**K**T**L**N**R**A**D**L**I**F**M**E**K**S**F**O**R**A**L**F**E**H**E**F**M**H**O**S**P**S**P**A**
 AnACUK 469 **Q**R**R**F**S**P**O**K**T**L**O**I**A**K**A**L**A**S**I**R**P**S**F**I**A**T**K**T**L**N**R**D**L**I**F**M**E**K**C**F**O**R**T**L**E**Y**E**D**F**I**N**A**C**G**T**P**T**

PaRSE21 477 **L**A**C**R**R**T**G**E**I**A**G**V**N**K**E**F**T**A**L**T**G**W**T**K**D**V**L**L**G**K**E**P**N**R**N**T**N**L**G**G**T**G**-----V**R**T**
 NcAOD5 491 **I**A**C**R**R**T**G**E**I**A**A**V**N**K**E**F**T**A**L**T**G**W**T**K**D**V**L**L**G**K**T**I**L**N**A**N**M**G**G**T**N**S**D**T**L**S**I**S**S**K**G**R**G**G**I**V**G**T
 AnACUK 529 **I**V**C**R**R**T**G**E**V**A**A**V**G**K**E**F**S**I**L**T**G**W**R**K**E**V**L**L**G**K**E**P**N**Y**V**N**T**G**G**S**-----A**A**N**

PaRSE21 522 **T**P**R**L**K**S**I**N**E**S**S**A**E**N**G**G**A**A**S**G**-----P**R**P**V**F**L**A**E**L**M**D**H**E**S**A**V**E**F**Y**E**D**Y**S**O**L**A**F**G**D**S**R**G
 NcAOD5 551 **T**P**R**L**K**P**L**H**P**E**Q**G**T**N**A**D**S**Q**Q**Q**S**Q**Q**H**K**E**Q**P**Q**P**V**F**L**A**E**L**M**D**E**A**S**V**T**O**F**Y**E**D**A**Q**L**A**F**T**H**S**R**G
 AnACUK 574 **S**R**N**I**T**P**R**S**S**V**E**S**T**G**R**-----**P**R**P**V**F**L**A**E**L**D**D**D**S**V**E**F**Y**E**D**F**A**R**L**A**F**G**D**S**R**G

PaRSE21 574 **R**M**T**R**K**C**R**L**L**K**Y**R**T**D**K**-----**F**A**A**G**G**G**G**G**A**G**E**---**E**E**R**K**P**D**P**S**A**A**P**R**O**Q**E**K**D**
 NcAOD5 611 **T**V**V**R**K**C**R**L**L**K**Y**R**T**O**E**N**M**D**A**A**A**A**A**A**A**A**S**A**P**T**A**S**G**G**S**G**S**S**N**G**T**V**V**N**G**G**P**D**S**S**P**A**G**K**T**E**K**E**R**
 AnACUK 621 **S**V**T**T**R**C**R**L**L**K**Y**R**T**K**E**-----**D**M**E**A**A**Q**S**D**D**N**G**O

PaRSE21 617 -----**S**R**H**S**I**L**S**N**R**V**A**K**I**D**G**E**H**G**I**S**K**L**E**-**R**D**V**K**L**E**C**S**Y**T**W**T**I**K**R**D**V**D**I**P**M**L**F**V**I**N**V**R**F**
 NcAOD5 671 **P**T**G**V**N**V**A**S**N**S**I**L**S**N**R**V**A**K**I**D**G**E**H**G**I**S**K**L**E**-**R**D**G**K**L**E**C**S**Y**T**W**T**I**K**R**D**V**D**I**P**M**L**I**M**I**N**F**L**P**
 AnACUK 648 -----**R**W**N**N**H**L**R**K**--G**G**I**A**N**E**A**G**M**N**O**L**G**F**R**D**G**K**V**E**C**A**Y**C**W**T**V**K**R**D**V**D**I**P**M**L**I**V**M**N**V**R**L**

PaRSE21 670 **F**F**F**F**S**T**I**T**M**E**E**G**I**A**N**G**I**L**V**F**T**M**L**L**P**E**S**
 NcAOD5 730 **C**Y**R**S**H**N**Q**L**A**V**-----**
 AnACUK 700 **PL**P**-----**

Supplemental Figure 2. Alignment of RSE3 with homologues from *Neurospora crassa* (Nc), *Aspergillus nidulans* (An) and *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). Same legend as in Figure 1A except that the star indicates the position of the mutation G642V

Supplemental Table 1. Characteristics of the 12 SSR markers used for the genetic linkage analysis of *rse2*

Marker	Position on chr3_SC2	Forward primer	Reverse primer	expected size*	
				in <i>s</i> isolate	in <i>T</i> isolate
198ks/a	646370-646670	TGTCTCGAAACCCCTTTAC	GAAAATGTAAGCCCGTGTT	301	-
539/770	881178-881409	CGTCAACCTCTTCTCTCGTGT	TTGGAAGTGGGGATGTTAGC	232	-
440/651	949785-949996	GCCGAGCAGGGTATAAAATG	GATTGTCGTCGCTCTTGAAA	212	-
inc133-1a/b	1015820-1016093	TCCGCATTCATCTTCCACT	AGAAGGCTGAACCGAGGAG	274	-
inc133-2a/b	1195841-1196187	GCACCTCCCATCAAACCT	TTCCGACTTTTCGAGTTGCT	347	-
inc133-3a/b	1448053-1448395	AAGCAAGGGAGAGGTTGGTAG	GTAACCTGACCGCCCTTA	343	-
N1	1486762-1487055	ACACGACACAACCGACCA	GCGGCGACAACGAATAAT	260	-
130ks/a	1605394-1605705	AGGGCTTCCTTGAGTGTGTC	CTCACCTCACCATCAACAC	312	-
N3	1486762-1590877	TGGAGGAGCCGGATATTG	TGGATCATCGCCATTCTG	310	+
415ks/a	1875644-1875954	ACGAACCTCGATAGGTCCAG	AGGAACCACACAGCACACAT	311	+
397ksa/b	2318128-2318436	GTGGTGATGGGCATTGACTA	CCAACAACCACCATCAACAT	309	-
620ksa/b	2540384-2540689	AATACGAATCCTCCCTCT	CGGTCGAGTTTTGTAGCTT	306	-

* Expected size of the PCR amplification (in nucleotides) in the *P. anserina s* strain.
In *P. comata T* strain the amplification is either larger (+) or smaller (-) in size.

Supplemental Table 1. Characteristics of the 12 SSR markers used for the genetic linkage analysis of *rse2*

2. Résultats annexes

Les orthologues des facteurs de transcription RSE2 et RSE3 ont été décrits chez *N. crassa*, *A. nidulans* et *S. cerevisiae* (Figure 23).

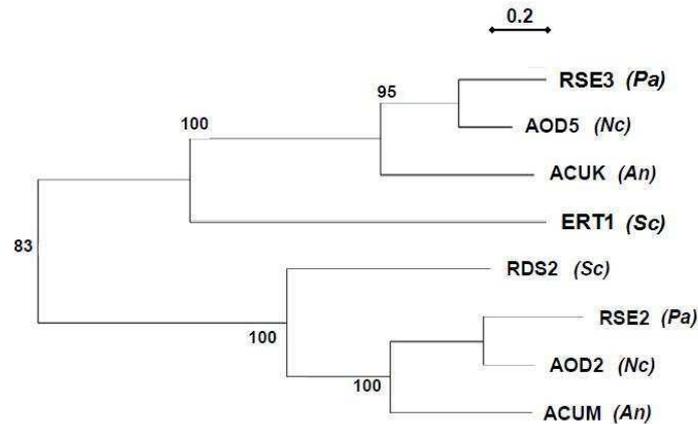


Figure 23: Arbre phylogénétique des orthologues de RSE2 et RSE3 chez quatre ascomycètes (*P. anserina* (Pa), *N. crassa* (Nc), *A. nidulans* (An) et *S. cerevisiae* (Sc)).

Les séquences protéiques ont été alignées avec ClustalW. L'arbre phylogénétique a été construit selon la méthode du maximum de vraisemblance avec le programme PhyML. 100 répliques de bootstrap ont été faites et les valeurs pour chaque nœud sont indiquées. La distance correspondant au nombre de substitutions nucléotidiques est indiquée.

2.1 Comparaison fonctionnelle entre RSE2/RSE3 et Rds2/Ert1 de *S. cerevisiae*

Le facteur de transcription Rds2p a tout d'abord été identifié par la sensibilité accrue que provoque sa délétion (RDS pour Regulator of Drug Sensitivity) vis à vis de certaines drogues : le kétoconazole (antifongique, inhibiteur du cytochrome P-450 (Loose *et al.*, 1983)) et le calcofluor (qui possède une grande affinité pour la chitine, un composé de la paroi cellulaire (Akache *et al.*, 2001; Akache and Turcotte, 2002)). Récemment il a été montré que Rds2p ainsi que Ert1p étaient également des régulateurs de l'expression des enzymes de la néoglucogenèse FBP et PCK en plus de la régulation majeure médiée par Cat8 (Turcotte *et al.*, 2010; Soontorngun *et al.*, 2007). Afin de tester une conservation fonctionnelle entre Rds2p et RSE2, nous avons envisagé de compléter l'hypersensibilité au kétoconazole de la souche $\Delta rds2$ par le gène sauvage *rse2*⁺ de *P. anserina*. Malheureusement cette expérience n'a pas été possible car contrairement aux résultats publiés (Akache and Turcotte, 2002 et figure A), la souche $\Delta rds2$ (fournie aimablement par R. Chanet) ne s'est pas révélée hypersensible au kétoconazole (Figure 24 B). Cependant, ces souches possèdent le

même fond génétique (BY4742) que celles étudiées par Turcotte. Nous n'avons pas d'explication pour cette discordance de résultats.

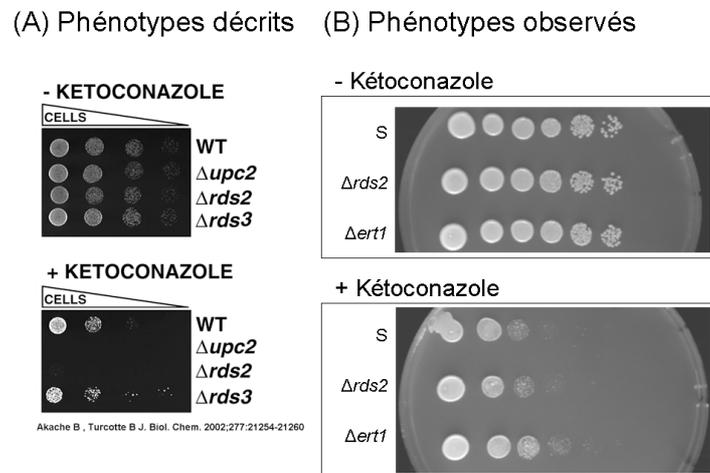


Figure 24: Phénotype de *S. cerevisiae* sur kétoconazole

(A) Phénotype décrit par (Akache and Turcotte, 2002)

(B) Phénotype observé

La même souche $\Delta rds2$ de *S. cerevisiae* a été utilisée afin de s'affranchir de l'effet du fond génétique, la souche $\Delta Ert1$ (Fournie par R. Chanet) possède aussi le même fond génétique BY4742, les mêmes concentrations de kétoconazole (5 μ g/mL) ont été utilisées.

Nous avons alors testé si la délétion de *rse2* et *rse3* modifiait la sensibilité des souches de *P. anserina* au kétoconazole et au calcofluor.

2.1.1 La perte de fonction de *rse2* et de *rse3* ne modifie pas le phénotype des souches sur kétoconazole

La souche sauvage, les souches mutantes *rse2-1* et *rse3-1* (gain de fonction) et les souches $\Delta rse2$, $\Delta rse3$ (perte de fonction) ont été mises en croissance sur kétoconazole. Les concentrations de l'antifongique ont été déterminées d'après les concentrations utilisées chez *N. crassa* (2 μ g/mL) (Pereira and Said, 2009). Sur ce milieu, la souche sauvage présente une croissance ralentie d'un facteur 2 environ, et une longévité de 5 cm comparée aux 11cm en conditions standard (Figure 25 A).

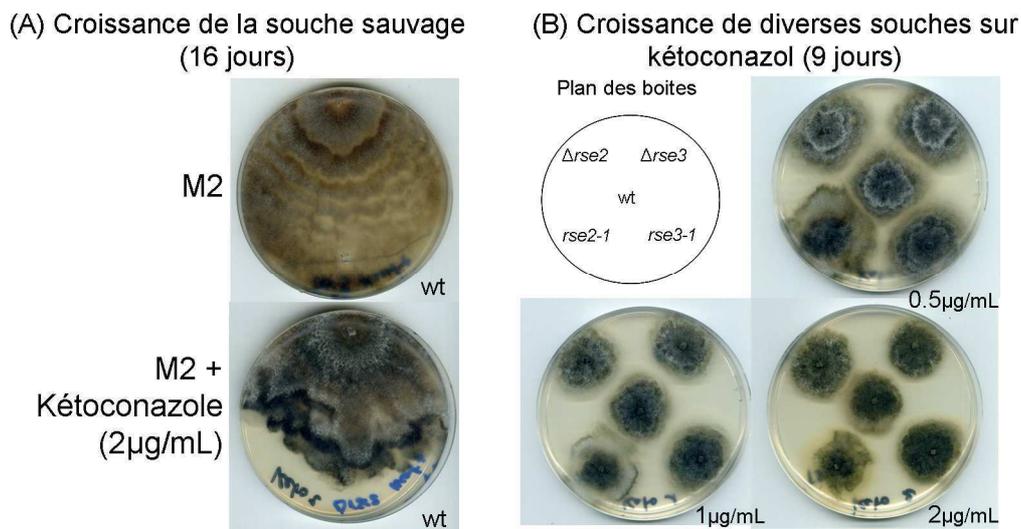


Figure 25: Phénotype sur ketoconazole

(A) Croissance à 16 jours de la souche sauvage sur M2 ou ketoconazole à 2 µg/ml

(B) Les souches sauvage, $\Delta rse2$, $\Delta rse3$, $rse2-1$ et $rse3-1$ ont été mises en croissance sur 0.5, 1 ou 2 µg/mL de ketoconazole. Les photos ont été prises après 9 jours de croissance.

Les souches $\Delta rse2$ et $\Delta rse3$ (tout comme les souches $rse2-1$ et $rse3-1$) ne présentent pas de sensibilité accrue au ketoconazole (Figure 25 B) contrairement à ce qui est décrit pour la souche $\Delta rds2$ de *S. cerevisiae*. Cette absence de sensibilité accrue a été observée jusqu'à une concentration de 5µg/mL. Les gènes *rse2* et *rse3* ne contrôlent donc pas la résistance au ketoconazole chez *P. anserina*.

2.1.2 La perte de fonction de rse2 et de rse3 ne présente pas de phénotype particulier sur calcofluor

De la même manière que pour le ketoconazole, le phénotype de la souche $\Delta rds2$ n'a pu être reproduit. De façon surprenante, les souches $\Delta rse2$ et $\Delta rse3$ présentent une résistance légèrement accrue au calcofluor comparée à une souche sauvage, tandis que les souches $rse2-1$ et $rse3-1$ sont hypersensibles (Figure 26).

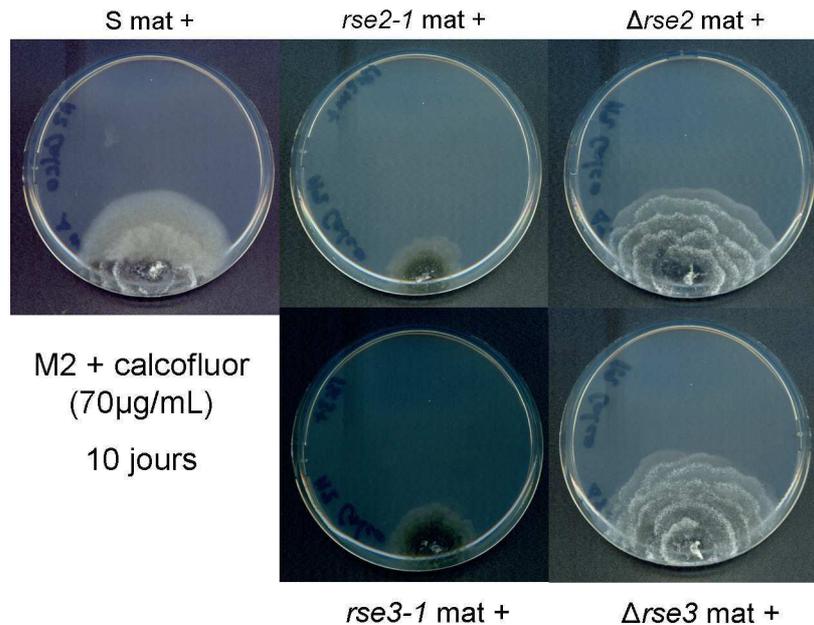


Figure 26: Phénotype sur calcofluor

Croissance à 10 jours de la souche sauvage, des mutants $\Delta rse2$, $\Delta rse3$, $rse2-1$ et $rse3-1$ sur M2 ou M2 + calcofluor à 70 µg/ml

Ces résultats contradictoires avec ceux publiés chez la levure ne permettent pas d'établir clairement un lien entre ces facteurs de transcription et la résistance / sensibilité au calcofluor et au kétoconazole.

S'il existe une conservation fonctionnelle entre *P. anserina* et *S. cerevisiae*, elle n'a été observée pour le moment uniquement au niveau des enzymes de la néoglucogénèse (*S. cerevisiae* ne possède pas de gène *aox*).

2.2 Comparaison fonctionnelle entre RSE2/RSE3 et AcuM/AcuK de *A. nidulans*

Il a été montré chez *A. nidulans*, que les facteurs de transcription AcuK et AcuM sont nécessaires à la croissance sur substrats néoglucogéniques tels que l'acétate, l'éthanol, la proline, l'alanine, le malate et le tween80 (Hynes *et al.*, 2007). RSE2 et RSE3, tout comme AcuK et AcuM, sont nécessaires pour l'activation de l'expression des enzymes FBP et PCK puisque les souches $\Delta rse2$ et $\Delta rse3$ ne poussent pratiquement pas sur acétate et le double mutant ne pousse pas du tout. Les mêmes phénotypes sont observés sur acide oléique (acide gras, substrat néoglucogénique) (Figure 27). Comme attendu il en est de même pour les souches Δfbp , Δpck et le double mutant $\Delta fbp \Delta pck$ (Figure 27).

RSE2 et RSE3 sont donc tous deux nécessaires à la croissance sur un substrat néoglucogénique. Il existe donc bien une conservation fonctionnelle entre *P. anserina* et *A. nidulans*.

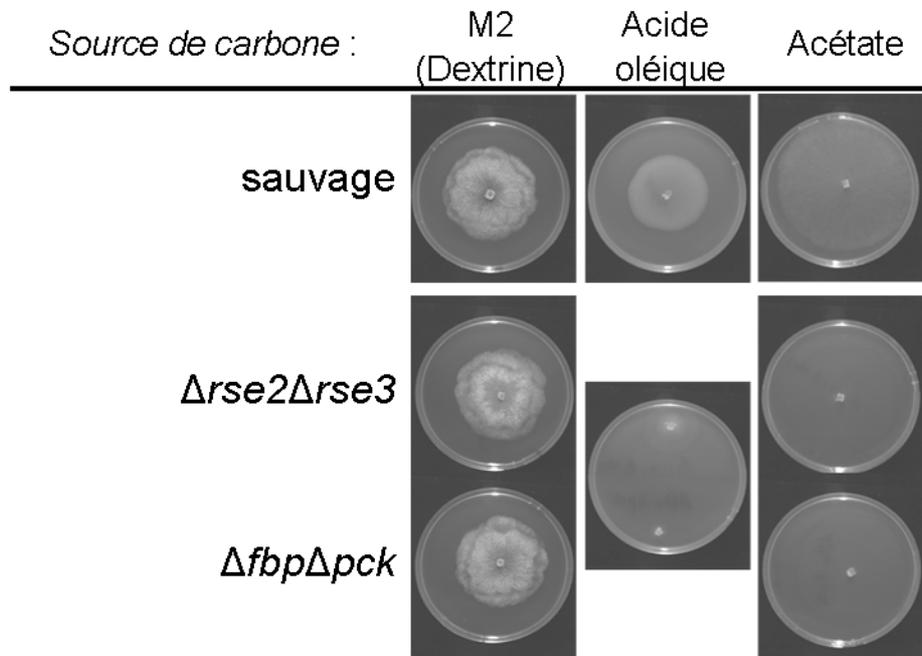


Figure 27: Phénotype sur deux sources de carbone néoglucogénique : l'acide oléique et l'acétate

La souche sauvage pousse sur acide oléique (0.05%) et sur acétate (1.4%). Les souches $\Delta rse2\Delta rse3$ et $\Delta fbp\Delta pck$ ne présentent pas de phénotype particulier sur M2, mais ne poussent pas sur acide oléique ni sur acétate. Les photos ont été prises à 3 jours après l'ensemencement.

Puisque RSE2 et RSE3 sont indispensables à une croissance sur acétate et dans des conditions de blocage de la voie cytochromique, il a semblé intéressant de tester la croissance du mutant *cox5::ble* sur acétate et acide oléique. En effet, puisqu'en contexte *cox5::ble*, les protéines RSE2 et RSE3 sont activées pour induire le gène *aox*, il est intéressant de savoir s'il y a conjointement activation des gènes *fbp* et *pck* chez ce mutant et une amélioration de sa croissance sur des substrats néoglucogéniques.

Comme indiqué sur la figure 28, la souche *cox5::ble* pousse effectivement mieux sur acide oléique (vitesse améliorée et mycélium plus dense) que sur dextrine (source de carbone du milieu M2).

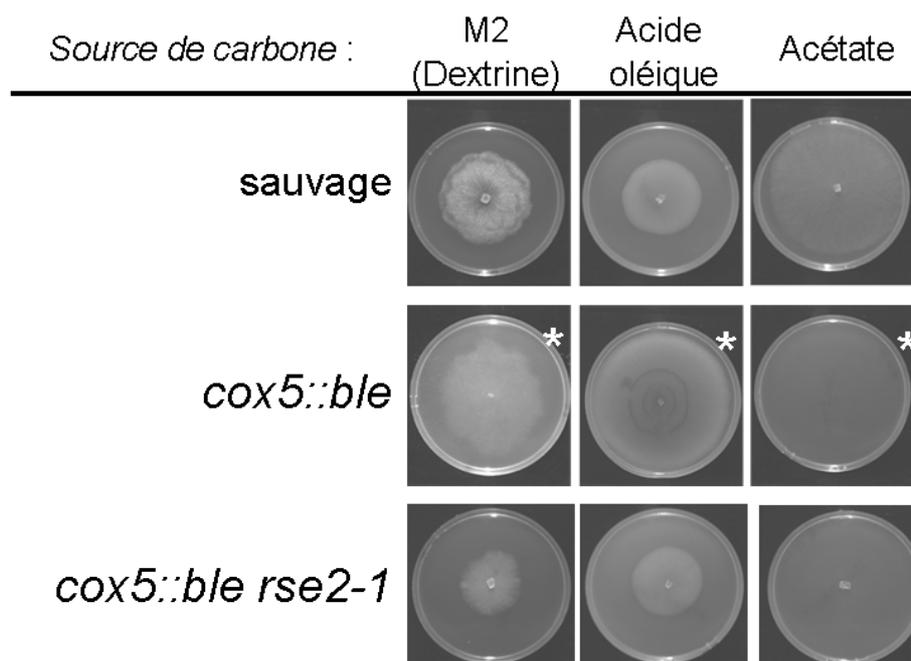


Figure 28: Phénotype du mutant *cox5::ble* sur deux sources de carbone néoglucogénique : l'acide oléique et l'acétate

Les photos ont été prises à 3 jours de croissance pour l'ensemble des souches sauf la souche *cox5::ble* (marqué par une étoile blanche) pour laquelle les photos ont été prise à 10 jours. Acide oléique (0.05%) et acétate (1.4%).

De façon surprenante, la souche *cox5::ble* est incapable de pousser sur acétate (Figure 28). L'acétate et l'acide oléique étant deux substrats néoglucogéniques (et la croissance de la souche *cox5::ble* étant possible sur un autre acide gras : le tween80, Annexe 4), ce n'est donc pas une incapacité à croître sur substrat néoglucogénique mais une spécificité de l'acétate qui est responsable de ce phénotype. On peut noter que cette incapacité à pousser sur acétate n'est pas sauvée par l'association de la mutation *cox5::ble* à l'allèle gain de fonction *rse2-1*, pourtant responsable d'une amélioration phénotypique sur M2 (Figure 28). Ces résultats montrent que l'activation de la régulation rétrograde mitochondriale passant par les facteurs de transcription RSE2 et RSE3 ne suffit pas à restaurer la croissance sur acétate.

L'acétate et les acides gras sont convertis en acétylCoA pour entrer dans le métabolisme, le blocage chez le mutant *cox5::ble* doit donc se trouver en amont de cette transformation dans la voie d'assimilation de l'acétate. L'acétate diffuse librement au travers de la membrane plasmique sous sa forme protonée, et c'est dans des conditions de faible concentration en acétate ou de pH élevé qu'un transporteur est nécessaire chez *A. nidulans*

(le transporteur AcpA) (Robellet *et al.*, 2008). Le même type d'observation a été fait chez *S. cerevisiae* (le transporteur Jen1 est responsable de l'import de la forme dissociée de l'acétate, cible de Cat8, régulateur transcriptionnel de la néoglucogenèse qui permet la levée de la répression catabolique par le glucose) (Casal *et al.*, 1999; Haurie *et al.*, 2001). Il est raisonnable de faire l'hypothèse que le même type de mécanisme d'import de l'acétate existe chez *P. anserina*, et que par conséquent, l'acétate disponible dans le milieu est capable de diffuser librement, y compris chez la souche *cox5::ble*. Si cette hypothèse est vraie, alors l'incapacité du mutant *cox5::ble* à assimiler l'acétate pourrait résulter d'une inactivité de l'enzyme catalysant la réaction de transformation de l'acétate en acétylCoA : l'acétylCoA synthase. Il existe dans le génome de *P. anserina* 2 candidats (Pa_3_7380 et Pa_2_870) pour cette enzyme. Dans les cellules de mammifères, les deux isoformes d'acétylCoA synthase (AceS1 à localisation cytoplasmique et AceS2 à localisation mitochondriale) sont régulées par dé-acétylation réversible médiée par les sirtuines SIRT1 et SIRT3 respectivement (Hallows *et al.*, 2006). Ce mécanisme de régulation de l'acétylCoA synthase par les sirtuines a été décrit en premier lieu chez les procaryotes (Starai *et al.*, 2002). Cette régulation est aussi conservée chez *S. cerevisiae*, et c'est la perte de fonction de plusieurs d'entre elles qui est responsable d'une incapacité de la levure à assimiler l'acétate (Starai *et al.*, 2003). Les homologues des sirtuines de *S. cerevisiae* sont conservés chez *P. anserina* (Boivin *et al.*, 2008). Il a été proposé par ailleurs que le rapport $NAD^+/NADH$ puisse réguler l'activité de ces déacétylases (Lin and Guarente, 2003). Une hypothèse pour rendre compte de l'incapacité du mutant *cox5::ble* à pousser sur acétate consiste à imaginer que le rapport $NAD^+/NADH$ est modifié chez le mutant du fait de son métabolisme mitochondrial perturbé et que cette modification ait comme conséquence un changement de l'activité des sirtuines et la non activation de l'acétylCoA synthase. Si cette hypothèse est vraie, alors la sirtuine responsable de l'activation de l'acétylCoA synthase n'est pas la protéine SIR2. En effet la souche $\Delta sir2$ (Boivin *et al.*, 2008) pousse sur acétate (Figure 29). Cependant les études faites chez *S. cerevisiae* montrent qu'il doit certainement exister une redondance fonctionnelle entre les sirtuines puisque qu'il faut associer les pertes de fonction de plusieurs sirtuines pour avoir un phénotype sur acétate (Starai *et al.*, 2003). Comme il existe sept paralogues putatifs dans le génome de *P. anserina* (Boivin *et al.*, 2008), il est raisonnable de penser que la redondance fonctionnelle observée chez *S. cerevisiae* existe aussi chez *P. anserina*.

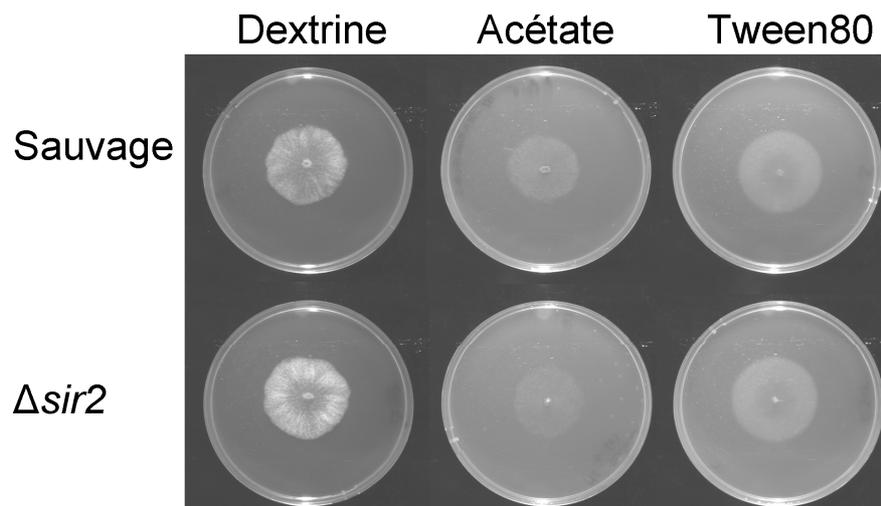


Figure 29: Phénotype de la souche $\Delta sir2$ en fonction de la source de carbone

Les photos ont été prises à trois jours sur un milieu standard (source de carbone : dextrine), sur des milieux où la seule source de carbone est l'acétate (1.4%) ou le tween80 (0.04%).

B. Analyse génétique et fonctionnelle des acteurs de la régulation rétrograde mitochondriale : RSE2 et RSE3

1. Article 2- Analyse génétique et fonctionnelle des facteurs de transcription RSE2 et RSE3

1.1 Résumé des résultats obtenus

Comme décrit dans le chapitre précédent, les facteurs de transcription RSE2 et RSE3 de *P. anserina*, conservés chez les champignons filamenteux *N. crassa*, *A. nidulans*, sont requis pour l'expression du gène *aox* et ils sont les régulateurs de l'expression de FBP et PCK chez *P. anserina* et *A. nidulans* (Chae, Nargang, *et al.*, 2007; Sellem, Bovier *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2012). Ils sont également impliqués dans le contrôle de la longévité chez *P. anserina* (Sellem, Bovier *et al.*, 2009). Pour aller plus loin dans la compréhension de ces facteurs de transcription chez *P. anserina* et du (ou de leurs) rôle(s), nous avons d'une part recherché à comprendre l'organisation fonctionnelle des ces protéines, et, d'autre part, leur rôle fonctionnel, leurs cibles et les conditions responsables de leur activation.

➤ Identification de nouveaux allèles gain de fonction des gènes *rse2* et *rse3*

Pour répondre à notre premier objectif, j'ai cherché à saturer le crible portant sur la sélection de révertants du mutant *cox5::ble*, à savoir l'apparition de secteurs mycéliens plus denses. Sur 40 cultures de la souche *cox5::ble*, 23 secteurs denses, aériens et présentant une nette amélioration de la vitesse de croissance ont été isolés. Les gènes *rse2* et *rse3* ont été séquencés chez ces 23 révertants et 8 nouvelles mutations ont été trouvées dans le gène *rse2* : E223K, A267V, S332N, R346I T491I (trouvée deux fois) F452L et V491A, 10 nouvelles mutations ont été trouvées dans le gène *rse3* : E251K, E251G, A438T, A438V, V626M, V626L, G634V (trouvée deux fois) et la duplication des acides aminés 640 à 645 (trouvée deux fois). L'ensemble de ces mutations ont les caractéristiques suivantes : amélioration de la croissance mycélienne en contexte *cox5::ble*, expression constitutive du gène *aox* en contexte *cox5⁺* (croissance immédiate sur antimycine A). La quasi saturation de ce crible suggère fortement qu'il n'existe pas d'autre acteurs que les protéines RSE2 et RSE3 contrôlant l'expression de l'AOX. Les positions et phénotypes de ces nouveaux allèles sont représentés dans la figure 1 de l'article, page 107.

D'autres suppresseurs ont été isolés et ne correspondent pas à des mutations dans les gènes *rse2* ou *rse3*. Leur effet suppresseur est plus faible en contexte *cox5::ble*. En contexte *cox5⁺*, ils ne sont pas responsables d'une expression constitutive de l'AOX, ils présentent un aspect mycélien plus noir et une longévité significativement diminuée par rapport à la souche sauvage. Ils ne sont donc pas impliqués dans l'expression de l'AOX et seront analysés plus en avant dans la suite du manuscrit.

➤ Analyse fonctionnelle des facteurs de transcription RSE2 et RSE3

Les 18 nouveaux allèles gain de fonction des facteurs de transcription RSE2 et RSE3 isolés dans cette étude, ainsi que les 3 isolés précédemment (Sellem, Bovier *et al.*, 2009), ont le même phénotype : une expression constitutive du gène *aox* responsable d'un phénotype suppresseur en contexte *cox5::ble* et une croissance sans délai sur antimycine en contexte *cox5⁺* (Figure 1 de l'article, page 107). Les facteurs de transcription de la famille des Zn₂Cys₆ sont généralement organisés de la façon suivante : un domaine de liaison à l'ADN en N-terminal, une région coil-coil responsable de la dimérisation et une région activatrice de la transcription en C-terminal (MacPherson *et al.*, 2006), la région centrale comporte souvent une région de faible homologie qui pourrait avoir un rôle dans la régulation de l'activité transcriptionnelle (Poch, 1997; MacPherson *et al.*, 2006). Les mutations gain de fonction isolées dans cette étude sont localisées dans la moitié C-terminale des protéines RSE2 et RSE3, et, au vu du nombre et de la fréquence de ces mutations, certaines pourraient être en fait des pertes de fonction d'un domaine inhibiteur de l'activité de RSE2 et RSE3. Pour tester cette hypothèse, plusieurs délétions ciblées ont été construites (représentées sur la figure 1 de l'article, page 107). L'ensemble des résultats obtenus suggèrent que pour RSE2 et RSE3, comme pour la plupart des protéines de la famille des Zn₂Cys₆, le domaine activateur est localisé dans la partie C-terminale (après le résidu 645 pour RSE3 et recouvrant le résidu 452 pour RSE2) et que les régions recouvrant les résidus E223 et G329 pour RSE2 et les résidus 640 à 645 pour RSE3 pourraient être impliquées dans l'activation de ces protéines en réponse à un signal inducteur.

L'analyse des longévités des souches construites a montré que, comme précédemment décrit (Sellem, Bovier *et al.*, 2009), la longévité des souches portant les allèles perte de fonction des facteurs de transcription RSE2 et RSE3 est augmentée, comparée une souche sauvage (Tableau 2 de l'article, page 114).

- RSE2 et RSE3 sont requis pour l'expression coordonnée des gènes *aox*, *fbp* et *pck* aussi bien sur antimycine que sur acétate

Les gènes *aox*, *fbp* et *pck* sont co-régulés sur antimycine A et cette corégulation nécessite RSE2 et RSE3 (Sellem, Bovier *et al.*, 2009). J'ai testé si cette corégulation était également observée en condition de néoglucogenèse (croissance sur acétate). Les résultats de RT-qPCR montrent bien une surexpression des gènes *fbp* et *pck* sur acétate (Figure 2 page 108) mais aussi du gène *aox*. Par ailleurs, le fait que les souches perte de fonction $\Delta rse2$ et $\Delta rse3$ ne peuvent pas pousser sur acétate indique que RSE2 et RSE3 sont essentiels pour l'expression de ces gènes.

- Identification de deux nouvelles cibles des protéines RSE2 et RSE3

Pour identifier la reprogrammation génétique sous contrôle de RSE2 et RSE3, j'ai réalisé une analyse transcriptomique comparant les souches *rse2-1*, *rse3-1* et *rse2-1 rse3-1* à une souche sauvage (Tableau S3 de l'article, pages 118-120). Je me suis intéressée aux gènes régulés de la même manière chez les mutants et différemment de la souche sauvage. En effet dans ces trois souches les protéines RSE2 et RSE3 sont constitutivement actives pour l'expression des gènes *aox*, *fbp* et *pck* et agissent vraisemblablement sous forme d'hétérodimère (voir manuscrit). On s'attend donc à ce que les gènes sous contrôle de ces facteurs de transcription se comportent de façon semblable chez ces trois mutants. Sur l'ensemble des 267 gènes différentiellement exprimés dans au moins une des trois souches (*rse2-1*, *rse3-1* et *rse2-1 rse3-1*) (Tableau S3 de l'article, pages 126-128), seuls 28 sont régulés dans le même sens chez ces trois mutants (Tableau 1 de l'article, page 110). Pour discriminer les cibles directes des cibles indirectes, j'ai recherché la présence du motif AIM (CGG(N)₇CGG) décrit chez *N. crassa* comme domaine de liaison des orthologues AOD2 et AOD5 (Chae, Lin, *et al.*, 2007; Chae, Nargang, *et al.*, 2007). Treize des 28 gènes du Tableau 1 possèdent au moins une fois ce motif dans les 1000 paires de bases en amont de l'ATG (Tableau 1 de l'article, page 110) et 5 d'entre eux (qui d'après les bases de données ont une fonction putative définie) sont induits sur antimycine. Les gènes *gdh* et *gogat* sont vraisemblablement de faux positifs parmi les cibles potentielles de ces facteurs de transcription (voir résultats annexes page 135), il en est de même pour le gène Pa_4_6210 (codant une pusaline déméthylase). Cette approche a toutefois permis d'identifier deux nouvelles cibles potentielles: les gènes Pa_6_4030, codant pour une enzyme avec un

domaine α/β hydrolase, et Pa_5_1700, codant une flavohémoglobine (*fhb*). Ces deux gènes sont induits sur antimycine, et cette induction est dépendante de la présence des facteurs de transcription RSE2 et RSE3 (Figure 3 de l'article, page 111).

- Les surexpressions de RSE2 et RSE3 ne complètent pas les pertes de fonction de leur partenaire

Parmi les hétérodimères de la famille des Zn_2Cys_6 décrits, il a été montré chez *S. cerevisiae*, que bien qu'agissant en hétérodimère, les protéines Oaf1p et Pip2p n'ont pas des fonctions similaires et que la surexpression du gène *oaf1*, même en absence du gène *pip2* permet l'induction d'un gène reporteur en réponse à l'oléate (Baumgartner *et al.*, 1999). Pour savoir si le même type de relation existe entre RSE2 et RSE3, les surexpressions de chacun de ces gènes ont été construites puis associées à la délétion de l'autre (*gpd-rse2 Δrse3* et *Δrse2 gpd-rse3*). La surexpression des gènes *rse2* et *rse3* n'ont aucun phénotype quelque soit le fond génétique. De plus, la construction des souches *gpd-rse2 Δrse3* et *Δrse2 gpd-rse3* et leur association à la mutation *cox5::ble*, a révélé que les deux protéines RSE2 et RSE3 sont nécessaires, quelque soit leur niveau d'expression, à la viabilité du mutant *cox5::ble*.

1.2 Article 2 – “Genetic and functional investigation of the Zn_2Cys_6 transcription factors RSE2 and RSE3 that control gluconeogenesis and alternative respiration in *Podospora anserina*”

(Article en cours de préparation pour soumission à Molecular Microbiology)

Genetic and functional investigation of the Zn₂Cys₆ transcription factors RSE2 and RSE3 that control gluconeogenesis and alternative respiration in *Podospora anserina*

Elodie Bovier^{*,†}, Carole H Sellem^{*}, Adeline Humbert^{*} and Annie Sainsard-Chanet^{*,†}

^{*}CNRS, Centre de Génétique Moléculaire, UPR 3404, Gif-sur-Yvette F-91198, France and

[†]Université Paris-Sud, Orsay F-91405, France

SUMMARY

Mitochondrial dysfunction leads to multiple cellular and organismal responses. In the filamentous fungus *Podospora anserina*, the two zinc cluster proteins RSE2 and RSE3 are key components of a response pathway by which the expression of the gene encoding the alternative oxidase (*aox*) is induced when the mitochondrial electron transport chain is impaired. In parallel are activated the gluconeogenic genes encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase (*pck*) and fructose-1,6-biphosphatase (*fbp*). The RSE2-RSE3 dependant coregulation of these genes is observed both when respiration is impaired and on gluconeogenic carbon source. Orthologues of RSE2 and RSE3 are present in a wide range of ascomycetes. By screening mutations that caused the constitutive expression of the *aox* gene, we identified 10 independent mutations scattered in 9 positions in gene *rse2* and 11 scattered in 5 hot spot positions in gene *rse3*. Some of these positions were deleted and the effects analyzed. This analysis suggests the presence of a potential central regulatory domain in RSE2 and a C-ter activation domain in both proteins. Microarray transcriptional profiling was conducted on *rse2* and *rse3* gain-of-function mutants. Twenty-eight genes, 13 of which contained a putative RSE2-RSE3 binding site, were identified as differentially expressed in the mutants compared to the wild-type. Two new potential direct targets of RSE2-RSE3 including a flavohemoglobin have been identified. The relevance for *P. anserina* to coregulate the genes required for gluconeogenesis and alternative oxidase is questioned.

INTRODUCTION

Filamentous fungi are natural scavengers and hence have a very flexible metabolism that enables them to live in a variety of environments. They are able to use a variety of carbon and nitrogen sources and their biological and ecological capacity to degrade various organic chemicals has been reviewed recently (Harms *et al.*, 2011; Silar *et al.*, 2011). Most filamentous fungi are saprophytes, they grow on environmental compounds that may be glucose or another carbon sources that result in the production of TCA cycle intermediates and therefore require gluconeogenesis to produce sugars. Glycolysis and gluconeogenesis are two opposite pathways for glucose metabolism (degradation or biosynthesis of glucose) and the fungi have to adapt their carbon metabolism according the available carbon source. This adaptation is generally realized through various mechanisms including reprogramming of gene expression (Galdieri *et al.*, 2010; Turcotte *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2009).

Another feature of many filamentous fungi is the presence of an alternative respiratory pathway in addition of the normal cytochrome-mediated pathway of electron transport. This pathway consists in a non-proton-pumping enzyme, the alternative oxidase (AOX) able to receive electrons from reduced ubiquinone and to catalyze the reduction of oxygen to water, bypassing the final steps of the cytochrome-mediated electron transport chain. In plants, the alternative oxidase is present in certain tissues or developmental stages and may also be induced in response to a variety of stresses (Figueira and Arruda, 2011; Polidoros *et al.*, 2009; Clifton *et al.*, 2006). In fungi, it is induced in certain mutational and environmental conditions. As in plants, it is expressed when the cytochrome respiratory chain is restricted in the presence of inhibitors such as antimycin A, azoxystrobin or cyanide and in the presence of respiratory mutations (Lorin *et al.*, 2001; Chae, Lin, *et al.*,

2007; Chae, Nargang, *et al.*, 2007; Inoue *et al.*, 2012). In these conditions, AOX bypasses respiratory complexes III and IV and acts as an overflow valve for electron transport, thus preventing the deleterious oxidative stress associated with the increased generation of mitochondrial reactive species (ROS). Several studies indicate that AOX is up-regulated in oxidative stress conditions (Magnani *et al.*, FEMS Micro letters, 2007, Martins *et al.*, Euk cell, 2010) and it is developmentally regulated in the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (Martins *et al.*, 2011). Recently it has been shown that AOX is also relevant in the virulence of several human pathogenic fungi such as *Paracoccidioides brasiliensis* (Ruiz *et al.*, 2011), *Cryptococcus neoformans* (Akhter *et al.*, 2003), *Aspergillus fumigatus* (Magnani *et al.*, 2008) and that it plays an important role in the life cycle of the fungal plant pathogen *Moniliophthora perniciosa* (Thomazella *et al.*, 2012). In all these cases, the AOX is important in the fungal defense against oxidative stress imposed by the host.

In the filamentous ascomycetes, *Neurospora crassa*, *Podospora anserina* and *Aspergillus nidulans*, recent data have shown that two Zinc cluster transcription factors, highly conserved in these three species, are required for the expression of the *aox* gene (Chae, Nargang, *et al.*, 2007; Sellem, Bovier *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2012). Surprisingly, they also have been shown in *P. anserina* and *A. nidulans* to be responsible for regulating the two key enzymes specific for gluconeogenesis that are phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK) and fructose-1,6-biphosphatase (FBP) (Sellem, Bovier *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2012). In *P. anserina*, these transcription regulators are also involved in lifespan control (Sellem, Bovier *et al.*, 2009).

In order to better understand the role of these transcription regulators in *P. anserina*, we have used a genetic approach and isolated several mutations screened for gain of function of the *aox* expression, all located in either genes *rse2* or *rse3* encoding the

transcription factors RSE2 and RSE3. Deletion of some positions corresponding to these mutations were constructed and analyzed for their effect on the expression of the *aox* gene. These data enabled us to propose a functional organization of the two transcriptional regulators. In parallel, we have compared the transcriptome of the wild-type and gain-of-function *rse2* and *rse3* mutants using oligonucleotide-based whole genome microarrays. The analysis of these data revealed two new potential direct targets of RSE2 and RSE3, including a gene encoding a flavohemoglobin, in addition to the *aox*, *fbp* and *pck* genes.

RESULTS

1° Isolation of novel mutants up-regulated for the expression of the alternative oxidase

Prior to this study, two alleles in gene *rse2* and one allele in gene *rse3* had been identified as responsible for constitutive expression of the alternative oxidase. These 2 genes encode two Gal4p-type C6 Zinc cluster proteins. In an effort to find potential additional genes controlling the alternative oxidase regulation, we used the screening strategy based on the isolation of mutations able to improve the phenotype of the respiratory mutant *cox5::ble* (Sellem, Bovier *et al.*, 2009). This mutant presents alteration in germinating and growing mycelium, reduction of the growth rate, female sterility and a spectacular increase in lifespan. All these characteristics are partially suppressed by overexpression of the alternative oxidase (Lorin *et al.*, 2001; Sellem, Bovier *et al.*, 2009). Of 40 *cox5::ble* cultures, 23 independent sectors appeared spontaneously fast growing. These revertant sectors were selected and crossed to wild-type. In all the cases, two types of *cox5::ble* ascospores were obtained: those giving rise to the original mutant phenotype (*cox5::ble* genotype) and those giving rise to an improved fast-growing mycelium (*cox5::ble*, *su* genotype) in accordance with the presence of extragenic suppressors in all the revertants. For each of the 23 strains carrying a suppressor mutation, genes *rse2* and *rse3*

were sequenced. Results showed that 8 strains contained a mutation in gene *rse2*, 10 in gene *rse3* and 5 contained no mutation in these 2 genes.

The mutations present in the 5 mutants that are not mutated for genes *rse2* or *rse3* are weak suppressors of the *cox5::ble* mutation. They restore the pigmentation of the mycelium and slightly improve the growth rate (of about 40%) but do not increase the germination rate of the *cox5::ble* mutant. The strains bearing these mutations in a *cox5+* context display a strong pigmentation of the mycelium and a premature senescence process. The expression of the *aox* gene in a strain can be evaluated by testing the ability of this strain to grow on a medium containing antimycin A. Antimycin A is an inhibitor of complex III leading to induction of the alternative oxidase. On this medium, the wild-type strain grows after a delay necessary for the induction whereas strains displaying a deregulated constitutive expression of the alternative oxidase grow without delay (Sellem, Bovier *et al.*, 2009). The 5 mutated strains behaved as the wild-type on antimycin A medium and RT-qPCR experiments confirmed that the *aox* gene is not activated in these strains (data not shown). We thus conclude that these mutations are not responsible for a deregulation of the expression of the alternative oxidase and that the suppressor effect of the *cox5::ble* mutation is based on an other pathway than the overexpression of the alternative oxidase. These mutants will be described elsewhere.

The positions of the newly identified and the previously published *rse2* and *rse3* mutations within the RSE2 and RSE3 protein sequences are shown in Figure 1. Analysis of the *rse2* sequence revealed that in our first annotation, exon 5 was truncated for 78 nucleotides. After correction of the sequence, the previously described *rse2*^{Y300D} and *rse2*^{G303S} mutations correspond to *rse2*^{Y326D} and *rse2*^{G329S} alleles. All the new alleles are substitutions except one in gene *rse3* that contains a 18bp-duplication of nucleotides causing a repeat of the amino acids 640-645. Two different mutations were identified that modify the amino acids E251 (E251K and

E251G), A438 (A438T and A438V), V626 (V626 M and V626L) in gene *rse3*. The mutations G634V in gene *rse3* and T449I in gene *rse2* were found twice independently. The screen is therefore practically saturated and has not identified additional genes others than *rse2* and *rse3* activating the alternative oxidase expression.

2° The RSE2 and RSE3 transcription factors are required for the coordinated expression of the alternative oxidase and the neoglucogenic genes but not for the expression of TCA cycle genes

In a previous study, we have shown that RSE2 and RSE3 activate the expression of the alternative oxidase and of the gluconeogenic genes *fbp* and *pck* (Sellem, Bovier *et al.*, 2009). *P. anserina* preferentially uses the cytochrome pathway to respire and glucose to grow but it can also use an alternative respiratory pathway in absence of the cytochrome pathway and gluconeogenesis in absence of glucose.

The connection between expression of the alternative oxidase and the gluconeogenic genes *fbp* and *pck* may not be obvious. It is observed when the wild-type strain is grown on a medium containing antimycin A Sellem, Bovier *et al.*, 2009 and Figure 2A). So, we reciprocally investigated the level of expression of the *aox* gene when the wild-type strain is grown on a medium containing acetate as sole source of carbon. As shown on Figure 2B, an increase of the expression of the *aox* gene (of about 3-fold) is also observed on this medium in parallel with an increase of about 9- and 50-fold respectively for the expression of the *fbp* and *pck* genes (required to grow on acetate). It seems therefore that the *aox*, *fbp* and *pck* genes belong to a transcriptional module that maintains a correlated expression in both respiratory deficiency or gluconeogenic conditions. The transcriptional induction of this module requires RSE2 and RSE3. We have previously shown that strains deleted for one or the other transcription factor ($\Delta rse2$ *rse3*⁺ and *rse2*⁺ $\Delta rse3$) are unable to grow on a medium containing antimycinA (Sellem, Bovier *et al.*, 2009). In the same way, the $\Delta rse2$ *rse3*⁺ and

rse2⁺ $\Delta rse3$ mutants grow very poorly on acetate and exhibit an extremely spindly mycelium and an extremely reduced growth rate. Interestingly, the double deletant $\Delta rse2$ $\Delta rse3$ shows no growth at all on acetate revealing a synergic effect between RSE2 and RSE3 for the activation of the gluconeogenesis pathway.

In a recent paper (Suzuki *et al.*, 2012), it is assumed that the orthologs of RSE2 and RSE3 in *Aspergillus nidulans* (AcuM and AcuK) are involved in the regulation of the genes encoding TCA cycle enzymes. This assumption is based on the fact that the expression of these genes is increased in ethanol relative to glucose as a source of carbon (David *et al.*, 2006) and that most of them contain a CCG(N)₇CCG binding motif of AcuM and AcuK. To check whether RSE2 and RSE3 have a role in the regulation of the expression of TCA cycle genes, we examined the expression of two genes encoding the putative mitochondrial citrate synthase CIT1 (Pa_3_6780) and the putative aconitase ACO1 (Pa_5_5970). These genes were identified from the genomic sequence (Espagne *et al.*, 2008) (<http://podospora.igmors.u-psud.fr>) using FUNGIpath (Grossetête *et al.*, 2010) to search for orthologues (<http://embg.igmors.u-psud.fr/fungipath/>). Their expression levels were measured by RT-qPCR after 6h of growth on acetate (Figure 2C) and after 6h of growth on medium containing antimycin A (Figure 2D). Both genes are up-regulated on acetate compared to M2 (dextrin): about 4-fold for Pa_3_6780 and 15-fold for Pa_5_5970 (Figure 2C). These results are in accordance with the data reported by David *et al.* (2006) in *A. nidulans* when cells are shifted from glucose to ethanol. However this up-regulation does not require RSE2 and RSE3 since it is also observed in the $\Delta rse2$ and $\Delta rse3$ mutants. Surprisingly, for an unknown reason, the expression of the 2 genes is even higher in the mutants than in the wild-type strain grown in the same conditions (Figure 2C). None of the two genes is up-regulated on antimycin A (Figure 2D). We can therefore conclude that in *P. anserina*, these two TCA cycle genes are not controlled by RSE2 and RSE3.

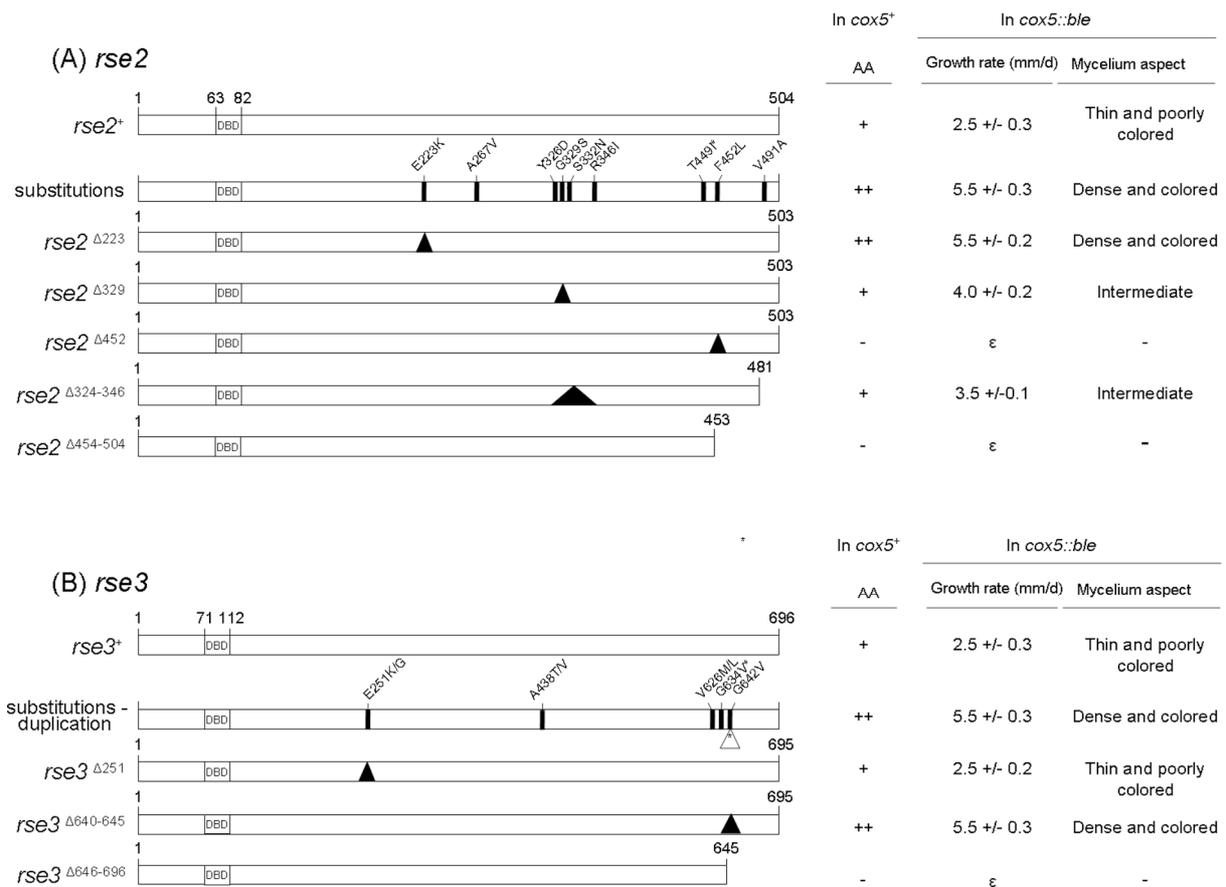


Figure 1: Identification of the mutations in the RSE2 and RSE3 proteins and properties of the mutated proteins.

Schematic representation of the RSE2 (A) and RSE3 (B) proteins. The C6 zinc cluster DNA-binding motif is indicated (DBD). The mutations screened as gain-of-function of the *aox* expression are indicated by a black line for substitutions and by a white triangle for the 18bp-duplication causing a repeat of the amino acids 640-645 inside the RSE3 protein. (*) means that the mutation was found in two mutants independently. The deletions created in each protein are shown by a black triangle. For each protein, the last line represents the protein truncated at the C-ter. In a *cox5+* context, the ability of the strains to grow on a medium containing 20µg/ml antimycin A is shown by +: growth after a delay, ++: growth without delay, -: no growth. In a *cox5::ble* context, the growth rate (in mm/d) and the mycelium aspect of the different strains is indicated. ε means that ascospores displayed a very long delay to germinate and yielded very tiny thalli that were almost or totally unable to grow further. The *rse2*^{Δ324-346} allele was integrated ectopically in a *Δrse2* strain (see text).

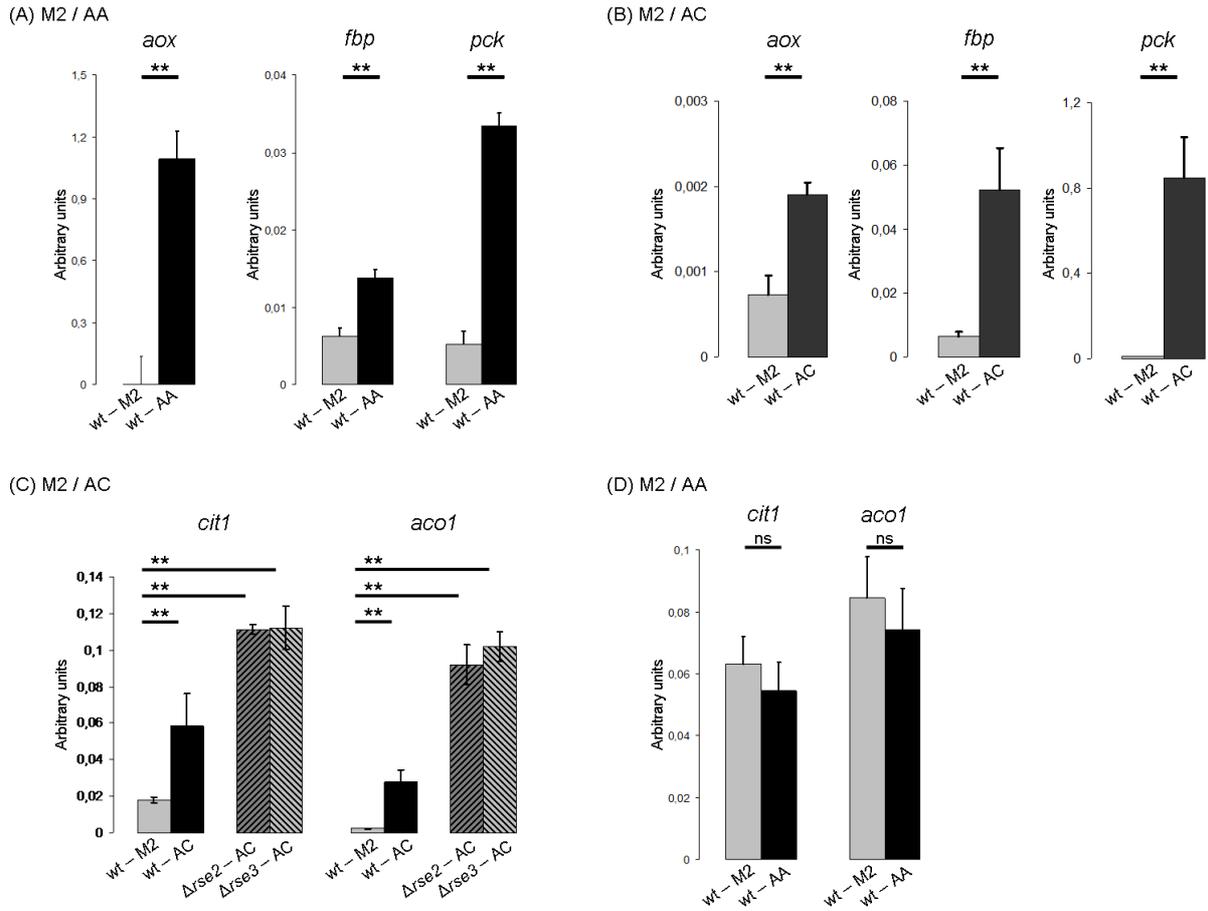


Figure 2: RT-qPCR analysis of the *aox*, *fbp*, *pck*, *cit1* and *aco1* transcript levels in different strains and cultures conditions.

Relative abundance of *aox*, *fbp* and *pck* transcripts in the wild-type strain grown during 6h on M2 + antimycin A (A) or acetate (B) and of *cit1* and *aco1* transcripts in the wild-type, $\Delta rse2$, $\Delta rse3$ grown during 6h on acetate (C) or during 6h on M2 + antimycin A (D). Total RNA was extracted from cultures of the wild-type grown under standard conditions (grey A, B, C, D) or in the presence of antimycin A (black, A, D) or acetate (black, B, C) and from cultures of the $\Delta rse2$ strain (dark shading, C) or the $\Delta rse3$ strain (grey shading, C) grown on acetate. Experiments were performed at least 3 times, ** $p < 0.05\%$ and ns: not significantly different (t test).

3° Transcriptional effects of the *rse2*^{Y326D} and *rse3*^{G642V} mutations

In order to identify more extensively the genes whose expression is controlled by RSE2 and RSE3, transcriptome profiling was conducted in the isogenic strains carrying *rse2*^{Y326D} or the *rse3*^{G642V} mutation or the double mutation *rse2*^{Y326D} *rse3*^{G642V}. Mutations *rse2*^{Y326D} and *rse3*^{G642V} render the RSE2 and RSE3 proteins constitutively active for the transcription of the *aox*, *fbp* and *pck* genes and there is strong evidence that the active transcription complex is the RSE2-RSE3 heterodimer. Both proteins are required to induce the alternative oxidase (Sellem, Bovier *et al.*, 2009) and to grow on acetate. Furthermore, the DNA binding domains of the two *N. crassa* orthologs (AOD2 and AOD5) are required to bind a sequence element in the *aox* promoter necessary for expression (Chae, Nargang, *et al.*, 2007). So, we searched for genes whose regulation was similar in the three strains *rse3*^{G642V}, *rse2*^{Y326D} and *rse2*^{Y326D} *rse3*^{G642V}. RNA was extracted from cultures grown 48h and prepared for hybridization (see Materials and Methods) to whole genome gene-expression microarrays developed for *P. anserina* (Bidard *et al.*, 2010). Genes with a fold-change ≥ 2 were defined as up-regulated and those with a fold-change ≤ 2 as down-regulated. A total of 267 genes were differentially transcribed in at least one of the mutant strain compared to the wild-type (Table S3) but only 28 genes listed in Table 1, were differentially transcribed in the same direction for each comparison (*rse2*^{Y326D} vs wild-type, *rse3*^{G642V} vs wild-type and *rse2*^{Y326D} *rse3*^{G642V} vs wild-type). It has been shown in *N. crassa*, that AOD2 and AOD5 bind to a CGG(N)7CGG motif (AIM motif) in the *aox* promoter and that this motif is required for expression of the gene (Chae, Lin, *et al.*, 2007; Chae, Nargang, *et al.*, 2007). This motif is conserved in the *aox* promoter of closely related species, specially in *P. anserina*. In order to discriminate potentially direct and indirect target genes, we searched for the presence of the AIM motif in the 5' region (1000pb upstream of the ATG) of the 28 differentially transcribed genes. Of the 28 genes, 13 contained one or more times the

AIM motif, in their upstream sequence (Table 1). Notably the *aox*, *pck* and *fbp* genes contain the motif, consistent with their activation by RSE2-RSE3. In a previous study (Sellem, Bovier *et al.*, 2009), the motif was not identified for *pck* and *fbp*, this may be due to a problem in the genome sequence data at the time.

The consistency of these microarray data with RT-qPCR analyses was tested for 6 genes selected to cover different FC values: *aox*, *pck*, *fbp*, *ndi1* that encodes an alternative NADH dehydrogenase (Maas *et al.*, 2010), Pa_2_6020 (*gdh*) and Pa_3_6960 (*gogat*) that respectively encode putative glutamate dehydrogenase and glutamate synthase, both involved in nitrogen metabolism. For all the genes except *ndi1*, the fold change displayed in microarray experiment was confirmed displayed by RT-qPCR. Gene *ndi1* had an FC value close to one in the RT-qPCR. Furthermore, whereas the genotype *nuo19.3::nat Δndi1* that leads to the inactivation of complex I and NDI1 is lethal (Maas *et al.*, 2010), the double mutant *nuo19.3::nat Δrse2* is viable (data not shown) indicating that RSE2 has no major role in the transcription of the *ndi1* gene.

The microarray data have been performed on *rse2* and *rse3* gain-of-function mutants. To check whether the RSE2 and RSE3 proteins are really involved in the regulation of the genes listed in Table 1, we investigated whether their transcription is activated in the wild-type strain but not in the $\Delta rse2$ strain grown for 6h in presence of antimycin A. We chose to look at Pa_2_6020 (*gdh*), Pa_3_6960 (*gogat*), Pa_6_4030, Pa_5_1700, and Pa_4_6210. The 3 last proteins have a putative assigned function: protein with a conserved α/β hydrolase domain (Pa_6_4030), flavohemoglobin (Pa_5_1700), pisatin demethylase (Pa_4_6210) (Table 1). We found that the *gdh* and *gogat* genes are not activated but rather expressed to a lower level in presence of antimycin A in both the wild-type and $\Delta rse2$ strains (data not shown). These genes are therefore false positives, not controlled by RSE2 and RSE3. One hypothesis to explain their activation in the *rse2*^{Y326D} and *rse3*^{G642V} mutants could be that the AIM motif

present in their promoter can be recognized by the mutated transcription factors. Results for Pa_6_4030, Pa_5_1700, and Pa_4_6210 are shown on Figure 3. They show that the transcription of Pa_4_6210 is induced on antimycin A but not regulated by RSE2. In contrast, the transcription of Pa_6_4030 and of Pa_5_1700 is activated on antimycin A and this activation requires RSE2.

Overall, the above results strongly suggest that the *aox*, *fbp*, *pck*, Pa_6_4030 and Pa_5_1700 are good candidates to be direct targets of the RSE2-RSE3 activator complex. All of them contain an AIM motif in their 5'upstream sequence, they are activated in presence of antimycin A and of mutated active forms of RSE2 and RSE3 and this activation depends on RSE2-RSE3.

Gene number	Gene name or function	Fold Change				[CGG(N) ₇ CGG] position (from ATG)
		<i>rse2</i> ^{Y326D}	<i>rse3</i> ^{G642V}	<i>rse2</i> ^{Y326D} <i>rse3</i> ^{G642V}		
Pa_3_1710	<i>aox</i>	13.06	9.99	10.09	-787 / -208	
Pa_4_3160	<i>pck</i>	11.59	10.32	10.88	-676 / -20	
Pa_5_1700	<i>fhb</i> *	6.08	6.67	4.95	-690	
Pa_6_4030	α / β hydrolase*	4.81	2.92	2.18	-617 / -151	
Pa_2_1020	unknown	4.00	2.87	2.3	-791	
Pa_7_1820	<i>ndi1</i>	3.37	3.25	2.9	-652	
Pa_1_21800	unknown	3.08	2.65	2.2	-850	
Pa_4_6210	pisatin demethylase*	3.08	2.35	3.87	-271	
Pa_5_12980	unknown ^a	2.76	4.17	4.75	-733 / -479 / -331	
Pa_2_6020	<i>gdh</i>	2.51	3.15	2.97	-821	
Pa_4_9360	<i>fbp</i>	2.38	2.35	2.41	-630	
Pa_3_6960	<i>gogat</i>	2.19	2.21	2.85	-499	
Pa_2_4180	unknown	-3.64	-3.39	-2.4	-100	
Pa_1_16790	plasma membrane NH ₄ transporter*	4.69	3.52	3.34	-	
Pa_4_3860	α / β hydrolase*	4.22	3.72	3.76	-	
Pa_7_1770	epoxide hydrolase*	3.75	3.96	6.06	-	
Pa_1_8440	unknown	3.26	3.04	2.65	-	
Pa_7_2940	unknown	3.12	2.40	2.38	-	
Pa_7_1230	plasma membrane zinc ion transporter*	3.07	2.53	2.39	-	
Pa_6_10	cytochrome P450*	2.32	2.33	2.16	-	
Pa_1_970	unknown	2.29	2.27	2.58	-	
Pa_7_2610	Zn(2) Cys(6) transcription factor*	2.23	2.35	2.66	-	
Pa_5_12810	unknown	-2.23	-2.33	-2.70	-	
cox3	<i>cox3</i>	-2.68	-2.33	-2.09	-	
Pa_2_9235	unknown	-3.01	-2.68	-3.62	-	
Pa_2_11900	<i>grg1</i>	-3.85	-4.19	-2.04	-	
Pa_7_3665	unknown	-4.96	-7.78	-3.52	-	
Pa_2_4820	fasciclin domain-containing protein*	-7.03	-5.58	-2.22	-	

Table 1: Main features of genes specifically regulated in the three mutant strains *rse2*^{Y326D} *rse3*^{G642V} and *rse2*^{Y326D} *rse3*^{G642V}

*: putative gene identification, Fold Change in mutant vs wild type comparison

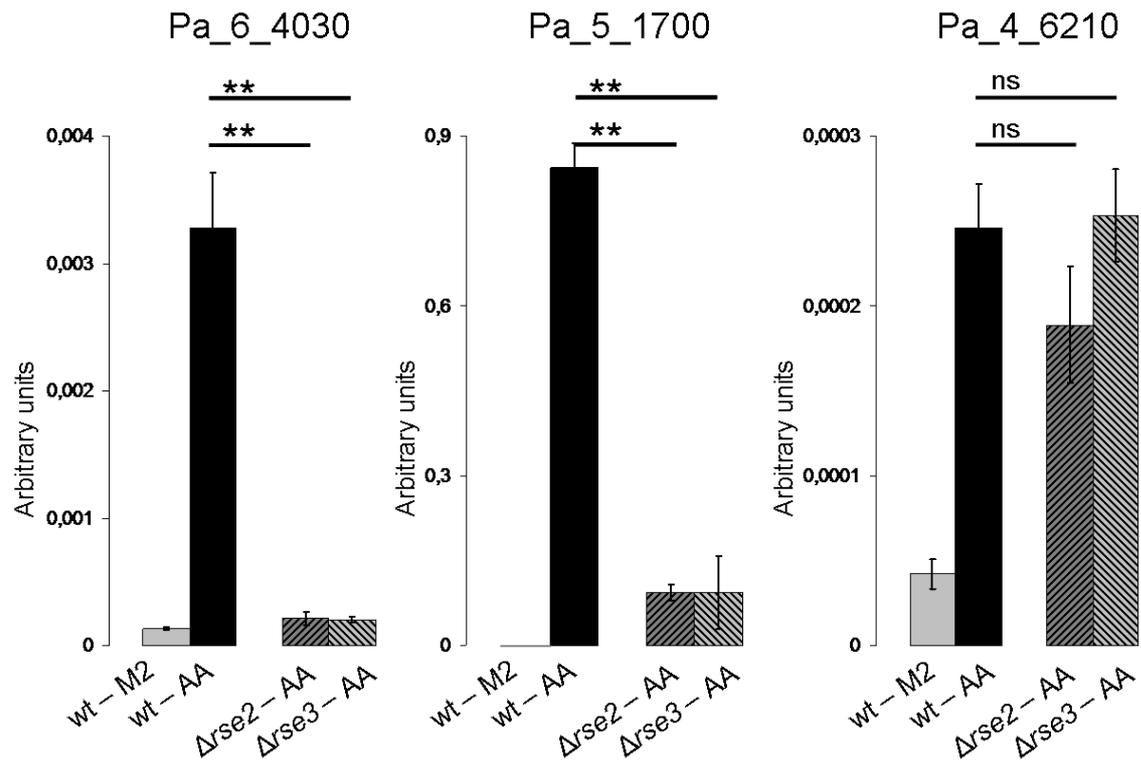


Figure 3: Relative abundance of the transcripts Pa_6_4030 , Pa_5_1700 and Pa_4_6210 measured by qRT-PCR experiments in the wild-type, $\Delta rse2$ and $\Delta rse3$ strains grown with or without antimycin A.

Total RNA was extracted from cultures of the wild-type grown under standard conditions (grey) or in the presence of antimycin A (black) or and from cultures of the $\Delta rse2$ strain (dark shading) or the $\Delta rse3$ strain (grey shading) grown during 6h on antimycine A. Experiments were performed at least 3 times, ** p < 0.05% and ns: not significantly different (t test).

4° Functional analysis of the RSE2 and RSE3 transcription factors

The 18 new *rse2* or *rse3* mutants recovered in this study share similar phenotypes. As the previously described *rse2*^{Y326D}, *rse2*^{G329S}, *rse3*^{G642V} mutants, they constitutively express the alternative oxidase at a high level as shown by their ability to grow without delay on a medium containing antimycin A in a *cox5+* context and to partially suppress the *cox5::ble* mutation defects (Figure 1). All the *rse2* and *rse3* mutations indicated on Figure 1 were dominant when recovered in a heterocaryotic mycelium containing *cox5::ble rse2+ rse3+* nuclei associated to *cox5::ble* nuclei carrying any of these *rse2* or *rse3* mutations. All of them correspond to gain-of-function mutations.

The functional organization of a prototypic Zn₂Cys₆ protein consists of an N-terminal Zn₂Cys₆ DNA-binding motif, a coiled-coil dimerisation region and a transcriptional activation region frequently C-terminal located (Schjerling and Holmberg, 1996). The central part of the protein often contains a middle homology region which is thought to play a role in regulating the transcriptional activity of the protein (Schjerling and Holmberg, 1996; Poch, 1997; MacPherson *et al.*, 2006).

The mutations obtained in *rse2* and *rse3* span in the half terminus of each protein, from amino acids 223 to 491 in the RSE2 protein (56% of the protein) and from amino acids 251 to 642 in the RSE3 protein (64% of the protein). Due to the relatively high frequency of these mutations, we hypothesized that at least some of these gain-of-function mutations could correspond to the loss of an inhibitory function.

To test this possibility, we first created a truncated RSE2 protein carrying an internal deletion of 23 amino acids (324-346), so as to remove a region that covers 4 substitution sites leading to a gain-of-function phenotype (Figure 1). The plasmid containing the mutant allele *rse2*^{Δ324-346} and a hygromycin resistance cassette was used to transform ectopically the *Δrse2* strain. Transformants resistant to hygromycin were selected and first tested on antimycin A. Our rationale was that the ability

to grow on this medium would mean that the *rse2*^{Δ324-346} transgene has retained its functionality since the recipient strain was *Δrse2*. Among 36 transformants tested, 10 were able to grow on antimycin A. Two of them were crossed with the *cox5::ble* strain leading to four genotypes containing the *cox5::ble* mutation: *cox5::ble Δrse2* spores that were unable to germinate as already described (Sellem, Bovier *et al.*, 2009), *cox5::ble rse2+* spores that displayed a growth rate of 2.5 ± 0.3 mm/d, *cox5::ble Δrse2 rse2*^{Δ324-346} and *cox5::ble rse2+ rse2*^{Δ324-346} spores that displayed a growth rate of 3.5 ± 0.1 mm/d. Viability of the *cox5::ble Δrse2 rse2*^{Δ324-346} strain confirmed that the truncated RSE2 protein is functional and its improved growth rate indicates that expression of the alternative oxidase is slightly more induced in presence of the truncated RSE2 protein than of the wild-type protein. This strongly suggests that the central portion of RSE2 displays a slight inhibitory function.

To examine more precisely the role of the central region of the RSE2 and RSE3 proteins, we then decided to introduce site specifically deletions of only one codon in the *rse2* and *rse3* genes. We chose to delete codons corresponding to residues E223, G329 or F452 in RSE2 and to residues E251 and A438 in RSE3. We also decided to delete the motif RDGKLE in RSE3 (640-645) whose duplication results in a gain of function. Moreover, to investigate whether the activation region of RSE2 and RSE3 is located in the most carboxy-terminal portion of the protein, the C-ter 51 amino acids of RSE2 (*rse2*^{Δ454-504}) and the C-ter 57 amino acids of RSE3 (*rse3*^{Δ646-696}) were also deleted.

We did not succeeded to obtain a plasmid carrying the deletion corresponding to A438 of RSE3 in *E. coli*. Several experiments were tempted that always gave a rearranged plasmid as if the construction was toxic in *E. coli*. All the other plasmids were obtained and the mutated alleles *rse2*^{Δ223}, *rse2*^{Δ329}, *rse2*^{Δ452}, *rse2*^{Δ454-504}, *rse3*^{Δ251}, *rse3*^{Δ640-645} and *rse3*^{Δ646-696} were introduced site specifically in the wild-type strain as previously described (El-Khoury *et al.*, 2008). The primary

transformants were crossed with the *cox5::ble* mutant and monocaryotic *cox5⁺* and *cox5::ble* spores bearing a mutated *rse2* or *rse3* allele (identified in the progeny by resistance to nourseothricin) were obtained. We followed the status of the mutated proteins via the transcription status of their target gene, the *aox* gene. Functionality of the mutated proteins was revealed by testing their ability to confer viability to a *cox5::ble* strain and to allow a *cox5⁺* strain to grow on a medium containing antimycin A. The inducible activation or the constitutive activity of the mutated proteins was tested in a *cox5⁺* context. An inducible activation is revealed by a delayed growth on antimycin A and by a very low level of *aox* mRNA in absence of antimycin A, a constitutive activity is revealed by a growth without delay on antimycin A and a high level of *aox* mRNA in absence of antimycin A. Till now, a constitutive activity of RSE2 or RSE3 is associated with a strong constitutive expression of the AOX and leads to a suppressor effect of the *cox5::ble* phenotype. Results are shown in Figure 1.

The deletion of residue 223 in the protein RSE2 as the deletion of the RDGKLE (640-645) motif in the protein RSE3 led to the same effect as did the E223K substitution and the duplication of the motif in each of the protein respectively, *i.e.*, a strong improvement of the *cox5::ble* phenotype and the ability for *cox5⁺* strain, to grow on antimycin A without delay. These deletions led therefore to constitutively activated proteins. The deletion of residue 329 in the protein RSE2 led to a weaker effect than the G329S substitution: it did not allowed to *cox5⁺* strains to grow without delay on antimycin A and led to a weak suppressor effect of the *cox5::ble* phenotype. The growth rate of the *cox5::ble rse2^{Δ329}* strain was 4.0 ± 0.2 mm/d compared to 2.5 ± 0.3 mm/d for *cox5::ble rse2⁺* and 5.5 ± 0.3 mm/d for *cox5::ble rse2^{G329S}*. These data indicate that the alternative oxidase is more expressed in presence of the *rse2^{Δ329}* allele than in presence of the wild-type allele *rse2⁺* but less than in presence of the *rse2^{G329S}* allele. Deletion of residue 329 in the protein RSE2 led therefore to a protein able to slightly activate the *aox*

gene in absence of activation signal. Deletion of residue 251 in the protein RSE3 maintained the functionality of the protein but did not result in a constitutively activated protein. The *cox5⁺ rse3^{Δ251}* and *cox5::ble rse3^{Δ251}* strains displayed the same phenotypes as *cox5⁺ rse3⁺* and *cox5::ble rse3⁺* strains respectively. Finally, the deletion of residue 452 in the protein RSE2 and that of the C-ter 51 amino acids in the proteins RSE2 (*rse2^{Δ454-504}*) and RSE3 (*rse3^{Δ646-696}*) abolish the function of these proteins: the *cox5⁺* strains were unable to grow on antimycin A and the *cox5::ble* ascospores displayed a very long delay to germinate (2 to 3 weeks instead of 4 days for *cox5::ble rse2⁺ rse3⁺* ascospores) and yielded very tiny thalli that were almost or totally unable to grow further. It is worth to note that the association of the deletion for the *rse2* or *rse3* genes to *cox5::ble* led to spores unable to germinate (Sellem, Bovier *et al.*, 2009).

These whole data strongly suggest that in RSE2 and RSE3, as in many Zn₂Cys₆ proteins, the activation domain is C-terminally located, after residue 645 in RSE3, encompassing residue 452 in RSE2. In contrast, the regions encompassing residues E223 and G329 in RSE2 and residues 640-645 in RSE3 seem to be involved in the response of these proteins to the inducer signal.

As noticed above, strong evidence suggests that the proteins RSE2 and RSE3 act in a heterodimeric complex. In seeking to better understand the respective role of each protein, we constructed *gpd-rse2* and *gpd-rse3* transgenes in which the coding sequence of both genes was fused to the strong promoter of gene *gpd* in order to overexpress the two proteins and test whether the overexpression of RSE3 is able to circumvent the requirement for RSE2 in the *aox* gene induction and *vice versa*. Each transgene was introduced ectopically in the wild-type strain and for each transgene, several independent secondary monocaryotic transformants were studied to avoid potential position effect of the transgene. The amount of *rse2* and *rse3* mRNAs was estimated by RT-qPCR experiments in two *gpd-rse2* (*gpd-rse2-t1* and *gpd-rse2-t2*) and two *gpd-rse3* (*gpd-rse3-t1*

and *gpd-rse3-t2*) transformants respectively. The expression of these two genes is low in the wild-type strain and was virtually unchanged in the *rse2*^{Y326D} and *rse3*^{G642V} mutants (Sellem, Bovier *et al.*, 2009). In contrast, it is increased about 7-fold and 50-fold in the *gpd-rse2-t1* and *gpd-rse2-t2* strains respectively and about 5-fold and 3-fold in the *gpd-rse3-t1* and *gpd-rse3-t2* strains. We used *cox5::ble gpd-rse3-t1* and $\Delta rse2$ or *cox5::ble gpd-rse2-t1* and $\Delta rse3$ as parents in genetic cross to obtain different genetic combinations. Tetrad analysis allowed us to determine the genotype of the meiotic products. This analysis revealed that the association *cox5::ble gpd-rse3-t1* $\Delta rse2$ and the association *cox5::ble gpd-rse2-t1* $\Delta rse3$ led to lethal spores unable to germinate. Hence, the overexpression of RSE3 does not permit to compensate the absence of RSE2 and *vice versa* for inducing the *aox* gene.

We previously showed that the lifespan of the *rse2*^{Y326D} and *rse3*^{G642V} mutants was slightly decreased and that of the $\Delta rse2$ and $\Delta rse3$ strains, significantly increased (Sellem, Bovier *et al.*, 2009). Lifespan of several new mutants was established. Results are given in Table 2. They show that the gain-of-function mutations of genes *rse2* and *rse3* do not significantly modify the lifespan. In contrast, as previously observed for the $\Delta rse2$ and $\Delta rse3$ strains, the lifespan of the loss-of-function strains *rse2* ^{$\Delta 452$} , *rse2* ^{$\Delta 454-504$} and *rse3* ^{$\Delta 640-645$} is increased (about 15 cm vs 9 cm for the wild-type).

Genotype	Lifespan (cm \pm standard error)
WT	8.6 \pm 1.9
<i>rse2</i> ^{E223K}	8.9 \pm 1.5
<i>rse2</i> ^{G329S}	7.6 \pm 1.1
<i>rse2</i> ^{F452L}	9.0 \pm 0.9
<i>rse2</i> ^{$\Delta 452$}	17.3 \pm 3.7
<i>rse2</i> ^{$\Delta 454-504$}	15.4 \pm 4.7
<i>rse3</i> ^{E251K}	7.1 \pm 0.7
<i>rse3</i> ^{$\Delta 251$}	9.0 \pm 1.4
<i>rse3</i> ^{$\Delta 640-645$}	7.7 \pm 1.1
<i>rse3</i> ^{$\Delta 646-696$}	12.6 \pm 1.9

Table 2: Lifespan of the different *rse2* and *rse3* mutants

Lifespans were measured on M2 medium at 27°C in race tubes on three subcultures derived from two to five independent spores. The mean lifespan is given in centimeters \pm standard error

DISCUSSION

The aim of this work was to gain further understanding in the role of RSE2 and RSE3 transcriptional factors of *P. anserina* that activate genes encoding the alternative oxidase and gluconeogenic enzymes.

Toward this end, we have initiated a genetic approach to isolate mutants involved in the expression of the *aox* gene in an attempt to identify potential partners to these transcriptional regulators. The screening procedure was a search for *cox5::ble* suppressors. Of the 23 suppressors analyzed, 8 fall in gene *rse2* and 10 in gene *rse3*, which, given the 3 previously described mutations (Sellem, Bovier *et al.*, 2009), correspond to 21 independent mutational events obtained in these 2 genes. The 5 mutations that do not fall in genes *rse2* or *rse3* are very weak suppressors and do not modify, at least significantly, the expression of the *aox* gene. Characterization of these mutations is likely to give new insights into the physiology of the *cox5::ble* respiratory deficient mutant. All the 10 mutations in gene *rse2* identify 9 positions of amino acid substitutions distributed in two regions in the half terminus of the protein (from positions 223 to 346 and positions 449 to 491). The mutation *rse2*^{T449I} has been found twice. All the 11 mutations in gene *rse3* identify 5 positions in the half terminus of the protein with a strong biased distribution in the end of the protein. Apart from the substitutions at positions 251 and 438, all the other mutations are clustered in a small fragment about 50 amino acids from the C-ter of the protein. Independent mutations at these positions have been obtained independently at least two times. It seems that for this gene, the screen is saturated. The screen has not identified new genes controlling the expression of the AOX, suggesting that no component other than the transcriptional regulators RSE2 and RSE3 are involved in the positive regulation of the *aox* gene.

To understand the functional importance of the residues that were recovered mutated in our screen of gain-of-function mutations, a number of them were deleted. Deletion of

E223 located in the middle of RSE2 as the deletion of the amino acids 640-645 at the C-ter of RSE3 convert these proteins in constitutive transcriptional activators. The deletion of G329 or of the amino acids 324-346 in RSE2 also activates the protein in absence of inducer (as revealed by the improved growth rate of the *cox5::ble* strain) but to a less extent. These data support the concept that as for many Zn₂Cys₆ transcription factors in *S. cerevisiae*, the central region of the RSE2 protein - around residue 223 and to a less extent around residue 329- contains sequences that inhibit the transcriptional activity of these proteins in absence of the inducer. This concept is based on several studies, for instance the occurrence of hot spots for gain-of-function mutations in the central region of the PDR1 and PDR3 genes (Carvajal *et al.*, 1997; Nourani *et al.*, 1997), the constitutive activation of Hap1p (Pfeifer *et al.*, 1989) and Leu3p (Friden *et al.*, 1989) after removal of a central region of these proteins. The substitutions found in the central part of the RSE2 protein might lead therefore to a loss of function of an inhibitory domain. The deletion of the C-ter 51 amino acids of RSE2 and RSE3 results in complete loss of function of the proteins. These data are consistent with a C-ter location of the activation domain in these proteins as in the majority of the zinc cluster proteins. The putative activation domain in protein RSE2 may overlap residue 452 (conserved in AOD2, AcuM and Rds2) since similar to the C-ter deletion, deletion of this residue caused loss of activation. According to this hypothesis, the gain-of-function F452V mutation might increase the activation function. In protein RSE3, the hot-spot for gain-of-function mutations is located about 50 amino acids from the C-ter of the protein, that is near or inside the putative activation domain. The mutations (substitutions, duplication or deletion of the residues 640-645) might therefore increase the activity of this domain by changing intramolecular interactions and unmasking the activation domain for instance. They also might enhance the interaction with auxiliary protein(s) resulting in an increased transcriptional

activity. It must be noticed however that no partner able to modulate the activity of RSE2 and RSE3 has been found in our screen. We cannot exclude however that these mutations located in the C-ter of RSE3 are loss-of-function mutations lying in a regulatory domain, though such a domain at the C-ter of this family of protein has never been described. Surprisingly, residue 251 is apparently dispensable since its deletion has no impact on the activity of the protein, whereas the E251K/G substitutions render the protein constitutively activated.

It is noteworthy that most of the changes isolated in the proteins RSE2 and RSE3 affect conserved residues in their orthologs. In protein RSE2, the residues Y326, G329, F452, R346 are conserved in AOD2 (*N. crassa*), AcuM (*A. nidulans*) and Rds2 (*S. cerevisiae*) and E223 is conserved in AOD2 and AcuM. In protein RSE3, the residues E251, G634 and G642 are conserved in AOD5 (*N. crassa*) and AcuK (*A. nidulans*) and V626 is conserved in AOD5. This conservation strongly suggests that these positions are significantly functional.

In *S. cerevisiae*, the Zn₂Cys₆ transcription factors Oaf1p and Pip2p act in an heterodimer complex to activate oleate-responsive genes (Karpichev and Small, 1998; Rottensteiner *et al.*, 1997; Baumgartner *et al.*, 1999). However Oaf1p overproduced in the absence of Pip2p allows oleate induction of a reporter gene (Baumgartner *et al.*, 1999). We show here that neither the overexpression of RSE3 (of about X5) nor that of RSE2 (of about X50) is able to circumvent the requirement for the other partner, consistent with the notion that the heterodimeric form is essential for activity.

A genome-wide study on the transcriptome of mutants constitutively activated for RSE2 and RSE3, *rse2*^{Y326D}, *rse3*^{G642V} and *rse2*^{Y326D} *rse3*^{G642V} confirmed that these activated forms up-regulate the *aox*, *fbp* and *pck* genes and also 19 others. In contrast, they down regulate 7 genes. In only 13 genes including *aox*, *pck* and *fbp*, the conserved binding motif CGG(N)₇CGG identified in the *N. crassa aox* promoter (Chae, Lin, *et al.*, 2007) was found. We were interested in the genes of

this category that encode an identified or putative function. We showed that the genes encoding the orthologs of *gogat* and *gdh*, up-regulated in the mutants are not activated in presence of antimycin A. This indicates that the mutant activated forms of RSE2 and RSE3 are different from the activated form when the electron chain is impaired. The gene encoding putative pisatin demethylase whose orthologs in fungal pea-pathogens are important for detoxifying host defensive chemicals (Delserone *et al.*, 1999; Coleman *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2003; George and VanEtten, 2001; Funnell *et al.*, 2002) showed enhanced expression in the mutants and in presence of antimycin A but is RSE2 and RSE3 independent. It is also the case for *cit1* and *aco1*, two TCA cycle genes up-regulated in presence of acetate, in a RSE2 and RSE3 independent manner. These data indicate that there are other pathways of cross talk between mitochondria and nucleus in addition to RSE2 and RSE3. Finally, only the expression of Pa_6_4030 and Pa_5_1700 correlates with that of the *aox*, *fbp* and *pck* genes. They are up-regulated in the gain-of-function *rse2* and *rse3* mutants and also in presence of antimycin A and their regulation is RSE2-RSE3 dependant. The fact that the *aox*, *fbp*, *pck*, Pa_6_4030, Pa_5_1700 genes contain at least one CGG(N)₇CGG motif in their promoter region suggests that they may be direct targets of RSE2-RSE3. The Pa_6_4030 encodes a protein with a putative α/β hydrolase domain whose function is unknown. Pa_5_1700 encodes a putative flavohemoglobin. This family of proteins, which appears widely distributed in bacteria and fungi, is known to function in nitric oxide (NO) detoxification, converting the NO radical to nitrate (Gardner *et al.*, 1998; Foster *et al.*, 2009). Multiple *Fhb* genes are found in the genomes of many fungi such as aspergilli (Zhou *et al.*, 2011; Schinko *et al.*, 2010). The *P. anserina* genome shows two highly conserved putative FHbs (Pa_5_1700 and Pa_1_3460) but only one responds to impaired respiration and depends on RSE2-RSE3. Its cellular location (mitochondrial or cytosolic) is unknown. Besides NO metabolism and detoxification, the physiological functions of

FHbs remain unclear. Fhb of *Saccharomyces cerevisiae* (YHb) has been proposed to be activated in presence of antimycin A and to protect against oxidative stress (Zhao *et al.*, 1996) but this function has been questioned (Buisson and Labbe-bois, 1998). In aspergilli, FHbs have been biochemically characterized as NO dioxygenases (Zhou *et al.*, 2009) with the unexpected function in promoting oxidative stress (Zhou *et al.*, 2010). In *P. anserina*, deletion of Pa_5_1700 confers hypersensitivity to H₂O₂ (data not shown), suggesting that this flavohemoglobin could play a role in the genetic response to oxidative stress. In *A. nidulans*, the *fhbA* gene was found coregulated with nitrate assimilation genes. The authors propose that this coregulation may be relevant to nitrogen metabolism under special ecological conditions known to generate high NO concentrations (Schinko *et al.*, 2010).

The relevance of the coregulation of the *aox*, *fbp*, *pck* and *fhb* genes in *P. anserina* remains to be understood. AOX has been documented to contribute to both reduction of the reactive oxygen species generated by mitochondria and regulation of the energy production (Joseph-Horne *et al.*, 2001). It is up-regulated by oxidative stress in *P. anserina* (Borghouts *et al.*, 2001) and several pathogen fungi (Magnani *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2011). Interestingly, in the dimorphic human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, genes from the glyoxylate cycle and the *aox* gene are up-regulated during the mycelial to yeast form transition (Tavares *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2005; Goldman *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2006; Felipe *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2011).

Some answers to the question of the relevance of this coregulation may be provided by preliminary data obtained from a metabolomic study conducted on the wild-type strain grown in presence of antimycin A. This study revealed an elevation of a number of amino acids and fatty acids (data not shown). A possible explanation for this observation is that when the respiratory chain is impaired, it is important to slow down the TCA cycle and to oxidize the reducing equivalents derived from the TCA

cycle by other ways than the deficient respiratory chain. Using TCA intermediates for gluconeogenesis, amino acids and fatty acids biosynthesis might constitute efficient ways to slow down the TCA cycle and oxidize reducing equivalents. Concerning the flavohemoglobin, besides its potential role in the response to oxidative stress, there is strong evidence for a connection between NO turnover and the maintenance of the redox balance (Igamberdiev and Hill, 2009). So, the coregulation of the AOX, gluconeogenesis enzymes and flavohemoglobin might respond to the necessity to maintain the redox balance when the respiration chain is impaired.

We previously reported that the gain-of-function mutants *rse2*^{Y326D} and *rse3*^{G642V} displayed a slight decreased lifespan whereas the *Δrse2* and *Δrse3* deletants showed an increased lifespan (Sellem, Bovier *et al.*, 2009). We did not recover a clear decrease of lifespan for the gain-of-function mutants described here but notably, the three loss-of-function mutations (*rse2*^{Δ452}, *rse2*^{Δ452-504}, *rse3*^{Δ646-696}) led to an increased lifespan. These results strongly suggest that the RSE2 and RSE3 transcription factors control the expression of one or several genes that contribute to shortening lifespan. It is neither the *aox* or *fbp* or *pck* or *fhb* genes whose deletion has no impact on the lifespan (Lorin *et al.*, 2001 and data not shown). Since the increase of lifespan is observed in standard growth conditions, that means that RSE2 and RSE3 may be active in absence of induction. It would be interesting to identify the genes whose expression is changed in the *Δrse2* and *Δrse3* mutants. This should allow us to gain new insights into the role of these transcription factors and to characterize their direct and indirect targets in absence of induction.

***P. anserina* strains, growth conditions, genetic analysis, lifespan measurements and transformation**

All the strains used in this study derived from the « s » wild-type strain. The long-lived *cox5::ble* strain has been described in Dufour *et al.*, 2000. The *rse2*^{Y326D}, *rse2*^{G329S} (initially referred as *rse2*^{Y300D}, *rse2*^{G303S}, see text), *rse3*^{G642V}, *Δrse2*, *Δrse3* and *Δrse2Δrse3* strains have been described in Sellem, Bovier *et al.*, 2009. The *ΔKu70* strain provides an efficient method for gene deletion and allelic replacement (El-Khoury *et al.*, 2008). Standard culture conditions, media and genetic methods for *P. anserina* have been described (Rizet and Engelmann, 1949; Esser, 1974). The M2 medium is a minimal medium in which carbon is supplied as dextrin (0.5%) and nitrogen as urea (0.05%). Acetate medium is a minimal media in which dextrin is replaced by sodium acetate (1.4%). When necessary, hygromycin, nourseothricin and antimycin A were added to the medium at 75 μg/ml, 50 μg/ml and 20 μg/ml, respectively. The germination medium (G) contains ground corn meal and ammonium acetate.

Lifespan were measured on M2 medium on three subcultures derived from two to five independent spores exhibiting a given genotype as previously described (Sellem, Bovier *et al.*, 2009).

Transformation of *P. anserina* was carried out as described (Bergès and Barreau, 1989) on protoplasts obtained by incubation with 40mg/ml glucanex (Laffort)

Quantitative RT-PCR experiments:

For RNA extraction, the different strains were grown on cellophane sheets (Bio Rad) overlaid on Petri dishes containing M2 medium for 48h at 27°C. The cellophane sheets were then transferred on Petri dishes containing M2 (control) or M2 supplemented with antimycin A (M2+AA) or acetate medium (AC) for incubation during 6h at 27°C. Mycelia were harvested, flash frozen in liquid nitrogen and grinded in a Fastprep apparatus (MP Bio) with glass beads and RLT buffer provided with the RNA extraction kit (RNeasy plant Kit (Qiagen)). For quantitative RT-PCR analysis, 2μg of total RNA freshly extracted was reverse transcribed with oligo (dT)₂₀ using the Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). RT-qPCR amplification mixtures (10μL) was performed with the LightCycler® 480 SYBR Green I Master kit (Roche) on 2μL of a 1/10 dilution of the reverse transcription reaction.

Reactions were run on and red in a LightCycler® 480 real-time PCR system (Roche). Data were analyzed with a software using the “second derivative” method of quantification. The cycling condition comprised 5 min at 95°C and 40 cycles at 95°C for 10 sec, 60°C for 20 sec and 72°C for 20 sec. Each plate contained cDNA samples representing all of the conditions examined for one gene, a standard curve of three serial dilutions points (1/4 dilutions). All measures were performed with two biological replicates for each condition. For microarray validation, the biological replicates used for RT-qPCR were different from those used in microarray experiments. Gene specific primers used was listed in Table S1. For all genes, a non-reverse transcribed control was performed on each biological replicate under the same conditions as the reverse-transcribed samples to control the absence of genomic DNA contamination. The reference gene used was Pa_3_5110 (gene *gpd* encoding the glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) as previously described in Sellem et al, 2009.

Construction of *P. anserina* strains carrying mutated *rse2* and *rse3* alleles

The mutations *rse2*^{Δ223}, *rse2*^{Δ329}, *rse2*^{Δ452}, *rse2*^{Δ454-504}, *rse3*^{Δ251}, *rse3*^{Δ640-645}, *rse3*^{Δ646-696} were introduced in *P. anserina* by gene replacement according to the protocol described in (El-Khoury et al., 2008). For each construction, the strategy used is the same, represented in Figure S1. 1) Three PCR fragments were obtained from wild-type genomic DNA using primers A and B, C and D, E and F. Primers B and C are antisense primers designed with the desired mutation (i.e. deletions of 3, 18 or 153 nucleotides). Primers D and E are head to tail primers located 200-400 nucleotides downstream from the stop codon (i.e. downstream from the polyadenylation site of the transcript), the final point of integration of the nourseothricin resistance cassette on the chromosome. The list of the different A, B, C, D, E, F primers used for the construction of the different mutants is given in Table S2. 2) In a second step, the ABCD fragment was amplified from AB and CD purified fragments using primers A and D. 3) In a third step, the fragment EF/ABCD was generated by amplification from the ABCD and EF purified fragments using primers E and D, thanks to the homologous region designed between primer A and F (*En1* restriction site plus 3-6 nucleotides). The resulting EF/ABCD fragment (containing the mutation) was introduced in the pAPI508 vector (containing the *nat1* cassette, (El-Khoury et al., 2008)) thanks to the restriction sites (*En2* and

En3) introduced in the design of primers D and E. The recombinant plasmid generated was controlled by sequencing and linearized thanks to the restriction site introduced with primers A and F (*En1*) and used for transformation in the *ΔKu70* *P. anserina* strain. Nourseothricin primary transformants were selected. The gene replacement event was controlled by PCR analysis and sequenced. A primary transformant was crossed with wild-type strain to eliminate the *ΔKu70* mutation. The same strategy was used with a wild-type fragment AD (without mutation) in order to generate a control vector and test the effect of the presence of a selectable marker alone near the target gene.

The deletion of 23 aminoacids in *rse2* (*rse2*^{Δ324-346}) was achieved by ectopic integration of a pBCHygro vector (Silar et al, 1995) containing the entire *rse2* sequence (modified ORF and 500 nucleotides flanking sequences) in a *Δrse2* strain. The deleted sequence was amplified in two steps: AB and CD fragments were first amplified from wild-type genomic DNA using primers A, B, C, D. The ABCD fragment was generated by amplification from the two former primers A and D, then cloned into the pBCHygro vector according to the restriction sites (*En1* and *En2*) introduced in primers A and D. The recombinant plasmid generated was controlled by sequencing and used for transformation in *Δrse2* strain. Hygromycin primary transformants were selected. The progeny of two primary transformants were further analyzed.

The *gpd-rse2* and *gpd-rse3* strains were obtained by ectopic integration of a pBCHygro vector containing the *rse2* or *rse3* coding sequences under the control of the strong constitutive promoter of the *gpd* gene. 350 nucleotides upstream from the ATG of *gpd* gene were amplified with primers A and B. The *rse* coding sequences (2670nt for *rse2* -2450nt for *rse3*) and 200-400 nucleotides downstream from the stop codon were amplified with primers C and D (B and C are two antisense primers designed at the *gpd/rse* junction surrounding the ATG start codon). The second step of amplification with primers A and D produced the chimeric fragment AD introduced into pBCHygro thanks to restriction sites (*En1* and *En2*) present in primers A and D. The recombinant vector, checked by sequencing, was introduced into wild-type protoplasts of *P. anserina*. Hygromycin resistant primary transformants were selected and the progeny of 3-6 was analyzed.

Labelling of cDNA, hybridization and microarray analyses

The construction and optimization of gene expression microarrays for *P. anserina* has been described previously (Bidard *et al.*, 2010). Briefly, the microarrays consisted of a 4644K platform (AMADID 018343, Agilent, Santa Clara, USA) containing 10,556 probes on each array with each probe present in four replicates. For the transcriptome microarray experiments, target preparation, hybridization and washing were performed according to the two-color microarray-based gene expression analysis instructions (version 5.0, February 2007) as described by the manufacturer (Agilent). One-microgram aliquots of total RNA were amplified and Cy-labelled with Agilent's Low RNA input fluorescent linear amplification (LRILAK) PLUS kit and the Two-Color RNA Spike-in Kit (Agilent). The labelling efficiency and the product integrity were checked as described previously (Imbeaud *et al.*, 2005). Four biological replicates labelled with Cy-3, for each of the different experimental conditions were compared with a common reference labelled with Cy-5, in indirect comparisons. The common reference was obtained by mixing RNA extracted from the different conditions as indicated in (Bidard *et al.*, 2010). A total of 825 ng of each of the Cy3- and Cy5-labeled targets was mixed and incubated on microarray slides for 17 h at 65°C in a rotating oven (10 rpm) using an Agilent in situ hybridization kit (Agilent). The slides were washed and dried by centrifugation at 800 rpm for 1 min. Microarrays were scanned using the Agilent DNA microarray Scanner (Agilent) at a resolution of 5 microns using the extended dynamic range (XDR) feature. Spot and background intensities were extracted with the Feature Extraction (FE, v9.5.3) software (Agilent, Santa Clara, USA) using the GE2-v4_95_Feb07 default protocol. Preliminary array quality was assessed through the use of Agilent control features as well as spike-in controls (Agilent 2-Color Spike-in Kit for RNA experiment). Subsequent flagging was done according to the GenePix Pro software (Molecular Devices Sunnyvale, USA) nomenclature, which included four flag levels (good [100], bad [2100], not found [250], moderate [0]). FE-software normalized data (Lowess normalized, local background subtracted) were processed with MAnGO (Marisa *et al.*, 2007). A moderated t test with adjustment of p-values (Benjamini and Hochberg, 1995) was computed to measure the significance of each difference of expression. Genes were considered as differentially transcribed if their transcript levels showed a ≥ 2 -

fold change ($FC \geq 2$) or ≤ 2 -fold change ($FC \leq -2$) with a p-value of < 0.005 .

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to Karine Budin and Yves Daubenton-Carafa for their help in the analysis of the transcriptomic data. We also are grateful to Christian Vélot for helpful discussion on fungi metabolism. We thank Elodie Tran and Aurélien Raveux for the construction of the several strains analyzed in this study. This work was supported by a fellowship from FRM to EB.

REFERENCES

- Akhter, S. et al.** (2003). Role of Alternative Oxidase Gene in Pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Role of Alternative Oxidase Gene in Pathogenesis of Cryptococcus neoformans. Infection and immunity* 71: 5794-5802.
- Baumgartner, U. et al.** (1999). Functional Analysis of the Zn 2 Cys 6 Transcription Factors Oaf1p and Pip2p. *The Journal of biological chemistry* 274: 22208-22216.
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y.** (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc Ser B (Statistical Methodology)* 57: 289-300.
- Bergès, T. and Barreau, C.** (1989). Heat shock at an elevated temperature improves transformation efficiency of protoplasts from *Podospira anserina*. *Journal of general microbiology* 135: 601-4.
- Bidard, F. et al.** (2010). A general framework for optimization of probes for gene expression microarray and its application to the fungus *Podospira anserina*. *bmc research notes* 3: 171.
- Borghouts, C. et al.** (2001). Copper-Modulated Gene Expression and Senescence in the Filamentous Fungus *Podospira anserina*. *Molecular and cellular biology* 21: 390-399.
- Buisson, N. and Labbe-bois, R.** (1998). Flavohemoglobin Expression and Function in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 273: 9527-9533.
- Carvajal, E. et al.** (1997). Molecular and phenotypic characterization of yeast PDR1 mutants that show hyperactive transcription of various ABC multidrug transporter genes. *Molecular & general genetics* : MGG 256: 406-15.
- Chae, M.S., Lin, C.C., et al.** (2007). Identification of an alternative oxidase induction motif in the promoter region of the aod-1 gene in *Neurospora crassa*. *Genetics* 175: 1597-606.

- Chae, M.S., Nargang, C.E., et al. (2007).** Two zinc-cluster transcription factors control induction of alternative oxidase in *Neurospora crassa*. *Genetics* 177: 1997-2006.
- Clifton, R. et al. (2006).** Alternative oxidases in Arabidopsis: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochimica et biophysica acta* 1757: 730-41.
- Coleman, J.J. et al. (2011).** Characterization of the Gene Encoding Pisatin Demethylase (FoPDA1) in *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 1482-1491.
- Delserone, L.M. et al. (1999).** Pisatin demethylation by fungal pathogens and nonpathogens of pea: association with pisatin tolerance and virulence. *physiological and molecular plant pathology* 55: 317-326.
- El-Khoury, R. et al. (2008).** Gene deletion and allelic replacement in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Current genetics* 53: 249-58.
- Espagne, E. et al. (2008).** The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserina*. *Genome biology* 9: R77.
- Esser, K. (1974).** *Podospora anserina*. In *Handbook of Genetics*, R.C. King, ed (Plenum Press, New York), pp. 531-551.
- Felipe, M.S.S. et al. (2005).** Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *The Journal of biological chemistry* 280: 24706-14.
- Ferreira, M.E.D.S. et al. (2006).** Transcriptome analysis and molecular studies on sulfur metabolism in the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Molecular genetics and genomics* : MGG 276: 450-63.
- Figueira, T.R.S. and Arruda, P. (2011).** Differential expression of uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase in the plant response to stress. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 43: 67-70.
- Foster, M.W. et al. (2009).** A genetic analysis of nitrosative stress. *Biochemistry* 48: 792-9.
- Friden, P. et al. (1989).** A large internal deletion converts yeast LEU3 to a constitutive transcriptional activator. *Molecular and cellular biology* 9: 4056-60.
- Funnell, D.L. et al. (2002).** Identification of new pisatin demethylase genes (PDA5 and PDA7) in *Nectria haematococca* and non-Mendelian segregation of pisatin demethylating ability and virulence on pea due to loss of chromosomal elements. *Fungal genetics and biology* : FG & B 37: 121-33.
- Galdieri, L. et al. (2010).** Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase. *Omics : a journal of integrative biology* 14: 629-38.
- Gardner, P.R. et al. (1998).** Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 10378-83.
- George, H.L. and VanEtten, H.D. (2001).** Characterization of pisatin-inducible cytochrome p450s in fungal pathogens of pea that detoxify the pea phytoalexin pisatin. *Fungal genetics and biology* : FG & B 33: 37-48.
- Goldman, G.H. et al. (2003).** Expressed Sequence Tag Analysis of the Human Pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* Yeast Phase: Identification of Putative Homologues of *Candida albicans* Virulence and Pathogenicity Genes. *eucaryotic cell* 2: 34-48.
- Grossetête, S. et al. (2010).** FUNGIpath: a tool to assess fungal metabolic pathways predicted by orthology. *BMC genomics* 11: 81.
- Harms, H. et al. (2011).** Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature reviews. Microbiology* 9: 177-92.
- Igamberdiev, A.U. and Hill, R.D. (2009).** Plant mitochondrial function during anaerobiosis. *Annals of botany* 103: 259-68.
- Imbeaud, S. et al. (2005).** Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic acids research* 33: e56.
- Inoue, K. et al. (2012).** Cytological evaluation of the effect of azoxystrobin and alternative oxidase inhibitors in *Botrytis cinerea*. *FEMS microbiology letters* 326: 83-90.
- Joseph-Horne, T. et al. (2001).** Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochimica et biophysica acta* 1504: 179-95.
- Karpichev, I.V. and Small, G.M. (1998).** Global regulatory functions of Oaf1p and Pip2p (Oaf2p), transcription factors that regulate genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 18: 6560-70.
- Khan, R. et al. (2003).** A binuclear zinc transcription factor binds the host isoflavonoid-responsive element in a fungal cytochrome p450 gene responsible for detoxification. *Molecular Microbiology* 49: 117-130.
- Lorin, S. et al. (2001).** Overexpression of the alternative oxidase restores senescence and fertility in a long-lived respiration-deficient

mutant of *Podospora anserina*. Molecular microbiology 42: 1259-67.

Maas, M.F.P.M. et al. (2010). Molecular gene therapy: overexpression of the alternative NADH dehydrogenase NDI1 restores overall physiology in a fungal model of respiratory complex I deficiency. Journal of molecular biology 399: 31-40.

MacPherson, S. et al. (2006). A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR 70: 583-604.

Magnani, T. et al. (2008). Silencing of mitochondrial alternative oxidase gene of *Aspergillus fumigatus* enhances reactive oxygen species production and killing of the fungus by macrophages. Journal of bioenergetics and biomembranes 40: 631-6.

Marisa, L. et al. (2007). MAnGO: an interactive R-based tool for two-colour microarray analysis. Bioinformatics (Oxford, England) 23: 2339-41.

Martins, V.P. et al. (2011). Involvement of an alternative oxidase in oxidative stress and mycelium-to-yeast differentiation in *Paracoccidioides brasiliensis*. Eukaryotic cell 10: 237-48.

Nourani, a et al. (1997). Clustered amino acid substitutions in the yeast transcription regulator Pdr3p increase pleiotropic drug resistance and identify a new central regulatory domain. Molecular & general genetics : MGG 256: 397-405.

Nunes, L.R. et al. (2005). Transcriptome Analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* Cells Undergoing Mycelium-to-Yeast Transition. eukaryotic cell 4: 2115-2128.

Pfeifer, K. et al. (1989). Functional dissection and sequence of yeast HAP1 activator. Cell 56: 291-301.

Poch, O. (1997). Conservation of a putative inhibitory domain in the GAL4 family members. Gene 184: 229-235.

Polidoros, A.N. et al. (2009). Aox gene structure, transcript variation and expression in plants. Physiologia plantarum 137: 342-53.

Rizet, G. and Engelmann, C. (1949). Contribution à l'étude génétique d'un ascomycète tétrasporé: *Podospora anserina*. Rehm Rev Cytol Biol Veget 11: 201-304.

Rottensteiner, H. et al. (1997). A heterodimer of the Zn₂Cys₆ transcription factors Pip2p and Oaf1p controls induction of genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. European journal of biochemistry / FEBS 247: 776-83.

Ruiz, O.H. et al. (2011). Alternative oxidase mediates pathogen resistance in *Paracoccidioides*

brasiliensis infection. PLoS neglected tropical diseases 5: e1353.

Schinko, T. et al. (2010). Transcriptome analysis of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans* reveals connections to nitric oxide metabolism. Molecular microbiology 78: 720-38.

Schjerling, P. and Holmberg, S. (1996). Comparative amino acid sequence analysis of the C6 zinc cluster family of transcriptional regulators. Nucleic acids research 24: 4599-607.

Sellem, C.H., Bovier, E. et al. (2009). Mutations in two zinc-cluster proteins activate alternative respiratory and gluconeogenic pathways and restore senescence in long-lived respiratory mutants of *Podospora anserina*. Genetics 182: 69-78.

Silar, P. et al. (2011). Fungi as a promising tool for bioremediation of soils contaminated with aromatic amines, a major class of pollutants. Nature reviews. Microbiology 9: 477.

Sun, J. et al. (2012). Deciphering transcriptional regulatory mechanisms associated with hemicellulose degradation in *Neurospora crassa*. Eukaryotic cell.

Suzuki, Y. et al. (2012). Reprogramming of carbon metabolism by the transcriptional activators AcuK and AcuM in *Aspergillus nidulans*. Molecular microbiology.

Tavares, A.H.F.P. et al. (2007). Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. Microbes and infection / Institut Pasteur 9: 583-90.

Thomazella, D.P.T. et al. (2012). The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. The New phytologist 194: 1025-1034.

Tian, C. et al. (2009). Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*. Proceedings of the National Academy of Sciences 106: 22157-22162.

Turcotte, B. et al. (2010). Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. FEMS yeast research 10: 2-13.

Zhao, X.-jian et al. (1996). Function and Expression of Flavohemoglobin in *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of biological chemistry 271: 25131-25138.

Zhou, S. et al. (2010). *Aspergillus oryzae* flavohemoglobins promote oxidative damage by hydrogen peroxide. Biochemical and biophysical research communications 394: 558-61.

Zhou, S. et al. (2009). Cloning and characterization of two flavohemoglobins from

Aspergillus oryzae. Biochemical and biophysical research communications 381: 7-11.

Zhou, S. *et al.* (2011). Functional analysis and subcellular location of two flavohemoglobins from *Aspergillus oryzae*. Fungal genetics and biology: FG & B 48: 200-7.

Supplementary data

gene number	gene name	primers (5' to 3')
Pa_5_5970	<i>aco1</i>	CCTGGGAGTTGAAGGCTCC TCAGCTTAACACCGATAACC
Pa_3_1710	<i>aox</i>	GAGGAAATGTTGGCAGTGGT GATGTCTGTTCCCCATCGAC
Pa_3_6780	<i>cit1</i>	CTCCTCCAAGACCCAGACCCTC GACCTTGGAGCCATGCTCCTTTC
Pa_4_9360	<i>fbp</i>	CACCGGTGACTTTACGCTCC GGAGAATTGGAGGGCGTGCC
Pa_5_1700	<i>fhb</i>	TACGAGTTTGGAGACATGCG GAGTCACCCAGGAACAAACC
Pa_2_6020	<i>gdh</i>	CCCTCACTGGCTTGATGATG GCCGGTAAGGACACCAG
Pa_3_6960	<i>gogat</i>	TCTACGAGCGTGCTGACC GGTGGCGATGATGACAGC
Pa_3_5110	<i>gpd</i>	CACCGAGGACGAGATTGTCT TCAGGGAGATACCAGCCTTG
Pa_7_1820	<i>ndi1</i>	CTTATTCCTCCACGACATCGC GGAATTGGGGGACGATGACG
Pa_4_3160	<i>pck</i>	ACCAAACCATCCGACATGC GGTCTTGTTTACTGTGTTGA
Pa_4_6210		GTTGAGGAGGTTTGGAGATTCCG TTCTGCTTCACAAACCAAGC
Pa_6_4030		CACCAGAGTTTGACCACGTC TAGACTCCCAGGGAACCAAC

Table S1: Primers used for quantitative RT-PCR experiments

Strains	Primers	Restriction site
<i>rse2</i> ^{Δ223}	A CACTCgcgggccgCCCAGTCCGTTCTTACG	<i>NotI</i>
	B GACGTCGAA <u>AA</u> CTCGACACCTCATGGGGAAC	
	C GGTGTCGAGT <u>TT</u> TCGACGTCCTGAACAACACTAC	
	D gggagatcTCGGCATAGCGACAGAAGGAG	<i>BglII</i>
	E gcgccatgG CCGACTTAGTTGCGATGC	<i>NcoI</i>
	F CTGGGgcgggccGC GAGTGCTGCTGCTGCTG	<i>NotI</i>
<i>rse2</i> ^{Δ329}	A CACTCgcgggccgCCCAGTCCGTTCTTACG	<i>NotI</i>
	B AAGACTCTGGT <u>ATT</u> TGATATAGTTAAACGGTTGGAG	
	C AACTATATCAA <u>AT</u> ACCAGAGTCTTCAAACGTATC	
	D gggagatcTCGGCATAGCGACAGAAGGAG	<i>BglII</i>
	E gcgccatgG CCGACTTAGTTGCGATGC	<i>NcoI</i>
	F CTGGGgcgggccGC GAGTGCTGCTGCTGCTG	<i>NotI</i>
<i>rse2</i> ^{Δ452}	A CACTCgcgggccgCCCAGTCCGTTCTTACG	<i>NotI</i>
	B GGAGCGGATCGGAATGGTTCCAAACTCTTC	
	C GGAACCAT <u>TGCC</u> GATCCGCTCCACGACACC	
	D gggagatcTCGGCATAGCGACAGAAGGAG	<i>BglII</i>
	E gcgccatgG CCGACTTAGTTGCGATGC	<i>NcoI</i>
	F CTGGGgcgggccGC GAGTGCTGCTGCTGCTG	<i>NotI</i>
<i>rse2</i> ^{Δ454-504}	A CACTCgcgggccgCCCAGTCCGTTCTTACG	<i>NotI</i>
	B TCCCACAT <u>TTA</u> ATCGAAGGCAATGGTTCCAAAC	
	C TGCCTTCGAT <u>TTAA</u> ATGTGGGATCAAATCGTCG	
	D gggagatcTCGGCATAGCGACAGAAGGAG	<i>BglII</i>
	E gcgccatgG CCGACTTAGTTGCGATGC	<i>NcoI</i>
	F CTGGGgcgggccGC GAGTGCTGCTGCTGCTG	<i>NotI</i>
<i>rse3</i> ^{Δ251}	A GTAGAgcgggccgcCTCAAGAGCCTCAACGAGAG	<i>NotI</i>
	B GTATAACTGCACTCCAG <u>CT</u> TCGAAATCCC	
	C GGGAT <u>TT</u> CGAA <u>AG</u> CTGGAGTGCAGTTATAC	
	D TAGAgtcgacCTTGTTGAATCCAAACTTCG	<i>SalI</i>
	E TATagatctGTTTTGGATATGTTG	<i>BglII</i>
	F GAGgcgggccgcTCTACGGCACAGACATGC	<i>NotI</i>
<i>rse3</i> ^{Δ640-645}	A GTAGAgcgggccgcCCTGTCTACTCATCGACACAG	<i>NotI</i>
	B GCCCAGCATTCCAA <u>AC</u> ATCGCTCCGTAGTGA	
	C GAGTCACTACGGAGCGAT <u>G</u> TTTGAATGCTGGGC	
	D TAGAgtcgacCTTGTTGAATCCAAACTTCG	<i>SalI</i>
	E TATagatctGTTTTGGATATGTTG	<i>BglII</i>
	F GAGgcgggccgcTCTACGGCACAGACATGC	<i>NotI</i>
<i>rse3</i> ^{Δ646-696}	A AAGAgcgggccGC GAGATCGCGGGCGTG	<i>NotI</i>
	B GCCAATTGGT <u>TA</u> CTCCAGCTTCCATCCCTC	
	C GAAGCTGGAG <u>T</u> AACCAATTGGCGGTTTAAAGA	
	D gggagatCTTGTTGAATCCAAACTTCGC	<i>BglII</i>
	E gcgccatgG TTTTGGATATGTTGATGGTTG	<i>NcoI</i>
	F GATCTCgcgggccGC CAGTTTGGGGCGGTTGG	<i>NotI</i>
<i>rse2</i> ^{Δ324-346}	A ccctcGAGGACCCATTGCTGCTGG	<i>XhoI</i>
	B CGAAGGATCTTTT <u>G</u> CGGTTGGAGGATCCAGC	
	C CCTCCAACCGCAAAGATCCTTCGACAACCTC	
	D ggggactagTCGAAGGGGCGGCATTGTG	<i>SpeI</i>
<i>gpd-rse2</i>	A cccaagcttCCCTTCCCTTCCACTTCTTC	<i>HindIII</i>
	B GGTTGCCGTCA <u>T</u> GTTGCTGTTGGTGAAG	
	C CAGCAA <u>CA</u> TGACGGCAACCGAAGCCAT	
	D GGGgcgggccGC ATAGCGACAGAAGGAGAG	<i>NotI</i>
<i>gpd-rse3</i>	A CCCgcgggccGCCTTCCCTTCCACTTCTTC	<i>NotI</i>
	B TCTTCCGGCA <u>T</u> GTTGCTGTTGGTGAAGA	
	C ACAGCAA <u>CA</u> TGCCGGAAGACGGTGGG	
	D cccaagCTTGTTGAATCCAAACTTCG	<i>HindIII</i>

note: For each construction nomenclature of the primers is according to the figure S1. Uppercase letters correspond to *P. anserina* sequence ; junction of non contiguous nucleotides on the wild type sequence is underlined. Lower case letters are nucleotides added for convenience.

Table S2: Primers used for the construction of the mutated *rse2* and *rse3* alleles

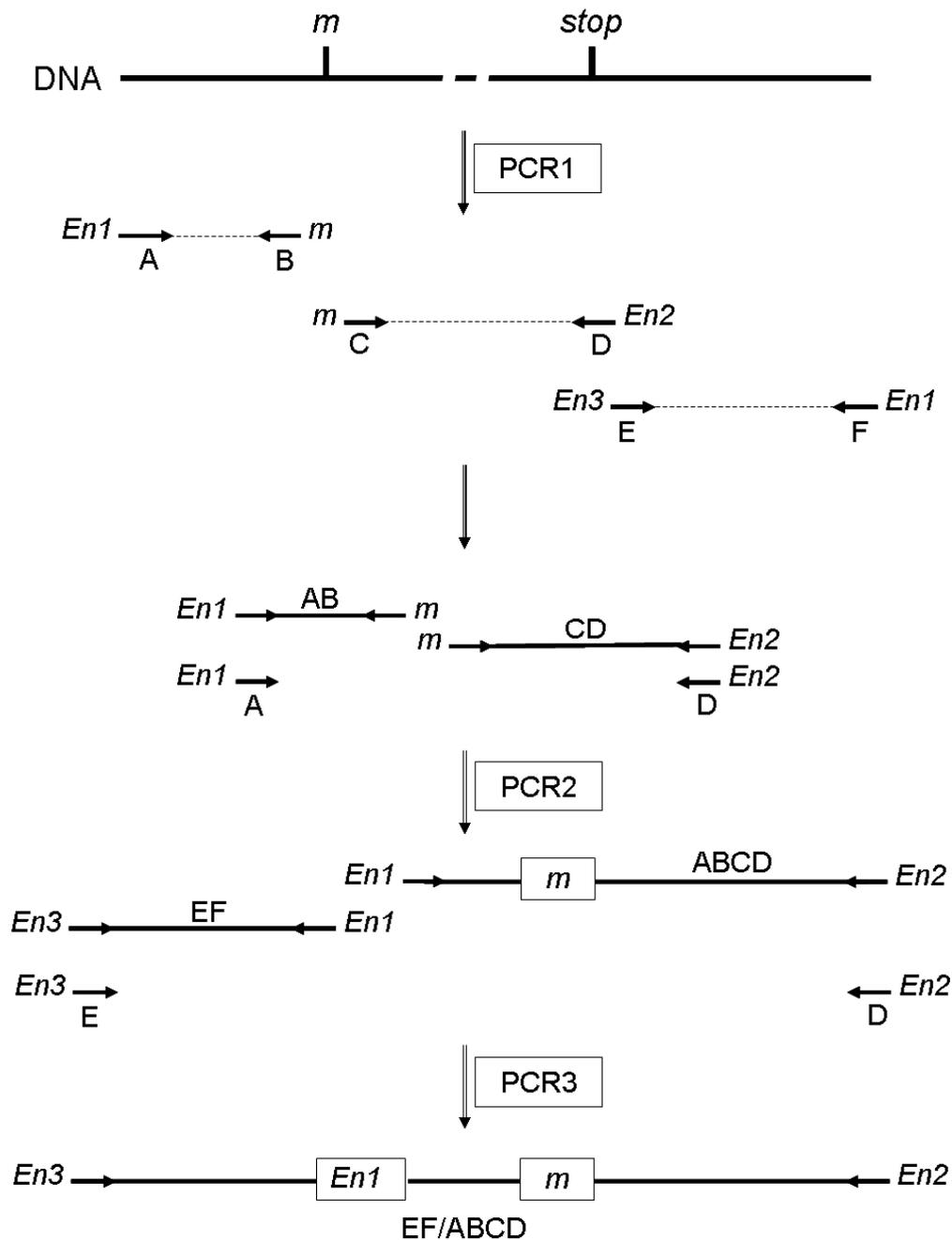


Figure S1: Strategy used to construct strains carrying mutated *rse2* and *rse3* alleles.

A fragment EF/ABCD containing the desired mutation was constructed by a 3-step PCR amplification as described in Materials and Methods. This fragment was introduced into the pAPI508 plasmid containing the *nat1* cassette (El Khoury) and sequenced to check for the absence of spurious mutation. The recombinant plasmid was then linearized thanks to a *not1* restriction site present in primers A and F and used to transform the $\Delta Ku70$ strain

Table S3: Genes differentially transcribed in the wild-type strain and the mutants (Part1)

Gene name	FC			Gene name	FC		
	rse2 ^{Y326D}	rse3 ^{G642V}	rse2 ^{Y326D} rse3 ^{G642V}		rse2 ^{Y326D}	rse3 ^{G642V}	rse2 ^{Y326D} rse3 ^{G642V}
cox3	-2.68	-2.33	-2.09	Pa_1_5480	4.41	1.01	-1.01
nad2	-2.03	-1.46	-1.58	Pa_1_600	2.42	1.36	-1.17
Pa_0_1190	-2.44	-1.84	-1.78	Pa_1_6440	1.69	2.07	1.72
Pa_0_1290	-1.64	-2.09	-1.51	Pa_1_7280	-1.87	-2.11	-1.73
Pa_0_130	-2.25	-2.77	-1.32	Pa_1_7520	-2.5	-1.69	1.36
Pa_0_1480	1.54	2.1	2.32	Pa_1_7990	-3.9	-3.03	-1.35
Pa_0_160	-2.12	-2.2	-1.43	Pa_1_8440	3.26	3.04	2.65
Pa_0_210	-2.68	-3.49	-1.42	Pa_1_9440	-2	-1.79	-1.11
Pa_0_220	-2.18	-2.4	-1.51	Pa_1_970	2.29	2.27	2.58
Pa_0_495	-1.64	-2.35	-1.26	Pa_2_1020	4	2.87	2.3
Pa_0_760	-2.23	-1.64	-1.68	Pa_2_11595	2.41	-1.14	-1.08
Pa_0_960	-2.72	-2.65	-1.67	Pa_2_1170	-2.22	-1.94	-1.58
Pa_1_1000	-4.39	-2.87	-1.49	Pa_2_11720	-2.16	-1.78	1.25
Pa_1_10030	1.15	1.36	2	Pa_2_1180	-2.1	-1.92	-1.68
Pa_1_1030	-2.28	-1.86	-1.12	Pa_2_11900	-3.85	-4.19	-2.04
Pa_1_10390	-3.77	-3.01	-1.76	Pa_2_1200	1.08	2	1.17
Pa_1_10640	2	1.63	1.25	Pa_2_12740	-1.49	-1.5	-2.13
Pa_1_11280	-3.13	-3.13	-1.44	Pa_2_13320	-2.61	-2.17	-1.19
Pa_1_11290	-2.35	-1.99	-1.44	Pa_2_14160	-2.38	-2.05	-1.26
Pa_1_11560	-2.73	-4.48	-1.29	Pa_2_1910	1.42	1.25	2.77
Pa_1_1197	-1.65	1.02	2.56	Pa_2_2160	-2.5	-2.57	-1.23
Pa_1_13780	-2.09	-1.29	-1.03	Pa_2_2390	2.12	1.31	-1.03
Pa_1_1390	-2.03	-1.69	-1.35	Pa_2_2710	-1.05	-1.06	-2.07
Pa_1_140	-4.68	-2.99	-1.65	Pa_2_3500	-3.7	-3.46	-1.66
Pa_1_14690	2.49	1	-1.03	Pa_2_4180	-3.64	-3.39	-2.4
Pa_1_15010	-4.32	-2.9	-1.19	Pa_2_4290	1.14	1.58	2.28
Pa_1_15240	-9.73	-6.61	-1.47	Pa_2_440	-2.08	-2.25	-1.64
Pa_1_15250	-2.69	-2.2	-1.41	Pa_2_4470	-1.07	1.63	2.01
Pa_1_15260	-6.5	-5.45	-1.26	Pa_2_4795	-1.73	-3.08	-1.08
Pa_1_16110	-1.9	-2.18	-1.27	Pa_2_4820	-7.03	-5.58	-2.22
Pa_1_16260	2.02	1.43	1.19	Pa_2_5820	-2.06	-2.2	-1.29
Pa_1_16790	4.69	3.52	3.34	Pa_2_6020	2.51	3.15	2.97
Pa_1_17250	-3.02	-2.38	-1.22	Pa_2_610	-7.69	-3.79	-1.83
Pa_1_18370	-2.37	-2.46	-1.47	Pa_2_6820	1.88	2.66	1.7
Pa_1_19030	-1.73	-2.06	-1.18	Pa_2_7580	-1.46	-1.19	-2.02
Pa_1_21210	-2.08	-1.91	-1.6	Pa_2_7980	2.07	1.7	1.46
Pa_1_21440	-2	-1.63	-1.24	Pa_2_8300	-2.69	-2.61	-1.76
Pa_1_21800	3.08	2.65	2.2	Pa_2_8460	-2.29	-1.8	-1.55
Pa_1_21890	-1.66	-2.08	-1.33	Pa_2_9235	-3.01	-2.68	-3.62
Pa_1_23550	1.52	1.86	2.02	Pa_2_9380	-1.9	-2.22	-1.26
Pa_1_23560	1.79	2.14	2.47	Pa_3_10440	-1.01	2.4	2.95
Pa_1_23930	-2.26	-2.32	-1.31	Pa_3_1050	2.15	1.05	-1.06
Pa_1_24000	-2.15	-1.73	-1.3	Pa_3_10530	-1.68	-1.57	-2.31
Pa_1_24650	-2.42	-1.67	1.01	Pa_3_10630	2.38	1.54	-1.09
Pa_1_2580	-2.11	-1.99	-1.3	Pa_3_1080	-3.58	-3.26	-1.35
Pa_1_3090	-2.66	-2.35	-1.49	Pa_3_11090	-2.27	-2.05	-1.67
Pa_1_3450	2.81	1.28	1.07	Pa_3_11210	-2.21	-1.36	-1.02
Pa_1_3485	-2.07	-2.93	-1.04	Pa_3_11370	-2.34	-1.74	1.12
Pa_1_3860	-1.61	-2.05	-1.18	Pa_3_11510	-2.7	-2.55	-1.65
Pa_1_4710	3.01	1.59	1.69	Pa_3_1340	-1.95	-2.58	-2.85
Pa_1_5420	2.41	1.81	1.5	Pa_3_1350	-1.66	-1.91	-2.32
Pa_1_5450	1.77	2	1.91	Pa_3_1390	-1.65	-1.99	-2.17
Pa_1_5470	-1.98	-2.28	-1.17	Pa_3_1710	13.06	9.99	10.09

Table S3: Genes differentially transcribed in the wild-type strain and the mutants (Part2)

Gene name	FC			Gene name	FC		
	rse2 ^{Y326D}	rse3 ^{G642V}	rse2 ^{Y326D} rse3 ^{G642V}		rse2 ^{Y326D}	rse3 ^{G642V}	rse2 ^{Y326D} rse3 ^{G642V}
Pa_3_1980	-1,84	-2,02	-2,18	Pa_4_7040	-2,31	-1,84	-1,3
Pa_3_2460	-2,07	-2,37	-1,15	Pa_4_7230	-2,5	-2,51	-1,36
Pa_3_3640	-2,13	-1,68	-1,49	Pa_4_7580	1,4	2,2	2,2
Pa_3_3800	2,47	1,32	1,14	Pa_4_8020	-2,18	-1,83	-1,25
Pa_3_4010	-1,9	-2,03	-1,14	Pa_4_8055	-2	-1,9	-1,92
Pa_3_4260	1,3	2,01	1,16	Pa_4_880	-2,14	-2,22	-1,05
Pa_3_4370	-1,54	-2,27	-1,27	Pa_4_9360	2,38	2,35	2,41
Pa_3_5090	1,36	1,27	2,15	Pa_4_9430	1,55	1,15	2,3
Pa_3_5420	-1,34	-2,03	-1,1	Pa_4_9540	-2,08	-2,17	-1,3
Pa_3_5650	2,22	2,42	1,43	Pa_5_10180	-2,58	-2,18	-1,09
Pa_3_590	-1,1	1,64	2	Pa_5_10190	2,16	1,01	1,08
Pa_3_6960	2,19	2,21	2,85	Pa_5_10420	-2,63	-2,26	-1,67
Pa_3_6970	1,98	2,22	1,73	Pa_5_10490	-2,55	-2,49	-1,48
Pa_3_7620	-1,68	-2,11	-1,28	Pa_5_10935	-2,01	-1,26	-1,63
Pa_3_7990	-1,42	1,24	2,35	Pa_5_10960	1,32	2,04	4,31
Pa_3_8110	-2,13	-2,08	-1,89	Pa_5_11000	-2,08	-2,24	-1,47
Pa_3_910	-1,8	-1,93	-2,61	Pa_5_11010	-1,94	-2,86	-1,12
Pa_3_925	-3,65	-2,24	-1,59	Pa_5_11020	-2,13	-3,97	-1,13
Pa_4_1215	1,93	2	-1,15	Pa_5_11030	-2,08	-4,31	-1,06
Pa_4_1334	1,91	2,59	1,58	Pa_5_11040	-2,3	-4,23	-1,09
Pa_4_1430	-2,09	-2,32	-1,45	Pa_5_11060	-2,72	-5,29	-1,21
Pa_4_1460	-2,82	-1,43	-1,04	Pa_5_11090	-2,22	-5,64	-1,06
Pa_4_2035	-2,02	-2,05	-1,24	Pa_5_11100	-1,58	-2	-1
Pa_4_2180	2,21	1,56	1,4	Pa_5_11180	2,3	1,53	1,09
Pa_4_280	-3,01	-2,7	-1,3	Pa_5_11190	2,41	1,5	1,03
Pa_4_3160	11,59	10,32	10,88	Pa_5_11200	2,42	1,65	1,23
Pa_4_330	2,12	2,35	1,69	Pa_5_11210	2,56	1,39	-1,12
Pa_4_3420	2,49	1,57	1,33	Pa_5_11220	2,66	1,94	1,19
Pa_4_3430	1,72	1,27	2,09	Pa_5_11295	-1,45	-2,44	-3,61
Pa_4_3460	3,51	1,5	1,61	Pa_5_1160	-1,71	-1,18	2,11
Pa_4_3770	2,33	1,01	-1,15	Pa_5_11750	-3,24	-3,18	-1,53
Pa_4_3790	1,37	1,45	2,22	Pa_5_11820	3,08	1,88	1,59
Pa_4_3810	-1,02	1,21	2,25	Pa_5_11870	4,41	2,05	1,85
Pa_4_3820	1,04	1,26	2,08	Pa_5_11990	1,04	1,72	2,2
Pa_4_3830	-1,49	-1,58	2,2	Pa_5_12000	-3,12	-2,48	-1,18
Pa_4_3840	-1,14	1,11	2,12	Pa_5_12810	-2,23	-2,33	-2,7
Pa_4_3850	-1,14	1,08	2,44	Pa_5_12980	2,76	4,17	4,75
Pa_4_3860	4,22	3,72	3,78	Pa_5_140	2,44	1,33	1,09
Pa_4_3920	-1,97	-2,27	-1,56	Pa_5_1700	6,08	6,67	4,95
Pa_4_3930	2	1,59	1,34	Pa_5_1850	-2,39	-1,28	-1,88
Pa_4_4430	-2,09	-1,57	-1,3	Pa_5_1880	1,66	2,02	1,35
Pa_4_4610	-2,08	-2,09	-1,25	Pa_5_1900	-3,09	-1,92	-1,1
Pa_4_4950	-3,82	-2,89	-1,92	Pa_5_1980	2,38	1,54	1,29
Pa_4_4960	-2,67	-2,97	-1,72	Pa_5_2360	-2,03	-1,64	-1,48
Pa_4_5110	-2,09	-2,13	-1,39	Pa_5_245	-2,5	-1,54	1,21
Pa_4_5290	-2,93	-2,88	-1,97	Pa_5_2700	1,66	2,19	1,19
Pa_4_5790	-1,88	-2,2	-1,28	Pa_5_2940	2,08	1,66	1,65
Pa_4_5860	2,18	2,62	1,76	Pa_5_3310	1,75	2,62	2,85
Pa_4_6000	-2,44	-2,69	-1,84	Pa_5_3730	1,84	1,88	2,24
Pa_4_6180	2,33	1,98	1,97	Pa_5_3870	-6,94	-3,77	-1,45
Pa_4_6210	3,08	2,35	3,87	Pa_5_400	2,1	2,25	1,37
Pa_4_6800	1,62	2,81	1,51	Pa_5_6250	2,87	1,48	1,2
Pa_4_6960	-3,34	-3,07	-1,77	Pa_5_6640	-1,68	-2,5	-1,53

**Table S3: Genes differentially transcribed in the wild-type strain and the mutants
(Part3)**

Gene name	FC			Gene name	FC		
	<i>rse2</i> ^{Y326D}	<i>rse3</i> ^{G642V}	<i>rse2</i> ^{Y326D} <i>rse3</i> ^{G642V}		<i>rse2</i> ^{Y326D}	<i>rse3</i> ^{G642V}	<i>rse2</i> ^{Y326D} <i>rse3</i> ^{G642V}
Pa_5_7020	1,04	1,54	2,13	Pa_6_6760	-2,64	-2,37	-1,52
Pa_5_7160	-1,8	-2,01	-2,36	Pa_6_7840	2,44	2,1	1,53
Pa_5_7220	-4,32	-3,73	-1,38	Pa_6_7850	2,25	1,83	1,29
Pa_5_7720	-2,3	-2,2	-1,08	Pa_6_7880	2,51	1,63	1,76
Pa_5_7880	-1,48	1,06	2,29	Pa_6_8230	-2,03	-1,56	-1,32
Pa_5_7910	-2,25	-1,91	-1,38	Pa_6_9550	-1,74	-2,02	-1,36
Pa_5_7920	-2,25	-2,01	-1,3	Pa_6_9760	2,36	1,84	1,04
Pa_5_7960	1,1	1,36	2,23	Pa_6_9970	1,84	2,08	1,6
Pa_5_8030	-1,85	-2,46	-1,92	Pa_7_10290	2,95	1,67	1,92
Pa_5_8610	-2,11	-2,06	1,06	Pa_7_1230	3,07	2,53	2,39
Pa_5_8670	2,39	1,32	1,51	Pa_7_1620	-1,94	-2,02	-1,22
Pa_5_8940	-2,06	-1,28	1,02	Pa_7_1750	2,02	1,39	1,45
Pa_5_9430	-1,93	-2,44	-1,63	Pa_7_1770	3,75	3,96	6,06
Pa_6_10	2,32	2,33	2,16	Pa_7_1820	3,37	3,25	2,9
Pa_6_10190	-2,87	-2,14	-1,49	Pa_7_240	-1,24	1,6	2,24
Pa_6_10200	-2,67	-2,27	-1,69	Pa_7_2600	1,71	1,84	2,37
Pa_6_1100	-2,33	-1,54	1,39	Pa_7_2610	2,23	2,35	2,66
Pa_6_11140	-2,32	-1,92	-1,39	Pa_7_2940	3,12	2,4	2,38
Pa_6_2010	1,94	2,35	1,59	Pa_7_320	-2,52	-2,47	-1,28
Pa_6_220	-1,39	1,15	2,7	Pa_7_3665	-4,96	-7,78	-3,52
Pa_6_2740	1,72	2,23	1,39	Pa_7_4130	2,31	2	1,75
Pa_6_3170	2,26	1,5	-1,09	Pa_7_4140	1,67	2,64	3,39
Pa_6_3690	-1,9	-2,14	-1,24	Pa_7_4360	-2,59	-2,68	-1,76
Pa_6_4030	4,81	2,92	2,18	Pa_7_4520	-2,43	-2,07	-1,16
Pa_6_5030	-2,02	-2,28	-1,45	Pa_7_5140	-2,01	-1,82	-1,65
Pa_6_6190	-2,48	-2,05	-1,2	Pa_7_5920	-2,17	-1,92	-1,46
Pa_6_6290	-1,35	1,13	2,17	Pa_7_610	-2,86	-2,35	-1,26
Pa_6_6330	-3,16	-2,49	-1,24	Pa_7_910	-1,87	-1,67	-2,07
Pa_6_6500	2,12	1,71	1,44	Pa_7_9270	-2,55	-2,24	-1,76

2. Résultats annexes

L'étude des souches *rse2-1*, *rse3-1*, $\Delta rse2$ et $\Delta rse3$ a montré 1) que ces facteurs de transcription régulent l'expression d'au moins deux voies alternatives (respiratoire par l'induction de l'AOX et métabolique par l'induction d'enzymes de la néoglucogenèse) en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial et 2) que l'état allélique de ces gènes contrôle la longévité de *P. anserina* indépendamment de l'expression de l'AOX. Nous avons entrepris une étude transcriptomique grâce aux puces à ADN pan-génomique développées pour *P. anserina* (Bidard *et al.*, 2010) pour tenter d'apporter des éléments de réponses à deux questions 1) quelles sont les cibles directes ou indirectes des facteurs de transcription RSE2 et RSE3. 2) parmi ces cibles, certaines sont-elles capables d'expliquer la diminution de longévité des souches *rse2-1* et *rse3-1* d'une part, et l'augmentation de longévité des souches $\Delta rse2$ et $\Delta rse3$ d'autre part.

2.1 Analyse de la reprogrammation de l'expression du génome nucléaire en fonction de l'état allélique des facteurs de transcription RSE2 et RSE3 par une approche transcriptomique

L'analyse transcriptomique a été réalisée sur les souches sauvage, *rse2-1*, *rse3-1*, $\Delta rse2$, $\Delta rse3$, les doubles mutantes *rse2-1 rse3-1* et $\Delta rse2 \Delta rse3$. Chacun des doubles mutants présente le même phénotype de longévité que chacun des simples mutants (Sellem, Bovier *et al.*, 2009). Ont été recherchés les gènes régulés dans le même sens dans les trois souches *rse2-1*, *rse3-1* et le double mutant *rse2-1 rse3-1* (gènes potentiellement responsables de la diminution de longévité de ces souches) et les gènes régulés dans le même sens dans les trois souches $\Delta rse2$, $\Delta rse3$ et le double mutant $\Delta rse2 \Delta rse3$ (gènes potentiellement responsables de l'augmentation de longévité de ces souches). Après optimisation du protocole, les ARNs ont été extraits du mycélium après 48h de croissance sur M2, le marquage et l'hybridation et l'analyse statistique ont été faits comme décrit dans Bidard *et al.*, 2011.

Les comparaisons entre les souches mutées et la souche sauvage montrent une grande variation dans le nombre de gènes différentiellement exprimés (70 entre *rse2-1 rse3-1* et la

souche sauvage, 280 entre $\Delta rse3$ et la souche sauvage) (Figure 30 A). Cette variation s'observe aussi dans la proportion de gènes surexprimés et réprimés dans chacune des souches. On observe notamment un profil très différent entre la souche $rse2-1 rse3-1$ comparé à $rse2-1$ et à $rse3-1$, de même entre la souche $\Delta rse2$ comparé à $\Delta rse3$ et $\Delta rse3 \Delta rse2$. On constate que les profils d'expression des souches portant les allèles gain ou perte de fonction ne sont pas inversés (la définition gain/perte de fonction porte sur l'expression des gènes *aox*, *fbp* et *pck*) (Figure 30 B). Les diagrammes de Venn, permettant de voir les intersections des gènes différentiellement exprimés dans chacune des souches, montrent une proportion importante de gènes régulés spécifiquement dans chacune des souches (40% pour $rse2-1$, 23% pour $rse3-1$, 45% pour $rse2-1 rse3-1$, 12% pour $\Delta rse2$, 76% pour $\Delta rse3$ et 50% pour $\Delta rse3 \Delta rse2$) (Figure 30 C). Ces variations dans les profils d'expression suggèrent que bien que RSE2 et RSE3 agissent vraisemblablement en hétérodimère sur leurs cibles directes, il est possible qu'ils puissent également interagir avec d'autres partenaires pour moduler l'expression génique.

La suite de l'analyse s'est concentrée sur les profils d'expression à priori les plus cohérents pour le contrôle d'une fonction biologique (ici la longévité). J'ai donc exclu de l'analyse les gènes qui sont régulés dans le même sens dans les souches gain et perte de fonction, les gènes qui ne sont pas régulés de la même manière entre les souches $rse2-1$, $rse3-1$ et $rse2-1 rse3-1$ d'une part, ainsi qu'entre les souches $\Delta rse2$, $\Delta rse3$ et $\Delta rse2 \Delta rse3$ d'autre part. Les profils d'expression retenus sont marqués par une flèche sur la Figure 30 D. Les 48 gènes appartenant à un de ces profils d'expression, leur fonction associée ainsi que leur niveau d'expression comparé à celui dans une souche sauvage pour chacun des mutants analysés sont indiqués dans le Tableau 3.

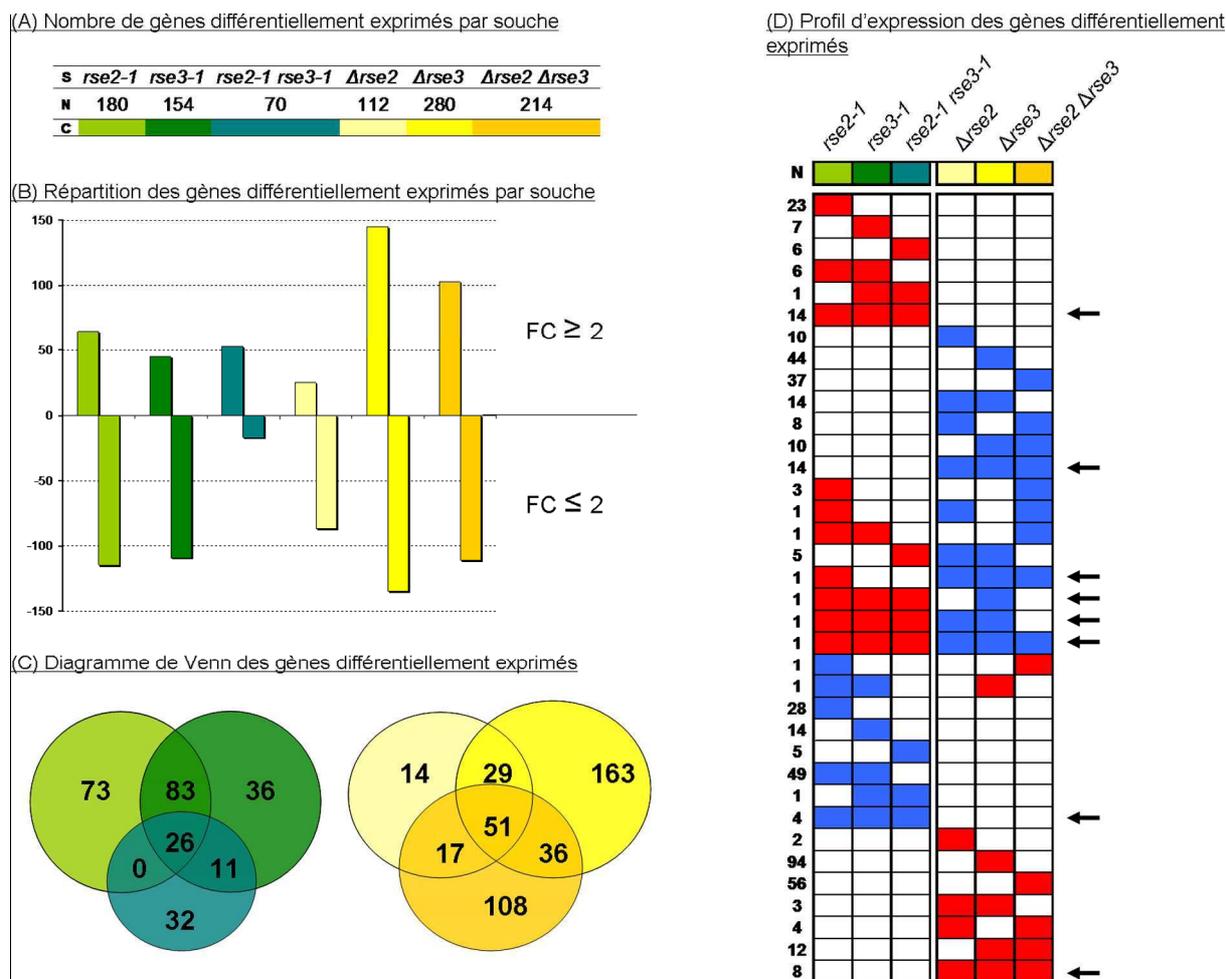


Figure 30: Analyse globale du transcriptome comparant les souches *rse2-1*, *rse3-1*, *rse2-1 rse3-1*, $\Delta rse2$, $\Delta rse3$ et $\Delta rse2 \Delta rse3$ à la souche sauvage

Les critères de validité utilisés lors de l'analyse différentielle reposent sur le rapport d'expression par rapport à la souche sauvage (Fold Change, FC). Sont retenus comme surexprimés les gènes avec un FC supérieur ou égal à 2 et comme gènes réprimés, les gènes avec un FC inférieur ou égal à (p Value ajustée à 10^{-3}).

(A) Nombre de gènes différentiellement exprimés par souche, S : nom de la souche, N : nombre de gènes différentiellement exprimés, C : code couleur par souche utilisé dans l'ensemble de la figure.

(B) Répartition des gènes différentiellement exprimés pour chacune des souches (voir le code couleur de (A)). Est représenté le nombre de gène sur exprimés ($FC \geq 2$) dans la partie haute du graphique, et le nombre de gènes réprimés ($FC \leq 2$) dans partie basse du graphique.

(C) Diagramme de Venn des gènes différentiellement exprimés (voir le code couleur de (A))

(D) Profil d'expression des gènes différentiellement exprimés, N : le nombre de gène appartenant à chacune des catégories, en rouge : les gènes surexprimés et en bleu : les gènes réprimés. Chaque colonne correspond à un génotype et chaque ligne à un profil d'expression. Les profils d'expression analysés plus avant sont marqués par une flèche. Ont été exclus de cette représentation les profils atypiques (même sens de régulation pour des souches gain de fonction ou perte de fonction par exemple).

annotation	souche						nom du gène ou fonction	Cat
	<i>rse2-1</i>	<i>rse3-1</i>	<i>rse2-1</i> <i>rse3-1</i>	Δ <i>rse2</i>	Δ <i>rse3</i>	Δ <i>rse2</i> Δ <i>rse3</i>		
Pa_3_1710	13,06	9,99	10,09	-1,39	-1,52	-1,32	<i>aox</i>	I
Pa_4_3160	11,59	10,32	10,88	-1,47	-1,5	-1,34	<i>pck</i>	
Pa_5_1700	6,08	6,67	4,95	-1,92	-1,08	-1,24	flavohémoglobine homologue à <i>fhb-1</i>	
Pa_1_16790	4,69	3,52	3,34	-1,16	-1,09	-1	transporteur de NH ₄ ⁺ de la membrane plasmique	
Pa_7_1820	3,37	3,25	2,9	-1,31	-1,17	-1,19	<i>ndj1</i>	
Pa_1_8440	3,26	3,04	2,65	-1,19	1,13	1,25	fonction inconnue	
Pa_2_1020	4	2,87	2,3	-1,22	1,73	-1,04	fonction inconnue	
Pa_6_4030	4,81	2,92	2,18	-1,25	-1,1	-1,3	α/β hydrolase	
Pa_7_1230	3,07	2,53	2,39	-1,22	-1,17	-1,21	transporteur d'ion zinc de la membrane plasmique	
Pa_2_6020	2,51	3,15	2,97	-1,3	-1,61	1,47	<i>gdh</i>	
Pa_4_9360	2,38	2,35	2,41	-1,36	-1,15	-1,01	<i>fbp</i>	
Pa_1_970	2,29	2,27	2,58	-1,78	-1,32	-1,07	fonction inconnue	
Pa_7_2610	2,23	2,35	2,66	-1,11	1,26	1,37	Facteur de transcription (Zn2Cys6)	
Pa_3_6960	2,19	2,21	2,85	-1,53	-1,64	-1,21	<i>gogat</i>	
Pa_5_4580	-1,13	-1,43	-1,44	-3,03	-3,08	-3,05	<i>pdh6</i>	
Pa_7_310	-1,59	-1,77	-1,33	-2,96	-3,27	-3,16	aldocéto-réductase	
Pa_3_1070	-1,9	-1,83	-1,32	-2,83	-4,36	-3,02	fonction inconnue	
Pa_7_6200	-1,87	-1,22	-1,28	-3,04	-3,87	-2,22	fonction inconnue	
Pa_3_2920	-1,58	-1,43	-1,72	-2,15	-6,14	-2,19	<i>idi1</i>	
Pa_1_11790	-1,26	-1,37	-1,19	-3,03	-2,38	-2,72	glycoside hydrolase	
Pa_5_3390	-1,61	-1,84	-1,07	-3,23	-2,59	-2,47	fonction inconnue	
Pa_6_10100	-1,41	-1,24	-1,15	-2,78	-3,75	-2,42	enzyme hybride NRPS/PKS	
Pa_1_20890	-1,64	-1,92	-1,28	-2,78	-3,82	-2,81	phosphoglycerate mutase	
Pa_3_10000	-1,63	-1,92	-1,32	-2,1	-2,39	-3,04	phospholipase Patatine like	
Pa_1_11870	-1,71	-1,91	-1,24	-2,08	-2,89	-2,15	polykétide synthase	
Pa_2_1550	-1,18	-1,21	-1,11	-2,12	-2,48	-2,08	fonction inconnue	
Pa_5_4170	-1,11	-1,4	1,15	-2,85	-2,74	-2,68	fonction inconnue	
Pa_1_1010	-1,08	1,27	-1,32	-2,32	-2,16	-2,47	endo-1,4-beta-xylanase 2	
Pa_7_1770	3,75	3,96	6,06	-1,72	-2,01	-1,23	epoxide hydrolase	
Pa_5_12980	2,76	11,974	4,75	-3,69	-5,22	-1,47	fonction inconnue	
Pa_4_3860	4,22	8,915	3,76	-2,51	-2,25	-2,32	esterase lippase	III
Pa_2_4820	-7,03	-5,58	-2,22	1,21	-1,2	1,24	fonction inconnue	IV
Pa_2_11900	-3,85	-4,19	-2,04	-1,13	1,82	1,02	<i>Pa_grg1</i>	
Pa_2_4180	-3,64	-3,39	-2,4	-1,06	-1,44	-1,07	fonction inconnue	
Pa_2_9235	-3,01	-2,68	-3,62	-1,32	-1,44	-1,81	fonction inconnue	
Pa_4_110	-1,71	-1,4	1,14	4,21	5,36	2,09	fonction inconnue	V
Pa_6_2325	-1,62	1,17	1,32	3,23	2,65	3,05	fonction inconnue	
Pa_5_2770	-1,31	-1,01	1,32	2,92	2,49	3,05	fonction inconnue	
Pa_1_6300	-1,31	-1,17	1,05	2,42	4,17	4,89	fonction inconnue	
Pa_4_2420	-1,96	-1,41	1,09	2,16	3,42	2,36	glycoside hydrolase	
Pa_7_6040	-1,28	-1,27	1,17	2,35	2,25	2,1	fonction inconnue	
Pa_1_2660	-1,33	-1,39	1	2,67	2,16	2,18	fonction inconnue	
Pa_4_6050	-1,37	-1,2	1,3	2,57	2,57	2	fonction inconnue	

Tableau 3 : Gènes appartenant aux profils d'expression retenus

L'annotation de chacun des gènes est donnée, ainsi que les fold change dans les 6 souches analysées (en saumon lorsque FC \geq 2 et en bleu lorsque FC \leq 2). Le nom des gènes ou les fonctions associées ont été recherchés sur le site du génome de *P. anserina* (<http://podospora.igmors.u-psud.fr/>) (Espagne *et al.*, 2008) ou par homologie d'après la base de données FungiPath (<http://embg.igmors.u-psud.fr/fungipath/>) (Grossetête *et al.*, 2010).

Pour une grande partie des gènes la fonction est inconnue (18/43). Comme attendu, on retrouve les gènes *aox*, *fbp* et *pck* surexprimés dans les souches gain de fonction, et ils ne sont pas dérégulés dans les souches perte de fonction (catégorie I). On trouve dans cette liste de gènes une proportion importante de gènes codant des enzymes du métabolisme (*pdh6* (pyruvate décarboxylase), aldocéto-réductase, glycoside hydrolase, phosphoglycerate mutase, glycoside hydrolase, polykétide synthase, NRPS/PKS), mais aussi des transporteurs

(de NH_4^+ et de Zinc). Deux voies métaboliques particulières sont induites, la néoglucogénèse (*fbp* et *pck*) et l'assimilation de l'azote / synthèse du glutamate (*gdh* et *gogat*) (annexe 5) en plus des voies alternatives respiratoires (*aox* et *ndi1*).

Concernant les gènes candidats potentiels contrôlant la longévité, bien que ce contrôle soit très certainement multifactoriel, la longévité de plusieurs souches, construites pour répondre à d'autres questionnements dans le laboratoire (Δfbp , Δpck , Δgdh , $\Delta gogat$) ou par Jinane Ait Benkhali (IGM) (ΔPa_2_4820 et ΔPa_4_110) a été mesurée. Le seul gène (*Pa_4_3860*) qui est surexprimé dans les souches gain de fonction et réprimé dans les souches pertes de fonction a été délété, ainsi que le gène *grg1* réprimé dans les souches gain de fonction. En effet il a été montré que l'expression de ce gène, soumis à la repression catabolique, augmente au cours de la sénescence (Kimpel and Osiewacz, 1999). Aucune de ces souches (Δfbp , Δpck , Δgdh , $\Delta gogat$, ΔPa_2_4820 , ΔPa_4_110 , ΔPa_4_3860 , $\Delta grg1$) ne présente de modification de longévité dans les conditions standard de culture. Il est vraisemblable que la longévité des souches mutantes *rse2-1* et *rse3-1* résulte plutôt de changements métaboliques complexes que de la modification transcriptomique d'un seul gène.

Les liens entre le métabolisme et le contrôle de la longévité sont aussi illustrés par l'effet de la restriction calorique. En effet, chez de nombreux modèles, dont *P. anserina* (van Diepeningen *et al.*, 2010; Maas *et al.*, 2004) il a été montré une augmentation de la longévité en condition de restriction calorique. Bien que les mécanismes sous jacents soient encore imparfaitement connus, certainement différents d'un modèle à l'autre (Skinner and Lin, 2010), la relation inverse entre l'apport calorique et la longévité ainsi que le rôle central de la fonction respiratoire mitochondriale suggèrent que le métabolisme (et sa reprogrammation) est une des clés de ce processus (Anderson and Weindruch, 2010; Zaman *et al.*, 2008) pour revue).

2.2 Recherche du motif CGG(N)₇CGG dans les séquences régulatrices des gènes différentiellement exprimés

Les études faites chez *N. crassa* ont clairement montré que les domaines de liaison à l'ADN des orthologues de RSE2 et RSE3 lient le motif CGG(N)₇CGG, que l'espacement de 7 nucléotides ne pouvait être modifié et que ce motif est conservé dans les séquences 5' régulatrices des gènes *aox* chez différents champignons filamenteux (Chae, Lin, *et al.*, 2007;

Chae, Nargang, *et al.*, 2007). Si le mode d'interaction à l'ADN de ces facteurs de transcription est conservé, alors les cibles directes de ces facteurs de transcription doivent toutes comporter ce motif dans leurs séquences régulatrices. En collaboration avec Yves d'Aubenton Carafa, la recherche bioinformatique de l'enrichissement de ce motif a été faite. La présence du motif dans les séquences 5' régulatrices de chacun des gènes régulés a été comparée à la recherche du même motif dans les séquences régulatrices de gènes non régulés (d'après les résultats de l'analyse transcriptomique). Les séquences amont (1000pb en amont de l'ATG) ont été obtenues sur le site du génome de *P. anserina* (<http://podospora.igmors.u-psud.fr/>). Toutes les combinaisons de triplets ont été recherchées sur les deux brins avec un espacement de 5 à 8 nucléotides entre les deux triplets. Pour chacun de ces motifs, le pourcentage de séquences contenant le motif a été calculé ainsi que la densité moyenne du motif par séquence. La distribution des motifs en fonction du pourcentage de leur présence dans les séquences régulatrices ne montre pas d'enrichissement des motifs CGG(N)₆CGG, CGG(N)₇CGG, CGG(N)₈CGG. Ceci n'est pas dû à une trop grande représentation de ces motifs dans le génome puisque leur densité moyenne par séquence est faible (Figure 31).

Le fait qu'il n'y ait pas d'enrichissement en CGG(N)₇CGG dans les séquences régulatrices des gènes potentiellement cibles des facteurs de transcription RSE2 et RSE3 peut s'expliquer de deux façons 1) ces facteurs de transcription ne reconnaissent pas ce motif, mais cela est peu probable au vu de la conservation de ce motif, de sa nécessité en amont du gène *aox* chez *N. crassa* (Chae, Lin, *et al.*, 2007; Chae, Nargang, *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2012), de la conservation fonctionnelle des protéines RSE2 et RSE3, et du fait qu'aucun autre motif ne se dégage de cette analyse, 2) plus vraisemblablement, la régulation transcriptionnelle observée dans ce transcriptome est principalement due à des effets indirects et la régulation spécifique par les protéines RSE2 et RSE3 se trouve noyée dans la masse des gènes différentiellement exprimés. En fait, sur les 28 gènes différemment transcrits entre les mutants gain de fonction *rse2-1*, *rse3-1* et le double mutant *rse2-1 rse3-1* d'une part et la souche sauvage d'autre part, seuls 13 contiennent le motif CGG(N)₇CGG, dont les gènes *aox*, *fbp*, *pck* (Article 2).

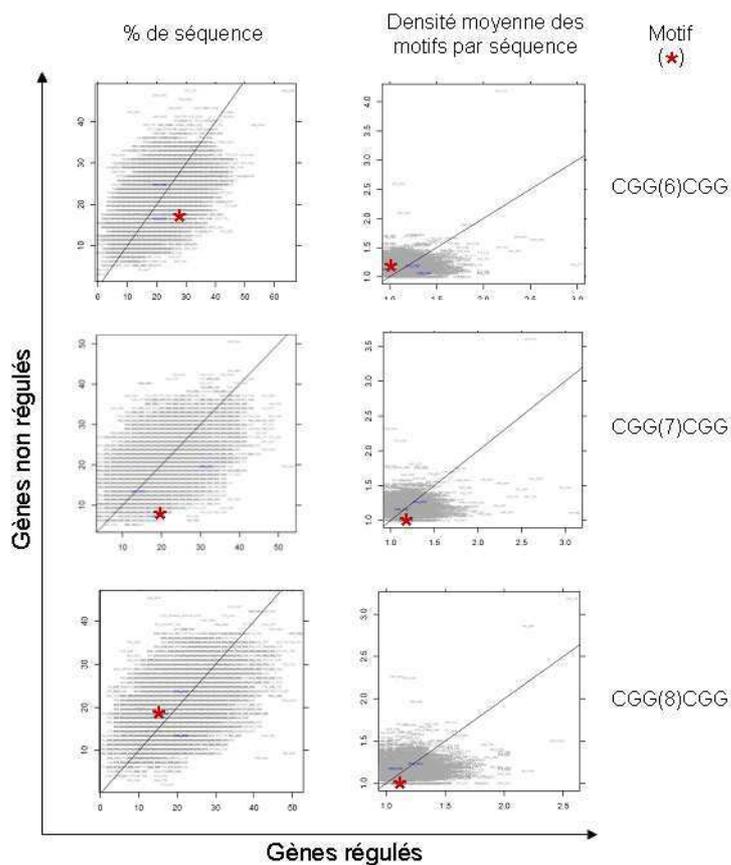


Figure 31: Recherche d'un enrichissement en CGG(N)₇CGG dans les séquences régulatrices des gènes différentiellement exprimés dans l'analyse transcriptomique

La figure représente le pourcentage de séquences portant les différentes combinaisons de triplets avec un espacement de 6, 7 ou 8 (1^{er} colonne), et la densité moyenne des motifs par séquence (2^e colonne). L'ordonnée de chacun des graphiques représente les gènes non régulés et l'abscisse les gènes régulés dans l'analyse transcriptomique. La position des motifs CGG(6)CGG, CGG(7)CGG et CGG(8)CGG est marquée par une étoile rouge.

2.3 Les gènes *gdh* et *gogat* impliqués dans le métabolisme azoté ne sont pas des cibles de la régulation rétrograde médiée par RSE2 et RSE3

2.3.1 *gdh* et *gogat* ne sont pas des cibles de la régulation rétrograde mitochondriale en réponse à un dysfonctionnement respiratoire

Les gènes *gdh* et *gogat* sont régulés positivement dans les souches *rse2-1* et *rse3-1* et présentent le motif CGG(N)₇CGG dans leur séquence amont. Ils codent respectivement la glutamate déshydrogénase et la glutamate synthase. Ces deux enzymes permettent l'assimilation de l'ammonium (Meti *et al.*, 2011) et sa conversion en glutamate (Voir Annexe 5). Étant donnée l'importance fonctionnelle de ces deux enzymes, il nous a paru important

de vérifier que les gènes *gdh* et *gogat* étaient bien induits en présence d'antimycine. De façon surprenante, comme décrit dans l'article 2 et dans la figure 32, l'expression de ces gènes n'est pas activée mais au contraire réprimée en présence d'antimycine.

Ces gènes sont donc des « faux positifs » dans la recherche des cibles de RSE2 et RSE3. Une possibilité est que les motifs CGG(N)₇CGG présents dans les séquences amonts de ces gènes, à cause de la mutation, soient reconnus par les facteurs de transcription mutés codés par *rse2-1* et *rse3-1*. Quelque soit la raison de leur surexpression chez les mutants *rse2-1* et *rse3-1*, ces gènes ne sont pas des cibles physiologiques de ces facteurs de transcription.

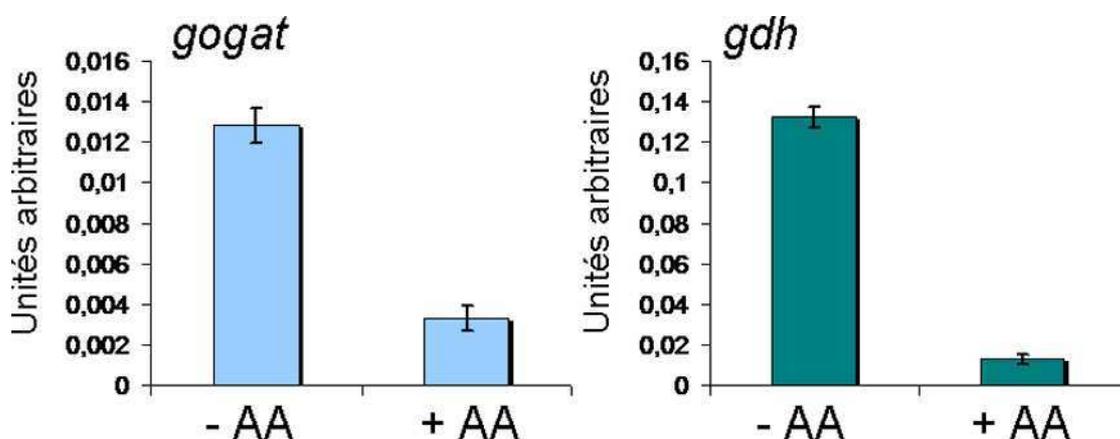


Figure 32: Niveau de transcrits des gènes *gogat* et *gdh* estimé par RT-qPCR en réponse à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire

Les ARNs ont été extraits de cultures d'une souche sauvage en absence (-AA) ou en présence (+AA) d'antimycine A (inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire). Le niveau de transcrit a été mesuré par RT-qPCR et normalisé par rapport à l'expression du gène de référence *gpd*.

2.3.2 L'association des délétions Δ *gdh* et Δ *gogat* est létale

Pour savoir si cette régulation négative des gènes *gdh* et *gogat* en présence d'antimycine avait un sens physiologique, les souches délétées pour ces gènes ont été construites dans le but de les associer au mutant *cox5::ble*.

Les simples mutants ne présentent pas de phénotype particulier. Par contre, la souche double mutant Δ *gdh Δ *gogat* présente un retard important de germination (Figure 33) et une incapacité à pousser sur le milieu standard de culture (M2).*

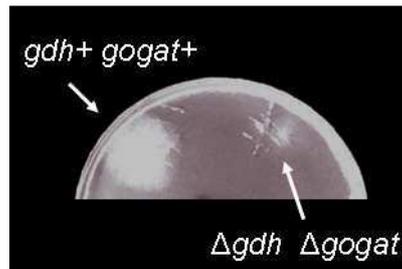


Figure 33: Phénotype de germination d'une spore sauvage (gdh^+ ; $gogat^+$) et d'une spore double mutante $\Delta gdh \Delta gogat$ à trois jours

Ce phénotype a été vérifié par l'analyse de la descendance d'une souche de génotype $\Delta gdh / \Delta gdh$; $\Delta gogat / gogat^+$. Cette descendance est composée de $\frac{1}{2}$ de spores présentant un retard de germination et de $\frac{1}{2}$ de spores présentant un phénotype sauvage (Tableau 4).

génotype	Germination	Croissance sur M2	effectif
$\Delta gdh gogat^+$	+	+	25
$\Delta gdh \Delta gogat$	+/-	-	22

Tableau 4: Descendance de la spore dicaryotique $\Delta gdh / \Delta gdh$; $\Delta gogat / gogat^+$

24 couples de spores monocaryotiques ont été semés, une spore n'a pas germé. La germination a été observée à trois jours

L'absence des enzymes GDH et GOGAT permet donc à la spore de germer (avec un délai) mais non de croître sur M2. Dans ce milieu, la source d'azote est l'urée qui doit être dégradé en ammonium par une uréase (il existe une uréase putative dans le génome de *P. anserina* : Pa_1_11040). La létalité d'une souche $\Delta gdh \Delta gogat$ montre donc que chez *P. anserina*, les enzymes GDH et GOGAT sont toutes deux fonctionnelles et nécessaires pour l'assimilation d'une source pauvre d'azote comme l'urée.

2.3. Conservation et composition des séquences protéiques de RSE2 et RSE3

L'ensemble des résultats obtenus montre qu'il existe une conservation fonctionnelle des protéines RSE2 et RSE3 pour la régulation de l'AOX et des enzymes FBP et PCK. De plus la dissection fonctionnelle des séquences protéiques a permis de proposer une organisation en domaines régulateurs (Article 2). Une étude récente chez un basidiomycètes (*Moniliophthora perniciosa*) montre le même type de régulation de l'AOX en réponse à un traitement à l'antimycine (Thomazella *et al.*, 2012). Il est probable que, chez ce champignon aussi, cette régulation passe par des orthologues des facteurs de transcription RSE2 et RSE3. La recherche par blast des séquences similaires à RSE2 et RSE3 dans le génome de *M. perniciosa* montre effectivement la présence de protéines putatives conservées, au moins pour la partie C-terminale. J'ai alors recherché, sur la base de données Fungipath, l'ensemble des orthologues de RSE2 et RSE3 parmi les génomes disponibles de champignons. L'alignement de 27 séquences des ascomycètes aux basidiomycètes (la classification des espèces utilisées dans les alignements est donnée en Annexe 6) met effectivement en évidence des régions conservées au-delà du domaine de liaison à l'ADN (Figure 35 A). Ces alignements montrent que toutes les substitutions gain de fonction obtenues chez RSE2 sont dans des régions conservées (Figure 35 A). Ces résultats sont en accord avec une organisation en domaines régulateurs de cette protéine, ceux-ci semblant être conservés des ascomycètes aux basidiomycètes. L'analyse plus en détail de la séquence de RSE2 n'a cependant pas montré d'enrichissement de ces domaines en un (ou plusieurs) types d'acides aminés (Figure 35 B).

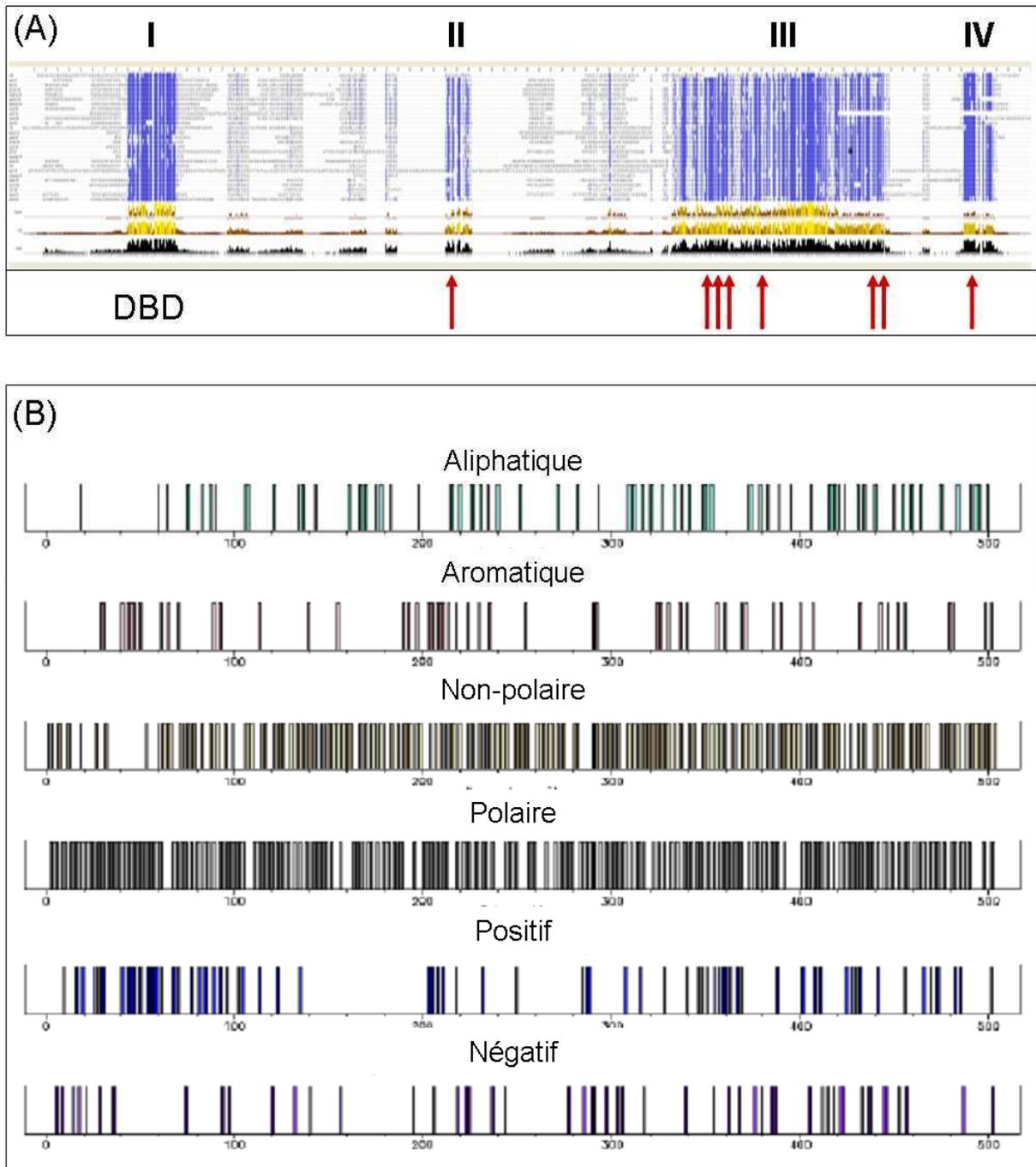


Figure 34 : Conservation et composition des séquences protéiques de RSE2

(A) Alignement par Muscle de 27 séquences d'orthologues de RSE2 chez des ascomycètes et des basidiomycètes d'après la base de données Fungipath. L'alignement est visualisé par Jalview. Les résidus avec un bon pourcentage d'identité sont surlignés en bleu et les histogrammes au dessous représentent la conservation, la qualité et le consensus pour chacune des positions. Ces valeurs sont calculées par le programme Jalview. Les espèces utilisées sont : *A. nidulans*, *A. oryzae*, *B. cinerea*, *C. heterostrophus*, *F. graminearum*, *M. graminicola*, *N. haematococca*, *N. crassa*, *P. anserina*, *S. nodorum*, *T. reesei*, *A. gossypii*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *D. hansenii*, *K. lactis*, *K. thermotolerans*, *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica*, *C. cinereus*, *L. bicolor*, *M. larici-populina*, *P. chrysosporium*, *P. ostreatus*, *S. commune*, *S. roseus* et *U. maydis*. Les flèches rouges indiquent les positions des mutations gain de fonction isolées (Article 2). DBD : domaine de liaison à l'ADN.

(B) Distribution des acides aminés aliphatiques, aromatiques, polaires, non polaires, positifs ou négatifs sur la séquence protéique de RSE2. Ces distributions ont été recherchées sur Pepinfo (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/pepinfo/>).

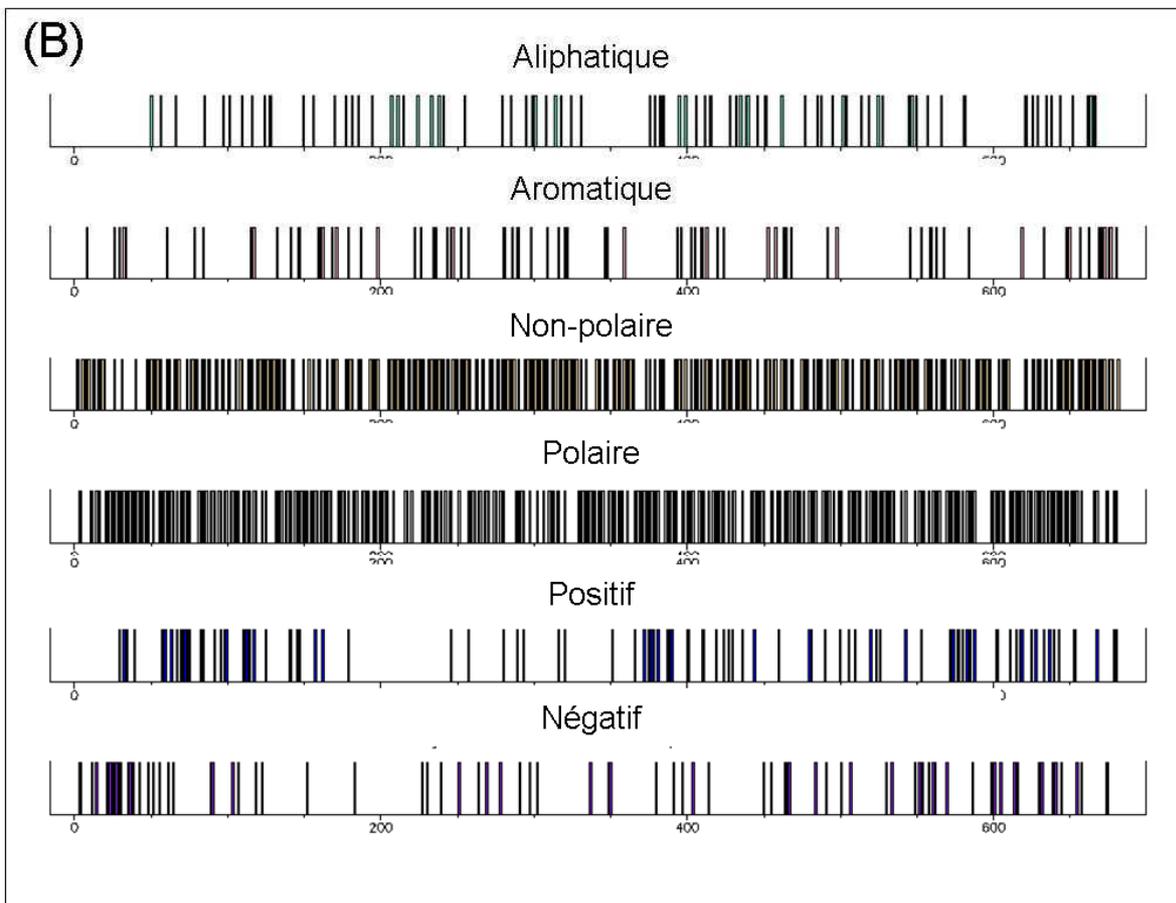
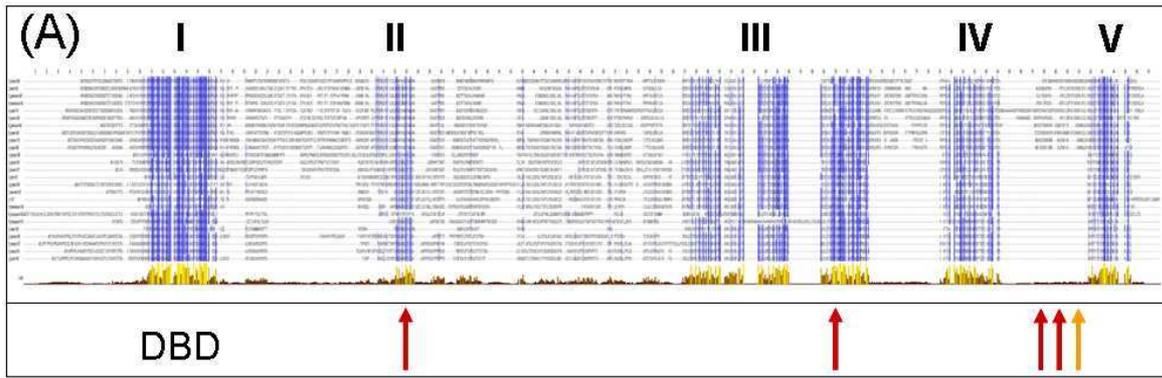


Figure 35 : Conservation et composition des séquences protéiques de RSE3

(A) Alignement par Muscle de 27 séquences d'orthologues de RSE3 chez des ascomycètes et des basidiomycètes d'après la base de données Fungipath. L'alignement est visualisé par Jalview. Les résidus avec un bon pourcentage d'identité sont surlignés en bleu et les histogrammes au dessous représentent la conservation, la qualité et le consensus pour chacune des positions. Ces valeurs sont calculées par le programme Jalview. Les espèces utilisées sont : *A. nidulans*, *A. oryzae*, *B. cinerea*, *C. heterostrophus*, *F. graminearum*, *M. graminicola*, *N. haematococca*, *N. crassa*, *P. anserina*, *S. nodorum*, *T. reesei*, *A. gossypii*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *D. hansenii*, *K. lactis*, *K. thermotolerans*, *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica*, *C. cinereus*, *L. bicolor*, *M. larici-populina*, *P. chrysosporium*, *P. ostreatus*, *S. commune*, *S. roseus* et *U. maydis*. Les flèches rouges indiquent les positions des mutations gain de fonction isolées (Article 2), la flèche jaune indique la position de la duplication. DBD : domaine de liaison à l'ADN.

(B) Distribution des acides aminés aliphatiques, aromatiques, polaires, non polaires, positifs ou négatifs sur la séquence protéique de RSE2. Ces distributions ont été recherchées sur Pepinfo (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/pepinfo/>).

Pour la protéine RSE3, seules les deux premières substitutions sont dans des régions conservées, tandis que les deux dernières, ainsi que la région dupliquée sont dans une région faiblement conservée (Figure 36 A). Cependant cette conservation s'améliore si l'alignement est restreint aux séquences des pézizomycotina (sous groupe des ascomycètes regroupant les aspergilli, *N. crassa* et *P. anserina*) (Annexe 7). La structure de RSE3 révélée par ces alignements montre donc une conservation différente de RSE2, avec apparemment une région spécifique à une sous classe des ascomycètes. C'est dans cette région que pourrait se trouver le domaine activateur d'après la dissection fonctionnelle faite (Article 2) Ces données pourraient suggérer qu'il existe une « fonction » ou une régulation spécifique de ce facteur de transcription, restreinte aux pézizomycètes. Comme pour la protéine RSE2, l'analyse en détail de la séquence protéique n'a pas montré d'enrichissement de ces domaines en un (ou plusieurs) types d'acides aminés (Figure 36 B).

3. Analyse métabolomique de la réponse à un traitement à l'antimycine et du mutant gain de fonction *rse2-1* (*rse2*^{Y326D})

Les facteurs de transcription RSE2 et RSE3 sont impliqués dans une reprogrammation métabolique en réponse à un dysfonctionnement respiratoire (régulation des enzymes de la néoglucogenèse). Cette reprogrammation a été explorée par une analyse métabolomique, réalisée sur la Plateforme Métabolisme Métabolome de l'IFR87. L'analyse a comparé un traitement à l'antimycine aux conditions standard de culture d'une part, et la souche *rse2*^{Y326D} à la souche sauvage d'autre part, afin de déterminer (i) quelle est la reprogrammation du métabolisme de *P. anserina* en réponse à un dysfonctionnement respiratoire et (ii) si la mutation *rse2*^{Y326D} est suffisante pour induire cette reprogrammation.

3.1 Méthodologie

Brièvement, 100mg de mycélium ont été récupérés pour chacune des conditions (trois répliques par condition) et lyophilisés. Une extraction méthanol/eau des échantillons (Noctor *et al.*, 2007) a été faite sur 15mg de matière sèche. Les métabolites ont été analysés par GC/TOF-MS (Noctor *et al.*, 2007), les données ont été vérifiées manuellement et traitées avec le logiciel ChromaTOF. Le niveau moyen de chaque métabolite (sur les trois répliques) pour chacune des conditions a été normalisé sur le niveau moyen de la souche sauvage en

conditions standard. Ont été retenus comme significativement différentes, les comparaisons avec une p-value < 0.05 (test de Student). Les résultats pour chacun des métabolites détectés sont donnés en annexe 8.

3.2 Analyse métabolomique de la réponse à un traitement à l'antimycine

Les résultats majeurs de cette comparaison schématisés sur la figure 36 sont 1) une diminution significative le l' α -cétoglutarate, 2) une augmentation importante des acides gras en réponse à l'antimycine (de 2 à 111 fois plus) 3) une augmentation significative de plusieurs acides aminés (cystéine, lysine, isoleucine, tyrosine, arginine et glutamine) et 4) une augmentation significative du glycérol-2-phosphate, du glycérol-3-phosphate et du mannitol (qui sont des dérivés de la glycolyse).

La diminution de 70% du niveau d' α -cétoglutarate suggère fortement un ralentissement du cycle de Krebs sur antimycine. Cet effet ne peut se voir pour les autres intermédiaires du cycle puisque ceux-ci existent aussi dans d'autres compartiments (dans le cytosol et notamment dans le cycle du glyoxylate). De plus, les métabolites augmentés sont tous des « bouts de chaîne » des voies catapleurotiques. Ces voies (en équilibre avec les voies inverses, ou anapleurotiques) sont impliquées dans l'utilisation des intermédiaires du TCA comme substrats pour éviter l'engorgement de celui-ci (Owen *et al.*, 2002 pour revue). Ces résultats sont donc cohérents avec une diminution de l'activité respiratoire, résultant en un ralentissement du TCA (diminution de l' α -cétoglutarate). Pour éviter un engorgement de celui-ci et une accumulation d'équivalents réducteurs, on aurait activation des voies catapleurotiques se traduisant par une augmentation des acides gras, des acides aminés et des dérivés de la glycolyse. En plus de consommer les intermédiaires du cycle de Krebs, et donc de déplacer le métabolisme carboné de la mitochondrie vers le cytosol, certaines de ces voies (la biosynthèse des acides gras, du mannitol, du glycérol-2-P et du glycérol-3-P) sont consommatrices d'équivalents réducteurs et pourrait avoir de plus une fonction dans le maintien de la balance RedOx.

3.3 La mutation *rse2*^{Y326D} est suffisante pour induire cette reprogrammation

La mutation *rse2*^{Y326D} est un gain de fonction mimant l'état activé de la protéine RSE2. Cette activation se fait normalement quand le transfert d'électrons le long de la chaîne respiratoire est perturbé (chez le mutant *cox5::ble* ou en présence d'antimycine par exemple). On peut se demander si l'activité de la protéine mutante est la même que celle de la protéine sauvage en présence d'inducteur (antimycine), et si cette activité conduit à la même reprogrammation métabolique. Le métabolome de la souche sauvage sur antimycine suggère fortement un ralentissement du TCA alors que le transcriptome de la souche *rse2*^{Y326D} ne montre aucune modification de l'expression des enzymes du TCA ou des voies de biosynthèse des acides gras et des acides aminés. Or, de façon surprenante, les résultats montrent une même tendance de régulation dans une souche *rse2*^{Y326D} que dans la souche sauvage sur antimycine : une diminution de l' α -cétoglutarate, une augmentation des acides gras, de certains acides aminés et du glycérol-2-phosphate (Figure 37).

La diminution de l' α -cétoglutarate est du même ordre de grandeur que celle observée sur antimycine, et la vitesse de respiration du mutant *rse2*^{Y326D} doit être mesurée. S'il y a bien un ralentissement du TCA aussi bien dans la souche sauvage sur antimycine que chez le mutant *rse2*^{Y326D}, cela suggère que ce ralentissement est bien contrôlé par RSE2 et RSE3. Il en est de même pour les voies catapleurotiques induites. L'analyse transcriptomique précédente permet de penser que ces régulations sont certainement des effets indirects des facteurs de transcription RSE2 et RSE3. Les liens entre la régulation transcriptionnelle observée et les modifications métaboliques restent à éclaircir, mais ces résultats appuient le fait que RSE2 et RSE3 sont des régulateurs majeurs de la régulation rétrograde induite en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial.

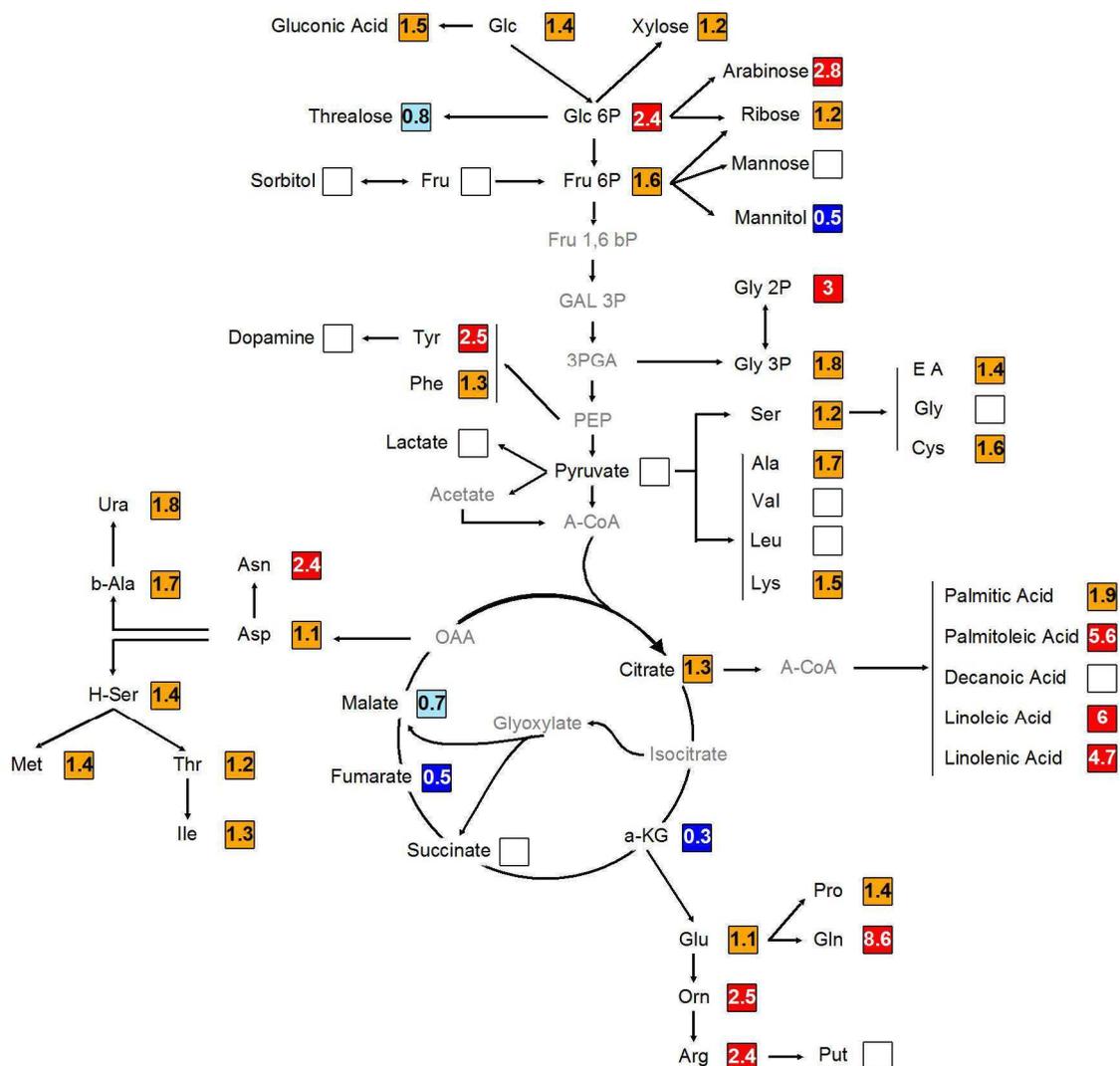


Figure 37: Niveau des métabolites dans le mutant gain de fonction *rse2*^{Y326D} comparé à une souche sauvage en condition standard

L'analyse a été faite sur trois répliques biologiques indépendantes par condition. Le niveau de chacun des métabolites a été calculé par rapport à la souche sauvage. Ont été considérées significatives les valeurs avec $p < 0.05$ (test de student). Les métabolites en gris n'ont pas pu être détectés lors de l'analyse. Sont surlignés en rouge les métabolites avec un niveau au moins 2 fois supérieur à la souche sauvage, en orange ceux avec une augmentation inférieure à un facteur 2, en bleu foncé les métabolites avec un niveau au moins deux fois inférieur à la souche sauvage et en bleu clair ceux avec une diminution inférieure à un facteur 2.

Abréviations : 3PGA, 3-phosphoglycerate; A-CoA, acétylCoA; a-KG, alpha-cétoglutarate; Ala, alanine; Arg, arginine; Asn, asparagine; Asp, aspartate; b-Ala, beta-alanine; E A, ethanolamine; Fru, fructose; Fru1,6-bP, fructose-1,6-biphosphate; Fru6P, fructose 6-phosphate; GAL3P, glyceraldéhyde-3-phospharte; Glc, glucose; Glc 6P, glucose-6-phosphate; Gln, glutamine; Glu, glutamate; Gly, glycine; Gly 2P, glycerol-2-phosphate; Gly 3P, glycerol-3-phosphate; H-Ser, homoserine; Ile, isoleucine; Leu, leucine; Lys, lysine; Met, methionine; OAA, oxaloacétate; Orn, Ornithine; PEP, phosphoénolpyruvate Phe, phenylalanine; Pro, proline; Put, putrescine; Ser, serine; Thr, threonine; Tyr, tyrosine; Ura, uracile; Val, valine

C. Etude préliminaire d'un suppresseur faible du mutant *cox5::ble*

1. Caractérisation d'un suppresseur faible du mutant *cox5::ble* indépendant des facteurs RSE2 et RSE3

1.1 Description phénotypique

Comme cité dans l'article 2, lors de la saturation du crible ayant permis d'isoler les différents allèles gain de fonction des gènes *rse2* et *rse3*, cinq suppresseurs indépendants non localisés dans ces gènes ont été isolés. Ils présentent un phénotype caractéristique en contexte *cox5::ble* : une légère amélioration de la vitesse de croissance et une pigmentation plus importante du mycélium (Figure 38).

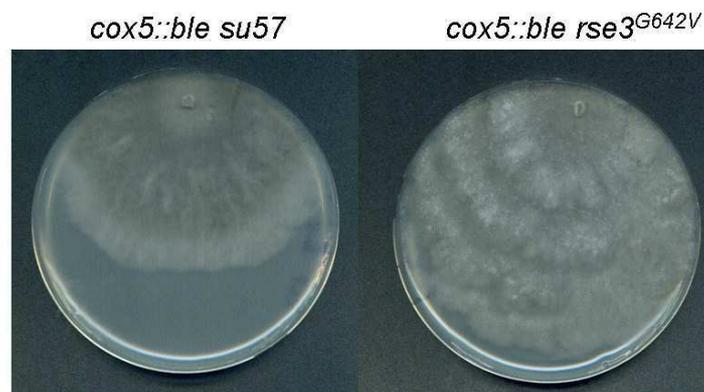


Figure 38: Phénotype de deux revertants issus de mutant *cox5::ble*

Photos à 4 jours des souches *cox5::ble su57*, *su57* étant un des suppresseurs différent des gènes *rse2* et *rse3*, et *cox5::ble rse3^{G642V}* (ou *rse3-1*), allèle gain de fonction de la protéine RSE3

Deux des cinq suppresseurs (*su57* et *su38*) ont été dissociés de la mutation *cox5::ble*. En contexte sauvage, ils présentent tous deux les mêmes phénotypes : un mycélium plus foncé avec un aspect de type « cripple growth » (Silar *et al.*, 2001) après un certain temps de croissance (figure 39 A et B), une fertilité femelle très diminuée (Figure 39 A) et une longévité nettement plus courte : 5,91+/-1,03 cm vs 13,27+/-2,35 cm pour la souche sauvage (Figure 38 C).

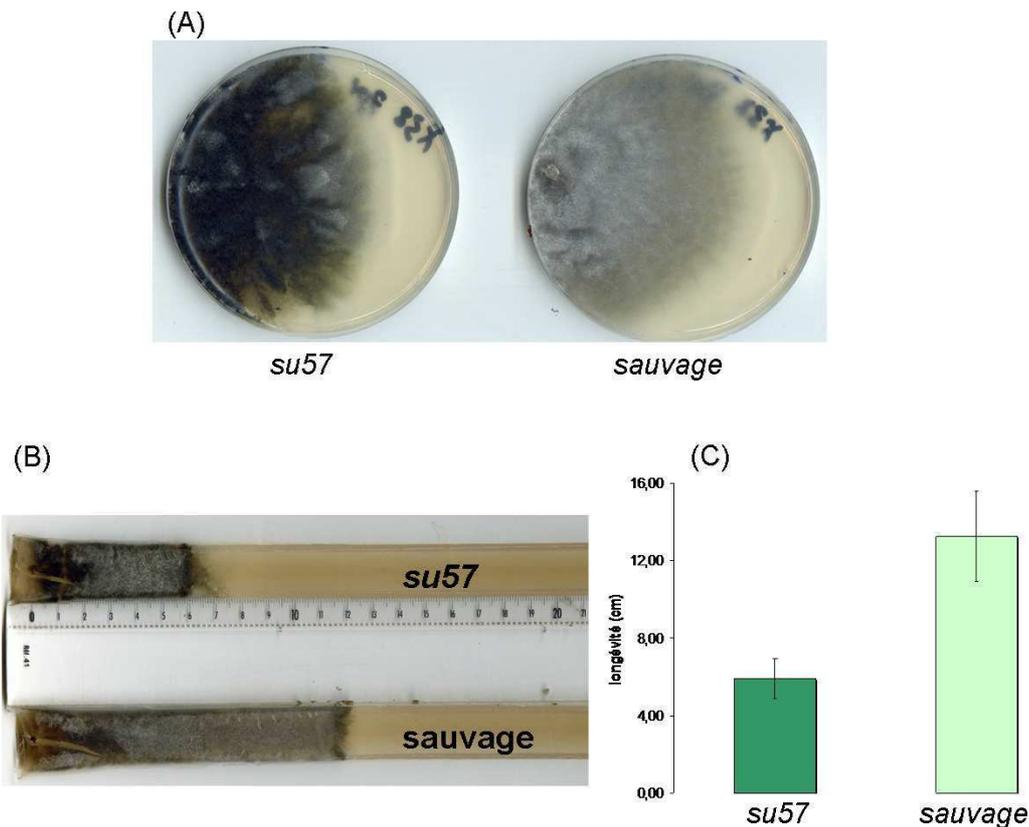


Figure 39: Aspects phénotypique du suppresseur *su57*

(A) Phénotype mycélien d'une souche *su57* en comparaison avec une souche sauvage

(B) Longévité en tube d'une souche *su57* et d'une souche sauvage

(C) Longévité mesurée sur 6 spores de chacun des génotypes (chaque mesure a été faite en triplicats), la longévité est donnée en centimètres

L'ensemble des phénotypes observés pour *su57* sont identiques à ceux observés pour *su38*. Ces phénotypes sont clairement différents des phénotypes des allèles gain de fonction des gènes *rse2* et *rse3* précédemment décrits.

1.2 L'effet suppresseur de *su38* et *su57* ne passe pas par l'induction du gène *aox*

Pour savoir si l'effet suppresseur observé en contexte *cox5::ble* était du à une induction du gène *aox*, et donc si ces suppresseurs étaient localisés dans un gène codant un acteur de la voie de régulation, RSE2 ou RSE3, les souches *su38* et *su57* ont été mises en croissance sur antimycine. Contrairement aux souches portant les allèles gain de fonction des gènes *rse2* et *rse3*, *su38* et *su57* poussent avec un délai identique à celui de la souche sauvage sur antimycine. Ces résultats, associés à des quantifications par RT-qPCR du niveau de transcrits du gène *aox*, permettent de conclure qu'aucun de ces suppresseurs n'est responsable d'une surexpression du gène *aox*. Ces deux suppresseurs ne sont donc pas impliqués dans la même voie de régulation que celle médiée par les facteurs de transcription RSE2 et RSE3.

2. Caractérisation du gène *med13*

Une analyse génétique a permis de localiser *su38* et *su57* sur le chromosome 4 de *P. anserina* avec un pourcentage de post-réduction d'environ 80%. La recherche de gènes candidats dans cette région du génome n'a rien donné. Les mutations *su38* et *su57* sont vraisemblablement localisées dans le même gène : même phénotype, même pourcentage de post réduction, même liaison avec le chromosome 4, absence de recombinaison entre elles. Les deux souches porteuses de ces mutations ont été séquencées pour l'ensemble de leur génome sur la plateforme Imagif. L'analyse des séquences a montré qu'une grande partie des polymorphes (substitutions, insertions ou délétions) sont positionnés dans des régions répétées du génome (transposons et duplications partielles) ou au niveau des centromères.

Nous nous sommes concentrés à l'analyse de la région du chromosome 4 dans laquelle sont localisées les deux mutations d'après l'analyse génétique. Cette analyse a révélé que les deux souches mutantes avaient une insertion d'un nucléotide : les mutants ont un poly-C de 9 nucléotides tandis que la souche sauvage a un poly-C de 8 nucléotides dans le gène Pa_4_6670. Cette insertion modifie le cadre de lecture et est responsable de l'apparition d'un codon stop précoce (tronquant la protéine de près de 1000 acides aminés) conduisant vraisemblablement à la perte de fonction de la protéine codée par ce gène (Figure 40).

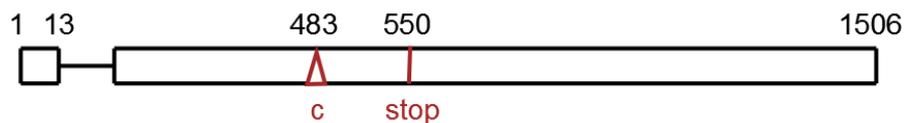


Figure 40: Structure du gène Pa_4_6670

Le gène Pa_4_6670 est composé de deux exons (rectangles blancs) et d'un intron (trait). La mutation correspondant à *su38* et *su57* est l'insertion d'un nucléotide (c) (représenté par un triangle rouge) au niveau du codon 483. Cette insertion est responsable d'une modification du cadre de lecture conduisant à un codon stop précoce (le 550^e, en rouge), tronquant ainsi la protéine de près de 1000 acides aminés.

La recherche d'orthologues de Pa_4_6670 a montré que ce gène pourrait coder pour une des sous unités du complexe du médiateur (Med13p chez *S. cerevisiae*). Le médiateur a été identifié chez *S. cerevisiae*, c'est un complexe de 21 sous unités requis pour l'expression basale ou régulée de pratiquement tous les gènes transcrits par l'ARN polymérase Pol-II. Les mécanismes exacts de la fonction du médiateur restent encore méconnus, bien que son implication dans divers mécanismes de régulation de la transcription (stimulation du niveau

basal de transcription, support de la transcription régulée et contribution à la phosphorylation de l'ARN Pol II par la kinase TFIIF) a été reportée (Björklund and Gustafsson, 2005, 2004). La sous unité Med13p (ou Srb9p) est une des plus grosses sous unités de ce complexe. Elle est conservée chez *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. elegans*, *D. melanogaster* et *H. sapiens* (Bourbon *et al.*, 2004). La protéine Med13p appartient à un module additionnel spécifique qui est retrouvé dans les extraits de cellules en phase exponentielle sur milieu riche en glucose, mais qui est absent des extraits de cellules en phase stationnaire (Björklund and Gustafsson, 2005, 2004). Plusieurs données tendent à montrer que le module auquel appartient Med13p exerce un effet répressif sur plus d'une centaine de gènes dont la moitié est dé-réprimé en carence nutritive (Holstege *et al.*, 1998; Spahr *et al.*, 2003). La dégradation de ce module en carence nutritive serait responsable de la levée de la répression de nombreux gènes et pourrait être soumise à régulation (Björklund and Gustafsson, 2005). On pourrait imaginer que chez ce mutant, il y a levée de la répression de certains gènes normalement réprimés par MED13.

L'étude de ce mutant et des rôles de MED13 chez *P. anserina* est actuellement poursuivi au laboratoire, et des résultats préliminaires montrent que l'inactivation du gène *med13* ($\Delta med13$) est bien responsable du phénotype observé.

Discussion

Discussion

Les travaux réalisés au cours de cette thèse avaient pour but de caractériser une voie de régulation rétrograde induite en condition de stress mitochondrial chez le champignon filamenteux *Podospora anserina*. La définition la plus stricte, utilisée chez les différents modèles, d'une régulation rétrograde est une communication de l'organelle vers le noyau responsable d'une reprogrammation de l'expression du génome. La fonction adaptative de cette voie de communication est évidente, puisqu'elle permet de réguler l'expression du génome nucléaire en fonction du statut physiologique de l'organelle.

Je me suis particulièrement intéressée à la régulation rétrograde en réponse à un dysfonctionnement respiratoire chez le champignon filamenteux *P. anserina*. Un des gènes cibles de cette régulation rétrograde mitochondriale a été identifié : le gène *aox*, ainsi que deux acteurs de cette régulation : les facteurs de transcription RSE2 et RSE3. Ce travail a permis de mettre en évidence (i) une possible organisation fonctionnelle des protéines RSE2 et RSE3 et des données suggèrent que cette organisation pourrait être conservée (ii) deux conditions d'activation de ces facteurs de transcription qui sont un dysfonctionnement mitochondrial et, de façon surprenante, une source de carbone néoglucogénique (iii) une partie de la reprogrammation de l'expression du génome nucléaire en réponse à cette régulation rétrograde mitochondriale ainsi que la reprogrammation métabolique en résultant.

L'ensemble des résultats publiés et en cours de soumission, sont discutés dans les articles 1 et 2. Cependant, les résultats annexes apportent des éléments supplémentaires et je souhaiterais revenir sur trois points de discussion 1) la conservation des acteurs de la régulation rétrograde étudiée, RSE2 et RSE3, 2) la reprogrammation transcriptomique et métabolique résultant de leur activation par un dysfonctionnement mitochondrial ou dans des conditions néoglucogéniques, 3) un rôle potentiel de ces facteurs de transcription à l'état non activé.

1. RSE2 et RSE3 sont des facteurs de transcription conservés.

Les protéines appartenant à la famille des zinc-cluster, portant le motif $Zn(II)_2Cys_6$ n'ont été identifiées que dans le règne des champignons. La grande majorité des protéines appartenant à cette famille a été décrite chez des ascomycètes, notamment chez *S. cerevisiae* (Todd and Andrianopoulos, 1997 et MacPherson *et al.*, 2006 pour revues). A ma connaissance, seuls deux ont été décrits chez des basidiomycètes : la protéine PRIB, qui semble régulée au cours du développement de *Lentinus edodes* (Endo *et al.*, 1994; Miyasaki *et al.*, 1997) et une séquence codante isolée à partir d'une librairie d'ADN génomique d'*Armillaria mellea* (Misiek and Hoffmeister, 2008). Les alignements des figures 34 et 35 montrent pourtant que les protéines RSE2 et RSE3 semblent conservées au-delà des ascomycètes. De plus, chacun des orthologues utilisés pour les alignements présente le motif caractéristique $Cys_{x2}Cys_{x6}Cys_{x5}Cys_{x2}Cys_{x8}Cys$ (à l'exception de l'orthologue de RSE2 chez *Aspergillus oryzae*, vraisemblablement à cause d'une erreur d'annotation du génome de ce dernier).

La conservation de ces protéines ne traduit pas forcément une conservation fonctionnelle. En effet, il n'y a pas de conservation fonctionnelle entre les protéines de *P. anserina* et de *S. cerevisiae* (RSE2 et Rds2p respectivement) pour les mécanismes de résistance aux drogues (Figure 24, 25 et 26). Par contre, Rds2 et Ert1 (orthologue de RSE3), comme RSE2 et RSE3, sont des régulateurs des enzymes de la néoglucogenèse (FBP, PCK), bien que ce ne soit pas les régulateurs principaux de cette voie métabolique. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré que le gène *PCK* est une de leur cible directe (Soontorngun *et al.*, 2007; Turcotte *et al.*, 2010), bien que d'autres régulateurs (Cat8p, Sip4p et Gsm1p) aient aussi été retrouvés lors de cette analyse (Turcotte *et al.*, 2010). Chez la levure, cette régulation se fait au cours du shift diauxique (passage d'un métabolisme fermentaire à un métabolisme respiratoire, voir l'annexe 1), et l'expression de FBP et PCK est soumise à la répression par le glucose même à faible concentration (Mercado and Gancedo, 1992; Mercado *et al.*, 1994). Par ailleurs, une interaction en double hybride a été mise en évidence entre ces deux facteurs de transcription (Ito *et al.*, 2001). Il semble donc qu'il y ait conservation fonctionnelle entre *S. cerevisiae* et *P. anserina* pour la régulation de la néoglucogenèse et que ces protéines agissent en hétérodimères chez les deux organismes. Ceci dit, ces deux organismes sont très éloignés et leur physiologie est très différente (*S. cerevisiae* a la capacité de fermenter et ne possède pas de respiration

alternative tandis que *P. anserina* est un aérobie strict). Il n'est donc pas étonnant que le rôle de RSE2 et RSE3 en réponse à une déficience respiratoire ne soit pas conservé chez *S. cerevisiae*. On peut noter cependant que le gène *PCK* est induit en présence d'antimycine mais non en contexte ρ^0 (Epstein *et al.*, 2001), et rien ne laisse penser que cette régulation soit contrôlée par Rds2. Par contre, chez le basidiomycète *Moniliophthora perniciosa*, il y a activation transcriptionnelle du gène *aox* en réponse à l'antimycine (Thomazella *et al.*, 2012). J'ai recherché par blast la présence d'homologues de RSE2 chez cet organisme et trouvé qu'il existait des EST couvrant une centaine d'acides aminés (du 300ème au 400ème, E.value de 6.10^{-37}). Cette région semble correspondre à des régions régulatrices de l'activité de RSE2 (Article 2) Par contre, aucune homologie n'est trouvée avec RSE3.

La conservation fonctionnelle la mieux établie reste celle avec les deux ascomycètes chez lesquels les orthologues de RSE2 et RSE3 ont été étudiés : *N. crassa* et *A. nidulans*. En effet, le rôle majeur et la nécessité de la présence des deux facteurs de transcription dans la régulation de l'AOX en réponse à un traitement à l'antimycine ont été montrés chez ces trois organismes (Chae, Nargang, *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2012; Sellem, Bovier *et al.*, 2009). La régulation des enzymes de la néoglucogenèse par ces facteurs de transcription n'a pas été étudiée chez *N. crassa*, mais elle est conservée chez *P. anserina* et *A. nidulans*, ainsi que l'incapacité à pousser sur des substrats néoglucogéniques pour des pertes de fonction de l'un ou l'autre (Suzuki *et al.*, 2012; Sellem, Bovier *et al.*, 2009). La présence obligatoire des deux facteurs de transcription pour la régulation de l'*aox*, de *fbp* et de *pck*, et surtout les expériences de retard sur gel effectuées chez *N. crassa* (Chae, Nargang, *et al.*, 2007) suggèrent fortement un mode d'action hétérodimérique de ces protéines. Chez cette famille de protéines, la dimérisation se fait généralement par un domaine coil-coiled adjacent au domaine de liaison à l'ADN (Schjerling and Holmberg, 1996). Cependant, aucun domaine coil-coiled ne peut être détecté chez RSE2 et RSE3, ni chez leurs orthologues. Chez *N. crassa*, la mise en évidence d'une interaction entre AOD2 et AOD5 (orthologues de RSE2 et RSE3 respectivement) a été faite avec des protéines tronquées ne comportant que le premier tiers N-terminal de chacune (Chae, Nargang, *et al.*, 2007; Chae and Nargang, 2009). Ces données suggèrent que 1) soit la fixation de chacune des protéines au doigt zinc permet à elle seule la dimérisation, 2) soit qu'il existe un domaine d'interaction non identifié situé dans la partie N-ter de ces protéines qui permet la dimérisation.

Concernant l'organisation de ces protéines, on peut noter une conservation plus ou moins grande suivant les régions entre les différents orthologues analysés, (Figure 34 et 35). Comme attendu, le domaine de liaison à l'ADN est très conservé. De façon surprenante, d'autres régions présentent une forte conservation alors que la région centrale de la famille des zinc-cluster est généralement peu conservée (MacPherson *et al.*, 2006), à l'exception de la « middle homology region » qui pourrait avoir une fonction régulatrice de l'activité transcriptionnelle (Schjerling and Holmberg, 1996), ce qui est en accord avec nos résultats d'analyse fonctionnelle. Les régions conservées observées entre les orthologues de RSE2 et RSE3 sont donc propres à ceux-ci. Cette conservation entre groupes d'orthologues pourrait avoir un rôle dans la spécificité de reconnaissance des cibles (au delà d'un triplet répété, CGG(N)₇CGG pour RSE2-RSE3) (Schjerling and Holmberg, 1996). De plus, pour RSE2, toutes les positions des mutations gain de fonction sont très conservées sur l'ensemble des orthologues analysés (Figure 34). Par contre, pour RSE3, les trois positions des mutations gain de fonction situées en C-terminal se trouvent dans une région conservée uniquement dans le sous groupe des pézizomycètes (Figure 35 et Annexe 7). Ces données suggèrent que ces positions appartiennent à des domaines qui ont une importance fonctionnelle, et que ces domaines et donc les mécanismes de régulation sont conservés entre orthologues.

La plus faible conservation de RSE3 pourrait indiquer que cette protéine a un rôle différent de son partenaire RSE2 comme cela a été décrit pour les protéines zinc-cluster Oaf1 et Pip2 de *S. cerevisiae* qui agissent en hétérodimères et contrôlent le métabolisme des acides gras (Karpichev and Small, 1998; Baumgartner *et al.*, 1999). On ne peut exclure l'apparition d'une fonction (ou d'une régulation) de RSE3 dans le sous groupe des pézizomycètes puisque dans ce sous groupe, les positions des mutations gain de fonction en C-terminal sont plus conservées. De plus, le nombre de positions trouvées lors du crible semble montrer qu'il existe moins de possibilités de rendre la protéine RSE3 constitutivement active par mutation par rapport à la protéine RSE2 (5 sites contre 8 pour RSE2). Cependant, pour l'instant, aucune donnée fonctionnelle ne permet de conclure à une fonction différente entre RSE2 et RSE3.

2. RSE2 et RSE3 répondent à deux types de stimuli en coréglant l'expression de l'AOX et de la néoglucogenèse.

Les résultats de cette étude ont montré que RSE2 et RSE3 sont activés à la fois par un dysfonctionnement respiratoire (antimycine, mutations de la chaîne respiratoire) ou par une source de carbone néoglucogénique (acétate) et que de cette activation entraîne l'induction de la transcription des gènes *aox*, *fbp* et *pck* (Figure x et y). Bien que non démontré, il est vraisemblable que ces cibles soient des cibles directes (Article 2). La coréglant des gènes *aox*, *fbp* et *pck* est conservée chez *A. nidulans* (Suzuki, 2012), et on peut supposer qu'elle l'est aussi chez *N. crassa*, qui est une espèce plus proche de *P. anserina* qu'*A. nidulans*. Ces résultats posent plusieurs questions : (i) Existe-t-il un sens biologique à cette coréglant ? (ii) Quel pourrait être le signal responsable de l'activation de RSE2 et RSE3?

Il n'est pas évident de lier fonctionnellement la régulation d'une voie respiratoire alternative, permettant de s'adapter à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire, à la régulation d'enzymes nécessaires à l'adaptation à une source de carbone : les substrats néoglucogéniques. Pourtant, RSE2 et RSE3 (et leurs orthologues chez *A. nidulans*, (Suzuki *et al.*, 2012)), qu'ils soient activés en réponse à un dysfonctionnement respiratoire ou par la source de carbone disponible, coréglant l'expression des gènes *aox*, *fbp* et *pck*. Pour tenter de comprendre le sens biologique de cette coréglant, on peut raisonner de deux points de vue, suivant que l'on cherche à comprendre la nécessité de réguler l'AOX sur substrat néoglucogénique, ou la nécessité de réguler la néoglucogenèse en conditions de dysfonctionnement respiratoire.

Chez *A. nidulans*, où le questionnement biologique est centré sur l'adaptation à la source de carbone, une hypothèse pour expliciter cette coréglant a été faite. Celle-ci postule qu'en condition néoglucogénique, l'AOX, en déviant partiellement le flux d'électrons de la chaîne respiratoire, pourrait permettre de maintenir un flux dans cette chaîne tout en évitant la production excessive d'ATP (qui perturberait l'équilibre de la balance ATP/ADP) ainsi que la production de ROS (Suzuki *et al.*, 2012). Il a aussi été montré chez *A. niger*, qu'à de fortes concentrations de glucose (conditions utilisées par l'industrie pour produire de l'acide citrique en grande quantité), l'AOX permettait de maintenir un flux d'électrons suffisant pour que le cycle de Krebs (TCA) soit fonctionnel tout en évitant un excès d'ATP, ce dernier étant alors produit par la glycolyse (Kirimura *et al.*, 2000, 2006). Toutefois, il a été montré

chez les plantes, que lorsque les deux voies sont présentes (AOX et voie cytochromique), l'AOX n'est utilisée qu'à un certain niveau de réduction du pool des quinones (35 à 40%) (Dry *et al.*, 1989; Siedow and Moore, 1993; Vanlerberghe and McIntosh, 1994). Ceci suggère que si la voie cytochromique fonctionne normalement, l'AOX n'est pas utilisée.

Dans l'article 2, centré sur la régulation rétrograde induite en réponse à un dysfonctionnement respiratoire, nous proposons une hypothèse permettant d'attribuer un rôle biologique à l'induction des gènes néoglucogéniques en cas de dysfonctionnement de la chaîne respiratoire. Cette hypothèse est basée sur la nécessité pour la cellule dans ces conditions, de ralentir le cycle de Krebs générateur d'équivalents réducteurs qui doivent être réoxydés par la chaîne respiratoire. La néoglucogenèse est une voie catapleurotique, c'est-à-dire qu'elle consomme des intermédiaires du TCA, et conduit ainsi à son ralentissement (Owen *et al.*, 2002 pour revue). La fonction biologique de la corégulation du gène *aox* et des gènes néoglucogéniques pourrait donc être de ralentir le TCA. Une telle hypothèse est renforcée par les résultats de l'analyse métabolomique de la souche sauvage de *P. anserina* sur antimycine (Figure 36) qui montre une augmentation des composés en bout de chaîne de voies catapleurotiques comme les acides gras (111 fois plus d'acide décanoïque et 5 fois plus d'acide palmitoléique par exemple) et les acides aminés (15 fois plus de glutamine et 3 fois plus de cystéine par exemple).

De part le lien étroit entre le TCA et la chaîne respiratoire, les deux métabolismes (carboné et oxydatif) sont intimement liés. Il n'est donc pas surprenant que la perturbation de l'un ait des répercussions sur l'autre et *vice versa*. Ce type de « double réponse » a été observé chez différents organismes :

- chez *S. cerevisiae*, il y a reprogrammation du métabolisme carboné par les facteurs de transcription Rtg1 et Rtg3 (Liu and Butow, 1999) et par le transporteur type Ato3 (Palkova *et al.*, 2002) en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial (voir Introduction). Le fait que la reprogrammation ne soit pas strictement identique à celle observée chez *P. anserina* s'explique certainement du fait de la capacité à fermenter de la levure et donc d'une adaptation métabolique spécifique.
- Chez les plantes, qui possèdent comme *P. anserina* une AOX, il y a induction de l'AOX en cas de dysfonctionnement de la chaîne respiratoire (Vanlerberghe and McIntosh, 1997; Vanlerberghe and McIntosh, 1992; Karpova *et al.*, 2002; Wagner and Moore, 1997; Saisho *et*

al., 2001, 1997; Djajanegara *et al.*, 2002) mais aussi en cas de perturbations du métabolisme carboné mitochondrial comme l'augmentation de la concentration en malate ou en citrate (Vanlerberghe and McIntosh, 1997; Djajanegara *et al.*, 2002; Zarkovic *et al.*, 2005). De plus, chez des mutants de l'ATP synthase, un important réajustement métabolique (métabolisme carboné et lipidique entre autres) a été observé (Busi, Gomez-Lobato, Araya, *et al.*, 2011). De nombreux rôles ont été proposés pour expliquer l'induction de l'AOX en absence de dysfonctionnement respiratoire (voir introduction). On peut notamment citer un rôle potentiel de l'AOX dans la modulation de la croissance des cellules végétales en réponse à la disponibilité de substrat (l'AOX est induite en réponse à une limitation en nutriments) (Sieger *et al.*, 2005) et dans l'accumulation des sucres au moins en réponse au froid (Wang *et al.*, 2011).

Les acteurs responsables de cette corégulation de la fonction respiratoire et du métabolisme carboné sont certainement différents en fonction des organismes, et surtout de leur mode de vie et de leur physiologie. Mais il semble que RSE2 et RSE3 (et probablement leur orthologues chez *N. crassa* et *A. nidulans*, et peut être aussi chez les autres pézizomycètes) soient des régulateurs majeurs dans la cascade de régulation conduisant à la corégulation des deux métabolismes puisque l'analyse métabolomique du mutant gain de fonction *rse2*^{Y326D} montre une reprogrammation similaire à celle de la réponse à l'antimycine (Figure 36 et 37).

En effet, ce mutant est un gain de fonction pour l'expression des gènes *aox*, *fbp* et *pck*, mais l'analyse transcriptomique seule (avec les critères de significativité appliqués (IFCI ≥ 2)) ne pouvait pas laisser penser que cette mutation soit responsable d'une reprogrammation importante du métabolisme. Or, chez ce mutant, on observe, comme chez une souche sauvage sur antimycine, une diminution de l' α -cétoglutarate et une augmentation des « bouts de chaîne » de voies catapleurotiques comme certains acides aminés et certains acides gras, ce qui tend à montrer une reprogrammation vers les voies catapleurotiques. L'analyse métabolomique de *rse2*^{Y326D} a été faite sur dextrine (polymère de glucose), en absence d'antimycine, les modifications du métabolome sont donc vraisemblablement les produits (directs et indirects) de l'effet de la mutation *rse2*^{Y326D}. La similarité des effets entre la mutation *rse2*^{Y326D} et la reprogrammation observée dans les conditions physiologiques d'activation de ce facteur de transcription (antimycine) suggère que RSE2 est un acteur

majeur de la réponse cellulaire à un dysfonctionnement mitochondrial. On peut alors supposer que les critères de significativité utilisés lors de l'analyse transcriptomique sont trop restrictifs, et que chez le mutant *rse2*^{Y326D} une régulation transcriptomique inférieure à 2 (non prise en compte lors de l'analyse) d'une enzyme et/ou d'un facteur de transcription conduise à la reprogrammation métabolique observée.

Cependant, bien que présentant des similarités, les deux analyses métabolomiques présentent également des différences : chez une souche sauvage sur antimycine, on observe une tendance à l'augmentation en succinate, malate et fumarate alors que chez un mutant *rse2*^{Y326D}, on observe la tendance inverse. On peut postuler que dans la souche sauvage, sur antimycine, il y a activation du cycle du glyoxylate de façon indépendante de RSE2 et RSE3, et que cette activation est responsable de l'augmentation de succinate, fumarate et malate produits à la fois par le TCA et par le cycle du glyoxylate. Par contre, dans une souche *rse2*^{Y326D} en absence d'antimycine, il n'y a pas d'activation du cycle du glyoxylate, puisque la chaîne respiratoire n'est pas perturbée, mais il y aurait cependant une réorientation métabolique vers les voies catapleurotiques du fait de la mutation. Il en résulterait alors un déséquilibre au niveau du TCA et une diminution de ses intermédiaires. Dans cette hypothèse, on peut se demander si ce déséquilibre a une répercussion sur la fonction respiratoire et si un ralentissement du TCA conduit à un ralentissement du transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire. Les propriétés respiratoires du mutant *rse2*^{Y326D} sont en cours d'analyse.

Une autre question soulevée par cette corégulation est la nature de l'effecteur responsable de l'activation de RSE2-RSE3. Les expériences de localisation des protéines taguées effectuées chez *A. nidulans* montrent que quelque soit la source de carbone utilisée (glucose ou acétate), les protéines sont localisées dans le noyau et liées à leurs cibles (Suzuki *et al.*, 2012). Ceci laisse penser que l'activation ne se fait pas par une relocalisation de ces protéines comme c'est le cas par exemple, pour l'hétérodimère Pdr1-Pdr3 chez *S. cerevisiae* (Figure 28) mais se fait alors qu'elles sont liées à leurs cibles. Il en est ainsi pour plusieurs facteurs de transcription de cette famille (MacPherson *et al.*, 2006 pour revue). Par exemple, Leu3 (qui est un régulateur de la voie de biosynthèse des acides aminés branchés, dont la leucine) est lié constitutivement à ses cibles et n'est activé qu'en présence d'un intermédiaire de la voie de biosynthèse de la leucine (Kirkpatrick and Schimmel, 1995; Sze *et*

al., 1992). Il a été proposé chez *A. nidulans* que l'activateur de AcuM et AcuK (orthologues de RSE2 et RSE3 respectivement) soit le malate. La concentration intracellulaire de ce métabolite serait augmentée sur acétate et sur proline (qui sont tous deux convertis en malate). Elle serait également augmentée en présence d'antimycine à cause de l'accumulation de NADH, qui aurait pour conséquence une diminution de l'activité de la malate déshydrogénase et donc une augmentation de la concentration en malate. Une telle augmentation a aussi été montrée dans des cultures transgéniques d'*A. thaliana* présentant un dysfonctionnement de l'ATP synthase, (Busi, Gomez-Lobato, Rius, *et al.*, 2011). De même, les résultats de l'analyse métabolomique (Figure 36) d'une souche sauvage de *P. anserina* sur antimycine montrent une légère, mais significative, augmentation du malate (x1.6). L'ensemble de ces résultats suggère qu'effectivement, en condition de dysfonctionnement de la chaîne respiratoire, il y a une augmentation du malate. Ce pourrait donc bien être un messenger de l'activation de ces facteurs de transcription comme il a été suggéré chez *A. nidulans*. Toutefois, aucune donnée expérimentale claire ne permet de conclure. De plus, on ne peut exclure une combinaison de signaux ou une signalisation différente en fonction du stimulus (dysfonctionnement mitochondrial/source de carbone). La différence du niveau de régulation des gènes *aox*, *fbp* et *pck* suivant ces deux stimuli pourrait aller dans ce sens. En effet sur antimycine, c'est le gène *aox* qui est le plus fortement induit (environ x50 alors qu'il est x2 sur acétate) et sur acétate, c'est le gène *pck* qui est le plus induit (environ x80 alors qu'il est x6 sur antimycine) (Figure 1 de l'article 2).

3. Ces facteurs de transcription pourraient avoir une fonction même à l'état non activé.

Les pertes de fonctions des facteurs de transcription RSE2 et RSE3 présentent une longévité significativement augmentée (Articles 1 et 2). Ces données suggèrent que dans des conditions de culture « standard » où ces facteurs de transcription ne sont normalement pas activés, ils jouent néanmoins un rôle dans le contrôle de la longévité. Il a été décrit précédemment que chez *S. cerevisiae*, la forme non activée du facteur de transcription Leu3 soit fonctionnelle et qu'en absence de son activateur, Leu3 ait la capacité de réprimer plusieurs gènes (cette fonction dépend de Mot1, un répresseur global de la transcription) (Boer *et al.*, 2005). On peut imaginer le même type de scénario pour RSE2 et RSE3, d'autant plus que l'analyse transcriptomique des souches $\Delta rse2$, $\Delta rse3$ et $\Delta rse2\Delta rse3$ montre que ces pertes de fonction sont responsables de nombreuses modifications de l'expression du

génomique nucléaire (Tableau 3). Cependant cette analyse transcriptomique n'a pas permis de proposer une hypothèse précise permettant d'expliquer l'accroissement de longévité de ces pertes de fonctions. En condition standard de culture, à l'exception du phénotype de longévité, aucun autre phénotype n'a été observé chez les souches $\Delta rse2$, $\Delta rse3$ et $\Delta rse2\Delta rse3$.

Pour terminer cette discussion, je souhaiterais brièvement revenir sur l'identification d'un mutant perte de fonction du gène Pa_4_6670 (homologue de Med13 chez *S. cerevisiae*). Ce mutant a été isolé 5 fois de façon indépendante dans le crible ayant permis d'identifier les mutations gain de fonction de RSE2 et RSE3. Cependant, la perte de fonction de *med13* conduit à un phénotype suppresseur faible comparé aux mutations gain de fonction de *rse2* ou *rse3*.

Le gène *med13* est une sous unité d'un module additionnel du médiateur (Björklund and Gustafsson, 2004, 2005) et il est conservée chez *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. elegans*, *D. melanogaster* et *H. sapiens* (Bourbon *et al.*, 2004). Ce module additionnel a été décrit chez *S. cerevisiae* comme un répresseur transcriptionnel actif en phase exponentielle et inactif en phase stationnaire (Chang *et al.*, 2001; Holstege *et al.*, 1998; Spahr *et al.*, 2003). Ce module est dégradé dans des conditions de carence nutritive, et cette dégradation est responsable de la levée de la répression de nombreux gènes (Björklund and Gustafsson, 2005).

Les résultats obtenus au cours de ce travail montrent qu'un dysfonctionnement mitochondrial conduit à une reprogrammation transcriptionnelle et métabolomique, notamment une régulation de la néoglucogenèse, voie utilisée aussi pour s'adapter à des carences nutritives. Ce n'est donc pas un hasard que le crible, basé sur l'amélioration du phénotype du mutant *cox5::ble*, nous ait permis d'identifier un régulateur transcriptionnel général impliqué dans l'adaptation aux conditions de disponibilité en nutriments (phase stationnaire et carence nutritive).

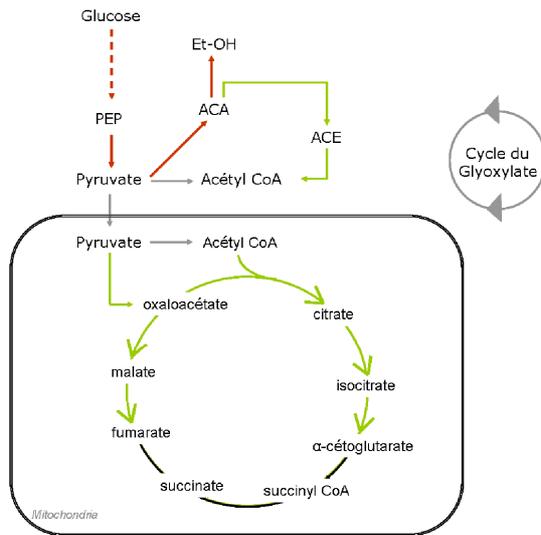
Le rôle de MED13, et donc du médiateur et de son module additionnel, en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial reste à explorer ; son rôle en condition « standard » de culture reste aussi à explorer puisque sa perte de fonction est responsable d'une diminution de longévité.

Annexes

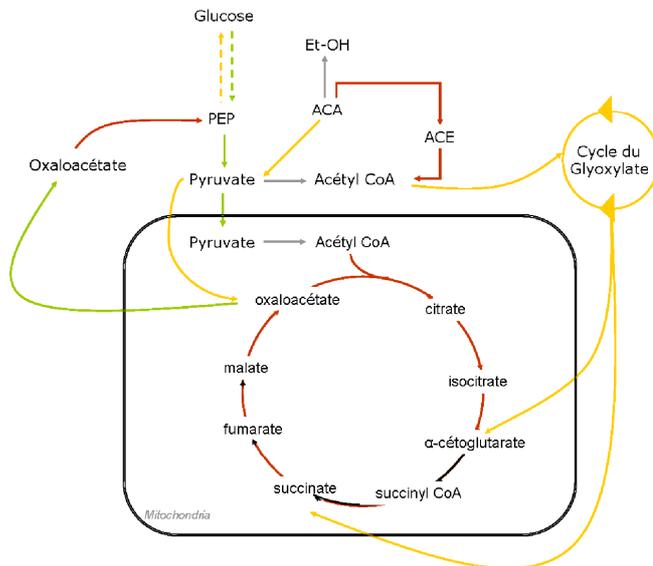
Annexe 1:

Régulation transcriptionnelle et flux métabolique autour du cycle de Krebs chez *S. cerevisiae*.

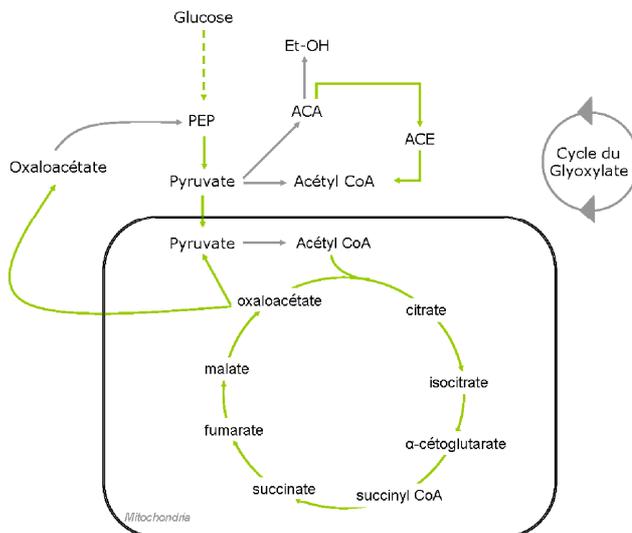
Métabolisme fermentaire



Shift Diauxique



Métabolisme respiratoire



Représentation du métabolisme carboné en condition fermentescible, lors du shift diauxique et en milieu respiratoire.

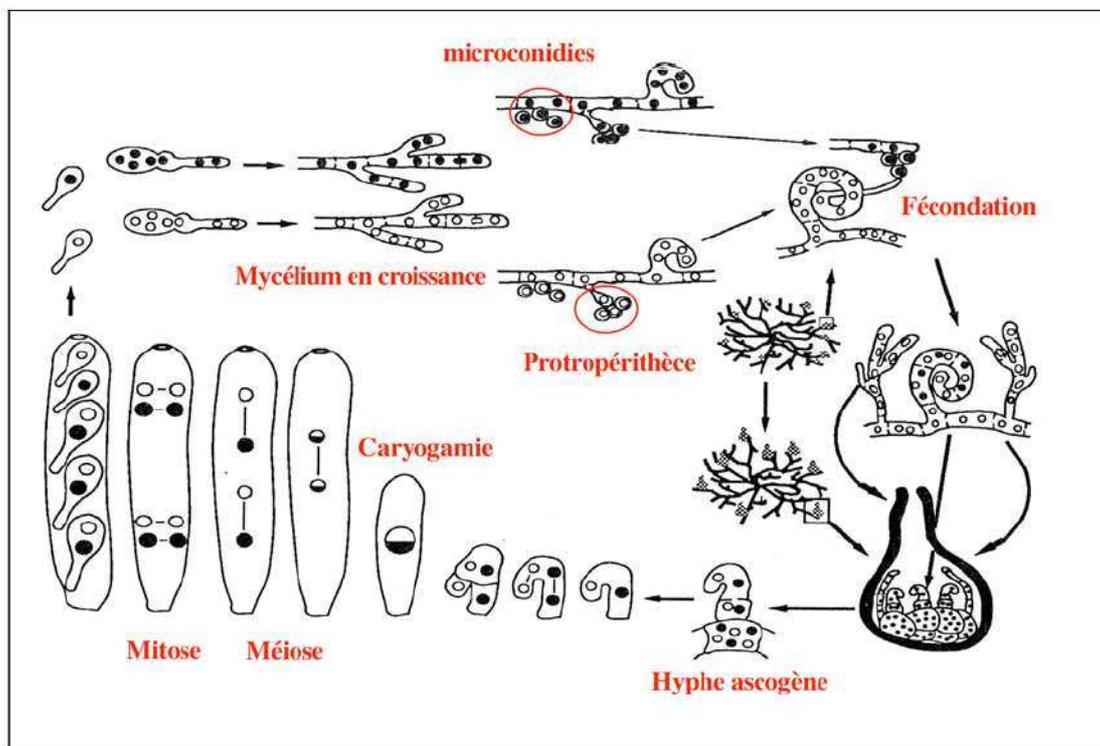
En Rouge : les voies induites transcriptionnellement, en jaune les flux métaboliques validés et en vert les voies induites transcriptionnellement et dont les flux métaboliques ont été validés, en gris : les voies sans données. En trait discontinu, les réactions catalysées par plusieurs enzymes.

PEP : phospho-énoypyruvate, ACA : acétaldéhyde, Et-OH : éthanol, ACE : Acétate. D'après (DeRisi, 1997; Gombert *et al.*, 2001; Camarasa, 2003).

Annexe 2 :

Le cycle de vie de *P. anserina*

P. anserina est un organisme hétérothallique qui possède deux types sexuels contrôlés par les locus *mat+* et *mat-*. Chaque thalle, en présence de lumière et en carence nutritive, produit des organes mâles ou microconidies et femelles ou ascogones (ou protopérithèces). Les ascogones possèdent une extension apicale (le trichogyne) capable de fusionner avec une microconidie de type sexuel opposé (fécondation). L'organe femelle fécondé se différencie en un organe de fructification, le périthèce (Figure).



Représentation schématique du cycle de vie de *P. anserina*.

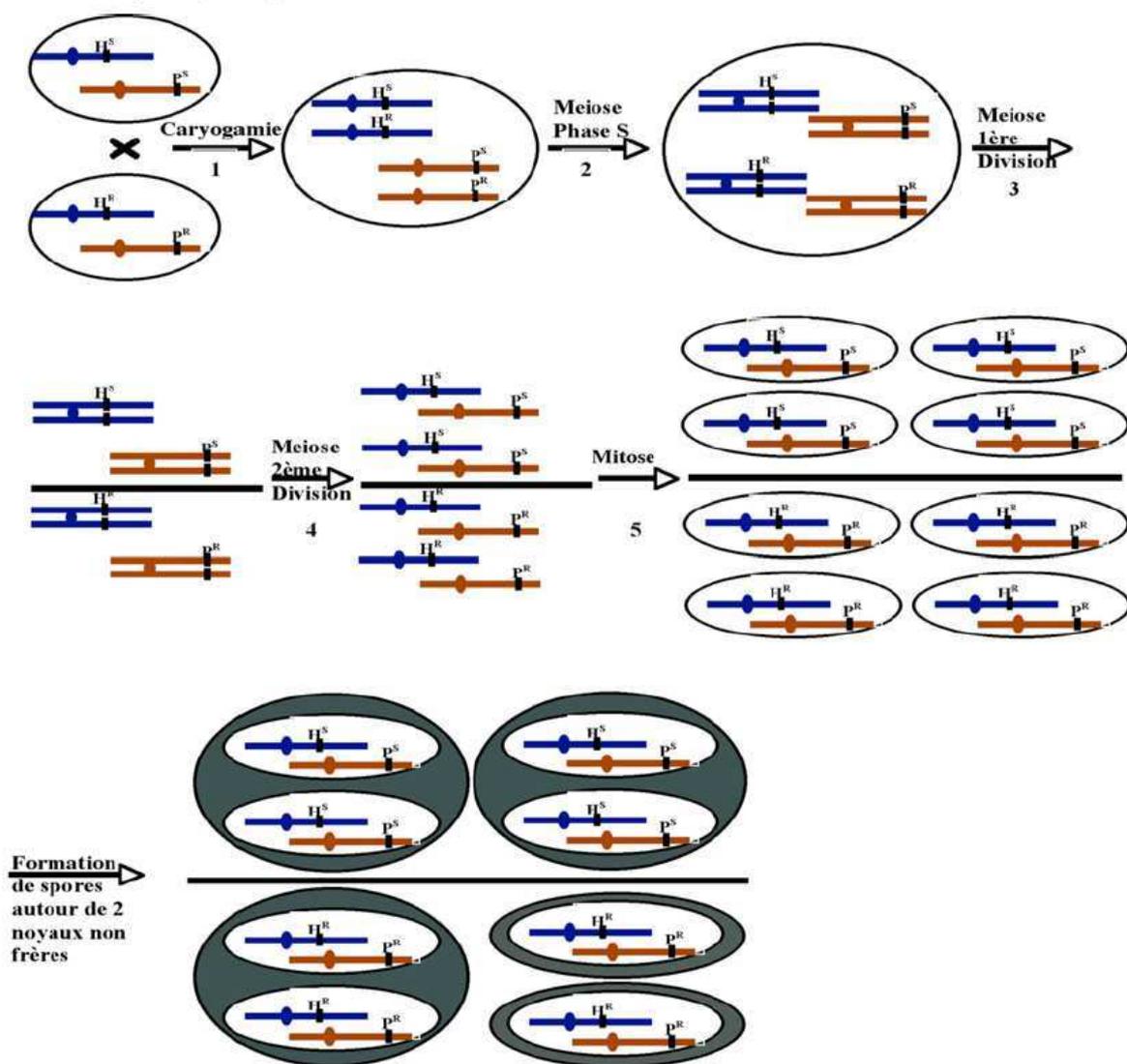
Il est important de souligner que les deux noyaux, mâle et femelle, ne fusionnent pas immédiatement ; ils se divisent et génèrent des cellules plurinuclées qui contiennent un mélange de noyaux des deux types sexuels. Il y a ensuite formation de cellules dicaryotiques qui contiennent un noyau de chaque type sexuel et caryogamie. La caryogamie est immédiatement suivie d'une méiose, elle-même suivie d'une mitose post-méiotique. Les fuseaux mitotiques se placent perpendiculairement aux fuseaux méiotiques. Les spores se forment autour de deux noyaux non frères comme indiqué sur la figure ci-dessus et on

obtient des asques à quatre spores binuclées englobant deux noyaux non frères dans une même ascospore. Un gène donné peut être pré-réduit (les 2 allèles de ce gène ségrégent dès la première division méiotique) ou post-réduit (les 2 allèles ségrégent à la seconde division méiotique) indiquant l'absence ou la présence d'un crossing-over entre ce gène et son centromère. Dans environ 1% des cas, l'étape de sporulation est imparfaite et conduit à la formation de trois grosses spores binuclées et de 2 petites uninuclées. Ces dernières sont à l'origine de souches monocaryotiques (Figure).

Annexe 3 :

Modalité de ségrégation de 2 gènes indépendants chez *P. anserina*

Le schéma ci-dessous présente un croisement entre une souche $P^R H^R$ possédant un transgène qui confère la résistance à la phléomycine (P^R , en rouge) et un transgène qui confère la résistance à l'hygromycine (H^R , en bleu) localisés sur 2 chromosomes différents et une souche sauvage sensible aux 2 antibiotiques ($P^S H^S$).



Ségrégation de 2 gènes physiquement indépendants chez *P. anserina*

Dans ce schéma, les 2 transgènes, localisés sur 2 chromosomes différents sont tous 2 pré-réduits (absence de crossing-over entre le gène et son centromère). Sont représentés la

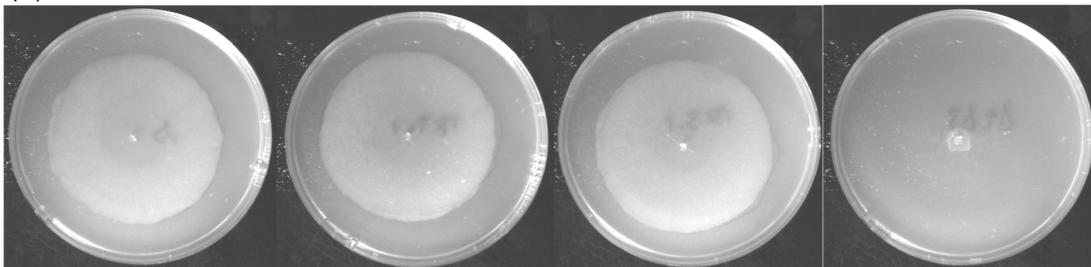
caryogamie (1) la phase S (2) précédant la première division méiotique (3) puis la deuxième division méiotique (4). La méiose est directement suivie d'une mitose (5). Cette dernière se fait suivant un plan perpendiculaire au plan de division méiotique et conduit à la formation de 8 noyaux haploïdes. Les spores se forment autour de deux noyaux non frères. Ceci conduit à la formation d'asques à 4 spores binuclées. Dans quelques rares cas (1% des asques), cette étape est imparfaite et conduit à la formation d'asques contenant 3 grosses spores binuclées et 2 spores uninuclées. Pour 2 gènes génétiquement indépendants (comme c'est le cas représenté ici pour les 2 transgènes), on obtiendra autant d'asques contenant 2 grosses spores binuclées $P^S H^S$ et 2 grosses spores binuclées $P^R H^R$ que d'asques contenant 2 grosses spores binuclées $P^R H^S$ et 2 grosses spores binuclées $P^S H^R$. La post réduction (crossing over entre le centromère et le gène étudié) de l'un ou des 2 gènes aboutirait à l'obtention de 4 spores contenant les 2 types de noyaux $P^R H^S$ et $P^S H^R$.

Annexe 4:

Phénotype de croissance sur tween 80

Tween 80 – 5 jours de croissance:

(A)



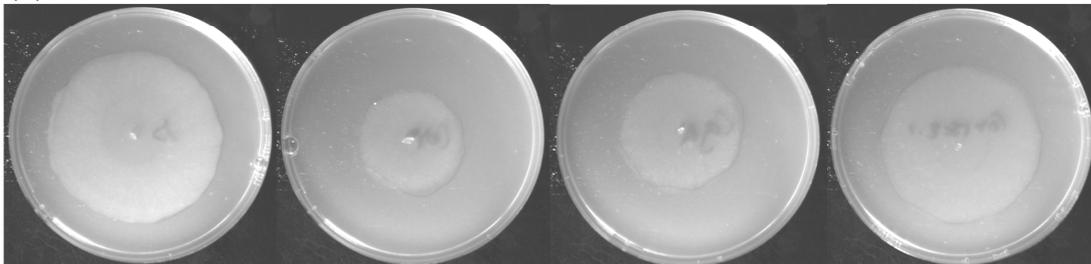
s

rse2-1

rse3-1

$\Delta rse2 \Delta rse3$

(B)



s

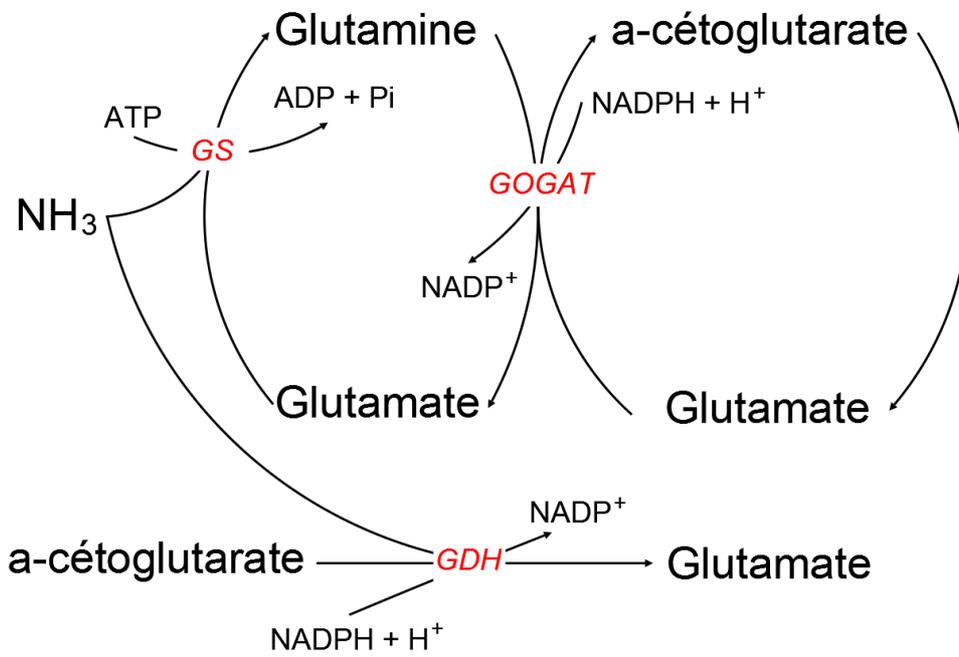
cox5::ble

cox5::ble gpd-aox

cox5::ble rse2-1

Croissance de différentes souches de *P. anserina* sur tween 80 à 0.04%

Annexe 5 :



Voie d'assimilation de l'ammonium et synthèse de glutamate par les enzymes GOGAT et GDH

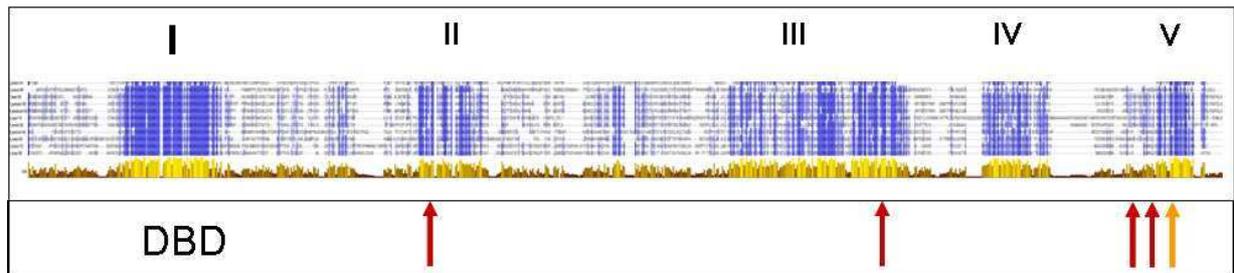
Annexe 6 :

Classification des espèces utilisées pour les alignements de séquence protéiques

Ascomycètes	Pezizomycotina	Dothideomycètes	<i>C. heterostrophus</i> <i>M. graminicola</i> <i>S. nodorum</i>
		Eurotiomycètes	<i>A.nidulans</i> <i>A. oryzae</i>
		Leomycètes	<i>B. cinerea</i>
		Sordariomycètes	<i>F. graminearum</i> <i>N. haematococca</i> <i>N. crassa</i> <i>P. anserina</i> <i>T. reesei</i>
	Saccharomycotina		<i>A. gossypii</i> <i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>D. hansenii</i> <i>K. lactis</i> <i>K. thermotolerans</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>Y. lipolytica</i>
Basidiomycètes	Agaricomycotina	Agaricomycètes	<i>C. cinereus</i> <i>L. bicolor</i> <i>P. chrysosporium</i> <i>P. ostreatus</i> <i>S. commune</i>
	Pucciniomycotina	Microbotryomycètes	<i>S. roseus</i>
		Pucciniomycètes	<i>M. larici-populina</i>
	Ustilagomycontina		<i>U. maydis</i>

Annexe 7 :

Alignement des séquences protéiques des orthologues de RSE3 des Pézizomycotina



Alignement des séquences protéiques de RSE3 restreint aux Pézizomycotina

Alignement par Muscle sur 10 séquences d'orthologues de RSE3 chez des Pezizomycètes d'après la base de donnée Fungipath. L'alignement est visualisé par Jalview. Les résidus avec un bon pourcentage d'identité sont surlignés en bleu sur l'alignement et les histogrammes au dessous représentent la conservation dans l'alignement, la qualité et le consensus pour chacune des positions. Ces valeurs sont calculées par le programme Jalview. Les espèces utilisées sont : *A. nidulans*, *A. oryzae*, *B. cinerea*, *F. graminearum*, *M. graminicola*, *N. haematococca*, *N. crassa*, *P. anserina*, *S. nodorum*, *T. reesei*. Les flèches rouges indiquent les positions des mutations gain de fonction isolées (Article 2), et la flèche orange la région de la duplication. DBD : domaine de liaison à l'ADN.

Annexe 8 :

Liste des métabolites retrouvés lors des analyses métabolomiques

	Complete Name	Abbreviations	Antimycine A		rse2 ^{Y326D}	
			FC	p value	FC	p value
With a least on one significative change compare to wild type on standar medium and represented on Figure x	Alpha-Alanine 2TMS	Ala	1,35	0,00	1,69	0,00
	L-Alanine 3TMS		1,23	0,24	1,57	0,00
	Alpha-KetoGlutaric Acid MeOx 2 2TMS	a-KG	0,30	0,01	0,33	0,01
	Arabinose MeOx 4TMS	Arabinose	0,69	0,06	2,80	0,00
	Arginine monohydrochloride TMS	Arg	9,01	0,00	2,38	0,00
	Asparagine 3TMS	Asn	0,82	0,41	2,44	0,00
	Aspartic acid 3TMS	Asp	1,11	0,15	1,14	0,03
	Beta-alanine 3TMS	b-Ala	1,20	0,01	1,71	0,00
	Citric acid 4TMS	Citrate	2,59	0,00	1,34	0,01
	Cysteine 3TMS	Cys	2,89	0,00	1,62	0,00
	Decanoic acid 1TMS	Decanoic Acid	111,88	0,00	0,99	0,92
	Dopamine 4TMS ou Tyramine3TMS	Dopamine	4,88	0,00	0,74	0,08
	Ethanolamine 3TMS	E A	1,62	0,00	1,42	0,00
	Fructose MeOx1 5TMS	Fru	1,28	0,05	0,98	0,51
	Fructose-6-P MeOx 6TMS	Fru 6P	1,3562	0,19	1,6665	0,05
	Fumaric acid 2TMS	Fumarate	1,19	0,03	0,52	0,00
	Gluconic acid 6TMS	Gluconic Acid	0,48	0,00	1,54	0,02
	Gluconic acid 4TMS		1,00	0,99	1,13	0,00
	Glucose MeOx2 5TMS	Glc	1,63	0,13	1,41	0,01
	Glucose MeOx1 5TMS		1,42	0,08	1,36	0,02
	Glucose-6-P MeOx 1 6TMS	Glc 6P	1,96	0,12	2,43	0,03
	Glutamic acid 3TMS	Glu	1,00	0,50	1,14	0,03
	Glutamine 4TMS	Gln	15,87	0,02	8,62	0,00
	Glutamine 3TMS		10,74	0,00	7,59	0,00
	5oxopyrrolidine2carboxyamide 2TMS		1,84	0,00	1,21	0,01
	Dérivé de la gln 2		2,60	0,00	1,46	0,06
	Glycerol 2phosphate 4TMS	Gly 2P	3,37	0,00	2,97	0,00
	Glycerol 3 phosphate 4TMS	Gly 3P	2,51	0,00	1,85	0,02
	Glycine 3TMS	Gly	1,29	0,00	0,93	0,07
	Homoserine 3TMS	H-Ser	0,86	0,01	1,42	0,00
	IsoLeucine 2TMS	Ile	2,01	0,00	1,25	0,02
	Lactic acid 2TMS	Lactate	1,96	0,00	1,58	0,10
	Linoleic acid 1TMS	Linoleic Acid	7,03	0,00	6,04	0,00
	Linolenic acid 1TMS	Linolenic Acid	3,44	0,01	4,75	0,01
	Lysine 4TMS	Lys	5,63	0,00	1,51	0,04
	Malic acid 3TMS	Malate	1,57	0,00	0,69	0,00
	Mannitol 6TMS	Mannitol	9,04	0,00	0,52	0,00
	Methionine 2TMS	Met	1,34	0,00	1,38	0,00
	Ornithine 4TMS	Orn	6,65	0,00	2,52	0,00
	Palmitic acid TMS	Palmitic Acid	2,13	0,00	1,91	0,00
Palmitoleic acid 1TMS	Palmitoleic Acid	7,45	0,00	5,57	0,01	
Phenylalanine 2TMS	Phe	1,12	0,26	1,33	0,02	
Proline 2TMS	Pro	1,67	0,00	1,41	0,00	
Putrescine 4TMS	Put	1,89	0,00	1,09	0,06	
Pyruvic acid MeO 1TMS	Pyruvate	0,7173	0,04	0,9206	0,26	
Ribose MeOx 4TMS	Ribose	1,09	0,16	1,19	0,01	
Serine 3TMS	Ser	1,12	0,04	1,24	0,00	
Sorbitol 6TMS	Sorbitol	1,32	0,00	1,14	0,09	
Succinic acid 2TMS	Succinate	1,54	0,04	0,96	0,45	
Threonine 3TMS	Thr	1,89	0,00	1,23	0,00	
Trehalose 8TMS	Threalose	1,21	0,02	0,86	0,01	
Tyrosine 3 TMS	Tyr	2,86	0,00	2,47	0,00	
Xylose MeOx2 4TMS	Xylose	0,45	0,00	1,19	0,00	
Xylose MeOx1 4TMS		0,64	0,01	0,91	0,24	

	Complete Name	Abbreviations	Antimycine A		<i>rse2</i> ^{Y326D}	
			FC	<i>p</i> value	FC	<i>p</i> value
With a least on one significant change compare to wild type on standar medium and not represented on Figure x	2,4-dihydroxybutanoic acid 3TMS		0,77	0,00	1,04	0,16
	2-Hydroxyglutaric acid 3TMS		0,66	0,01	0,99	0,90
	9H-Purin-6-amine TMS		0,75	0,15	0,55	0,05
	9H-Purine TMS		1,20	0,02	0,96	0,52
	Aminoadipic acid 3TMS		1,11	0,07	1,11	0,03
	Arabinofuranose TMS		0,76	0,28	0,55	0,01
	Citramalic acid 3TMS		2,92	0,00	1,37	0,00
	D-Erythro-Pentitol TMS		3,82	0,00	1,12	0,35
	Ethylphosphoric acid 2TMS		25,40	0,00	3,05	0,19
	Galactose MeOx1 5TMS		0,90	0,22	0,85	0,04
	Levoglucozan 3TMS		1,05	0,28	1,14	0,00
	Myo-inositol 6TMS		0,96	0,36	0,83	0,01
	Nicotinic acid 1TMS		1,28	0,16	1,36	0,00
	Norcodeine		7,28	0,00	1,86	0,02
	Norleucine 2TMS		1,83	0,02	6,47	0,00
	Pentitol, 1-desoxytetrakis-O-TMS		46,11	0,00	1,15	0,29
	Sorbose methoxyamine 5TMS		2,66	0,00	1,22	0,01
	Stearic acid 1TMS		2,14	0,04	2,35	0,01
	Threitol 4TMS		1,84	0,00	0,87	0,00
	Threitol 4TMS		1,45	0,00	0,96	0,29
	Threonic acid 4TMS		2,12	0,01	0,99	0,92
Threonic acid-1,4-lactone 2TMS		2,87	0,00	1,00	0,98	
Threonic acid-1,4-lactone 2TMS		3,23	0,00	0,82	0,41	
Uracil 2TMS		1,37	0,03	1,77	0,00	

	Complete Name	Abbreviations	Antimycine A		<i>rse2</i> ^{Y326D}	
			FC	<i>p</i> value	FC	<i>p</i> value
non significant	Valine 2TMS	Val	0,99	0,44	1,03	0,19
	Leucine 2TMS	Leu	1,06	0,16	1,03	0,27
	Mannose MeOx1 5TMS	Mannose	0,94	0,26	1,04	0,29
	1H-Imidazole, 1TMS		0,52	0,10	0,39	0,06
	2-Furancarboxylic acid 1TMS		0,97	0,33	1,14	0,06
	Fructose MeOx2 5TMS + gulonic acid		1,26	0,04	1,02	0,25
	GABA 3TMS		1,23	0,15	1,15	0,06
	Glucose-6-P MeOx 2 6TMS		1,39	0,14	1,57	0,06
	Glutaric Acid 2TMS		0,96	0,39	0,91	0,15
	Gly 2TMS		0,77	0,13	0,73	0,09
	Glyceric acid 3TMS		0,99	0,43	1,04	0,25
	Glycerol 3TMS		0,56	0,18	0,34	0,07
	Glycolic acid 2TMS		1,00	0,50	1,15	0,10
	L-Proline, 5-oxo-TMS		0,98	0,29	0,96	0,12
	L-Proline, 5-oxo-TMS		1,63	0,07	1,69	0,05
	Phosphoric acid 3TMS		0,97	0,25	1,02	0,31
	Phosphoric acid, Monomethyl ester 2TMS		1,23	0,09	1,13	0,18
	Pyroglutamic acid 2TMS		0,98	0,29	0,96	0,12
	Urea 2TMS		1,14	0,30	1,26	0,09

Bibliographie

- Abeliovich, H. and Klionsky, D.J.** (2001). Autophagy in Yeast : Mechanistic Insights and Physiological Function Autophagy in Yeast : Mechanistic Insights and Physiological Function. *Microbiology and molecular biology reviews* **65**: 463–479.
- Akache, B. et al.** (2001). Phenotypic analysis of genes encoding yeast zinc cluster proteins. *Nucleic acids research* **29**: 2181–90.
- Akache, B. and Turcotte, B.** (2002). New regulators of drug sensitivity in the family of yeast zinc cluster proteins. *The Journal of biological chemistry* **277**: 21254–60.
- Akiyama, S. et al.** (1985). Isolation and genetic characterization of human KB cell lines resistant to multiple drugs. *Somat Cell Mol Genet* **11**: 117–126.
- Amirsadeghi, S. et al.** (2006). Changes in plant mitochondrial electron transport alter cellular levels of reactive oxygen species and susceptibility to cell death signaling molecules. *Plant & cell physiology* **47**: 1509–19.
- Anderson, R.M. and Weindruch, R.** (2010). Metabolic reprogramming, caloric restriction and aging. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **21**: 134–41.
- Ankele, E. et al.** (2007). In vivo visualization of Mg-protoporphyrin IX, a coordinator of photosynthetic gene expression in the nucleus and the chloroplast. *The Plant cell* **19**: 1964–79.
- Apel, K. and Hirt, H.** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual review of plant biology* **55**: 373–99.
- Arnholdt-Schmitt, B. et al.** (2006). AOX - a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? *Trends in plant science* **11**: 281–7.
- Balzi, E. et al.** (1987). The multidrug resistance gene PDR1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **262**: 16871–9.
- Bartoli, C.G.** (2005). Up-regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1269–1276.
- Bauer, J. et al.** (2000). The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis. *Nature* **403**: 203–7.
- Baumgartner, U. et al.** (1999). Functional Analysis of the Zn₂Cys₆ Transcription Factors Oaf1p and Pip2p. *The Journal of biological chemistry* **274**: 22208–22216.
- Begel, O. et al.** (1999). Mitochondrial group II introns, cytochrome c oxidase, and senescence in *Podospira anserina*. *Molecular and cellular biology* **19**: 4093–100.

- Belcour, L. et al.** (1981). Mitochondrial DNA amplification in senescent culture of *Podospora anserina*: Variability between the retained, amplified sequences. *Current genetics* **3**: 13–21.
- Belcour, L. et al.** (1982). No Title. In *Mitochondrial genes* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 415–421.
- Belcour, L. and Begel, O.** (1980). Life-span and senescence in *Podospora anserina*: effect of mitochondrial genes and functions. *J. Gen. Microbiol.* **119**: 505–515.
- Belcour, L. and Vierny, C.** (1986). Variable DNA splicing sites of a mitochondrial intron: relationship to the senescence process in *Podospora*. *The EMBO journal* **5**: 609–14.
- Bidard, F. et al.** (2010). A general framework for optimization of probes for gene expression microarray and its application to the fungus *Podospora anserina*. *bmc research notes* **3**: 171.
- Bidard, F. et al.** (2011). Genome-wide gene expression profiling of fertilization competent mycelium in opposite mating types in the heterothallic fungus *Podospora anserina*. *PLoS one* **6**: e21476.
- Björklund, S. and Gustafsson, C.M.** (2004). The mediator complex. *advances in protein chemistry* **67**: 43–65.
- Björklund, S. and Gustafsson, C.M.** (2005). The yeast Mediator complex and its regulation. *Trends in biochemical sciences* **30**: 240–4.
- Boer, V.M. et al.** (2005). Contribution of the *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional regulator Leu3p to physiology and gene expression in nitrogen- and carbon-limited chemostat cultures. *FEMS yeast research* **5**: 885–97.
- Boivin, A. et al.** (2008). Life span extension by dietary restriction is reduced but not abolished by loss of both SIR2 and HST2 in *Podospora anserina*. *Mechanisms of ageing and development* **129**: 714–21.
- Bourbon, H. et al.** (2004). A Unified Nomenclature for Protein Subunits of Mediator Complexes Linking Transcriptional Regulators to RNA polymerase II. *Molecular cell* **14**: 553–557.
- Bradbeer, J. et al.** (1979). Cytoplasmic synthesis of plastid polypeptides may be controlled by plastid-synthesized RNA. *Nature* **279**: 816–817.
- Busi, M.V., Gomez-Lobato, M.E., Rius, S.P., et al.** (2011). Effect of mitochondrial dysfunction on carbon metabolism and gene expression in flower tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant* **4**: 127–43.
- Busi, M.V., Gomez-Lobato, M.E., Araya, A., et al.** (2011). Mitochondrial dysfunction affects chloroplast functions. *Plant Signaling & Behavior* **6**: 1904–1907.

- Butow, R. A and Avadhani, N.G.** (2004). Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Molecular cell* **14**: 1–15.
- Camarasa, C.** (2003). Investigation by ¹³C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. *Microbiology* **149**: 2669–2678.
- Camp, R.G.L.D. et al.** (2003). Rapid Induction of Distinct Stress Responses after the Release of Singlet Oxygen in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **15**: 2320–2332.
- Carvajal, E. et al.** (1997). Molecular and phenotypic characterization of yeast PDR1 mutants that show hyperactive transcription of various ABC multidrug transporter genes. *Molecular & general genetics : MGG* **256**: 406–15.
- Casal, M. et al.** (1999). The Lactate-Proton Symport of *Saccharomyces cerevisiae* Is Encoded by The Lactate-Proton Symport of *Saccharomyces cerevisiae* Is Encoded by JEN1. *journal of bacteriology* **181**: 2620–2623.
- Chae, M.S., Lin, C.C., et al.** (2007). Identification of an alternative oxidase induction motif in the promoter region of the *aod-1* gene in *Neurospora crassa*. *Genetics* **175**: 1597–606.
- Chae, M.S., Nargang, C.E., et al.** (2007). Two zinc-cluster transcription factors control induction of alternative oxidase in *Neurospora crassa*. *Genetics* **177**: 1997–2006.
- Chae, M.S. and Nargang, F.E.** (2009). Investigation of regulatory factors required for alternative oxidase production in *Neurospora crassa*. *Physiologia plantarum* **137**: 407–18.
- Chang, Y.W. et al.** (2001). The rye mutants identify a role for Ssn/Srb proteins of the RNA polymerase II holoenzyme during stationary phase entry in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **157**: 17–26.
- Chen, Z. et al.** (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science (New York, N.Y.)* **262**: 1883–6.
- Clifton, R. et al.** (2006). Alternative oxidases in *Arabidopsis*: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochimica et biophysica acta* **1757**: 730–41.
- Clifton, R. et al.** (2005). Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology* **58**: 193–212.
- Copeland, J.M. et al.** (2009). Extension of *Drosophila* life span by RNAi of the mitochondrial respiratory chain. *Current biology : CB* **19**: 1591–8.
- Cristina, D. et al.** (2009). A regulated response to impaired respiration slows behavioral rates and increases lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS genetics* **5**: e1000450.

- Cruz-Hernández, a and Gómez-Lim, M. a** (1995). Alternative oxidase from mango (*Mangifera indica*, L.) is differentially regulated during fruit ripening. *Planta* **197**: 569–76.
- DeRisi, J.L.** (1997). Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression on a Genomic Scale. *Science* **278**: 680–686.
- Debuchy, R. et al.** (2010). Mating Systems and Sexual Morphogenesis in Ascomycetes. In Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi, K.A. Borkovich and D.J. Ebbole, eds (ASM Press: Washington DC), pp. 501–535.
- Decottignies, a et al.** (1998). ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p. *The Journal of biological chemistry* **273**: 12612–22.
- Delahodde, A. et al.** (1995). Positive autoregulation of the yeast transcription factor Pdr3p , which is involved in control of drug resistance . These include : Positive Autoregulation of the Yeast Transcription Factor Pdr3p , Which Is Involved in Control of Drug Resistance. *Molecular and cellular biology* **15**: 4043–4051.
- Delaveau, T. et al.** (1994). PDR3, a new yeast regulatory gene, is homologous to PDR1 and controls the multidrug resistance phenomenon. *Molecular & general genetics : MGG* **244**: 501–11.
- Devaux, P.** (1991). Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* **30**: 1163–1173.
- van Diepeningen, A.D. et al.** (2010). Calorie restriction causes healthy life span extension in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Mechanisms of ageing and development* **131**: 60–8.
- Dillin, A.** (2002). Rates of Behavior and Aging Specified by Mitochondrial Function During Development. *Science* **298**: 2398–2401.
- Dinakar, C. et al.** (2010). Importance of ROS and antioxidant system during the beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Planta* **231**: 461–74.
- Djajanegara, I. et al.** (1999). A single amino acid change in the plant alternative oxidase alters the specificity of organic acid activation. *FEBS letters* **454**: 220–4.
- Djajanegara, I. et al.** (2002). Regulation of alternative oxidase gene expression in soybean. *Plant molecular biology* **50**: 735–42.
- Dojcinovic, D. et al.** (2005). Identification of a region of the Arabidopsis AtAOX1a promoter necessary for mitochondrial retrograde regulation of expression. *Plant molecular biology* **58**: 159–75.

- Dry, I.B. et al.** (1989). Regulation of alternative pathway activity in plant mitochondria: Nonlinear relationship between electron flux and the redox poise of the quinone pool. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **273**: 148–157.
- Dufour, E. et al.** (2000). A causal link between respiration and senescence in *Podospira anserina*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 4138–43.
- Dyall, S.D. et al.** (2004). Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science (New York, N.Y.)* **304**: 253–7.
- Ederli, L. et al.** (2006). Interaction between nitric oxide and ethylene in the induction of alternative oxidase in ozone-treated tobacco plants. *Plant physiology* **142**: 595–608.
- El-Khoury, R. and Sainsard-Chanet, A.** (2009). Suppression of mitochondrial DNA instability of autosomal dominant forms of progressive external ophthalmoplegia-associated ANT1 mutations in *Podospira anserina*. *Genetics* **183**: 861–71.
- Elhafez, D. et al.** (2006). Characterization of mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in *Arabidopsis*: intraorganelle location and expression. *Plant & cell physiology* **47**: 43–54.
- Emanuel, C. et al.** (2004). Chloroplast development affects expression of phage-type RNA polymerases in barley leaves. *the plant journal* **38**: 460–472.
- Endo, H. et al.** (1994). A novel cDNA, priBc, encoding a protein with a Zn(II)2Cys6 zinc cluster DNA-binding motif, derived from the basidiomycete *Lentinus edodes*. *Gene* **139**: 117–121.
- Epstein, C.B. et al.** (2001). Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Molecular biology of the cell* **12**: 297–308.
- Espagne, E. et al.** (2008). The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospira anserina*. *Genome biology* **9**: R77.
- Espineda, C.E. et al.** (1999). The AtCAO gene, encoding chlorophyll a oxygenase, is required for chlorophyll b synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 10507–11.
- Esser, K. and Tudzynski, P.** (1977). Prevention of senescence in the ascomycete *Podospira anserina* by the antibiotic tiamulin. *Nature* **265**: 454–456.
- Fey, V. et al.** (2005). Retrograde plastid redox signals in the expression of nuclear genes for chloroplast proteins of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of biological chemistry* **280**: 5318–28.
- Fitter, D.W. et al.** (2002). GLK gene pairs regulate chloroplast development in diverse plant species. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **31**: 713–27.

- Florez-Sarasa, I. et al.** (2011). In vivo cytochrome and alternative pathway respiration in leaves of *Arabidopsis thaliana* plants with altered alternative oxidase under different light conditions. *Plant, cell & environment* **34**: 1373–83.
- Frederico, A.M. et al.** (2009). Alternative oxidase involvement in *Daucus carota* somatic embryogenesis. *Physiologia plantarum* **137**: 498–508.
- Giraud, E. et al.** (2009). The transcription factor ABI4 is a regulator of mitochondrial retrograde expression of ALTERNATIVE OXIDASE1a. *Plant physiology* **150**: 1286–96.
- Gombert, A.K. et al.** (2001). Network Identification and Flux Quantification in the Central Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under Different Conditions of Glucose Repression. *journal of bacteriology* **183**: 1441–1451.
- Gray, J.C. et al.** (2003). Coordination of plastid and nuclear gene expression. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **358**: 135–44; discussion 144–5.
- Gross, J. and Bhattacharya, D.** (2011). Endosymbiont or host: who drove mitochondrial and plastid evolution? *Biology direct* **6**: 12.
- Grossetête, S. et al.** (2010). FUNGIpath: a tool to assess fungal metabolic pathways predicted by orthology. *BMC genomics* **11**: 81.
- Guaragnella, N. and Butow, R. a** (2003). ATO3 encoding a putative outward ammonium transporter is an RTG-independent retrograde responsive gene regulated by GCN4 and the Ssy1-Ptr3-Ssy5 amino acid sensor system. *The Journal of biological chemistry* **278**: 45882–7.
- Gulshan, K. et al.** (2008). Evidence for the bifunctional nature of mitochondrial phosphatidylserine decarboxylase: role in Pdr3-dependent retrograde regulation of PDR5 expression. *Molecular and cellular biology* **28**: 5851–64.
- Gupta, K.J. et al.** (2012). Inhibition of aconitase by nitric oxide leads to induction of the alternative oxidase and to a shift of metabolism towards biosynthesis of amino acids. *Journal of experimental botany* **63**: 1773–84.
- Hallows, W.C. et al.** (2006). Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 10230–5.
- Hallstrom, T.C. et al.** (2001). Coordinate control of sphingolipid biosynthesis and multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **276**: 23674–80.
- Hallstrom, T.C. and Moye-Rowley, W.S.** (2000). Multiple signals from dysfunctional mitochondria activate the pleiotropic drug resistance pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **275**: 37347–56.

- Haurie, V. et al.** (2001). The transcriptional activator Cat8p provides a major contribution to the reprogramming of carbon metabolism during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **276**: 76–85.
- Hedtke, B. et al.** (1999). Inter-organellar crosstalk in higher plants: impaired chloroplast development affects mitochondrial gene and transcript levels. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **19**: 635–43.
- Hess, W.R. et al.** (1994). Ribosome-deficient plastids affect transcription of light-induced nuclear genes: genetic evidence for a plastid-derived signal. *Molecular & general genetics : MGG* **242**: 305–12.
- Hilal, M. et al.** (1997). Specific localization of the respiratory alternative oxidase in meristematic and xylematic tissues from developing soybean roots and hypocotyls. *Plant physiology* **115**: 1499–503.
- Holstege, F.C. et al.** (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* **95**: 717–28.
- Howitt, C. a et al.** (1999). Type 2 NADH dehydrogenases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 are involved in regulation rather than respiration. *Journal of bacteriology* **181**: 3994–4003.
- Huang, J. and Lemire, B.D.** (2009). Mutations in the *C. elegans* succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit promote superoxide generation and premature aging. *Journal of molecular biology* **387**: 559–69.
- Hwang, A.B. and Lee, S.-J.** (2011). Regulation of life span by mitochondrial respiration: the HIF-1 and ROS connection. *Aging* **3**: 304–10.
- Hynes, M.J. et al.** (2007). Transcriptional control of gluconeogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **176**: 139–50.
- Inaba, T. et al.** (2011). Retrograde Signaling Pathway From Plastid to Nucleus. *International review of Cell and Molecular Biology* **290**: 167–203.
- Ito, T. et al.** (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 4569–74.
- Jamet-Vierny, C. et al.** (1999). What triggers senescence in *Podospora anserina*? *Fungal genetics and biology : FG & B* **27**: 26–35.
- Jamet-vierny, C.** (1980). Senescence in *Podospora anserina* : of a Mitochondrial. **21**.
- Jia, Y. et al.** (1997). A basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription complex in yeast functions in a signaling pathway from mitochondria to the nucleus. *Molecular and cellular biology* **17**: 1110–1117.

- Johanningmeier, U.** (1988). Possible control of transcript levels by chlorophyll precursors in *Chlamydomonas*. *European journal of biochemistry / FEBS* **177**: 417–24.
- Journo, D. et al.** (2009). Aup1-mediated regulation of Rtg3 during mitophagy. *The Journal of biological chemistry* **284**: 35885–95.
- Kakizaki, T. et al.** (2009). Coordination of plastid protein import and nuclear gene expression by plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Plant physiology* **151**: 1339–53.
- Karpichev, I.V. and Small, G.M.** (1998). Global regulatory functions of Oaf1p and Pip2p (Oaf2p), transcription factors that regulate genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **18**: 6560–70.
- Karpova, O.V. et al.** (2002). Differential Expression of Alternative Oxidase Genes in Maize Mitochondrial Mutants. *The Plant cell* **14**: 3271–3284.
- Kean, L.S. et al.** (1997). Plasma membrane translocation of fluorescent-labeled phosphatidylethanolamine is controlled by transcription regulators, PDR1 and PDR3. *The Journal of cell biology* **138**: 255–70.
- Keeling, P.J.** (2010). The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **365**: 729–48.
- Kim, K.S. et al.** (1986). *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional citrate synthase genes. *Molecular and cellular biology* **6**: 1936–42.
- Kimpel, E. and Osiewacz, H.D.** (1999). PaGrg1, a glucose-repressible gene of *Podospora anserina* that is differentially expressed during lifespan. *Current genetics* **35**: 557–63.
- Kirimura, K. et al.** (2000). Contribution of cyanide-insensitive respiratory pathway, catalyzed by the alternative oxidase, to citric acid production in *Aspergillus niger*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **64**: 2034–2039.
- Kirimura, K. et al.** (2006). Expression analysis of alternative oxidase gene (aox1) with enhanced green fluorescent protein as marker in citric acid-producing *Aspergillus niger*. *Journal of bioscience and bioengineering* **102**: 210–4.
- Kirkpatrick, C.R. and Schimmel, P.** (1995). Detection of leucine-independent DNA site occupancy of the yeast Leu3p transcriptional activator in vivo. *Molecular and cellular biology* **15**: 4021–30.
- Kissova, I. et al.** (2007). Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast. *Autophagy* **3**: 329–36.
- Kissova, I. et al.** (2004). Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **279**: 39068–74.

- Kleine, T. et al.** (2009). DNA transfer from organelles to the nucleus: the idiosyncratic genetics of endosymbiosis. *Annual review of plant biology* **60**: 115–38.
- Kolaczowska, A. and Goffeau, A.** (1999). Regulation of pleiotropic drug resistance in yeast. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **2**: 403–414.
- Kolaczkowski, M. et al.** (2004). Differential Regulation of Ceramide Synthase Components LAC1 and LAG1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell* **3**: 880–892.
- Koussevitzky, S. et al.** (2007). Signals from Chloroplasts Converge to Regulate Nuclear Gene Expression. *Science* **316**: 715–719.
- Kück, U. et al.** (1981). Plasmid-like DNA is part of mitochondrial DNA in *Podospora anserina*. *Current genetics* **3**: 151–156.
- Larkin, R.M. et al.** (2003). GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling. *Science (New York, N.Y.)* **299**: 902–6.
- Lee, K.P. et al.** (2007). Of stress-related signals from the plastid to the nucleus of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 10270–10275.
- Lee, S.-J. et al.** (2010). Inhibition of respiration extends *C. elegans* life span via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity. *Current biology : CB* **20**: 2131–6.
- Lee, S.S. et al.** (2003). A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. *Nature genetics* **33**: 40–8.
- Lennon, A. M. et al.** (1997). The Effects of Salicylic Acid and Tobacco Mosaic Virus Infection on the Alternative Oxidase of Tobacco. *Plant physiology* **115**: 783–791.
- Leppert, G. et al.** (1990). Cloning by gene amplification of two loci conferring multiple drug resistance in *Saccharomyces*. *Genetics* **125**: 13–20.
- Li, W. et al.** (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **69**: 1125–36.
- Liao, X. and Butow, R.A.** (1993). RTG1 and RTG2 : Two Yeast Genes Required for a Novel Path of Communication from Mitochondria to the Nucleus. *Cell* **72**: 61–71.
- Liao, X.S. et al.** (1991). Intramitochondrial functions regulate nonmitochondrial citrate synthase (CIT2) expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **11**: 38–46.
- Lin, S.-J. and Guarente, L.** (2003). Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Current Opinion in Cell Biology* **15**: 241–246.

- Liu, Z. and Butow, R. a** (1999). A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function. *Molecular and cellular biology* **19**: 6720–8.
- Liu, Z. and Butow, R. a** (2006). Mitochondrial retrograde signaling. *Annual review of genetics* **40**: 159–85.
- Loose, D.S. et al.** (1983). Ketoconazole blocks adrenal steroidogenesis by inhibiting cytochrome P450-dependent enzymes. *The Journal of clinical investigation* **71**: 1495–9.
- Lorin, S. et al.** (2006). Mitochondrial metabolism and aging in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Biochimica et biophysica acta* **1757**: 604–10.
- Lorin, S. et al.** (2001). Overexpression of the alternative oxidase restores senescence and fertility in a long-lived respiration-deficient mutant of *Podospora anserina*. *Molecular microbiology* **42**: 1259–67.
- Lurin, C. et al.** (2004). Genome-Wide Analysis of Arabidopsis Pentatricopeptide Repeat Protein Reveals Their Essential Role in Organelle Biogenesis. *The Plant cell* **16**: 2089–2103.
- Maas, M.F.P.M. et al.** (2010). Molecular gene therapy: overexpression of the alternative NADH dehydrogenase NDI1 restores overall physiology in a fungal model of respiratory complex I deficiency. *Journal of molecular biology* **399**: 31–40.
- Maas, M.F.P.M. et al.** (2004). The mitochondrial plasmid pAL2-1 reduces calorie restriction mediated life span extension in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal genetics and biology : FG & B* **41**: 865–71.
- MacPherson, S. et al.** (2006). A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **70**: 583–604.
- Mamnun, Y.M. et al.** (2002). The yeast zinc finger regulators Pdr1p and Pdr3p control pleiotropic drug resistance (PDR) as homo- and heterodimers in vivo. *Molecular microbiology* **46**: 1429–40.
- Marcou, D.** (1961). Notion de longévité et nature cytoplasmique du déterminant de sénescence chez quelques champignons. *Ann. Sci. Natur. Bot.* **11**: 653–764.
- Maxwell, D.P. et al.** (1999). The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 8271–6.
- Mayfield, S.P. and Taylor, W.C.** (1984). Carotenoid-deficient maize seedlings fail to accumulate light-harvesting chlorophyll a/b binding protein (LHCP) mRNA. *European journal of biochemistry / FEBS* **144**: 79–84.

- McDonald, A. and Vanlerberghe, G.** (2004). Branched mitochondrial electron transport in the Animalia: presence of alternative oxidase in several animal phyla. *IUBMB life* **56**: 333–41.
- McDonald, A.E. et al.** (2009). Alternative oxidase in animals: unique characteristics and taxonomic distribution. *The Journal of experimental biology* **212**: 2627–34.
- Meeuse, B.J.D.** (1975). Thermogenic Respiration in Aroids. *Annual review of plant physiology* **26**: 117–126.
- Mercado, J.J. et al.** (1994). The levels of yeast gluconeogenic mRNAs respond to environmental factors. *European journal of biochemistry / FEBS* **224**: 473–81.
- Mercado, J.J. and Gancedo, J.M.** (1992). Regulatory regions in the yeast FBP1 and PCK1 genes. *FEBS letters* **311**: 110–4.
- Meskauskiene, R. et al.** (2001). FLU: a negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 12826–31.
- Meti, R.S. et al.** (2011). Enzymes of Ammonia Assimilation in Fungi: An overview. *recent research in science and technology* **2**: 28–38.
- Misiek, M. and Hoffmeister, D.** (2008). Processing sites involved in intron splicing of *Armillaria* natural product genes. *Mycological research* **112**: 216–24.
- Miyasaki, Y. et al.** (1997). Determination of the DNA-Binding Sequences of the Zn (II)₂Cys₆ PRIB Protein Derived from the Basidiomycete *Lentinus edodes* Gene. *Journal of Biological Chemistry* **122**: 1088–1091.
- Mochizuki, N. et al.** (2001). *Arabidopsis* genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 2053–8.
- Mochizuki, N. et al.** (2010). The cell biology of tetrapyrroles: a life and death struggle. *Trends in plant science* **15**: 488–98.
- Mochizuki, N. et al.** (2008). The steady-state level of Mg-protoporphyrin IX is not a determinant of plastid-to-nucleus signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 15184–9.
- Moore, A.L. et al.** (2002). Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger? *Trends in plant science* **7**: 478–81.

- Moulin, M. et al.** (2008). Tetrapyrrole profiling in *Arabidopsis* seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 15178–83.
- Nakamura, T. et al.** (2012). Mechanistic Insight into Pentatricopeptide Repeat Proteins as Sequence-Specific RNA-Binding Proteins for Organellar RNAs in Plants. *Plant & cell physiology* *cell physiology*.
- Noctor, G. et al.** (2007). A comparative study of amino acid measurement in leaf extracts by gas chromatography-time of flight-mass spectrometry and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Metabolomics* **3**: 161–174.
- Norman, C. et al.** (2004). Salicylic Acid Is an Uncoupler and Inhibitor of Mitochondrial Electron Transport. *Plant physiology* **134**: 492–501.
- Nourani, a et al.** (1997). Clustered amino acid substitutions in the yeast transcription regulator Pdr3p increase pleiotropic drug resistance and identify a new central regulatory domain. *Molecular & general genetics : MGG* **256**: 397–405.
- Oelmüller, R. et al.** (1986). Expression of nuclear genes as affected by treatments acting on the plastids. *Planta* **168**: 482–492.
- Osiewacz, H.D. et al.** (2010). Mitochondrial pathways governing stress resistance, life, and death in the fungal aging model *Podospora anserina*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1197**: 54–66.
- Owen, O.E. et al.** (2002). The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *The Journal of biological chemistry* **277**: 30409–12.
- Padmasree, K. and Raghavendra, A.S.** (1999). Importance of oxidative electron transport over oxidative phosphorylation in optimizing photosynthesis in mesophyll protoplasts of pea (*Pisum sativum* L.). 546–553.
- Palkova, Z. et al.** (2002). Ammonia Pulses and Metabolic Oscillations Guide Yeast Colony Development. *Molecular biology of the cell* **13**: 3901–3914.
- Palková, Z. et al.** (1997). Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* **390**: 532–6.
- Panwar, S.L.** (2006). Long Chain Base Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* Is Induced by Retrograde Signals from the Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 6376–6384.
- Parikh, V.S. et al.** (1987). The mitochondrial genotype can influence nuclear gene expression in yeast. *Science (New York, N.Y.)* **235**: 576–80.

- Pereira, R. and Said, S.** (2009). Alterations in growth and branching of *Neurospora crassa* caused by sub-inhibitory concentrations of antifungal agents. *Rev Argent Microbiol* **41**: 39–44.
- Poch, O.** (1997). Conservation of a putative inhibitory domain in the GAL4 family members. *Gene* **184**: 229–235.
- Pomorski, T. et al.** (2003). Drs2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p Are Required for Phospholipid Translocation across the Yeast Plasma Membrane and Serve a Role in Endocytosis. **14**: 1240–1254.
- Pontier, D. et al.** (2007). Knock-out of the magnesium protoporphyrin IX methyltransferase gene in Arabidopsis . Effects on chloroplast development and on chloroplast-to-nucleus signaling HAL-AO Author Manuscript. *The Journal of biological chemistry* **282**: 2297–2304.
- Priault, M. et al.** (2005). Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast. *Cell death and differentiation* **12**: 1613–21.
- Purvis, A.C.** (1997). Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* **100**: 165–170.
- Purvis, A.C. and Shewfelt, R.L.** (1993). Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? *Physiologia plantarum* **88**: 712–718.
- Raghavendra, A.S. and Padmasree, K.** (2003). Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends in Plant Science* **8**: 546–553.
- Rasmusson, A.G. et al.** (2008). The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria. *Mitochondrion* **8**: 47–60.
- Rera, M. et al.** (2010). Mitochondrial electron transport chain dysfunction during development does not extend lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of ageing and development* **131**: 156–64.
- Rhoads, D.M. and McIntosh, L.** (1991). Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an alternative oxidase protein of *Sauromatum guttatum* (Schott). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 2122–6.
- Rhoads, D.M. and Subbaiah, C.C.** (2007). Mitochondrial retrograde regulation in plants. *Mitochondrion* **7**: 177–94.
- Rizet, G.** (1953). Longevity of strains of *Podospora anserina*. *C. R. Hebd. Seances Aca. Sci* **237**: 1106–1109.

- Robellet, X. et al.** (2008). AcpA, a member of the GPR1/FUN34/YaaH membrane protein family, is essential for acetate permease activity in the hyphal fungus *Aspergillus nidulans*. *The Biochemical journal* **412**: 485–93.
- Rothermel, B. a et al.** (1997). Rtg3p, a basic helix-loop-helix/leucine zipper protein that functions in mitochondrial-induced changes in gene expression, contains independent activation domains. *The Journal of biological chemistry* **272**: 19801–7.
- Roussel, D.L. et al.** (1991). Chloroplast Structure and Function Is Altered in the NCS2 Maize mitochondrial mutant. *Plant physiology* **96**: 232–238.
- Rustin, P. and Queiroz-Claret, C.** (1985). Changes in oxidative properties of *Kalanchoe blossfeldiana* leaf mitochondria during development of Crassulacean acid metabolism. *Planta* **164**: 415–422.
- Ryan, M.T. and Hoogenraad, N.J.** (2007). Mitochondrial-nuclear communications. *Annual review of biochemistry* **76**: 701–22.
- Saish, D. et al.** (2001). The gene for alternative oxidase-2 (AOX2) from *Arabidopsis thaliana* consists of five exons unlike other AOX genes and is transcribed at an early stage during germination. *Genes & genetic systems* **76**: 89–97.
- Saisho, D. et al.** (2001). ATP synthesis inhibitors as well as respiratory inhibitors increase steady-state level of alternative oxidase mRNA in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of plant physiology* **158**: 241–245.
- Saisho, D. et al.** (1997). Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology* **35**: 585–96.
- Santos Macedo, E. et al.** (2012). Involvement of alternative oxidase (AOX) in adventitious rooting of *Olea europaea* L. microshoots is linked to adaptive phenylpropanoid and lignin metabolism. *Plant Cell Reports*.
- Santos Macedo, E. et al.** (2009). Physiologic responses and gene diversity indicate olive alternative oxidase as a potential source for markers involved in efficient adventitious root induction. *Physiologia plantarum* **137**: 532–52.
- Saupe, S.J.** (2011). The [Het-s] prion of *Podospora anserina* and its role in heterokaryon incompatibility. *Seminars in cell & developmental biology* **22**: 460–8.
- Schjerling, P. and Holmberg, S.** (1996). Comparative amino acid sequence analysis of the C₆ zinc cluster family of transcriptional regulators. *Nucleic acids research* **24**: 4599–607.
- Schwarzländer, M. et al.** (2012). The impact of impaired mitochondrial function on retrograde signalling: a meta-analysis of transcriptomic responses. *Journal of experimental botany* **63**: 1735–50.

- Sekito, T. et al.** (2000). Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p. *Molecular biology of the cell* **11**: 2103–15.
- Sekito, T. et al.** (2002). RTG-dependent Mitochondria-to-Nucleus Signaling Is Regulated by MKS1 and Is Linked to Formation of Yeast Prion [URE3]. *Molecular biology of the cell* **13**: 795–804.
- Sellem, C.H. et al.** (2007). A mutation in the gene encoding cytochrome c1 leads to a decreased ROS content and to a long-lived phenotype in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal genetics and biology : FG & B* **44**: 648–58.
- Sellem, C.H., Bovier E. et al.** (2009). Mutations in two zinc-cluster proteins activate alternative respiratory and gluconeogenic pathways and restore senescence in long-lived respiratory mutants of *Podospora anserina*. *Genetics* **182**: 69–78.
- Shahi, P. and Moye-Rowley, W.S.** (2009). Coordinate control of lipid composition and drug transport activities is required for normal multidrug resistance in fungi. *Biochimica et biophysica acta* **1794**: 852–859.
- Siedow, J.N. and Moore, A.L.** (1993). A kinetic model for the regulation of electron transfer through the cyanide-resistant pathway in plant mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1142**: 165–174.
- Sieger, S.M. et al.** (2005). The role of alternative oxidase in modulating carbon use efficiency and growth during macronutrient stress in tobacco cells. *Journal of experimental botany* **56**: 1499–515.
- Silar, P. et al.** (2001). Cell degeneration in the model system *Podospora anserina*. *Biogerontology* **2**: 1–17.
- Skinner, C. and Lin, S.-J.** (2010). Effects of calorie restriction on life span of microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology* **88**: 817–28.
- Smith, J. and Rubenstein, I.** (1973). Cytoplasmic inheritance of the timing of “Senescence” in *Podospora anserina*. *Journal of General Microbiology* **76**.
- Smith, M.D. et al.** (2004). atToc159 is a selective transit peptide receptor for the import of nucleus-encoded chloroplast proteins. *The Journal of cell biology* **165**: 323–34.
- Soontornngun, N. et al.** (2007). Regulation of gluconeogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by activator and repressor functions of Rds2. *Molecular and cellular biology* **27**: 7895–905.
- Spahr, H. et al.** (2003). Mediator influences *Schizosaccharomyces pombe* RNA polymerase II-dependent transcription in vitro. *The Journal of biological chemistry* **278**: 51301–6.

- Starai, V.J. et al.** (2003). Short-chain fatty acid activation by acyl-coenzyme A synthetases requires SIR2 protein function in *Salmonella enterica* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **163**: 545–55.
- Starai, V.J. et al.** (2002). Sir2-dependent activation of acetyl-CoA synthetase by deacetylation of active lysine. *Science (New York, N.Y.)* **298**: 2390–2.
- Strand, A. et al.** (2003). Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinIX. *Nature* **5**: 79–83.
- Susek, R.E. et al.** (1993). Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell* **74**: 787–99.
- Suzuki, Y. et al.** (2012). Reprogramming of carbon metabolism by the transcriptional activators AcuK and AcuM in *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology* **84**: 942–64.
- Svensson, A. S. and Rasmusson, A. G.** (2001). Light-dependent gene expression for proteins in the respiratory chain of potato leaves. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **28**: 73–82.
- Sze, J.Y. et al.** (1992). In vitro transcriptional activation by a metabolic intermediate: activation by Leu3 depends on alpha-isopropylmalate. *Science (New York, N.Y.)* **258**: 1143–5.
- Taiz, L. and Zeiger, E.** (2010). Topic 11.3, Multiple Energy Conservation Bypasses. In Plant physiology online.
- Tal, R. et al.** (2007). Aup1p, a yeast mitochondrial protein phosphatase homolog, is required for efficient stationary phase mitophagy and cell survival. *The Journal of biological chemistry* **282**: 5617–24.
- Thomazella, D.P.T. et al.** (2012). The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. *The New phytologist* **194**: 1025–1034.
- Timmis, J.N. et al.** (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature reviews. Genetics* **5**: 123–35.
- Todd, R.B. and Andrianopoulos, a** (1997). Evolution of a fungal regulatory gene family: the Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal genetics and biology : FG & B* **21**: 388–405.
- Traven, a et al.** (2001). Interorganellar communication. Altered nuclear gene expression profiles in a yeast mitochondrial DNA mutant. *The Journal of biological chemistry* **276**: 4020–7.
- Turcotte, B. et al.** (2010). Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS yeast research* **10**: 2–13.

- Tóth, M.L. et al.** (2008). Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* **4**: 330–338.
- Umbach, A.L. et al.** (2002). Activation of the plant mitochondrial alternative oxidase: insights from site-directed mutagenesis. *Biochimica et biophysica acta* **1554**: 118–28.
- Vanlerberghe, G.C. and McIntosh, L.** (1997). ALTERNATIVE OXIDASE: From Gene to Function. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **48**: 703–734.
- Vanlerberghe, G.C. and McIntosh, L.** (1994). Mitochondrial electron transport regulation of nuclear gene expression. Studies with the alternative oxidase gene of tobacco. *Plant physiology* **105**: 867–74.
- Vanlerberghe, G.C. and McIntosh, L.** (1996). Signals Regulating the Expression of the Nuclear Gene Encoding Alternative Oxidase of Plant Mitochondria. *Plant physiology* **111**: 589–595.
- Vanlerberghe, G.C. and McIntosh, L.** (1992). Alternative Pathway Capacity. *Plant physiology* **100**: 115–119.
- Veiga, a et al.** (2003). Cyanide-resistant respiration, a very frequent metabolic pathway in yeasts. *FEMS Yeast Research* **3**: 239–245.
- Vierny, C. et al.** (1982). A sequence of mitochondrial DNA is associated with the onset of senescence in a fungus. *Nature* **297**: 157–159.
- Wagner, a M. and Moore, a L.** (1997). Structure and function of the plant alternative oxidase: its putative role in the oxygen defence mechanism. *Bioscience reports* **17**: 319–33.
- Wagner, a. M. and Wagner, M.J.** (1995). Measurements of in Vivo Ubiquinone Reduction Levels in Plant Cells. *Plant physiology* **108**: 277–283.
- Wagner, A.M. et al.** (2008). Regulation of thermogenesis in flowering Araceae: The role of the alternative oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1777**: 993–1000.
- Wagner, D. et al.** (2004). The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of *Arabidopsis thaliana*. *Science (New York, N.Y.)* **306**: 1183–5.
- Walker, D.W. et al.** (2006). Hypersensitivity to oxygen and shortened lifespan in a *Drosophila* mitochondrial complex II mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 16382–7.
- Walter, L. et al.** (2011). The homeobox protein CEH-23 mediates prolonged longevity in response to impaired mitochondrial electron transport chain in *C. elegans*. *PLoS biology* **9**: e1001084.

- Wang, J. et al.** (2011). Impact of mitochondrial alternative oxidase expression on the response of *Nicotiana tabacum* to cold temperature. *Physiologia plantarum* **142**: 339–51.
- Waters, M.T. and Langdale, J. a** (2009). The making of a chloroplast. *The EMBO journal* **28**: 2861–73.
- Woodson, J.D. et al.** (2011). Heme synthesis by plastid ferrochelatase I regulates nuclear gene expression in plants. *Current biology : CB* **21**: 897–903.
- Yoshida, K., Watanabe, C.K., Hachiya, T., et al.** (2011). Distinct responses of the mitochondrial respiratory chain to long- and short-term high-light environments in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, cell & environment* **34**: 618–28.
- Yoshida, K. et al.** (2006). Distinct roles of the cytochrome pathway and alternative oxidase in leaf photosynthesis. *Plant & cell physiology* **47**: 22–31.
- Yoshida, K., Watanabe, C.K., Terashima, I., et al.** (2011). Physiological impact of mitochondrial alternative oxidase on photosynthesis and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, cell & environment* **34**: 1890–9.
- Yoshida, K. et al.** (2007). Up-regulation of mitochondrial alternative oxidase concomitant with chloroplast over-reduction by excess light. *Plant & cell physiology* **48**: 606–14.
- Yoshida, K. and Noguchi, K.** (2009). Differential gene expression profiles of the mitochondrial respiratory components in illuminated *Arabidopsis* leaves. *Plant & cell physiology* **50**: 1449–62.
- Zaman, S. et al.** (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annual review of genetics* **42**: 27–81.
- Zarkovic, J. et al.** (2005). A reporter gene system used to study developmental expression of alternative oxidase and isolate mitochondrial retrograde regulation mutants in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology* **57**: 871–88.
- Zhang, X. et al.** (2005). Transcriptional regulation by Lge1p requires a function independent of its role in histone H2B ubiquitination. *The Journal of biological chemistry* **280**: 2759–70.
- Zhang, X. and Moye-Rowley, W.S.** (2001). *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance gene expression inversely correlates with the status of the F(0) component of the mitochondrial ATPase. *The Journal of biological chemistry* **276**: 47844–52.
- Zhang, Z.-W. et al.** (2011). Transient accumulation of Mg-protoporphyrin IX regulates expression of PhANGs - New evidence for the signaling role of tetrapyrroles in mature *Arabidopsis* plants. *Journal of plant physiology* **168**: 714–21.



La Thèse



EDITION SPECIALE

11 SEPTEMBRE 2012

Elodie Bovier soutient sa thèse!

D'après nos sources, Elodie Bovier soutiendrait sa thèse
le **mardi 11 septembre 2012 à 14h**
dans la salle des séminaires du bâtiment 24.

Sa thèse, effectuée sous la direction d'Annie Sainsard-Chanet, a pour titre: « Caractérisation de deux acteurs d'une voie de régulation rétrograde induite par un stress mitochondrial chez *Podospora anserina* ». La présentation de ses résultats sera suivie d'un pot dans le hall du bâtiment 26.

Résumé disponible en page 6



Du Brésil au Gabon, le monde entier retient son souffle!
« toutes nos pensées vont à Elodie »



Premières images exclusives!

RÉSUMÉ

Le champignon filamenteux *Podospora anserina* constitue un système modèle pour l'étude de plusieurs processus biologiques, notamment le vieillissement. Une relation de causalité entre le fonctionnement de la chaîne respiratoire et la longévité a été établie pour la première fois chez *P. anserina* et cette relation de causalité semble conservée. Le lien entre fonctionnement de la chaîne respiratoire et longévité pourrait se faire en partie par l'induction d'une régulation rétrograde en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial. Les études des régulations rétrogrades mitochondriales et chloroplastiques montrent qu'en réponse à un dysfonctionnement de ces organites, il y a une reprogrammation de l'expression génique qui participe à la plasticité adaptative des espèces en réponse à l'environnement.

Un gène cible d'une régulation rétrograde mitochondriale a été identifié chez *P. anserina*: le gène *aox*. L'oxydase alternative appartient à une voie respiratoire alternative en conditions de dysfonctionnement de la voie des cytochromes. Deux facteurs de transcription acteurs de cette régulation rétrograde mitochondriale ont été identifiés par une approche génétique. Ces protéines, RSE2 et RSE3, appartiennent à la famille des protéines Zn₂Cys₆ et sont les régulateurs majeurs du gène *aox*. Outre le gène *aox*, ces deux facteurs de transcription corégulent les deux enzymes de la néoglucogénèse FBP (Fructose-1,6-biphosphatase) et PCK (Phosphoénolpyruvate carboxykinase). Des allèles gain de fonction des gènes *rse2* et *rse3* ont été isolés et le crible pratiquement saturé. L'analyse de ces mutations ainsi que des approches de mutagenèse dirigée, ont permis de proposer l'existence de régions régulatrices dans les séquences protéiques RSE2 et RSE3.

Une approche transcriptomique a permis d'identifier de nouvelles cibles de RSE2 et RSE3 activées lors d'un dysfonctionnement mitochondrial : le gène *fhb* (codant une flavohémoglobine) et le gène Pa_6_4030 (codant une α/β hydrolase). Une approche métabolomique a permis une meilleure compréhension de la reprogrammation métabolique en réponse à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire et du rôle de RSE2/RSE3 dans cette reprogrammation.

RSE2 et RSE3 sont donc des acteurs d'une régulation rétrograde mitochondriale responsables de l'activation de voies respiratoires alternatives mais aussi d'une reprogrammation du métabolisme de *P. anserina* qui permettrait de maintenir une homéostasie cellulaire en condition de dysfonctionnement mitochondrial.