



**HAL**  
open science

**Etude de la dégénérescence cellulaire épigénétique  
Crippled Growth chez le champignon *Podospora  
anserina***

Tinh-Suong Nguyen

► **To cite this version:**

Tinh-Suong Nguyen. Etude de la dégénérescence cellulaire épigénétique Crippled Growth chez le champignon *Podospora anserina*. Biologie cellulaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT: 2018USPCC164 . tel-02407606

**HAL Id: tel-02407606**

**<https://theses.hal.science/tel-02407606>**

Submitted on 12 Dec 2019

**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.

Thèse de doctorat  
de l'Université Sorbonne Paris Cité  
Préparée à l'Université Paris Diderot

**Ecole doctorale MTCI (Médicament, Toxicologie, Chimie, Imagerie) n°563**

*Laboratoire Interdisciplinaire des Energies de Demain / Equipe Génétique et Epigénétique des  
Champignons*

# Etude de la dégénérescence cellulaire épigénétique Crippled Growth chez le champignon *Podospora anserina*

Par Tinh-Suong Nguyen

Thèse de doctorat de Microbiologie Eucaryote

Dirigée par Pr Philippe Silar

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 27 septembre 2018

Président du jury : PLESSIS Anne / PR / Université Paris Diderot  
Rapporteurs : BETERMIER Mireille / DR / CNRS  
MALAGNAC Fabienne / PR / Université Paris Sud  
Examineurs : AUCHERE Françoise / MCU / Université Paris Diderot  
LEBRUN Marc-Henri / DR / CNRS  
Directeur de thèse : SILAR Philippe / PR / Université Paris Diderot  
Membre invité : LALUCQUE Hervé / MCU / Université Paris Diderot



**Titre : Étude de la dégénérescence cellulaire épigénétique Crippled Growth chez le champignon *Podospora anserina*.**

**Résumé :** De nombreux champignons peuvent présenter des instabilités phénotypiques. Chez le champignon filamenteux modèle *Podospora anserina*, la dégénérescence cellulaire épigénétique Crippled Growth (CG) se caractérise par un ralentissement de la croissance, une pigmentation altérée, un défaut de production de fructifications et d'hyphes aériens. CG est dû à un élément C, infectieux et cytoplasmique, produit durant la phase stationnaire. Deux types de mutants ont été isolés au laboratoire : les mutants *IDC*, incapables de présenter CG, et les mutants *PDC* développant plus fréquemment CG. Les premiers ont été particulièrement étudiés et ont permis d'identifier plusieurs acteurs impliqués dans CG : la voie MAPK PaMpk1 et son auto-activation est au cœur du système, la voie MAPK PaMpk2, le complexe NADPH oxydase Nox1 et d'autres petites protéines participent aussi à la régulation de CG en activant la voie PaMpk1. Les travaux présentés ici caractérisent pour la première fois deux mutants *PDC* : les mutants *PDC<sup>2205</sup>* et *PDC<sup>2209</sup>*. *PDC<sup>2205</sup>* est affecté dans le gène *PDC1* et code pour une protéine, PDC1, conservée chez les ascomycètes. Cette protéine module CG en inhibant la voie PaMpk1. L'étude du mutant *PDC<sup>2209</sup>*, quant à elle, a permis d'identifier un cluster très particulier nommé cluster 2209. Ce dernier code d'une part pour les constituants de la boucle d'activation de PaMpk1, et d'autre part pour des répresseurs de cette boucle. Ces deux types d'éléments, activateurs et répresseurs, semblent s'organiser en au moins deux systèmes toxine/antitoxine. Par ailleurs, ce cluster s'est conservé chez les *Sordariales* et les *Chaetosphaeriales*, même s'il présente une histoire évolutive très particulière, subissant de nombreux réarrangements. Ce cluster est donc très important mais sa fonction reste inconnue.

**Mots clefs :** *Podospora anserina*, champignons, Crippled Growth, dégénérescence, épigénétique

**Title : Study of the epigenetic cell degeneration Crippled Growth in the fungus *Podospora anserina*.**

**Abstract :** Many fungi display epigenetic instability. In *Podospora anserina*, the epigenetic cell degeneration "Crippled Growth" (CG) is characterized by slow growth, alteration of pigmentation and inability to differentiate fructifications and aerial hyphae. CG is due to a cytoplasmic and infectious element called C produced during stationary phase. Two types of CG mutants were isolated: *IDC* mutants impaired in the development of CG and *PDC* mutants promoting the development of CG. The former have been well studied and all mutants are affected in the MAPK1 pathway, the MAPK2 pathway, the Nox1 NADPH oxidase complex, or in small cysteine-containing proteins probably involved in signal transduction. Here, we present for the first time an analysis of two *PDC* mutants, the *PDC<sup>2205</sup>* and the *PDC<sup>2209</sup>* strains. *PDC<sup>2205</sup>* is mutated in the *PDC1* gene and encodes the PDC1 protein which is conserved in most Ascomycota. This protein regulates CG by inhibiting the PaMpk1 pathway. As for the mutant *PDC<sup>2209</sup>*, its analysis has allowed to identify the cluster 2209. This cluster encodes the component of the activation loop of the PaMpk1 and the repressors of the loop. These two types of elements, activators and repressors, seem to be organized in two toxin/antitoxin systems. Besides, this cluster is conserved in the *Sordariales* and the *Chaetosphaeriales* with a very specific evolutionary story. So, this cluster is very important, but its function is still unknown.

**Keywords :** *Podospora anserina*, filamentous fungi, Crippled Growth, degeneration, epigenetics



*A Côme  
et à la petite étoile qui l'accompagne*

« Le hasard je l'emmerde j'aimerais qu'on puisse le provoquer  
Que dès le départ on ait bien tous les mêmes chances d'y arriver »

Tim Dup, un peu de mélancolie heureuse



## **REMERCIEMENTS**

En premier lieu, je souhaite remercier Anne Plessis pour m’avoir fait l’honneur de présider mon jury de thèse, Mireille Bétermier et Fabienne Malagnac qui ont accepté d’examiner mon manuscrit, ainsi que Françoise Auchère et Marc-Henri Lebrun qui ont bien voulu évaluer ce travail et faire partie de ce jury.

Je tiens à remercier particulièrement Philippe Silar pour m’avoir accueillie dans son laboratoire et m’avoir permis de travailler dans les meilleures conditions possibles. Je le remercie vivement pour sa disponibilité, son aide et ses conseils (scientifiques, cinématographiques et littéraires), ainsi que pour son indulgence vis-à-vis du Fastprep (qui est juste un peu abîmé).

Je remercie chaleureusement Hervé Lalucque pour m’avoir accompagnée durant ces quatre années malgré les aléas et pour ses nombreux conseils.

Un grand merci également à l’ensemble des membres (actuels et passés) de l’équipe Génétique et Epigénétique des Champignons : Louis Bernier, Sylvain Brun (notamment pour les nombreux « debriefs » sportifs), Charlie Boucher (ex-MAIDL), Julien Bouillon, Sylvie Cangemi (pour son travail si précieux au laboratoire), Jean-Marc Dauget, Alexander Demoor, Roselyne Ferrari (et ses nombreuses aventures), et Valérie Gautier (pour son aide essentielle), pour les fous-rires et bons moments partagés au cours de ces quatre années.

Je remercie également chercheurs et stagiaires côtoyés au 6<sup>ème</sup> étage et notamment : Mathieu Arnoux (pour sa bienveillance), Delphine Bonnin, François Bouteau, Florence Chapeland-Leclerc, Jonathan Dikec, Insaf Essadik, Frédéric Filaine, Patrick Laurenti, Gwenaël Ruprich-Robert, Guillaume Paci, Ling Shen et Tingting Zhao.

Je tiens à remercier une nouvelle fois Fabienne Malagnac pour m’avoir fait entrevoir les nombreuses possibilités d’études génétiques chez les champignons un jour d’été à Orsay.

Je remercie ma famille pour leur soutien, de l’Océan Pacifique à la région parisienne. Un immense merci en particulier à « ma p’tite Maman », qui n’aurait jamais pensé que nous enseignerions un jour au même groupe de TD. Je remercie Hervé pour son soutien, sa compréhension, et sa confiance qui m’ont notamment permis de terminer un semi-marathon et de décrocher un titre départemental au « ping ».



# **TABLE DES MATIERES**

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>5</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>7</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b>	<b>11</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>17</b>
<b>I. Les champignons : de la biosphère au laboratoire</b>	<b>17</b>
1. Les champignons : acteurs majeurs des écosystèmes et intérêts biotechnologiques	17
2. <i>Podospora anserina</i> , un organisme modèle de laboratoire	19
<b>II. Les différentes formes d'hérités épigénétiques</b>	<b>22</b>
1. Héritabilité des régulations transcriptionnelles	22
a. La méthylation de l'ADN	22
b. Le mécanisme MIP	23
c. Le mécanisme RIP	24
2. Héritabilité des régulations post-transcriptionnelles	25
a. Le quelling	25
b. Le mécanisme MSUD	27
3. Hérité de structure : le prion	30
a. Découverte et caractérisation	30
b. L'exemple de l'élément PSI chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
4. Hérité de réseaux de régulation	33
a. Le « switch white-opaque » chez <i>Candida albicans</i>	33
b. Boucles d'activation dans les œufs de xénope	37
<b>III. <i>Podospora anserina</i>, un modèle d'étude des phénomènes épigénétiques</b>	<b>41</b>
1. Les phénomènes épigénétiques connus chez <i>Podospora anserina</i>	41
a. La sénescence	41
b. Le phénomène d'incompatibilité végétative	44
c. La dégénérescence Wavy	45

2.	Mon projet de thèse : la dégénérescence Crippled Growth	47
a.	Découverte et caractérisation	47
b.	Crippled Growth et fidélité de traduction	48
c.	Crippled Growth est causé par un élément C	49
d.	Les mutants Crippled Growth	51
e.	Les acteurs de la voie CG	52
f.	Modèle proposé	58
3.	Objectifs de ma thèse	59
 <b>CHAPITRE I : ANALYSE DU MUTANT <i>PDC</i><sup>2205</sup></b>		<b>60</b>
 <b>CHAPITRE II : ANALYSE DU MUTANT <i>PDC</i><sup>2209</sup></b>		<b>85</b>
<b>I. Identification et caractérisation du cluster 2209</b>		<b>85</b>
1.	Détermination du génotype du mutant <i>PDC</i> <sup>2209</sup>	85
2.	Identification du cluster 2209	87
3.	Caractérisation des gènes du cluster 2209	88
a.	Le gène <i>Pa_4_7102</i> présente un domaine conservé	88
b.	Les gènes <i>IDC</i> du cluster 2209	89
c.	Les gènes <i>PDC</i> du cluster 2209	93
d.	Cas du gène <i>Pa_4_7088</i>	98
e.	Organisation génétique du cluster 2209	99
f.	Rôle possible du cluster 2209	100
 <b>II. Evolution phylogénique du cluster 2209</b>		<b>104</b>
1.	Le cluster 2209 chez les <i>Sordariales</i>	104
a.	Nouvelle annotation du génome de la souche <i>T</i> : présence d'un cluster 2209 particulier	104
b.	Le cluster 2209 chez les <i>Podospora</i>	106
c.	Nouvelles données de RNAseq : identification du gène <i>Pa_4_7097</i> , responsable du phénotype de la souche <i>A406</i> ?	108
d.	Traces du cluster 2209 chez les <i>Sordariales</i>	110
e.	Hypothèse d'un cluster 2209 ancestral	115
2.	Etude du cluster 2209 dans différents contextes génétiques	116
a.	Introgression du cluster 2209 des souches <i>T</i> , <i>A406</i> et <i>CBS415.72</i> dans la souche <i>S</i>	117
b.	Introgression du cluster 2209S dans les souches <i>T</i> , <i>A406</i> et <i>CBS415.72</i>	118
c.	Conclusions	119
 <b>III. Organisation des gènes <i>IDC</i> et <i>PDC</i> dans la voie CG</b>		<b>120</b>
1.	Association des mutations <i>IDC</i> du cluster 2209 avec la mutation <i>AS6-5</i>	120

2.	Association des mutations <i>IDC</i> du cluster 2209 avec des mutations de <i>PDC1</i>	121
3.	Association des mutations <i>PDC</i> du cluster 2209 avec $\Delta PaMpk1$	122
4.	Analyse du double mutant $\Delta 7111 PDC1^{\Delta}$	123
5.	Interactions au sein du cluster : perspectives	124
<b>CONCLUSION - DISCUSSION</b>		<b>125</b>
<b>ANNEXES</b>		<b>131</b>
<b>ANNEXES I : ARTICLES</b>		<b>132</b>
<b>ANNEXES II : FIGURES</b>		<b>199</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>		<b>212</b>



## TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 : CYCLE DE VIE DE <i>P. ANSERINA</i> .....	20
FIGURE 2 : SEGREGATION DES ALLELES LORS DE LA MEIOSE EN CAS DE PRE-REDUCTION (FDS) OU POST-REDUCTION (SDS) CHEZ <i>P. ANSERINA</i> .....	20
FIGURE 3 : LES DEUX TYPES DE MECANISMES DE METHYLATION DE L'ADN .....	23
FIGURE 4 : LE MODELE DU QUELLING CHEZ <i>N. CRASSA</i> .....	26
FIGURE 5 : LA DELETION DE <i>ASM-1</i> EST DOMINANTE .....	27
FIGURE 6 : MODELE DU MECANISME MSUD .....	29
FIGURE 7 : LES DEUX MECANISMES DE REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLES CHEZ <i>N. CRASSA</i> .....	29
FIGURE 8 : STRUCTURES DE LA PROTEINE PRP SOUS FORME NATIVE (PRP <sup>C</sup> ) ET SOUS FORME INFECTIEUSE (PRP <sup>Sc</sup> ) .....	30
FIGURE 9 : SYNTHÈSE PROTEIQUE DANS UNE SOUCHE [PSI <sup>-</sup> ] .....	32
FIGURE 10 : TRANSLECTURE DANS UNE SOUCHE [PSI <sup>+</sup> ] .....	32
FIGURE 11 : COLONIES DE <i>C. ALBICANS</i> PRESENTANT LES DEUX MORPHOLOGIES, WHITE (W) ET OPAQUE (O) ET OBSERVATION MICROSCOPIQUE DES LEVURES SOUS LES DEUX FORMES .....	34
FIGURE 12 : ORGANISATION DES LOCUS SEXUEL, <i>MTL</i> A ET <i>MTL</i> a, CHEZ <i>C. ALBICANS</i> .....	34
FIGURE 13 : BOUCLES DE REGULATION DU « SWITCH WHITE-OPAQUE » CHEZ <i>C. ALBICANS</i> .....	36
FIGURE 14 : SYSTEME DE REGULATION DU « SWITCH WHITE-OPAQUE » CHEZ <i>C. ALBICANS</i> .....	36
FIGURE 15 : L'ACTIVATION DES OOCYTES DE XENOPES CORRESPOND A LA REACTION D'UNE ENZYME ULTRASENSIBLE .....	39
FIGURE 16 : COURBES DE LONGEVITE DE SOUCHES DES « RACES GEOGRAPHIQUES » A, B, N ET E DE LONGEVITE MOYENNE CROISSANTE .....	42
FIGURE 17 : SCHEMA REPRESENTANT LES PHASES SUCCESSIVES DE L'ÉVOLUTION DU MYCELIUM EN CROISSANCE CONTINUE .....	43
FIGURE 18 : RELATION ENTRE LES PROTEINES ISSUES DES ALLELES <i>HET-S</i> ET <i>HET-S</i> .....	45
FIGURE 19 : SOUCHE <i>IDC</i> <sup>452</sup> SOUS FORME NORMALE (A) ET PRESENTANT UN SECTEUR ALTERE (B). CE SECTEUR ALTERE, UNE FOIS REPIQUE, PRESENTE DIVERS PHENOTYPES (C A H) .....	46
FIGURE 20 : UN MUTANT PRESENTANT UN SECTEUR CG SUR MILIEU STANDARD M2 .....	47
FIGURE 21 : CG EST PROVOQUE PAR LE PASSAGE EN PHASE STATIONNAIRE .....	48
FIGURE 22 : TEST EN BARRE DE LA SOUCHE <i>S</i> PERMETTANT DE METTRE EN EVIDENCE L'INDUCTION DE CG PAR LA PHASE STATIONNAIRE SUR M2+YE .....	49
FIGURE 23 : TEST D'INFECTION A PARTIR D'UNE SOUCHE <i>AS6-5</i> CG DONNEUSE SUR UNE SOUCHE <i>AS6-5</i> NG RECEVEUSE .....	50
FIGURE II.1 : PHENOTYPE DES MUTANTS <i>PDC</i> <sup>2205</sup> , <i>PDC</i> <sup>2208</sup> ET <i>PDC</i> <sup>2209</sup> SUR M2 .....	85
FIGURE II.2 : LES MUTANTS <i>PDC</i> <sup>2209</sup> ET <i>Δ7111</i> PRESENTENT DES PHENOTYPES IDENTIQUES .....	86
FIGURE II.3 : SEQUENCES PROTEIQUES DES PRODUITS DU GENE <i>PA_4_7111</i> DE LA SOUCHE SAUVAGE (EN BLEU) ET DU MUTANT <i>PDC</i> <sup>2209</sup> (EN ORANGE) .....	86
FIGURE II.4 : COMPOSITION DU CLUSTER 2209 DANS LA SOUCHE <i>S</i> .....	87
FIGURE II.5 : TEST CG DES SOUCHES <i>S</i> , <i>T</i> ET <i>Δ86-11</i> .....	87
FIGURE II.6 : IDENTIFICATION DU DOMAINE ASLA (COG1368) DANS LA PROTEINE 7102 ISSUE DU GENE <i>PA_4_7102</i> .....	88

FIGURE II.7 : LE MUTANT $\Delta 7102$ EST UN MUTANT <i>IDC</i> .....	88
FIGURE II.8 : LES SOUCHES $\Delta 7109$ , $\Delta 7108$ , $\Delta 7095$ ET $\Delta 7086$ SONT PHENOTYPIQUEMENT IDENTIQUES A LA SOUCHE <i>S</i> SUR M2. .	89
FIGURE II.9 : TEST CG EN BANDE REVELANT LE CARACTERE <i>IDC</i> DES SOUCHES $\Delta 7109$ , $\Delta 7108$ , $\Delta 7095$ ET $\Delta 7086$ .....	90
FIGURE II.10 : TEST DE FERTILITE DES SOUCHES <i>S</i> , $\Delta 86-11$ , $\Delta 7108$ ET $\Delta 7095$ SUR DIFFERENTS MILIEUX. ....	92
FIGURE II.11 : PHENOTYPE DES SOUCHES $\Delta 7111$ , $\Delta 7107$ , $\Delta 7105$ , $\Delta 7100$ , ET $\Delta 7090$ SUR M2.....	93
FIGURE II.12 : TEST CG CHEZ LES MUTANTS $\Delta 7107$ ET $\Delta 7105$ . ....	94
FIGURE II.13 : TEST DE FERTILITE DES SOUCHES <i>S</i> , $\Delta 7107$ , $\Delta 7105$ ET $\Delta 7100$ SUR DIFFERENTS MILIEUX.....	95
FIGURE II.14 : TEST DE FERTILITE DES SOUCHES <i>S</i> , $\Delta 7105$ ET $\Delta 7111$ SUR M2 AVEC ET SANS $\Delta MAT$ . ....	96
FIGURE II.15 : TESTS PHENOTYPIQUES DE LA SOUCHE $\Delta 7088$ .....	98
FIGURE II.16 : ORGANISATION DU CLUSTER 2209 DANS LA SOUCHE <i>S</i> .....	99
FIGURE II.17 : MODELE PROPOSE SUR LA REGULATION DE LA VOIE PAMPK1 PAR LES GENES <i>IDC</i> DU CLUSTER 2209 COMPOSANT LA BOUCLE D’AUTO-ACTIVATION (EN ROUGE) ET LES GENES <i>PDC</i> CONSTITUANT LE SYSTEME D’INHIBITION DE LA BOUCLE (EN BLEU). .....	100
FIGURE II.18 : MISE EN EVIDENCE DE LA PRODUCTION DE PEROXYDE D’HYDROGENE PAR LE DAB ET DE LA MORT CELLULAIRE PAR LE BLEU EVANS DES MUTANTS DU CLUSTER 2209 AU CONTACT DE <i>PENICILLIUM CHRYSOGENUM</i> .....	101
FIGURE II.19 : MISE EN EVIDENCE DE LA PRODUCTION DE PEROXYDE D’HYDROGENE PAR LE DAB ET DE LA MORT CELLULAIRE PAR LE BLEU EVANS DES MUTANTS PDC DU CLUSTER 2209 AU CONTACT DE <i>PENICILLIUM CHRYSOGENUM</i> . ....	102
FIGURE II.20 : ORGANISATION DU CLUSTER 2209 DANS LA SOUCHE <i>T</i> .....	105
FIGURE II.21 : MISE EN EVIDENCE DE L’EVENEMENT DE DUPLICATION AU SEIN CLUSTER 2209T.....	105
FIGURE II.22 : ARBRE PHYLOGENETIQUE DES <i>PODOSPORA</i> CONSTRUIT A PARTIR DE QUATRE REGIONS GENOMIQUES.....	107
FIGURE II.23 : L’ORGANISATION DU CLUSTER 2209 DANS LA SOUCHE <i>A406</i> (EN HAUT) EST TRES SIMILAIRE A CELLE DU CLUSTER 2209S (EN BAS). ....	108
FIGURE II.24 : L’HOMOLOGUE DU GENE <i>PA_4_7097</i> NE PRESENTE PAS DE CODON INITIATEUR DANS LA SOUCHE <i>A406</i> .....	109
FIGURE II.25 : PHYLOGENIE DES SORDARIALES.....	110
FIGURE II.26 : LE CLUSTER 2209 EST PRESENT CHEZ LES ESPECES DE SORDARIALES ET DE CHAETOSPHAERIALES. ....	114
FIGURE II.27 : MISE EN EVIDENCE DES GENES PARALOGUES DANS LE CLUSTER 2209S. ....	115
FIGURE II.28 : HYPOTHESE D’UN CLUSTER 2209 ANCESTRAL.....	116
FIGURE II.29 : TEST CG DES SOUCHES <i>S</i> , <i>T</i> , <i>A406</i> , ET <i>CBS415.72</i> . ....	117
FIGURE II.30 : TEST CG DES SOUCHES 2209T> <i>S</i> , 2209A406> <i>S</i> ET 2209CBS415.72> <i>S</i> .....	118
FIGURE II.31 : TEST CG DES MUTANTS ISSUS DE L’INTROGRESSION DE LA DELETION $\Delta 86-11$ DANS LES SOUCHES <i>T</i> ( $\Delta 86-11$ > <i>T</i> ), <i>A406</i> ( $\Delta 86-11$ > <i>A406</i> ) ET <i>CBS415.72</i> ( $\Delta 86-11$ > <i>CBS415.72</i> ). ....	119
FIGURE II.32 : TEST CG DES DOUBLES MUTANTS $\Delta 86-11 AS6-5$ , $\Delta 7102 AS6-5$ , $\Delta 7108 AS6-5$ , $\Delta 7109 AS6-5$ , $\Delta 7095 AS6-5$ ET $\Delta 7086 AS6-5$ . ....	120
FIGURE II.33 : LE DOUBLE MUTANT $\Delta 86-11 PDC^{2205}$ SE CONDUIT COMME LA SOUCHE <i>IDC</i> $\Delta 86-11$ . LES FLECHES NOIRES MONTRENT LE PHENOMENE DE SENESCENCE. ....	122
FIGURE II.34 : LES DOUBLES MUTANTS $\Delta 7102 PDC^{2205}$ ET $\Delta 7102 PDC1^{\Delta}$ , ET $\Delta 7108 PDC1^{\Delta}$ ET $\Delta 7108 PDC^{2205}$ PRESENTENT DES PHENOTYPES DE TYPES <i>PDC</i> FORT IDENTIQUES A CELUI DES MUTANTS <i>PDC1^{\Delta}</i> ET <i>PDC^{2205}</i> . ....	122

FIGURE II.35 : LES DOUBLES MUTANTS $\Delta 7100 \Delta PAMPK1$ , $\Delta 7090 \Delta PAMPK1$ ET $\Delta 7105 \Delta PAMPK1$ PRESENTENT UN MYCELIUM ROSE ET PLAT, SEMBLABLE AU PHENOTYPE DU MUTANT $\Delta PAMPK1$ .	123
FIGURE II.36 : LE DOUBLE MUTANT $\Delta 7111 PDC1^A$ PRESENTE UN PHENOTYPE CG FORT.	123
FIGURE C.1 : PDC1 ET SON ORTHOLOGUE PRESENT DANS LA SOUCHE <i>T</i> SONT SIMILAIRES.	127
FIGURE C.2 : MODELE PROPOSE EXPOSANT LA VOIE DE REGULATION CG.	130
FIGURE A.1 : PRINCIPE DE LA DELETION D'UN GENE PAR LA METHODE DE « SPLIT-MARKER ».	201
FIGURE A.2 : RESULTATS DE SOUTHERN BLOT DES DELETIONS DES GENES DU CLUSTER 2209.	203
FIGURE A.3 : COMPLEMENTATION DES MUTANTS DE DELETION DU CLUSTER 2209.	204
FIGURE A.4 : COMPARAISON DES GENES <i>PA_4_7100</i> (A), <i>PA_4_7102</i> (B) ET <i>PA_7_5680</i> (C) AVEC LEUR ORTHOLOGUES RESPECTIFS PRESENTS DANS LA SOUCHE <i>PODOSPORA SETOSA</i> .	208
FIGURE A.5 : DETERMINATION DES GENES PARALOGUES AU SEIN DU CLUSTER 2209 PAR COMPARAISON DE SEQUENCES ENTRE LES SOUCHES <i>S</i> ET <i>T</i> .	211



## **LISTE DES TABLEAUX**

TABLEAU 1 : TRANSMISSION DE CG DE DIVERS DONNEURS A LA SOUCHE RECEVEUSE AS6-5 NG. ....	50
TABLEAU 2 : STABILITE DES SOUCHES DE <i>P. ANSERINA</i> SUR MILIEU STANDARD M2 ET SUR DIFFERENTS MILIEUX. ....	52
TABLEAU II.1 : RESULTATS DU TEST D'INFECTION DE LA SOUCHE AS6-5 (NG) PAR LES SOUCHES $\Delta 7102$ , $\Delta 7108$ , $\Delta 7109$ , $\Delta 7095$ ET $\Delta 7086$ . ....	91
TABLEAU II.2 : RESULTATS DU TEST D'INFECTION DE LA SOUCHE AS6-5 (NG) PAR LES SOUCHES $\Delta 7105$ ET $\Delta 7107$ . ....	94
TABLEAU II.3 : RESULTATS DU TEST D'INFECTION DE LA SOUCHE AS6-5 (NG) PAR LES SOUCHES $\Delta 7100$ ET $\Delta 7090$ . ....	97
TABLEAU A.1 : AMORCES UTILISEES POUR LA DELETION DES GENES DU CLUSTER 2209. ....	200



# **INTRODUCTION**

## **I. LES CHAMPIGNONS : DE LA BIOSPHERE AU LABORATOIRE**

### **1. Les champignons : acteurs majeurs des écosystèmes et intérêts biotechnologiques**

Les champignons sont des microorganismes eucaryotes qui se divisent en deux groupes : les *Eumycota* ou « vrais champignons », et les *Pseudomycota*. Ils constituent un large règne en termes de nombre d'espèces. En particulier, on estime que seulement 100 000 espèces seraient à ce jour décrites alors que les *Eumycota* en compteraient plus d'un million. Les champignons peuvent se présenter sous forme unicellulaire appelée levure, ou sous forme pluricellulaire qualifiée alors de filamenteux. Dans ce dernier cas, le champignon développe des hyphes, c'est-à-dire des cellules capables de croître en s'allongeant, et se ramifie pour former un mycélium. Généralement, le cycle de vie d'un champignon filamenteux fluctue entre une phase de croissance végétative du mycélium, et une phase de reproduction (sexuée ou asexuée) consacrée à la production et à la dispersion de spores.

De manière remarquable, ces microorganismes sont des hétérotrophes qui se nourrissent exclusivement par osmotrophie : ils sécrètent des enzymes qui digèrent la matière organique présente dans le milieu extérieur, puis ils absorbent les molécules ainsi produites *via* des transporteurs. La majorité des champignons consomment de la matière morte (ce sont les saprotrophes) et notamment la biomasse riche en lignine et cellulose non digérables par les autres organismes vivants. C'est en parti pourquoi les champignons sont des acteurs majeurs dans la régulation de la biomasse et le recyclage de la matière carbonée. Par ailleurs, certains champignons comme les mycorhiziens vivent en symbiose ou en mutualisme avec d'autres organismes, favorisant donc le développement de multiples espèces végétales. Par conséquent, ce sont des microorganismes clefs dans le maintien de la santé des sols.

Cependant, certains champignons sont également délétères pour d'autres organismes. C'est notamment le cas des phytopathogènes responsables de nombreuses pertes agricoles. Parmi les parasites les plus importants au niveau scientifique et économique, on compte *Magnaporthe oryzae* (agent de la pyriculariose du riz), *Botrytis cinerea* (agent de la pourriture grise), *Fusarium graminearum* (agent de la fusariose du maïs et du blé) ou encore *Ustilago maydis* (agent du charbon du maïs et organisme modèle pour l'étude des phytopathogènes) (Dean et al., 2012). En 2003, on estimait que les champignons phytopathogènes étaient responsables d'une perte annuelle de 200 milliards d'euros pour l'agriculture mondiale (Arora, 2003), et dans le même temps, 880 millions de dollars avaient été investis dans l'épandage de fongicides aux Etats-Unis (Gianessi and Reigner, 2005). Les champignons phytopathogènes ont donc un important poids économique pour notre agriculture.

L'autre impact délétère des champignons se porte évidemment sur la santé humaine. Avec le développement et le perfectionnement des traitements médicaux notamment pour les transplantés et les malades atteints de cancer, on observe un nombre croissant de patients immuno-déprimés susceptibles de souffrir d'infections nosocomiales. En particulier, les genres *Candida* et *Aspergillus* sont responsables d'infections opportunistes conduisant à un taux de mortalité global de 35% (Gellendautremer et al., 2008).

Ces microorganismes eucaryotes constituent également une menace pour les habitations. Le mûre des maisons, *Serpula lacrymans*, en est un exemple phare. D'autres champignons capables d'envahir les bâtiments sont également responsables de la production de composés volatiles à l'origine d'allergies ou d'irritations pour les habitants.

Ensuite, les champignons jouent un rôle très important dans l'alimentation et l'industrie (agro-industrie). Dès l'Antiquité, les Hommes ont utilisé ces microorganismes pour l'élaboration de boissons fermentées par exemple. Aujourd'hui les processus de fermentation par les levures *Saccharomyces* et/ou *Brettanomyces* pour la fabrication de la bière sont totalement maîtrisés. Par ailleurs, les progrès de la myciculture permettent de produire pour la consommation courante de nombreuses espèces telles que les champignons de Paris (*Agaricus bisporus*), les pleurotes (*Pleurotus*), les morilles (*Morchella*) ou encore les shiitakes (*Lentinula*). De plus, par leur aptitude à dégrader la lignocellulose de la paroi végétale, les champignons deviennent une alternative séduisante pour le blanchiment du papier dans l'industrie papetière qui utilise pour cela de nombreux composés chlorés extrêmement polluants. Il en est de même pour la production de biocarburants de deuxième génération à partir de déchets agricoles. L'utilisation de leur capacité enzymatique est également une solution intéressante pour la dépollution des sols contaminés par des molécules toxiques. Cependant, l'un des domaines qui utilisent le plus ces microorganismes reste le milieu pharmaceutique. Depuis la découverte de la pénicilline en 1928, les champignons sont grandement employés pour leur production de divers métabolites secondaires.

Pour étudier ces espèces de champignons d'intérêt écologique, médical ou biotechnologique, il est parfois nécessaire de se référer à des espèces modèles, dont le cycle est connu, facilement cultivables et manipulables en laboratoire. En effet, la culture des champignons mutualistes ou pathogènes par exemple est rarement maîtrisée. Les organismes modèles permettent donc une analyse des aspects fondamentaux des processus biologiques et leur application aux champignons d'intérêt qui leur sont proches. Au sein de notre laboratoire, nous utilisons le champignon filamenteux *Podospora anserina* comme organisme modèle.

## 2. *Podospora anserina*, un organisme modèle de laboratoire

*Podospora anserina* est un modèle pour l'étude des processus biologiques des Eucaryotes. Ce champignon filamenteux est un ascomycète non pathogène, cosmopolite et coprophile, généralement retrouvé sur les excréments d'herbivores. *P. anserina* fait partie de l'embranchement des *Ascomycota*, du sous-embranchement des *Pezizomycotina*, de la classe des *Sordaryomycetes* et de l'ordre des *Sordariales*. Son génome, entièrement séquencé (Espagne et al., 2008) est constitué d'environ 10 500 gènes (caractéristique moyenne pour les champignons filamenteux), pour 35 Mb réparti sur 7 chromosomes. *P. anserina* est hermaphrodite et chaque individu possède donc les structures sexuelles femelles et mâles respectivement les ascogones et les microconidies ou spermaties. Son cycle de reproduction sexuée est connu et s'étend sur 7 jours en laboratoire dans des conditions optimales (27°C, 70% d'hygrométrie et en présence de lumière) (**Figure 1**). Il nécessite deux types sexuels, *mat+* et *mat-*, la reproduction ne pouvant se produire qu'entre organes reproducteurs de type sexuel différent. Il existe un système phéromone/récepteur permettant la reconnaissance entre la microconidie et l'ascogone de types sexuels différents. A l'issue de la fécondation, des fructifications (appelées périthèces) se forment autour des ascogones fécondés. Une fois mature, après 4 jours environ, ces périthèces contiennent des asques renfermant les spores, qu'ils dispersent en continu en les éjectant à travers leur col pendant 5 jours. Les spores se développent dans les asques après caryogamie et à la suite d'une méiose et d'une mitose post-méiotique. Deux phénomènes importants pour l'analyse génétique, peuvent alors avoir lieu : la pré-réduction et la post-réduction (**Figure 2**). Dans le cas de la pré-réduction, il n'y a pas de crossing-over entre le gène et son centromère et il y a ségrégation des allèles différents (représentés en blanc et noir sur la Figure 2) lors de la première division de la méiose. Les spores englobent alors deux noyaux génétiquement identiques mais non-frère après la mitose post-méiotique. En revanche, dans le cas de la post-réduction, un crossing-over a lieu entre le gène et son centromère. Les spores se forment ainsi autour de deux noyaux génétiquement différents, et les thalles issus de ces spores seront hétérocaryotiques pour ce gène.

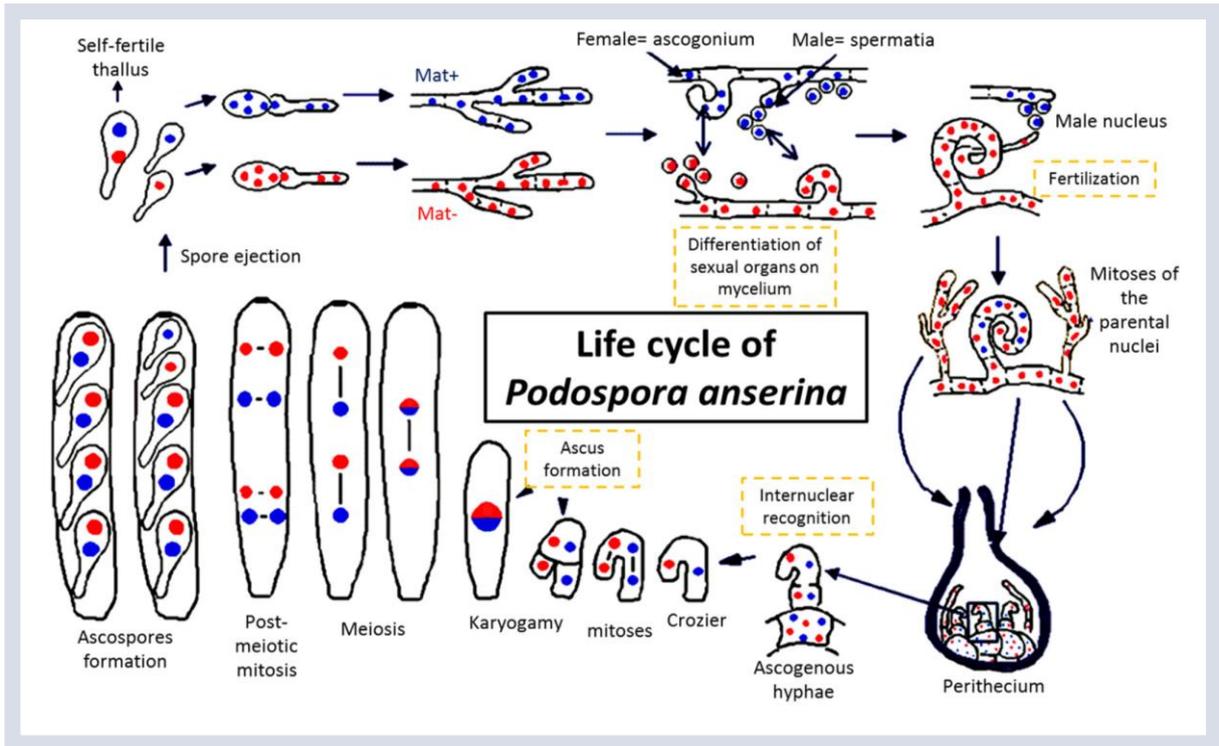


Figure 1 : Cycle de vie de *P. anserina*. Modifiée d'après <http://podospora.i2bc.paris-saclay.fr/more.php>.

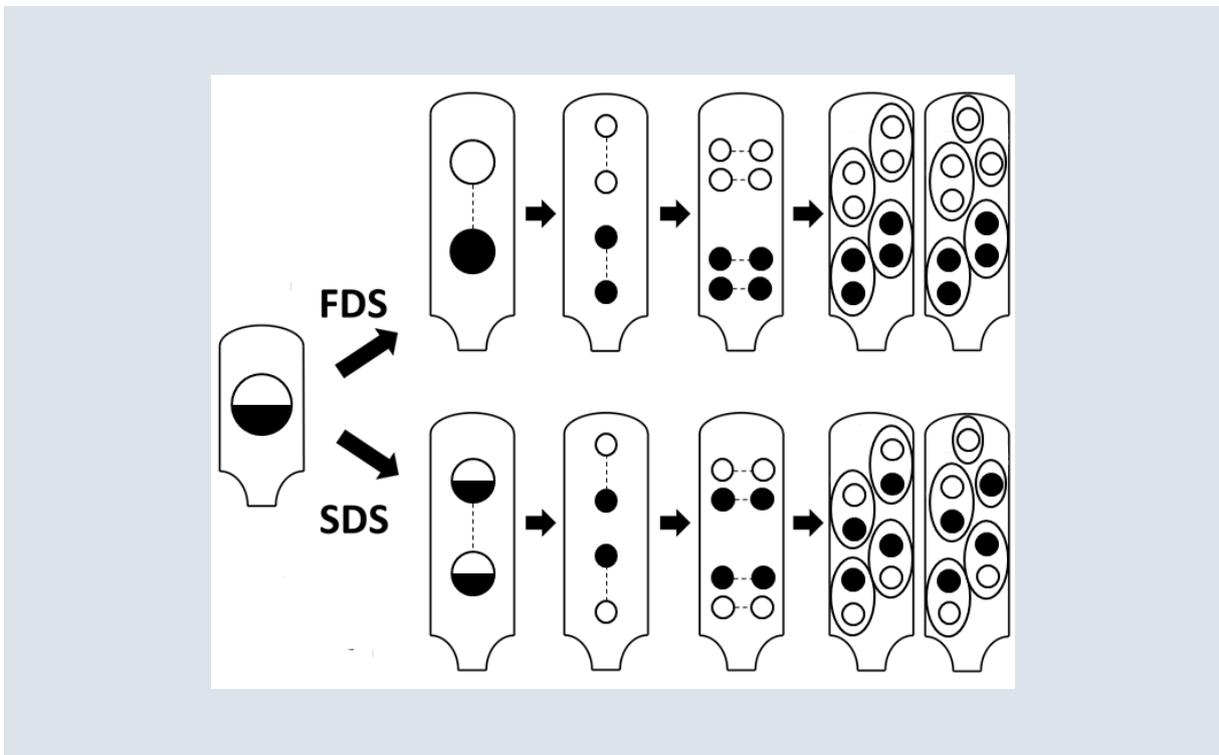


Figure 2 : Ségrégation des allèles lors de la méiose en cas de pré-réduction (FDS) ou post-réduction (SDS) chez *P. anserina*. Modifiée d'après (Grognet et al., 2014a).

Dans la majorité des cas, chaque asque produit quatre spores binucléées qui contiennent chacune les deux types sexuels. Par conséquent le mycélium provenant de la germination d'une spore est hétérocaryotique et autofertile. On dit ainsi que *P. anserina* est un champignon pseudo-homothallique. Cependant, dans 1% des cas, une malformation se produit : l'une des spores n'englobe pas deux noyaux mais un seul et le noyau restant est également enveloppé et deviendra une autre spore. Ainsi, ces asques présenteront 3 « grosses » spores hétérocaryotiques et 2 « petites » spores monocaryotiques, aisément reconnaissables sous loupe binoculaire. Classiquement au laboratoire, les souches utilisées proviennent de la germination de petites spores. En effet, ce type de spores ne contenant qu'un seul type de noyau, cela permet de réaliser des croisements orientés. Par ailleurs, un croisement sur boîte de Pétri produisant environ 100 000 asques, ces souches monocaryotiques peuvent facilement s'obtenir même avec une fréquence de 1%.

Dans la nature, les spores de *P. anserina* doivent transiter par le système digestif d'un herbivore pour acquérir la capacité de germination. En laboratoire, un milieu de germination simple a été mis au point. Il en est de même pour le milieu standard de culture qui permet au champignon de croître de 7 mm environ en 24h dans les conditions optimales. *P. anserina* est donc aisément cultivable et une importante quantité de matériel biologique et notamment génétique peut être récupérée en peu de temps. Par ailleurs, cet ascomycète est facilement transformable, même si l'ADN exogène doit nécessairement s'intégrer au génome pour être transmis au cours des divisions cellulaires. On peut donc facilement réaliser des délétions de gènes, des complémentations, l'introduction d'allèles mutants ou encore la localisation de protéines marquées avec une protéine fluorescente chez ce microorganisme. Son caractère non pathogène, sa culture aisée en laboratoire, son cycle de reproduction court et maîtrisé, et sa capacité à le modifier génétiquement, ont fait de *P. anserina* un champignon modèle et ont permis l'étude de nombreux processus biologiques (Silar, 2013). Ainsi, les phénomènes de dégénérescence des spores et du mycélium, respectivement nommés aujourd'hui par les termes de Spore Killer et incompatibilité végétative, ont été mis en évidence dès le milieu du XX<sup>ème</sup> siècle (Padieu and Bernet, 1967; Rizet and Esser, 1953). En outre, l'étude de cet ascomycète a révélé l'existence d'un système de défense contre les compétiteurs appelé Interférence Hyphale (Silar, 2005). *P. anserina* est également un organisme couramment utilisé pour l'analyse du phénomène de senescence (Marcou, 1961; Osiewacz et al., 2010). Et récemment, le rôle de ce champignon dans le maintien de la santé des sols a été mis en exergue : d'une part par sa capacité à inactiver des dérivés de pesticides comme le 3,4-dichloroaniline (Martins et al., 2009), polluant de nombreuses terres agricoles ; et d'autre part par son large éventail d'enzymes capables de dégrader la biomasse végétale, l'un des équipements enzymatiques le plus important du règne fongique (Couturier et al., 2016).

Le champignon filamenteux *P. anserina* est donc un organisme modèle pour l'étude des processus biologiques et notamment des mécanismes génétiques et épigénétiques chez les Eucaryotes.

## II. LES DIFFERENTES FORMES D'HEREDITES EPIGENETIQUES

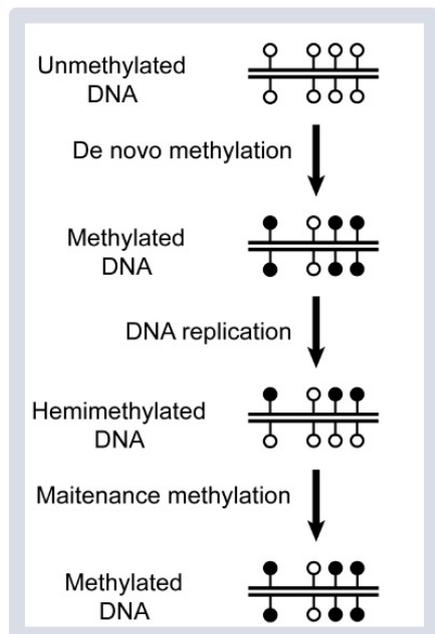
Au début des années 1940, Conrad Waddington émet pour la première fois le concept de « paysage épigénétique », c'est-à-dire l'ensemble des processus par lesquels le génotype engendre le phénotype (Waddington, 1942). Aujourd'hui, on définit l'épigénétique comme l'étude de la régulation de l'expression des gènes, sans qu'il n'y ait de modification dans la séquence nucléotidique. Cette régulation est donc réversible (contrairement aux mutations de l'ADN) et peut se transmettre lors de la division cellulaire et de la méiose. Cette transmission de l'information épigénétique s'effectue à trois niveaux : au niveau de l'organisation de la chromatine et de la méthylation de l'ADN, au niveau de la machinerie impliquant des petits ARN interférants (RNAi) et enfin, au niveau des phénomènes régulateurs et structuraux essentiellement protéiques.

### 1. Héritabilité des régulations transcriptionnelles

#### a. La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est la régulation épigénétique la plus courante et joue un rôle important dans la structure et la dynamique de la chromatine. C'est donc un acteur majeur dans la régulation et l'extinction de l'expression des gènes. Ce mécanisme est présent chez divers Eucaryotes (champignons, plantes et mammifères) et engendre des conséquences pléiotropes. En effet, la méthylation de l'ADN est essentielle lors du développement chez les mammifères et dans l'inactivation du chromosome X. Elle joue également un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité du génome par la répression de l'ADN exogène et des séquences répétées telles que les transposons, les centromères et les ADN satellites. Généralement, une hypométhylation correspond à l'expression des gènes de la région considérée tandis qu'une hyperméthylation est associée à la répression de l'expression des gènes.

Le processus de méthylation est conduit par les ADN méthyltransférases (DMT) qui catalysent le transfert d'un groupe méthyle à partir d'une S-adénosyl-méthionine (AdoMet ou SAM) sur la position C5 des cytosines. A ce jour, deux types d'ADN méthyltransférases ont été identifiées, les ADN méthyltransférases *de novo* et les ADN méthyltransférases de maintenance (**Figure 3**). Les premières sont responsables de la méthylation des séquences non méthylées. A l'opposé, les ADN méthyltransférases de maintenance interviennent dans la méthylation du brin néo-synthétisé à partir des sites hémi-méthylés, après la réplication. Ainsi grâce à cette machinerie, il y a conservation de ces marques épigénétiques au cours des générations. Chez les champignons filamenteux, deux mécanismes permettant l'extinction transcriptionnelle ou TGS (transcriptional gene silencing), ont été décrits chez *Ascobolus immersus* et *Neurospora crassa*.



**Figure 3 : Les deux types de mécanismes de méthylation de l'ADN.** Le processus de méthylation *de novo* permet l'ajout de groupes méthyl sur des cytosines spécifiques sur les deux brins d'ADN (assurant ainsi une méthylation symétrique). Après réplication de l'ADN, le brin néosynthétisé n'est pas méthylé et les sites méthylés deviennent donc hémiméthylés. Le mécanisme de méthylation de maintenance reconnaît ces régions et permet le maintien de la méthylation symétrique sur les deux brins. D'après (Veland and Chen, 2017).

b. Le mécanisme MIP

Chez *A. immersus*, le mécanisme de MIP (méthylation induite prémeiotiquement) a été découvert suite à des expériences de transgénèse (Faugeron et al., 1989; Goyon and Faugeron, 1989). Le MIP permet d'éteindre l'expression des séquences présentes plus d'une fois dans le génome d'*A. immersus* par une forte méthylation *de novo* de la plupart des cytosines des gènes dédoublés. Lors d'expériences de transformation, l'inactivation des gènes répétés (c'est-à-dire du gène endogène ainsi que de la/les copie(s) insérée(s)) est observée après un premier croisement des transformants obtenus. Ce phénomène se maintient à travers les divisions mitotiques et méiotiques, même lorsque les deux séquences répétées ont ségrégué indépendamment l'une de l'autre (Rhounim et al., 1992). Néanmoins, le MIP est réversible et il est possible de lever l'inactivation en utilisant un agent déméthylant sur des cellules en croissance (Goyon and Faugeron, 1989). De plus, pour que le MIP ait lieu, il est nécessaire que les duplications soient présentes dans le même noyau haploïde. Ainsi, l'inactivation se déroulerait à un moment précis lors de la reproduction sexuée, précédant la fusion de deux noyaux haploïdes de types sexuels (Goyon and Faugeron, 1989).

Le MIP agit efficacement sur des séquences répétées d'au moins 400 pb présentes en tandem, et sur des duplications d'au moins 600 pb distribuées dans le génome. Son action engendre une absence de transcrits ou la présence d'ARNm tronqués (Barry et al., 1993). L'analyse de ces transcrits incomplets a montré que la transcription une fois initiée, se propageait jusqu'à atteindre une région méthylée. Par ailleurs, lorsque deux séquences répétées sont méthylées par le MIP, la fréquence de recombinaison est diminuée d'un facteur cent. En effet, la méthylation de l'ADN influence également l'état de la chromatine, et peut donc inhiber le processus de recombinaison homologue (Maloisel and Rossignol, 1998). Le MIP est donc un mécanisme efficace de protection de l'intégrité du génome d'*A. immersus*.

Le premier mutant altéré dans le phénomène MIP identifié est muté dans le gène *masc1* codant pour une protéine qui possède un domaine catalytique caractéristiques des DMT (Malagnac et al., 1997).

Cependant aucune activité enzymatique n'a été détectée *in vitro*. L'inactivation de *masc1* n'influence pas le système de maintenance de la méthylation, ce mécanisme étant assuré par *masc2* (Chernov et al., 1997). Par ailleurs, un croisement entre le mutant *masc1* et la souche sauvage sexuellement compatible est stérile, le développement sexué étant arrêté à un stade précoce. La protéine Masc1 est donc requise dans le système MIP d'une part, et d'autre part, elle joue un rôle important dans la reproduction sexuée. Or, chez *Aspergillus nidulans* qui ne possède pas de mécanisme MIP, la protéine DmtA, orthologue à Masc1, est également nécessaire aux étapes précoces du développement sexuel (Lee et al., 2008). Ces résultats questionnent sur le lien entre le MIP et la défense de l'intégrité du génome, et la reproduction sexuée.

Dernièrement, une troisième DMT, Masc3, aurait été identifiée par comparaison et alignement de séquences grâce au séquençage complet du génome d'*A. immersus* (Montanini et al., 2014).

Un autre mécanisme très similaire au MIP a été identifié chez *N. crassa*, et bien qu'il génère des mutations irréversibles, il est décrit ci-après.

### c. Le mécanisme RIP

*N. crassa* présente également un système de défense par extinction génique découvert par Selker et ses collaborateurs (Selker et al., 1987). Ce processus, similaire au MIP et appelé RIP (repeat-induced point mutation), agit également à l'étape dicaryotique dans le cycle de reproduction sexuée. Tout d'abord, il avait été montré que le RIP œuvrait sur des séquences répétées d'une taille minimale de 400 pb et ayant plus de 80% d'identité (quelle que soit leur localisation au sein du génome) (Watters et al., 1999). Cependant, plus récemment, il a été mis en évidence qu'une parfaite homologie de deux séquences de 155 pb est suffisante pour déclencher ce mécanisme (Gladyshev and Kleckner, 2014). Par ailleurs, le RIP est également capable de détecter et d'éteindre deux régions partageant des motifs composés de quatre nucléotides homologues suivis par sept nucléotides non-homologue (soit 36% d'homologie paratgée) (Gladyshev and Kleckner, 2016). La caractéristique principale du système RIP est la production de mutations de type C:G vers A:T. Plus précisément, la majorité des cytosines sont mutées en thymines. Ainsi, tous les éléments mobiles présents dans le génome de *N. crassa* sont affectés par ce mécanisme, et toutes les séquences répétées sont riches en AT. Par ailleurs, ces régions riches en AT représentent un signal de méthylation : les séquences répétées subissent donc des mutations irréversibles et ont un niveau de transcription nul du fait du processus de méthylation (Miao et al., 2000; Selker and Stevens, 1987; Tamaru and Selker, 2003).

Une protéine essentielle pour le RIP a été identifiée et nommée RID (RIP Defective) (Freitag et al., 2002). Elle correspond à l'unique protéine homologue à Masc1 chez *N. crassa*. Cependant, contrairement à Masc1, la mutation de cette protéine engendre une souche déficiente pour le mécanisme RIP mais toujours fertile. Les homologues de Masc1 et RID ont été identifiés chez quasiment tous les ascomycètes où leur action durant la reproduction sexuée semble conservée (Lee et al., 2008). De façon

concordante, la structure moléculaire de Masc1 et de RID diffère des autres DMT et notamment de leurs homologues (Gladyshev, 2017). Il est possible que ces deux enzymes aient évolué pour former un domaine catalytique spécifique et/ou nécessitant des co-facteurs particuliers.

Les mécanismes de régulation transcriptionnelle de type MIP ou RIP sont répandus chez les champignons filamenteux ascomycètes et constituent une défense efficace contre l'invasion de leur génome par les éléments transposables. En outre, le processus de MIP agit durant le développement sexuel, ce qui concorde avec leur capacité à reconnaître des séquences homologues. Ce dernier point, qui ferait intervenir des interactions entre ADN double brin, demeure cependant indéterminé. Chez *P. anserina*, il existe un mécanisme fonctionnel de type RIP qui présente une efficacité moindre que celui de *N. crassa* (Hane et al., 2015). En revanche, aucune recherche n'a mis en évidence la présence d'un système de type MIP. Néanmoins, lors des nombreuses expérimentations réalisées sur ce champignon modèle, il a parfois été observé (et notamment au cours de ces travaux de thèse) des extinctions de transgènes au cours du temps (et en l'absence de croisement de la souche portant le transgène). Il est donc envisageable qu'un tel mécanisme existe également chez *P. anserina* à une basse efficacité.

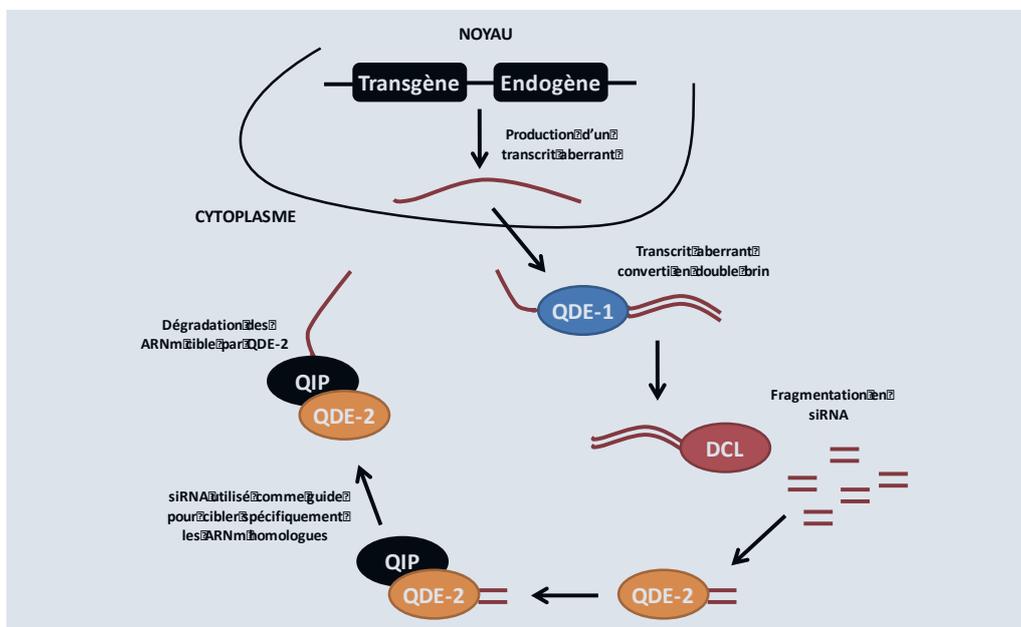
## 2. Héritabilité des régulations post-transcriptionnelles

### a. Le quelling

Pour faire face aux différentes menaces (virus, transposons, etc.) pouvant compromettre l'intégrité de leur génome, les organismes eucaryotes ont développé des mécanismes de régulation post-transcriptionnelles appelés PTGS (post-transcriptional gene silencing). Chez les champignons, le premier mécanisme de ce type a été découvert chez *Neurospora crassa* par Romano et Macino. Ces derniers tentent en 1992 de sur-exprimer le gène albino-1 (*al-1*) impliqué dans la biosynthèse de caroténoïdes et qui confère à *N. crassa* sa pigmentation orangée (Romano and Macino, 1992). Pour ce faire, ils introduisent des copies *al-1* supplémentaires dans son génome. De façon surprenante, 30% des transformants obtenus présentent un phénotype blanc, identiques aux mutants *al-1*. Ce phénomène, appelé quelling, inactive spécifiquement au niveau post-transcriptionnel le gène endogène ainsi que ses séquences homologues exogènes. En effet, la quantité de pré-ARNm n'est pas modifiée, alors que celle des transcrits matures du gène visé par le quelling diminue très fortement (Cogoni et al., 1996). Pour que ce mécanisme s'opère, une région homologue de 132 nucléotides est suffisante (Cogoni et al., 1996). Au contraire, l'insertion de régions non codantes, comme les séquences promotrices, n'est pas suffisante pour déclencher le quelling (Cogoni et al., 1996). En outre, le quelling est une régulation réversible et des souches présentant un phénotype blanc ont engendré des colonies orange à des fréquences variables (Romano and Macino, 1992; Cogoni and Macino, 1997). Des hétérocaryons issus d'un mélange entre un noyau sauvage et un noyau portant plusieurs copies *al-1* éteintes par le quelling révèlent également que ce dernier est un phénomène dominant et diffusible (Cogoni et al., 1996).

Grâce à un crible utilisant un champignon modèle, les mutants *qde* (*quelling defective*), altérés dans le quelling, ont été isolés et ont permis d'identifier les acteurs de ce phénomène : *qde-1* code pour une ARN polymérase ARN-dépendante (RdRP) (Cogoni and Macino, 1999a), *qde-2* code pour une protéine de type Argonaute (Catalanotto et al., 2000) et *qde-3* code pour une hélicase RecQ (Cogoni and Macino, 1999b). Les protéines DCL-1 et DCL-2, des RNase III (de classe 3) produisant des petit ARN interférents (siRNA) de 21-25 nucléotides, partiellement redondantes n'ont pas pu être identifiées lors de ce premier criblage (Catalanotto et al., 2004). Enfin, une exonucléase QIP a été isolée après une analyse biochimique des protéines interagissant avec QDE-2 (Maiti et al., 2007). Ces différentes études ont permis de dessiner un modèle présenté **Figure 4**. Le quelling serait donc un mécanisme de type RNAi, déclenché par l'introduction d'un transgène homologue à un gène endogène. Une fois transcrits par l'ARN polymérase II, les pré-ARNm seraient pris en charge par QDE-1 qui les convertirait en ARN double-brin (dsRNA). Ces derniers seraient alors divisés en siRNA de 25 nucléotides environ par DCL-1 ou DCL-2. Ces molécules sont ensuite incorporées au complexe RISC (RNA-induced silencing complex) *via* la protéine QDE-2, et transformées par l'exonucléase QIP. Les produits ARN ainsi obtenus sont utilisés pour cibler les ARNm homologues. Après avoir été piégés, les ARNm sont probablement dégradés par QDE-2.

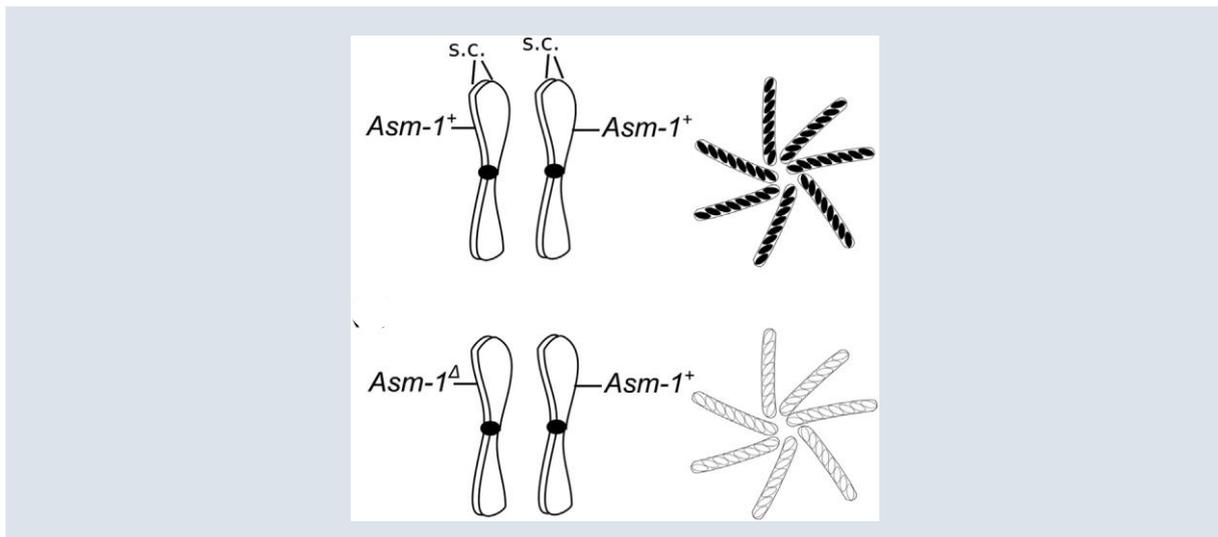
Certains aspects de ce mécanisme restent cependant à éclaircir. C'est notamment le cas de QDE-3 qui pourrait agir au niveau de la transcription du transgène et/ou dans le recrutement de QDE-1. En outre, le processus d'activation du quelling n'est pas encore bien défini, mais un modèle propose que des transcrits aberrants des transgènes en seraient à l'origine.



**Figure 4 :** Le modèle du quelling chez *N. crassa*. Modifiée d'après (Malagnac and Silar, 2011).

b. Le mécanisme MSUD

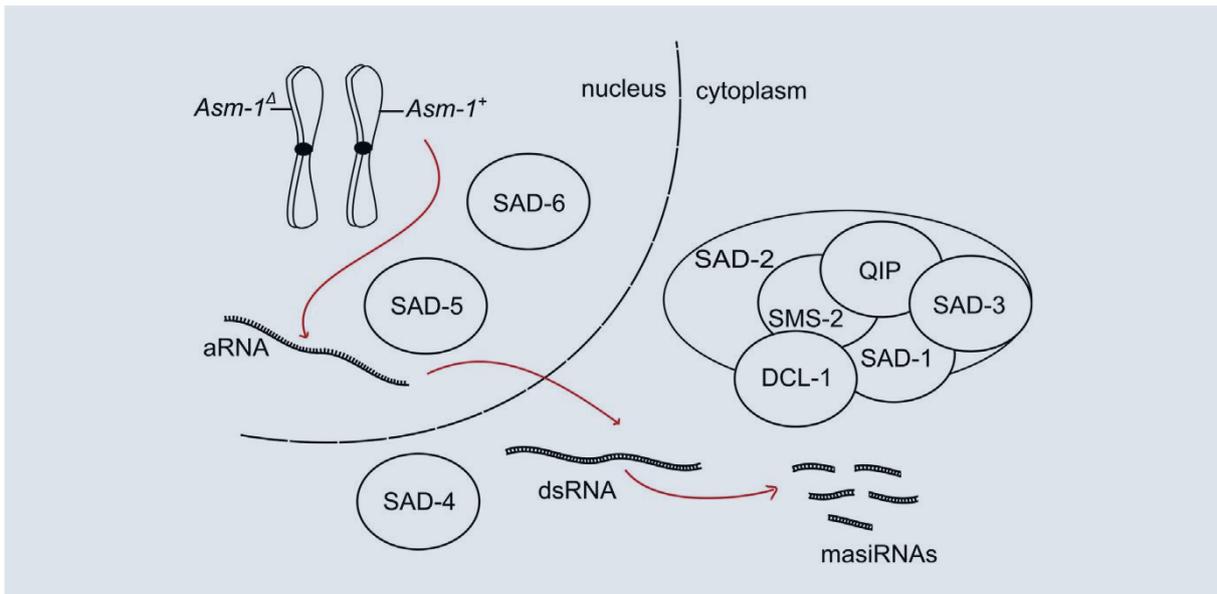
En plus de la régulation durant le développement végétatif par le mécanisme de quelling, *N. crassa* dispose également d'un système de reconnaissance et d'extinction de l'ADN « non-apparié » pendant la méiose. Ce phénomène appelé MSUD (Meiotic Silencing by Unpaired DNA) a été découvert par Metzenberg et ses collègues en étudiant le gène *Asm-1* (*Ascospore maturation-1*) (Aramayo and Metzenberg, 1996; Shiu et al., 2001). Ce gène est orthologue à *stuA* chez *Aspergillus nidulans*, et, tout comme les mutants *stuA*, les mutants *Asm-1* présentent un phénotype végétatif particulier avec un défaut de production d'hyphes aériens notamment (Aramayo et al., 1996). En outre, les mutants invalidés pour *Asm-1* (*Asm-1<sup>Δ</sup>*) sont stériles au niveau femelle. De manière très surprenante, en croisant une souche *Asm-1<sup>Δ</sup>* avec une souche sauvage, il en résulte la production de huit ascospores blanches et non viables (**Figure 5**). Ce phénomène de dominance est étonnant puisque la suppression d'un allèle ne peut conduire à la production d'aucun produit pouvant interférer dans le développement cellulaire normal. La seule hypothèse pouvant permettre d'expliquer ce résultat est l'insuffisance allélique (i.e. deux allèles fonctionnels de *Asm-1* sont nécessaires pour produire une quantité suffisante de protéine *Asm-1* pour une production normale d'ascospores noires). Ainsi une complémentation au site permet d'éliminer la dominance de *Asm-1<sup>Δ</sup>*. Cependant, lorsque la complémentation est réalisée en ectopique, huit ascospores blanches sont produites comme pour le croisement *Asm-1<sup>Δ</sup>* x *Asm-1<sup>+</sup>*. Ces observations sont le fait du mécanisme MSUD qui éteint l'expression des séquences de 1,3 kb minimum (Lee et al., 2004) qui ne sont pas appariées durant la méiose (Shiu et al., 2001).



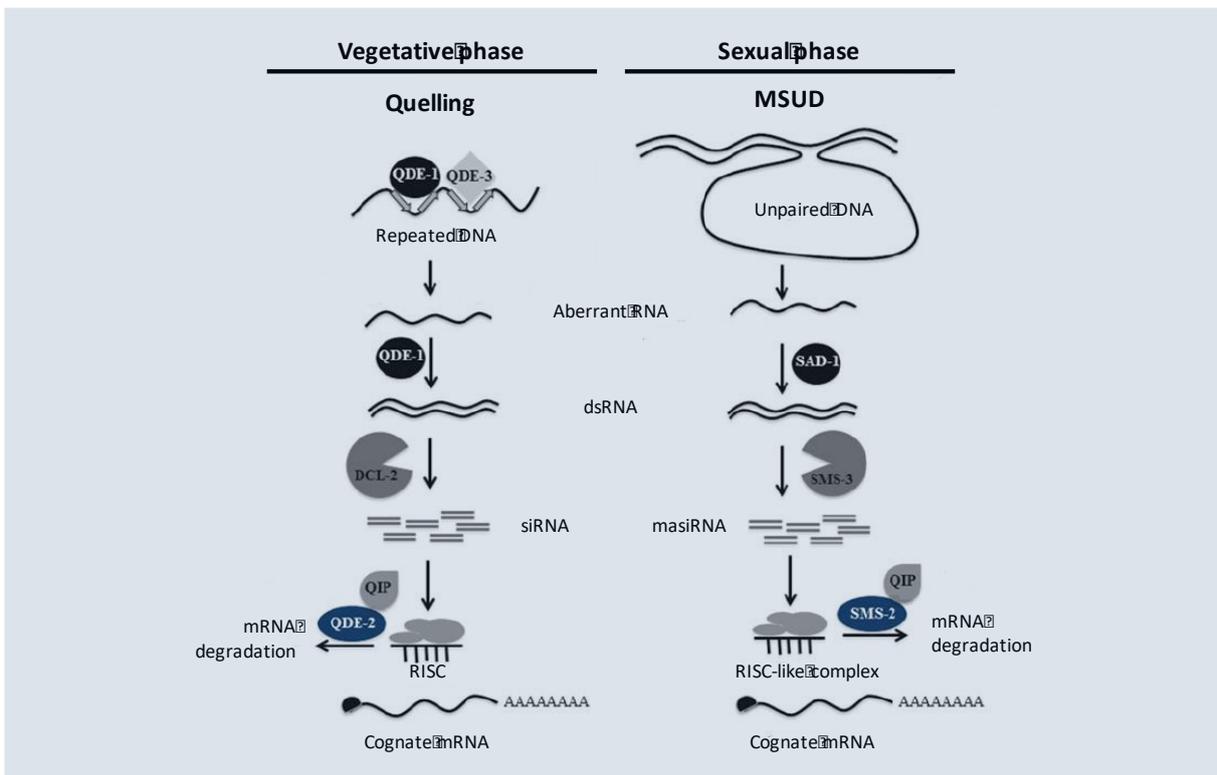
**Figure 5 : La délétion de *Asm-1* est dominante.** En haut, un croisement entre deux souches sauvages (*Asm-1<sup>+</sup>*) engendre des asques à huit spores sauvages noires. En revanche, le croisement entre la souche sauvage et la souche *Asm-1<sup>Δ</sup>* (en bas) produit des asques à huit spores blanches et non viables. s.c. : chromatide sœur. D'après (Hammond, 2017).

A partir de l'étude du premier mutant suppresseur du MSUD obtenu par mutagenèse aléatoire, le premier gène impliqué dans ce mécanisme a été caractérisé (Shiu et al., 2001). Il s'agit du gène *sad-1* (*suppressor of ascus dominance*) codant pour une RdRP similaire à QDE-1. Les RdRP étant impliquées dans la machinerie RNAi, les analyses se sont portées sur les protéines de type DICER et Argonaute. Ainsi, il a été montré que la protéine DICER DCL-1 (Alexander et al., 2008) et la protéine Argonaute SMS-2 (*suppressor of meiotic silencing 2*), homologue à QDE-2 (Lee et al., 2003), sont nécessaires au mécanisme MSUD. Par ailleurs, QDE-2 étant connu pour interagir avec QIP durant le quelling, des études ont été menées pour évaluer l'éventuel rôle de cette exonucléase pendant le MSUD. Elles ont montré que QIP est également requise pour l'extinction génique au cours de la méiose (Lee et al., 2010; Xiao et al., 2010). Les deux mécanismes de régulation partagent donc de nombreuses protéines homologues. De plus, Hammond et ses collaborateurs ont mis en évidence que l'extinction par le MSUD est de type RNAi (Hammond et al., 2013a). En effet, ils ont pu détecter la présence de petits ARN, appelés masiRNA, spécifiques à un gène non apparié pendant la méiose, en quantité dix fois plus importante par rapport au contrôle. Pour compléter ce modèle, un criblage génétique a été réalisé sur la banque de mutants de *N. crassa* disponible (Colot et al., 2006). Il a permis d'identifier de nouvelles protéines : SAD-3 (Hammond et al., 2011), SAD-4 (Hammond et al., 2013b), et les protéines nucléaires SAD-5 (Hammond et al., 2013b) et SAD-6 (Samarajeewa et al., 2014). Enfin, le gène *sad-2* identifié comme le gène *sad-1* par mutagenèse aléatoire (Shiu et al., 2006), code pour une protéine co-localisée avec QIP et SMS-2 (Xiao et al., 2010) et vient compléter le modèle présenté **Figure 6**.

Quelling et MSUD sont donc deux mécanismes de régulation post-transcriptionnelle présentant de fortes homologies (**Figure 7**) et peuvent être définis comme complémentaires chez *N. crassa*. Chez *P. anserina*, en revanche, aucun mécanisme de type MSUD ou quelling n'a été mis en évidence à ce jour.



**Figure 6 : Modèle du mécanisme MSUD.** aRNA : ARN aberrant. D’après (Hammond, 2017).

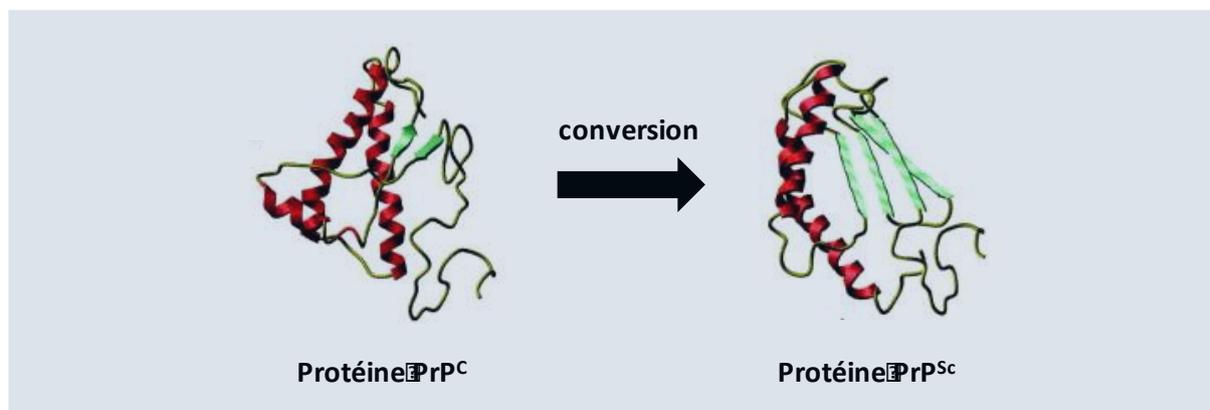


**Figure 7 : Les deux mécanismes de régulation post-transcriptionnelles chez *N. crassa*.** Modifiée d’après (Quoc and Nakayashiki, 2015).

### 3. Hérité de structure : le prion

#### a. Découverte et caractérisation

Entre 1986 et les années 2000, une épizootie particulièrement médiatisée d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), appelée également « maladie de la vache folle », a touché le Royaume-Uni. Cette infection fait partie, avec la tremblante du mouton, le kuru et la maladie de Creutzfeldt-Jakob, des maladies neurodégénératives causées par un agent infectieux singulier : le prion. C'est en 1982 que Prusiner propose ce terme pour la première fois (acronyme de PRoteinaceous Infectious ONly) pour caractériser l'agent causant la tremblante du mouton (Prusiner, 1982). L'agent infectieux responsable de cette maladie est une protéine appelée PrP (*Protease Resistant Protein*) (Prusiner, 1982). Elle possède la particularité de pouvoir se présenter sous deux formes (**Figure 8**) (Prusiner, 1991). Sous sa conformation normale (PrP<sup>C</sup>), la protéine est fonctionnelle et non-infectieuse. En revanche, sous sa forme prion (PrP<sup>Sc</sup>), la protéine est infectieuse et capable de catalyser efficacement le changement de conformation de protéines natives vers la forme prion. Il y a ainsi accumulation de protéines sous forme infectieuse qui induit un changement de phénotype, sans aucune modification du génotype. Par ailleurs, les protéines prions s'organisent en fibres, ce qui les rend moins vulnérables à différents stress (augmentation de la température, dessiccation, protéinases, etc). Aujourd'hui, le terme prion n'est plus restreint aux agents infectieux des maladies dégénératives précédemment citées, et s'est élargi à toute protéine capable d'adopter une conformation infectieuse.



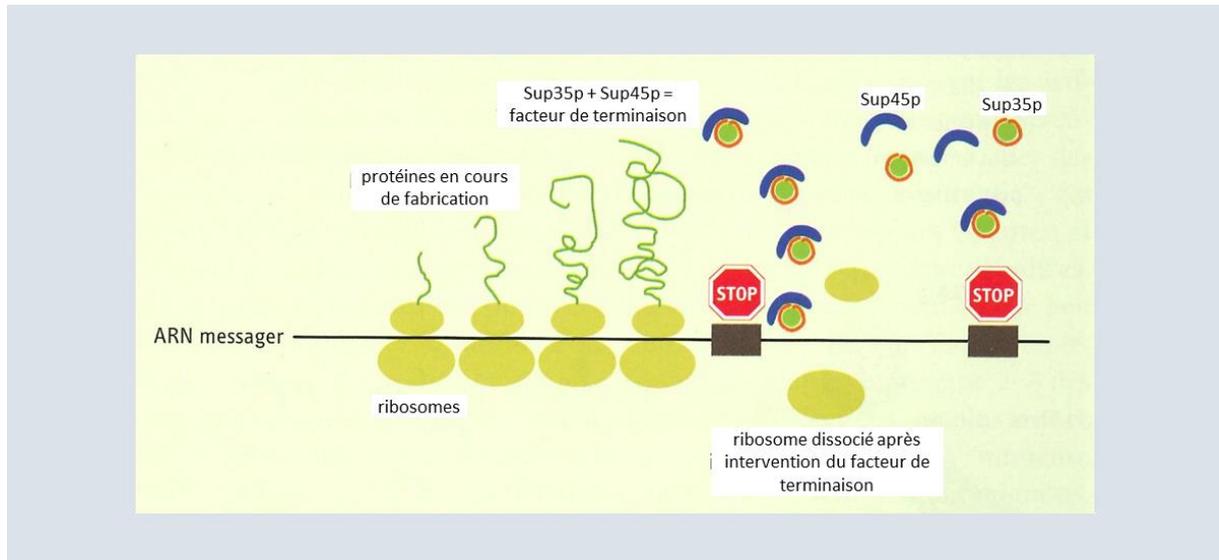
**Figure 8 : Structures de la protéine PrP sous forme native (PrP<sup>C</sup>) et sous forme infectieuse (PrP<sup>Sc</sup>).** Modifiée d'après (Soto and Saborío, 2001).

b. L'exemple de l'élément PSI chez *Saccharomyces cerevisiae*

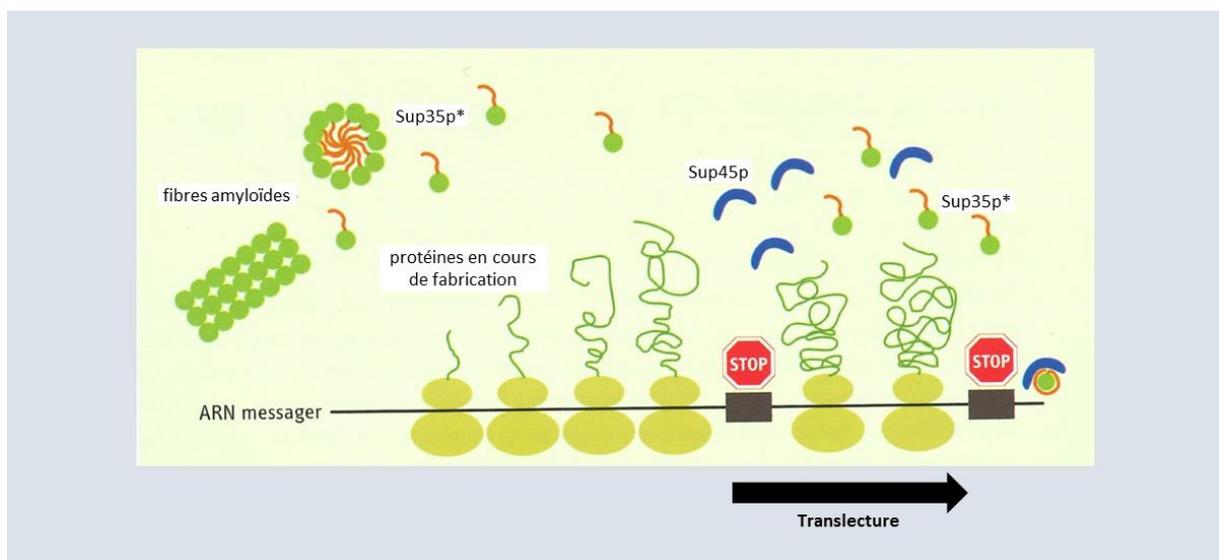
Dès les années 1960, un caractère à l'hérédité non-mendélienne est découvert chez *S. cerevisiae* lors de la recherche de supresseurs chez des souches mutantes auxotrophes pour l'adénine, [ade<sup>-</sup>]. Ces souches possèdent une mutation non-sens dans le gène *ade1*, et accumulent un précurseur dans la chaîne de biosynthèse de l'adénine, provoquant une pigmentation rouge des colonies. Brian Cox isole ainsi des colonies blanches et bicolores (blanc/rouge) de phénotype [ade<sup>+</sup>] (Cox, 1965). En analysant la ségrégation de ce caractère, il met en évidence que l'élément responsable de [ade<sup>+</sup>] est dominant et cytoplasmique, et le nomme PSI. En effet, les croisements entre une souche [PSI<sup>+</sup>] et une souche [psi<sup>-</sup>] engendrent un diploïde [PSI<sup>+</sup>], qui lui-même, de façon étonnante, donne quatre spores [PSI<sup>+</sup>]. De plus, le caractère [PSI<sup>+</sup>] peut être transmis à une souche [psi<sup>-</sup>] en transférant le cytoplasme de l'une à l'autre, sans échange de noyaux (Cox et al., 1980). L'élément PSI semble d'origine protéique puisque des cellules [PSI<sup>+</sup>] peuvent être converties en [psi<sup>-</sup>] de façon permanente en cultivant les souches en présence de chlorure de guanidinium, un dénaturant de protéines (Tuite et al., 1981). Par la suite, une corrélation entre l'élément PSI et le gène *SUP35* a été observée (Ter-Avanesyan et al., 1994). Ce dernier est un supresseur informationnel non-spécifique au codon STOP. Le caractère omnipotent de ce type de supresseur suppose que la mutation ne se situe pas dans un gène codant pour un ARNt. La protéine Sup35p codée par ce gène joue un rôle majeur dans l'apparition du phénotype [PSI<sup>+</sup>] : différentes délétions dans Sup35p conduisent à abolir le phénotype [PSI<sup>+</sup>] de façon permanente, tandis que sa surexpression augmente la probabilité d'apparition de [PSI<sup>+</sup>] (Ter-Avanesyan et al., 1994). Ces expériences de délétions ont mis en évidence que la partie N-terminale de la protéine était essentielle pour le maintien de [PSI<sup>+</sup>]. En outre, Doel et ses collaborateurs ont montré qu'une unique mutation faux-sens (glycine modifiée en aspartate) à l'extrémité N-terminale (114 premiers acides aminés) de Sup35p engendrait un allèle dominant générant une souche dépourvue de l'élément PSI (Doel et al., 1994). Dans le même temps, Wickner étudie l'élément cytoplasmique et infectieux Ure3 présent également chez la levure. Il émet l'hypothèse alors pour la première fois que les prions sont des phénomènes répandus qui ne se limitent pas au système PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>Sc</sup> chez les mammifères, et propose que l'élément Ure3 et l'élément PSI sont tous deux des prions (Wickner, 1994). Cette hypothèse se confirme avec les études de Tuite qui montre que les protéines PrP et Sup35 possèdent une homologie dans leur partie N-terminale avec la présence de séquences répétées relativement semblables : PQGGYQQYN pour PrP et PHGGGWGQ pour Sup35p (Tuite, 1994). De plus, tout comme PrP<sup>Sc</sup>, Sup35p<sup>[PSI<sup>+</sup>]</sup> (Sup35p issue des cellules [PSI<sup>+</sup>]) s'accumule, s'agrège et présente une résistance aux protéases, contrairement à Sup35p<sup>[PSI<sup>-</sup>]</sup> (Paushkin et al., 1996).

La protéine Sup35p a été identifiée comme étant un facteur de terminaison qui forme avec Sup45p le complexe de terminaison de la traduction. Ils sont respectivement les équivalents des facteurs de terminaison eucaryotes eRF3 et eRF1. Le premier a pour rôle la reconnaissance du codon stop, tandis que le second facilite la libération du polypeptide *via* l'hydrolyse du GTP. Dans les souches [psi<sup>-</sup>],

Sup35p se trouve dans sa conformation normale et peut s'associer à Sup45p pour mettre fin aux traductions à la lecture du codon stop (**Figure 9**). En revanche, lorsque Sup35p subit une transconformation, d'une part, elle transforme une grande partie des protéines Sup35p natives en Sup35p prions, et d'autre part, elle n'est plus capable de former un complexe avec Sup45p. Le complexe de terminaison de la traduction n'étant plus actif, il y a translecture et synthèse de protéines anormales (**Figure 10**).



**Figure 9 : Synthèse protéique dans une souche [psi<sup>-</sup>].** Modifiée d'après (Silar and Malagnac, 2013).



**Figure 10 : Translecture dans une souche [PSI<sup>+</sup>].** La protéine Sup35p sous forme prion (Sup35p\*) ne peut s'associer à Sup45p pour former le facteur de terminaison. Modifiée d'après (Silar and Malagnac, 2013).

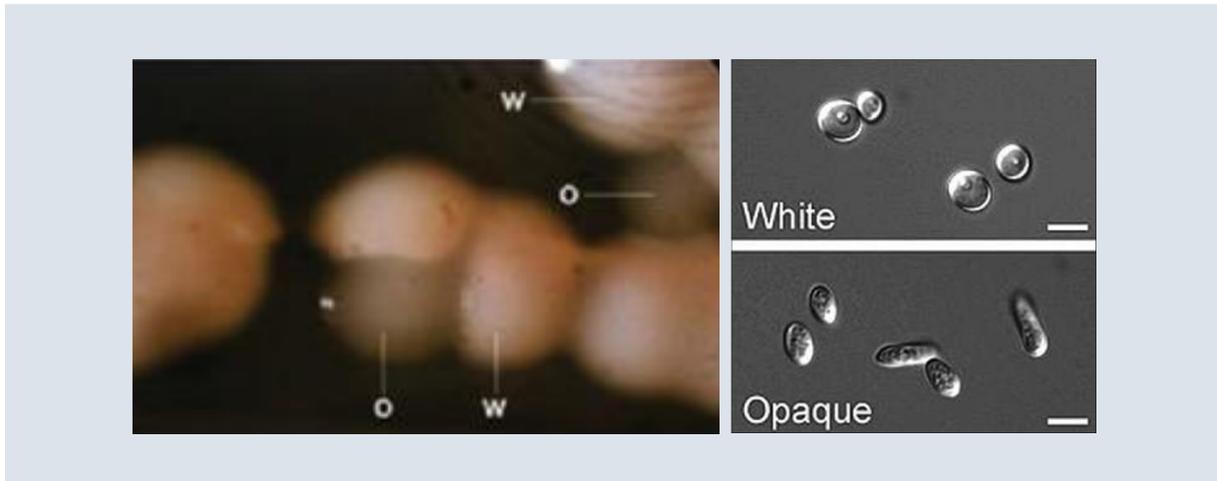
Chez les levures [PSI<sup>+</sup>], il existe une caractéristique remarquable appelé phénomène de souche. Malgré le fait qu'une seule et même protéine prion, Sup35p, soit impliquée dans [PSI<sup>+</sup>], de nombreuses « souches » [PSI<sup>+</sup>] aux phénotypes différents ont été isolées. Ce phénomène fait écho aux maladies neurodégénératives humaines pour lesquelles un même polypeptide engendre des phénotypes différents selon les patients (tels que la localisation des lésions cérébrales, ou le temps de latence de la maladie) (Chien and Weissman, 2001). Cette diversité de phénotypes déterminée par l'élément PSI s'explique par la capacité de Sup35p à adopter différentes formes de fibres amyloïdes (Chien and Weissman, 2001; King and Diaz-Avalos, 2004; Tanaka et al., 2004; Diaz-Avalos et al., 2005). Ces multiples conformations ont un impact sur l'efficacité de translecture des codons stop et par conséquent, sur le répertoire protéique de la cellule ainsi que sur leur phénotype.

Comme le présuait Wickner dès 1994, les prions sont des phénomènes très répandus et dans différents organismes, de nombreuses protéines ont été identifiées comme telles à ce jour (pour revue, (Nguyen et al., 2017)). Chez *P. anserina*, il existe également des processus de ce type qui seront exposés par la suite.

#### 4. Hérité de réseaux de régulation

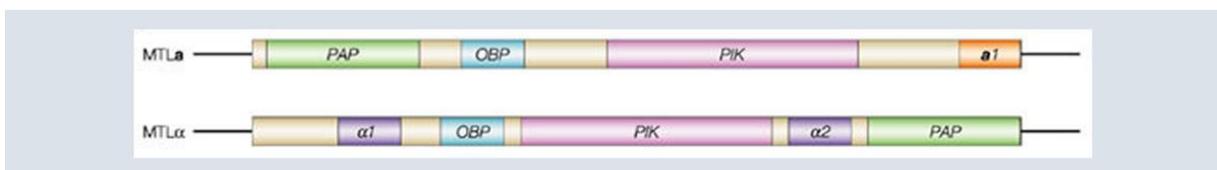
##### a. Le « switch white-opaque » chez *Candida albicans*

*Candida albicans* est une levure diploïde commensale du système digestif humain présente chez une grande partie de la population. Sous certaines conditions, elle peut se révéler pathogène de façon opportuniste et être à l'origine de candidoses, généralement superficielles mais également profondes pour les individus immunodéprimés. Son caractère pathogénique est étroitement lié à sa morphologie. Cette levure possède en effet la capacité de passer d'une morphologie dite « white » à une morphologie dite « opaque » et réciproquement (**Figure 11**) (Slutsky et al., 1987). Sous sa forme « white », les levures sont blanches et rondes, ce qui génère des colonies blanches et lisses. En revanche, les levures « opaque » sont grises et allongées, produisant des colonies grises et granuleuses. Au niveau de l'interaction entre *C. albicans* et son hôte, les cellules « white » sont mieux adaptées aux infections internes tandis que les cellules « opaque » se développent dans les infections cutanées (Kvaal et al., 1997, 1999; Lachke et al., 2003). Par ailleurs, les levures « white », contrairement aux levures « opaque », sécrètent des composés chimioattracteurs/chimioattractants pour les leucocytes (Geiger et al., 2004). Cela expliquerait le fait que *C. albicans* sous forme « opaque » est moins sujet à la phagocytose par les macrophages que les cellules sous forme « white », *in vitro* (Lohse and Johnson, 2008). En outre, la morphologie adoptée par les cellules dépend en partie des conditions environnementales telles que la température et le pH. Dans les conditions de laboratoire, le changement de morphologie est un événement rare (estimé à un tous les 10<sup>4</sup> divisions cellulaires) (Lohse and Johnson, 2009).



**Figure 11 : Colonies de *C. albicans* présentant les deux morphologies, white (w) et opaque (o) et observation microscopique des levures sous les deux formes.** Modifiée d’après (Berman and Sudbery, 2002).

Le « switch white-opaque » est étroitement lié au type sexuel de *C. albicans*. Alors que pendant près de 100 ans, cette levure a été considérée comme asexuelle, les données génomiques obtenues par séquençage ont permis d’identifier le locus MTL (mating-type-like) de 9kb impliqué dans le déterminisme du type sexuel et possédant deux versions (Hull and Johnson, 1999) : MTL<sub>a</sub> et MTL<sub>α</sub>. Le locus MTL<sub>a</sub> code pour deux régulateurs transcriptionnels  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ , tandis que le locus MTL<sub>α</sub> code pour les régulateurs transcriptionnels  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ . A cela, viennent s’ajouter pour les deux versions du locus MTL, les gènes PAP, PIK et OBP codant respectivement une poly(A) polymérase, une phosphoinositol kinase et une oxysterol binding protein (**Figure 12**). Chez les cellules haploïdes  $\alpha$ ,  $\alpha 1$  permet l’expression des gènes spécifiques au type sexuel  $\alpha$  alors que  $\alpha 2$  réprime l’expression de ceux spécifiques aux levures a. Au contraire, chez les cellules haploïdes a, le régulateur  $\alpha 1$  n’a pas de fonction connue et les gènes spécifiques au type sexuel a sont constitutivement exprimés. De plus en l’absence du facteur de transcription  $\alpha 2$ , les gènes spécifiques au type sexuel  $\alpha$  ne sont pas exprimés.



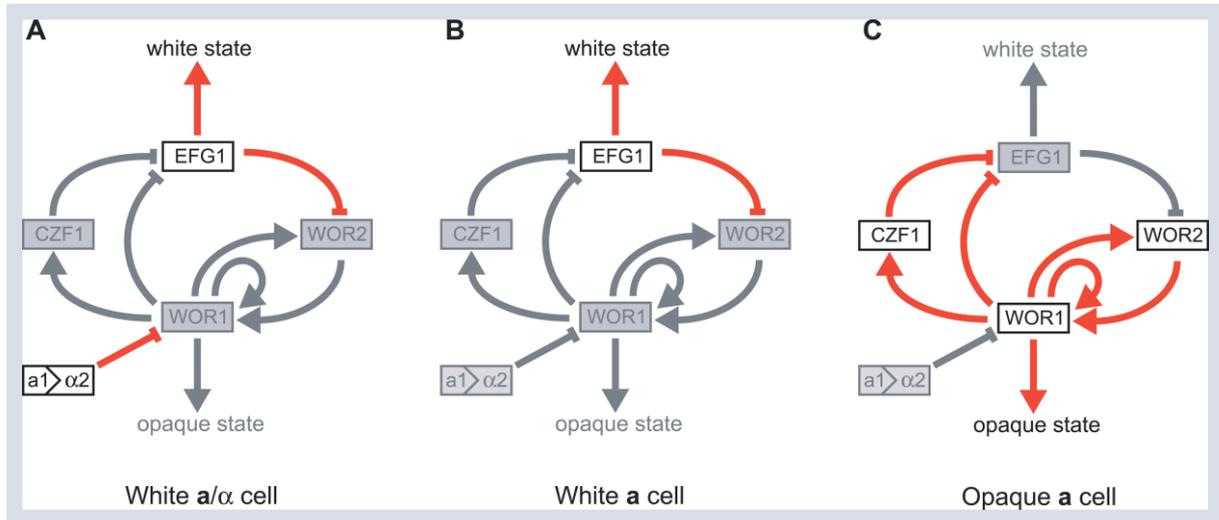
**Figure 12 : Organisation des locus sexuel, MTL<sub>a</sub> et MTL<sub>α</sub>, chez *C. albicans*.** D’après (Berman and Sudbery, 2002).

Chez *C. albicans*, contrairement à *S. cerevisiae* par exemple, toutes les cellules a et  $\alpha$  ne sont pas compétentes pour la reproduction sexuée. Pour que ce processus puisse avoir lieu, il est nécessaire

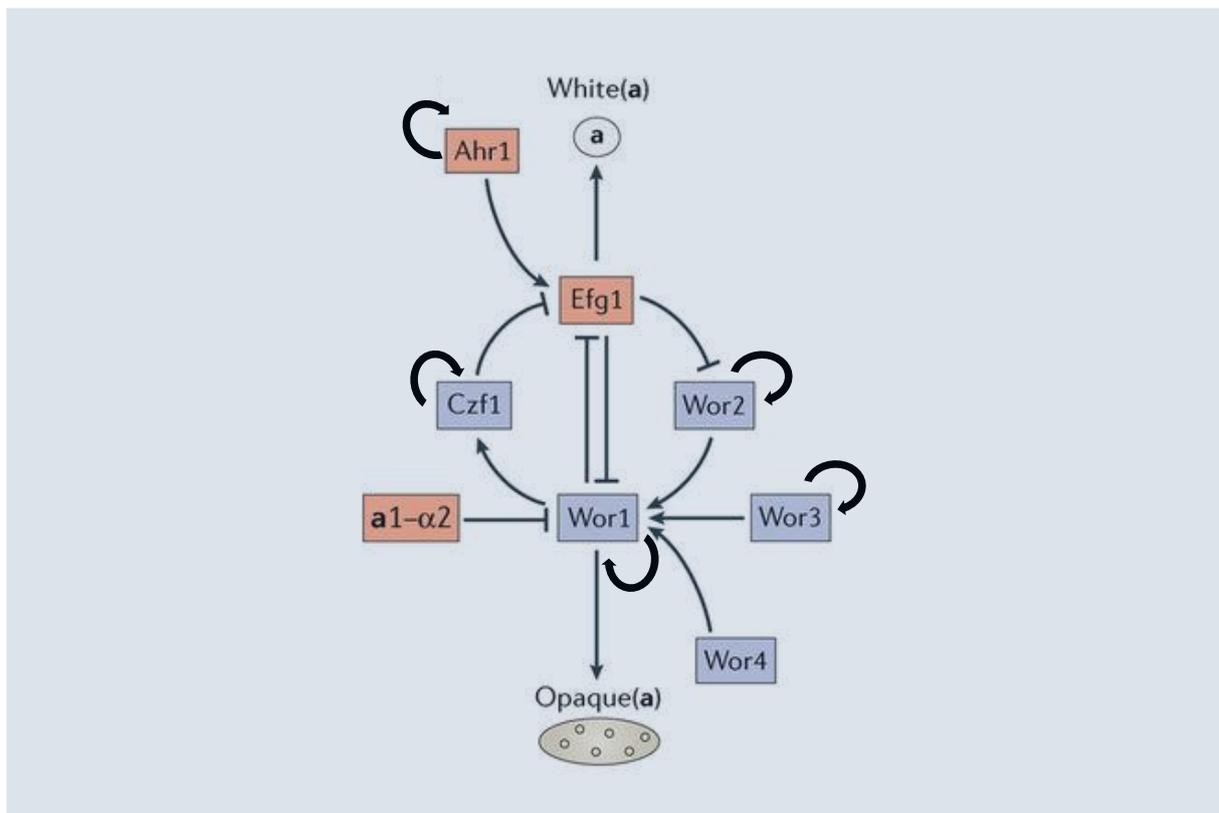
que les levures modifient leur morphologie et passent d'une cellule « white » à une forme moins stable et plus rare « opaque ». Lorsqu'un diploïde  $a/\alpha$  se forme, il prend la morphologie « white ». Par ailleurs, la levure  $a/\alpha$  exprime à la fois, les protéines  $a1$  et  $\alpha2$  qui s'associent pour constituer un hétérodimère. Ce dernier réprime la majorité des gènes du type sexuel et inhibe la transition white-opaque. Il permet cependant à la cellule d'entrer en méiose sous conditions favorables, notamment à température ambiante (Magee and Magee, 2000). L'ensemble de ces données explique la difficulté d'observer la reproduction sexuée chez *C. albicans*. En effet, la très grande majorité des souches cliniques isolées (95%) sont diploïdes  $a/\alpha$  et sont donc incapables de se croiser, ni de faire la transition white-opaque (Lockhart et al., 2002). En outre, il est étonnant qu'une levure commensale de l'Homme ne puisse entrer en méiose qu'à une température bien inférieure à 37°C. Cela renforce l'hypothèse selon laquelle *C. albicans* se multiplierait principalement par divisions clonales.

L'une des caractéristiques remarquables de ces morphologies est le maintien des phénotypes « white » et « opaque » au cours des générations dans des conditions de culture normales en laboratoire. Au cours d'une centaine de divisions cellulaires, les levures « white » engendrent toujours des levures « white », et les levures « opaque » produisent toujours des levures « opaque ». Pour expliquer cette stabilité, il a été proposé que la morphologie de *C. albicans* serait contrôlée par une ou plusieurs boucles d'auto-activation. En réalité, il s'agit d'un réseau de boucles d'auto-activation au sein de la régulation de la transcription dont le protagoniste central, et le premier acteur identifié, est WOR1 (Huang et al., 2006; Srikantha et al., 2006; Zordan et al., 2006) (**Figure 13**). Ce dernier est requis dans la transition white-opaque, et il est possible de transformer une colonie entière « white » en une colonie « opaque » en exprimant WOR1 de façon ectopique dans ces cellules. WOR1 est un facteur de transcription capable de se fixer à son propre promoteur, et formant ainsi une boucle d'auto-activation. Cette dernière permet donc de maintenir une quantité de facteur WOR1 élevée et ainsi de stabiliser l'état « opaque ». Outre sa propre activation, WOR1 stimule l'expression de CZF1 (Vinces and Kumamoto, 2007), inhibiteur de l'expression de EFG1, et de WOR2 également activateur de l'expression de WOR1 (**Figure 13C**). En revanche, lorsque les levures sont diploïdes  $a/\alpha$ , l'hétérodimère  $a1/\alpha2$  réprime l'expression de WOR1 (**Figure 13A**). Le facteur EFG1 est donc exprimé et vient éteindre l'expression de WOR2 (Sonneborn et al., 1999; Srikantha et al., 2000). Dans le cas des cellules  $a$  ou  $\alpha$  « white », le circuit de régulation est majoritairement éteint et seul le facteur EFG1 permet de maintenir ce phénotype (**Figure 13B**).

Trois autres facteurs de transcription viennent compléter ce modèle : WOR3 (Lohse et al., 2013) et WOR4 (Lohse and Johnson, 2016) qui agissent positivement sur WOR1, et Ahr1 qui stimule l'expression de EFG1 (**Figure 14**). Il s'avère également que, outre WOR1, les facteurs CZF1, Ahr1, WOR2 et WOR3 présentent une boucle d'auto-activation (Hernday et al., 2013).



**Figure 13 : Boucles de régulation du « switch white-opaque » chez *C. albicans*.** D’après (Zordan et al., 2007).



**Figure 14 : Système de régulation du « switch white-opaque » chez *C. albicans*.** Modifiée d’après (Noble et al., 2017).

Ce modèle composé de nombreuses boucles d'auto-activation permet d'expliquer la stabilité des morphologies au cours des divisions cellulaires, mais également la transition aléatoire possible entre les deux états. Dans ce modèle, l'état par défaut où le système est majoritairement inactif est la forme « white ». La transition vers la forme « opaque » nécessite l'activation du système par WOR1. Par fluctuations aléatoires, WOR1 peut s'accumuler de manière suffisante pour déclencher cette activation. Ainsi une certaine quantité de WOR1 permettrait de maintenir la forme « opaque », niveau suffisant qui est transmis aux cellules filles durant la mitose. De façon identique, la transition vers un état « white » peut avoir lieu lorsque la concentration de WOR1 n'est plus assez élevée dans l'une des cellules filles par exemple.

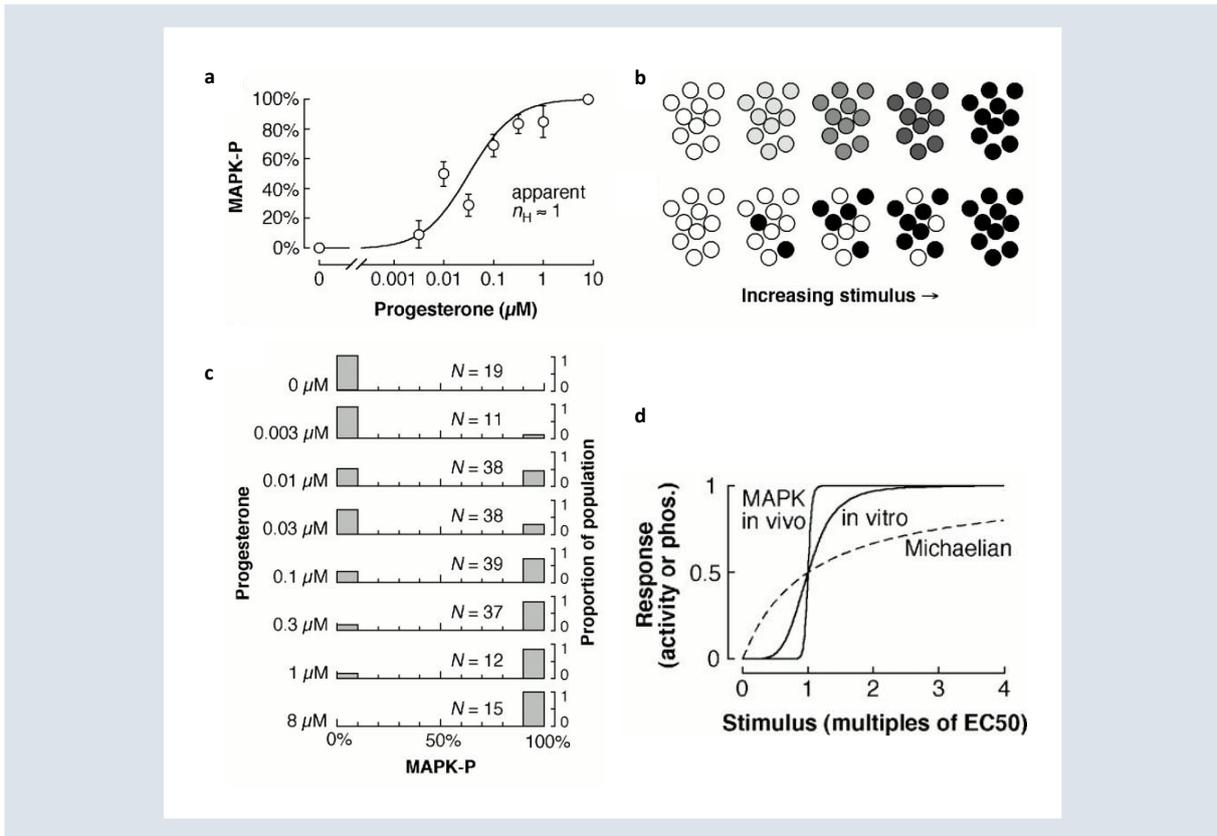
Récemment, une nouvelle morphologie de *C. albicans* a été isolée et a été appelée « gray ». Les colonies « gray » sont lisses et grises, et présentent un profil transcriptionnel différent de ceux des levures « white » ou « opaque » (Tao et al., 2014). Ce phénotype ne nécessite pas la présence de WOR1. Il existe cependant une connexion entre le système white-opaque et celui contrôlant la morphologie « gray » puisque le double mutant *wor1 efg1* n'est pas capable d'adopter l'état « gray ».

#### b. Boucles d'activation dans les œufs de xénope

L'amphibien *Xenopus laevis* est un modèle de laboratoire qui a été particulièrement utilisé pour étudier le cycle cellulaire et le développement embryonnaire. En effet, de par leur taille (diamètre variant de 1,1 à 1,3 mm), les oocytes peuvent être étudiés individuellement, ce qui a permis de mettre en évidence les voies de régulation impliquées dans leur maturation. Au cours de leur développement, les oocytes sont arrêtés à un état similaire à la phase G2 du cycle cellulaire. Pour lever cette pause, les cellules doivent être en contact avec la progestérone sécrétée par les cellules folliculaires voisines. En réponse à cette hormone, plusieurs voies de signalisation sont activées.

L'une de ces voies, est la cascade MAPK p42. Elle se compose de la MAPKKK Mos, la MAPKK Mek-1 et la MAPK p42 ou Erk2. Ainsi, la progestérone provoque l'accumulation de Mos qui phosphoryle et active Mek-1. À son tour, cette dernière, une fois activée, phosphoryle et active p42 qui induit l'activation du complexe Cdc2-cycline B. Ce complexe Cdc2-cycline B est à l'origine de la décomposition de l'enveloppe nucléaire ou « germinal vesicle breakdown » ainsi que de la reprise de la méiose jusqu'en métaphase II. Un défaut dans l'accumulation de Mos (Sagata et al., 1988) ou dans l'activation de Mek-1 (Kosako et al., 1994) ou p42 (Gotoh et al., 1995) inhibe l'activation de Cdc2 et donc la maturation par la progestérone. En revanche, l'injection dans les oocytes de Mos non-dégradable (Yew et al., 1992) ou l'activation constitutive de Mek-1 (Gotoh et al., 1995; Huang et al., 1995) ou de p42 (Haccard et al., 1995) provoque une activation de Cdc2 et une maturation des cellules en l'absence de progestérone.

Le processus de maturation est un système de type « tout ou rien » : les oocytes se présentent seulement sous deux états, immatures (phase G2) ou matures (métaphase II), et une fois le phénomène de maturation déclenchée, il n'y a pas de retour possible à l'état immature. Ferrell et Machleder ont étudié la réponse des oocytes face à un gradient de stimulus (Ferrell and Machleder, 1998). Pour ce faire, ils ont soumis les cellules à une concentration croissante de progestérone et ont observé une réponse graduelle de la part de la population d'oocytes, similaire à la réaction d'une enzyme michaelienne. En effet, suite à un stimulus, une enzyme michaelienne est immédiatement activée et son activation s'amplifie avec l'augmentation du stimulus (**Figure 15a**). Cependant, en analysant individuellement les oocytes, les auteurs ont montré que la concentration en p42 phosphorylé était soit très élevée (>90%), soit quasi nulle (<10%) (**Figure 15bc**). Ainsi, aucune quantité intermédiaire de p42 phosphorylé n'a été mesurée. Ce profil d'activation est caractéristique des enzymes ultrasensibles (**Figure 15d**). Ces enzymes ne répondent pas à un faible stimulus, mais lorsque ce dernier est suffisant, leur niveau d'activation augmente très rapidement. Le caractère ultrasensible d'une enzyme est dû à sa coopérativité reflétée par le coefficient de Hill. Ce coefficient de Hill est égal à 1 pour les enzymes michaelienne, ce qui signifie que le substrat se fixe aux différents sites actifs de l'enzyme de façon indépendante. Un coefficient de Hill supérieur à 1 traduit une ultrasensibilité de l'enzyme : la fixation du ligand est coopérative c'est-à-dire que la liaison d'un ligand facilite la fixation du ligand sur les autres sites actifs de l'enzyme. Par exemple, le coefficient de Hill pour la fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine est de 2,8. Ici, le coefficient de Hill pour la phosphorylation de p42 est estimé à 42 *in vivo*. Le système MAPK p42 permet donc de traduire un stimulus graduel en réponse de type « tout ou rien ». Par ailleurs, les auteurs ont démontré que cette réponse ultrasensible était due à une boucle de rétrocontrôle positive de la cascade MAPK.



**Figure 15 : L’activation des oocytes de xénopes correspond à la réaction d’une enzyme ultrasensible.** En augmentant le stimulus (*i.e.* la progestérone), on observe une réaction de type michaelienne (a). Cela peut être dû à une augmentation graduelle de la réponse de chacune des cellules, ou à l’activation complète de certains œufs dans la population (b). L’analyse des œufs de façon individuelle a montré qu’ils se présentaient sous deux formes : inactivés ou activés (c). La MAPK p42 est une enzyme ultrasensible (d). Modifiée d’après (Ferrell and Machleder, 1998).

La deuxième voie de signalisation activée lors de la maturation des oocytes est la cascade Jun N-terminal Kinases (JNK) (Bagowski et al., 2001). Cette voie est constituée d’une JNK kinase qui phosphoryle et active une MAP kinase kinase, qui elle-même phosphoryle et active une JNK. Elle possède la particularité de rester constitutivement active jusqu’à l’étape de gastrulation. En outre, la voie JNK peut être activée dans les oocytes immatures en appliquant un stress hyperosmotique aux cellules telles que le sorbitol. Tout comme la cascade MAPK p42, la voie MAPK JNK présente une réaction de type michaelienne en réponse à des concentrations croissantes de sorbitol sur une population d’oocytes. Mais, individuellement, les cellules répondent de façon binaire. Cette réaction, également ultrasensible, présente un coefficient de Hill de 20.

Une réaction ultrasensible peut être de deux types : monostable ou bistable. Dans un système ultrasensible monostable, la réponse est activée suite à un stimulus mais ce dernier doit être continu pour que la réponse soit maintenue. Lors de la diminution du stimulus, le système revient immédiatement à

un état « éteint », identique à celui ayant précédé le stimulus. Au contraire, dans un système ultrasensible bistable, la réponse reste activée après l'arrêt du stimulus. Il existe différents degrés d'hystérésis qui maintiennent le système actif plus ou moins longtemps après la réduction du stimulus. Si cette hystérésis est suffisamment robuste, le système peut être constitutivement actif bien après la disparition du stimulus. Pour caractériser la voie ultrasensible JNK, Bagowski et Ferrell ont activé cette cascade dans des oocytes immatures *via* du sorbitol (Bagowski and Ferrell, 2001). Une fois la voie pleinement active, ils ont retiré toute trace de la solution hyperosmotique. La grande majorité des oocytes (70%) présentent une voie JNK active jusqu'à 16h après avoir supprimé le sorbitol. La cascade JNK est donc un système ultrasensible bistable. De surcroît, les auteurs ont montré par transfert de cytoplasme que l'activation de cette voie est autocatalytique. En effet, la voie JNK est activée dans un oocyte immature après injection de cytoplasme provenant d'un oocyte activé par sorbitol. Cet état d'activation peut être transmis à un troisième oocyte à partir du cytoplasme du deuxième, et ce, malgré un effet de dilution. Les auteurs ont ainsi mis en évidence la présence d'un facteur nommé JPF (JNK activation-promoting factor) produit lors de l'activation de la cascade JNK, et capable de favoriser sa propre activation ou production.

La formation du complexe Cdc2-cycline B lors de la maturation des oocytes est également un système bistable caractérisé par une réponse de type « tout ou rien ». Ainsi, les étapes précoces de l'embryogénèse sont dirigées par une association de cascades de transduction de signaux interconnectées résultant en une réponse de type « tout ou rien ».

Les réseaux de régulation impliquant l'activation de voies protéiques sont des phénomènes répandus. Ils permettent notamment par la présence de boucles d'auto-activation, de maintenir des états relativement stables. Ce sont généralement des mécanismes complexes qui impliquent des voies de régulation souvent engagées dans divers processus. Ils sont cependant peu étudiés malgré leur intérêt dans la compréhension des états multi-stables présentés par certains organismes.

### III. *PODOSPORA ANSERINA*, UN MODELE D'ETUDE DES PHENOMENES EPIGENETIQUES

Comme nous l'avons vu précédemment, *P. anserina* est un organisme modèle qui permet d'étudier facilement les systèmes génétiques et épigénétiques à l'origine notamment d'instabilités phénotypiques.

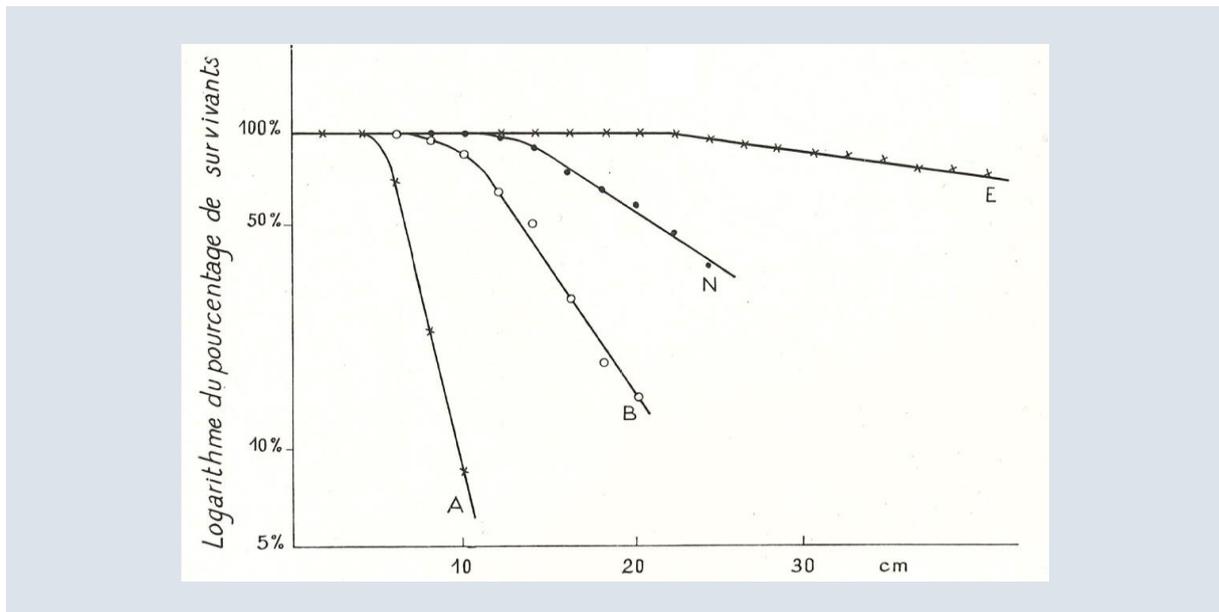
#### 1. Les phénomènes épigénétiques connus chez *Podospora anserina*

##### a. La sénescence

*P. anserina*, tout comme de nombreuses espèces, n'est pas un champignon immortel. Même dans les meilleures conditions de culture, il ne se développe pas de façon indéfinie. Après sa germination, ce champignon croît à une vitesse constante sur une certaine période. Puis, sa vitesse de croissance se réduit fortement jusqu'à un arrêt complet du développement. Dans le même temps, les hyphes de la phase de croissance se modifient profondément (Rizet, 1953a): ils sont grêles, plus pigmentés, vacuolisés à leur extrémité, plus sinueux et moins denses, et on peut fréquemment observer l'éclatement de leur paroi sous microscope (Marcou, 1961). Néanmoins, le caractère sénescence des hyphes a peu d'influence sur la capacité de reproduction du champignon. Il est donc toujours possible de croiser un thalle sénescence avec un thalle jeune. Il a ainsi été montré de cette manière que la sénescence se transmettait d'une génération à l'autre par voie sexuelle (Rizet, 1957). Cependant, la ségrégation du caractère sénescence dans les asques ne suit pas les lois de Mendel : elle se fonde sur une hérédité maternelle (Rizet, 1957). Le déterminant de la sénescence est donc cytoplasmique et peut en outre, être contagieux. Les premières expériences de contamination ont été réalisées par Denise Marcou et ont montré qu'un hyphe sénescence était capable de transmettre son caractère à un hyphe jeune (Marcou, 1961). Cette infection a lieu après la formation d'anastomoses entre ces deux hyphes et mélange cytoplasmique sans échange de noyaux.

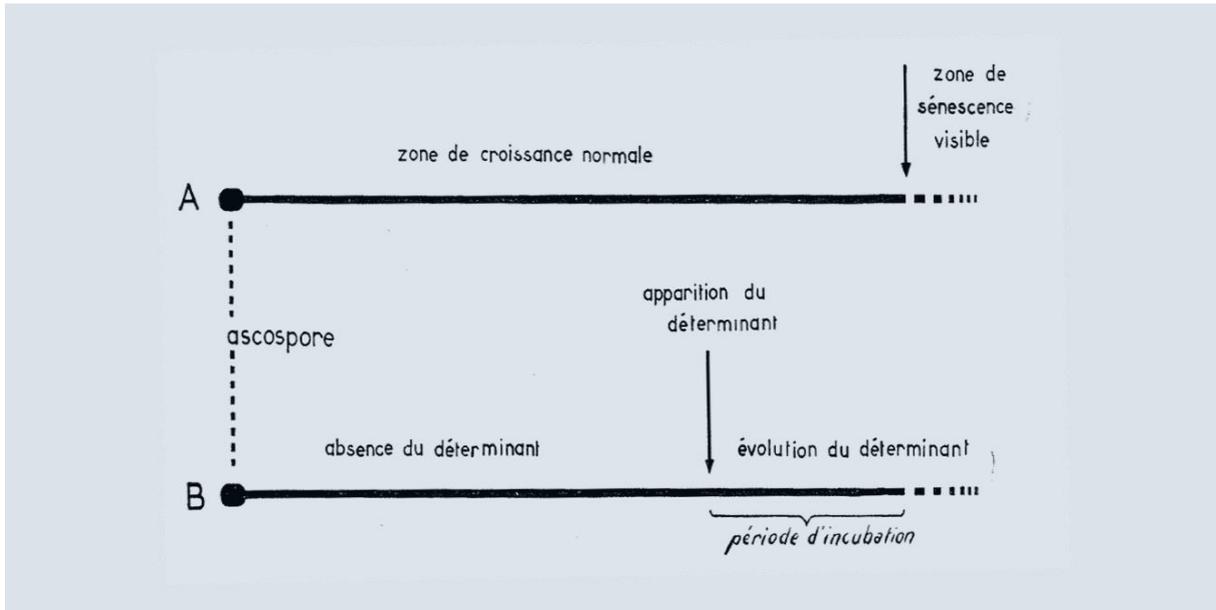
Selon les souches géographiques de *P. anserina* étudiées, on observe un temps variable avant l'apparition des premiers symptômes de la sénescence. Cette période constitue la longévité du champignon. Par ailleurs, en étudiant plusieurs cultures issues d'un même thalle (appelées lignées parallèles), on peut remarquer d'importantes différences de longévité mesurée : c'est la dispersion (phénomène cependant limité). Ces deux caractéristiques dépendent du génotype et du milieu de culture (Rizet, 1953b). La longévité est un caractère qui se maintient de manière fidèle lors de la reproduction sexuée. Ainsi, pour une souche donnée, la longévité moyenne des individus de deux générations différentes ne diffère pas statistiquement. Il en est de même pour la dispersion. Ces deux éléments que sont la longévité et la dispersion peuvent être quantifiés à partir des courbes de longévité (**Figure 16**). En effet, en reportant le logarithme du pourcentage de cultures survivantes en fonction de la distance

parcourue par le mycélium, les courbes obtenues manifestent toujours la même forme générale : un palier parallèle à l'axe des abscisses suivi d'une droite. Le palier reflète le fait qu'aucune culture ne présente de caractère sénescence en début de croissance et sa longueur définit la plus courte longévité individuelle mesurée. Quant à la droite, elle permet d'obtenir la dispersion par la mesure de sa pente. Il existe une forte corrélation entre la longévité et la dispersion. En effet, les souches de *P. anserina* présentant une courte longévité ont toutes une dispersion très faible. En revanche, pour les souches dont la sénescence apparaît après plusieurs mois de culture, la longévité des lignées parallèles est extrêmement variable. Dans ce cas, la dispersion est donc très forte et se traduit sur la courbe de longévité par une droite de faible pente (cas de la souche E sur la **Figure 16**).



**Figure 16 : Courbes de longévité de souches des « races géographiques » A, B, N et E de longévité moyenne croissante. D'après (Marcou, 1961).**

La forme particulière des courbes de longévité ont permis de préciser la nature du déterminant de la sénescence. En effet, il a été montré que le déterminant de la sénescence survenait de façon aléatoire mais que ses symptômes n'apparaissent qu'après un temps d'incubation (Marcou, 1961). Ainsi, le plateau observé sur les courbes de longévité correspond à deux phases : une période de croissance du mycélium en absence de déterminant, suivie d'une période d'incubation après apparition du déterminant. Lorsque ce dernier atteint un certain seuil, la sénescence devient alors visible. Ainsi les phases morphologiques et les phases physiologiques ne sont pas concordantes (**Figure 17**).



**Figure 17 : Schéma représentant les phases successives de l'évolution du mycélium en croissance continue.** A : phases morphologiques (mycélium normal et mycélium sénescant) ; B : phases physiologiques (période correspondant à l'absence du déterminant et période correspondant à l'évolution de ce déterminant). D'après (Marcou, 1961).

Les premières études ont donc montré que le déterminant de la sénescence était de nature cytoplasmique et infectieux, et qu'il apparaissait nécessairement de façon aléatoire. Les études qui s'en sont suivies se sont concentrées sur l'intégrité de la mitochondrie lors du développement de *P. anserina* notamment après que Cummings et ses collaborateurs, ainsi que Stahl et ses collaborateurs, ont mis en évidence la présence de petites molécules d'ADN circulaires (« plasmid-like DNA » puis nommées senDNA) dans le cytoplasme de mycélium sénescant uniquement (Cummings et al., 1978; Stahl et al., 1978). Ces molécules se sont révélées avoir comme origine l'ADN mitochondrial (Jamet-Vierny et al., 1980; Stahl et al., 1980). Plusieurs types de senDNA ont été retrouvés dans différentes cultures indépendantes de mycélium sénescant. Ils sont nommés  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , etc, et représentent chacun des séquences répétées de différentes régions du chromosome mitochondrial. Une corrélation entre présence de ces senDNA et développement de la sénescence a été établie (Sainsard-Chanet et al., 1993). Néanmoins, seul le senDNA  $\alpha$  est présent dans toutes les souches sauvages sénescantes. Il correspond au premier intron (intron  $\alpha$ ) du gène *COXI* codant pour la sous-unité I du cytochrome c oxydase. Cet intron  $\alpha$  est un transposon de classe II capable de se transposer dans le génome mitochondrial. Afin de déterminer si le senDNA  $\alpha$  est le déterminant de la sénescence, un mutant appelé *mid26* dépourvu de cet intron et dont le site d'intégration est modifié, empêchant ainsi l'invasion de l'élément transposable, a été analysé (Begel et al., 1999). Ces différentes mutations n'affectent pas l'activité du cytochrome c oxydase et *mid26* présente une croissance et une fertilité identiques à celles de la souche sauvage. Cette souche *mid26* malgré l'absence de senDNA  $\alpha$  développe tout de même les syndromes caractéristiques d'un

mycélium sénescence avec notamment l'amplification de *senDNA*  $\beta$  et  $\gamma$ . Cependant, elle présente une longévité deux fois plus longue que la souche sauvage (Begel et al., 1999). Le réarrangement du génome mitochondrial observé dans le mycélium en sénescence ne semble donc pas être le déterminant de ce phénomène dégénératif. De plus, il a été montré que la transmission des *senDNA* à des cultures jeunes n'était pas corrélée à une co-transmission du déterminant de la sénescence (Jamet-Vierny et al., 1999). Et enfin, le déterminant de la sénescence ne ségrège pas de la même manière qu'une mutation mitochondriale (Jamet-Vierny et al., 1999). Par conséquent, la production de *senDNA* semble plutôt être une conséquence mais non la cause de la sénescence. La nature du déterminant de la sénescence reste donc encore à déterminer.

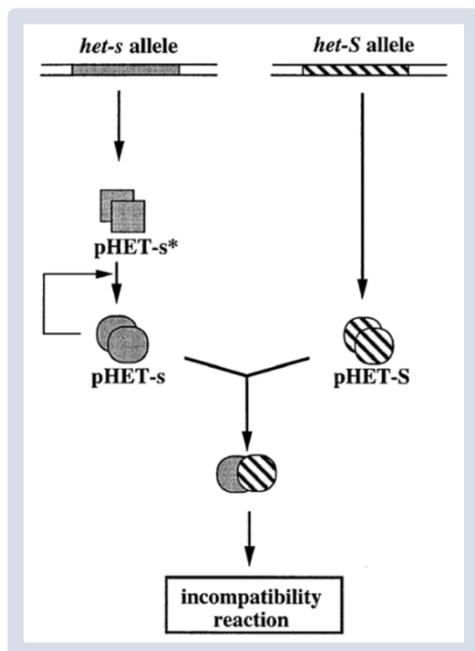
#### b. Le phénomène d'incompatibilité végétative

Outre la sénescence, un phénomène épigénétique associé à l'incompatibilité du système Het-S/s a été rapidement décrit chez *P. anserina* (Rizet and Esser, 1953). Cette réaction a été observée lors de la confrontation entre les souches *S* et *s* (respectivement de phénotypes [Het-S] et [Het-s]). Ce processus inhibe le contact entre les deux partenaires en provoquant la mort des cellules hétérocaryotiques. Le locus responsable de ce phénomène est nommé *het* et *het-S* et *het-s* en sont deux de ses allèles. Il code pour une protéine de 289 acides aminés qui n'est pas essentielle à la viabilité ni au cycle de vie du champignon (Turcq et al., 1991).

Il a été remarqué que les souches de génotypes *het-s* peuvent présenter deux phénotypes : [Het-s] et [Het-s\*]. Ce dernier est un phénotype stable et neutre, c'est-à-dire qu'il se maintient lors des repiquages et ne présente pas d'incompatibilité végétative vis-à-vis de mycélium [Het-S]. Cependant, il existe une transition spontanée qui modifie [Het-s\*] en [Het-s] à une fréquence de  $10^{-7}$  par noyau environ. En outre, cette transition se produit invariablement lorsqu'il y a mélange de cytoplasmes [Het-s\*] et [Het-s], *via* notamment leurs anastomoses. Le phénotype [Het-s] est dominant sur [Het-s\*] et se propage sans échange de noyaux (Beisson-Schecroun, 1962). De façon intéressante, les croisements entre des souches [Het-s] et [Het-s\*] engendrent uniquement une descendance [Het-s] lorsque la souche [Het-s] joue le rôle de femelle, et majoritairement une descendance [Het-s\*] quand la souche [Het-s\*] joue le partenaire femelle (Beisson-Schecroun, 1962). L'hypothèse selon laquelle la transmission de l'allèle *het* se ferait par la mitochondrie a été écartée puisque *het-s* et une mutation mitochondriale ne ségrègent pas de la même manière dans les spores hétérocaryotiques (Belcour and Begel, 1977). Par la suite, les études se sont donc concentrées sur les caractéristiques des protéines codées par les allèles du locus *het*.

L'absence de réaction d'incompatibilité observée dans les souches [Het-s\*] ne résulte pas d'un défaut d'expression de l'allèle *het-s*. En effet, le niveau d'expression ainsi que la quantité et la taille des ARNm et protéines (nommées pHet-s et pHet-s\*) produits ne présentent pas de différences significatives entre les souches [Het-s] et [Het-s\*] (Coustou et al., 1997). Néanmoins, les deux polypeptides

synthétisés ne possèdent pas exactement la même masse moléculaire (une différence de 500 à 1000 Da est observée en SDS/PAGE). Ainsi il est supposé que la transition [Het-s\*] vers [Het-s] serait due à la modification de pHet-s\* en pHet-s (**Figure 18**). Et effectivement, il a été montré *in vitro* et *in vivo*, que la pHet-s s'agrégait en fibres amyloïdes (Coustou-Linares et al., 2001; Dos Reis et al., 2002) et que celles-ci avaient la propriété d'infecter la souche [Het-s\*] (Maddelein et al., 2002). Par ailleurs, la protéine pHet-s est plus résistante à la protéinase K. L'ensemble de ces données montre que pHet-s possède toutes les caractéristiques des protéines de type prions.



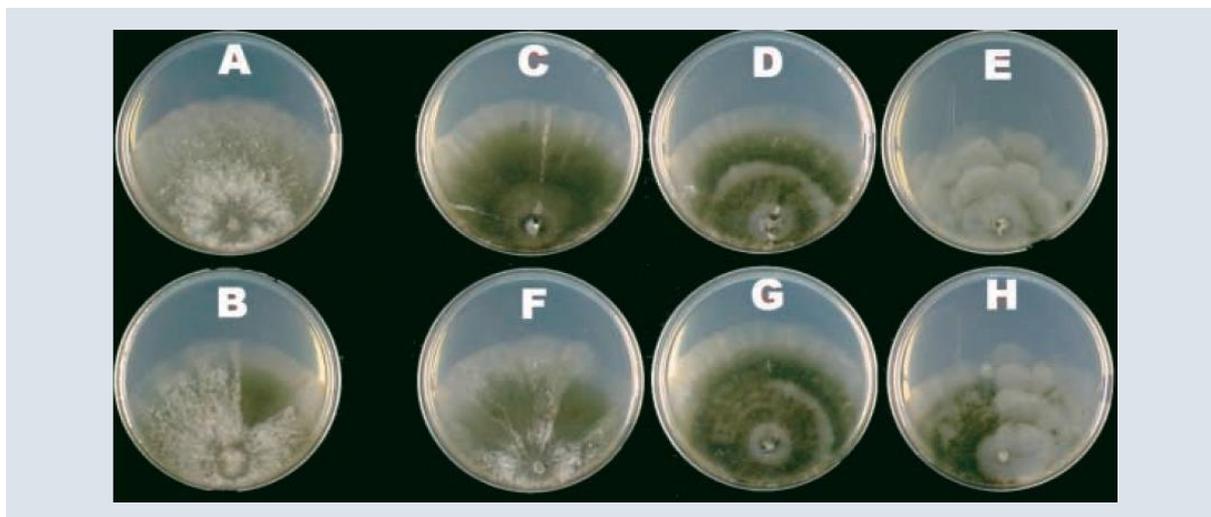
**Figure 18 : Relation entre les protéines issues des allèles *het-s* et *het-S*.** D'après (Coustou et al., 1997).

Le système Het-S/s, et notamment la structure moléculaire de pHets et pHets\*, a fait l'objet d'études complémentaires qui ont permis de confirmer ce modèle (Daskalov et al., 2014, 2015; Gendoo and Harrison, 2011; Mathur et al., 2012; Mizuno et al., 2011; Wan and Stubbs, 2014; Wan et al., 2012). Il reste l'un des prions le mieux connu et décrit à ce jour.

### c. La dégénérescence Wavy

Lors de l'étude la dégénérescence Crippled Growth (voir plus bas), il a été isolé un mutant particulier nommé  $IDC^{452}$  (Lalucque and Silar, 2004). Ce dernier présente un phénotype multi-stable appelé Wavy. En effet, dans des conditions similaires, la souche  $IDC^{452}$  peut présenter un mycélium normal ou un mycélium altéré par différents types de secteurs (**Figure 19**). Ces secteurs, qui se caractérisent tous par une altération de la pigmentation, l'absence d'hyphes aérien et une stérilité, peuvent se classer en trois catégories : « vert plat » forme la moins altérée, « zoné » et « chou-fleur » forme la plus altérée (respectivement C, D et E sur la **Figure 19**). Par ailleurs, l'apparition et le type de secteur dépend de la température. A 27°C, la souche  $IDC^{452}$  développe un phénotype Wavy à une fréquence de 5%, alors que cette fréquence augmente jusqu'à 20% à 18°C. Et le repiquage d'un secteur

[vert plat] incubé à cette même température induit généralement le développement d'un secteur [chou-fleur]. Au contraire, un secteur [chou-fleur] incubé à 27°C donne fréquemment un secteur [vert plat]. De plus, cette souche *IDC<sup>452</sup>* souffre d'une thermosensibilité à 37°C et d'un défaut de croissance sur milieu de germination.



**Figure 19 : Souche *IDC<sup>452</sup>* sous forme normale (A) et présentant un secteur altéré (B). Ce secteur altéré, une fois repiqué, présente divers phénotypes (C à H). D'après (Lalucque and Silar, 2004).**

Il a été montré que la souche *IDC<sup>452</sup>* était mutée dans le gène *PaTrk1* codant pour le transporteur de potassium PaTrk1 (Lalucque and Silar, 2004). Chez les champignons, les transporteurs de type Trk permettent l'import de potassium dans la cellule *via* le potentiel de membrane formé par l'ATPase Pma1 (Gaber et al., 1988). Par ailleurs, la délétion de ce gène engendre un phénotype identique à celui du mutant *IDC<sup>452</sup>*. Un autre gène codant pour ce même type de transporteur a été identifié chez *P. anserina* et nommé *PaTrk2*. La délétion de ce gène est également à l'origine du développement de Wavy, mais avec une plus faible pénétrance. Par la suite, les travaux de Pierre Grognet ont déterminé la présence dans le génome de *P. anserina* du gène PaHak1 pour l'import du potassium (outre les gènes PaTrk1 et PaTrk2) (Grognet, 2013). Pour l'export du potassium, cinq gènes sont impliqués : deux gènes PaTok et trois gènes codant des sous unités régulatrices nommées PaVgb. Enfin, deux autres gènes, PaAcu et PaPat, codent pour des ATPases capables de transporter dans la cellule du potassium et du sodium.

L'apparition du phénomène Wavy est particulièrement dépendant des conditions de culture et notamment de la composition du milieu gélosé utilisé. Ainsi, le développement de cet état multi-stable a été perdu lors de modifications dans l'environnement du laboratoire. C'est pourquoi la relation entre un défaut dans le transport de potassium et la formation d'états multi-stables reste encore inexpliquée.

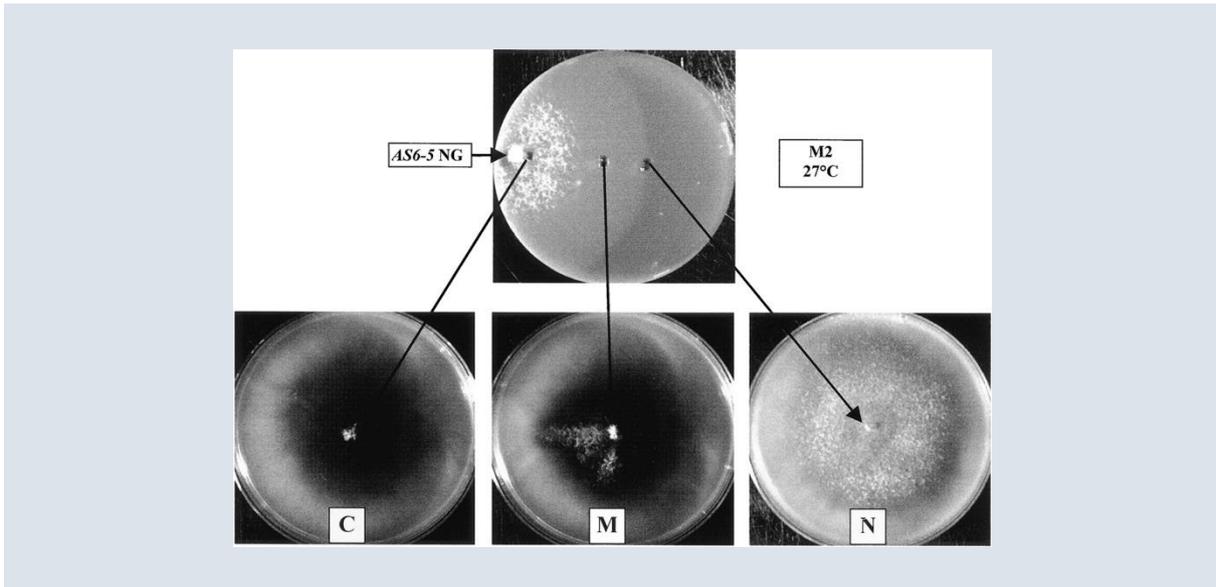
## 2. Mon projet de thèse : la dégénérescence Crippled Growth

### a. Découverte et caractérisation

En 1999, il a été découvert que la souche *AS6-5* de *P. anserina* pouvait se présenter sous deux formes malgré des conditions de culture identiques (Silar et al., 1999). Dans près de 10% des cas et dans des conditions de croissance standard (c'est-à-dire à 27°C et sur milieu classique de longévité M2), cette souche présente des secteurs. Ces derniers se caractérisent par une croissance retardée, une pigmentation plus intense et une stérilité femelle (**Figure 20**). Cette altération est appelée Crippled Growth (CG) et se maintient au cours des repiquages, révélant une transmission de ce phénotype lors de la mitose. De manière remarquable, ce phénotype est réversible : les cultures sous forme CG peuvent à nouveau présenter un phénotype normal (Normal Growth ou NG) après exposition à un stress. Ainsi il est possible d'obtenir des cultures normales à partir de thalles CG en incubant *P. anserina* à haute température (37°C), en le cultivant sur M2 complété de saccharose, de paromomycine, de kasugamycine ou sur milieu de germination, après conservation pendant au moins trois mois à 4°C, en l'exposant à une irradiation aux UV (100 J.m<sup>-2</sup>) ou encore en fragmentant le mycélium. Cependant, cette réversion est partielle et temporaire. Après culture sur milieu de germination d'une souche *AS6-5*, des implants sont prélevés à différents stades du thalle (en phase de croissance ou en phase stationnaire) et déposés sur M2 (**Figure 21**). On observe alors que le mycélium régénéré à partir de l'implant prélevé en phase de croissance est normal, tandis que celui prélevé en phase stationnaire engendre un mycélium mosaïque avec des secteurs NG et CG. La réversion est donc dans ce cas temporaire et c'est le passage en phase stationnaire qui provoque l'apparition de CG. Le processus d'apparition est également réalisable à partir de la souche sauvage et une culture sous forme NG peut évoluer en CG sur milieu M2 complété avec de l'extrait de levures (M2+YE) ou de l'apocynine (Haedens et al., 2005). De cette manière, il a été mis en évidence que la souche sauvage *S* de référence de *P. anserina* est donc également bistable (c'est-à-dire qu'elle présente les deux morphologies, NG et CG) sur M2+YE ou M2+apocynine.



**Figure 20 : Un mutant présentant un secteur CG sur milieu standard M2.**



**Figure 21 : CG est provoqué par le passage en phase stationnaire.** La souche *AS6-5 NG* a été mise en culture sur M2 pendant 6 jours. Des implants ont été prélevés au front de croissance, à 1,5cm du front (correspondant à 2 jours en phase stationnaire) et à 4 cm du front (correspondant à 6 jours en phase stationnaire), et ont été repiqués sur M2. D’après (Silar et al., 1999).

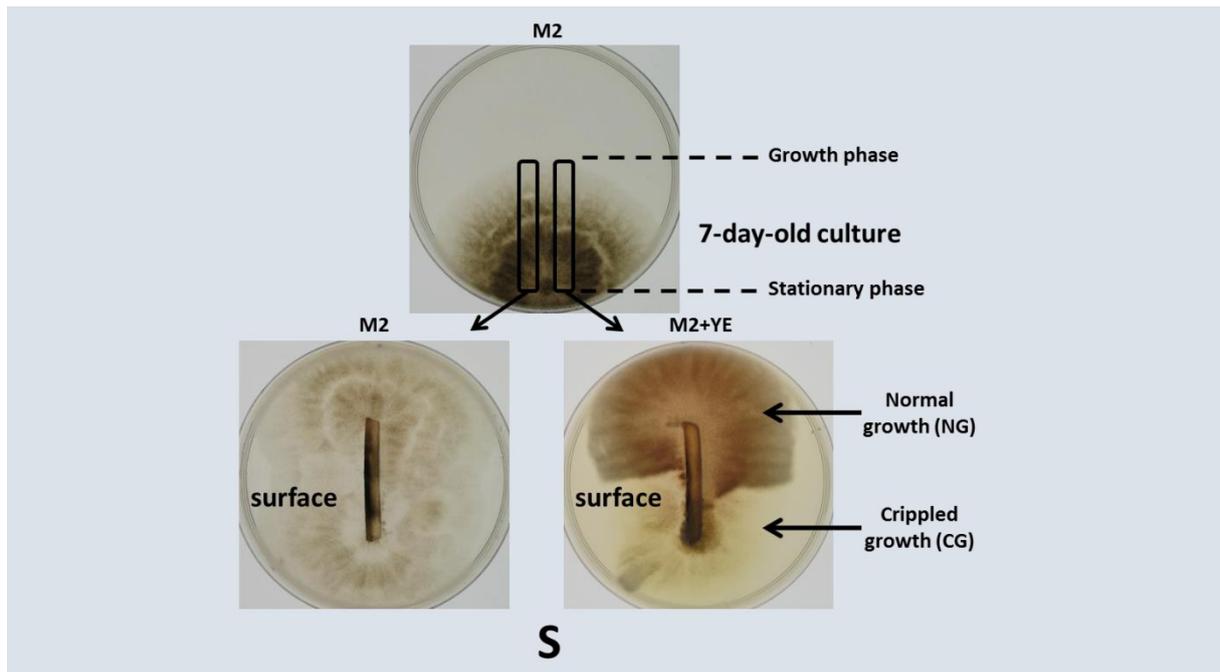
b. Crippled Growth et fidélité de traduction

La souche *AS6-5* possède une mutation dans le gène codant pour une protéine ribosomale. Cette mutation engendre une augmentation de la fidélité de traduction par inhibition de la lecture du codon stop UGA (Coppin-Raynal et al., 1988). Afin de déterminer si la fidélité de la traduction était impliquée dans l’apparition de CG, diverses souches disponibles de *P. anserina* possédant des allèles anti-suppresseurs (augmentant la fidélité de traduction) ou des allèles suppresseurs (diminuant la fidélité de traduction) ont été analysées en repiquant sur M2 de larges implants à partir d’un thalle cultivé à 27°C sur M2 (Silar et al., 1999). Ainsi, les souches portant l’un des 26 allèles anti-suppresseurs connus (répartis sur 7 gènes différents : *AS2*, *AS3*, *AS4*, *AS6*, *AS7*, *AS9* et *su12*) présentent des secteurs altérés similaires à CG. Au contraire, les souches portant l’un des 15 allèles suppresseurs (situés sur 9 gènes différents : *su1*, *su2*, *su3*, *su4*, *su7*, *su8*, *su11*, *su12* et *su15*) ne développent jamais CG. Les allèles anti-suppresseurs promeuvent donc le développement de CG. En outre, les doubles mutants pourvus de deux allèles anti-suppresseurs produisent un fort CG, plus stable que celui développé par la souche *AS6-5* ou par les simples mutants. De plus, l’association d’un allèle suppresseur omnipotent à un allèle anti-suppresseur dans les souches *su12-1C1 AS6-5* et *su12-1C1 AS3-1*, permet de réduire la fidélité de traduction au point que ces doubles mutants ne développent jamais CG après leur passage en phase stationnaire. Les souches *su1-1 AS6-5* et *su1-1 AS4-44* quant à elles, présentent un phénotype CG moins

prononcé que dans les simples mutants *AS6-5* et *AS4-44*. Par conséquent, le développement de CG est favorisé par une augmentation de la fidélité de traduction.

c. Crippled Growth est causé par un élément C

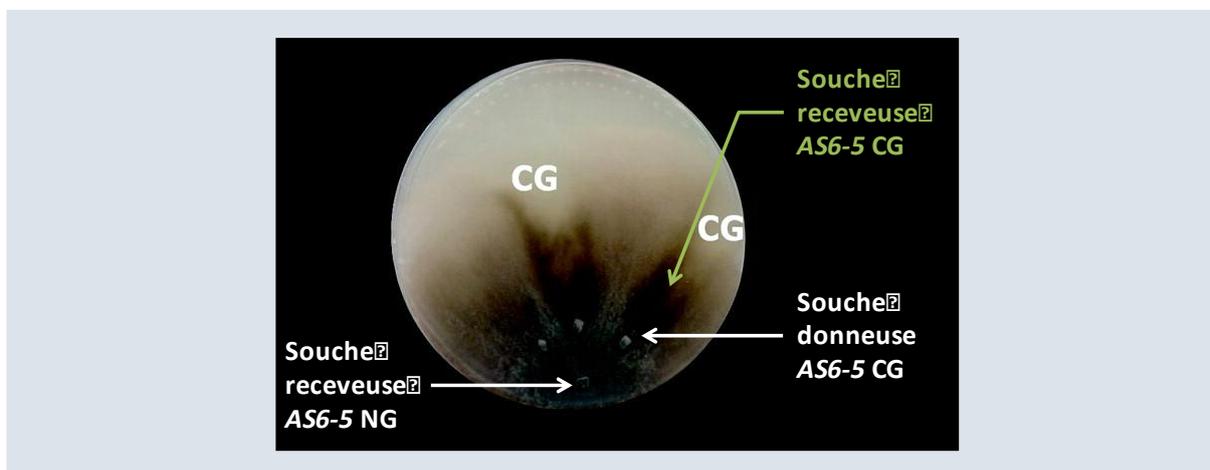
L'apparition de CG sous forme de secteurs et la réversibilité du phénomène suggèrent qu'aucune modification du génome n'est à l'origine de la dégénérescence. En particulier, aucun changement au niveau de l'ADN mitochondrial n'a été détecté (Silar et al., 1999). Il a également été vu précédemment que le passage en phase stationnaire provoquait l'apparition de CG. Le « test en barre » permet de mettre en évidence plus clairement ce processus. A partir d'une souche *S* cultivée pendant 5 jours, un rayon du thalle est découpé et déposé sur milieu M2+YE. A la reprise de croissance, deux morphologies du mycélium sont facilement identifiables. Le phénotype CG est observé au niveau du mycélium issu de cellules en phase stationnaire, tandis qu'un phénotype NG se développe au niveau du mycélium issu de cellules en phase de croissance (**Figure 22**). Par conséquent, le déterminant de CG, appelé élément C, est produit durant la phase stationnaire dans une culture *S* ou *AS6-5* NG.



**Figure 22 : Test en barre de la souche *S* permettant de mettre en évidence l'induction de CG par la phase stationnaire sur M2+YE.**

Pour caractériser la nature de l'élément C, des expériences d'infection ont été réalisées. Pour cela, des implants d'une souche donneuse CG sont disposés à 1 mm du front de croissance d'une souche receveuse NG s'étant développée pendant 3 jours. Après quelques jours d'incubation, des anastomoses se sont formées entre souches donneuses et receveuses, et des secteurs CG apparaissent (**Figure 23**).

Les types sexuels des souches étant différentes, il est aisé de déterminer l'origine des noyaux. Ainsi, l'analyse du type sexuel du mycélium CG révèle uniquement la présence de noyaux de la souche receveuse. Cette dernière est donc devenue CG après échange de cytoplasme avec la souche donneuse CG. En conséquence, l'élément *C* est cytoplasmique et infectieux.



**Figure 23 : Test d'infection à partir d'une souche AS6-5 CG donneuse sur une souche AS6-5 NG receveuse.** Modifiée d'après (Kicka and Silar, 2004).

Ces expériences de contamination ont permis de confirmer la présence de l'élément *C* dans l'ensemble du thalle des souches CG mais également dans la phase stationnaire des souches *S* et AS6-5 NG (**Tableau 1**).

Donor	Phase	Success/attempt
AS6-5 CG	Growth	7/12
	Stationary	9/12
AS6-5 NG	Growth	0/21
	Stationary	6/12
AS4-44 CG	Growth	7/12
	Stationary	5/12
AS4-44 NG	Growth	0/12
	Stationary	7/12
<i>su12-1C1</i> NG	Growth	0/15
	Stationary	4/12
WT NG	Growth	0/30
	Stationary	12/30

**Tableau 1 : Transmission de CG de divers donneurs à la souche receveuse AS6-5 NG.** D'après (Silar et al., 1999).

Enfin, la transmission de l'élément *C* à travers la méiose a été testée. Pour cela, la descendance issue des croisements entre souches portant chacune un allèle anti-suppresseur a été analysée. Du fait

que le milieu de germination G est également un milieu permettant de curer l'élément C, une attention particulière a été donnée pour transférer au plus tôt les spores germées sur M2. Toutes les ascospores ainsi obtenues (et portant donc au moins un allèle anti-suppresseur) se développent normalement et ne présentent CG qu'après passage en phase stationnaire. Par conséquent, l'élément C n'est pas transmis lors de la méiose, et ce malgré le fait que les cellules parentales impliquées dans le développement sexuel produisent l'élément C.

d. Les mutants Crippled Growth

Pour identifier des acteurs régulant CG, des expériences de génétique classique ont été menées (Haedens et al., 2005). Elles ont permis d'isoler deux types de mutants : les mutants *IDC* (impaired in the development of CG) et les mutants *PDC* (promote the development of CG) (**Tableau 2**). Les premiers résultent d'une mutagenèse aléatoire par rayons UV sur des protoplastes issus des souches *AS6-5* ou *AS4-44*. Après l'évènement de mutagenèse, les clones survivants sont repiqués sur M2 et incubés pendant 10 jours pour permettre la mise en place de la phase stationnaire. Puis, les clones sont repiqués sur M2 complété avec de l'acétate d'ammonium. Les mutants incapables de développer CG sur ce milieu sont nommés *IDC*. De la même manière, pour obtenir des mutants *PDC*, des protoplastes issus de la souche *mid26* (souche comportant une mutation dans son génome mitochondrial lui permettant d'avoir une longévité deux fois plus longue que la souche sauvage) sont soumis aux UV. Les clones survivants sont repiqués sur M2 et incubés pendant 4 jours, avant un nouveau repiquage sur M2. Plusieurs mutants présentent alors CG à divers degrés sur M2 et sont nommés *PDC*.

Ainsi, les mutants *IDC* sont incapables de présenter un phénotype CG quel que soit le milieu utilisé, tandis que les mutants *PDC* sont bistables sur M2. Les mutants *IDC* isolés ont été divisés en trois catégories : la première comprend des mutants de la fidélité de traduction, tandis que la seconde regroupe divers mutants qui, même s'ils ne présentent pas CG, produisent toujours l'élément C. Le troisième quant à lui regroupe les mutants présentant un phénotype distinctif. En effet, ces derniers sont tous roses (absence de pigmentation), dépourvus d'hyphes aériens, et incapables de se reproduire sexuellement. Ces souches *IDC* ont été particulièrement étudiées et ont permis d'identifier de nombreux acteurs régulant positivement CG.

	M2	M2+YE M2+apocynine
<i>S</i>	NG	NG / CG
<i>IDC</i>	NG	NG
<i>PDC / AS6-5 / AS4-44</i>	NG / CG	NG / CG

**Tableau 2 : Stabilité des souches de *P. anserina* sur milieu standard M2 et sur différents milieux.**

e. Les acteurs de la voie CG

- La voie MAPK PaMpk1

Suite aux expériences de mutagenèse aléatoire, trois mutants ont été identifiés : *IDC<sup>118</sup>*, *IDC<sup>172</sup>* et *IDC<sup>507</sup>* (Kicka and Silar, 2004). Les souches *IDC<sup>118</sup>* et *IDC<sup>172</sup>* ont été obtenues à partir d'*AS6-5* alors qu'*IDC<sup>507</sup>* a été isolé à partir de la souche *AS4-44*. De ce fait, les premières souches construites sont les doubles mutants *AS6-5 IDC<sup>118</sup>*, *AS6-5 IDC<sup>172</sup>* et *AS4-44 IDC<sup>507</sup>*. Ces mutants sont donc incapables de développer CG et présentent un phénotype rose, plat et stérile. Ce défaut de reproduction est dû à l'absence de différenciation des organes reproducteurs femelles (périthèces) matures, malgré la formation d'ascogones. Les gamètes mâles sont en revanche identiques à ceux de la souche sauvage. L'ensemble de ces caractéristiques phénotypiques permettent notamment de mener des analyses génétiques. Ainsi en croisant ces mutants avec la souche sauvage *S*, les simples mutants *IDC<sup>118</sup>*, *IDC<sup>172</sup>* et *IDC<sup>507</sup>* ont été isolés et présentent un phénotype identique à celui des doubles mutants. De plus, il a été montré que le phénotype de chaque mutant était causé par une unique mutation, et que ces trois souches possèdent une mutation au sein du même gène.

L'absence de phénotype CG dans ces souches peut avoir plusieurs origines : la diminution du niveau de fidélité de traduction, l'incapacité à produire l'élément *C*, ou la production d'un inhibiteur de l'élément *C*. La première hypothèse a été écartée, les simples mutants ayant un niveau de fidélité de la traduction similaire à celui de la souche sauvage. De ce fait, la production de l'élément *C* durant la phase stationnaire a été analysée par des expériences d'infection. Ces dernières révèlent que lorsque *AS6-5 IDC<sup>118</sup>*, *AS6-5 IDC<sup>172</sup>* et *AS4-44 IDC<sup>507</sup>* sont utilisées comme souches donneuses, aucun secteur CG n'apparaît chez les souches receveuses. Ces mutants ne produisent donc pas l'élément *C*. Par ailleurs, lorsque ces doubles mutants jouent le rôle de souches receveuses, aucun secteur CG n'est observé. Par conséquent, ces mutants ne sont pas capables de propager l'élément *C*. En résumé, le gène muté dans les souches est nécessaire pour la production et la diffusion du déterminant de CG.

Le gène muté dans ces trois souches, *IDC<sup>118</sup>*, *IDC<sup>172</sup>* et *IDC<sup>507</sup>*, a été identifié *via* l'utilisation d'une banque génomique. Il s'agit du gène codant pour une MAP kinase kinase kinase (MAPKKK) appelée PaASK1. Cette kinase fait partie de la famille MEK et se révèle orthologue de Bck1 chez *S. cerevisiae*. La protéine Bck1 appartient à la voie contenant la protéine kinase kinase Mkk1-Mkk2 et la protéine kinase Slt2 (Levin, 2011) et apparaît responsable de l'intégrité de la paroi cellulaire. L'identification de PaASK1 est confirmée par la surexpression de ce gène dans la souche *S* qui engendre un mutant développant CG dans des conditions de culture standards. Au vu de ces premiers résultats, il est raisonnable de penser que l'ensemble de cette voie MAPK est impliqué dans la régulation de CG. Des études se sont donc portées sur la MAP kinase kinase (MAPKK) PaMKK1 et la MAP kinase (MAPK) PaMpk1 situées en aval de PaASK1 dans la cascade de phosphorylation (Kicka et al., 2006). Ainsi, les mutants *IDC<sup>404</sup>*, possédant une mutation non-sens dans le gène *PaMKK1*, et  $\Delta PaMpk1$  présentent un phénotype identique aux mutants *PaASK1* : ils sont roses, dépourvus d'hyphes aériens, inaptes à accomplir un cycle de reproduction sexuée et incapables de produire ni de diffuser l'élément *C*. Et de manière identique, la surexpression de PaMpk1 dans la souche sauvage induit le développement d'un phénotype CG.

Il a été précédemment montré que l'élément *C* était présent dans la phase stationnaire de la souche *S* et absent des hyphes en croissance. Par conséquent, on peut supposer que la voie MAPK PaMpk1 peut se présenter sous deux formes, active ou inactive, selon l'âge et le niveau de différenciation de la cellule. Couramment, l'activation des kinases s'effectue par phosphorylation. L'état de phosphorylation de PaMpk1 a donc été analysé dans les deux conditions, NG et CG. De façon surprenante, PaMpk1 semble phosphorylée de la même manière dans les deux cas. Ainsi, l'activation de cette cascade ne s'effectue pas par la phosphorylation. En revanche, en étudiant *in vivo* PaMpk1 associée à la GFP, une corrélation a été mise en évidence entre la localisation de la protéine chimère et l'apparition de CG. Dans la souche sauvage et les mutants sous forme NG, il semblerait que PaMpk1 soit principalement présente dans le cytoplasme des hyphes en croissance, ainsi que dans le noyau (~ 20% des noyaux) des cellules de la phase stationnaire (Kicka et al., 2006). Cette localisation nucléaire n'est pas visible chez les mutants *IDC<sup>118</sup>* et *IDC<sup>404</sup>*. Au contraire, la souche *AS6-5* sous forme CG présente PaMpk1 dans 80% de ses noyaux (que ce soit en phase stationnaire ou en phase de croissance). La localisation nucléaire de PaMpk1 pourrait donc être le marqueur de l'activation de la voie MAPK PaMpk1.

Cette première analyse des mutants *IDC* place donc la cascade MAPK PaMpk1 au cœur du modèle expliquant l'apparition de CG, les trois kinases étant nécessaires dans la production et la diffusion de l'élément *C*. Par ailleurs, la localisation nucléaire de PaMpk1 indiquerait une activation de la voie. Cette activation a lieu durant l'entrée en phase stationnaire de la souche sauvage et conduit à une différenciation des cellules qui inclue la production d'hyphes aériens, la pigmentation du mycélium et la capacité à effectuer le cycle de reproduction sexuée. Pour maintenir l'état stationnaire, on peut supposer que la voie PaMpk1 se comporte comme la voie MAPK JNK activée dans les oocytes de

xénope. De ce fait, il y aurait autoactivation de la cascade, et son autoactivation inappropriée serait ainsi à l'origine de l'altération CG.

- La voie MAPK PaMpk2

Par l'analyse du génome de *P. anserina*, une autre voie MAPK composée de la MAPKKK PaTLK2, la MAPKK PaMPKK2 et la MAPK PaMpk2, a été identifiée (Lalucque et al., 2012). Cette voie est homologue à la voie composée de Ste11, Ste7 et Fus3, contrôlant la reconnaissance des gamètes chez *S. cerevisiae*. Pour déterminer le rôle de ces kinases dans le développement de CG, chaque protéine a été inactivée par délétion. Les souches  $\Delta PaTLK2$ ,  $\Delta PaMPKK2$  et  $\Delta PaMpk2$  obtenues présentent toutes le même phénotype et sont affectées dans de nombreux processus de développement. Leur mycélium est caractéristique des mutants *IDC* : dépigmenté, dépourvu d'hyphes aériens et incapable de produire des anastomoses. Il présente également un défaut dans la formation des structures « appressorium-like » permettant à *P. anserina* de pénétrer la biomasse. De plus, il ne développe pas de protopérithèces et est donc incapable d'effectuer le cycle de reproduction sexuée. En outre, le taux de germination des ascospores est quasi nul du fait de l'absence de « peg » de germination (*i.e.* la structure de germination initiale d'où émergent les hyphes). Du fait de ces nombreux mécanismes impactés chez ces mutants, la voie PaMpk2 est considérée comme étant la principale voie de développement chez *P. anserina*. En ce qui concerne la régulation de CG, les trois mutants ne présentent jamais de dégénérescence de ce type, y compris sur M2+YE et sont donc considérés comme des souches *IDC*. Cependant, en raison de l'absence de formation d'anastomoses, il n'a pas été testé si ce phénotype était dû à l'incapacité à produire l'élément *C* et/ou à le propager.

Pour déterminer le rôle de la voie PaMpk2 dans le contrôle de CG, une souche activant constitutivement PaMKK2, appelée *PaMKK2<sup>C</sup>*, a été construite et analysée. Contrairement à ce qui était attendu, ce mutant ne présente pas CG de façon constitutive mais se comporte comme la souche sauvage pour ce critère. Par ailleurs, le double mutant  $\Delta PaMpk1 PaMKK2^C$  a permis de montrer d'une part que la voie PaMpk1 est épistatique par rapport à la voie PaMpk2. Et d'autre part, cela a mis en évidence qu'une expression régulée de PaMKK2 est nécessaire au bon fonctionnement de PaMpk1.

En résumé, la voie PaMpk2 est la voie principale de développement de *P. anserina* mais n'est pas un acteur majeur dans la régulation de CG. Néanmoins, elle agit en amont de la voie PaMpk1 et permet une correcte régulation de celle-ci.

Une troisième voie MAPK constituée de PaHOK3 (MAPKKK), PaMKK3 (MAPKK), et PaMpk3 (MAPK) a été identifiée chez *P. anserina*. Cette cascade correspond à la voie SSK2/22–Pbs2–Hog1 chez *S. cerevisiae*. Cependant, cette troisième voie n'a aucune action sur le développement de *P. anserina* dans les conditions de cultures en laboratoire et ne semble agir qu'au niveau de l'osmotolérance et de la résistance aux antifongiques.

- Le complexe PaNox1 NADPH oxydase

Parmi les différents mutants *IDC* issus du crible initial, le mutant *IDC<sup>343</sup>* a été isolé. Tout comme les mutants de la voie PaMpk1, il présente un défaut de pigmentation et de production d'hyphes aériens, ainsi qu'une stérilité femelle (Malagnac et al., 2004). Par la méthode de « sib-selection », la souche *IDC<sup>343</sup>* a été complétement avec un fragment d'ADN contenant un gène codant une protéine homologue à la grosse sous-unité catalytique des NADPH oxydases (Nox) des plantes et des animaux. Par sa grande similarité avec la protéine humaine *Nox1*, ce gène est appelé *PaNox1*. Le séquençage de ce gène dans *IDC<sup>343</sup>* a confirmé cette identification : dans *IDC<sup>343</sup>*, le gène *PaNox1* possède une délétion d'un nucléotide, ce qui induit la synthèse d'une protéine extrêmement tronquée (7 acides aminés). Les Nox forment un complexe enzymatique inséré au sein de la membrane. Ce complexe mutiprotéique permet la catalyse de la réaction d'oxydation du NADPH *via* le dioxygène. Les produits issus de cette réaction sont donc du NADP<sup>+</sup>, du H<sup>+</sup> et de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Ces deux dernières molécules réagissent alors pour former du peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les Nox sont donc productrices d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species). Chez les champignons, la régulation et la fonction des Nox ont été bien conservées. Elles sont notamment nécessaires dans la différenciation et la fusion cellulaires (Roca et al., 2012; Kayano et al., 2013; Tong et al., 2014; Dirschnabel et al., 2014), la production de fructification lors de la reproduction sexuée (Lara-Ortiz et al., 2003; Malagnac et al., 2004; Cano-Domínguez et al., 2008; Giesbert et al., 2008; Dirschnabel et al., 2014), la germination des ascospores (Cano-Domínguez et al., 2008; Lambou et al., 2008; Malagnac et al., 2008), le système de défense (Silar, 2005; Montero-Barrientos et al., 2011; Hernández-Oñate et al., 2012), la pénétration (développement des appressoriums pour les phytopathogènes, et des appressoriums-like pour les saprophytes) (Egan et al., 2007; Segmüller et al., 2008; Brun et al., 2009) et la dégradation de la biomasse (Brun et al., 2009), le contrôle de la croissance hyphale chez les champignons symbiotiques (Tanaka et al., 2006), et le remodelage du cytosquelette pendant la croissance polarisée (Dagdas et al., 2012; Ryder et al., 2013). Ces ROS pourraient donc constituer des messagers secondaires de courte durée de vie permettant d'activer différentes voies de signalisation de développement cellulaire, ou en réponse à un stress. Dans le cadre de la dégénérescence CG, il semblerait également que la production de ROS permettrait le développement complet de CG. En effet, la mutation non-sens *IDC<sup>343</sup>* associée à la mutation *AS6-5* engendre un double mutant présentant quelque fois aléatoirement des secteurs légèrement plus pigmentés (Malagnac et al., 2004). Ces derniers sont instables et redeviennent normaux après repiquage. Cependant, ces secteurs peuvent être maintenus par ajout de menadione (quinone à l'origine de la production de superoxydes par auto-oxydation) dans le milieu. Ainsi, en l'absence de PaNox1, un CG faible se développe, révélant que la voie PaMpk1, situé en aval, peut toujours être activée. De plus, il a été observé que PaNox1 était essentielle à la localisation nucléaire de PaMpk1, mais n'avait aucun impact sur sa phosphorylation (Kicka et al., 2006). Cependant, des études récentes n'ont pas permis de confirmer le rôle de la localisation nucléaire de PaMpk1 (Timpano et al., 2016).

Le deuxième acteur du complexe PaNox1 a été identifié à partir du mutant *IDC*<sup>524</sup> (Brun et al., 2009). Cette souche, au phénotype identique à celui de *IDC*<sup>343</sup> (muté dans *PaNox1*), présente une mutation dans un gène homologue au facteur humain p67<sup>phox</sup>, « activateur » du complexe NADPH oxydase. Cette activation se fait notamment lors de l'interaction entre p67<sup>phox</sup> et une protéine G appelé Rac. Or dans la souche *IDC*<sup>524</sup>, le gène muté, nommé *PaNoxR*, a subi la substitution d'une leucine par une proline dans un domaine « Rac binding » supposé. Cette leucine étant conservée chez les *Pezizomycotina*, on peut aisément supposer qu'un changement de ce résidu provoque une importante modification dans la structure de ce motif, important pour la fonction de la protéine.

Enfin, le mutant *IDC*<sup>509</sup>, dont le phénotype est identique à celui de *IDC*<sup>343</sup> (muté dans *PaNox1*), a permis de caractériser le dernier membre du complexe PaNox1. Il s'agit de PaNoxD, l'homologue de la protéine transmembranaire p22<sup>phox</sup> (Lacaze et al., 2015). Chez l'Homme, p22<sup>phox</sup> se lie à la protéine p47<sup>phox</sup>. Cependant, PaNoxD, tout comme son homologue SmPro41 chez *S. macrospora*, ne présente pas de domaine de fixation en C-terminal à p47<sup>phox</sup>. Par ailleurs, aucun homologue à p47<sup>phox</sup> n'a été retrouvé chez les champignons après analyse de leur génome (Lacaze et al., 2015). Ainsi, le complexe NADPH oxydase PaNox1 serait composé de la sous-unité catalytique PaNox1 lié à PaNoxD, et à l'activateur PaNoxR. Ces trois protéines ont bien été co-localisés au niveau du système vacuolaire (Lacaze et al., 2015).

Un second complexe NADPH oxydase, constitué de PaNox2, PaPls1 et PaNoxR, a été identifié chez *P. anserina*. Cependant, PaNox2 ne semble pas jouer de rôle dans la régulation de CG (Malagnac et al., 2004).

- Les autres protéines impliquées dans CG

Le mutant *IDC*<sup>821</sup> a permis d'identifier le gène *PaSo*, nommé ainsi du fait de son homologie avec le gène *So* ou *Ham-1* de *N. crassa* (Fleißner and Glass, 2007; Tong et al., 2014). Chez ce champignon, *So* est l'un des acteurs du dialogue cellulaire mis en place lors de la formation d'anastomose. Dans ce processus, *So* et le complexe MAK-2 sont recrutés alternativement à l'apex des deux hyphes concernés par la fusion cellulaire (Herzog et al., 2015). Chez *P. anserina*, le mutant *IDC*<sup>821</sup> tout comme la souche *PaSo*<sup>Δ</sup> (délétée de *PaSo*) est incapable de développer d'anastomoses. Cette caractéristique est typique et retrouvée chez tous les mutants *IDC* « roses » analysés.

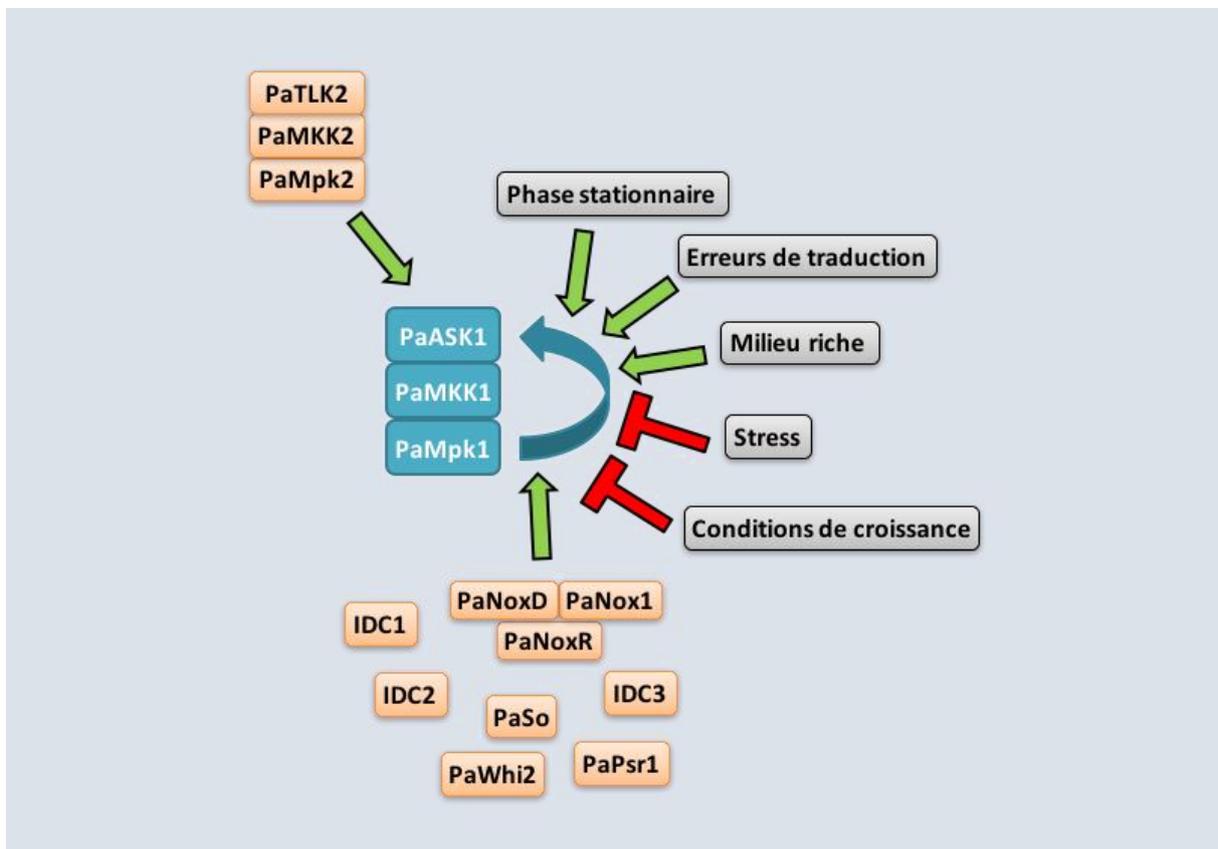
Trois mutants *IDC*, *IDC1*, *IDC*<sup>318</sup> et *IDC*<sup>502</sup>, se sont révélés mutés dans le même gène (Jamet-Vierny et al., 2007). Ce gène, nommé *IDC1*, est homologue à *Ham-5* chez *N. crassa*. Ce dernier joue le rôle de « scaffold » pour la voie MAPK constituée de NRC-1, MEK-2 et MAK-2 (Jonkers et al., 2014), équivalent à la voie MAPK PaMpk2 chez *P. anserina*. Ainsi la protéine *Ham-5* est nécessaire à la formation du complexe MAPK au cours de la fusion cellulaire. Cependant, la fonction de « scaffold » d'*IDC1* n'a pas été montrée chez *P. anserina*.

Les mutants *IDC* ont également permis d'identifier deux gènes importants dans la formation des périthèces : les souches *IDC*<sup>506</sup> et *IDC*<sup>519</sup> sont mutées dans le gène *IDC2*, et la souche *IDC*<sup>522</sup> possède une mutation dans le gène *IDC3* (Lalucque et al., 2017). Ces trois mutants sont capables de différencier les gamètes mâles et femelles. Cependant, le développement du protopérithèce est bloqué lors de la reproduction sexuée et un temps d'incubation plus long est nécessaire (12 jours au lieu de 7) pour obtenir quelques ascospores. La stérilité femelle est donc moins sévère que celle observée chez les mutants *PaNox1* et *PaMpk1*. Le gène *IDC2* code pour une petite protéine de sécrétion conservée chez les *Pezizomycotina* et dont l'orthologue est Ham-7 (protéine impliquée dans la formation des anastomoses) chez *N. crassa*. Elle se compose notamment d'une ancre GPI et de quatre cystéines conservées. Comme attendu, cette protéine est exprimée au niveau de la membrane plasmique, et pendant la phase stationnaire. Par ses quatre cystéines conservées et essentielles à sa fonction, il est permis d'émettre l'hypothèse que la protéine *IDC2* puisse changer de conformation après avoir subi une oxydation (*via* des ROS par exemple) et ainsi transmettre un signal. Le gène *IDC3* quant à lui, possède des orthologues présents chez la plupart des espèces de *Leotiomyceta*. Ce gène code pour une protéine constituée de quatre domaines transmembranaires et l'un des deux domaines externes présente deux cystéines conservées. Cette protéine agit au sein des vacuoles dans les cellules en phase stationnaire. Ainsi, la localisation cellulaire d'*IDC3* est identique à celle du complexe *PaNox1* NADPH oxydase. On peut donc supposer que cette protéine intervient également dans la transmission du signal contrôlé par les ROS et grâce à ses deux cystéines conservées.

Les deux derniers gènes *IDC* caractérisés sont les gènes *PaWhi2* et *PaPsr1* (Timpano et al., 2016). Ils ont été respectivement identifiés à partir des mutants *IDC*<sup>815</sup> et *scl1*. Le premier est issu d'une mutagenèse aléatoire par UV sur des protoplastes de la souche *S* et a été sélectionné pour son phénotype typique des mutants *IDC* (*i.e.* rose, plat et femelle stérile). Le second a été isolé après mutagenèse aléatoire par UV sur des fragments de mycélium de la souche *S*. Le mutant *scl1* est issu d'une structure ressemblant à un sclérote et possède un mycélium identique aux mutants *IDC*. Le gène *PaWhi2* a été nommé ainsi du fait de sa grande similarité avec *Whi2* chez *S. cerevisiae*. Ce dernier a été identifié comme le signal d'entrée en phase stationnaire en réponse à une carence. Par ailleurs, il a été également montré que *WHI2* se liait physiquement à *PSR1* afin de contrôler la réponse aux stress *via* leur interaction avec le facteur de transcription *MSN2*. Malgré l'absence de peptide signal caractéristique des protéines de membrane comme *PSR1*, le gène muté dans *scl1* a été nommé *PaPsr1* en raison de sa grande similarité et des motifs conservés avec *PSR1* de *S. cerevisiae*.

f. Modèle proposé

L'analyse des mutants *IDC* a donc permis d'identifier de nombreux acteurs, tous impliqués dans une même voie de signalisation dont le rôle semble être de préparer le mycélium à la phase stationnaire chez *P. anserina*. En l'absence de cette voie, le mycélium ne produit pas de pigment, ne différencie pas d'hyphe aérien et d'anastomose ; il devient aussi incapable de différencier des périthèces matures, bien qu'il différencie toujours des gamètes mâles et femelles. Le rôle de cette voie est donc en adéquation avec CG, dont l'élément causal *C* est induit par la phase stationnaire. La dégénérescence CG pourrait donc résulter de l'activation inappropriée de la voie en période de croissance. Celle-ci serait maintenue *via* la présence d'une boucle d'autorégulation positive (**Figure 24**), à l'image de ce qui a été décrit pour les voies MAPK chez le xénope.



**Figure 24 : Modèle illustrant la régulation CG.**

### 3. Objectifs de ma thèse

Après avoir étudié les principaux mutants *IDC* et avoir identifié les régulateurs majeurs négatifs de CG, il était nécessaire d'analyser les souches *PDC* afin de compléter le modèle et de mieux appréhender la régulation de cette dégénérescence. Au cours de ces travaux, deux mutants *PDC* au phénotype particulièrement marqué, ont été caractérisés. En effet, les souches *PDC*<sup>2205</sup> et *PDC*<sup>2209</sup> présentent toutes deux un CG fort, c'est-à-dire que le repiquage d'un implant sur M2 (en l'absence de stress) engendrera toujours un thalle entièrement grêle. Ces deux mutants ont été isolés lors du crible initial à partir de la souche *mid26* ((Haedens et al., 2005) ; voir §III.2.d) L'étude du mutant *PDC*<sup>2205</sup> a fait l'objet d'un article et constitue le premier chapitre, tandis que l'analyse de la souche *PDC*<sup>2209</sup> est détaillée dans le second chapitre.

## **CHAPITRE I : ANALYSE DU MUTANT *PDC*<sup>2205</sup>**

La caractérisation du mutant *PDC*<sup>2205</sup> (muté dans le gène *PDC1*) a fait l'objet d'un article accepté dans *Molecular Microbiology* sous le titre « Identification and characterization of PDC1, a novel protein involved in the epigenetic cell degeneration Crippled Growth in *Podospora anserina* » et présenté ci-après. Cette future publication regroupe le travail d'anciens et actuels membres de l'équipe Génétique et Epigénétique des Champignons : Philippe Silar a isolé le mutant *PDC*<sup>2205</sup> et identifié le gène *PDC1*, Narumon Tangthirasunun a remplacé le gène *PDC1* par le marqueur de résistance à l'hygromycine, Philippe Silar et Hervé Lalucque m'ont encadrée pour la substitution du gène *PDC1* par le marqueur de résistance à la généticine (facilitant la génération de double mutants), les analyses phylogénétiques, la mutagenèse dirigée, le marquage de la protéine PDC1 et l'étude des doubles mutants. Une partie de l'analyse des doubles mutants est présentée dans l'article « *PaPro1* and *IDC4*, two genes controlling stationary phase, sexual development and cell degeneration in *Podospora anserina* » par Valérie Gautier, Laetitia Chan Ho Tong, Tinh-Suong Nguyen, Robert Debuchy, Philippe Silar, et accepté pour publication dans *Journal of Fungi* (article en **Annexes**).

élément sous droit, diffusion non autorisée

## **CHAPITRE II : ANALYSE DU MUTANT *PDC*<sup>2209</sup>**

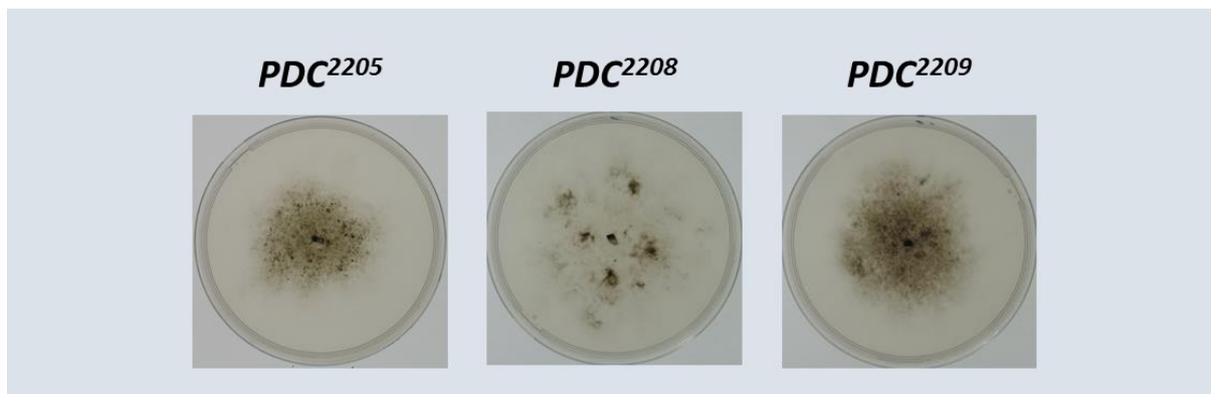
L'étude complète du mutant *PDC*<sup>2205</sup> a permis d'identifier l'un des acteurs de la régulation négative de CG. Afin de compléter le modèle déjà existant, un nouveau mutant *PDC*, le mutant *PDC*<sup>2209</sup>, a aussi été analysé. Ces résultats sont présentés dans ce chapitre.

### **I. IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DU CLUSTER 2209**

#### **1. Détermination du génotype du mutant *PDC*<sup>2209</sup>**

Les travaux présentés ci-après portant sur l'identification du gène muté chez *PDC*<sup>2209</sup> ont été réalisés par Philippe Silar.

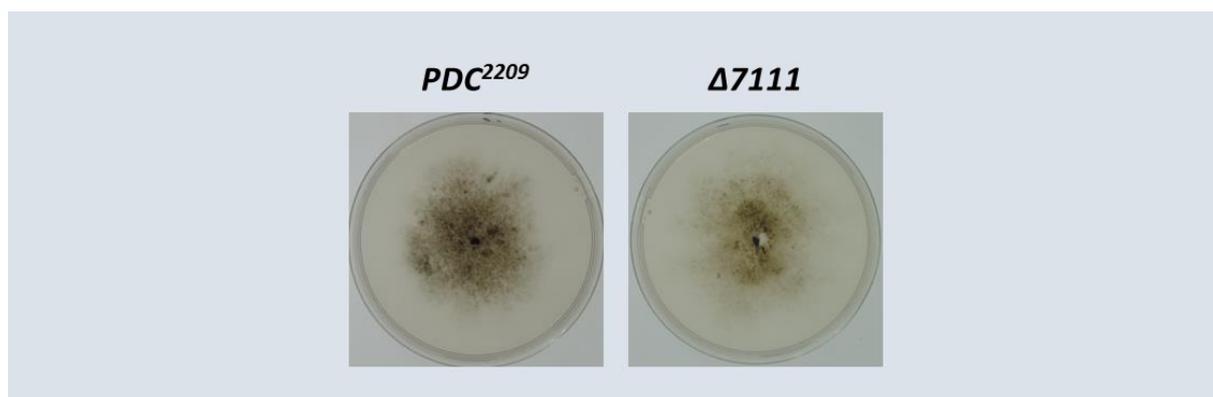
Le mutant *PDC*<sup>2209</sup> a été isolé à partir d'un crible utilisant des protoplastes issus de la souche *mid26* (souche comportant une mutation dans son génome mitochondrial lui permettant d'avoir une longévité deux fois plus longue que la souche sauvage). Après avoir été soumis aux UV, les clones survivants ont été repiqués sur M2 et incubés pendant 4 jours, avant un nouveau repiquage sur M2 (Haedens et al., 2005). Parmi les mutants ainsi engendrés, le mutant *PDC*<sup>2209</sup> faisait partie, avec les mutants *PDC*<sup>2205</sup> et *PDC*<sup>2208</sup> (Haedens et al., 2005), des souches présentant un très fort CG sur M2 (**Figure II.1**).



**Figure II.1 : Phénotype des mutants *PDC*<sup>2205</sup>, *PDC*<sup>2208</sup> et *PDC*<sup>2209</sup> sur M2.**

Un premier croisement avec la souche sauvage a été réalisé pour obtenir le mutant *PDC*<sup>2209</sup> (dépourvu de la mutation *mid26*). Par la suite, *PDC*<sup>2209</sup> a subi cinq isogénisations par croisement avec la souche *S* avant d'être séquencé. Cependant, ce séquençage n'a pas permis dans un premier temps de déterminer un gène candidat. Par conséquent, une cartographie de la mutation a été mise en œuvre grâce à plusieurs marqueurs génétiques répartis sur différents chromosomes. Ainsi, la mutation *PDC*<sup>2209</sup> n'était

pas liée au gène codant Nox3 (situé sur le chromosome 1), ni à celui codant PaMpk1 (situé sur le chromosome 2), ni à celui codant Pat1 (situé sur le bras gauche du chromosome 5), ni à celui codant Lac8 (situé sur le bras gauche du chromosome 7). En revanche, il s'est avéré que la mutation  $PDC^{2209}$  était liée au gène codant Tok1 localisé près du télomère du chromosome 4. D'après les résultats de séquençage, deux mutations candidates se situaient dans cette région : l'une se localisait dans le gène  $Pa\_4\_8760$  et l'autre dans une séquence *a priori* non codante. Le premier gène semble être un candidat peu probable puisque d'autres souches séquencées portaient la même mutation. Grâce à l'utilisation d'un programme de prédiction *de novo* de séquences codantes (FGENESH), il s'est révélé que la seconde mutation se situait en réalité dans une CDS nouvellement prédite et nommée  $Pa\_4\_7111$ . Le gène  $Pa\_4\_7111$  s'étend sur 710 pb et comporte un intron de 65 pb. La délétion de ce gène réalisée par Laetitia Chan Ho Tong engendre une souche, appelée  $\Delta 7111$ , au phénotype identique à celui de  $PDC^{2209}$  (**Figure II.2**). Cela confirmait l'identification de la mutation dans  $Pa\_4\_7111$  comme celle responsable du développement d'un fort CG. Cette dernière consiste au remplacement d'une thymine et d'une guanine par deux adénines, créant un codon stop prématuré. Le gène  $Pa\_4\_7111$  produit alors un peptide de 11 acides aminés au lieu d'une protéine de 214 résidus (**Figure II.3**).



**Figure II.2 : Les mutants  $PDC^{2209}$  et  $\Delta 7111$  présentent des phénotypes identiques.**

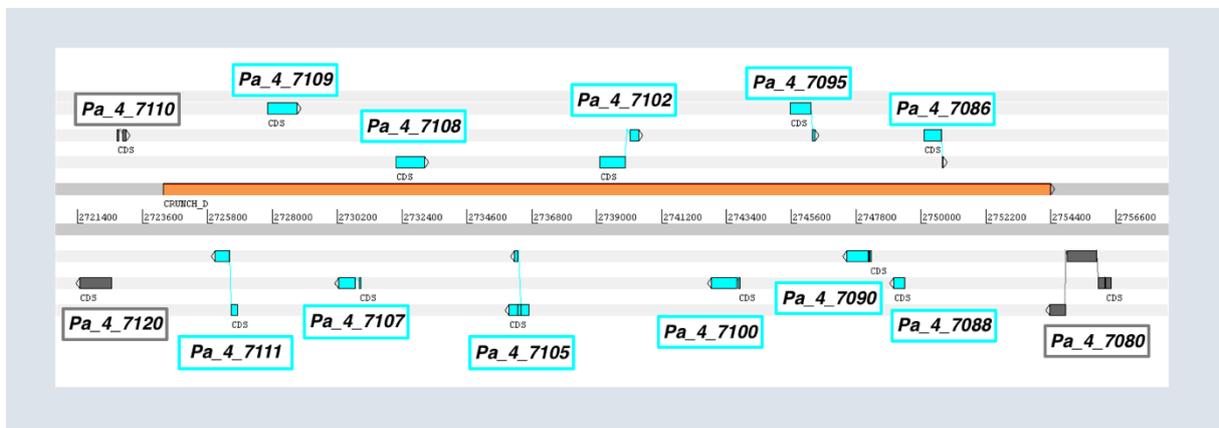
```

MPRRSRPRPYLWYCRNGPCGKKSPDHRDFSDCEDCQLYKHTKYFDNGHLHSKFRHSCLNTVKSQYTKLCLSLV71
MPRRSRPRPYL*11
LGLPISNVTTTPQVVILALIATPDACFSSIAGIQLFVISQTTGNHKEPIDAQLDVEKTSVSSQSPQSPDQPPQIRS146
NDTQHHDESLVDPEPEYVDSTCTDTNSTADASAVKDDYWKWDVDRQRFVHIDEKTGKETVCPEWFD*214
    
```

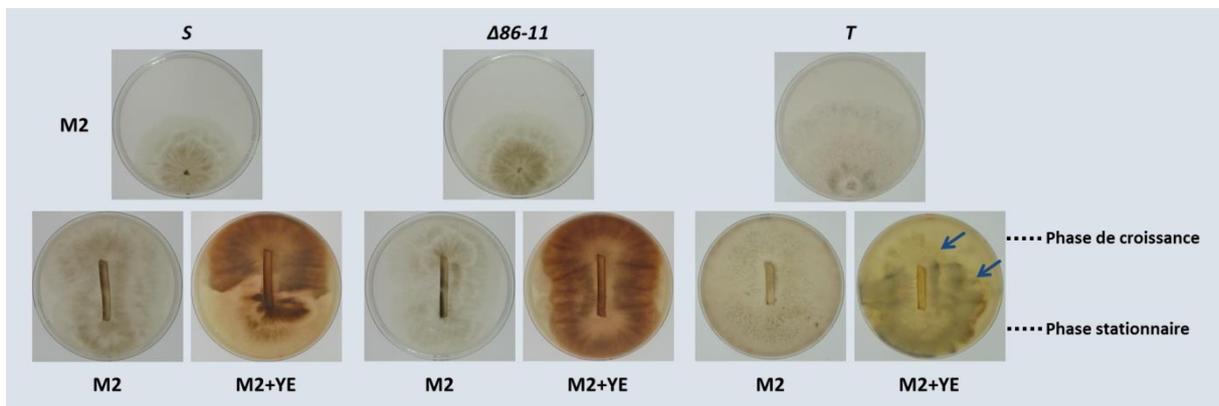
**Figure II.3 : Séquences protéiques des produits du gène  $Pa\_4\_7111$  de la souche sauvage (en bleu) et du mutant  $PDC^{2209}$  (en orange).**

## 2. Identification du cluster 2209

Le génome de la souche *S* a été comparé à celui d'une autre souche géographique de *P. anserina*, la souche *T*. Cette analyse révèle que le gène *Pa\_4\_7111* est localisé dans une région d'environ 30 kb absente de la souche *T*. Plus précisément, cette région se situe entre les gènes *Pa\_4\_7110* et *Pa\_4\_7080*. Grâce notamment aux données de RNAseq (réalisé par Robert Debuchy), onze gènes ont été identifiés dans cette zone : *Pa\_4\_7111*, *Pa\_4\_7109*, *Pa\_4\_7108*, *Pa\_4\_7107*, *Pa\_4\_7105*, *Pa\_4\_7102*, *Pa\_4\_7100*, *Pa\_4\_7095*, *Pa\_4\_7090*, *Pa\_4\_7088* et *Pa\_4\_7086* (**Figure II.4**). Le cluster entier (*i.e.* comportant les onze gènes), nommé cluster 2209, a été remplacé par un marqueur de sélection par Laetitia Chan Ho Tong. La souche ainsi obtenue est appelée  $\Delta 86-11$  et se comporte comme une souche *IDC* (**Figure II.5**). De manière intéressante, la souche *T* qui, tout comme la souche  $\Delta 86-11$  ne possède pas ce cluster, n'est pas non plus capable de présenter CG (**Figure II.5**).



**Figure II.4 : Composition du cluster 2209 dans la souche *S*.** Dans le programme Artemis, la région absente de la souche *T* est représentée en orange. Les gènes du cluster 2209 sont en bleu et les gènes bordants sont en gris.

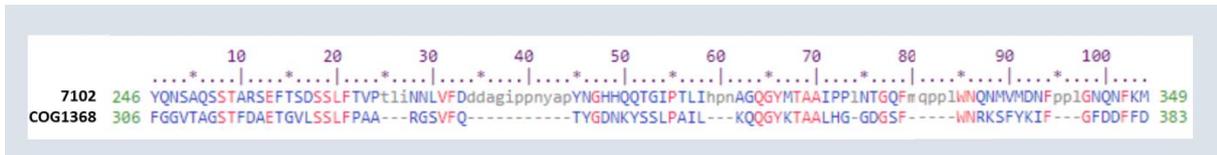


**Figure II.5 : Test CG des souches *S*, *T* et  $\Delta 86-11$ .** La souche *T* ne développe pas CG sur M2+YE mais présente un autre phénomène de dégénérescence connu au laboratoire sous le nom de « Vauban » et désignée par les flèches bleues.

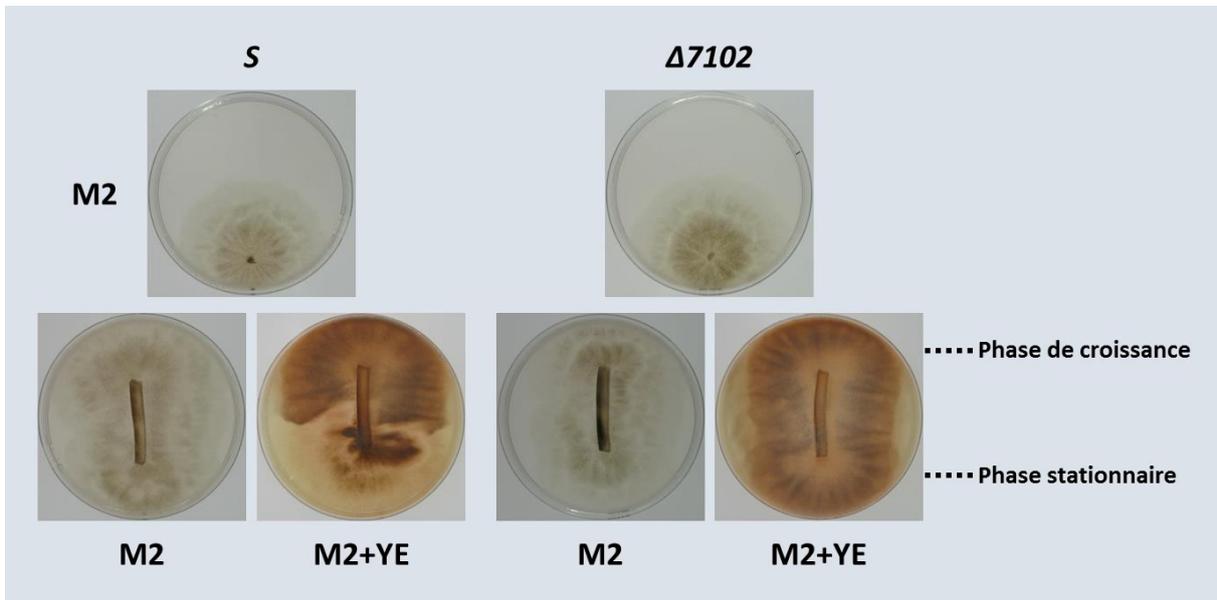
### 3. Caractérisation des gènes du cluster 2209

a. Le gène *Pa\_4\_7102* présente un domaine conservé

Une première analyse prédictive des gènes du cluster 2209 par des outils informatiques (recherche d'orthologues, de motifs conservés, de localisation cellulaire probables, etc.) n'avait pas permis de leur proposer une fonction potentielle. Seul le gène *Pa\_4\_7102* semblait disposer d'un domaine conservé, avec néanmoins une faible conservation (**Figure II.6**). Ce dernier consiste en un domaine AslA caractéristique des arylsulfatases. Par conséquent, le gène *Pa\_4\_7102* a été le premier analysé par génétique directe. Sa délétion a été réalisée par Elise Iracane par la méthode de « split-marker » (méthode détaillée en **Annexes, Figure A.1**) lors de notre premier stage de Master 2. La souche obtenue, nommée  $\Delta 7102$ , est incapable de développer CG et le gène *Pa\_4\_7102* est donc considéré comme un gène *IDC* (**Figure II.7**).



**Figure II.6 :** Identification du domaine AslA (COG1368) dans la protéine 7102 issue du gène *Pa\_4\_7102*.

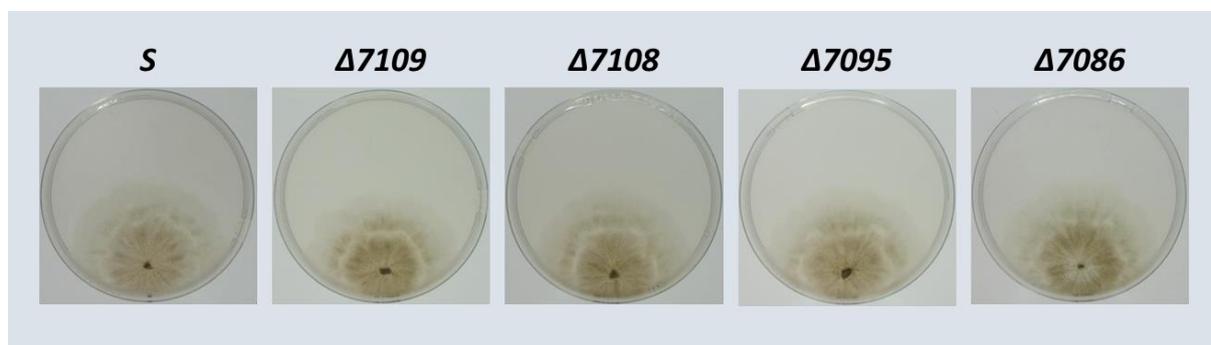


**Figure II.7 :** Le mutant  $\Delta 7102$  est un mutant *IDC*.

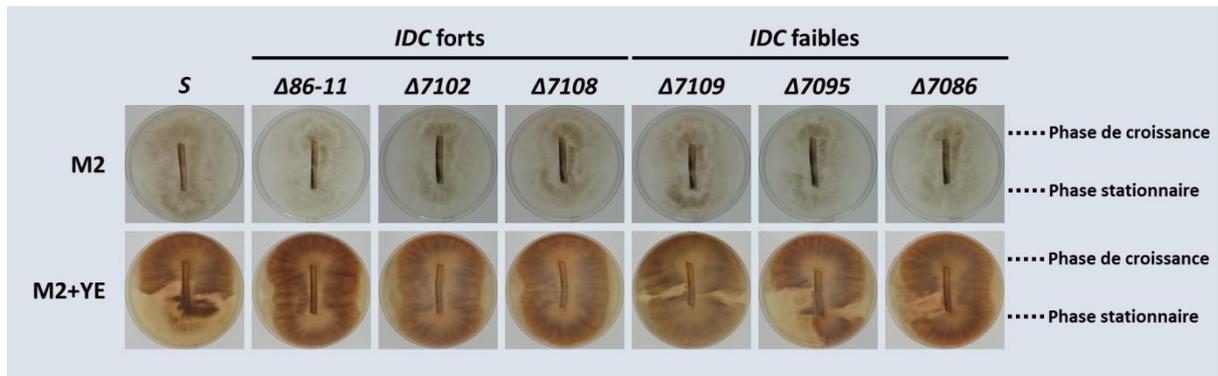
Par conséquent, au début de mes travaux de thèse, deux gènes du cluster 2209 avaient été caractérisés : le gène *Pa\_4\_7111* contrôlant négativement CG et dont la délétion engendre un mutant *PDC*, ainsi que le gène *Pa\_4\_7102* régulant positivement CG et dont la délétion produit une souche *IDC*. Afin de s'assurer que seuls ces deux gènes du cluster 2209 sont impliqués dans la régulation de CG, l'ensemble des gènes du cluster 2209 a été analysé par délétion en remplaçant chaque gène par le gène de résistance à la généticine selon la méthode du « split-marker ». De manière surprenante, tous les gènes à l'exception d'un, se sont révélés impliqués dans le contrôle de CG : certains présentent un rôle positif (gènes *IDC*), alors que d'autres possèdent un rôle négatif (gènes *PDC*).

b. Les gènes *IDC* du cluster 2209

Les délétions des gènes *Pa\_4\_7109*, *Pa\_4\_7108*, *Pa\_4\_7095* et *Pa\_4\_7086* ont été menées pour construire respectivement les souches  $\Delta 7109$ ,  $\Delta 7108$ ,  $\Delta 7095$  et  $\Delta 7086$  (leur génotype ayant été vérifié par Southern blot, présenté en annexe, **Figure A.2**). Sur milieu standard M2, ces quatre mutants ne diffèrent pas phénotypiquement de la souche sauvage (**Figure II.8**). Afin de déterminer la présence de CG dans ces souches, un test en bande a été mis en œuvre (**Figure II.9**). D'après ce test, le mutant  $\Delta 7108$  présente un phénotype identique à ceux de  $\Delta 7102$  et  $\Delta 86-11$ , c'est-à-dire qu'il ne développe aucun secteur CG sur M2+YE. De ce fait, leur phénotype est considéré comme un phénotype « *IDC* fort ». Les mutants  $\Delta 7109$ ,  $\Delta 7095$  et  $\Delta 7086$ , quant à eux, présentent des secteurs restreints induits par la phase stationnaire sur M2+YE. Contrairement à la souche sauvage, ces secteurs CG sont limités par le développement de secteurs NG au niveau du mycélium issu de la phase stationnaire. Les souches  $\Delta 7109$ ,  $\Delta 7095$  et  $\Delta 7086$  ont donc un phénotype « *IDC* faible ». Un phénotype sauvage a été restauré pour chacune de ces souches par complémentation, confirmant le rôle de la délétion dans le phénotype *IDC* (**Figure A.3**).



**Figure II.8 : Les souches  $\Delta 7109$ ,  $\Delta 7108$ ,  $\Delta 7095$  et  $\Delta 7086$  sont phénotypiquement identiques à la souche *S* sur M2.**



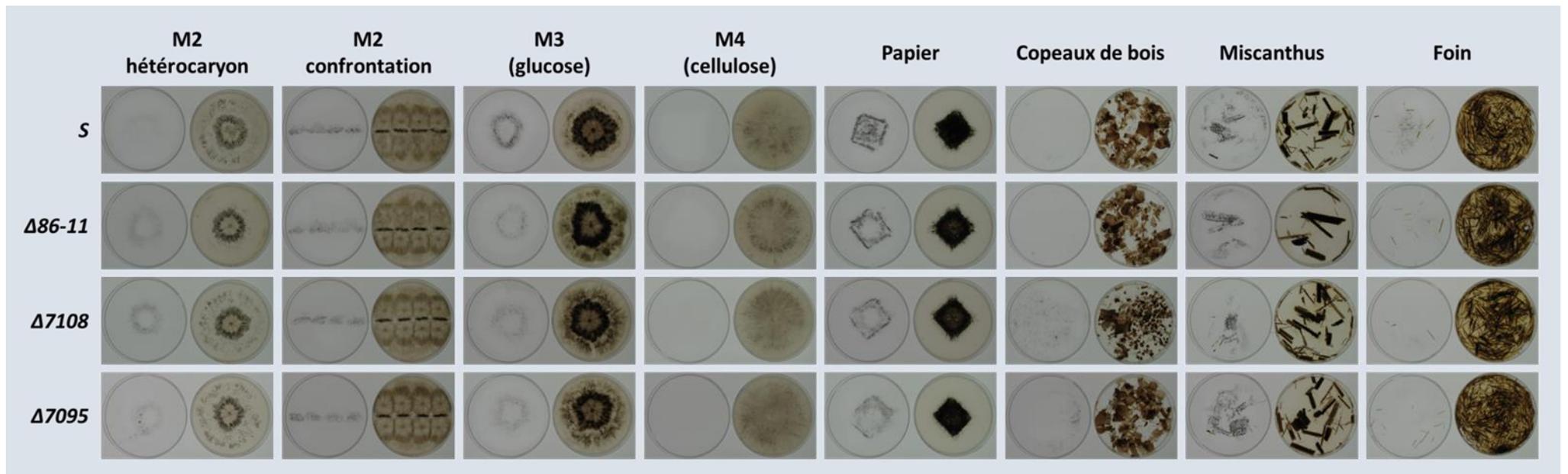
**Figure II.9 : Test CG en bande révélant le caractère *IDC* des souches  $\Delta 7109$ ,  $\Delta 7108$ ,  $\Delta 7095$  et  $\Delta 7086$ .**

Ainsi, les mutants  $\Delta 7109$ ,  $\Delta 7095$  et  $\Delta 7086$  peuvent développer CG de façon très limitée, tandis que les souches  $\Delta 7102$  et  $\Delta 7108$  en sont incapables. Cependant, pour confirmer la présence (ou l'absence) de l'élément *C*, il est nécessaire de réaliser un test d'infection de la souche *AS6-5* sous sa forme normale (comme décrit dans (Silar et al., 1999)). Les résultats présentés **Tableau II.1**, révèlent que des implants prélevés dans la phase stationnaire des souches  $\Delta 7102$ ,  $\Delta 7108$ ,  $\Delta 7109$ ,  $\Delta 7095$  et  $\Delta 7086$ , sont capables d'induire des secteurs CG dans la souche receveuse *AS6-5*. Il en est de même avec la souche  $\Delta 86-11$ . Ainsi, bien que ces souches ne développent pas CG, elles produisent tout de même l'élément *C* pendant la phase stationnaire, mais ce dernier ne semble pas capable de se propager dans les hyphes en croissance. Ces données sont en accord avec le modèle proposé selon lequel ces souches *IDC* activent toujours correctement la voie PaMpk1, mais ne possèdent plus la boucle d'autorégulation positive.

Souche receveuse	Souches donneuses	Provenance de l'implant	Nombre de secteurs CG
AS6-5 (NG)	S	Apex	0/32
		Phase stationnaire	4/32
	$\Delta 86-11$	Apex	0/27
		Phase stationnaire	2/27
	$\Delta 7102$	Apex	0/32
		Phase stationnaire	1/24
	$\Delta 7108$	Apex	0/32
		Phase stationnaire	3/32
	$\Delta 7109$	Apex	0/32
		Phase stationnaire	1/32
	$\Delta 7095$	Apex	0/32
		Phase stationnaire	2/32
	$\Delta 7086$	Apex	0/32
		Phase stationnaire	1/32

**Tableau II.1 : Résultats du test d'infection de la souche AS6-5 (NG) par les souches  $\Delta 7102$ ,  $\Delta 7108$ ,  $\Delta 7109$ ,  $\Delta 7095$  et  $\Delta 7086$ .**

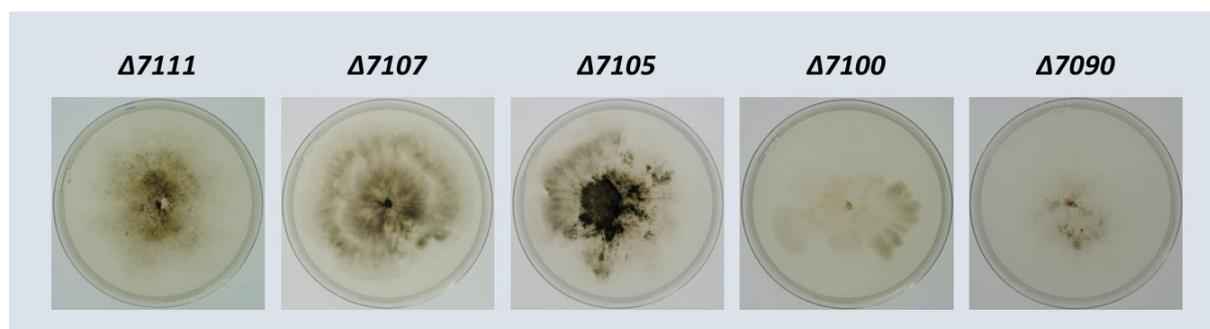
L'étude phénotypique de ces différents mutants *IDC* s'est poursuivie par la caractérisation de leur capacité de reproduction. Des tests de fertilité ont donc été réalisés sur différents milieux (**Figure II.10**). D'après ces résultats, les mutants  $\Delta 7109$ ,  $\Delta 7108$ ,  $\Delta 7102$ ,  $\Delta 7095$  et  $\Delta 7086$ , tout comme la souche  $\Delta 86-11$ , sont capables de réaliser la reproduction sexuée, de manière identique à la souche sauvage. Aucun défaut dans la production de gamètes mâles et femelles, dans la formation de périthèces, ni dans la production et la germination d'ascospores n'a été observé.



**Figure II.10 : Test de fertilité des souches S,  $\Delta 86-11$ ,  $\Delta 7108$  et  $\Delta 7095$  sur différents milieux.** Sur chaque photo, le milieu sur lequel s'est développé le champignon est situé à droite. A gauche se trouve le couvercle où sont éventuellement présentes des traces noires correspondant à la sporée émise par le champignon. Les mutants  $\Delta 7109$ ,  $\Delta 7102$ , et  $\Delta 7086$  présentent les mêmes phénotypes que ceux observés ici.

c. Les gènes *PDC* du cluster 2209

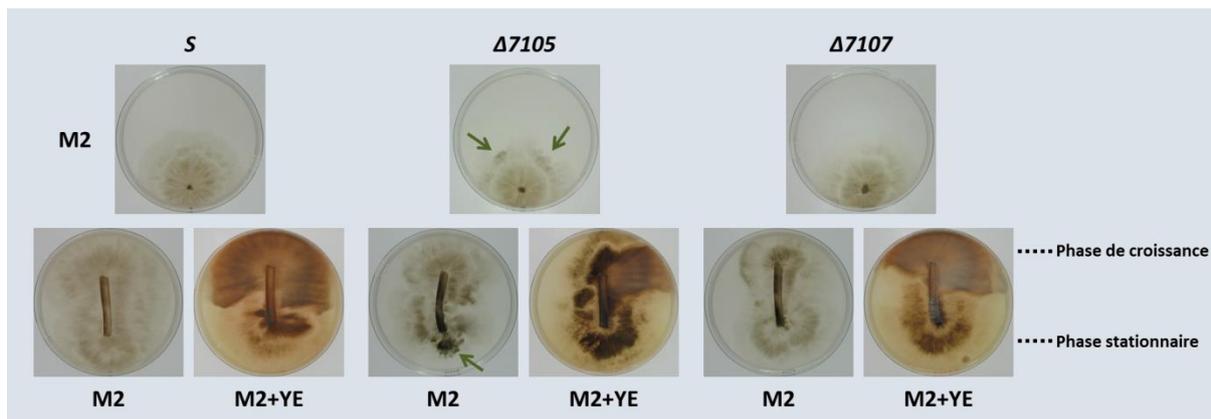
La construction des souches  $\Delta 7107$ ,  $\Delta 7105$ ,  $\Delta 7100$ , et  $\Delta 7090$  a été réalisée en remplaçant respectivement les gènes *Pa\_4\_7107*, *Pa\_4\_7105*, *Pa\_4\_7100* et *Pa\_4\_7090* par le marqueur de résistance à la généticine (la vérification des génotypes par Southern blot ainsi que leur complémentation, sont présentées en **Annexes, Figure A.2**). En particulier, la construction des souches  $\Delta 7105$  et  $\Delta 7090$  (*i.e.* la transformation, la vérification par Southern blot et le phénotypage) ont été réalisées par des étudiants de Master 2, Alexander Demoor et Jizhou Li respectivement. Sur milieu standard M2, deux catégories se distinguent. La première est constituée des mutants  $\Delta 7107$  et  $\Delta 7105$  auxquels peut s'ajouter le mutant  $\Delta 7111$  (construit par Laetitia Chan Ho Tong) et qui développent des secteurs CG sur M2 de façon aléatoire. On note tout de même que les souches  $\Delta 7105$  et  $\Delta 7111$  semblent présenter plus fréquemment CG que  $\Delta 7107$ . La seconde est formée de  $\Delta 7100$  et  $\Delta 7090$  qui présentent uniquement un phénotype de croissance grêle, peu pigmenté ressemblant fortement à CG (**Figure II.11**).



**Figure II.11 : Phénotype des souches  $\Delta 7111$ ,  $\Delta 7107$ ,  $\Delta 7105$ ,  $\Delta 7100$ , et  $\Delta 7090$  sur M2.**

Dans les souches  $\Delta 7107$  et  $\Delta 7105$ , la présence de CG est clairement mise en évidence grâce au test CG en bande (**Figure II.12**). Dans ce test, le secteur NG issu de la phase de croissance est fortement réduit en comparaison avec la souche sauvage. De plus, la présence de l'élément *C*, aussi bien en phase stationnaire qu'au niveau des hyphes en croissance, a été confirmée par un test d'infection pour ces deux mutants (**Tableau II.2**). Comme observé précédemment, cela se traduit parfois par la présence de secteurs CG sur M2. Par ailleurs, pour la souche  $\Delta 7107$ , aucune déficience dans la reproduction sexuée (sur différents milieux), ni dans la production et la germination de spores n'a été observée (**Figure II.13**). Ce n'est pas le cas pour les mutants  $\Delta 7105$  et  $\Delta 7111$  (**Figure II.13**). En effet, la souche  $\Delta 7105$  forme beaucoup moins de spores, tandis que la souche  $\Delta 7111$  n'est plus capable d'en produire en raison de l'absence de périthèces matures (**Figure II.14**). D'après le croisement  $\Delta 7105$  mat+ par  $\Delta 7105$  mat-, ce mutant développe de petites fructifications qui sont, pour certains, pourvus de col. En revanche, un croisement  $\Delta 7111$  mat+ par  $\Delta 7111$  mat- engendre des fructifications bloquées à un stade de protopérithèces. Afin de déterminer à quel niveau les protéines issues des gènes *Pa\_4\_7105* et

*Pa\_4\_7111* pourraient agir, un croisement avec la souche  $\Delta mat$  a été réalisé (**Figure II.14**). Cette souche dépourvue du locus sexuel n'intervient pas dans la méiose, mais elle permet de pourvoir en cellules nécessaires pour former les tissus maternels. Pour les cas des mutants  $\Delta 7105$  et  $\Delta 7111$ , la souche  $\Delta mat$  permet de restaurer le phénotype sauvage, c'est-à-dire le développement de périthèces matures et la production de spores (**Figure II.14**). Par conséquent, les produits des gènes *Pa\_4\_7105* et *Pa\_4\_7111* ne jouent pas de rôle dans la fécondation mais agissent au niveau du mycélium ou de la formation du tissu maternel lors de la reproduction sexuée.

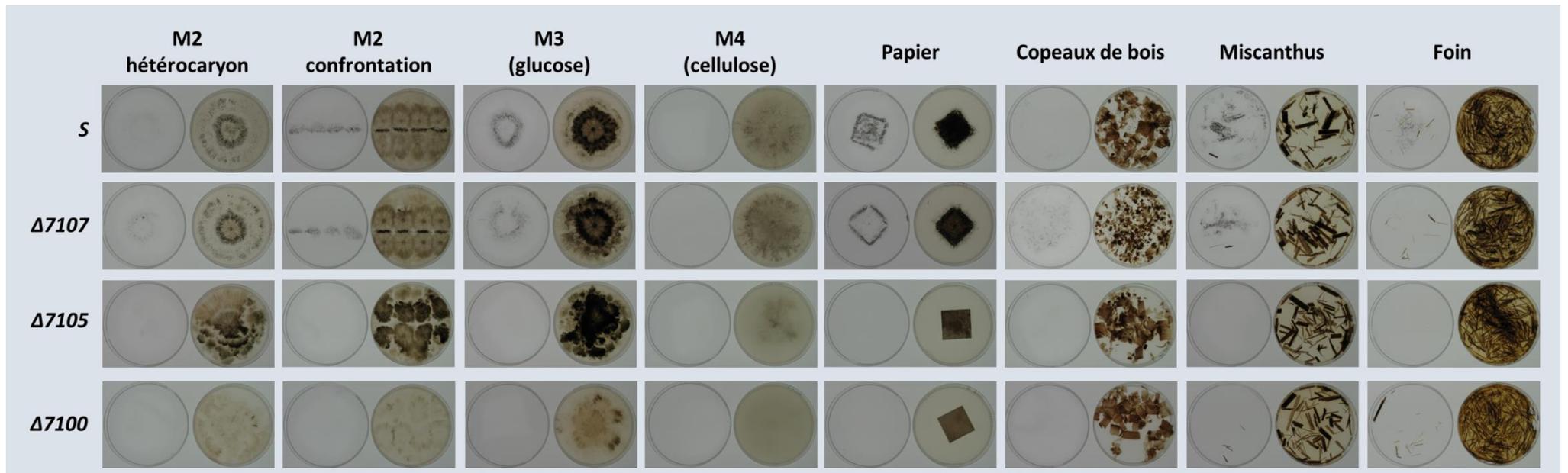


**Figure II.12 : Test CG chez les mutants  $\Delta 7107$  et  $\Delta 7105$ .** Les flèches vertes montrent les secteurs CG sur M2.

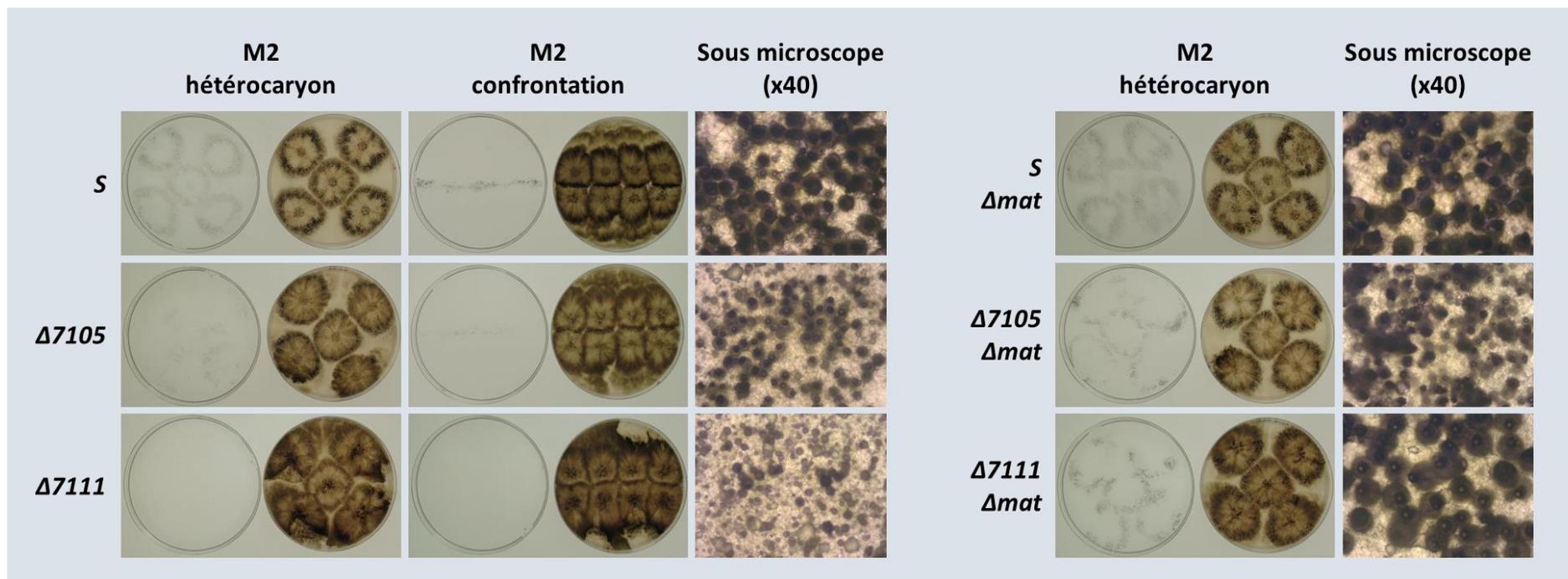
Souche receveuse	Souches donneuses	Provenance de l'implant	Nombre de secteurs CG
AS6-5 (NG)	S	Apex	0/32
		Phase stationnaire	4/32
	$\Delta 7105$	Apex	27/32
	$\Delta 7107$	Apex	22/40

**Tableau II.2 : Résultats du test d'infection de la souche AS6-5 (NG) par les souches  $\Delta 7105$  et  $\Delta 7107$ .**

D'après l'ensemble de ces données, on peut considérer le mutant  $\Delta 7107$  comme un « *PDC* faible » capable sous sa forme normale de produire des spores de la même manière que la souche sauvage *S*. Les souches  $\Delta 7105$  et  $\Delta 7111$  quant à elles, sont dites « *PDC* forts » du fait du développement fréquent de secteurs CG sur M2 ainsi que de leur déficience dans leur production sexuée sous leur forme NG.



**Figure II.13 : Test de fertilité des souches S,  $\Delta 7107$ ,  $\Delta 7105$  et  $\Delta 7100$  sur différents milieux.** Sur chaque photographie, le milieu sur lequel s'est développé le champignon est situé à droite. A gauche se trouve le couvercle où sont éventuellement présentes des traces noires correspondant à la sporée émise par le champignon. Les mutants  $\Delta 7109$ ,  $\Delta 7102$ , et  $\Delta 7086$  présentent les mêmes phénotypes que ceux observés ici. Le mutant  $\Delta 7090$  présente le même phénotype que celui de  $\Delta 7100$ .



**Figure II.14 : Test de fertilité des souches *S*,  $\Delta 7105$  et  $\Delta 7111$  sur M2 avec et sans  $\Delta mat$ .** Sur chaque photographie (œil nu), le milieu sur lequel s’est développé le champignon est situé à droite. A gauche se trouve le couvercle où sont éventuellement présentes des traces noires correspondant à la sporée émise par le champignon. Les mutants  $\Delta 7105$  et  $\Delta 7111$  croisés par eux-mêmes ne produisent peu voire aucune spore du fait de périthèces non matures. La souche  $\Delta mat$  permet de restaurer un phénotype sauvage.

En ce qui concerne les mutants  $\Delta 7100$  et  $\Delta 7090$ , ceux-ci ne peuvent être analysés par le test CG en bande. En effet, ils présentent constamment le même mode de croissance très altéré. Afin de montrer que ce développement est bien CG, des tests d'infection ont été mis en œuvre. Pour cela, la souche AS6-5 sous sa forme normale joue le rôle de souche receveuse, face aux implants des souches  $\Delta 7100$  et  $\Delta 7090$ , souches donneuses. Les résultats sont présentés **Tableau II.3** et montrent que des implants issus de cellules apicales de  $\Delta 7100$  et  $\Delta 7090$  sont capables d'induire des secteurs CG dans la souche AS6-5. Ainsi, ces tests de contamination montrent que l'élément C est présent dans la phase de croissance et que le développement altéré observé chez ces mutants est bien probablement dû à la présence constante de l'élément C. Par conséquent, les souches  $\Delta 7100$  et  $\Delta 7090$  développent très fortement CG sur M2. Par ailleurs, contrairement aux autres souches PDC étudiées jusqu'à présent, il n'a pas été possible de les cultiver sous forme NG, quel que soit le stress appliqué (fragmentation, incubation à 37°C, culture après plusieurs mois de conservation à 4°C). De ce fait, ces deux mutants sont considérés comme des « PDC constitutifs ». Ainsi, de façon attendue, ces souches, bien que produisant des gamètes mâles, sont incapables de réaliser la production sexuée (**Figure II.13**).

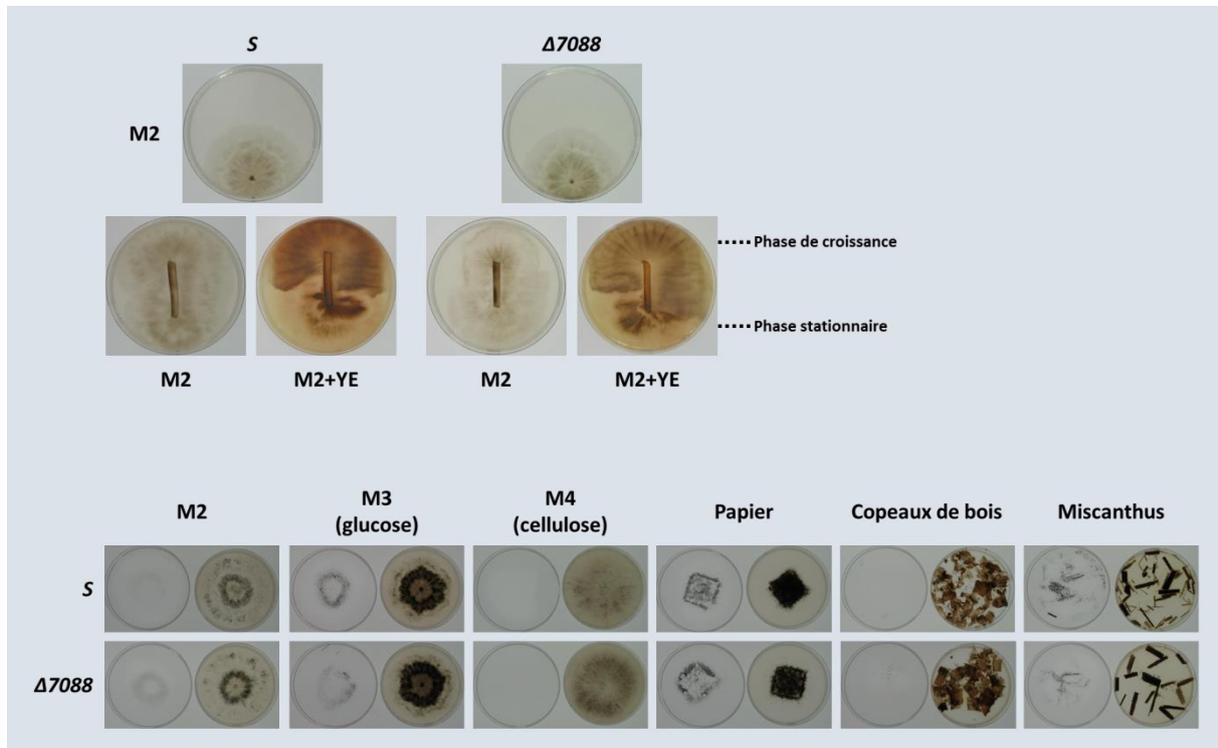
Souche receveuse	Souches donneuses	Provenance de l'implant	Nombre de secteurs CG
AS6-5 (NG)	S	Apex	0/32
		Phase stationnaire	4/32
	$\Delta 7100$	Apex	5/32
	$\Delta 7090$	Apex	25/32

**Tableau II.3 : Résultats du test d'infection de la souche AS6-5 (NG) par les souches  $\Delta 7100$  et  $\Delta 7090$ .**

En résumé, ces différentes analyses ont montré que les gènes *Pa\_4\_7111*, *Pa\_4\_7107*, *Pa\_4\_7105*, *Pa\_4\_7100* et *Pa\_4\_7090* codent pour des acteurs du système responsable de la répression de la boucle d'autorégulation positive. Par ailleurs, les gènes *Pa\_4\_7100* et *Pa\_4\_7090* semblent particulièrement cruciaux dans ce processus puisque les mutants de ces deux gènes semblent présenter une boucle constamment active.

d. Cas du gène *Pa\_4\_7088*

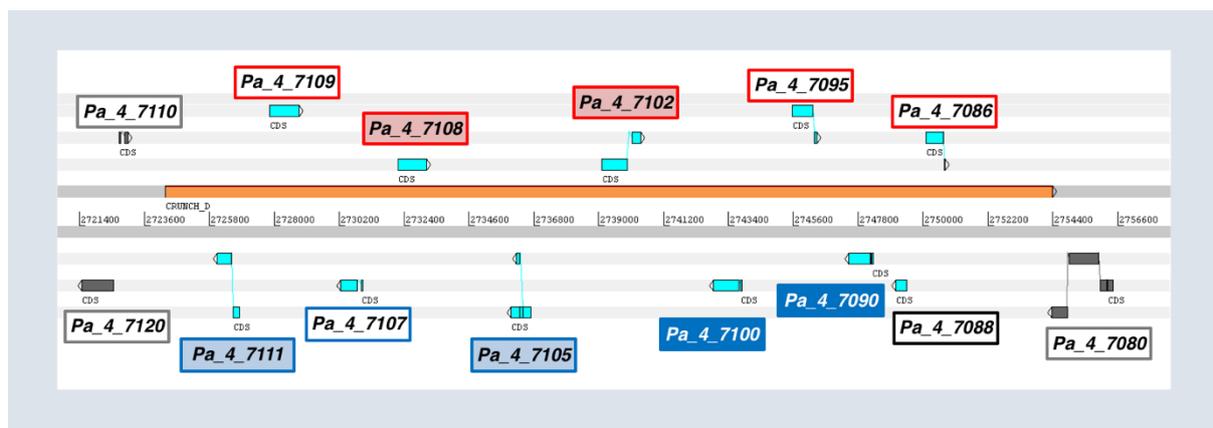
Le gène *Pa\_4\_7088* a été inactivé pour construire la souche  $\Delta 7088$ . A la suite des tests phénotypiques, ce mutant ne présente pas de différences significatives avec la souche sauvage (**Figure II.15**).



**Figure II.15 : Tests phénotypiques de la souche  $\Delta 7088$ .** Le test CG (en haut) ne montre pas de différences manifestes avec la souche *S*. De même les tests de fertilité (en bas) révèlent des phénotypes identiques pour le mutant  $\Delta 7088$  et la souche *S*. Sur chaque photo du test de fertilité, le milieu sur lequel s'est développé le champignon est situé à droite. A gauche se trouve le couvercle où sont éventuellement présentes des traces noires correspondant à la sporée émise par le champignon. Les tests sur M2 par confrontation et sur foin ne sont pas présentés mais les phénotypes de *S* et  $\Delta 7088$  restent identiques.

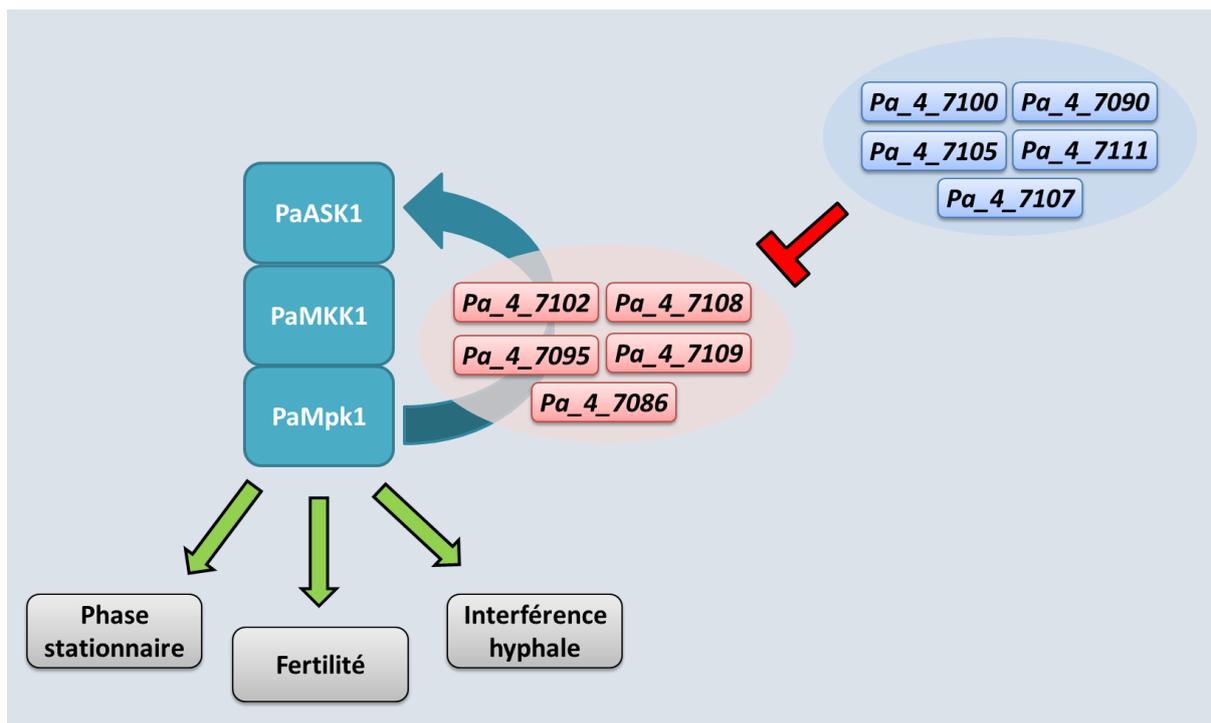
e. Organisation génétique du cluster 2209

La délétion systématique de chacun des gènes du cluster 2209 a permis de souligner le rôle primordial de cette région dans le phénomène CG. En effet, à l'exception du gène *Pa\_4\_7088*, tous les gènes de ce cluster influent sur la régulation de CG, et par extension, sur la mise en place de la phase stationnaire (**Figure II.16**). De manière remarquable, tous les gènes *IDC* sont localisés sur le même brin, tandis que tous les gènes *PDC* se situent sur le brin opposé. Cette organisation particulière peut suggérer que la structure tridimensionnelle de cette région est importante. Ainsi, on pourrait penser que la substitution d'un gène par un marqueur de sélection (de taille légèrement plus grande) déstabilise la conformation de la double hélice d'ADN. Cela induirait des mutants *IDC* lorsque l'insertion du transgène s'effectue sur le premier brin, et cela engendrerait des mutants *PDC* en cas de modification du second brin. Cependant, cette hypothèse peut être écartée par les expériences de complémentation réalisées pour chacun des mutants. En effet, l'insertion de chaque allèle sauvage dans le mutant correspondant en position ectopique permet de restaurer un phénotype sauvage (**Figure A.3**). Néanmoins, il existerait un modèle simple permettant d'expliquer cette organisation particulière et qui sera discuté plus en détails par la suite.



**Figure II.16 : Organisation du cluster 2209 dans la souche S.** La région absente de la souche *T* est représentée en orange. Les gènes *IDC* du cluster 2209 sont en rouge (encadrement simple pour les gènes *IDC* faibles, remplissage rouge clair pour les gènes *IDC* forts). Les gènes *PDC* sont en bleu (encadrement simple pour les gènes *PDC* faibles, remplissage bleu clair pour les gènes *PDC* forts, et remplissage bleu foncé pour les gènes *PDC* constitutifs). Les gènes sans fonctions particulières sont en noir et les gènes bordants sont en gris.

Le cluster 2209 est donc une région complexe constituée de gènes *IDC* et de gènes *PDC*. Grâce aux analyses génétiques précédemment exposées, il est suggéré que ce cluster code à la fois pour des acteurs constituant la boucle de régulation positive ainsi que pour des composants du système venant l'inhiber (**Figure II.17**).

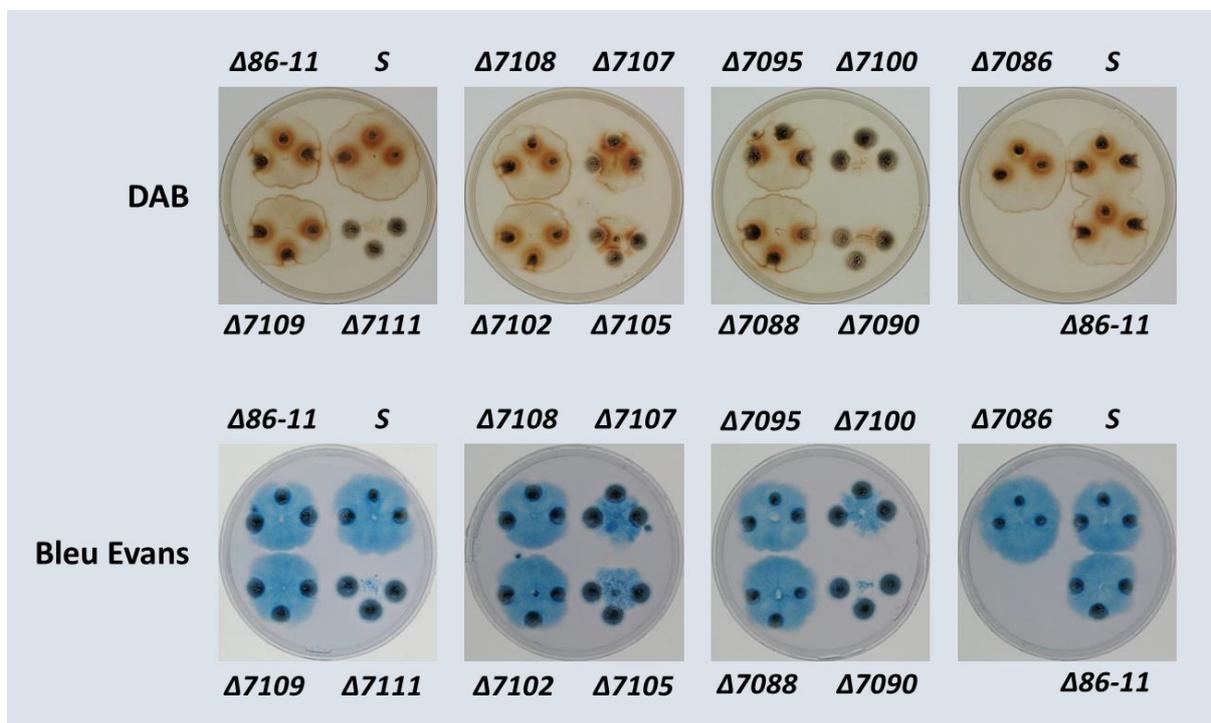


**Figure II.17 : Modèle proposé sur la régulation de la voie PaMpk1 par les gènes *IDC* du cluster 2209 composant la boucle d’auto-activation (en rouge) et les gènes *PDC* constituant le système d’inhibition de la boucle (en bleu).**

f. Rôle possible du cluster 2209

Alors que le cluster 2209 provoque un phénomène de dégénérescence (de façon artificielle au laboratoire), celui-ci semble s’être maintenu au cours de l’Évolution (voir sections suivantes). Ce cluster serait donc sélectionné de manière positive et pourrait d’un avantage l’individu porteur. Or, l’étude phénotypique du mutant dépourvu du cluster 2209 (mutant  $\Delta 86-11$ ) n’a pas permis d’identifier d’autres phénotypes que celui de l’absence de CG. En particulier, ce mutant est aussi fertile que la souche sauvage et semble mettre en place sa phase stationnaire de la même manière. Par conséquent, le cluster 2209 ne possède pas de rôle positif apparent et ne semblerait donc pas pourvoir la souche *S* d’un quelconque avantage sélectif. La dégénérescence CG étant profondément liée à la voie PaMpk1, les investigations quant à la fonction de ce cluster se sont portées sur les rôles de cette voie dans le développement et la physiologie de *P. anserina*. En effet, la voie PaMpk1 agit à trois niveaux : outre la phase stationnaire et la reproduction sexuée, elle contrôle également le phénomène d’interférence hyphale. Seul ce dernier processus n’a pas été analysé dans les résultats présentés ci-dessus. En effet, il n’est pas discernable sur une simple culture ; il est nécessaire de pratiquer des tests d’interférences hyphales en présence d’autres champignons (Silar, 2005). Ainsi, pour tester le rôle du cluster 2209 dans la reconnaissance de compétiteurs, ces tests ont été mis en place. Ils consistent à mettre en contact *P. anserina* avec une autre

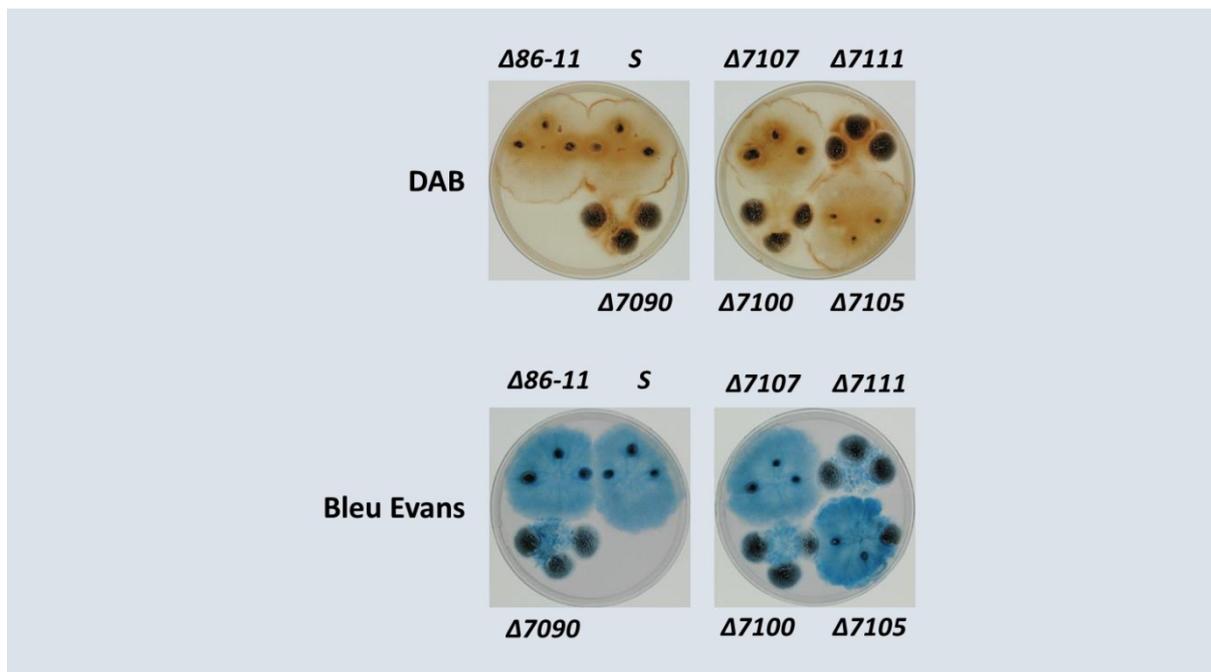
espèce de champignon, tel que *Penicillium chrysogenum*, ce qui engendre deux phénomènes différents. Le premier consiste en la production massive de ROS au niveau de la zone de contact. Et la seconde engendre la mort cellulaire d'un des deux acteurs. Ces deux réactions sont indépendantes et la mort d'un des deux champignons n'est pas systématique. Dans le cas d'un contact avec *P. chrysogenum*, ce sont les hyphes de ce dernier qui subiront la mort cellulaire. Ces deux phénomènes peuvent être mis en évidence *via* l'utilisation de DAB (3,3'-diaminobenzidine) révélant la présence de peroxyde d'hydrogène, et du bleu Evans détectant la mort cellulaire. Ces tests ont été réalisés sur les différents mutants du cluster 2209 à notre disposition (**Figure II.18**).



**Figure II.18 : Mise en évidence de la production de peroxyde d'hydrogène par le DAB et de la mort cellulaire par le bleu Evans des mutants du cluster 2209 au contact de *Penicillium chrysogenum*.** Trois implants de *P. chrysogenum* ont été appliqués autour d'un implant de chacun des mutants du cluster 2209. La détection s'effectue après deux jours de culture dans des conditions standards.

Ce test d'interférence hyphale montre clairement que la souche sauvage *S* produit du peroxyde d'hydrogène et engendre la mort cellulaire de *P. chrysogenum* à son contact. Il en est de même pour les souches *IDC* testées (*i.e.*  $\Delta 86-11$ ,  $\Delta 7109$ ,  $\Delta 7108$ ,  $\Delta 7102$  et  $\Delta 7095$ ) ainsi que la souche  $\Delta 7088$ . Les souches *PDC* quant à elles, se sont toutes développées sous forme CG lors de ce test. On peut néanmoins observer que  $\Delta 7107$  et  $\Delta 7105$  se comporte de la même manière que la souche *S*. En ce qui concerne les trois autres mutants,  $\Delta 7111$ ,  $\Delta 7100$  et  $\Delta 7090$ , l'absence de précipité coloré peut s'expliquer par le fait

que les souches ne se sont pas assez développées pour entrer en contact avec les hyphes de *P. chrysogenum*. Seule la souche  $\Delta 7100$  provoque visiblement la mort cellulaire de *P. chrysogenum* sur le test du bleu Evans. Pour déterminer la capacité des mutants *PDC* à réagir au contact d'un champignon compétiteur, les mêmes tests sont effectués de nouveau avec un temps de culture plus long. Ceci permet d'augmenter les chances de rencontre entre les hyphes des deux champignons, malgré le développement de *P. anserina* sous forme CG (**Figure II.19**).



**Figure II.19 : Mise en évidence de la production de peroxyde d'hydrogène par le DAB et de la mort cellulaire par le bleu Evans des mutants *PDC* du cluster 2209 au contact de *Penicillium chrysogenum*.** Trois implants de *P. chrysogenum* ont été appliqués autour d'un implant de chacun des mutants *PDC* du cluster 2209. La détection s'effectue après quatre jours de culture dans des conditions standards.

D'après ce nouveau test, les souches  $\Delta 7111$ ,  $\Delta 7107$ ,  $\Delta 7105$  et  $\Delta 7090$  présentent distinctement un phénotype identique à la souche sauvage avec production de ROS et mort cellulaire de *P. chrysogenum*. Concernant le mutant  $\Delta 7100$ , la réaction de mort cellulaire est moins visible sur ce test. De même, la production de peroxyde d'hydrogène semble plus faible en comparaison avec la souche *S* et les autres mutants *PDC*.

En conclusion, le test d'interférence hyphale réalisé sur les différents mutants du cluster 2209 n'a pas permis de démontrer clairement le rôle des gènes d'intérêt dans la reconnaissance et les réactions de *P. anserina* face à ses champignons compétiteurs. L'avantage évolutif potentiel apporté par le cluster reste donc inconnu.

## II. EVOLUTION PHYLOGENIQUE DU CLUSTER 2209

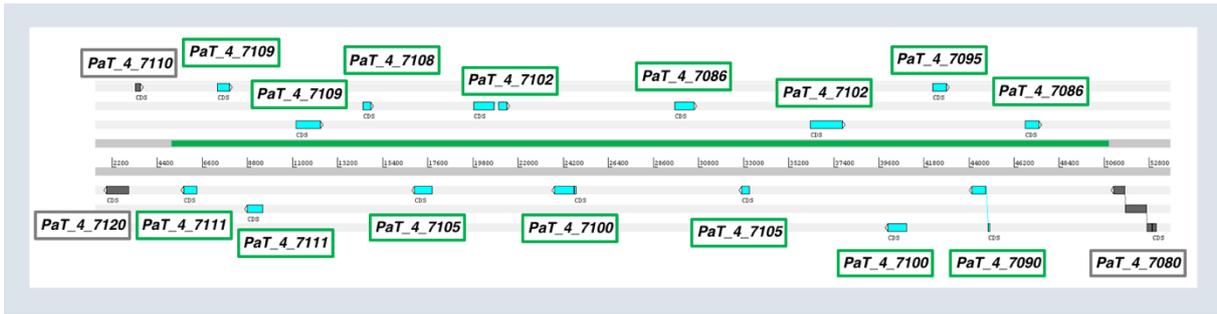
Comme présentées dans la section I.3, les premières analyses de la séquence du génome de la souche *T* n'avait pas permis de déterminer de cluster orthologue. Or, les deux souches de *Podospora*, *S* et *T* partagent un pourcentage de similitude au niveau nucléotidique de 96 à 99% (en fonction des régions), l'identification d'un cluster adoptant une évolution classique devait donc être aisée. L'étude plus approfondie du génome de la souche *T*, ainsi que celle d'autres espèces de *Sordariales* pour lesquels des séquences génomiques sont disponibles, a permis de montrer que le cluster 2209 suit une évolution complexe et originale.

Les travaux présentés ci-après ont été réalisés en collaboration avec Philippe Silar.

### 1. Le cluster 2209 chez les *Sordariales*

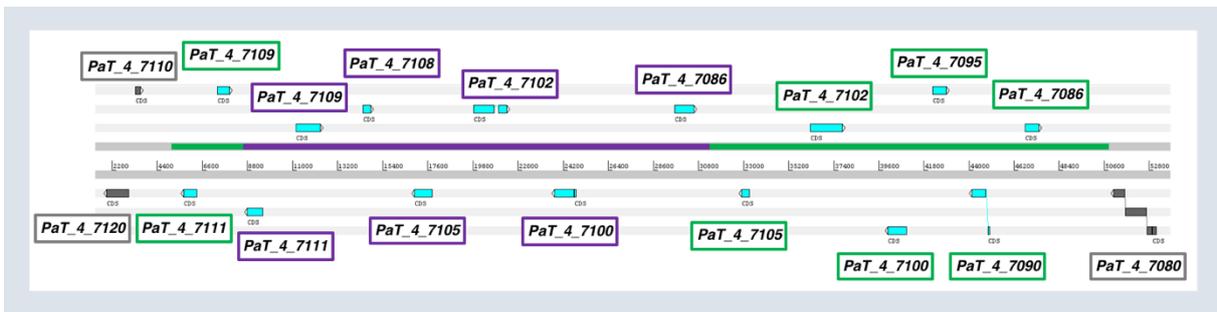
#### a. Nouvelle annotation du génome de la souche *T* : présence d'un cluster 2209 particulier

Un premier assemblage du génome de la souche *T* n'avait pas permis d'identifier le cluster 2209 par comparaison simple par BLAST avec la souche *S*. Un nouvel assemblage plus complet du génome de la souche *T* ayant été réalisé, une nouvelle analyse a été menée. Dans cet assemblage, des trous de séquences ont été comblés, ce qui a entraîné l'obtention sur un même contig des gènes conservés bordant le cluster dans la souche *S* (les gènes *PaT\_4\_7110* et *PaT\_4\_7080*, respectivement homologues à *Pa\_4\_7110* et *Pa\_4\_7080*). Celui-ci a remis en question la délétion précédemment observée dans la souche *T*. En effet, ces nouvelles données mettent en évidence la présence d'une région d'environ 35kb sur le chromosome 4 entre ces gènes conservés. Le pourcentage d'identité de séquences entre ces deux couples de gènes bordants est de 99%. En d'autres termes, il existe une différence d'un nucléotide sur cent entre *PaT\_4\_7110* et *Pa\_4\_7110* ou entre *PaT\_4\_7080* et *Pa\_4\_7080*. En revanche, la comparaison des séquences des souches *S* et *T* entre ces deux gènes bordants présente une identité de séquence particulièrement faible, de l'ordre de 25%, ce qui correspond à la comparaison non optimisée de deux séquences aléatoires. Ainsi, en comparant ces deux régions au niveau nucléotidique avec des outils classiques (tels que ClustalW2, MEGA, MAFFT), aucune correspondance ne peut être décelée. Cependant, les programmes de prédiction *de novo*, confirmés par des données de RNAseq, montrent la présence de 15 séquences codantes dans cette région de la souche *T*. Et en comparant un à un ces gènes avec ceux du cluster 2209 de la souche *S*, il est possible d'identifier des homologues (avec toujours un très faible pourcentage en identité de séquence d'environ 28% au niveau protéique). En conséquence, la souche *T* possède également un cluster du même type que le cluster 2209 (**Figure II.20**), mais de séquence très divergente, beaucoup plus que les autres régions du génome. Dès lors, et pour plus de clarté, le cluster 2209 de la souche *S* sera nommé cluster 2209S et celui de la souche *T*, cluster 2209T.



**Figure II.20 : Organisation du cluster 2209 dans la souche T.** La région divergente vis-à-vis de la souche S est présentée en bleu. Les gènes du cluster 2209 sont en bleu et les gènes bordants sont en gris.

La caractérisation du cluster 2209T permet de nous éclairer sur l’histoire évolutive de cette région. Tout d’abord, le cluster 2209T est constitué de 15 gènes (contre 11 pour le cluster 2209S) mais il se trouve dépourvu des homologues des gènes *Pa\_4\_7107* et *Pa\_4\_7088*. Ensuite, certains gènes sont présents en deux copies. C’est le cas des gènes *PaT\_4\_7111*, *PaT\_4\_7109*, *PaT\_4\_7105*, *PaT\_4\_7102*, *PaT\_4\_7100* et *PaT\_4\_7086*. L’ordre des gènes dupliqués (avec sauvegarde de la synténie) permet d’émettre l’hypothèse d’une duplication du cluster en son sein (**Figure II.21**). Sous cette hypothèse, l’ensemble des gènes du cluster 2209T aurait été copié et inséré au niveau du gène *PaT\_4\_7108* qui aurait alors disparu. S’en serait suivi par la suite au moins un évènement de délétion engendrant la disparition des gènes *PaT\_4\_7095* et *PaT\_4\_7090*.



**Figure II.21 : Mise en évidence de l’évènement de duplication au sein cluster 2209T.** La région divergente vis-à-vis de la souche S est présentée en violet. Les gènes initiaux du cluster 2209 sont en bleu, les gènes dupliqués sont encadrés en violet et les gènes bordants sont en gris.

b. Le cluster 2209 chez les *Podospora*

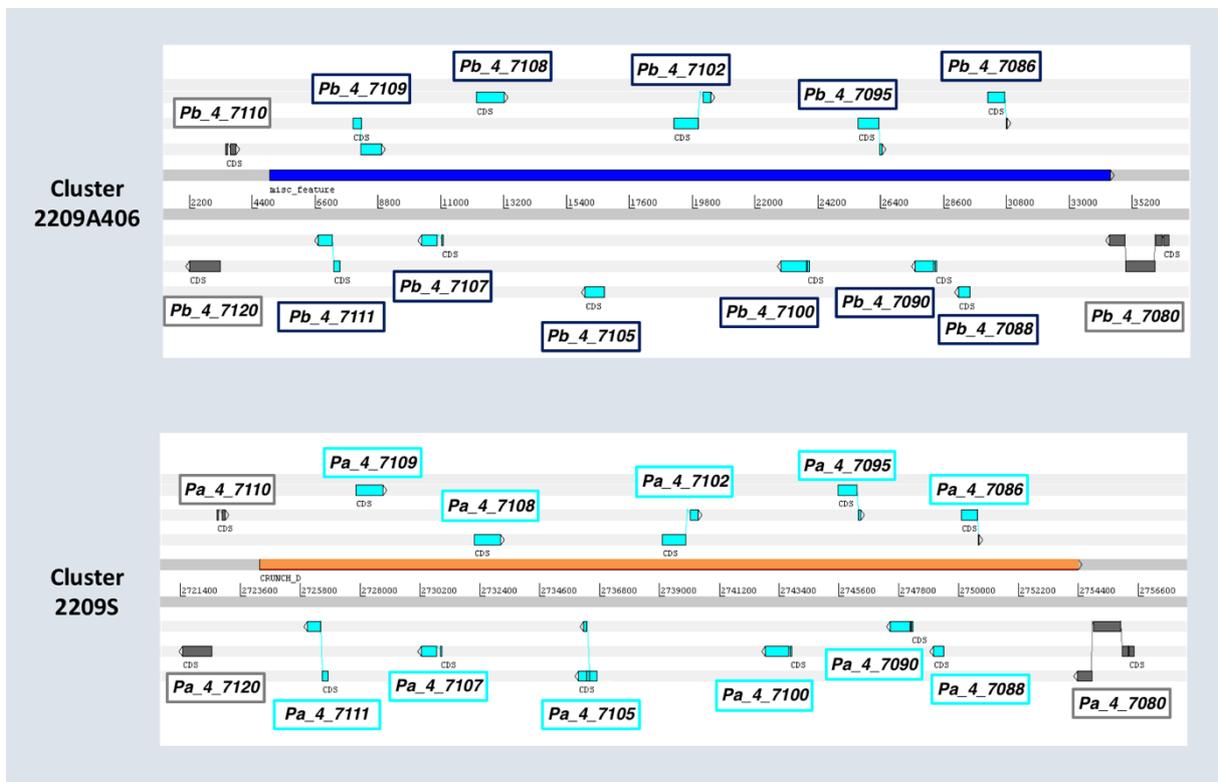
D'après les résultats précédents, il existe donc dans la souche *T*, une version très différente du cluster 2209S. Afin de mieux appréhender l'évolution de ce cluster, une étude de l'évolution de différentes souches de *Podospora anserina* est menée. Et en particulier, ces souches sont testées pour déterminer le type de cluster (cluster 2209S ou cluster 2209T) porté ainsi que sur leur capacité à développer CG. Pour ce faire, en collaboration avec Charlie Boucher, une analyse est réalisée sur la collection de souches de *Podospora anserina*/*Podospora pauciseta*/*Podospora comata* présente au laboratoire. *P. pauciseta* est un autre nom donné à *P. anserina*. En ce qui concerne *P. comata* qui présente des spores légèrement plus petites que *P. anserina*, elle est considérée par certains mycologues comme une espèce à part entière, alors que d'autres estiment qu'elle fait partie d'une sous-espèce. L'article (Boucher et al., 2017) permet d'élucider ce complexe d'espèces nommée « *Podospora anserina sensus lato* » (article en **Annexes**). D'une part, l'appellation *Podospora anserina*/*Podospora pauciseta*/*Podospora comata* recouvre en réalité sept espèces différentes (**Figure II.22**). D'autre part, concernant le phénotype CG, seule l'espèce « *Podospora anserina sensus stricto* » le développe (**Figure II.22**). Toutes les autres espèces sont incapables de présenter CG, malgré de multiples tentatives pour déclencher ce phénomène de dégénérescence.

De plus, Charlie Boucher a également étudié la présence du cluster 2209 chez ces différentes espèces en amplifiant les gènes *Pa\_4\_7100*, *Pa\_4\_7102* et *Pa\_4\_7111* par PCR. Pour cela, il a utilisé des amorces spécifiques permettant d'amplifier les gènes de la souche *S* ou les gènes de la souche *T*. Ainsi, les amorces spécifiques de *S* ont permis d'obtenir des produits de PCR pour toutes les souches de *P. anserina sensus stricto* ainsi que pour la souche A406 (ou CBS112042) de *Podospora bellae-mahoneyi* et CBS415.72 de *Podospora pseudocomata*. Au contraire, des amplifications ont été acquises avec les amorces spécifiques de la souche *T* à partir des souches de *Podospora pauciseta* (CBS237.71) et *Podospora pseudopauciseta* (CBS411.78). Il n'a pas réussi à amplifier de cluster pour les souches de *Podospora pseudoanserina* (CBS124.78 et CBS253.71). En résumé, certaines espèces semblent présenter la version *S* du cluster et d'autres la version *T* (**Figure II.22**).



c. Nouvelles données de RNAseq : identification du gène *Pa\_4\_7097*, responsable du phénotype de la souche *A406* ?

Récemment, le séquençage du génome de la souche *A406* a été rendue disponible. En conséquence, les gènes composant le cluster 2209A406 (cluster 2209 présent dans *A406*) ont été définis (**Figure II.23**). De façon surprenante, l'organisation de ce cluster, c'est-à-dire la nature des gènes et leur synténie, ne diffère pas du cluster 2209S. Or, il a été montré que la souche *A406* ne développait pas CG. Cette absence de phénotype CG serait-elle due à un autre élément codé par le génome de la souche *A406* qui inhiberait les effets du cluster 2209 ? Ou serait-ce dû au cluster 2209A406 lui-même ? Une réponse partielle à ces questions a été suggérée par la découverte récente d'une nouvelle séquence codante au sein du cluster 2209S.



**Figure II.23 :** L'organisation du cluster 2209 dans la souche *A406* (en haut) est très similaire à celle du cluster 2209S (en bas).

En effet, de nouvelles données de RNAseq de la souche *S* obtenues il y a peu ont montré la présence d'un nouveau gène. Elles ont été réalisées sur du mycélium âgé de quatre jours (contre deux jours pour les précédentes analyses). D'après ces dernières analyses, une séquence codante encore indéterminée se situerait entre les gènes *Pa\_4\_7100* et *Pa\_4\_7095*, sur le même brin que ce dernier (**Figure II.24**). Ainsi, ce gène, nommé *Pa\_4\_7097*, ne s'exprimerait que dans des cellules depuis longtemps entrées en phase stationnaire. Parce que son identification est toute récente, la délétion de *Pa\_4\_7097* est en cours et il n'apparaît pas dans les études phylogénétiques présentées ci-après. Le gène

*Pa\_4\_7097* étant situé sur le brin sens du cluster 2209S, la protéine produite pourrait donc être une protéine IDC régulant positivement la voie CG. De même, placé juste en amont du gène *Pa\_4\_7095* (à moins de 100 pb de son codon initiateur), *Pa\_4\_7097* pourrait interférer avec la transcription de *Pa\_4\_7095* et par exemple la favoriser, créant ainsi un effet PDC dans la souche *S*. De manière intéressante, ce gène *Pa\_4\_7097* est dépourvu de codon initiateur dans la souche *A406*, ce qui expliquerait l'absence de CG dans cette souche (Figure II.24). Il reste à déterminer si ce gène a un rôle dans CG et si l'absence de codon initiateur modifie son rôle dans la souche *A406*.

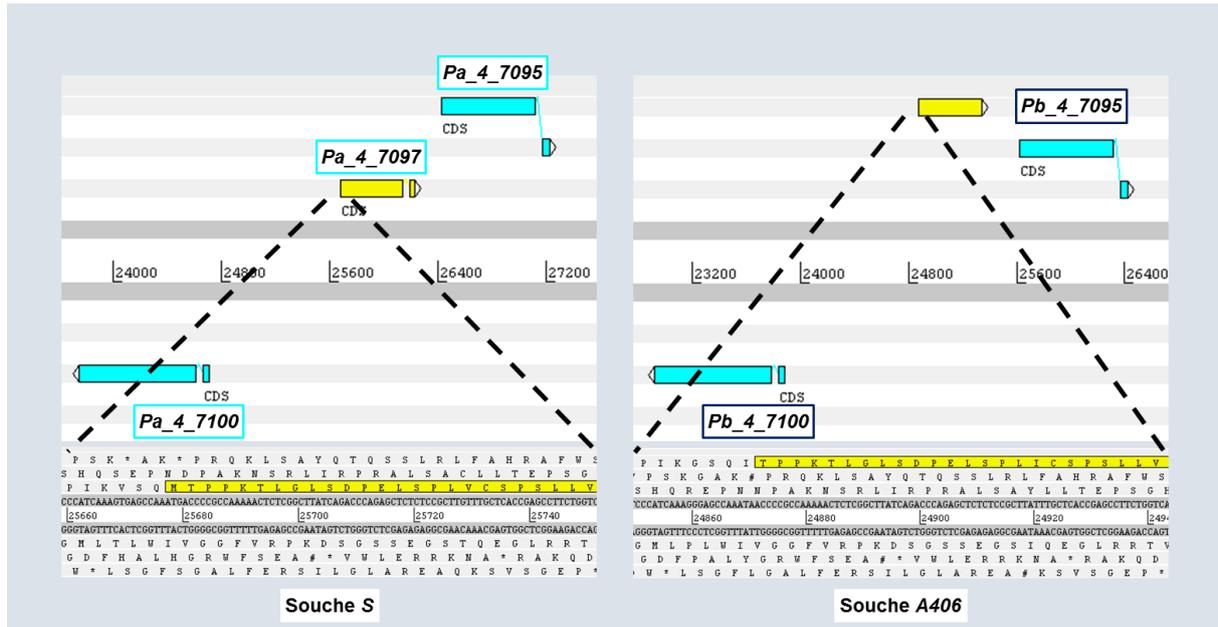
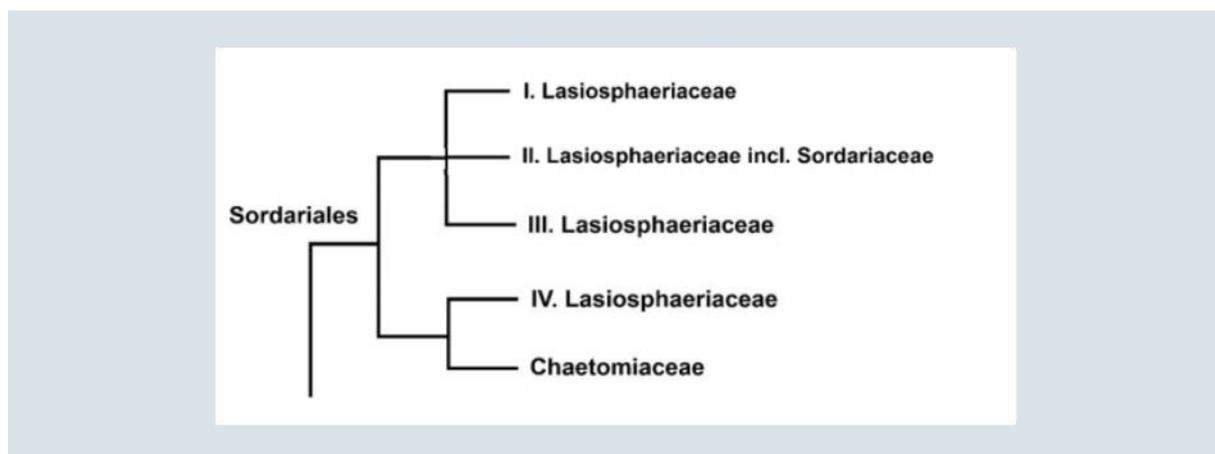


Figure II.24 : L'homologue du gène *Pa\_4\_7097* ne présente pas de codon initiateur dans la souche *A406*.

d. Traces du cluster 2209 chez les *Sordariales*

D’après l’étude des souches de *Podospora anserina sensus lato*, le cluster 2209 est une région fortement divergente. Cependant, ce cluster est localisé au même endroit au sein des génomes et bordé par des gènes dont les homologues sont aisément identifiables. Par conséquent, il est tout de même possible de rechercher des gènes homologues à ceux du cluster 2209 chez des champignons proches d’un point de vu phylogénétique de *P. anserina*. *P. anserina* fait partie de la famille des *Lasiosphaeriaceae* et de l’ordre des *Sordariales*. La famille des *Lasiosphaeriaceae* est en fait paraphylétique. Elle se subdivise en quatre lignées (dites clade I, II, III et IV), dont une est apparentée au *Chaetomiaceae* (le clade IV qui contient *P. anserina*) et une autre aux *Sordariaceae* (le clade II) (**Figure II.25**). Le cluster 2209 a été retrouvé chez une large fraction des *Sordariales* ainsi que chez les *Chaetosphaeriales*, l’ordre qui lui est le plus proche, mais pas chez les *Coniochaetales* qui est un peu plus éloigné, ni d’ailleurs chez aucun autre champignon (**Figure II.26**). L’analyse du cluster dans les différentes lignées apporte des informations intéressantes.



**Figure II.25 : Phylogénie des Sordariales.** D’après (Kruys and Wedin, 2009).

- Chez les autres *Lasiosphaeriaceae* de clade IV

Des versions diverses du cluster 2209 ont été identifiées chez des espèces proches de *P. anserina* telles que *Podospora setosa*, *Apiosordaria backusii*, *Arnimium arizonense* et *Cladorrhinum bulbillosum*. Chez ces champignons, le cluster 2209 est bordé d’un côté par les gènes homologues à *Pa\_4\_7080* et *Pa\_4\_7070*. A l’opposé, on retrouve les gènes homologues à *Pa\_4\_7120* et *Pa\_4\_7130* (pour *P. setosa*) ou les gènes homologues à *Pa\_4\_7170* et *Pa\_4\_7160* (pour *A. backusii*, *A. arizonense* et *C. bulbillosum*). De façon très intéressante, il est possible de différencier les clusters homologues au cluster 2209S de ceux homologues au cluster 2209T. Ainsi, *P. setosa* possède un cluster de type 2209S tandis que *A. arizonense* et *C. bulbillosum* présentent un cluster de type 2209T. En ce qui concerne *A. backusii*, il est étonnant d’observer la présence de deux clusters accolés : l’un de nature 2209T et l’autre de type 2209S.

Par ailleurs, on remarque qu'à l'exception de *P. bellae-mahoneyi*, dont le cluster est semblable à celui de la souche *S*, le gène *Pa\_4\_7088* ne paraît pas avoir d'homologue chez les *Lasiosphaeriaceae* de clade IV. Ce locus, dont la fonction n'a pas été déterminée, semble donc spécifique aux souches *S* et *P. bellae-mahoneyi*.

- Chez les *Chaetomiaceae*

Chez les *Chaetomiaceae*, le groupe le plus proche des *Lasiosphaeriaceae* de clade IV, un grand nombre d'espèces possédant au moins l'homologue d'un gène du cluster 2209 a été identifié. Les traces génétiques du cluster 2209 sont situées en aval des gènes homologues à *Pa\_4\_6420* et *Pa\_4\_6430*, et généralement en amont des homologues à *Pa\_4\_7070* et *Pa\_4\_7060*. Cependant, seuls *Madurella mycetomatis* et *Thielavia arenaria* présentent des clusters presque complets avec respectivement huit et six gènes du cluster 2209. On note chez *M. mycetomatis* l'inversion du gène homologue à *Pa\_4\_7090* ainsi que son déplacement entre les gènes homologues à *Pa\_4\_7102* et *Pa\_4\_7100*. *Achaetomium strumarium* et *Thielavia antarctica* quant à eux, possèdent quatre gènes du cluster 2209, deux gènes *PDC* (dont l'homologue à *Pa\_4\_7100*) et deux gènes *IDC*, tandis que *Thielavia hyrcaniae* et *Thielavia appendiculata* disposent d'un gène *PDC* (l'homologue à *Pa\_4\_7100*) et d'un gène *IDC* (l'homologue à *Pa\_4\_7095*). Concernant les autres *Chaetomiaceae* identifiés, ils possèdent un gène homologue à *Pa\_4\_7100* ou son pseudogène. Il semble donc qu'au cours de l'évolution des *Chaetomiaceae*, les gènes du cluster soient perdus. L'orthologue du gène *Pa\_4\_7100* qui régule négativement la boucle de régulation CG, semble donc être le dernier gène à disparaître après que le cluster 2209 eut subi de nombreux réarrangements. Cette règle comporte une exception : chez *Thielavia terrestris*, l'orthologue de *Pa\_4\_7100* a disparu alors que ceux de *Pa\_4\_7105* et *Pa\_4\_7102* sont toujours présents.

- Chez les *Sordariaceae*

Chez les *Sordariaceae*, les gènes encadrant le cluster 2209 ne sont pas très conservés. Par ailleurs, une grande partie des *Neurospora*, dont le génome séquencé est accessible, ne possède pas de traces du cluster 2209. C'est notamment le cas pour *N. crassa*, *N. tetrasperma*, *N. hispaniola*, *N. discreta* et *N. terricola*. On ne retrouve d'ailleurs que deux gènes du cluster au maximum chez les autres *Sordariaceae*: des homologues à *Pa\_4\_7095* et à *Pa\_4\_7100*. Il semble donc que chez cette famille, les gènes du cluster soient aussi perdus, et ceci de manière indépendante des *Chaetomiaceae*. Encore une fois, lorsqu'il ne reste qu'un gène (voire un pseudogène) du cluster, il s'agit de l'homologue à *Pa\_4\_7100*.

- Chez les *Lasiosphaeriaceae* de clade I

Le cluster 2209 paraît bien conservé au sein du groupe des *Lasiosphaeriaceae* de clade I. En effet, les espèces identifiées présentent toutes un cluster bordé par les gènes homologues à *Pa\_4\_8660* et homologues à *Pa\_4\_7080*. De plus, ces clusters sont tous composés de six gènes : les homologues à *Pa\_4\_7105*, *Pa\_4\_7102*, *Pa\_4\_7100*, *Pa\_4\_7095*, *Pa\_4\_7090* et *Pa\_4\_7086*, soit trois gènes *IDC* et trois gènes *PDC*.

- Chez les *Lasiosphaeriaceae* de clade II

Dans ce groupe des *Lasiosphaeriaceae* de clade II, seuls quatre génomes ont été séquencés et assemblés. *Cercophora scorteae*, *Podospora appendiculata*, *Bombardia bombardia* et *Apodospora peruviana* possèdent chacun un cluster identique à celui présenté par les *Lasiosphaeriaceae* de clade I.

- Chez les *Lasiosphaeriaceae* de clade III

Les *Lasiosphaeriaceae* de clade III comptent également peu de génomes disponibles. Chez *Podospora didyma*, *Lasiophaeria miniovina* et *Lasiosphaeria ovina*, les clusters de type 2209 identifiés sont relativement complet avec la présence de sept à huit gènes.

- Chez les *Chaetosphaeriales*

Dans le dernier groupe des *Sordariales*, le cluster 2209 a été identifié chez deux espèces : *Thozetella* sp. et *Chaetosphaeria innumera*. Chez ces deux champignons, le cluster se compose de gènes homologues à *Pa\_4\_7111*, *Pa\_4\_7109*, *Pa\_4\_7105* et *Pa\_4\_7102*. De façon étonnante, aucun gène homologue à *Pa\_4\_7100* n'a été retrouvé. Néanmoins, comme chez la très grande majorité des champignons présentant des traces du cluster, il existe un équilibre entre le nombre de gènes *IDC* et le nombre de gènes *PDC* : ici les *Chaetosphaeriales* disposent de deux gènes *IDC* et deux gènes *PDC*.

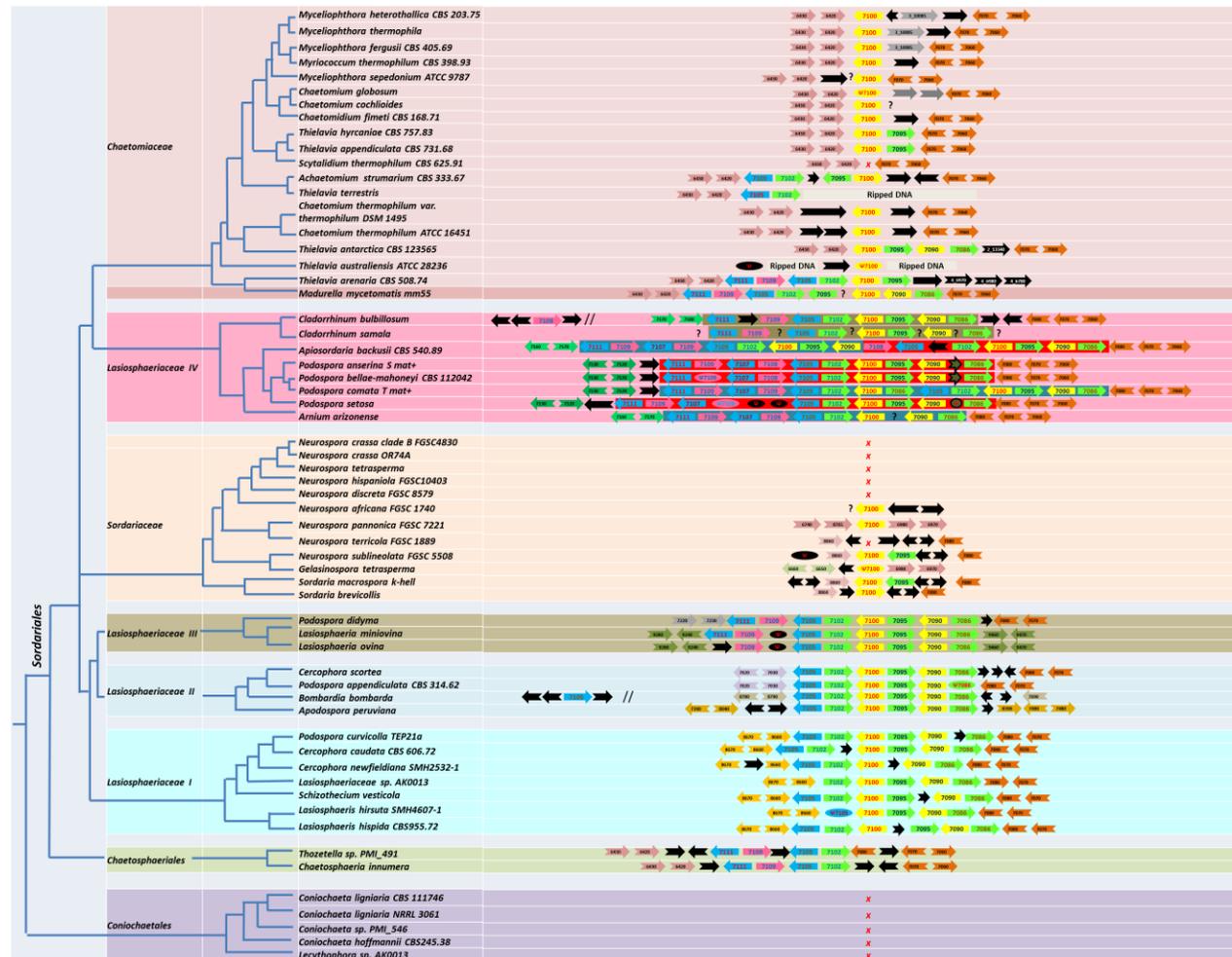
- Chez les autres champignons

Dans le groupe frère des *Sordariales* et des *Chaetosphaeriales*, les *Coniochaetales*, aucune espèce (dont le génome est disponible) ne semble posséder de cluster 2209. En outre, aucun des gènes du cluster 2209 n'a été identifié chez les champignons phylogénétiquement plus éloignés, à l'exception du gène *Pa\_4\_7111*, peut-être présent chez quelques *Hypocreales*. En effet, un motif situé dans la partie C-terminale des protéines codées par les gènes *Pa\_4\_7111* et *Pa\_4\_7107* est retrouvé chez certaines

espèces telles que *Fusarium oxysporum* ou *Fusarium verticillioides*. Ce très court motif (une trentaine de résidus dont moins de la moitié sont conservés entre *Sordariales* et *Hypocreales*) pourrait être apparu par évolution convergente ou avoir été transféré horizontalement.

- Phylogénie du cluster 2209 : conclusions

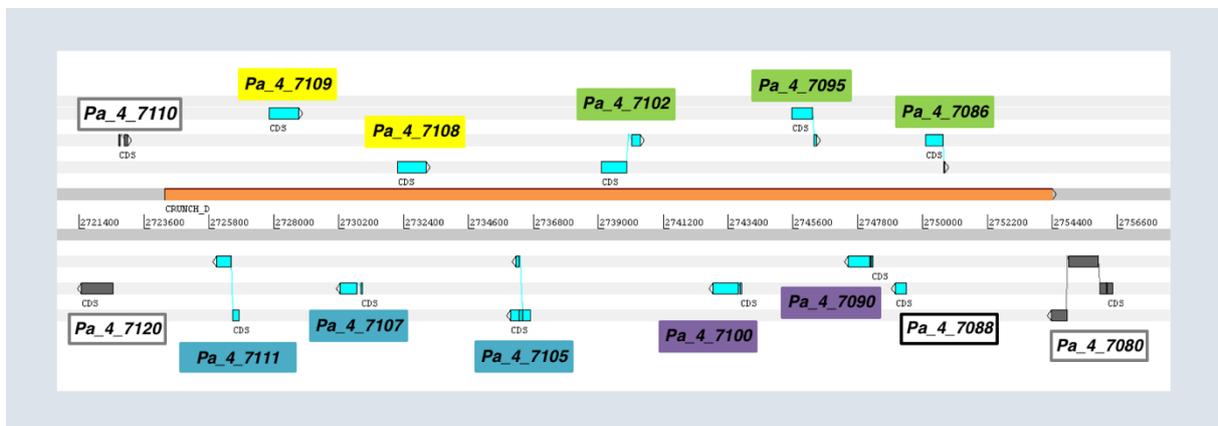
Le cluster 2209 semble donc spécifique aux *Sordariales* et aux *Chaetosphaeriales*. Néanmoins, le taux de divergence entre les protéines est tel qu'il n'est pas possible de s'assurer de l'absence d'homologues chez des espèces éloignées. Ainsi, il est difficile de déterminer le moment d'apparition de ce cluster. Cependant, il pourrait avoir joué un rôle important dans la survie des espèces puisqu'il s'est maintenu au cours de l'Évolution dans les groupes des *Sordariales* et des *Chaetosphaeriales*, dans lesquels la diversité est équivalente à celle des Chordés. De plus, de façon remarquable, il a généralement conservé la même synténie (à quelques exceptions près). La conservation du cluster à travers l'Évolution pourrait également s'expliquer par sa nature égoïste éventuelle. En effet, celui-ci pourrait favoriser sa propre transmission à l'image des « spores killers » (Grognet et al., 2014a). Quoi qu'il en soit, le cluster 2209 a été réarrangé de nombreuses fois avec plusieurs évènements de duplication et délétions différents en fonction des espèces. Par conséquent, il semblerait que ce cluster soit ou a été soumis à une pression de sélection particulière. Cela est particulièrement vrai chez les *Lasiosphaeriaceae* du clade IV, où la distribution des deux types de cluster (*S* et *T*) au sein des différentes espèces suggère une évolution complexe : soit le cluster a été amplifié puis a subi de multiples délétions, soit le cluster a été soumis à une sélection balancée des deux types de cluster suivie de « lineage sorting », c'est-à-dire d'une distribution d'un des deux types de cluster au moment d'évènements de spéciations. En plus de cette évolution complexe et encore mystérieuse, le très faible pourcentage de ressemblance des différentes protéines homologues, suggère une évolution accélérée (un exemple est donné **Figure A.4**). Afin de déterminer si cette évolution est soumise à une pression de sélection positive, des premières analyses ont été lancées mais ne se sont pas révélées concluantes. En effet, les essais de quantification des changements synonymes par rapport aux non synonymes ne sont pas probants du fait d'une trop grande divergence des séquences (c'est notamment le cas lors de comparaisons entre les différentes espèces), ou au contraire, du fait d'une trop grande ressemblance (c'est le cas de la comparaison entre les séquences des souches de *S* et de *A406*). Ce point reste donc à éclaircir.



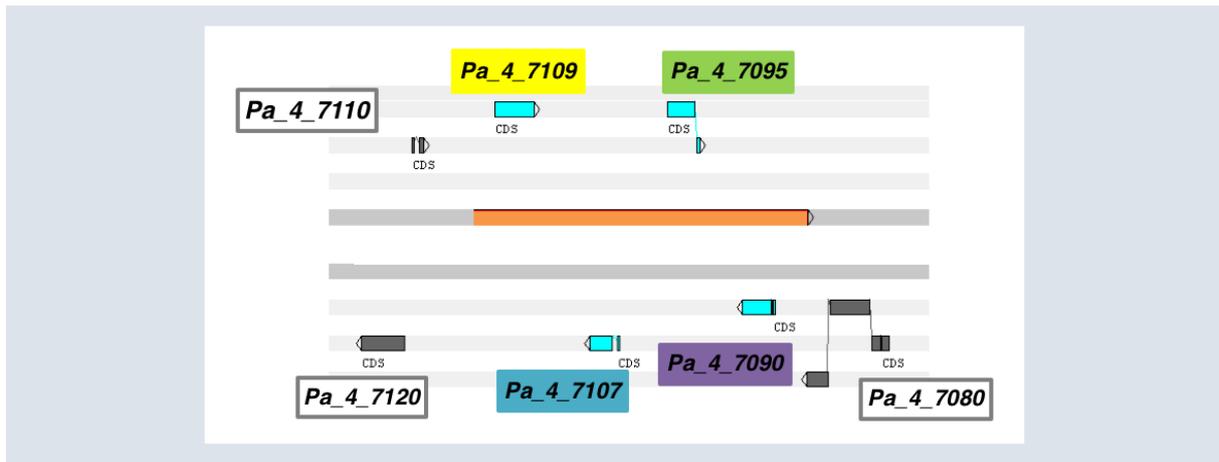
**Figure II.26 : Le cluster 2209 est présent chez les espèces de Sordariales et de Chaetosphaeriales.** Les gènes du cluster sont indiqués par des flèches. Les flèches à entaille représentent les gènes hors du cluster. Aucun gène du cluster n'a été identifié chez les espèces marquées d'une croix rouge.  $\phi$  indique les pseudogènes. La double barre oblique détermine une autre région du génome. Les flèches vert kaki bordées de noir représentent les orthologues de *Pa\_4\_7088*. Les flèches noires dépourvues de nom représentent des gènes non identifiés. Les points d'interrogation expriment un doute sur la présence éventuelle d'un gène.

e. Hypothèse d'un cluster 2209 ancestral

La détermination de ces nombreux gènes homologues aux gènes du cluster 2209 chez différents *Sordariales* a permis de construire des listes de données. Ces dernières se sont enrichies au fur et à mesure de l'identification de gènes homologues et ont ainsi permis de déterminer des gènes homologues dans des souches très divergentes de *P. anserina*. De surcroît, l'analyse plus fine de ces listes a révélé la nature surprenante de certains gènes du cluster. En effet, en comparant par exemple des gènes homologues à *Pa\_4\_7111* avec l'ensemble des homologues à *Pa\_4\_7107*, il s'est révélé que *Pa\_4\_7111* est une duplication du gène *Pa\_4\_7107* (**Figure A.5**). De la même manière, *Pa\_4\_7105* est issu de la duplication du gène *Pa\_4\_7107*. Pareillement, *Pa\_4\_7090* et *Pa\_4\_7100* sont paralogues entre eux, tout comme *Pa\_4\_7102*, *Pa\_4\_7095* et *Pa\_4\_7086*, ainsi que *Pa\_4\_7108* et *Pa\_4\_7109* (**Figure A.5** et **Figure II.27**). Par conséquent, l'organisation génétique particulière du cluster 2209S peut être expliquée par des événements de duplication et de délétions. Sous cette hypothèse, il aurait existé un cluster ancestral constitué de quatre gènes : *Pa\_4\_7109*, *Pa\_4\_7107*, *Pa\_4\_7095* et *Pa\_4\_7090* (**Figure II.28**). Ce cluster ancestral se serait dupliqué en son sein et aurait subi plusieurs délétions. Ainsi, les gènes *Pa\_4\_7109* et *Pa\_4\_7095*, tous deux *IDC* étant situés sur le même brin, leur duplication a engendré cinq gènes *IDC* localisés sur le même brin d'ADN. Et il en est de même pour les gènes *PDC* issus de la duplication de *Pa\_4\_7107* et *Pa\_4\_7090*.



**Figure II.27 : Mise en évidence des gènes paralogues dans le cluster 2209S.** Les gènes partageant la même couleur sont paralogues entre eux.

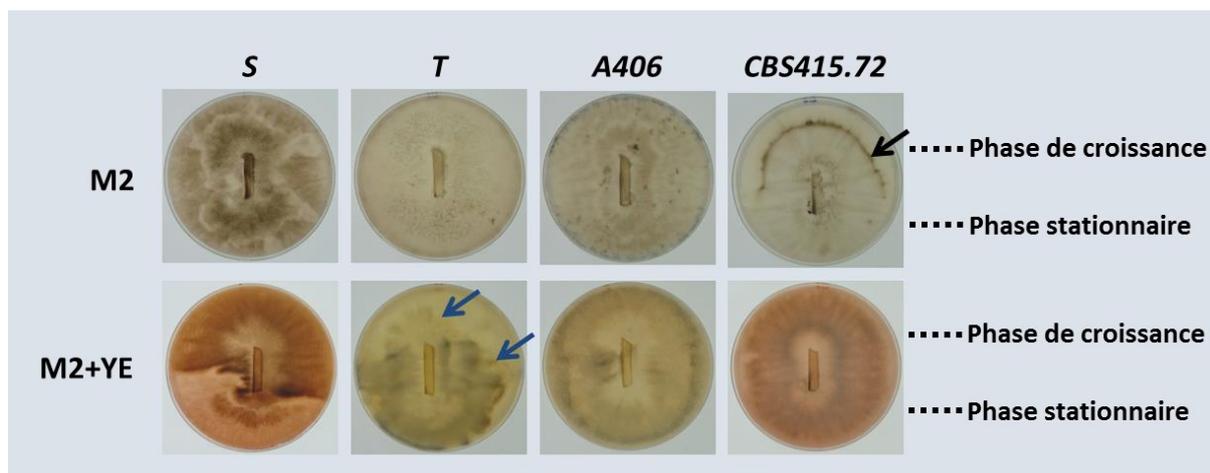


**Figure II.28 : Hypothèse d'un cluster 2209 ancestral.**

Un modèle simple est donc ici proposé permettant de rendre compte des effets des différents gènes du cluster 2209 dans *S* : les gènes IDC coderaient pour différentes versions d'un même duplex de protéines favorisant la rétroaction positive et les gènes PDC, pour différentes versions d'un duplex réprimant les duplex engendrés par les gènes IDC, à la manière d'un système toxine/antitoxine (les protéines IDC du cluster jouant le rôle de toxines, et les protéines PDC jouant le rôle d'antitoxines).

## 2. Etude du cluster 2209 dans différents contextes génétiques

Pour étudier plus finement le cluster 2209, quatre souches de *Podospora* ont été sélectionnées : la souche *S* (*P. anserina*), la souche *T* (*P. comata*), la souche *A406* (*P. bellae-mahoneyi*), et la souche *CBS415.72* (*P. pseudocomata*). Ces espèces ne sont pas phénotypiquement très différentes sur milieu standard. Seule la souche *CBS415.72* présente une longévité réduite par rapport aux autres souches choisies. Par ailleurs, comme il a été vu précédemment, les souches *T*, *A406* et *CBS415.72* ne présentent pas CG que ce soit sur M2 ou M2+YE (**Figure II.29**). On note cependant que la souche *T* est sujette à un autre phénomène de dégénérescence connue au laboratoire sous le nom de « Vauban », et s'exprimant sur le milieu M2+YE.

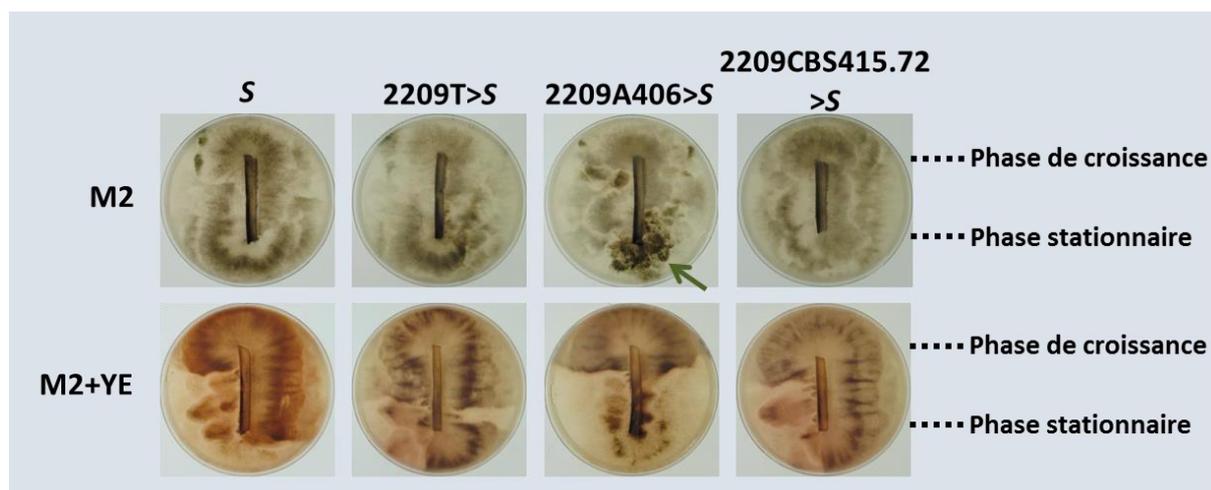


**Figure II.29 :** Test CG des souches *S*, *T*, *A406*, et *CBS415.72*. La flèche noire montre la barre de senescence développée par la souche *CBS415.72*. Les flèches bleues indiquent la dégénérescence de type Vauban sur la souche *T* sur M2+YE.

a. Introgression du cluster 2209 des souches *T*, *A406* et *CBS415.72* dans la souche *S*

D'après les observations précédentes, il semblerait que le cluster 2209S soit l'un des, voire le « master locus » responsable de CG. Pour confirmer ce point, une succession de croisements a été mise en œuvre afin d'insérer le cluster 2209 de chacune des souches *T*, *A406* et *CBS415.72* dans la souche *S* à la place du cluster 2209S. Pour cela, le mutant  $\Delta 86-11$  (portant le marqueur de résistance à l'hygromycine B) est croisé avec chacune de ces souches. Dans la descendance, les spores sensibles à l'hygromycine B sont sélectionnées pour de nouveau être croisées avec la souche  $\Delta 86-11$ . Le même processus est appliqué aux spores de chaque nouvelle génération. Ainsi, on admet qu'après dix générations, l'ensemble du génome provient de la souche *S*, à l'exception de la région génomique liée au cluster 2209 issue des souches *T*, *A406* ou *CBS415.72*. On obtient donc les souches 2209T>*S*, 2209A406>*S* et 2209CBS415.72>*S* qui sont soumises à un test CG (**Figure II.30**). La souche *S* possédant le cluster 2209 de la souche *T*, *A406*, ou de la souche *CBS415.72*, présente des secteurs CG réduits (*T* et *CBS415.72*) ou accrus (*A406*) par rapport au témoin. Ainsi, il semblerait qu'un acteur supplémentaire serait présent dans la souche *S*. En l'absence de cluster 2209, la présence de cet autre élément ne serait pas suffisante pour produire l'élément *C*. En revanche, en présence des clusters issus des souches *T* ou *CBS415.72*, des secteurs se développent mais à moindre fréquence. Concernant la présence du cluster 2209 version *A406* dans *S*, on peut remarquer la présence de secteur CG sur M2, et l'amplification de la dégénérescence sur M2+YE, en comparaison avec la souche *S*. Par conséquent, le cluster 2209A406 serait plus actif dans la souche *S* et aurait donc un impact plus important que le cluster

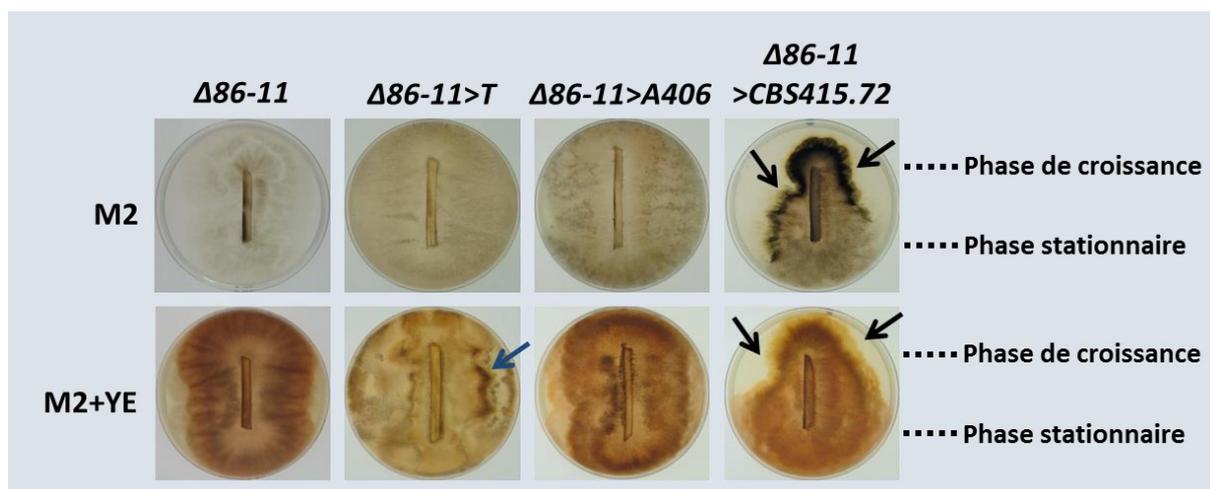
2209S. Il posséderait donc un activateur interne. De ce fait, la souche *A406* ne posséderait pas l'élément activateur externe du cluster 2209. Il a été vu précédemment que la principale différence observée entre les clusters 2209S et 2209A406 concernait le gène *Pa\_4\_7097*. La protéine issue de ce gène nouvellement identifié est supposée être une protéine IDC régulant positivement CG (via peut-être une augmentation de l'expression du gène voisin *Pa\_4\_7095*). En conséquence, le gène *Pa\_4\_7097* pourrait constituer un élément activateur interne du cluster 2209.



**Figure II.30 :** Test CG des souches 2209T>S, 2209A406>S et 2209CBS415.72>S. La flèche verte montre un secteur CG sur M2.

b. Introgression du cluster 2209S dans les souches *T*, *A406* et *CBS415.72*

Afin de déterminer d'autres acteurs potentiels régulant CG, l'insertion du cluster 2209S dans les souches *T*, *A406* et *CBS415.72* est mise en œuvre. Cependant, du fait de l'absence de marqueur de sélection permettant de suivre le cluster au cours des générations, une première introgression de la délétion  $\Delta 86-11$  (portant le marqueur de résistance à l'hygromycine B) est réalisée dans ces trois souches. Pour cela, un premier croisement est effectué entre le mutant  $\Delta 86-11$  et *T*, *A406* ou *CBS415.72*. Dans la descendance obtenue, les spores portant le marqueur de sélection sont retenues pour de nouveau être croisées avec les souches *T*, *A406* ou *CBS415.72*, et ce jusqu'à obtenir une dixième génération. A ce stade, l'ensemble du génome provient des souches *T*, *A406* ou *CBS415.72*, à l'exception de la région génomique liée au marqueur de résistance à l'hygromycine B issue de la souche  $\Delta 86-11$ . Comme attendu, les mutants ainsi construits, nommés  $\Delta 86-11>T$ ,  $\Delta 86-11>A406$  et  $\Delta 86-11>CBS415.72$ , ne diffèrent pas des souches *T*, *A406* ou *CBS415.72* (**Figure II.31**).



**Figure II.31 : Test CG des mutants issus de l'introgession de la délétion  $\Delta 86-11$  dans les souches  $T$  ( $\Delta 86-11>T$ ),  $A406$  ( $\Delta 86-11>A406$ ) et  $CBS415.72$  ( $\Delta 86-11>CBS415.72$ ). Les flèches noires désignent le phénomène de sénescence, et la flèche bleue montre le phénotype « Vauban ».**

Actuellement, une deuxième succession de croisements est conduite à partir de ces constructions pour insérer le cluster 2209S dans les souches  $T$ ,  $A406$  ou  $CBS415.72$ . Pour ce faire, les croisements sont réalisés entre  $\Delta 86-11>T$ ,  $\Delta 86-11>A406$  ou  $\Delta 86-11>CBS415.72$ , et la souche  $S$ . A chaque génération, les spores ayant intégré le cluster 2209S ne possèdent plus la délétion  $\Delta 86-11$  et sont donc sensibles à l'hygromycine B. Ainsi, ces spores sont sélectionnées pour être de nouveau croisées avec les souches  $\Delta 86-11>T$ ,  $\Delta 86-11>A406$  ou  $\Delta 86-11>CBS415.72$ , et ce jusqu'à la dixième introgession.

### c. Conclusions

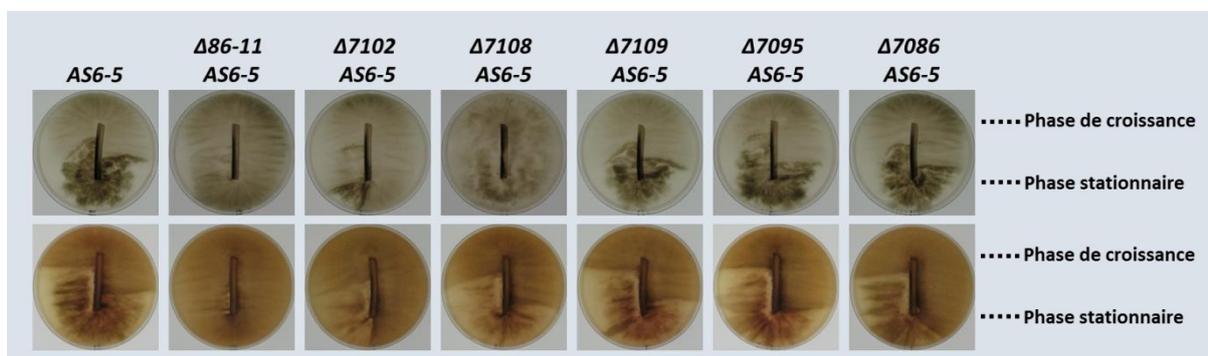
Le cluster 2209 est en cours d'être analysé dans différents contextes génétiques. Par introgession, il a été possible à présent, d'insérer le cluster 2209 version  $T$ ,  $A406$  et  $CBS415.72$  dans la souche  $S$ . Ces premières constructions ont montré que le cluster 2209 n'était pas le seul élément responsable de CG. Ainsi, au moins deux autres acteurs se sont distingués. Le premier absent des souches  $T$  et  $CBS415.72$ , est présent dans  $S$  et augmenterait la fréquence d'apparition de l'élément  $C$ . Le deuxième est un élément supplémentaire dans le cluster de la souche  $A406$  qui agirait en synergie avec le fond génétique de la souche  $S$ . En particulier, l'absence du gène  $Pa\_4\_7097$  (par défaut de codon initiateur) serait un candidat intéressant pour le facteur interne au cluster.

### III. ORGANISATION DES GENES *IDC* ET *PDC* DANS LA VOIE CG

La dégénérescence CG est le reflet de la mauvaise mise en place de la phase stationnaire contrôlée par la voie PaMpk1. Au cours des travaux actuels et passés, de nombreux acteurs de cette voie ont été identifiés. Pour déterminer les interactions entre ces différentes protéines et pour pouvoir ordonner cette voie de signalisation, des analyses d'épistasie sont mises en œuvre. Ces dernières consistent en l'étude de doubles mutants et de leur phénotype. Dans le cas d'une voie simple linéaire, le double mutant affecté à la fois dans une protéine activatrice et une protéine inhibitrice exprime le phénotype du simple mutant dont la protéine mutée agit en aval dans la voie d'activation. De cette manière, si l'activateur est en aval au sein de la voie, le double mutant développe le phénotype issu de l'inactivation de la voie. Au contraire, si l'inhibiteur est en aval dans la voie de signalisation, le double mutant présente un phénotype résultant de l'activation de la voie. Dans le cadre de la voie CG, des doubles mutants *IDC PDC* ont été construits. Un phénotype IDC de ces doubles mutants révèle que le gène *IDC* produit une protéine agissant en aval. De même, un phénotype PDC de ces doubles mutants indique que la protéine issue du gène *PDC* agit en aval. Cependant, la présence d'une boucle d'autorégulation positive ainsi que la présence probable de branches dans la voie peuvent venir perturber les interprétations.

#### 1. Association des mutations *IDC* du cluster 2209 avec la mutation *AS6-5*

Le mutant *AS6-5*, dans lequel la fidélité de traduction est augmentée, est le mutant *PDC* dans lequel a été découvert le phénomène CG. Les travaux précédemment exposés ont mis en évidence les acteurs constituant la boucle d'auto-activation de la voie CG. Afin de mieux appréhender le rôle de chacun des gènes *IDC* du cluster 2209, les mutants *IDC* correspondant ont été associés à la mutation *AS6-5*. S'en est suivi un test CG pour déterminer la présence de cette dégénérescence (**Figure II.32**).

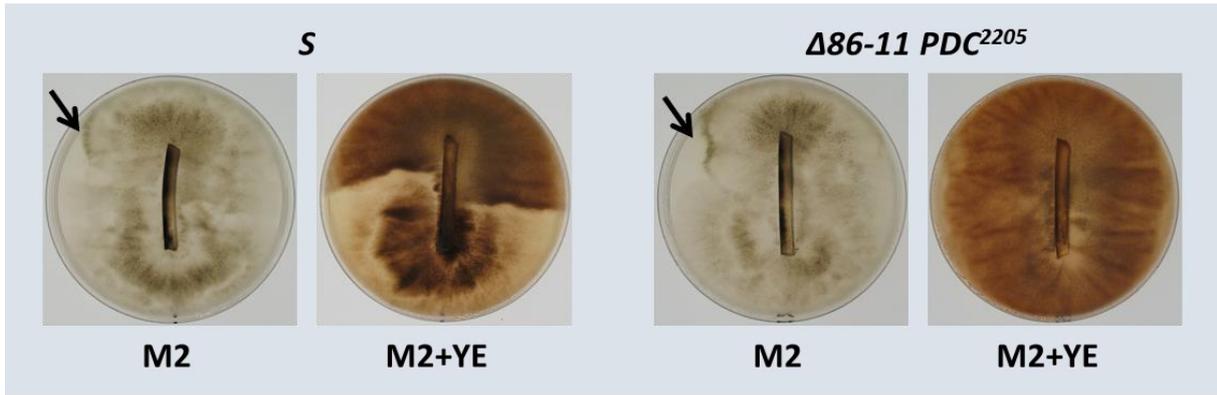


**Figure II.32 :** Test CG des doubles mutants  $\Delta 86-11$  *AS6-5*,  $\Delta 7102$  *AS6-5*,  $\Delta 7108$  *AS6-5*,  $\Delta 7109$  *AS6-5*,  $\Delta 7095$  *AS6-5* et  $\Delta 7086$  *AS6-5*.

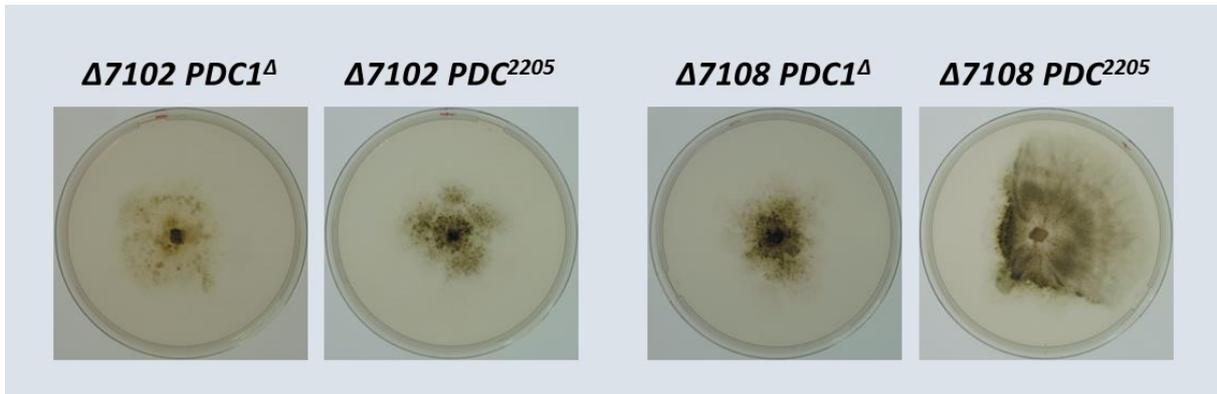
D'après ces résultats, la délétion du cluster entier ( $\Delta 86-11$ ) ne permet plus à la mutation *AS6-5* de provoquer CG, confirmant que le cluster 2209 est l'élément régulateur majeur de la voie CG. En revanche, l'association de la délétion  $\Delta 7108$  (*IDC fort*) avec la mutation *AS6-5* n'inhibe pas le développement de CG sur M2+YE. Il existe donc au moins un autre acteur nécessaire, en plus du produit du gène *Pa\_4\_7108*, pour constituer la boucle d'activation. En outre, le second mutant *IDC fort*,  $\Delta 7102$ , combiné à *AS6-5*, développe aussi CG sur M2+YE, mais également un petit secteur CG issu de la phase stationnaire sur M2. La délétion de *Pa\_4\_7102* permet donc de réduire partiellement CG provoqué par *AS6-5*. Encore une fois, le produit de ce gène joue un rôle important mais n'est pas suffisante pour activer pleinement la boucle d'activation. Ces résultats sont en accord avec le modèle toxine/antitoxine proposé précédemment. En effet, le cluster 2209S présenterait deux copies de ce système, et la délétion de l'une des deux serait insuffisante pour abolir CG. Pour ce faire, il faudrait inactiver simultanément les deux complexes indépendants toxine/antitoxine. Les doubles mutants  $\Delta 7109$  *AS6-5*,  $\Delta 7095$  *AS6-5* et  $\Delta 7086$  *AS6-5*, quant à eux, ne présentent pas de différences significatives avec la souche *AS6-5*. Cela confirme le rôle plus réduit des produits des gènes *Pa\_4\_7109*, *Pa\_4\_7095* et *Pa\_4\_7086* dans la boucle d'activation.

## 2. Association des mutations *IDC* du cluster 2209 avec des mutations de *PDC1*

Dans un premier temps, la délétion du cluster entier a été associée avec la mutation *PDC*<sup>2205</sup> pour former le double mutant  $\Delta 86-11$  *PDC*<sup>2205</sup>. Ce dernier se comporte comme le simple mutant  $\Delta 86-11$  (**Figure II.33**). Ceci confirme que le cluster 2209 est l'acteur majeur de la régulation de CG. La délétion de *PDC1* ou la mutation *PDC*<sup>2205</sup> ont également été associées au mutant *IDC fort*  $\Delta 7102$ . Les doubles mutants ainsi obtenus,  $\Delta 7102$  *PDC*<sup>2205</sup> et  $\Delta 7102$  *PDC1*<sup>Δ</sup>, présentent le même phénotype identique à celui du simple mutant *PDC1*<sup>Δ</sup> ou *PDC*<sup>2205</sup> (**Figure II.34**). Des constructions similaires ont été réalisées avec le deuxième mutant *IDC fort*  $\Delta 7108$ . Et de manière identique, les mutants  $\Delta 7108$  *PDC1*<sup>Δ</sup> et  $\Delta 7108$  *PDC*<sup>2205</sup> développent un phénotype semblable à celui du simple mutant *PDC1*<sup>Δ</sup> ou *PDC*<sup>2205</sup> (**Figure II.34**). Ces observations confirment la présence de deux acteurs indépendants au sein du cluster 2209S.



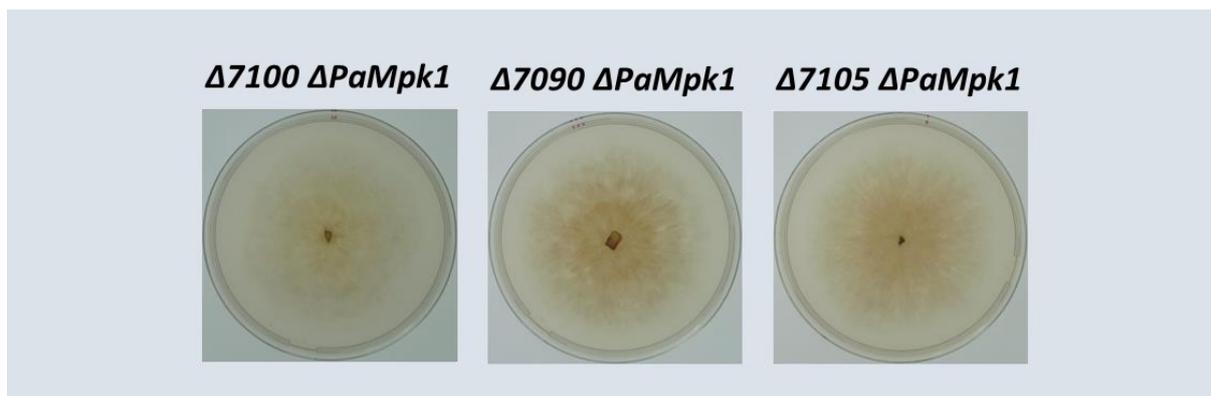
**Figure II.33 :** Le double mutant  $\Delta 86-11 PDC^{2205}$  se conduit comme la souche IDC  $\Delta 86-11$ . Les flèches noires montrent le phénomène de sénescence.



**Figure II.34 :** Les doubles mutants  $\Delta 7102 PDC^{2205}$  et  $\Delta 7102 PDC1^{\Delta}$ , et  $\Delta 7108 PDC1^{\Delta}$  et  $\Delta 7108 PDC^{2205}$  présentent des phénotypes de types *PDC* fort identiques à celui des mutants  $PDC1^{\Delta}$  et  $PDC^{2205}$ .

### 3. Association des mutations *PDC* du cluster 2209 avec $\Delta PaMpk1$

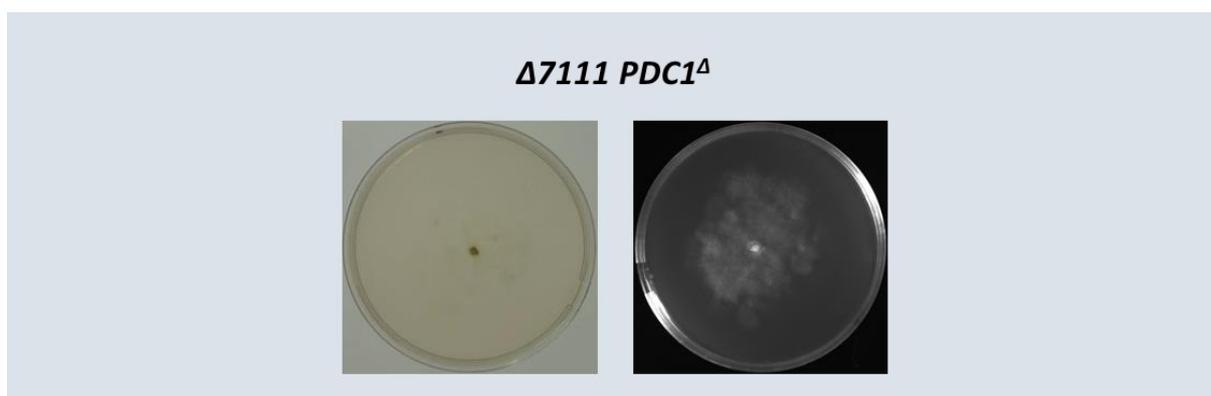
Dans un second temps, ce sont les mutants *PDC* constitutifs,  $\Delta 7100$  et  $\Delta 7090$  qui ont été associés au mutant. En effet, selon le modèle proposé, PaMpk1 est cruciale pour le développement de CG. Par conséquent, il est attendu que les doubles mutants *PDC*  $\Delta PaMpk1$  présentent un phénotype IDC. Et de fait,  $\Delta 7100 \Delta PaMpk1$  et  $\Delta 7090 \Delta PaMpk1$  présentent un phénotype identique à celui du simple mutant  $\Delta PaMpk1$  (**Figure II.35**). De la même manière, le double mutant  $\Delta 7105 \Delta PaMpk1$  développe aussi un phénotype  $\Delta PaMpk1$  (**Figure II.35**). Ces observations viennent confirmer le modèle selon lequel ces protéines *PDC* agissent en amont de la voie PaMpk1.



**Figure II.35 :** Les doubles mutants  $\Delta 7100 \Delta PaMpk1$ ,  $\Delta 7090 \Delta PaMpk1$  et  $\Delta 7105 \Delta PaMpk1$  présentent un mycélium rose et plat, semblable au phénotype du mutant  $\Delta PaMpk1$ .

#### 4. Analyse du double mutant $\Delta 7111 PDC1^{\Delta}$

Enfin, le double mutant  $\Delta 7111 PDC1^{\Delta}$  a été construit dans le but de vérifier si  $PDC1$  agit dans une voie parallèle ou dans la même voie que les protéines issues du cluster 2209S. Si la protéine engendrée par  $Pa\_4\_7111$  et  $PDC1$  agissent dans la même voie, le phénotype attendu du double mutant devrait être identique à  $\Delta 7111$  ou à  $PDC1^{\Delta}$ . En revanche, si ces deux acteurs agissent dans des voies parallèles, le double mutant obtenu devrait développer un CG plus fort, cumul des effets de  $\Delta 7111$  et de  $PDC1^{\Delta}$ . Il s'avère que  $\Delta 7111 PDC1^{\Delta}$  présente un CG très fort et peu pigmenté (**Figure II.36**). Il semble donc que ces deux protéines agissent en parallèle. Cependant, les autres doubles mutants  $PDC PDC1^{\Delta}$  ne sont pas encore disponibles, laissant donc en suspens la question de savoir si  $PDC1$  agit réellement en parallèle des éléments du cluster 2209.



**Figure II.36 :** Le double mutant  $\Delta 7111 PDC1^{\Delta}$  présente un phénotype CG fort.

L'association des mutants du cluster 2209 avec d'autres mutants IDC et PDC connus (et situés à l'extérieur du cluster) sont en cours pour confirmer la place de chacun dans la voie CG. Cependant,

l'obtention de doubles mutants se révèle parfois délicate du fait de la stérilité femelle présentée parfois par les deux souches parentales.

L'ensemble des résultats présenté jusqu'alors confirme le modèle proposé dans lequel l'autorégulation de la voie PaMpk1 serait l'élément essentiel de la voie CG. Cette autorégulation serait contrôlée de manière complexe par deux systèmes, ou « sous-clusters », chacun composé de deux protéines codées par les gènes *IDC* agissant sur la régulation positive de la boucle, et de deux protéines engendrées par les gènes *PDC* la réprimant. A cela, vient s'ajouter *PDC1* qui pourrait agir en tant que membre d'au moins un des complexes. Quant aux autres protéines *IDC* connues et pour lesquels la construction de doubles mutants est en cours, elles sont impliquées dans la régulation de PaMpk1 par la phase stationnaire. Elles agissent probablement en réprimant *PDC1* et les protéines issues des gènes du cluster 2209S.

## 5. Interactions au sein du cluster : perspectives

La distance entre les différents gènes du cluster 2209 étant très réduite, la fréquence de recombinaison entre eux est nulle et il n'est donc pas possible d'obtenir de doubles mutants par simples croisements. Ainsi, pour construire des doubles mutants au sein du cluster, il est nécessaire d'insérer une cassette de délétion dans une souche déjà dépourvue d'un des gènes du cluster et également porteur de la mutation  $\Delta mus51$  (réduisant la fréquence de recombinaison non homologue). Les études en cours portent sur la construction de doubles mutants associant *PDC* constitutifs,  $\Delta 7100$  ou  $\Delta 7090$ , avec *IDC* forts,  $\Delta 7102$  ou  $\Delta 7108$ . Le phénotype des souches ainsi obtenues,  $\Delta 7100\Delta 7102$ ,  $\Delta 7100\Delta 7108$ ,  $\Delta 7090\Delta 7102$  et  $\Delta 7090\Delta 7108$ , devrait apporter des réponses quant aux interactions entre les protéines *PDC* et *IDC* dans l'hypothèse d'un système toxine / antitoxine. Si la double délétion touche un couple toxine / antitoxine, il est attendu à ce que le double mutant présente un phénotype similaire à celui de la souche *S*. En revanche si la double délétion supprime une toxine et une antitoxine non associées, il est supposé que le double mutant développe CG comme un mutant *PDC*. Afin de reconstituer les deux complexes prédits, il est entrepris d'associer les transgènes utilisés pour la complémentation.

## CONCLUSION - DISCUSSION

Les mécanismes de régulation épigénétique sont des processus efficaces permettant aux organismes de s'adapter rapidement à leur environnement. En agissant sur trois niveaux (conformation de l'ADN, machinerie RNAi et régulation protéique), ils permettent de moduler l'expression des gènes et la réponse à un signal à différents degrés. Chez le champignon filamentueux modèle, *P. anserina*, plusieurs mécanismes épigénétiques ont été mis en évidence ces dernières décennies. Ainsi, les phénomènes de sénescence, de dégénérescence de forme Wavy, et d'incompatibilité végétative de type Het-S/s ont été identifiés chez ce microorganisme eucaryote. En particulier, le prion pHet-s responsable d'une incompatibilité végétative reste aujourd'hui l'un des prions les mieux caractérisés. Cependant, les autres phénomènes cités sont bien moins connus. En effet, bien qu'il existe une large littérature (couvrant une période de plus de 65 ans) sur la sénescence, le déterminant cytoplasmique et infectieux de la sénescence reste encore indéterminé. Depuis les premières analyses (Sainsard-Chanet et al., 1994), l'implication de la mitochondrie a été mise en évidence, mais le rôle des modifications mitochondriales dans la formation du déterminant reste à éclaircir (Jamet-Viorny et al., 1999). Concernant la dégénérescence Wavy, les études réalisées jusqu'à présent (Grognet, 2013; Lalucque and Silar, 2004) n'ont pas non plus permis de proposer un modèle permettant d'illustrer ce phénomène. Ce n'est pas le cas de la dégénérescence Crippled Growth pour laquelle un modèle fondé sur un comportement « prion-like » a été proposé. CG est un phénomène artificiel observé en laboratoire par la culture de la souche sauvage *S* sur M2+YE. Pour étudier ce processus très particulier induit par une mauvaise mise en place de la phase stationnaire, de nombreux mutants *IDC* et *PDC* ont été isolés au laboratoire. Les premiers ont été largement étudiés et ont permis de dessiner un modèle au sein duquel la voie PaMpk1 et sa boucle d'activation jouent le rôle principal. Les travaux de thèse présentés ci-dessus sont venus enrichir ce modèle par l'étude de deux mutants *PDC* d'une part, et d'autre part, par la première analyse phylogénétique réalisée sur ce phénomène.

Tout d'abord, l'analyse du mutant *PDC*<sup>2205</sup> a mené à la caractérisation de la protéine PDC1, première protéine identifiée comme régulant négativement la voie CG. Les études d'interactions épistatiques entre PDC1 et les autres protéines IDC connues permettent de la placer au niveau de la boucle de régulation positive de PaMpk1. Ainsi, la protéine PDC1 se situerait à ce niveau pour réprimer la boucle et entraver l'auto-activation de PaMpk1 dans les hyphes en phase de croissance d'une souche au développement normal sur milieu standard M2. Dans ces conditions, la phase stationnaire signaliserait *via* la NADPH oxydase PaNox1 et les protéines annexes (IDC1, IDC2, IDC3, PaWhi2, PaPsr1 et PaSo) la levée de la répression exercée par PDC1 et par conséquent, l'activation de la voie. Néanmoins, l'absence de PDC1 ne permet pas une induction constitutive de CG, suggérant qu'il existe d'autres acteurs impliqués dans la répression/activation de la boucle. Pour cela, les protéines codées par le cluster 2209S identifié grâce à l'étude du mutant *PDC*<sup>2209</sup>, offrent de bons candidats. Cependant, ils

ne sont probablement pas les seuls. En effet, le gène affecté dans le mutant *PDC*<sup>2208</sup> (**Figure II.1**) pourrait également être à l'origine d'un des constituants du système de répression/activation. L'hypothèse la plus envisageable porte sur l'existence d'un complexe multiprotéique dont PDC1 serait l'un des composants. Les éventuelles interactions de PDC1 avec d'autres protéines (notamment les protéines IDC) seront probablement observées lors de possibles futures analyses biochimiques pour confirmer ce modèle. D'un point de vue évolutif, PDC1 est conservé chez tous les ascomycètes filamenteux (*Pezizomycotina*). Pour déterminer son rôle chez une espèce éloignée, il a été entrepris l'inactivation du gène orthologue à *PDC1* chez *Fusarium graminearum*. Malheureusement, l'insertion d'une cassette de délétion chez ce champignon n'a pas abouti. La question de la conservation de la fonction de la protéine codée par ce gène en tant que répresseur de la voie MAPK est donc toujours en suspens.

L'étude du mutant *PDC*<sup>2209</sup> a permis la découverte du cluster 2209 dont l'implication dans le contrôle de CG est complexe et multifactorielle. Ce dernier, composé de onze gènes dont dix sont impliqués dans la voie CG, est l'un des éléments régulateurs majeurs de cette dégénérescence. Il présente à la fois les gènes *IDC* codant pour les constituants de la boucle d'activation de PaMpk1 et des gènes *PDC* exprimant des inhibiteurs de cette boucle (**Figure II.17**). L'analyse phylogénétique couplée à la comparaison des différentes protéines codées par le cluster suggèrent un système ancestral de type toxine/antitoxine, à quatre composants. Il serait constitué de deux protéines nécessaires à la formation de la toxine et dont le rôle est d'activer la boucle de rétroaction positive, ainsi que de deux protéines nécessaires à la fabrication de l'antitoxine venant réprimer la boucle. Par ailleurs, le cluster 2209S présenterait au moins deux complexes indépendants toxines/antitoxines. Ceci est confirmé par l'analyse des doubles mutants construits par l'association des mutations *IDC* du cluster avec les mutations *AS6-5* et *PDC1*. Ainsi la présence d'une double boucle de rétroaction positive rend compte de la stabilité de CG et de sa capacité à se transmettre au cours des générations mitotiques. De manière intéressante, la délétion des gènes *Pa\_4\_7100* et *Pa\_4\_7090* engendre un CG constitutif, suggérant que la voie MAPK est toujours active dans ces souches. L'activation de la voie se ferait de façon constitutive à travers les deux complexes indépendants formés par les protéines codées par les gènes *IDC*. En conséquence, les deux complexes composés des protéines codées par les gènes *PDC* procéderaient simplement à la répression de celles issues des gènes *IDC*.

Les souches *T*, *CBS415.72* et *A406*, possèdent leur propre version du cluster 2209. Leur analyse dans leur contexte génétique naturel ainsi que dans le contexte génétique *S*, révèle l'existence de facteurs génétiques, internes et externes au cluster, modulant la voie CG. De fait, le développement de CG est très limité lorsque le cluster 2209T se trouve dans un contexte génétique *S*. La grande divergence des protéines codées par ce cluster par rapport au cluster 2209S, permet d'expliquer leur inefficacité. Par ailleurs, l'absence complète de développement de CG dans la souche *T* s'explique par la présence d'un autre facteur modulant CG dans cette souche. C'est pourquoi, il est supposé que la souche *T* possède un élément répresseur ou ne dispose pas d'un facteur activateur. La protéine PDC1 est une candidate pour

remplir cette fonction. Toutefois, la comparaison entre les deux protéines orthologues des souches *S* et *T* montre une grande conservation de séquence, incluant les six acides aminés conservés et essentiels à l'activité de PDC1 (**Figure C.1**). La délétion de l'orthologue à *PDC1* dans la souche *T* a été entreprise dans le but de différencier les deux modèles (répresseur ou activateur de la voie CG). Malheureusement, parce que la souche *T* est plus difficile à manipuler génétiquement que la souche *S*, cette délétion s'est révélée sans succès.



**Figure C.1 : PDC1 et son orthologue présent dans la souche *T* sont similaires.** La séquence protéique de PDC1 est en bleu, celle de son orthologue dans la souche *T* est en vert. Les résidus conservés sont en rouge. Les étoiles indiquent les différences entre les deux protéines.

L'absence de séquence génomique de la souche *CBS475.72* ne permet pas de conclure quant au déterminant génétique interne au cluster 2209 qui diminuerait le développement de CG. En revanche, le génome de la souche *A406* est disponible. Cela a permis d'établir une corrélation entre l'augmentation de CG dans la souche *S* introgressée avec le cluster 2209A406 avec la présence d'une mutation dans une séquence codante nouvellement identifiée. De plus, tout comme *CBS475.72* et *T*, cette souche n'est pas capable de présenter CG. Il existe donc un élément externe au cluster et de nature inconnue ayant pour effet d'abolir CG dans ces souches. Ce facteur, commun aux trois souches ou non, peut consister en un répresseur ou être le reflet de l'absence d'un activateur. Pour discerner ces deux hypothèses, plusieurs analyses ont été engagées par Philippe Silar. La première consiste en l'introgession du cluster 2209S dans chacune des souches *T*, *A406* et *CBS475.72*, ceci afin de vérifier que ce cluster n'est pas responsable de CG par lui-même dans chacun de ces trois fonds génétiques. La seconde réside en l'introgession de ce facteur externe au cluster dans le contexte génétique *S*. Pour cela, le défaut de développement de CG en présence du cluster 2209S est suivi au cours des générations. Et effectivement,

les premiers croisements analysés suggèrent qu’il existerait un élément qui ségrège 2:2. Un locus serait donc responsable de l’absence de CG dans chacune des trois souches.

Le rôle particulier et inhabituel de ce cluster est soutenu par l’analyse de son évolution. En effet, ce cluster semble présenter une évolution rapide comme le montre (1) le faible taux de ressemblance entre les gènes orthologues d’espèces proches, (2) l’apparition et la disparition de gènes sans orthologue chez les autres champignons, à l’image de *Pa\_4\_7088*, (3) la disparition ou l’émergence de pseudogènes dérivés des gènes du cluster, en particulier sa disparition complète chez les *Neurospora*. De manière intéressante, *Pa\_4\_7100*, codant très probablement une antitoxine importante, semble être le plus souvent le dernier gène à disparaître. Plus spécifiquement chez les *Lasiosphaeriaceae* du clade IV, le cluster 2209 semble avoir subi de nombreuses amplifications et/ou une sélection balancée suivie de « lineage sorting ». Ce mode d’évolution complexe suggère que cette région génomique présente éventuellement des rôles antagonistes. Ainsi, il est possible que CG ait un rôle négatif important dans la nature en limitant la prolifération de *P. anserina*, bien que jusqu’à présent, la dégénérescence n’ait été observée qu’en laboratoire. Le mode de régulation de la voie PaMpk1 pourrait quant à elle conférer un effet bénéfique. Dans une situation de défense contre un compétiteur par exemple, l’autorégulation de cette voie permettrait d’apporter une réponse rapide. Cet aspect a été évalué au cours de ces travaux par des tests d’interférences hyphales. Cependant, ces expériences réalisées au laboratoire restent limitées. En particulier, un retard du temps de réaction ne peut être détecté que par observation en temps réel sous microscope. La mise en place de tels contrôles et leur interprétation ne sont bien évidemment pas aisées à réaliser. De façon alternative, le cluster pourrait constituer un élément génétique égoïste qui favorise sa propre transmission. Cette hypothèse n’a pas été investiguée et reste donc à tester. Néanmoins, parce que les gènes *IDC* et *PDC* semblent toujours être présents en tandem, il a été supposé qu’il code un système toxine/antitoxine. Or, ce type de système est connu pour détenir un comportement égoïste. Cette dernière supposition expliquerait le maintien du cluster, mais également le fait que le gène orthologue à *Pa\_4\_7100* (qui engendre une protéine PDC, potentielle antitoxine) soit le dernier existant chez certains champignons.

En résumé, l’analyse des mutants *PDC* s’est révélée aussi riche en enseignements que l’étude des mutants *IDC*. Ces derniers avaient permis de dessiner le modèle selon lequel CG est lié à l’activation anormale de la voie PaNox1/PaMpk1. Ce nouveau type d’élément épigénétique identifié présente un comportement analogue à celui des prions, mais fondé sur l’activation d’une voie de régulation, et non sur la *trans*-conformation d’une protéine. Comme attendu, la nature multipartenaire de ce système le rend bien plus complexe qu’un prion. Cela est en particulier confirmé par l’analyse du cluster 2209 et de ses dix (voire onze) gènes importants. La **Figure C.2** résume l’ensemble des données collectées jusqu’à aujourd’hui. Elle devra par la suite être complétée par (1) la protéine codée par le gène affecté dans le mutant *PDC<sup>2208</sup>* qui semble également avoir un rôle très important au vu du CG très fort développé par ce mutant, et (2) l’élément répresseur présent dans les souches *T*, *A406*, et *CBS415.72* ou le facteur activateur présent dans la souche *S*, modulant CG. Dans ce système, la biochimie permettrait

éventuellement de déterminer de nouveaux facteurs interagissant avec des protéines déjà identifiées. Cependant, la capacité des techniques biochimiques à capturer un grand nombre de protéines peut se révéler limitante et laborieuse pour l'identification des différentes interactions. La génétique quant à elle, s'avère plus performante pour mettre en évidence les protéines impliquées dans un tel processus. De plus, maintenant que les séquences génomiques sont disponibles ou facilement déterminables, l'étape limitante d'identification des gènes n'en est plus une. La détermination et la caractérisation de PDC1 et du cluster 2209 en est un bon exemple. Ainsi, à notre connaissance, Crippled Growth est aujourd'hui avec le phénomène white-opaque présenté par *Candida albicans*, le système de switch phénotypique épigénétique le mieux connu chez les eucaryotes. Ces deux systèmes se révèlent complexes avec de multiples boucles de rétroaction, loin de ce qui est envisagé dans le design des modules de régulations de la biologie de synthèse.

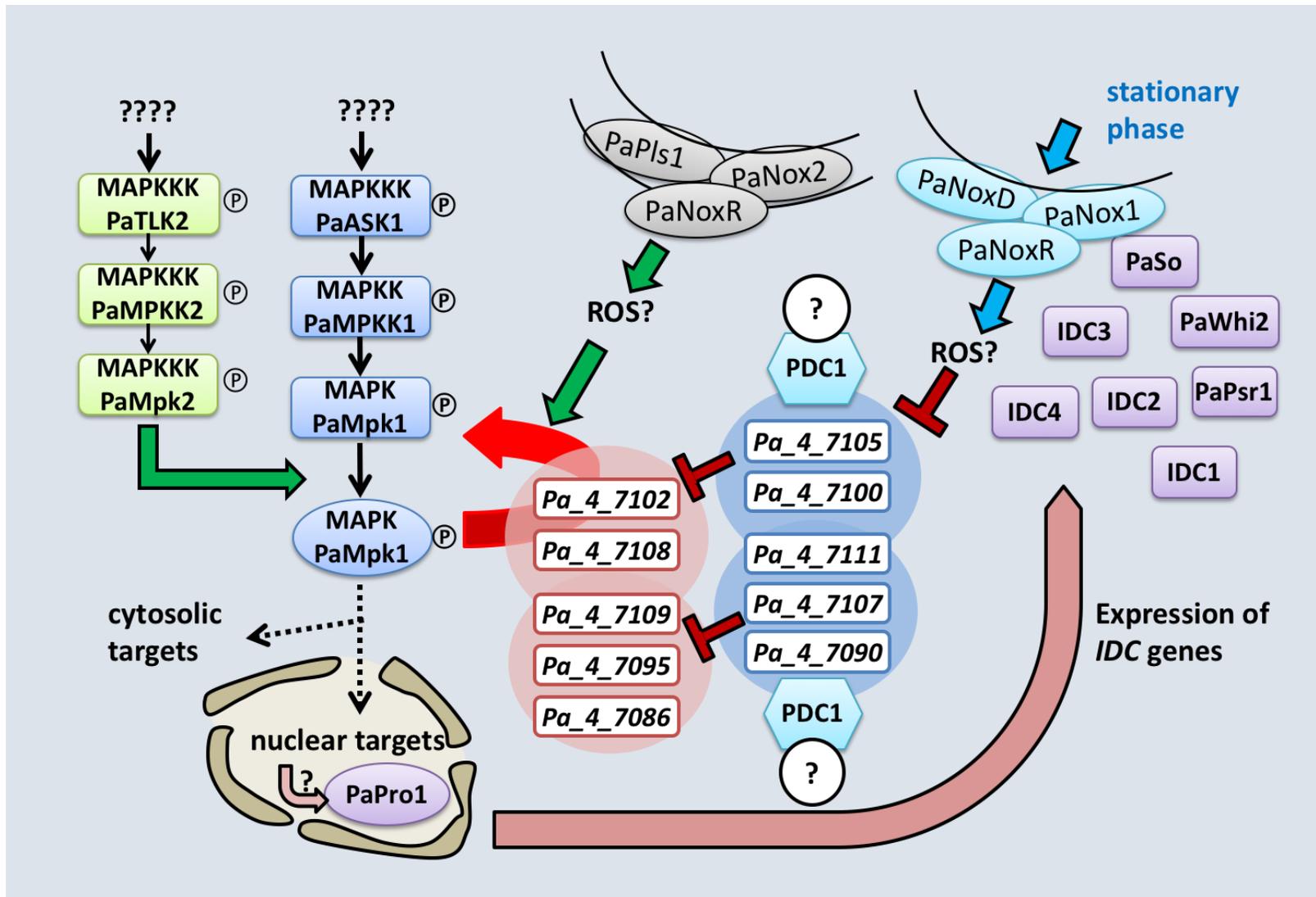


Figure C.2 : Modèle proposé exposant la voie de régulation CG.

# **ANNEXES**

## **ANNEXES I : ARTICLES**

*Cryptogamie, Mycologie, 2017, 38 (4): 485-506*

### **Species delimitation in the *Podospora anserina*/*Podospora pauciseta*/*Podospora comata* species complex**

Charlie BOUCHER, Tinh-Suong NGUYEN, Philippe SILAR

Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire Interdisciplinaire des Energies de Demain, 75205 Paris CEDEX 13 France

élément sous droit, diffusion non autorisée

132-157

élément sous droit, diffusion non autorisée

J Fungi (Basel). 2018 Jul 11;4(3). pii: E85. doi: 10.3390/jof4030085.

***PaPro1* and *IDC4*, two genes controlling stationary phase, sexual development and cell degeneration in *Podospora anserina***

Valérie Gautier<sup>1</sup>, Laetitia Chan Ho Tong<sup>1</sup>, Tinh-Suong Nguyen<sup>1</sup>, Robert Debuchy<sup>2</sup> and Philippe Silar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire Interdisciplinaire des Energies de Demain (LIED), 75205 Paris, France.

<sup>2</sup>Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198, Gif-sur-Yvette cedex, France

élément sous droit, diffusion non autorisée



## ANNEXES II : FIGURES

Utilisation	Nom	Séquence
Délétion du gène <i>Pa_4_7109</i> (966 pb)	7109-1F	ttgtagtggttggtggccgttggaaatctgt
	7109-2R	<b>ctatttaacgacctgcctgaaccg</b> ccctctttctgacgagacctgctgcaactc
	7109-MkF	<b>gagttgcagcaggtctcgtcagaaagaggcc</b> ggttcagggcagggctgtaaatag
	7109-MkR	<b>actgaggtatcgttgtaaaagtccccgccg</b> catcgaactggatctcaacagcggtaag
	7109-3F	<b>cttaccgctgttgagatccagttcgatg</b> cgggcgggactttacaacgatacctcagt
	7109-4R	agcatcccgactcttgcaaagcctccaatt
Délétion du gène <i>Pa_4_7107</i> (714 pb)	7107-1F	gactggcgaggagcctctctgtaaaagtta
	7107-2R	<b>ctatttaacgacctgcctgaaccg</b> ataaacgaacggaagctggtgaggtagttg
	7107-MkF	<b>caactacctaccagcttccgttcgtttatc</b> ggttcagggcagggctgtaaatag
	7107-MkR	<b>aaggacagtgaagtgttatcggtcaagaac</b> atcgaactggatctcaacagcggtaag
	7107-3F	<b>cttaccgctgttgagatccagttcgatgt</b> tcttgaccgcataacacttactgtcctt
	7107-4R	cggggactttacaacgatacctcagtcatt
Délétion du gène <i>Pa_4_7108</i> (951 pb)	7108-1F	cgaacggaagctggtgaggtagttgaagagg
	7108-2R	<b>ctatttaacgacctgcctgaaccgtg</b> agaacaagaggaagggaggtgggatcga
	7108-MkF	<b>tcgatcccacctcccttctctgttctc</b> acggttcagggcagggctgtaaatag
	7108-MkR	<b>gtccacggcttagaccttgacgccttag</b> catcgaactggatctcaacagcggtaag
	7108-3F	<b>cttaccgctgttgagatccagttcgatg</b> ctagggcgtcaaaggctaaagccgtggac
	7108-4R	gcaccgcatttcccattctgtttccatgg
Délétion du gène <i>Pa_4_7105</i> (651 pb)	7105-1F	ggatccttggtgacctctgtgttgata
	7105-2R	<b>ctatttaacgacctgcctgaaccg</b> agggcgaattaagcaaaggttctttctg
	7105-MkF	<b>caggaaaagaaacctttgcttaattcg</b> cctcgggttcagggcagggctgtaaatag
	7105-MkR	<b>acagacacacagcttgcgaatccgatatt</b> catcgaactggatctcaacagcggtaag
	7105-3F	<b>cttaccgctgttgagatccagttcgatg</b> aatatcggattcgacaagctgtgtgtctgt
	7105-4R	ggttggtctagcagagaaaggggaagaaac
Délétion du gène <i>Pa_4_7100</i> (957 pb)	7100-1F	cgggcgttaatgctgatagaatgatatgg
	7100-2R	<b>ctatttaacgacctgcctgaaccg</b> ctaacagaaggtgatgatcgggaaactc
	7100-MkF	<b>gagtttccgatcatcagccttctgtttag</b> cgggttcagggcagggctgtaaatag
	7100-MkR	<b>caaacgtcagggtaaagttgatgcactt</b> gtcatcgaactggatctcaacagcggtaag
	7100-3F	<b>cttaccgctgttgagatccagttcgatg</b> acaagtgcataacttaccctgacgttttg
	7100-4R	cgaatgtcttacagtcccgaagttccata

Délétion du gène <i>Pa_4_7095</i> (796 pb)	7095-1F	gggacgactctctctctcttggctggtg
	7095-2R	<b>ctatttaacgacctgcctgaacc</b> ggcgttctgcagatttggttggttaggg
	7095-MkF	<b>ccctaccacaaacaaatctgcagaacc</b> gccggttcagggcagggctgtaaatag
	7095-MkR	<b>gactgggtccacacacacgatgaaacacg</b> acatcgaactggatctcaacagcggtaag
	7095-3F	<b>cttaccgtgttgagatccagttcgat</b> gctgtttcatcgtgtgtggaccagtc
	7095-4R	tgtgggaatagggcctcgatactgtaaccga
Délétion du gène <i>Pa_4_7090</i> (804 pb)	7090-1F	ggaactggcactcaatcgtgccttaaac
	7090-2R	<b>ctatttaacgacctgcctgaacc</b> gggtgtgagctgctgttgaaagtctgtat
	7090-MkF	<b>atacaagacttcaacagcagctcacacccc</b> gggttcagggcagggctgtaaatag
	7090-MkR	<b>ccatccccaagtaaaaggaaatgtgagaaa</b> catcgaactggatctcaacagcggtaag
	7090-3F	<b>cttaccgtgttgagatccagttcgat</b> gtttctcacatttctttactggggatgg
	7090-4R	gatgtcagggatgggctagtgtttgcttat
Délétion du gène <i>Pa_4_7088</i> (363 pb)	7088-1F	aggacatggaattgaacaaattccaatcg
	7088-2R	<b>ctatttaacgacctgcctgaacc</b> gtttacacagggcctttgctcatgaatacac
	7088-MkF	<b>gtgtattcatgagcaaaaggcctgtgtaaac</b> gggttcagggcagggctgtaaatag
	7088-MkR	<b>gttttaaggcacgattgagtgaccagttcc</b> catcgaactggatctcaacagcggtaag
	7088-3F	<b>cttaccgtgttgagatccagttcgat</b> gggaactggcactcaatcgtgccttaaac
	7088-4R	gggtgtgagctgctgttgaaagtctgtat
Délétion du gène <i>Pa_4_7086</i> (643 pb)	7086-1F	ggctgtgtctggcttggatcatgatggtgtg
	7086-2R	<b>ctatttaacgacctgcctgaacc</b> gcgtgtgctttatccgaggtctttgctgtgg
	7086-MkF	<b>ccacagcaaagacctcggataaaaagcacacg</b> ccggttcagggcagggctgtaaatag
	7086-MkR	<b>gatgaaatcccgaagccaaaagagcgcgtg</b> catcgaactggatctcaacagcggtaag
	7086-3F	<b>cttaccgtgttgagatccagttcgat</b> gcacgcgctctttggcttcgggatttcac
	7086-4R	gttttacaccgaccacacgcacacagttgc

**Tableau A.1 : Amorces utilisées pour la délétion des gènes du cluster 2209.** Sont représentés en gras les régions 3' des amorces qui ne s'appartiennent pas lors de la première PCR.

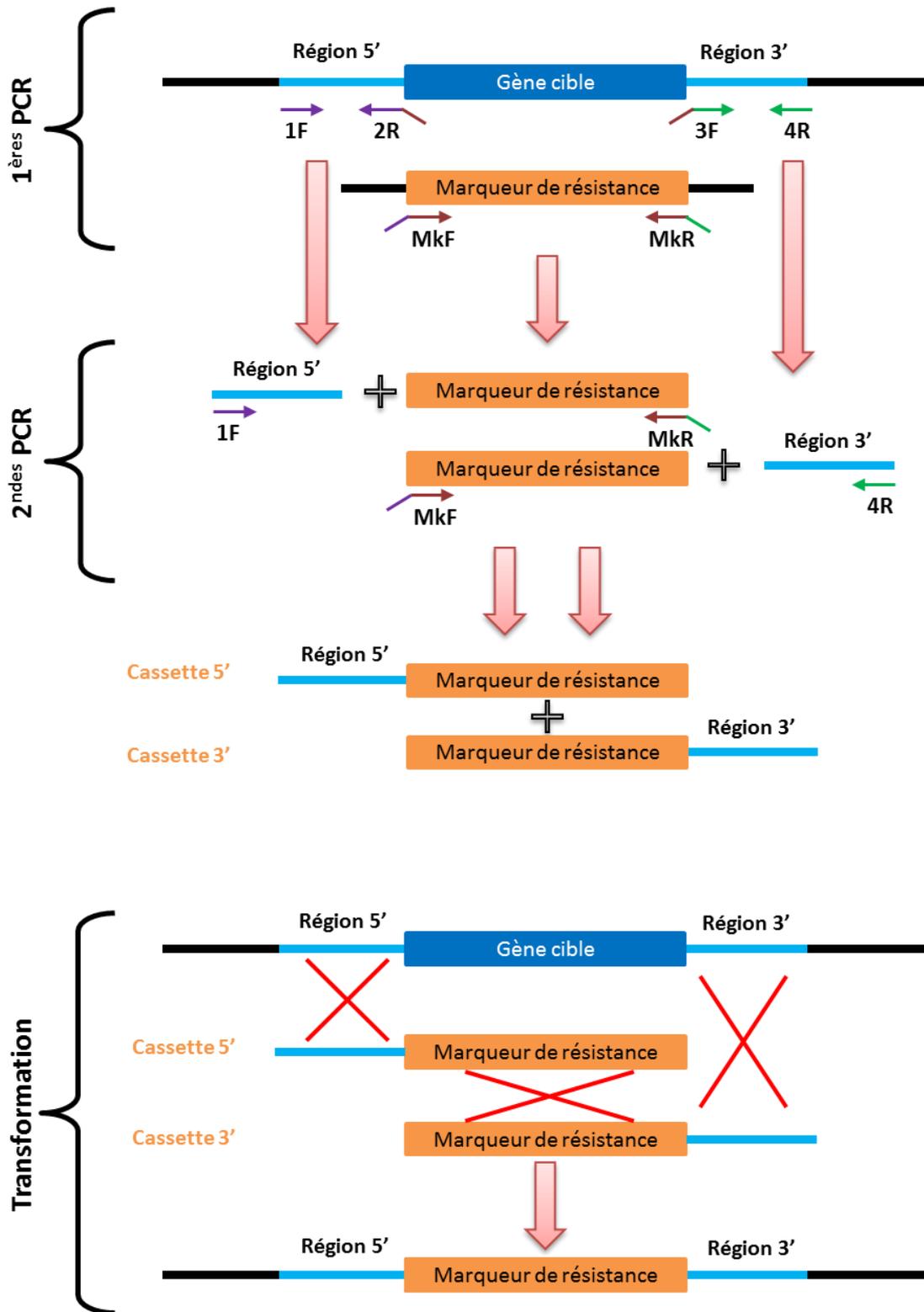
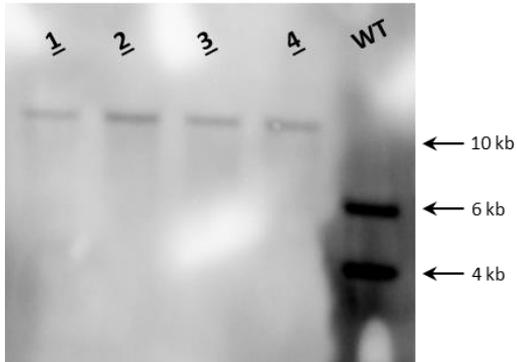


Figure A.1 : Principe de la délétion d'un gène par la méthode de « split-marker ». Trois évènements de recombinaison doivent avoir lieu pour insérer la cassette de délétion à la place du gène cible. D'après (Silar, 2013).

**Délétion de *Pa\_4\_7109***



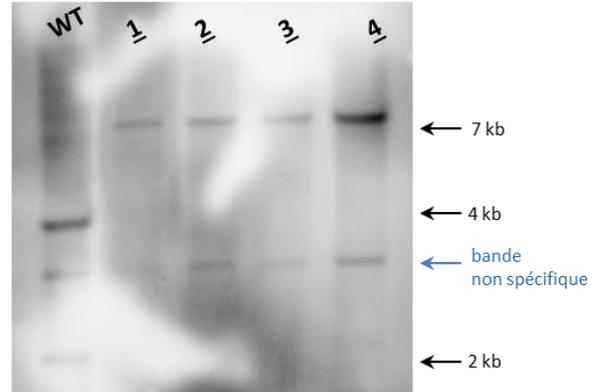
Enzyme : *ApaI*

Tailles attendues

Sauvage : 3908 - 5505 pb

Délétant : 10 472 pb

**Délétion de *Pa\_4\_7108***



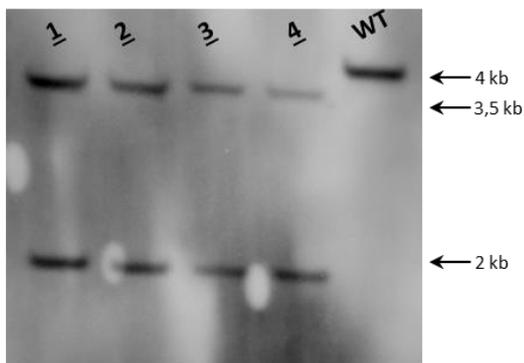
Enzyme : *ApaI*

Tailles attendues

Sauvage : 3908 - 2056 pb

Délétant : 7272 pb

**Délétion de *Pa\_4\_7107***



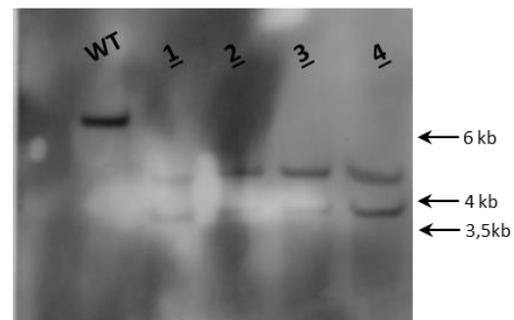
Enzyme : *SacI*

Tailles attendues

Sauvage : 4260 pb

Délétant : 3786 - 1905 pb

**Délétion de *Pa\_4\_7100***



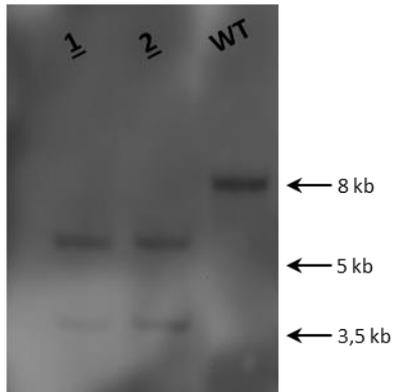
Enzyme : *NcoI*

Tailles attendues

Sauvage : 7057 pb

Délétant : 4651 - 3733 pb

**Délétion de *Pa\_4\_7095***



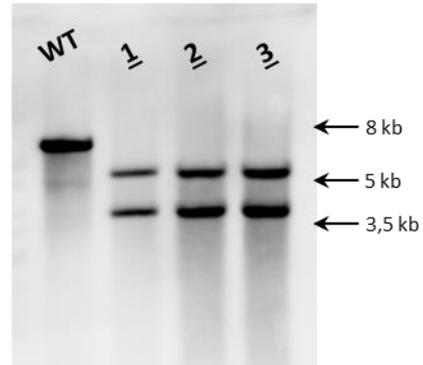
Enzyme : *NaeI*

Tailles attendues

Sauvage : 8020 pb

Délétant : 5588 - 3687 pb

**Délétion de *Pa\_4\_7088***



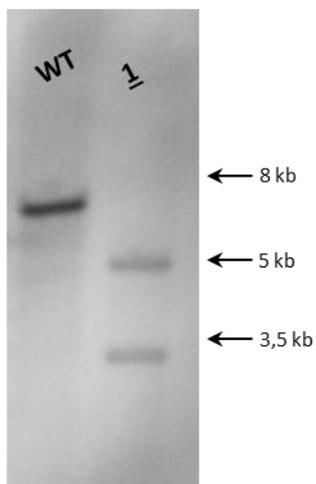
Enzyme : *NcoI*

Tailles attendues

Sauvage : 7043 pb

Délétant : 5199 - 3778 pb

**Délétion de *Pa\_4\_7086***



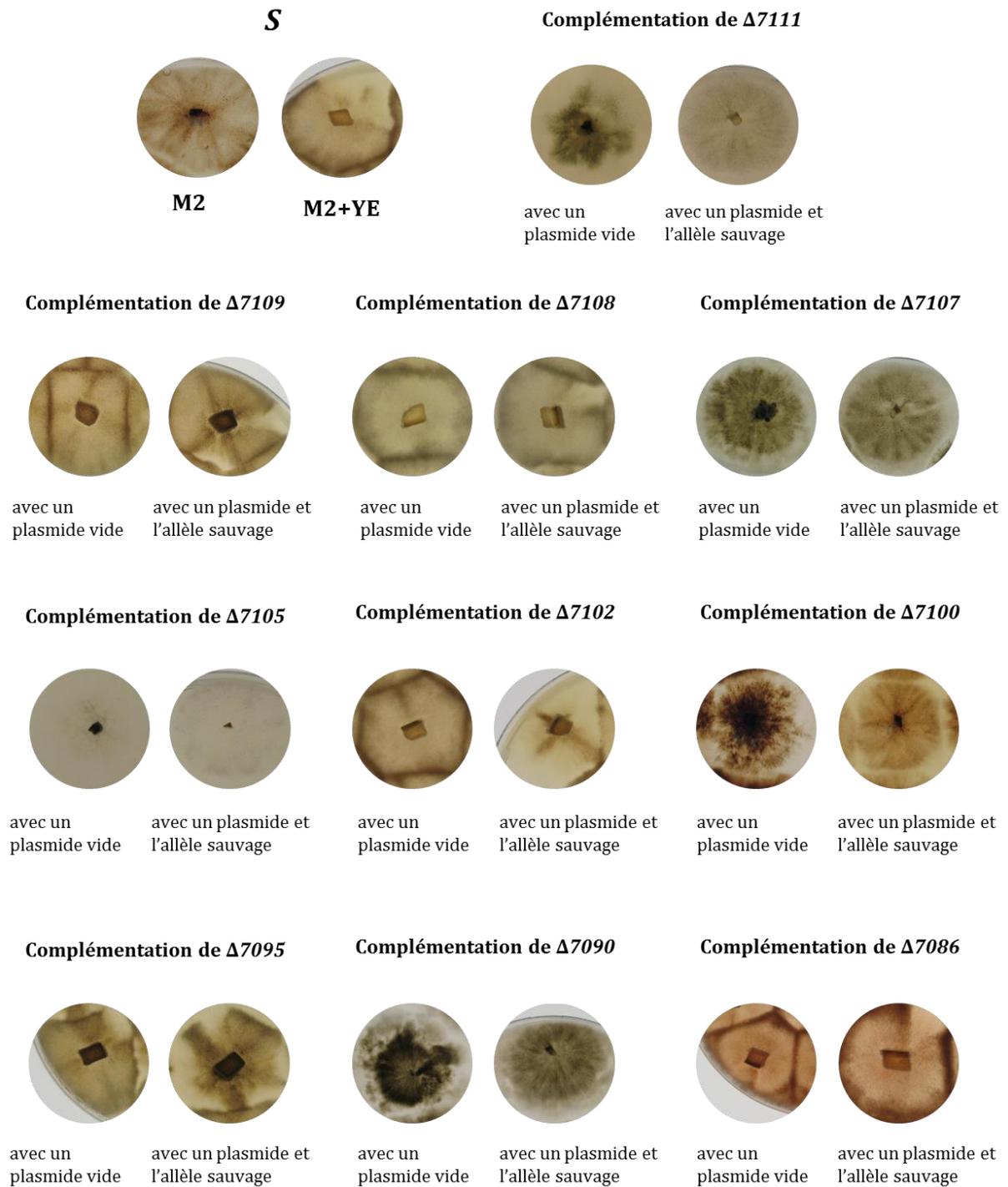
Enzyme : *NcoI*

Tailles attendues

Sauvage : 7043 pb

Délétant : 5080 - 3471 pb

**Figure A.2 : Résultats de Southern blot des délétions des gènes du cluster 2209.**



**Figure A.3 : Complémentation des mutants de délétion du cluster 2209.** Les allèles sauvages ont été insérés de manière ectopique. Pour la complémentation des souches *IDC*, les implants sont issus de cultures âgées de trois jours et sont déposés sur M2+YE. Dans ces conditions, la souche sauvage développe des secteurs CG. Pour la complémentation des souches *PDC*, les thalles présentés ici sont issus de trois repiquages successifs sur M2.



Query: 1 MAQTSSTGEADTF--DSICITRLHEHSHGGLASGSLEHFVSPV SIDLGGPHTISTALASK 58  
 MAQT S +A D I ITR +EH G + +H VSPV+ D GGP+TIST AS  
 Sbjct: 1 MAQTPSLHKAPGTEPDPIRITRAYEHVNLNGFVARETDHLVSPVTTDPGGPNTISTYSASI 60

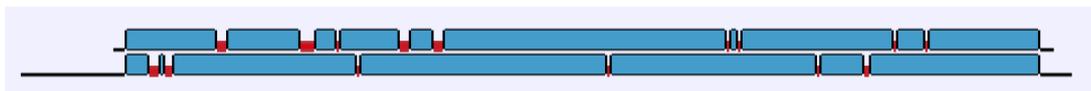
Query: 59 LLEIGLDELDELALVKIKRHIVHVDWRYETPNPKFTTRHLVIAGSFPMIAFAGGTQWFENVA 118  
 L + +A K K +H+DWRY PNPKFTTRHL++ GS P + FAGGT W+ENVA  
 Sbjct: 61 LFAVDQKVAEARAKAKECHIHLDWRYGPPNPKFTTRHLLVLGSSPTVGFAGGTAWYENVA 120

Query: 119 RTSVFRGEQETMPIPDDL RDPAWITPLTSRKPSLNTGPQLGNLSGLQHTCRQEPNRWARA 178  
 + SVFRGEQETM IP+ L+ PAW TPL RK L TG + G+ G QH C QEP+RW RA  
 Sbjct: 121 KASVFRGEQETMSIPNYLQSPA WTTPLDPRKSLTTGAETGSFIGSQHPCWQEPSRWTRA 180

Query: 179 LSPPELSDTSRTVSPDEDDQLSNCSDTASTGSASFSEATAPRIYTPAPSRQNSSSLADIN 238  
 SPPEL DT R SP PE+DQLS CSD AS S FSEAT P +YTPAPSRQNSSSLADIN  
 Sbjct: 181 FSPPELSDTSPRKGSPGPEEDQLSVCSDPASVDSTFSEATTPSLYTPAPSRQNSSSLADIN 240

Query: 239 GAWMDCQIQQQFQSEAFQQQRKQAEADLYMRTGDVSGLIGVIKTASQFSQSGSSTGAFG 296  
 GAWMD +IQQQFQSEAFQQQ+KQAEADLY++TGDVSGLI V+ ASQFS G S G G  
 Sbjct: 241 GAWMDLRIQQQFQSEAFQQQKQAEADLYVQTDVSGLISVMNMASQFNGGSPSIGTPG 298

**A : Comparaison de *Pa\_4\_7100* (Query) par rapport à son orthologue présent chez *Podospora setosa* (Sbjct): 62% d’identité, 71% de similarité.**



Query: 7 SRNKNGLAMVREAQNPQTTTSVPTDSRFPIPPGAAERP V-----RKRRRSSGLSAVQPEN 61  
 SRN G AMV PQ P ++ P GAA +KRRR + P  
 Sbjct: 46 SRNNTGPAMV-----PQ-----FPMNNSGPTSLGAANEASLSERHQKRRRVDCSPSPSPTQ 96

Query: 62 ASRAINLHEAPPIET-----RPRVETFPV-ISSEINSERRVSRGWSRRRLQEV--- 110  
 + + P RP +T + SS+IN + + W RRLQ++  
 Sbjct: 97 QAPPSGPGQTPLSSLTRLRSGGRPDGQTSISEFSSQINP--KAPKRGWQTRRLQOIPGP 154

Query: 111 --REAVSFLSAS-----GEKFAIGVIVRRDLRQSFVSESAVSFLGFRPMNLPVPRRPLLS 163  
 +EAVS S GEK AI VI +L+QS +S S V LG +LPV R S  
 Sbjct: 155 KEKEAVSIFSIDKSGFIGEKVAINVIYEDNLQQSLLSSSVVRCLGMDSEDLPVKRCAFFS 214

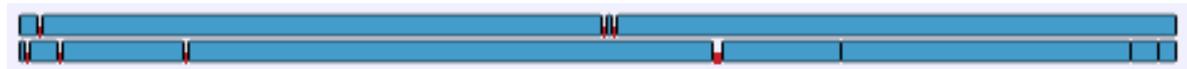
Query: 164 ISSGQIRPERYVRAVVEQVEISNGGRVRLQTDMLVVD RQFPFPGVHAILCGNFFHRDEA 223  
 SSG I P++YV +EQV++ +GGR + Q GDMLVVD +F PGVHA+L +FF R  
 Sbjct: 215 ESSGLIHPQQYVEVAMEQVDMDSGGR-KSQLGDMLVVD SARFKPGVHAVLRDRFFERGRTR 273

Query: 224 GHSSSIAANQSTYSQR--QPH--RTSYQNSAQSSSTARSEFTSDSSLFVPTLINNLVFD 279  
 +S + ++TY R P+ S +S QS++ S T +S ++T + + FD  
 Sbjct: 274 ERLTSRGSERNYQPRAADPYLFAQSVPSSTQSNSEMSGHTGNSFVYTATSSMGR-SFDK 332

Query: 280 DAGIPPNYAPYNGHHQQTGIPTLIHPN--AGQGYMTAAIP-PLNTGQFMQPPLWNQNMVM 336  
 + I PNY P N + TG+P L P QGY ++ P N Q M P + + ++  
 Sbjct: 333 EPRIRPNYNPNQAY---TGMPMLTPTNLQPQGYSGSMALPGNFAQGMHPQMLDPSLIA 389

Query: 337 DNFPPLGNQNFKMPGPAPPNGAYGPDG 364  
 + PL + N +Y P G  
 Sbjct: 390 ADISPLADPNLITYSGGQSATSSYWPSG 417

**B : Comparaison de Pa\_4\_7102 (Query) par rapport à son orthologue présent chez *Podospora setosa* (Sbjct): 33% d'identité, 46% de similarité.**



Query: 1 MADATSTTAAAPPKE-----PVADEQNVEKPAETQTEEVVEEEEEEQLEDAPFVIVKIV 55  
 MADAT T APPKE P+ +E E PAET+ EE EEE+ EQLEDAPF+VKIV  
 Sbjct: 1 MADAT--TPETAPPKEQVLGTPLGEEAAGEAPAETRPEE---EEEDGEQLEDAPFVIVKIV 55

Query: 56 LPHDDKTFELVPSPLEQIHEIRQSIIEHPIAVQYSCFHLEHNGQRINDFINVSDVEGLAN 115  
 LPH+DKTFELVPSPLEQIHEIRQSIIEHPIAVQYSCFHLEH+GQRINDFI VSDVEGLA+  
 Sbjct: 56 LPHEDKTFELVPSPLEQIHEIRQSIIEHPIAVQYSCFHLEHSGQRINDFIQVSDVEGLAH 115

Query: 116 NSELHVVEDPYSEKEARIHFIRVRELIGAAGDRDTRDQVQILSGASVFDDVVAEADKQAGA 175  
 SEL VVEDPY+EKEARIHFIR+RELIGAAGDRDTRDQVQILSGASVFDDVVA+A +Q A  
 Sbjct: 116 GSELRVVEDPYTEKEARIHFIRIRELIGAAGDRDTRDQVQILSGASVFDDVVADAAEQVEA 175

Query: 176 EVAVQEYNFEAGVSPSILLPKEHEAAPKTVKLITLSSWNPPPAPLRQKGHLLYLITITNE 235  
 EV Q Y+FEA V+PSILLPKE APKTVKLITLSSWNPPPAPLRQKGHLLYLITITNE  
 Sbjct: 176 EV--QAYDFEAAVNPSILLPKETPPAPKTVKLITLSSWNPPPAPLRQKGHLLYLITITNE 233

Query: 236 GEQFQVTSHAGGFYVNNSSNSKFDPSPKQDKKAGVISAHSLYTLLEKLSPSFAESYEAFO 295  
 GEQFQVTSH GGFYVNNSSN+KFDPSPKQDKKAGVISAHSLYTLLEKLSPSFA+S+ FO  
 Sbjct: 234 GEQFQVTSHVGGFYVNNSSNNKFDPSPKQDKKAGVISAHSLYTLLEKLSPSFAQSFVDFQ 293

Query: 296 KFANRKDPLATFQIGNTVPSAPWLVPTSSPLVAHIADPTRSQETFLGGAENTDSL RDW 355  
 +FANR+DPLATFQIGNTVPSAPWLVPTSSPLVAHIADPTRSQETFLGGAENTDSL RDW  
 Sbjct: 294 QFANRRDPLATFQIGNTVPSAPWLVPTSSPLVAHIADPTRSQETFLGGAENTDSL RDW 353

Query: 356 NEEFQSARELPKDTIQDRVFRERLIAKLHADYNDAARGAVLVARGEVAPLNPTEGRDAQ 415  
 NEEFQSARELPKDTIQDRVFRERLIAKLHADYNDAARGAVLVARGEVAPLNPTEGRDAQ  
 Sbjct: 354 NEEFQSARELPKDTIQDRVFRERLIAKLHADYNDAARGAVLVARGEVAPLNPTEGRDAQ 413

Query: 416 IFVYNNVFFSFGADGVGTFTSEGGDEAAKVATGKDVFGVKLVNQLDIDGLYTPGTVVVDY 475  
 IFVYNNVFFSFGADGVGTFTSEGGDEAAKVATGKDVFGVKLVNQLDIDGLYTPGTVVVDY  
 Sbjct: 414 IFVYNNVFFSFGADGVGTFTSEGGDEAAKVATGKDVFGVKLVNQLDIDGLYTPGTVVVDY 473

Query: 476 LGKRIVQGSIVPGIFKQPEPGENQIHYGAVDGKDVVAADAEAFAPGFATLASYL RVKKHAV 535

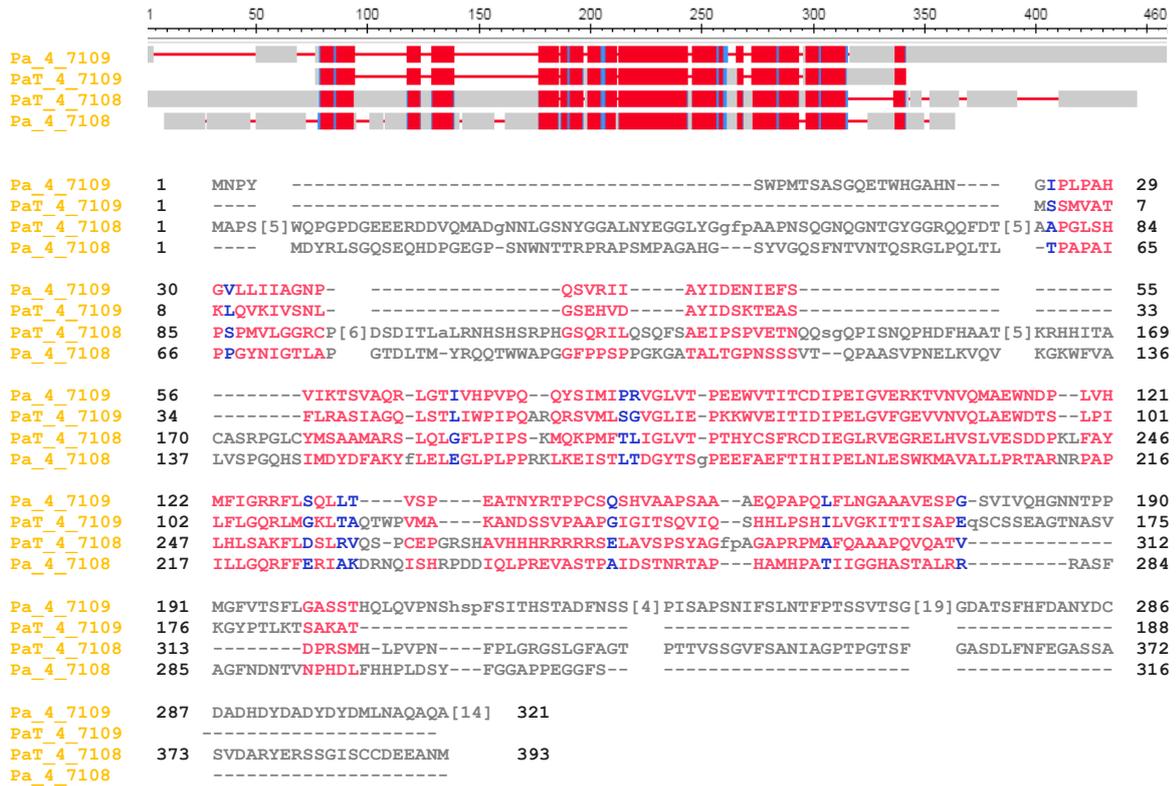


```
Query: 1244 GVGVGSVTGAPAQLPARGAAPSTKDSRNIDELMKYIEGGDKTKGGSGGGKRPGRANP 1303
          G VGSVTGA AQLP R AAP++KD+RNIDELMKYIEG DKK KGGS GGKRPGRANP
Sbjct: 1242 GATVGSVTGAGAQLPD-RAAAPASKDARNIDELMKYIEGSDKKGKGGG-GGKRPGRANP 1299

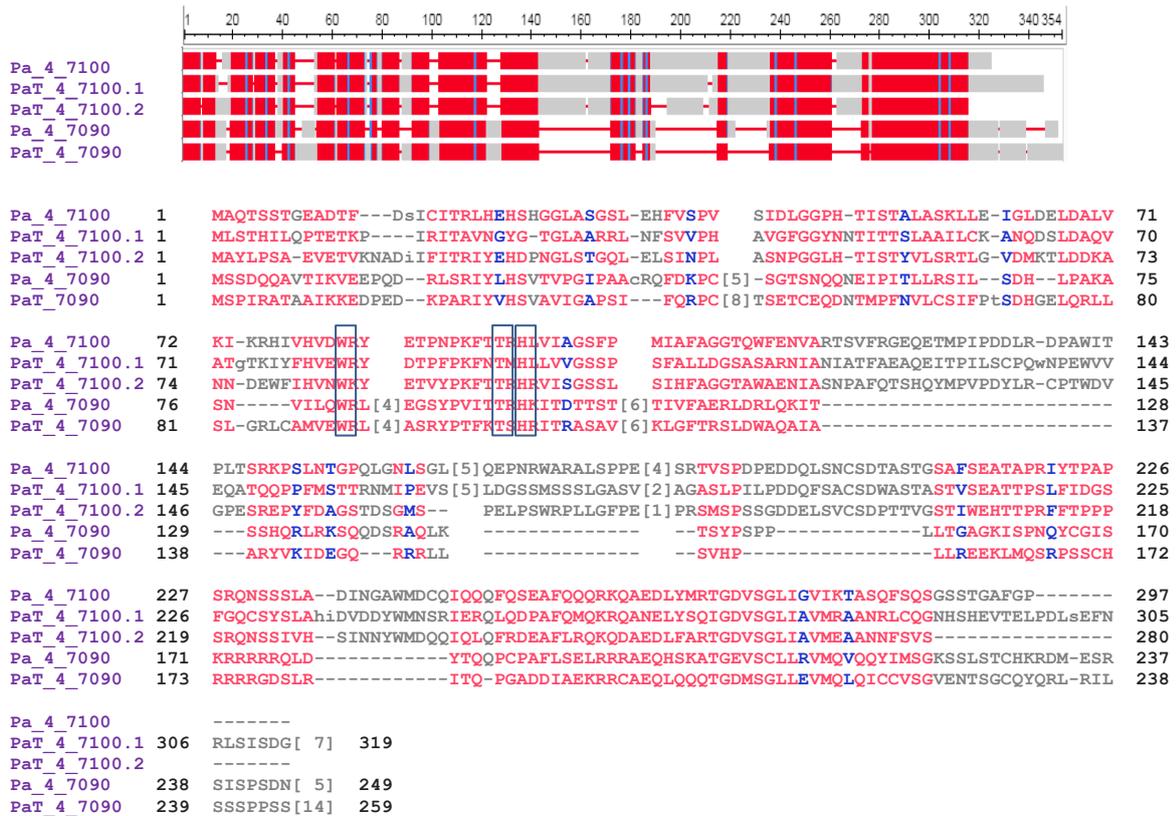
Query: 1304 KRRGGASGTA 1313
          KRRGGA+GTA
Sbjct: 1300 KRRGGAAGTA 1309
```

**C : Comparaison de *Pa\_7\_5680* (Query) par rapport à son orthologue présent chez *Podospora setosa* (Sbjct): 87% d'identité, 91% de similarité.**

**Figure A.4 : Comparaison des gènes *Pa\_4\_7100* (A), *Pa\_4\_7102* (B) et *Pa\_7\_5680* (C) avec leur orthologues respectifs présents dans la souche *Podospora setosa*.** Le gène *Pa\_7\_5680* évolue à une vitesse normale et le pourcentage d'identité et de similarité (87% et 91% respectivement) sont classiques pour des protéines issues de *P. anserina* et de *P. setosa*. En revanche, les gènes *Pa\_4\_7100* et *Pa\_4\_7102* présentent une évolution accélérée.

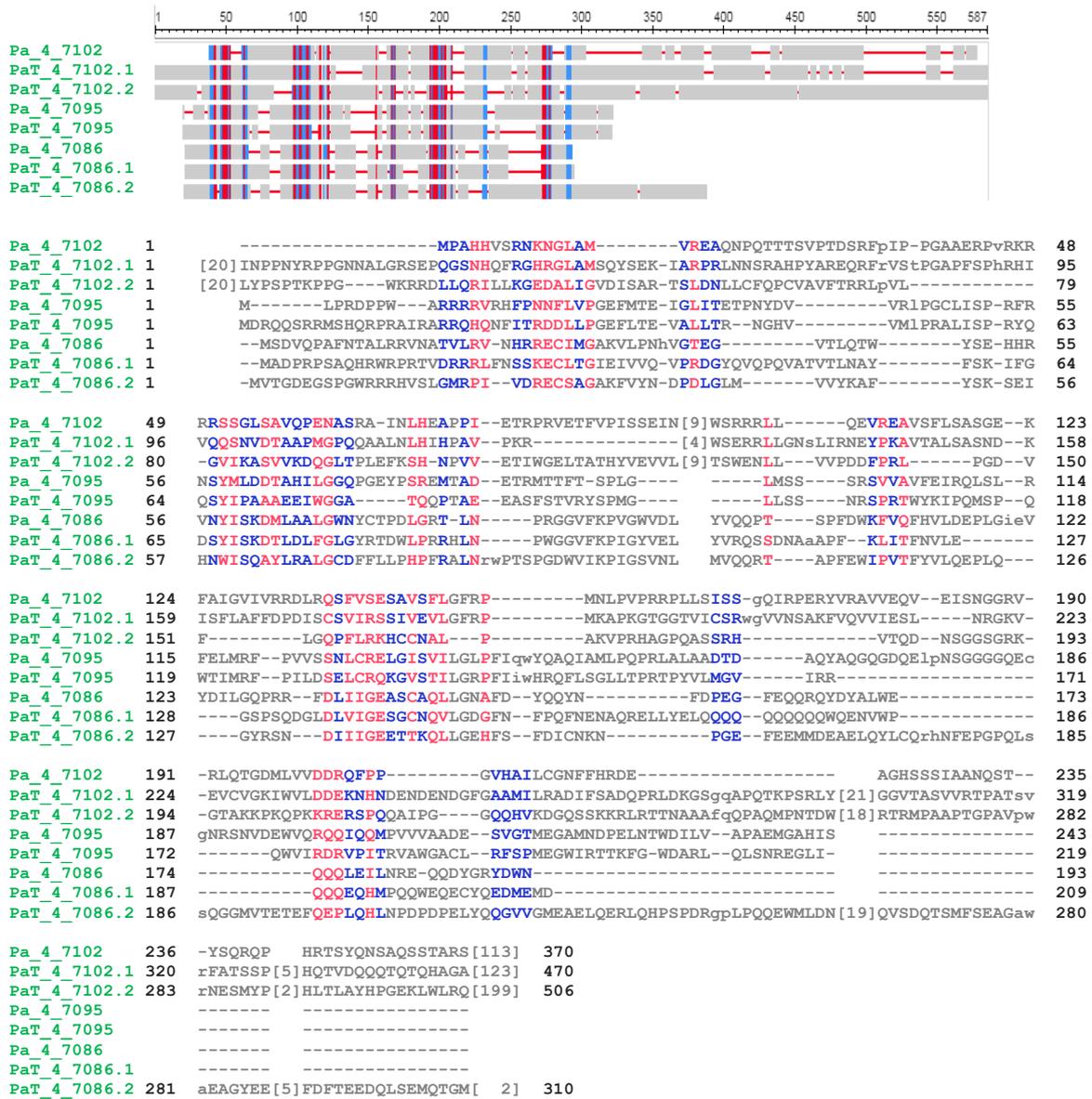


A : Alignement de *Pa\_4\_7108* et de ses orthologues et paralogues dans les souches *S* et *T*.



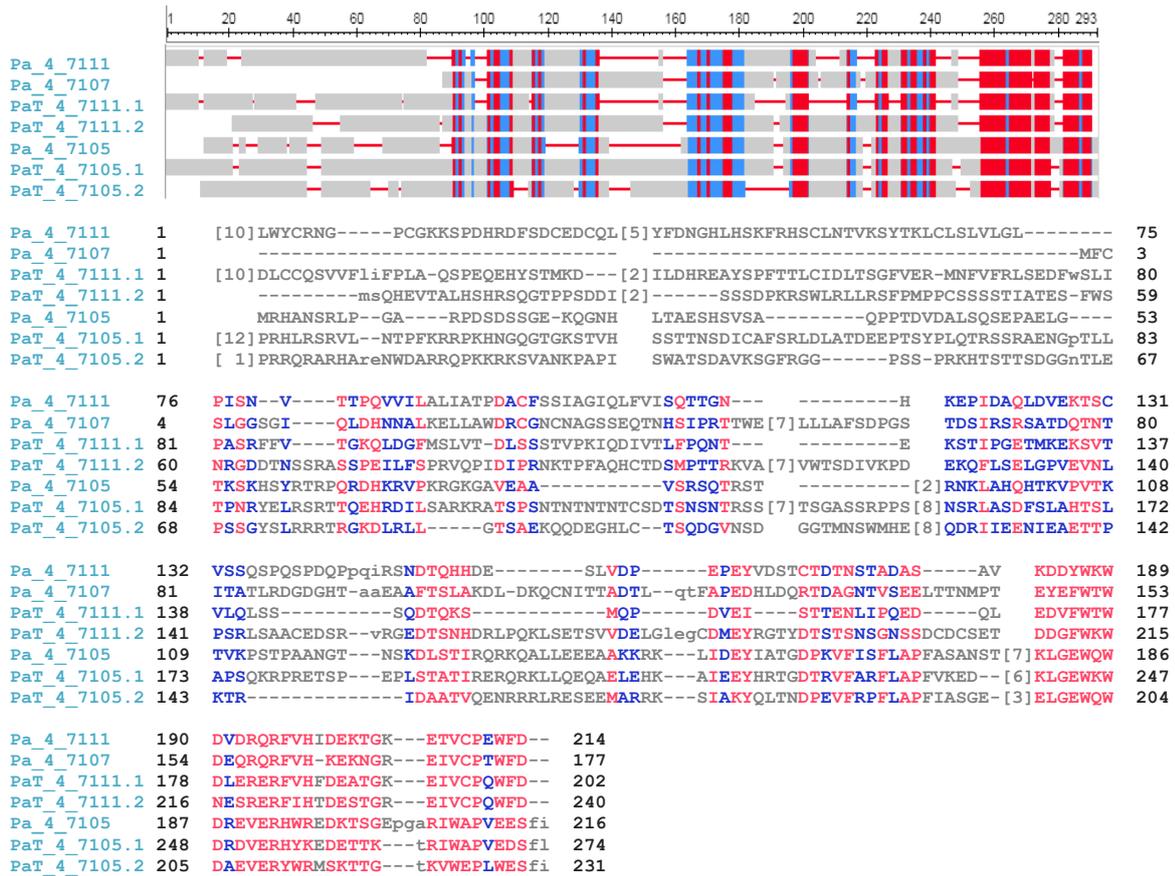
B : Alignements de *Pa\_4\_7100* et de ses orthologues et paralogues dans les souches *S* et *T*.

Il existe deux versions de *PaT\_4\_7100* dans la souche *T*. Les résidus conservés sont encadrés.



**C : Alignements de Pa\_4\_7102 et de ses orthologues et paralogues dans les souches S et T.**

Il existe deux versions de PaT\_4\_7102 et de PaT\_4\_7086 dans la souche T.



**D : Alignements de Pa\_4\_7111 et de ses orthologues et paralogues dans les souches S et T.**

Il existe deux versions de PaT\_4\_7111 et de PaT\_4\_7105 dans la souche T.

**Figure A.5 : Détermination des gènes paralogues au sein du cluster 2209 par comparaison de séquences entre les souches S et T.** Les résultats d'alignements sont issus de COBALT (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/>). Les régions conservées sont marquées en rouge et bleu.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Aldabbous, M.S., Roca, M.G., Stout, A., Huang, I.-C., Read, N.D., and Free, S.J. (2010). The ham-5, rcm-1 and rco-1 genes regulate hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Microbiol. Read. Engl.* *156*, 2621–2629.
- Alexander, W.G., Raju, N.B., Xiao, H., Hammond, T.M., Perdue, T.D., Metzenberg, R.L., Pukkila, P.J., and Shiu, P.K.T. (2008). DCL-1 colocalizes with other components of the MSUD machinery and is required for silencing. *Fungal Genet. Biol. FG B* *45*, 719–727.
- Aramayo, R., and Metzenberg, R.L. (1996). Meiotic transvection in fungi. *Cell* *86*, 103–113.
- Aramayo, R., Peleg, Y., Addison, R., and Metzenberg, R. (1996). Asm-1+, a *Neurospora crassa* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Genetics* *144*, 991–1003.
- Archer, D.B., Connerton, I.F., and MacKenzie, D.A. Filamentous Fungi for Production of Food Additives and Processing Aids. In *Food Biotechnology*, (U. Stahl, U. E. B Donalies & E. Nevoigt), pp. 99–147.
- Arora, D.K. (2003). *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications*.
- Bagowski, C.P., and Ferrell, J.E. (2001). Bistability in the JNK cascade. *Curr. Biol. CB* *11*, 1176–1182.
- Bagowski, C.P., Xiong, W., and Ferrell, J.E. (2001). c-Jun N-terminal kinase activation in *Xenopus laevis* eggs and embryos. A possible non-genomic role for the JNK signaling pathway. *J. Biol. Chem.* *276*, 1459–1465.
- Barry, C., Faugeron, G., and Rossignol, J.L. (1993). Methylation induced premeiotically in *Ascobolus*: coextension with DNA repeat lengths and effect on transcript elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 4557–4561.
- Begel, O., Boulay, J., Albert, B., Dufour, E., and Sainsard-Chanet, A. (1999). Mitochondrial Group II Introns, Cytochrome c Oxidase, and Senescence in *Podospora anserina*. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 4093–4100.
- Beisson-Schecroun, J. (1962). Cellular incompatibility and nucleo-cytoplasmic interactions in the “barrage” phenomena in *Podospora anserina*. *Ann. Genet.* *4*, 4–50.
- Belcour, L., and Begel, O. (1977). Mitochondrial genes in *Podospora anserina*: recombination and linkage. *Mol. Gen. Genet. MGG* *153*, 11–21.
- Berman, J., and Sudbery, P.E. (2002). *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat. Rev. Genet.* *3*, 918–930.
- Bidard, F., Coppin, E., and Silar, P. (2012). The transcriptional response to the inactivation of the PaMpk1 and PaMpk2 MAP kinase pathways in *Podospora anserina*. *Fungal Genet. Biol. FG B* *49*, 643–652.
- Boucher, C., Nguyen, T.-S., and Silar, P. (2017). Species Delimitation in the *Podospora anserina*/ *p. pauciseta*/ *p. comata* Species Complex (Sordariales). *Cryptogam. Mycol.* *38*, 485–506.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J.C., Gerds, M.L., Hammes, W.P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., et al. (2012). Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.* *154*, 87–97.
- Brand, A. (2012). Hyphal Growth in Human Fungal Pathogens and Its Role in Virulence. *Int. J. Microbiol.* *2012*, 1–11.
- Brown, G.D., Denning, D.W., Gow, N.A.R., Levitz, S.M., Netea, M.G., and White, T.C. (2012). Hidden

- Killers: Human Fungal Infections. *Sci. Transl. Med.* *4*, 165rv13-165rv13.
- Brun, S., Malagnac, F., Bidard, F., Lalucque, H., and Silar, P. (2009). Functions and regulation of the Nox family in the filamentous fungus *Podospira anserina*: a new role in cellulose degradation. *Mol. Microbiol.* *74*, 480–496.
- Cano-Domínguez, N., Álvarez-Delfín, K., Hansberg, W., and Aguirre, J. (2008). NADPH Oxidases NOX-1 and NOX-2 Require the Regulatory Subunit NOR-1 To Control Cell Differentiation and Growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* *7*, 1352–1361.
- Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G., and Cogoni, C. (2000). Gene silencing in worms and fungi. *Nature* *404*, 245.
- Catalanotto, C., Pallotta, M., ReFalo, P., Sachs, M.S., Vayssie, L., Macino, G., and Cogoni, C. (2004). Redundancy of the two dicer genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 2536–2545.
- Chernov, A.V., Vollmayr, P., Walter, J., and Trautner, T.A. (1997). Masc2, a C5-DNA-methyltransferase from *Ascobolus immersus* with similarity to methyltransferases of higher organisms. *Biol. Chem.* *378*, 1467–1473.
- Chien, P., and Weissman, J.S. (2001). Conformational diversity in a yeast prion dictates its seeding specificity. *Nature* *410*, 223–227.
- Cogoni, C., and Macino, G. (1997). Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 10233–10238.
- Cogoni, C., and Macino, G. (1999a). Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* *399*, 166–169.
- Cogoni, C., and Macino, G. (1999b). Posttranscriptional gene silencing in *Neurospora* by a RecQ DNA helicase. *Science* *286*, 2342–2344.
- Cogoni, C., Irelan, J.T., Schumacher, M., Schmidhauser, T.J., Selker, E.U., and Macino, G. (1996). Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J.* *15*, 3153–3163.
- Colot, H.V., Park, G., Turner, G.E., Ringelberg, C., Crew, C.M., Litvinkova, L., Weiss, R.L., Borkovich, K.A., and Dunlap, J.C. (2006). A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 10352–10357.
- Coppin-Raynal, E., Dequard-Chablat, M., and Picard, M. (1988). Genetics of ribosomes and translational accuracy in *Podospira anserina*. In *Genetics of Translation. New Approaches*, pp. 431–442.
- Coustou, V., Deleu, C., Saupe, S., and Begueret, J. (1997). The protein product of the *het-s* heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospira anserina* behaves as a prion analog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 9773–9778.
- Coustou-Linares, V., Maddelein, M.L., Bégueret, J., and Saupe, S.J. (2001). In vivo aggregation of the HET-s prion protein of the fungus *Podospira anserina*. *Mol. Microbiol.* *42*, 1325–1335.
- Couturier, M., Tangthirasunun, N., Ning, X., Brun, S., Gautier, V., Bennati-Granier, C., Silar, P., and Berrin, J.-G. (2016). Plant biomass degrading ability of the coprophilic ascomycete fungus *Podospira anserina*. *Biotechnol. Adv.* *34*, 976–983.
- Cox, B.S. (1965). PSI, a cytoplasmic suppressor of super-suppressor in yeast. 505–521.

- Cox, B.S., Tuite, M.F., and Mundy, C.J. (1980). Reversion from suppression to nonsuppression in SUQ5 [psi+] strains of yeast: the classification of mutations. *Genetics* 95, 589–609.
- Cummings, D.J., Belcour, L., and Grandchamp, C. (1978). Electron microscopy of mitochondrial DNA in *Podospira anserina* and the presence of a multimeric range of circular DNA molecules from senescent cultures. *Comptes Rendus Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. Sci. Nat.* 287, 157–160.
- Dagdas, Y.F., Yoshino, K., Dagdas, G., Ryder, L.S., Bielska, E., Steinberg, G., and Talbot, N.J. (2012). Septin-Mediated Plant Cell Invasion by the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Science* 336, 1590–1595.
- Daskalov, A., Gantner, M., Wälti, M.A., Schmidlin, T., Chi, C.N., Wasmer, C., Schütz, A., Ceschin, J., Clavé, C., Cescau, S., et al. (2014). Contribution of specific residues of the  $\beta$ -solenoid fold to HET-s prion function, amyloid structure and stability. *PLoS Pathog.* 10, e1004158.
- Daskalov, A., Dyrka, W., and Saupe, S.J. (2015). Theme and variations: evolutionary diversification of the HET-s functional amyloid motif. *Sci. Rep.* 5, 12494.
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., et al. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology: Top 10 fungal pathogens. *Mol. Plant Pathol.* 13, 414–430.
- Dettmann, A., Heilig, Y., Valerius, O., Ludwig, S., and Seiler, S. (2014). Fungal Communication Requires the MAK-2 Pathway Elements STE-20 and RAS-2, the NRC-1 Adapter STE-50 and the MAP Kinase Scaffold HAM-5. *PLOS Genet.* 10, e1004762.
- Diaz-Avalos, R., King, C.-Y., Wall, J., Simon, M., and Caspar, D.L.D. (2005). Strain-specific morphologies of yeast prion amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10165–10170.
- Dirschnabel, D.E., Nowrousian, M., Cano-Domínguez, N., Aguirre, J., Teichert, I., and Kück, U. (2014). New Insights Into the Roles of NADPH Oxidases in Sexual Development and Ascospore Germination in *Sordaria macrospora*. *Genetics* 196, 729–744.
- Doel, S.M., McCreedy, S.J., Nierras, C.R., and Cox, B.S. (1994). The dominant PNM2- mutation which eliminates the psi factor of *Saccharomyces cerevisiae* is the result of a missense mutation in the SUP35 gene. *Genetics* 137, 659–670.
- Dos Reis, S., Couлары-Salin, B., Forge, V., Lascu, I., Bégueret, J., and Saupe, S.J. (2002). The HET-s prion protein of the filamentous fungus *Podospira anserina* aggregates in vitro into amyloid-like fibrils. *J. Biol. Chem.* 277, 5703–5706.
- Egan, M.J., Wang, Z.-Y., Jones, M.A., Smirnov, N., and Talbot, N.J. (2007). Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 11772–11777.
- Erjavec, J., Kos, J., Ravnikar, M., Dreo, T., and Sabotič, J. (2012). Proteins of higher fungi--from forest to application. *Trends Biotechnol.* 30, 259–273.
- Espagne, E., Lespinet, O., Malagnac, F., Da Silva, C., Jaillon, O., Porcel, B.M., Couloux, A., Aury, J.-M., Ségurens, B., Poulain, J., et al. (2008). The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospira anserina*. *Genome Biol.* 9, R77.
- Faugeron, G., Goyon, C., and Grégoire, A. (1989). Stable allele replacement and unstable non-homologous integration events during transformation of *Ascobolus immersus*. *Gene* 76, 109–119.
- Ferrell, J.E., and Machleder, E.M. (1998). The Biochemical Basis of an All-or-None Cell Fate Switch in *Xenopus* Oocytes. *Science* 280, 895–898.
- Fleißner, A., and Glass, N.L. (2007). SO, a Protein Involved in Hyphal Fusion in *Neurospora crassa*, Localizes to Septal Plugs. *Eukaryot. Cell* 6, 84–94.

- Fleißner, A., Sarkar, S., Jacobson, D.J., Roca, M.G., Read, N.D., and Glass, N.L. (2005). The *so* Locus Is Required for Vegetative Cell Fusion and Postfertilization Events in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* 4, 920–930.
- Freitag, M., Williams, R.L., Kothe, G.O., and Selker, E.U. (2002). A cytosine methyltransferase homologue is essential for repeat-induced point mutation in *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 8802–8807.
- Gaber, R.F., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1988). TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2848–2859.
- Geiger, J., Wessels, D., Lockhart, S.R., and Soll, D.R. (2004). Release of a potent polymorphonuclear leukocyte chemoattractant is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 72, 667–677.
- Gellendautremer, J., Lanternier, F., Dannaoui, E., and Lortholary, O. (2008). Associations antifongiques dans les candidoses et aspergilloses invasives. *Réanimation* 17, 259–266.
- Gendoo, D.M.A., and Harrison, P.M. (2011). Origins and evolution of the HET-s prion-forming protein: searching for other amyloid-forming solenoids. *PloS One* 6, e27342.
- Gianessi, L.P., and Reigner, N. (2005). The Value of Fungicides In U.S. Crop Production. 243.
- Giesbert, S., Schürg, T., Scheele, S., and Tudzynski, P. (2008). The NADPH oxidase *Cpnox1* is required for full pathogenicity of the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Mol. Plant Pathol.* 9, 317–327.
- Gladyshev, E. (2017). Repeat-Induced Point Mutation (RIP) and Other Genome Defense Mechanisms in Fungi. *Microbiol. Spectr.* 5.
- Gladyshev, E., and Kleckner, N. (2014). Direct recognition of homology between double helices of DNA in *Neurospora crassa*. *Nat. Commun.* 5.
- Gladyshev, E., and Kleckner, N. (2016). Recombination-Independent Recognition of DNA Homology for Repeat-Induced Point Mutation (RIP) Is Modulated by the Underlying Nucleotide Sequence. *PLOS Genet.* 12, e1006015.
- Gotoh, Y., Masuyama, N., Dell, K., Shirakabe, K., and Nishida, E. (1995). Initiation of *Xenopus* Oocyte Maturation by Activation of the Mitogen-activated Protein Kinase Cascade. *J. Biol. Chem.* 270, 25898–25904.
- Goyon, C., and Faugeron, G. (1989). Targeted transformation of *Ascomobolus immersus* and de novo methylation of the resulting duplicated DNA sequences. *Mol. Cell. Biol.* 9, 2818–2827.
- Grigoriev, I.V., Nikitin, R., Haridas, S., Kuo, A., Ohm, R., Otilar, R., Riley, R., Salamov, A., Zhao, X., Korzeniewski, F., et al. (2014). MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Res.* 42, D699-704.
- Grognet, P. (2013). Contributions à l'étude des dégénérescences du mycélium et des spores chez le champignon filamentueux *Podospora anserina*. Université Paris Diderot (Paris 7).
- Grognet, P., Lalucque, H., Malagnac, F., and Silar, P. (2014a). Genes That Bias Mendelian Segregation. *PLOS Genet.* 10, e1004387.
- Grognet, P., Bidard, F., Kuchly, C., Tong, L.C.H., Coppin, E., Benkhali, J.A., Couloux, A., Wincker, P., Debuchy, R., and Silar, P. (2014b). Maintaining two mating types: structure of the mating type locus and its role in heterokaryosis in *Podospora anserina*. *Genetics* 197, 421–432.
- Guindon, S., and Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704.

- Haccard, O., Lewellyn, A., Hartley, R.S., Erikson, E., and Maller, J.L. (1995). Induction of *Xenopus* oocyte meiotic maturation by MAP kinase. *Dev. Biol.* *168*, 677–682.
- Haedens, V., Malagnac, F., and Silar, P. (2005). Genetic control of an epigenetic cell degeneration syndrome in *Podospora anserina*. *Fungal Genet. Biol. FG B* *42*, 564–577.
- Hammond, T.M. (2017). Sixteen Years of Meiotic Silencing by Unpaired DNA. *Adv. Genet.* *97*, 1–42.
- Hammond, T.M., Xiao, H., Boone, E.C., Perdue, T.D., Pukkila, P.J., and Shiu, P.K.T. (2011). SAD-3, a Putative Helicase Required for Meiotic Silencing by Unpaired DNA, Interacts with Other Components of the Silencing Machinery. *G3 Bethesda Md* *1*, 369–376.
- Hammond, T.M., Spollen, W.G., Decker, L.M., Blake, S.M., Springer, G.K., and Shiu, P.K.T. (2013a). Identification of small RNAs associated with meiotic silencing by unpaired DNA. *Genetics* *194*, 279–284.
- Hammond, T.M., Xiao, H., Boone, E.C., Decker, L.M., Lee, S.A., Perdue, T.D., Pukkila, P.J., and Shiu, P.K.T. (2013b). Novel proteins required for meiotic silencing by unpaired DNA and siRNA generation in *Neurospora crassa*. *Genetics* *194*, 91–100.
- Hane, J.K., Williams, A.H., Taranto, A.P., Solomon, P.S., and Oliver, R.P. (2015). Repeat-Induced Point Mutation: A Fungal-Specific, Endogenous Mutagenesis Process. In *Genetic Transformation Systems in Fungi, Volume 2*, (Springer, Cham), pp. 55–68.
- Hernández-Oñate, M.A., Esquivel-Naranjo, E.U., Mendoza-Mendoza, A., Stewart, A., and Herrera-Estrella, A.H. (2012). An injury-response mechanism conserved across kingdoms determines entry of the fungus *Trichoderma atroviride* into development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 14918–14923.
- Hernday, A.D., Lohse, M.B., Fordyce, P.M., Nobile, C.J., DeRisi, J.L., and Johnson, A.D. (2013). Structure of the transcriptional network controlling white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* *90*, 22–35.
- Herzog, S., Schumann, M.R., and Fleißner, A. (2015). Cell fusion in *Neurospora crassa*. *Curr. Opin. Microbiol.* *28*, 53–59.
- Huang, G., Wang, H., Chou, S., Nie, X., Chen, J., and Liu, H. (2006). Bistable expression of WOR1, a master regulator of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 12813–12818.
- Huang, W., Kessler, D.S., and Erikson, R.L. (1995). Biochemical and biological analysis of Mek1 phosphorylation site mutants. *Mol. Biol. Cell* *6*, 237–245.
- Hull, C.M., and Johnson, A.D. (1999). Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* *285*, 1271–1275.
- Humbert, A., Bovier, E., Sellem, C.H., and Sainsard-Chanet, A. (2015). Deletion of the MED13 and CDK8 subunits of the Mediator improves the phenotype of a long-lived respiratory deficient mutant of *Podospora anserina*. *Fungal Genet. Biol. FG B* *82*, 228–237.
- Jamet-Viorny, C., Begel, O., and Belcour, L. (1980). Senescence in *Podospora anserina*: amplification of a mitochondrial DNA sequence. *Cell* *21*, 189–194.
- Jamet-Viorny, C., Rossignol, M., Haedens, V., and Silar, P. (1999). What Triggers Senescence in *Podospora anserina*? *Fungal Genet. Biol.* *27*, 26–35.
- Jamet-Viorny, C., Debuchy, R., Prigent, M., and Silar, P. (2007). IDC1, a Pezizomycotina-specific gene that belongs to the PaMpk1 MAP kinase transduction cascade of the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genet. Biol.* *44*, 1219–1230.
- Jonkers, W., Leeder, A.C., Ansong, C., Wang, Y., Yang, F., Starr, T.L., Camp, D.G., Smith, R.D., and

- Glass, N.L. (2014). HAM-5 functions as a MAP kinase scaffold during cell fusion in *Neurospora crassa*. *PLoS Genet.* *10*, e1004783.
- Katoh, K., Kuma, K., Toh, H., and Miyata, T. (2005). MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res.* *33*, 511–518.
- Kayano, Y., Tanaka, A., Akano, F., Scott, B., and Takemoto, D. (2013). Differential roles of NADPH oxidases and associated regulators in polarized growth, conidiation and hyphal fusion in the symbiotic fungus *Epichloë festucae*. *Fungal Genet. Biol.* *56*, 87–97.
- Kicka, S., and Silar, P. (2004). PaASK1, a mitogen-activated protein kinase kinase kinase that controls cell degeneration and cell differentiation in *Podospora anserina*. *Genetics* *166*, 1241–1252.
- Kicka, S., Bonnet, C., Sobering, A.K., Ganesan, L.P., and Silar, P. (2006). A mitotically inheritable unit containing a MAP kinase module. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 13445–13450.
- King, C.-Y., and Diaz-Avalos, R. (2004). Protein-only transmission of three yeast prion strains. *Nature* *428*, 319–323.
- Knuppertz, L., Warnsmann, V., Hamann, A., Grimm, C., and Osiewacz, H.D. (2017). Stress-dependent opposing roles for mitophagy in aging of the ascomycete *Podospora anserina*. *Autophagy* *13*, 1037–1052.
- Kosako, H., Gotoh, Y., and Nishida, E. (1994). Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in *Xenopus* oocyte maturation. *EMBO J.* *13*, 2131–2138.
- Kruys, A., and Wedin, M. (2009). Phylogenetic relationships and an assessment of traditionally used taxonomic characters in the Sporormiaceae (Pleosporales, Dothideomycetes, Ascomycota), utilising multi-gene phylogenies. *Syst. Biodivers.* *7*, 465–478.
- Kvaal, C., Lachke, S.A., Srikantha, T., Daniels, K., McCoy, J., and Soll, D.R. (1999). Misexpression of the opaque-phase-specific gene PEP1 (SAP1) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect. Immun.* *67*, 6652–6662.
- Kvaal, C.A., Srikantha, T., and Soll, D.R. (1997). Misexpression of the white-phase-specific gene WH11 in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence. *Infect. Immun.* *65*, 4468–4475.
- Lacaze, I., Lalucque, H., Siegmund, U., Silar, P., and Brun, S. (2015). Identification of NoxD/Pro41 as the homologue of the p22<sup>phox</sup> NADPH oxidase subunit in fungi: NoxD/Pro41: the fungal p22<sup>phox</sup> homologue. *Mol. Microbiol.* *95*, 1006–1024.
- Lachke, S.A., Lockhart, S.R., Daniels, K.J., and Soll, D.R. (2003). Skin facilitates *Candida albicans* mating. *Infect. Immun.* *71*, 4970–4976.
- Lalucque, H., and Silar, P. (2004). Incomplete penetrance and variable expressivity of a growth defect as a consequence of knocking out two K(+) transporters in the euscomycete fungus *Podospora anserina*. *Genetics* *166*, 125–133.
- Lalucque, H., Malagnac, F., Brun, S., Kicka, S., and Silar, P. (2012). A Non-Mendelian MAPK-Generated Hereditary Unit Controlled by a Second MAPK Pathway in *Podospora anserina*. *Genetics* *191*, 419–433.
- Lalucque, H., Malagnac, F., Green, K., Gautier, V., Grognet, P., Chan Ho Tong, L., Scott, B., and Silar, P. (2017). IDC2 and IDC3, two genes involved in cell non-autonomous signaling of fruiting body development in the model fungus *Podospora anserina*. *Dev. Biol.* *421*, 126–138.
- Lambou, K., Malagnac, F., Barbisan, C., Tharreau, D., Lebrun, M.-H., and Silar, P. (2008). The Crucial Role of the Pls1 Tetraspanin during Ascospore Germination in *Podospora anserina* Provides an Example of the Convergent Evolution of Morphogenetic Processes in Fungal Plant Pathogens and Saprobes. *Eukaryot. Cell* *7*, 1809–1818.

- Lara-Ortíz, T., Riveros-Rosas, H., and Aguirre, J. (2003). Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* *50*, 1241–1255.
- Lee, D.W., Pratt, R.J., McLaughlin, M., and Aramayo, R. (2003). An argonaute-like protein is required for meiotic silencing. *Genetics* *164*, 821–828.
- Lee, D.W., Seong, K.-Y., Pratt, R.J., Baker, K., and Aramayo, R. (2004). Properties of unpaired DNA required for efficient silencing in *Neurospora crassa*. *Genetics* *167*, 131–150.
- Lee, D.W., Freitag, M., Selker, E.U., and Aramayo, R. (2008). A cytosine methyltransferase homologue is essential for sexual development in *Aspergillus nidulans*. *PloS One* *3*, e2531.
- Lee, D.W., Millimaki, R., and Aramayo, R. (2010). QIP, a component of the vegetative RNA silencing pathway, is essential for meiosis and suppresses meiotic silencing in *Neurospora crassa*. *Genetics* *186*, 127–133.
- Letunic, I., and Bork, P. (2007). Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *23*, 127–128.
- Levin, D.E. (2011). Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* *189*, 1145–1175.
- Lockhart, S.R., Pujol, C., Daniels, K.J., Miller, M.G., Johnson, A.D., Pfaller, M.A., and Soll, D.R. (2002). In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type. *Genetics* *162*, 737–745.
- Lohse, M.B., and Johnson, A.D. (2008). Differential phagocytosis of white versus opaque *Candida albicans* by *Drosophila* and mouse phagocytes. *PloS One* *3*, e1473.
- Lohse, M.B., and Johnson, A.D. (2009). White-opaque switching in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* *12*, 650–654.
- Lohse, M.B., and Johnson, A.D. (2016). Identification and Characterization of Wor4, a New Transcriptional Regulator of White-Opaque Switching. *G3 Genes Genomes Genet.* *6*, 721–729.
- Lohse, M.B., Hernday, A.D., Fordyce, P.M., Noiman, L., Sorrells, T.R., Hanson-Smith, V., Nobile, C.J., DeRisi, J.L., and Johnson, A.D. (2013). Identification and characterization of a previously undescribed family of sequence-specific DNA-binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 7660–7665.
- Maddelin, M.-L., Dos Reis, S., Duvezin-Caubet, S., Couly-Salin, B., and Saupe, S.J. (2002). Amyloid aggregates of the HET-s prion protein are infectious. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 7402–7407.
- Magee, B.B., and Magee, P.T. (2000). Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL $\alpha$  and MTL $\alpha$  strains. *Science* *289*, 310–313.
- Maiti, M., Lee, H.-C., and Liu, Y. (2007). QIP, a putative exonuclease, interacts with the *Neurospora* Argonaute protein and facilitates conversion of duplex siRNA into single strands. *Genes Dev.* *21*, 590–600.
- Malagnac, F., and Silar, P. (2006). Regulation, cell differentiation and protein-based inheritance. 2584–2587.
- Malagnac, F., and Silar, P. (2011). Chapter 13 - Epigenetics of Eukaryotic Microbes. In *Handbook of Epigenetics*, T. Tollefsbol, ed. (San Diego: Academic Press), pp. 185–201.
- Malagnac, F., Wendel, B., Goyon, C., Faugeron, G., Zickler, D., Rossignol, J.L., Noyer-Weidner, M., Vollmayr, P., Trautner, T.A., and Walter, J. (1997). A gene essential for de novo methylation and development in *Ascombolus* reveals a novel type of eukaryotic DNA methyltransferase

- structure. *Cell* *91*, 281–290.
- Malagnac, F., Lalucque, H., Lepère, G., and Silar, P. (2004). Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genet. Biol.* *41*, 982–997.
- Malagnac, F., Bidard, F., Lalucque, H., Brun, S., Lambou, K., Lebrun, M.-H., and Silar, P. (2008). Convergent evolution of morphogenetic processes in fungi. *Commun. Integr. Biol.* *1*, 180–181.
- Maloisel, L., and Rossignol, J.L. (1998). Suppression of crossing-over by DNA methylation in *Ascobolus*. *Genes Dev.* *12*, 1381–1389.
- Marcou, D. (1961). Notion de longévité et nature cytoplasmique du déterminant de la sénescence chez quelques champignons. In *Ann Sci Nat Bot*, pp. 653–764.
- Martins, M., Rodrigues-Lima, F., Dairou, J., Lamouri, A., Malagnac, F., Silar, P., and Dupret, J.-M. (2009). An acetyltransferase conferring tolerance to toxic aromatic amine chemicals: molecular and functional studies. *J. Biol. Chem.* *284*, 18726–18733.
- Mathur, V., Seuring, C., Riek, R., Saupe, S.J., and Liebman, S.W. (2012). Localization of HET-S to the cell periphery, not to [Het-s] aggregates, is associated with [Het-s]-HET-S toxicity. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 139–153.
- Miao, V.P., Freitag, M., and Selker, E.U. (2000). Short TpA-rich segments of the zeta-eta region induce DNA methylation in *Neurospora crassa*. *J. Mol. Biol.* *300*, 249–273.
- Mizuno, N., Baxa, U., and Steven, A.C. (2011). Structural dependence of HET-s amyloid fibril infectivity assessed by cryoelectron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 3252–3257.
- Montanini, B., Chen, P.-Y., Morselli, M., Jaroszewicz, A., Lopez, D., Martin, F., Ottonello, S., and Pellegrini, M. (2014). Non-exhaustive DNA methylation-mediated transposon silencing in the black truffle genome, a complex fungal genome with massive repeat element content. *Genome Biol.* *15*.
- Montero-Barrientos, M., Hermosa, R., Cardoza, R.E., Gutiérrez, S., and Monte, E. (2011). Functional Analysis of the *Trichoderma harzianum* *nox1* Gene, Encoding an NADPH Oxidase, Relates Production of Reactive Oxygen Species to Specific Biocontrol Activity against *Pythium ultimum*. *Appl. Environ. Microbiol.* *77*, 3009–3016.
- Nguyen, T.-S., Lalucque, H., Malagnac, F., and Silar, P. (2017). Chapter 5 - Prions and Prion-Like Phenomena in Epigenetic Inheritance. In *Handbook of Epigenetics (Second Edition)*, T.O. Tollefsbol, ed. (Academic Press), pp. 61–72.
- Noble, S.M., Gianetti, B.A., and Witchley, J.N. (2017). *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nat. Rev. Microbiol.* *15*, 96–108.
- Osiewacz, H.D., Brust, D., Hamann, A., Kunstmann, B., Luce, K., Müller-Ohldach, M., Scheckhuber, C.Q., Servos, J., and Strobel, I. (2010). Mitochondrial pathways governing stress resistance, life, and death in the fungal aging model *Podospora anserina*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1197*, 54–66.
- Padieu, E., and Bernet, J. (1967). Mode of action of the genes responsible for abortion of certain products of meiosis in the Ascomycete, *Podospora anserina*. *Comptes Rendus Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. Sci. Nat.* *264*, 2300–2303.
- Paushkin, S.V., Kushnirov, V.V., Smirnov, V.N., and Ter-Avanesyan, M.D. (1996). Propagation of the yeast prion-like [psi+] determinant is mediated by oligomerization of the SUP35-encoded polypeptide chain release factor. *EMBO J.* *15*, 3127–3134.
- Prusiner, S.B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* *216*, 136–144.

- Prusiner, S.B. (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science* 252, 1515–1522.
- Quoc, N.B., and Nakayashiki, H. (2015). RNA Silencing in Filamentous Fungi: From Basics to Applications. In *Genetic Transformation Systems in Fungi, Volume 2*, (Springer, Cham), pp. 107–124.
- Rhounim, L., Rossignol, J.L., and Faugeron, G. (1992). Epimutation of repeated genes in *Ascobolus immersus*. *EMBO J.* 11, 4451–4457.
- Rizet, G. (1941). Sur l'analyse génétique des asques du *Podospora anserina*. 59–61.
- Rizet, G. (1952). Les phénomènes de barrage chez *Podospora anserina*. I. Analyse génétique des barrages entre souches S and s. *Rev. Cytol. Biol.* 13, 51–92.
- Rizet, G. (1953a). Impossibility of obtaining uninterrupted and unlimited multiplication of the ascomycete *Podospora anserina*. *Comptes Rendus Hebd. Seances Acad. Sci.* 237, 838–840.
- Rizet, G. (1953b). Longevity of strains of *Podospora anserina*. *Comptes Rendus Hebd. Seances Acad. Sci.* 237, 1106–1109.
- Rizet, G. (1957). Are modifications leading to senescence in *Podospora* of cytoplasmic nature? *Comptes Rendus Hebd. Seances Acad. Sci.* 244, 663–665.
- Rizet, G., and Esser, K. (1953). Phenomena of incompatibility between strains of different origins in *Podospora anserina*. *Comptes Rendus Hebd. Seances Acad. Sci.* 237, 760–761.
- Roca, M.G., Weichert, M., Siegmund, U., Tudzynski, P., and Fleißner, A. (2012). Germling fusion via conidial anastomosis tubes in the grey mould *Botrytis cinerea* requires NADPH oxidase activity. *Fungal Biol.* 116, 379–387.
- Romano, N., and Macino, G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* 6, 3343–3353.
- Ryder, L.S., Dagdas, Y.F., Mentlak, T.A., Kershaw, M.J., Thornton, C.R., Schuster, M., Chen, J., Wang, Z., and Talbot, N.J. (2013). NADPH oxidases regulate septin-mediated cytoskeletal remodeling during plant infection by the rice blast fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 3179–3184.
- Sagata, N., Oskarsson, M., Copeland, T., Brumbaugh, J., and Vande Woude, G.F. (1988). Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Nature* 335, 519–525.
- Sainsard-Chanet, A., Begel, O., and Belcour, L. (1993). DNA deletion of mitochondrial introns is correlated with the process of senescence in *Podospora anserina*. *J. Mol. Biol.* 234, 1–7.
- Sainsard-Chanet, A., Sellem, C., Silar, P., Belcour, L., Dequard-Chablat, M., and Picard, M. (1994). Sénescence chez les champignons filamenteux. 574–576.
- Samarajeewa, D.A., Sauls, P.A., Sharp, K.J., Smith, Z.J., Xiao, H., Groskreutz, K.M., Malone, T.L., Boone, E.C., Edwards, K.A., Shiu, P.K.T., et al. (2014). Efficient detection of unpaired DNA requires a member of the rad54-like family of homologous recombination proteins. *Genetics* 198, 895–904.
- Segmüller, N., Kokkelink, L., Giesbert, S., Odinius, D., van Kan, J., and Tudzynski, P. (2008). NADPH Oxidases Are Involved in Differentiation and Pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 21, 808–819.
- Selker, E.U., and Stevens, J.N. (1987). Signal for DNA methylation associated with tandem duplication in *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 7, 1032–1038.
- Selker, E.U., Jensen, B.C., and Richardson, G.A. (1987). A portable signal causing faithful DNA methylation de novo in *Neurospora crassa*. *Science* 238, 48–53.
- Shiu, P.K., Raju, N.B., Zickler, D., and Metzberg, R.L. (2001). Meiotic silencing by unpaired DNA.

Cell 107, 905–916.

- Shiu, P.K.T., Zickler, D., Raju, N.B., Ruprich-Robert, G., and Metzzenberg, R.L. (2006). SAD-2 is required for meiotic silencing by unpaired DNA and perinuclear localization of SAD-1 RNA-directed RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2243–2248.
- Silar, P. (1995). Two new easy to use vectors for transformations. *Fungal Genet. Rep.* 42, 73.
- Silar, P. (2005). Peroxide accumulation and cell death in filamentous fungi induced by contact with a contestant. *Mycol. Res.* 109, 137–149.
- Silar, P. (2013). *Podospora anserina*: From Laboratory to Biotechnology. In *Genomics of Soil- and Plant-Associated Fungi*, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 283–309.
- Silar, P., and Daboussi, M.J. (1999). Non-conventional infectious elements in filamentous fungi. *Trends Genet. TIG* 15, 141–145.
- Silar, P., and Malagnac, F. (2013). *Les champignons redécouverts* (Belin).
- Silar, P., and Picard, M. (1994). Increased longevity of EF-1 $\alpha$  high-fidelity mutants in *Podospora anserina*. *J. Mol. Biol.* 235, 231–236.
- Silar, P., Haedens, V., Rossignol, M., and Lalucque, H. (1999). Propagation of a novel cytoplasmic, infectious and deleterious determinant is controlled by translational accuracy in *Podospora anserina*. *Genetics* 151, 87–95.
- Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M., and Soll, D.R. (1987). “White-opaque transition”: a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 169, 189–197.
- Sonneborn, A., Tebarth, B., and Ernst, J.F. (1999). Control of white-opaque phenotypic switching in *Candida albicans* by the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect. Immun.* 67, 4655–4660.
- Soto, C., and Saborío, G.P. (2001). Prions: disease propagation and disease therapy by conformational transmission. *Trends Mol. Med.* 7, 109–114.
- Srikantha, T., Tsai, L.K., Daniels, K., and Soll, D.R. (2000). EFG1 null mutants of *Candida albicans* switch but cannot express the complete phenotype of white-phase budding cells. *J. Bacteriol.* 182, 1580–1591.
- Srikantha, T., Borneman, A.R., Daniels, K.J., Pujol, C., Wu, W., Seringhaus, M.R., Gerstein, M., Yi, S., Snyder, M., and Soll, D.R. (2006). TOS9 regulates white-opaque switching in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 5, 1674–1687.
- Stahl, U., Lemke, P.A., Tudzynski, P., Kück, U., and Esser, K. (1978). Evidence for plasmid like DNA in a filamentous fungus, the ascomycete *Podospora anserina*. *Mol. Gen. Genet. MGG* 162, 341–343.
- Stahl, U., Kück, U., Tudzynski, P., and Esser, K. (1980). Characterization and cloning of plasmid like DNA of the ascomycete *Podospora anserina*. *Mol. Gen. Genet. MGG* 178, 639–646.
- Tamaru, H., and Selker, E.U. (2003). Synthesis of signals for de novo DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2379–2394.
- Tanaka, A., Christensen, M.J., Takemoto, D., Park, P., and Scott, B. (2006). Reactive Oxygen Species Play a Role in Regulating a Fungus–Perennial Ryegrass Mutualistic Interaction. *Plant Cell* 18, 1052–1066.
- Tanaka, M., Chien, P., Naber, N., Cooke, R., and Weissman, J.S. (2004). Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature* 428, 323–328.
- Tao, L., Du, H., Guan, G., Dai, Y., Nobile, C.J., Liang, W., Cao, C., Zhang, Q., Zhong, J., and Huang,

- G. (2014). Discovery of a “white-gray-opaque” tristable phenotypic switching system in *Candida albicans*: roles of non-genetic diversity in host adaptation. *PLoS Biol.* *12*, e1001830.
- Teichert, I., Steffens, E.K., Schnaß, N., Fränzel, B., Krisp, C., Wolters, D.A., and Kück, U. (2014). PRO40 is a scaffold protein of the cell wall integrity pathway, linking the MAP kinase module to the upstream activator protein kinase C. *PLoS Genet.* *10*, e1004582.
- Ter-Avanesyan, M.D., Dagkesamanskaya, A.R., Kushnirov, V.V., and Smirnov, V.N. (1994). The Sup35 Omnipotent Suppressor Gene Is Involved in the Maintenance of the Non-Mendelian Determinant [Psi(+)] in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Genetics* *137*, 671–676.
- Timpano, H., Chan Ho Tong, L., Gautier, V., Lalucque, H., and Silar, P. (2016). The PaPsr1 and PaWhi2 genes are members of the regulatory network that connect stationary phase to mycelium differentiation and reproduction in *Podospora anserina*. *Fungal Genet. Biol.* *FG B 94*, 1–10.
- Tong, L.C.H., Silar, P., and Lalucque, H. (2014). Genetic control of anastomosis in *Podospora anserina*. *Fungal Genet. Biol.* *FG B 70*, 94–103.
- Tuite, M.F. (1994). Genetics. Psi no more for yeast prions. *Nature* *370*, 327–328.
- Tuite, M.F., Mundy, C.R., and Cox, B.S. (1981). Agents that cause a high frequency of genetic change from [psi+] to [psi-] in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *98*, 691–711.
- Turcq, B., Deleu, C., Denayrolles, M., and Bégueret, J. (1991). Two allelic genes responsible for vegetative incompatibility in the fungus *Podospora anserina* are not essential for cell viability. *Mol. Gen. Genet.* *MGG 228*, 265–269.
- Veland, N., and Chen, T. (2017). Chapter 2 - Mechanisms of DNA Methylation and Demethylation During Mammalian Development. In *Handbook of Epigenetics (Second Edition)*, T.O. Tollefsbol, ed. (Academic Press), pp. 11–24.
- Vinces, M.D., and Kumamoto, C.A. (2007). The morphogenetic regulator Czf1p is a DNA-binding protein that regulates white opaque switching in *Candida albicans*. *Microbiol. Read. Engl.* *153*, 2877–2884.
- Waddington, C.H. (1942). Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* *563–565*.
- Wan, W., and Stubbs, G. (2014). Fungal prion HET-s as a model for structural complexity and self-propagation in prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 5201–5206.
- Wan, W., Wille, H., Stöhr, J., Baxa, U., Prusiner, S.B., and Stubbs, G. (2012). Degradation of fungal prion HET-s(218-289) induces formation of a generic amyloid fold. *Biophys. J.* *102*, 2339–2344.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., and Barton, G.J. (2009). Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *25*, 1189–1191.
- Watters, M.K., Randall, T.A., Margolin, B.S., Selker, E.U., and Stadler, D.R. (1999). Action of repeat-induced point mutation on both strands of a duplex and on tandem duplications of various sizes in *Neurospora*. *Genetics* *153*, 705–714.
- Wickner, R.B. (1994). [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* *264*, 566–569.
- Xiao, H., Alexander, W.G., Hammond, T.M., Boone, E.C., Perdue, T.D., Pukkila, P.J., and Shiu, P.K.T. (2010). QIP, a Protein That Converts Duplex siRNA Into Single Strands, Is Required for Meiotic Silencing by Unpaired DNA. *Genetics* *186*, 119–126.
- Yew, N., Mellini, M.L., and Vande Woude, G.F. (1992). Meiotic initiation by the mos protein in

*Xenopus*. *Nature* 355, 649–652.

Zordan, R.E., Galgoczy, D.J., and Johnson, A.D. (2006). Epigenetic properties of white-opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12807–12812.

Zordan, R.E., Miller, M.G., Galgoczy, D.J., Tuch, B.B., and Johnson, A.D. (2007). Interlocking Transcriptional Feedback Loops Control White-Opaque Switching in *Candida albicans*. *PLOS Biol.* 5, e256.