



**HAL**  
open science

# Fonctions et organisations de l'hétérochromatine au cours du développement sexué chez le champignon filamenteux *Podospora anserina*

Florian Carlier

► **To cite this version:**

Florian Carlier. Fonctions et organisations de l'hétérochromatine au cours du développement sexué chez le champignon filamenteux *Podospora anserina*. Biologie moléculaire. Université Paris-Saclay, 2018. Français. NNT : 2018SACLS457 . tel-02426209

**HAL Id: tel-02426209**

**<https://theses.hal.science/tel-02426209>**

Submitted on 2 Jan 2020

**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.

# Fonctions et organisations de l'hétérochromatine au cours du développement sexué chez le champignon filamentueux *Podospora anserina*

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'université Paris-Sud

École doctorale n°577

Structure et dynamique des systèmes vivants SDSV

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 26 Novembre 2018, par

**Florian Carlier**

Composition du Jury :

Simon Saule Professeur, Université Paris-Sud UMR3347 / U1021 – Signalisation normale et pathologique : de l'embryon aux thérapies innovantes des cancers	Président
Nadia Ponts Chargé de recherche, INRA - Centre de Bordeaux-Aquitaine UR 1264 - MYCSA : Mycologie et sécurité des aliments	Rapporteur
Slimane AIT-SI-ALI Directeur de recherche, Université Paris Diderot – CNRS UMR7216 : Dynamique épigénétique et différenciation cellulaire	Rapporteur
Gwenaël RUPRICH-ROBERT Maître de conférences, université Paris-Descartes UMR8236 Laboratoire Interdisciplinaire des Energies de Demain (LIED)	Examineur
Gaël LE TRIONNAIRE Chargé de recherche, Université de Renne - INRA UMR Igepp – Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes	Examineur
Fabienne Malagnac Professeur, Université Paris-Sud UMR 9198 – Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC)	Directeur de thèse



*A Jean Derain*



## **Remerciements**

*Je souhaite d'abord remercier les membres de mon jury pour avoir accepté d'examiner mon travail de thèse. Merci à Nadia Ponts et Slimane Ait-Si-Ali pour avoir accepté d'être mes rapporteurs de thèse et pour avoir lu et commenté mon manuscrit. Je remercie également les examinateurs Gwenaël Ruprich-Robert, Gaël Le Trionnaire et Simon Saule d'avoir accepté de prendre part à mon jury de soutenance de thèse.*

*Je souhaite particulièrement remercier ma directrice de thèse Fabienne Malagnac. Merci pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet d'étude dans le laboratoire. Merci de m'avoir ouvert au monde de la recherche. Merci pour tous les conseils et les connaissances que tu as pu de me transmettre au cours de ces trois dernières années.*

*Un grand merci aux membres du laboratoire « Epigénétique et Développement chez les Champignons » pour m'avoir aidé à réaliser cette étude et pour leur agréable compagnie.*

*Merci à Pierre Grognet pour m'avoir transmis ses conseils et pour le traitement informatique des données ChIP-seq.*

*Merci à Sylvie Nicolas pour son appui expérimental et pour toutes ses petites histoires que j'ai pu suivre au cours de ces trois ans passés ensemble.*

*Merci à Annie Sainsard-Chanet pour m'avoir enseigné durant de longues années pendant mes études à l'université et qui a continué de le faire au cours de la thèse. Merci pour ton soutien.*

*Merci à Simone Belmondo pour son agréable compagnie et pour m'avoir encouragé quotidiennement durant l'écriture de ma thèse.*

*Je souhaite remercier également Véronique Contamine qui a participé au début de cette étude et qui profite maintenant d'une retraite bien méritée.*

*Je souhaite particulièrement remercier Robert Debuchy qui a toujours été un soutien formidable et un puit de science remarquable. Merci pour m'avoir permis de suivre la formation Q-PCR et pour m'avoir aidé à dessiner le protocole expérimental de ChIP-QPCR. Merci de m'avoir alimenté pendant les trois mois d'écriture de la thèse.*

*Un grand merci à Daan Noordermeer et à Sébastien Bloyer pour leurs conseils et leurs ressources qui nous ont permis de générer les résultats de ChIP-seq. Merci de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire afin d'initier les expériences de western-blot.*



*Merci à Frédérique Bidard de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire afin de réaliser les photos de microscopies présentées dans cette étude.*

*Merci aux membres de mon comité de thèse Hervé Lalucque et Sébastien Bloyer qui ont suivi l'avancée de mes travaux et qui m'ont conseillé durant ces trois années de thèses.*

*Je souhaite finalement remercier Nadia Ponts pour m'avoir invité à présenter mes travaux de recherche durant le colloque EpiAgro à Bordeaux.*

*Merci à Mireille Betermier pour m'avoir proposé de présenter mes résultats au cours du séminaire « Biologie Intégrative des Génomes ».*

*Merci à France-Culture pour m'avoir permis de présenter mes travaux de recherche à la radio nationale.*

*Pour terminer, je tiens à remercier l'index « Biologie Intégrative des Génomes » (BIG) pour le financement de ce projet.*

*Un grand merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'avancée de ce projet.*





## Sommaire

Liste des abréviations	6
I- Introduction bibliographique	10
I-I La Chromatine	10
I-I-1 La fibre nucléosomique	10
Le nucléosome est l'unité primordiale de la compaction de l'ADN	10
La localisation des nucléosomes au niveau des séquences intra-géniques	12
I-I-2 Les complexes remodeleurs de la chromatine ATP-dépendants	13
I-I-3 Hétérochromatine et Euchromatine	15
Hétérochromatine constitutive et hétérochromatine facultative	16
I-II-Les histones	17
I-II-1 Les Histones canoniques	17
I-II-2 Les Histones Variantes	18
Les variants de l'histone H2A	19
Les variants de l'histone H3	20
I-II-3 Le cas de l'histone de liaison H1	21
Caractérisation <i>in vitro</i>	21
L'histone H1 s'est diversifiée au cours de l'évolution	22
L'histone H1 est présente en trois isoformes chez les mammifères	23
L'histone H1 est un acteur clef de la mise en place de l'hétérochromatine	24
I-II-4 Les Histones chez les Archaea	24
I-III La régulation de la chromatine	
par les modifications post-traductionnelles des histones	25
I-III-1 Le code Histone	26
Les premières études biochimiques, les tâtonnements d'Allfrey	26
Le « langage histone » et l'épigénétique moderne	26
I-III-2 L'acétylation des histones	28
L'acétylation des histones est prise en charge par les HATs	30
Les sirtuines sont des HDACs NAD <sup>+</sup> dépendantes	32
Sir2 et le vieillissement	33
Les sirtuines chez les mammifères	35
Les sirtuines chez les champignons	37
I-III-3 La méthylation des histones	38
I-III-3-a La méthylation des lysines	38
I-III-3-b Les marques cofacteurs de la transcription	41



<b>I-III-c L'assemblage de l'hétérochromatine constitutive</b>	<b>43</b>
<b>Les facteurs de l'hétérochromatine constitutive identifiés chez <i>D. melanogaster</i></b>	<b>43</b>
<b>Les protéines SUV(AR)3-9 sont essentielles au développement embryonnaire chez les mammifères</b>	<b>44</b>
<b>L'hétérochromatine constitutive régule la méthylation de l'ADN chez <i>A. thaliana</i></b>	<b>44</b>
<b>Les espèces de la classe des Saccharomyces sont dépourvues d'enzyme KMT1</b>	<b>46</b>
<b>Le modèle <i>S. pombe</i> : l'assemblage de l'hétérochromatine par l'ARN interférent</b>	<b>48</b>
<b>L'assemblage de l'hétérochromatine constitutive chez les champignons filamenteux a été mis en évidence chez <i>Neurospora crassa</i></b>	<b>50</b>
<b>L'hétérochromatine constitutive intervient dans la croissance végétative et le développement sexué et asexué du champignon modèle <i>N. crassa</i></b>	<b>52</b>
<b>I-III-d L'assemblage de l'hétérochromatine facultative par les protéines PcG</b>	<b>55</b>
<b>La marque H3K27me3 est apposée par le complexe PRC2</b>	<b>55</b>
<b>L'hétérochromatine facultative est essentielle au cycle de vie d'<i>A. thaliana</i></b>	<b>56</b>
<b>L'hétérochromatine facultative chez <i>S. pombe</i> fait appel au système Clr4/ARNi</b>	<b>58</b>
<b>Le complexe PRC2 assemble l'hétérochromatine facultative dans les régions subtélomériques des chromosomes de la levure <i>Cryptococcus neoformans</i>.</b>	<b>59</b>
<b>Le complexe PRC2 est conservé dans le sous-embranchement des Pezizomycotina</b>	<b>60</b>
<b>L'hétérochromatine facultative participe à la régulation de clusters de métabolites secondaires et de facteurs de virulence chez certains champignons phytopathogènes</b>	<b>61</b>
<b>I-III-e La relation entre l'hétérochromatine constitutive et facultative.</b>	<b>62</b>
<b>La modification H3K27me3 colocalisée avec H3K9me3 dans l'hétérochromatine constitutive chez <i>Zyoseptoria tritici</i></b>	<b>62</b>
<b>La méthylation de l'ADN empêche le chevauchement des deux types d'hétérochromatine</b>	<b>63</b>
<b>I-IV « Repeat Induced Point Mutation », assemblage de l'hétérochromatine et reproduction sexuée chez les champignons filamenteux</b>	<b>64</b>
<b>I-IV-1 Les mécanismes de défenses contre les ETs chez les Pezizomycotina</b>	<b>65</b>
<b>Un exemple de système de surveillance des ARN co-transcrits chez <i>C. neoformans</i></b>	<b>65</b>
<b>L'inactivation des transgènes multicopies par le Quelling chez <i>N. crassa</i> dépend de la recombinaison homologue</b>	<b>66</b>
<b>Le MSUD inactive l'expression des gènes contenus dans les segments chromosomiques non appariés au cours de la méiose</b>	<b>66</b>



Le RIP est un mécanisme préméiotique qui cible les séquences répétées présentes dans un génome fongique haploïde	67
I-IV-2 Le mécanisme moléculaire du RIP	69
L'ADN méthyltransférase RID est essentiel au RIP	69
Le modèle de reconnaissance par alignement de séquences homologues de deux doubles hélices d'ADN	70
Les signatures du RIP sont conservées chez les Pezizomycotina	71
Masc1 est essentielle pour l'établissement du cycle sexué chez <i>A. immersus</i>	73
I-V Introduction du sujet d'étude : le rôle de l'hétérochromatine au cours du développement sexué de l'ascomycète modèle <i>Podospora anserina</i>	74
II Matériels et méthodes supplémentaires	78
<u><i>Podospora anserina</i></u>	78
Le croisement en tricaryon avec la souche <i>Δmat</i>	79
III Résultats et discussions	82
III-I A RID-like Cytosine Methyltransferase Homologue Is Essential for Sexual Development in <i>Podospora anserina</i>	
III-II Loss of enhancer of zeste homologue histone methyltransferase (Kmt6) causes major depletion of both H3K9 and H3K27 tri-methylation which results in developmental defects in the filamentous fungi <i>Podospora anserina</i>	156
III-III Résultats Annexes	230
III-III-1 Implication de l'hétérochromatine sur le Repeat Induced Point Mutation chez <i>P. anserina</i>	230
III-III-2 Mise en place d'un système d'analyse à haut débit de la recombinaison méiotique chez <i>P. anserina</i>	234
IV- Discussion générale et conclusion	238
PaRID est essentielle au développement sexué	238
Le RIP est dépendant de PaKmt6	240
Mise au point du protocole de ChIP-Seq chez <i>P. anserina</i>	243
Les marques H3K9me3 et H3K27me3 colocalisent sur l'hétérochromatine constitutive	244
PaHP1 favorise la mise en place de H3K9me3 et H3K27me3	245
PaKmt1 et PaHP1 sont impliquées dans le développement végétatif	247
PaKmt6 intervient dans la plupart des étapes de développement	249
V Bibliographie	252



## Liste des tables et des figures

<b>Figure 1. La structure et le repliement de l'ADN</b>	<b>9</b>
<b>Figure 2. Observation de la fibre nucléosomique</b>	<b>11</b>
<b>Figure 3. L'organisation des nucléosomes sur les séquences géniques</b>	<b>12</b>
<b>Figure 4. Les familles de remodeleurs ATP-dépendants et leurs sous-unités catalytiques</b>	<b>14</b>
<b>Figure 5. Les territoires chromatinien</b>	<b>16</b>
<b>Figure 6. Panorama des principales modifications affectant les extrémités N-terminales des histones et des protéines remodeleurs de la chromatine</b>	<b>27</b>
<b>Figure 7. L'acétylation des lysines</b>	<b>29</b>
<b>Figure 8. Le complexe SAGA est un cofacteur de la transcription</b>	<b>31</b>
<b>Figure 9. Les deux complexes impliquant Sir2 et leurs fonctions chez <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>33</b>
<b>Figure 10. Distribution de la méthylation des lysines chez les mammifères en fonction de l'état transcriptionnelle d'un gène</b>	<b>39</b>
<b>Figure 11. La méthylation des lysines</b>	<b>41</b>
<b>Figure 12. Présence et absence de méthylation de l'histone H3 et des cytosines dans le règne des Mycota</b>	<b>47</b>
<b>Figure 13. Mise en place de l'hétérochromatine chez <i>S. pombe</i></b>	<b>48</b>
<b>Figure 14. Mise en place de l'hétérochromatine constitutive chez <i>N. crassa</i></b>	<b>51</b>
<b>Figure 15. PRC2 et PRC1 sont nécessaires au cycle de vie d'<i>A. thaliana</i></b>	<b>58</b>
<b>Figure 16. Enrichissement des marques épigénétiques sur le chromosome 7 de <i>Z. tritici</i></b>	<b>63</b>
<b>Figure 17. Le RIP chez <i>N. crassa</i></b>	<b>68</b>
<b>Figure 18. Efficacité mutationnelle du RIP dans les mutant <i>NcDim-2</i> et <i>NcRid</i> chez <i>N. crassa</i></b>	<b>70</b>
<b>Figure 19. Représentation de l'association de deux doubles hélices d'ADN</b>	<b>71</b>
<b>Figure 20. La genèse du RIP en deux étapes</b>	<b>73</b>
<b>Figure 21. Hypothèses de travail</b>	<b>75</b>
<b>Figure 22. Cycle de vie de <i>P. anserina</i></b>	<b>77</b>
<b>Figure 23. La ségrégation d'un couple d'allèles m/+ au cours de la formation des ascospores suit un schéma de post-réduction ou de pré-réduction</b>	<b>80</b>





<b>Résultats annexes - Figure 1. Implication des protéines remodeleurs de la chromatine dans le RIP</b>	<b>229</b>
<b>Résultats annexes - Figure 2. Utilisation d'un croisement entre les souches géographiques S et T pour analyser la recombinaison méiotique chez <i>Podospora</i></b>	<b>233</b>
<b>Résultats annexes - Figure 3. Le géotypage des SNP par PCR en duplex</b>	<b>235</b>
<b>Figure de discussion.</b>	
<b>Fonctions des protéines de l'hétérochromatine chez <i>P. anserina</i></b>	<b>246</b>
<b>Table 1. Les cibles non-histones de SIRT1 et leurs fonctions</b>	<b>36</b>
<b>Table 2. Liste des phénotypes associés au développement chez les mutants <i>Kmt1</i>, <i>Hpl</i> et <i>Kmt6</i> de champignons filamenteux</b>	<b>54</b>
<b>Résultats annexes – Table 1. La nouvelle génération de descendants S par T présente un biais génétique en faveur du contexte S.</b>	<b>236</b>

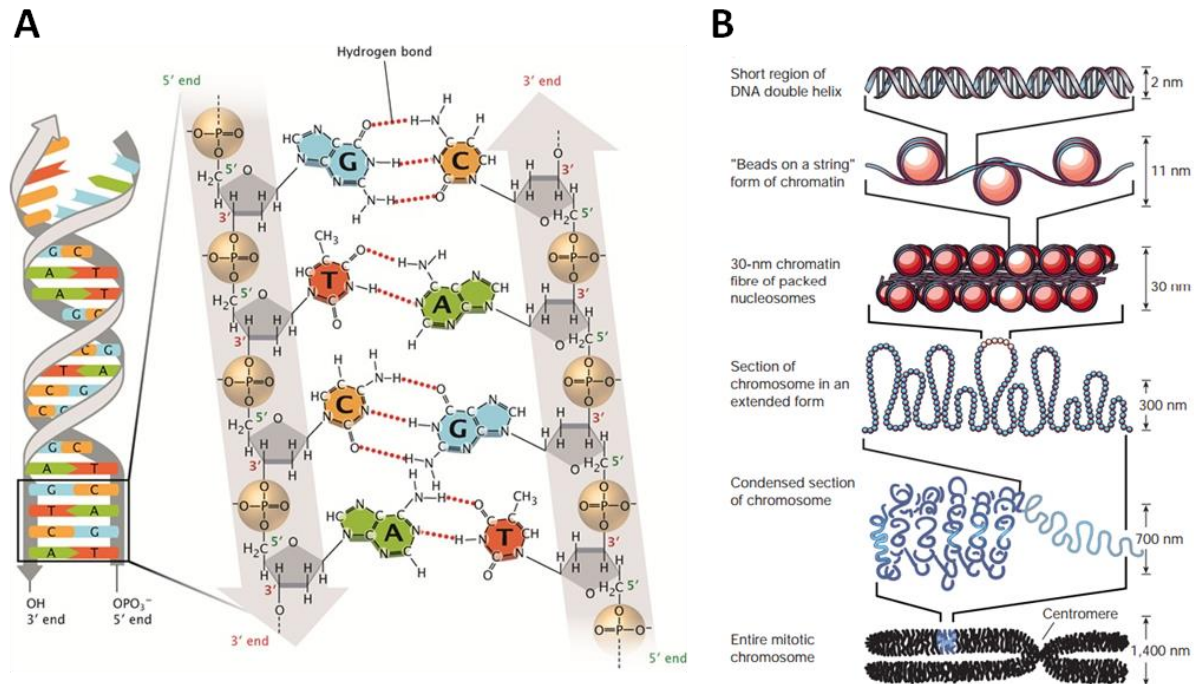


## Liste des Abréviations

5mC	5-méthylcytosine
A	adénine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNr	ADN ribosomique
ARN	acide ribonucléique
ARNi	ARN interférent
ARNm	ARN messenger
ARNs	Petit ARN non codant
ARNsi	Petit ARN interférent
ADP	adénosine diphosphate
ATP	adénosine triphosphate
bp	paire de base
BRD	Bromodomaine
C	Cytosine
CDS	Séquence codante de gène
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine
cM	centiMorgans
CoA	Coenzyme A
CR	Restriction calorique
C-terminale	extrémité COOH de protéine
Da	Dalton
DNMT	ADN méthyltransférase
ERC	ADNr extrachromosomique
ET	Elément transposable
G	guanine
GFP	« green Fluorescent Protein »
HAT	Histone acétyltransférase
HDAC	Histone désacétylase
HMT	Histone méthyltransférase



HXKYme(1,2,3)	(1 mono-, 2 di-, 3 tri-) méthylation de la lysine (Y) de l'histone (X)
HXKYAc	Acétylation de la lysine (Y) de l'histone (X)
KDM	Lysine déméthylase
MIP	« methylation induced premeiotically »
MNase	Nucléase micrococciale
MSUD	« Meiotic silencing by unpaired DNA »
N-terminale	extrémité NH <sub>2</sub> de protéine
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NFR	« nucléosome free region »
NHEJ	« Non-Homologous End-Joining »
NLR	« Nucleosome repeat length »
PcG	Polycomb-group
PCR	« polymerase chain reaction »
Pol	Polymérase
PTM	modification post traductionnelle
qPCR	PCR quantitative
RIP	« repeat induced point mutation »
SAM	S-adénosylméthionine
seq	Séquençage
SIS	« Sex-Induced Silencing »
T	thymine
TF	Facteur de transcription
TSS	Site d'initiation de la transcription
XpY	dinucléotide (X et Y correspondant à A, T, C, G)
X::Y	paire de nucléotide (X et Y correspondant à A, T, C, G)



**Figure 1. La structure et le repliement de l'ADN**

**A.** A gauche, un modèle simplifié de la structure hélicoïdale de l'ADN. A droite, une représentation moléculaire plus détaillée. L'ADN est constitué d'un squelette désoxyribose-phosphate composé de deux chaînes antiparallèles (rubans en gris) reliées entre elles par les paires de bases azotées Adénine-Thymine (vert et rouge) et Guanine-Cytosine (bleu et orange). L'enchaînement séquentiel de ces bases constitue le patrimoine génétique, propre à chaque individu vivant.

**B.** Cette hélice s'enroule deux fois autour de structures multiprotéiques : les nucléosomes (en rouge). Ce premier étage de la chromatine constitue la fibre nucléosomique ou plus communément appelé « le chapelet de perles ». Le deuxième étage correspond au premier repliement de la chromatine par rapprochement des nucléosomes entre eux ; elle forme une fibre chromatinienne de 30 nm d'épaisseur. Ce filament peut se replier sur lui-même et générer des boucles. Ces structures sont agencées spécifiquement et participent à l'architecture 3D du génome. Le repliement maximal de la chromatine a lieu au cours de la mitose, une étape clef de la division cellulaire au cours de laquelle les chromosomes sont condensés.

## **I- Introduction bibliographique**

### **I-I La Chromatine**

La structure basique de l'ADN est similaire chez toutes les espèces du vivant. Elle est constituée de deux chaînes nucléotidiques maintenues entre elles par des liaisons hydrogènes et entrelacées en une double hélice (fig. 1A). Chez les procaryotes, la fibre d'ADN est « dénudée », facilement accessible à la transcription et à la réplication. Inversement, les chromosomes eucaryotes sont structurés en chromatine.

L'unité fondamentale de la chromatine est le nucléosome comprenant un segment d'ADN enroulé autour d'un octamère d'histones. Ce nucléofilament représente le premier degré de compaction de l'information génétique et peut subir différents niveaux de repliements jusqu'à atteindre un degré de condensation maximum au cours de la métaphase (fig. 1B).

La formation de la chromatine est un processus dynamique qui joue un rôle crucial dans de nombreux processus cellulaires tels que la régulation de l'expression génique, la réplication et la réparation de l'ADN, la ségrégation des chromosomes et la recombinaison méiotique. Sa mise en place met en jeu des modifications chimiques à la fois réversibles et héréditaires localisées sur les extrémités terminales flottantes des histones qui, si elles ne présentent pas un effet direct sur la compaction de l'ADN, sont utilisées comme balise de recrutement des complexes protéiques remodeleurs de la chromatine.

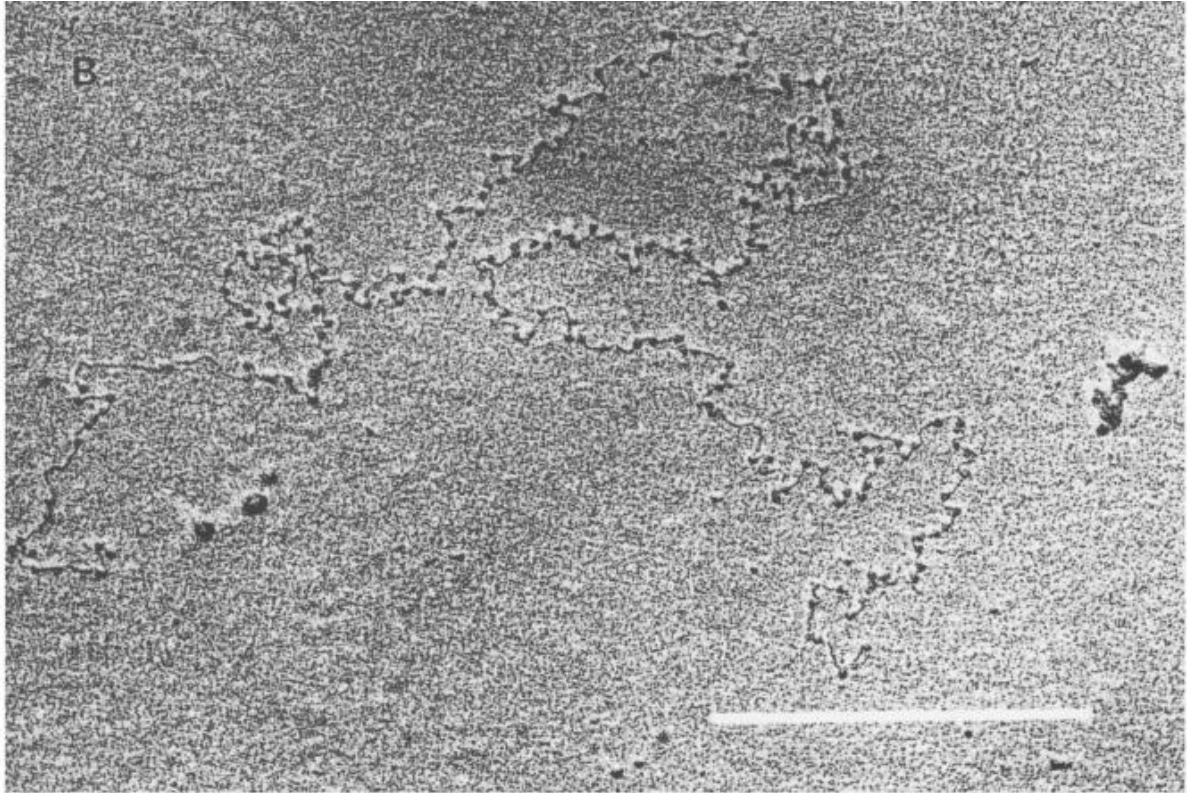
#### **I-I-1 La fibre nucléosomique**

##### **Le nucléosome est l'unité primordiale de la compaction de l'ADN**

Le nucléosome est constitué d'une matrice protéique centrale composé d'un octamère d'histones.

Dans la plupart des cas, chaque octamère est formé à partir de deux copies de chacune des quatre histones canoniques : H2A, H2B, H3 et H4. L'ensemble forme une unité globulaire de charge positive autour duquel l'ADN, chargé négativement, s'enroule 1,65 fois sur 147 pb. Les séquences d'ADN internucléosomiques sont maintenues par l'histone de liaison H1 à l'entrée et la sortie de l'octamère d'histones et leur longueur moyenne varie entre les espèces (entre 7 pb chez *Schizosaccharomyces pombe* à 38 pb chez l'homme). La définition initiale du nucléosome comprend le monomère d'ADN (147 pb +  $\approx$  20 pb = 167 pb), l'octamère d'histone et l'histone de liaison H1 (Kornberg 1974; Oudet, Gross-Bellard, et Chambon 1975).





**Figure 2. Observation de la fibre nucléosomique** (Oudet, Gross-Bellard, et Chambon 1975)

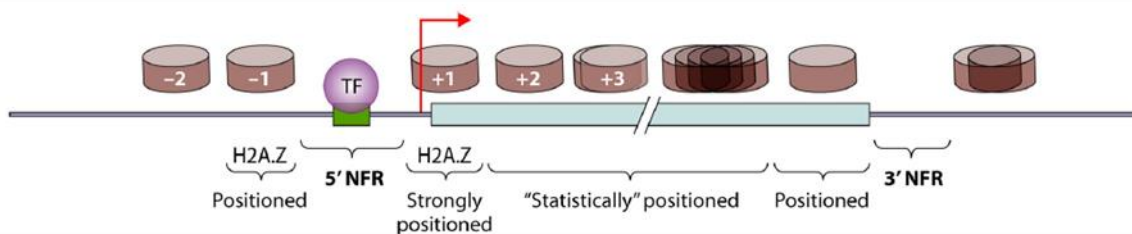
En 1975, l'observation par microscopie électronique de la chromatine de cellules de foie de poulet après digestion de l'histone H1 par la trypsine révèle la forme de la fibre nucléosomique. La chromatine est composée d'une chaîne flexible de particule sphérique de 124 Å de diamètre que l'on nommera « nucléosome ». La barre blanche indique 0,5 µm.

Au cours de chaque réplication de l'ADN, les nucléosomes sont dissociés avant d'être réassemblés à la fois sur les brins parentaux et fils. Ce processus met en jeu des protéines chaperonnes (CAF1 et ASF1) qui interagissent directement avec la machinerie de réplication de l'ADN (Verreault et al. 1996; Munakata et al. 2000). La célérité de ce mécanisme et son lien étroit avec le réplisome permettrait la redistribution locale des histones pour générer de nouveaux nucléosomes chimériques aux niveaux des brins fils. Cette caractéristique serait l'un des éléments mécanistiques de l'hérédité des modifications épigénétiques portées par les histones (Radman-Livaja et al. 2011).

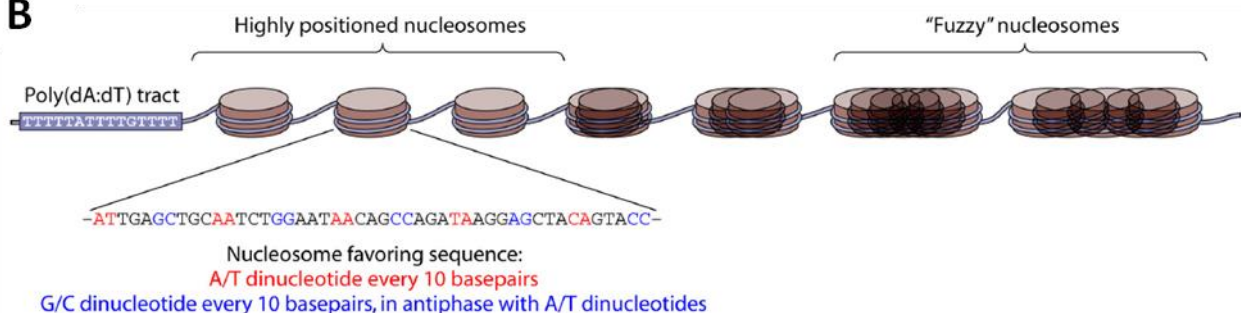
## La localisation des nucléosomes au niveau des séquences intra-géniques

La localisation des nucléosomes dans le génome est un processus dynamique qui intervient directement dans la régulation de l'expression génique. En effet, contrairement aux régions internucléosomiques, l'ADN contenu dans l'octamère d'histone est peu accessible à la machinerie transcriptionnelle et aux éléments de régulation intervenant en *trans* (e.g. facteurs de transcription). En outre, des expériences de cartographie de nucléosome chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont montré que la majorité des gènes présentent un profil de localisation similaire.

**A**



**B**



**Figure 3. L'organisation des nucléosomes sur les séquences géniques** (Jansen et Verstrepen 2011)

Représentation schématique du positionnement des nucléosomes chez *S. cerevisiae*. A. Les séquences d'ADN transcrites (rectangle bleu) sont bordées par des régions NRF dépourvues de nucléosomes (représentées en rouge). Le NRF en 5' du TSS (flèche) est bordé par l'histone variant H2A.Z (voir paragraphe « histones variants ») et est constitué de séquences promotrices (rectangle vert) sur lesquelles se fixe les facteurs de transcription (TF). B. Le positionnement des nucléosomes dépend d'éléments nucléiques en cis comprenant les séquences barrières riches en A::T aux frontières du NRF et des répétitions de nucléotides A/T et C/G sur l'ADN du nucléosome corps.

95% des gènes de la levure présentent ainsi une région d'environ 150 pb dépourvue de nucléosomes en 5' du site de démarrage de la transcription (TSS) (communément appelé NRF pour « nucléosome free region ») bordée par deux nucléosomes fermement positionnés (-1 et +1) (fig. 3A).

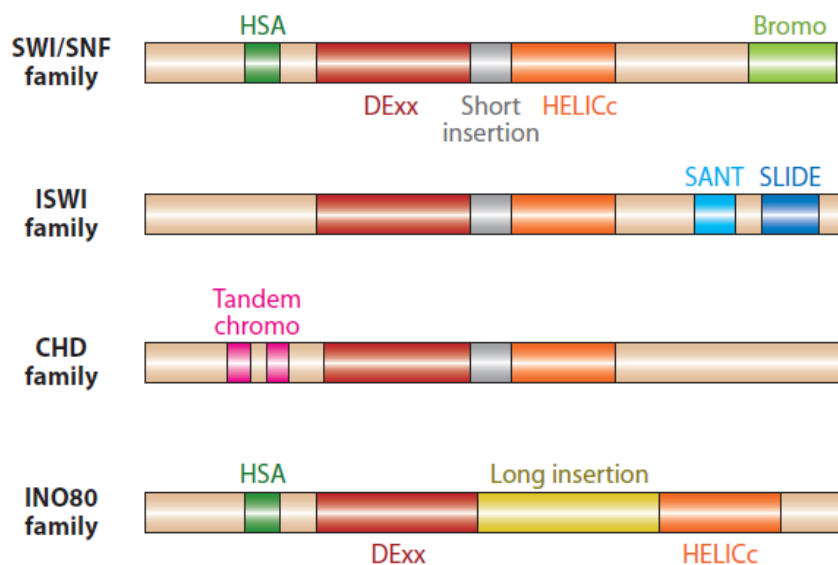
Le positionnement du NFR est initialement mis en place par des séquences d'ADN régulatrices riches en AT défavorisant la mise en place des nucléosomes (Ramakrishnan et al. 1993b; Iyer et Struhl 1995; Mavrich et al. 2008) (fig. 3B). Ces séquences « barrières » positionnent les nucléosomes -1 et +1 qui à leur tour, par effet de réciprocité, positionnent les nucléosomes +2 et -2 et ainsi de suite jusqu'à ce que l'accumulation des petites différences abolisse cette rythmique de localisation spécifique. De la même façon, certaines espèces présentent une séquence NFR supplémentaire au niveau du terminateur, même si cette propriété est moins conservée que celle décrite précédemment. Par opposition aux séquences barrières riches en AT, des séquences alternant le dinucléotide A/T (environ un tous les 10 pb) et le dinucléotide G/C (entre les A/T) augmenteraient l'affinité de l'ADN à se structurer en nucléosome (Drew et Travers 1985). Même si ces deux éléments semblent jouer un rôle déterminant dans l'assemblage de la chromatine, la régulation dynamique et temporelle de la localisation des nucléosomes dépend de facteurs protéiques *trans* communément appelés remodeleurs de la chromatine.

Parmi les remodeleurs de la chromatine, nous distinguerons d'une part les protéines « éditrices » qui ajoutent des modifications régulatrices post traductionnelles sur les extrémités C-terminales des histones et d'autre part les complexes protéiques ATP-dépendants qui agissent directement sur la stabilité des nucléosomes.

### **I-II-2 Les complexes remodeleurs de la chromatine ATP-dépendants**

Contrairement aux protéines chaperonnes qui interviennent dans l'assemblage du nucléosome, les complexes remodeleurs de la chromatine ATP-dépendants déstabilisent l'interaction ADN/histone. En hydrolysant l'ATP, elles induisent une translocation de l'ADN internucléosomique vers l'intérieur du nucléosome pour générer une boucle de dissociation (Zofall et al. 2006). Cette boucle se propage sur la surface du nucléosome entraînant sa dissociation, son déplacement ou sa restructuration.

Ces complexes sont regroupés en quatre familles incluant les SWI/SNF (switch/sucrose-nonferment-able), les ISWI (imitation switch), les INO80 (inositol-requiring) et les CHD (chromo-helicase/ATPase-DNA-binding). Chaque complexe possède une sous unité ATPase et des sous unités non catalytiques régulatrices et/ou fonctionnelles. Les ATPase présentent un domaine catalytique conservé mais se distinguent par leurs domaines de fixation et de régulation qui leurs confèrent des fonctions spécifiques (fig. 4).



**Figure 4. Les familles de remodeleurs ATP-dépendants et leurs sous-unités catalytiques** (Clapier et Cairns 2009)

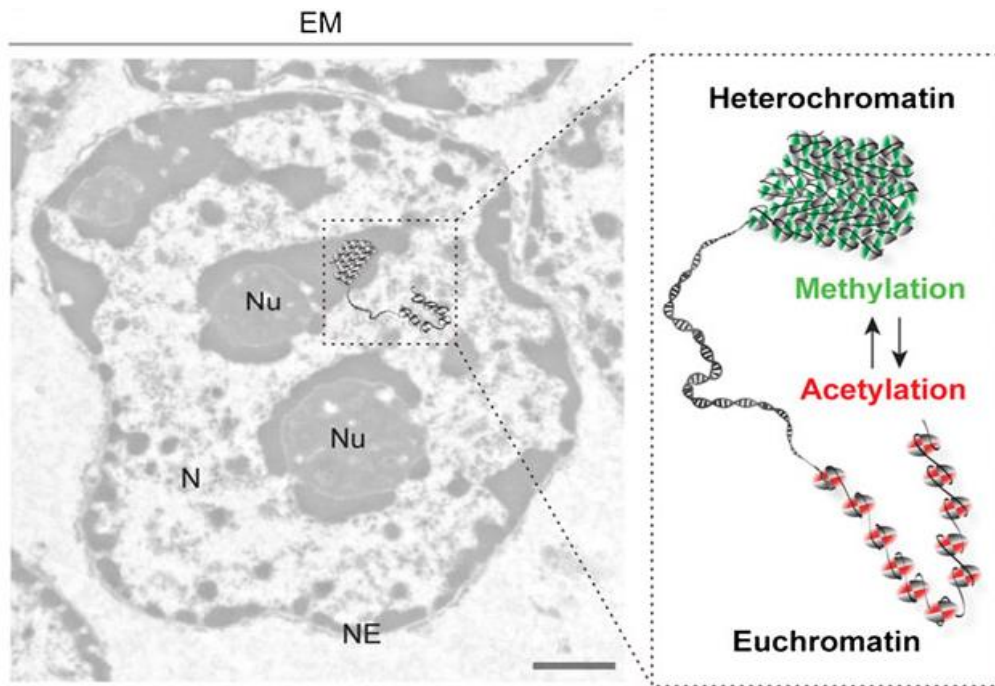
Chaque famille de remodeleurs possède une sous-unité catalytique caractérisée par un domaine ATPase séparé en deux parties par une insertion plus ou moins longue, DExx (rouge) et HELICc (orange). Les familles sont définies selon leurs combinaisons distinctes de domaines adjacents à l'unité catalytique. Parmi eux, le bromodomaine (vert clair) et le chromodomaine (rose) reconnaissent respectivement les résidus histones acétylés et méthylés. Les domaines Hélicase-SANT (HSA, vert foncé) et SLIDE (bleu foncé) sont des modules de fixation à l'ADN, et le domaine SANT (bleu clair) promeut des interactions protéine-protéine, notamment avec les extrémités terminales des histones.

Certains constituants des complexes remodeleurs ATP-dépendant, protéines catalytiques ou régulatrices, sont des molécules « lectrices » définies par la capacité à cibler spécifiquement les modifications chimiques post traductionnelles des histones. Cette interaction peut se faire via les domaines de fixation contenus dans des sous-unités catalytiques tels que le bromodomaine des SWI/SNF et le chromodomaine des CHD qui reconnaissent respectivement l'acétylation de la lysine 14 et la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (fig. 4). Les remodeleurs sont également capables d'interagir avec des facteurs de transcription pour cibler des gènes d'intérêts. Cela a été démontré notamment pour l'activateur Gcn4 qui interagit avec les complexes RSC et SWI/SNF chez la levure pour réguler l'expression du gène *ARG1* intervenant dans le métabolisme des acides aminés (Swanson et al. 2003). La multiplicité de ces complexes et de leurs composantes est un des éléments utilisés par l'évolution pour complexifier les niveaux de régulation de l'expression génique de la cellule.

En contrôlant l'accessibilité de l'ADN, les remodeleurs ont un rôle clef dans la régulation de nombreux processus cellulaires. Ils facilitent notamment le passage des ARN et ADN polymérase en dissociant les nucléosomes qui gênent leur progression puis repositionnent les nucléosomes réassemblés. Ils régulent l'accessibilité aux machineries de réparation de l'ADN et de recombinaison et participent activement à la régulation spécifique de l'expression des gènes en dissimulant ou découvrant les séquences cis régulatrices.

### **I-I-3 Hétérochromatine et Euchromatine**

L'activité transcriptionnelle des gènes dépend de l'organisation locale de son environnement chromatinien. En fonction de son degré de compaction, la chromatine se présente sous deux formes. L'euchromatine est peu condensée et localisée dans des régions riches en gènes. Elle correspond à un environnement chromatinien favorable à la transcription. Cependant, ces régions peuvent être condensées au cours de la mitose et de la méiose afin d'exécuter les étapes de ségrégation des chromosomes, puis de nouveau décondensées. Par opposition, l'hétérochromatine reste hautement condensée tout au long du cycle cellulaire et inhibe l'activité transcriptionnelle. Comparée à l'euchromatine, elle est répliquée tardivement en phase S et est située dans des régions relativement pauvres en gènes mais riches en éléments répétés. Dans le noyau, l'hétérochromatine se situe principalement dans les régions péri-nucléaires et dans le nucléole, alors que l'euchromatine est plutôt répartie dans le nucléoplasme (fig. 5). En plus de leurs divergences physiques et spatiales, ces deux formes de chromatines conditionnent leur environnement protéique via des plateformes de recrutement pour assurer différentes fonctions nucléaires (*e.g.* réparation de l'ADN, recombinaison, transcription).



**Figure 5. Les territoires chromatinien** (Jost, Bertulat, et Cardoso 2012)

Les territoires de l'hétérochromatine et de l'euchromatine ont été déterminés d'un point de vue cytologique par Emil Heitz en 1928. L'image de microscopie électronique (à gauche) nous montre les compartiments chromatinien d'un noyau (N) de cellule de foie de souris. L'hétérochromatine, dense, est en partie regroupée dans le nucléole (Nu) et dans des espaces périphériques proches de l'enveloppe nucléaire (NE). L'état de condensation de la chromatine dépend en partie des modifications post-traductionnelles des histones. Si l'acétylation est caractéristique de l'euchromatine, la méthylation est présente dans les deux formes mais concerne des résidus cibles différents (voir paragraphe modification des histones).

### **Hétérochromatine constitutive et hétérochromatine facultative**

L'hétérochromatine peut être classée en deux catégories : l'hétérochromatine constitutive et l'hétérochromatine facultative. L'hétérochromatine constitutive est permanente, elle est localisée dans des régions dénuées de gènes et riches en séquences d'ADN répétées. Parmi elles, les centromères et les télomères correspondent respectivement aux régions centrales et aux extrémités des chromosomes. Ce sont des régions fortement enrichies en éléments transposables où la présence d'hétérochromatine constitutive permet de réprimer leur expression. Par ailleurs, les propriétés de compaction de ce type de chromatine empêchent l'accès des protéines de recombinaison, réparation, etc. Par contraste, l'hétérochromatine facultative peut être réversible.

Elle se forme dans un environnement euchromatinien dans lequel les protéines de l'hétérochromatine ciblent spécifiquement des gènes pour en réprimer l'expression. Chez les organismes multicellulaires, ce type de chromatine est essentiel à l'exécution des programmes développementaux qui participent à la différenciation des cellules, par exemple pour réprimer les gènes de pluripotence (Serrano, Vazquez, et Tischfield 2013). Chez les mammifères, elle permet la compensation de dose en inactivant un des deux chromosomes X dans les cellules des femelles (Brinkman et al. 2006). La régulation de l'hétérochromatine facultative dépend donc de son environnement et peut être altérée par divers stimuli. Chez les organismes macroscopiques tels que les champignons filamenteux, la présence de certains composants dans le milieu extérieur peut altérer l'expression d'un certain nombre de gènes du métabolisme secondaire et/ou des gènes de virulence. Ces gènes sont souvent regroupés en cluster pour faciliter une réponse rapide à travers la régulation chromatinienne.

Moléculairement, l'hétérochromatine constitutive est associée à la présence de la protéine lectrice HP1 (protéine de l'hétérochromatine 1) et à la modification post-traductionnelle H3K9me3 (5tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone 3) alors que l'hétérochromatine facultative est associée aux protéines de type Polycomb (complexes PRC1 et PRC2) et à la modification H3K27me3 (tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone 3). Chez les organismes qui en sont pourvus, l'hétérochromatine colocalise avec la méthylation des cytosines de l'ADN.

### **I-III-Les histones**

Les histones sont de petites protéines (autour de 110-130 aa pour la plupart d'entre elles) très conservées qui présentent un domaine globulaire (ou domaine corps) et une extrémité N- et/ou C-terminale flexible sujette à des modifications covalentes qui interviennent dans leur structure, leurs fonctions et leur régulation.

#### **I-II-1 Les Histones canoniques**

Les quatre histones canoniques H2A, H2B, H3 et H4 font partie d'une des familles de protéines les plus conservées chez les eucaryotes. Elles sont exprimées exclusivement en phase S par des gènes en copies multiples, généralement regroupés en clusters (Albig et Doenecke 1997).

Chez les métazoaires, les transcrits ont la particularité de ne pas contenir d'intron et d'extrémités polyadénylées mais présentent une structure tige-boucle en 3' nécessaire à leur terminaison. Ces histones s'assemblent en dimères H3-H4 et H2A-H2B. L'association de deux copies de chaque dimère, constitue la structure fonctionnelle des nucléosomes.

Les histones présentent toutes un agencement moléculaire type, composé d'un domaine N-terminal peu structuré riche en acide aminés basiques et une région en C-terminal courte. La région centrale est très conservée et constitue le domaine de repliement histone (« histone fold motif ») composé de 3 hélices alpha séparées par deux feuillets beta (Arents et Moudrianakis 1995). Ce domaine central compose l'interface de dimérisation H2A-H2B et H3-H4, essentiel à la formation de l'octamère. Le motif histone est retrouvé également sur des protéines interagissant avec l'ADN impliquées dans la régulation de la transcription (Baxevanis *et al.* 1995).

La fonction des nucléosomes varie selon l'incorporation spécifique d'histones variants en remplacement des histones conventionnelles et de la présence de modifications post-traductionnelles majoritairement localisée au niveau des extrémités C-terminale des histones.

### **I-II-2 Les Histones Variantes**

Contrairement aux histones canoniques, les histones variantes sont exprimées pendant tout le cycle cellulaire et leur incorporation, indépendante de la réplication de l'ADN, est réalisée par remplacement d'histones dans les nucléosomes via l'activité des complexes remodeleurs ATP-dépendant et des histones chaperonnes (Albig et Doenecke 1997; Doyen *et al.* 2006; Luk *et al.* 2007). Contrairement aux histones canoniques, les ARN pré-messagers d'histones variantes présentent des introns qui peuvent être sujets à de l'épissage alternatif et sont polyadénylés.

Les différences structurelles introduites par les histones variantes affectent la stabilité des nucléosomes concernés et l'association ADN/protéine, ce qui a des conséquences directes sur la conformation de la chromatine et donc sur la transcription. De plus, les histones variantes présentent des fonctions spécifiques lors des processus cellulaires telles que la réparation de l'ADN et le recrutement des kinetochores.



Les histones variantes sont présentes dans l'ensemble des espèces eucaryotes mais se sont diversifiées chez les métazoaires (les mammifères notamment) en nombre et en fonctions pour vraisemblablement agrandir et complexifier les systèmes de régulation transcriptionnelle nécessaires au maintien et au changement des états de différenciation cellulaire.

Dans cette étude nous présenterons les histones variantes les plus étudiées et les mieux caractérisées.

### **Les variants de l'histone H2A**

L'histone H2A présente le plus de variants d'histones caractérisés avec des propriétés fonctionnelles distinctes.

L'histone variant H2A.X se distingue par la présence d'un domaine riche en motif sérine-glutamine (SQ) sur l'extrémité C-terminale. En réponse aux cassures double brins d'ADN, les variants H2A.X sont phosphorylés localement au niveau de la sérine 139 ( $\gamma$ H2A.X) par les kinases ATR, ATM et DNA-PK (Rogakou et al. 1998). Cette modification intervient dans le recrutement des machineries de réparation des dommages à l'ADN et des complexes remodeleurs de la chromatine ATP-dépendants INO80 facilitant l'accès à l'ADN en relâchant la chromatine (van Attikum, Fritsch, et Gasser 2007).

H2A.Z est l'histone variante la mieux conservée puisqu'elle présente 60% d'identité avec son homologue conventionnel (Thatcher et Gorovsky 1994). En outre, la perte de ce variant chez beaucoup d'organismes, tels que la drosophile ou la souris, entraîne un arrêt précoce du développement (Faast et al. 2001). Sa fonction est principalement associée à l'activation transcriptionnelle (Allis et al. 1980; Adam et al. 2001). Localisée majoritairement dans les nucléosomes adjacents aux séquences NFR en 5' des gènes de l'euchromatine, elle participerait à l'architecture des promoteurs en régulant la déplétion en nucléosome et interviendrait dans la fixation de la machinerie transcriptionnelle au TSS. Constitutivement exprimée, son incorporation est réalisée spécifiquement chez la levure par les complexes remodeleurs INO80 et l'histone chaperonne Chz1 (Luk et al. 2007). Une étude structurale a montré que la présence de H2A.Z déstabilise les interactions entre histones favorisant ainsi la dissociation du nucléosome (Thakar et al. 2009). Il semblerait aussi que certaines de ses fonctions soient régulées par l'acétylation de plusieurs de ses résidus en N-terminale.

Sa présence dans les régions péri-centromériques suggère que cette histone variante joue un rôle dans l'établissement de l'hétérochromatine constitutive en lien avec la fixation de la protéine hétérochromatine 1 (HP1) (Swaminathan, Baxter, et Corces 2005).

Trois fois plus gros que l'histone canonique, et présent seulement chez les vertébrés, le variant macroH2A (40kDa) arbore un macro-domaine globulaire additionnel relié par une chaîne flexible en C-terminale. Chez la souris, son extrémité N-terminale présente 64% d'identité avec celle de l'histone conventionnelle (Pehrson et Fried 1992). Associé à l'inactivation du chromosome X chez les mammifères (Costanzi et Pehrson 1998; Nusinow et al. 2007), ce variant est localisé le plus souvent au niveau des promoteurs de gènes développementaux et contenus dans l'hétérochromatine facultative. Comme initialement montré chez le Zebrafish, macroH2A participe de concert avec les protéines du groupe Polycomb à la régulation transcriptionnelle de ces gènes et donc à la mise en place d'un état cellulaire différencié (Buschbeck et al. 2009). Son domaine histone se distingue au niveau de la zone de contact H2A-H2A ce qui renforcerait la stabilité du nucléosome et promouvrait ainsi la compaction de la chromatine (Muthurajan et al. 2011). Le macro-module est conservé dans tous les règnes du vivant et présente une affinité pour les métabolites NAD<sup>+</sup> tel que l'ADP-ribose ce qui peut suggérer une fonction dans la régulation chromatinienne en réponse au contenu en métabolites cellulaires (Till et Ladurner 2009).

### **Les variants de l'histone H3**

Propres aux eucaryotes, les centromères présentent un domaine chromatinien compact spécialisé dans l'assemblage du complexe kinetochore nécessaire à la fixation du fuseau mitotique de microtubules. Leurs caractéristiques varient selon les espèces mais tous ont en commun la présence d'un domaine central enrichi en nucléosomes, portant le variant cenH3/CENP-A incorporé à la place de l'histone H3, en phase G1 spécifiquement, par la protéine chaperonne scm3/HJURP. CenH3 est essentielle au bon fonctionnement des kinetochores et donc à l'intégrité et à la ségrégation des centromères (Stoler et al. 1995; Yoda et al. 2000). Il a en particulier été démontré dans les cellules Hela que la phosphorylation de son extrémité N-terminale est essentielle à la progression mitotique (Goutte-Gattat et al. 2013).

Chez les mammifères, l'histone H3 comprend trois formes non centromériques. Les histones canoniques H3.1 et H3.2 diffèrent d'un acide aminé mais partagent la même fonction.

En revanche, l'histone variant H3.3, qui diffère de 5 acides aminés de H3.1, est incorporée indépendamment de la réplication par l'histone chaperonne HIRA au niveau des promoteurs des gènes actifs (elle colocalise d'ailleurs avec H2A.Z), alors que H3.1 est plutôt associée aux promoteurs inactifs. Si H3.3 n'affecte pas la stabilité des nucléosomes, ce variant d'histone est en revanche enrichi avec la modification post traductionnelle (PTM) activatrice H3K4me3 et promeut la transcription des gènes. Cette histone participerait par ailleurs à la compensation de dose du chromosome X chez la drosophile (Mito, Henikoff, et Henikoff 2005). Ce variant est également incorporé spécifiquement au niveau des régions péri-centromériques et des télomères par le complexe apoptotique chaperon Daax en association avec le complexe remodeleur ATRX (un sous type d'unité catalytique SNF2 de la famille SWI/SNF) et servirait ainsi à moduler l'expression des gènes en copies multiples (Drané et al. 2010).

### **I-II-3 Le cas de l'histone de liaison H1**

#### **Caractérisation *in vitro***

Comme les histones canoniques, H1 possède un domaine globulaire conservé de 75 aa qui présente un motif de conformation d'histone et une longue extrémité C-terminale (100 aa) enrichie en résidus basiques qui adoptent un repliement spécifique en s'associant avec l'ADN (Ramakrishnan et al. 1993a). Le domaine globulaire interagit directement avec l'octamère d'histone et l'ADN aux sites d'entrée et de sortie du nucléosome cœur, ce qui stabilise la structure, inhibe l'activité de certains complexes remodeleurs, empêche son glissement spontané et protège l'ADN de l'action des nucléases (Simpson 1978; Allan et al. 1980; Hill et Imbalzano 2000).

En 1979, Thoma *et al.* démontrent *in vitro* que l'histone H1, en faible concentration ionique, est capable d'orienter et d'ordonner la fibre nucléosomique en une structure chromatiniennne en zig-zag, plus compacte, de 30nm d'épaisseur. Des études viennent finalement valider ses caractéristiques biochimiques en démontrant la faculté de l'histone de liaison d'inhiber la transcription (Schlüssel et Brown 1984; Croston *et al.* 1991). Tout semble alors désigner l'histone de liaison H1 comme un élément clef de la compaction de la chromatine.

## L'histone H1 s'est diversifiée au cours de l'évolution

Pourtant, l'histone H1, considérée comme variant, représente la classe d'histone la plus divergente entre les espèces en nombre d'isoformes, de structures et de régulations de son expression. On comptabilise ainsi un variant chez le protiste *Tetrahymena thermophila*, la levure *S. cerevisiae* et les ascomycètes (*e.g. Ascobolus immersus, Aspergillus nidulans et Neurospora crassa*), trois chez *Arabidopsis thaliana* contre six chez *Nicotiana tabacum*, un chez *Drosophila melanogaster* contre huit chez *Caenorhabditis elegans* et 11 chez les mammifères (*e.g. Mus musculus et Homo sapiens*) (Izzo, Kamieniarz, et Schneider 2008). Chaque variant étant présent en une seule copie dans chaque espèce.

L'isoforme du protiste *T. thermophila* révèle une forme plus primitive dépourvue de la majeure partie du domaine globulaire. Cette caractéristique a été mise en parallèle avec la division amitotique du macronoyau qui ne nécessite pas de condensation de la chromatine, ce qui suggèrerait que le domaine globulaire (manquant dans cette espèce) serait responsable de cette fonction (Wu *et al.* 1986). A l'inverse, le variant de *S. cerevisiae* présente un domaine globulaire additionnel. Bien que sa fonction ne soit toujours pas élucidée, il se pourrait que l'isoforme soit capable de fixer deux octamères d'histones à la fois (Landsman 1996). La délétion du gène chez ces deux organismes n'affecte pas la viabilité et n'induit pas d'augmentation globale de l'expression génique mais altère spécifiquement la régulation transcriptionnelle d'une cinquantaine de gènes (Shen et Gorovsky 1996; Hellauer, Sirard, et Turcotte 2001). En outre, des expériences de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) ont montré, *in vivo*, que l'interaction de l'histone H1 avec le nucléosome cœur n'est que transitoire (de l'ordre de quelques minutes) en comparaison avec les histones canoniques (de l'ordre de plusieurs heures) (Misteli *et al.* 2000). Cette caractéristique de mobilité dynamique couplée à sa fonction de régulateur spécifique de l'expression génique confère à l'histone H1 la capacité d'intervenir spécifiquement dans le génome pour modifier l'état de la chromatine locale.

La perte de l'histone de liaison ne semble pas non plus affecter la viabilité, la croissance végétative et le développement sexué chez les Ascomycètes (Seymour *et al.* 2016). Il a néanmoins été montré qu'elle réduit la longévité chez *A. immersus*, augmente l'accessibilité de la chromatine à la MNase, et augmente la méthylation globale de l'ADN (Barra *et al.* 2000). Chez *A. thaliana* la forte réduction des histones H1 induit des défauts phénotypiques pléiotropes sur le développement et la croissance (Wierzbicki et Jerzmanowski 2005).

## **L'histone H1 est présente en trois isoformes chez les mammifères**

Chez les mammifères, la distribution d'histone H1 est importante et très conservée. On distingue trois sous catégories. La première catégorie comprend cinq gènes d'histones qui sont organisés en clusters et exprimés uniquement en phase S. En conséquence, les histones H1.1 à H1.5 sont incorporées de manière répliation-dépendante dans la chromatine. Au contraire, la deuxième catégorie comprend les histones H1.0 et H1x dont les gènes s'expriment tout au long du cycle cellulaire et dont les protéines correspondantes sont incorporées à tout moment au cours du cycle cellulaire. La troisième catégorie contient quatre gènes qui s'expriment uniquement dans les cellules germinales (H1t, H1T2 et HILS1 dans les gamètes mâles et H1oo dans l'ovocyte).

Chez la souris, l'inactivation d'un seul gène codant une de ces histones n'affecte pas la viabilité et ne présente pas de phénotype remarquable à l'exception de H1T2, nécessaire à la structuration de la chromatine au cours de la spermatogenèse, dont l'inactivation conduit à une infertilité des individus mâles (Tanaka et al. 2005). L'absence de phénotype des autres simples mutants s'explique par la redondance fonctionnelle des histones et par l'augmentation compensatoire de l'expression des variants restants dans les simples mutants. En revanche, la délétion séquentielle des trois variants H1.2, H1.3 et H1.4 est létale au stade embryonnaire précoce (Fan et al. 2003). Si les cellules souches embryonnaires (ES) extraites présentent une chromatine plus relâchée, la longueur moyenne de la séquence d'ADN nucléosomique (NLR pour « Nucleosome repeat length ») est réduite, suggérant un resserrement des nucléosomes entre eux. Fan *et al* proposent que la réduction du NLR permette de contrebalancer la modification des charges électrostatiques provoquée par l'absence, ou du moins la forte réduction, de l'histone de liaison. Dans le même sens, la présence de la PTM activatrice H4K12Ac globale est fortement diminuée dans ces cellules (ainsi que H3K9me2 et H3K27me3 mais dans une moindre mesure). Comme déjà observé chez la levure, il a été montré que l'inactivation des trois histones H1 affecte significativement l'expression que d'une trentaine de gènes chez la souris, positivement ou négativement. Parmi ces gènes, un tiers sont soumis à l'empreinte génomique parentale ou sont localisés sur les chromosomes X ou Y, pour lesquels, la méthylation de l'ADN joue un rôle majeur dans la régulation de leur expression (Fan et al. 2005).

## **L’histone H1 est un acteur clef de la mise en place de l’hétérochromatine**

Si les études *in vivo* chez les mammifères n’apportent que peu de réponses claires sur la fonction de l’histone H1, celles sur *D. melanogaster* montrent qu’elle joue un rôle majeur dans la formation de l’hétérochromatine. Lu *et al* ont mis en évidence que plus de la moitié des éléments transposables (TEs) référencés chez la drosophile sont surexprimés dans des cellules fortement déplétées en histone H1. Dans ces conditions, les locus concernés sont appauvris en PTMs inactivatrices H3K9me2. Ces observations dessinent un lien entre l’histone de liaison H1 et la formation et/ou le maintien de l’hétérochromatine, lien renforcé par la propriété de H1 d’interagir à la fois avec l’histone méthyltransférase (HMT) Su(var)3-9 et la protéine Hp1, toutes deux nécessaires à la formation de l’hétérochromatine constitutive (X. Lu et al. 2013). L’interaction spécifique avec HP1 a également été caractérisée *in vitro* pour l’histone de mammifère H1.4 et serait régulée par la présence de PTMs de type méthylation et phosphorylation au niveau de l’extrémité N-terminale de l’histone (Daujat et al. 2005).

### **I-II-4 Les Histones chez les Archaea**

Les analyses phylogénétiques indiquent que l’émergence du domaine de repliement histone est survenue avant la divergence des lignages Archaea et Eucaryote mais après celui des bactéries, d’où ils sont absents. Chez les Archaea, ils sont présents dans la classe des Euryarchaea et semble s’être perdus relativement tôt au cours de la divergence des Crenarchaea (Sandman et Reeve 2006).

Contrairement aux eucaryotes, les histones d’Archaea sont dépourvues d’extrémités N-terminales sujettes aux PTM régulatrices. Elles présentent cependant un domaine d’interaction histone-histone ainsi que les résidus chargés nécessaires à la fixation de l’ADN (Sandman et Reeve 2006). Si l’assemblage des nucléosomes eucaryotes implique strictement deux copies des hétérodimères H2A-H2B et H3-H4 dû aux propriétés structurales des protéines concernées, les « nucléosomes » Archaea rassemblent tout aussi bien des homodimères que des hétérodimères, voir des homotétramères et hétérotétramères. Les dimères et tétramères, constitués d’histones homologues aux protéines H3 et H4, interagissent avec l’ADN de manière identique aux eucaryotes et protègent des séquences de 60 à 180 pb contre la digestion à la MNase (avec une périodicité de 30 pb) (Pereira et Reeve 1998; Mattioli et al. 2017).

En adaptant la méthodologie utilisée chez *S. cerevisiae*, Ammar *et al* ont déterminé un profil de localisation des nucléosomes chez *Haloferax volcanii*. Ils ont ainsi démontré la présence de 14,2 nucléosomes par kb dans son génome (contre 5,2 chez la levure) et identifié une NRF au niveau des TSS de 2 343 transcrits sur 3 059 (Ammar *et al.* 2012).

Si l'utilité des histones dans la compaction des génomes chez les Archaea reste matière à débat (à cause de leurs petites tailles), il se pourrait qu'il existe chez ces espèces une régulation transcriptionnelle liée à une ou plusieurs structures chromatinienne. Bien qu'à ce jour, aucune histone chaperonne ou protéine remodelleur de la chromatine n'ait été identifiée chez les Archaea, on peut facilement imaginer un système de régulation qui tirerait partie de leur faculté à établir différents étages de complexes protéiques fonctionnels de type histone. Les fortes similarités des dimères Archaea avec H3-H4, telle que leur capacité d'interagir avec l'ADN, laisse penser que l'émergence d'une régulation de l'expression génique impliquant une forme de chromatine primitive a eu lieu avant la divergence des deux lignages et trouverait son origine dans les formes ancestrales des histones H3 et H4 (Pereira et Reeve 1998).

### **I-III La régulation de la chromatine par les modifications post-traductionnelles des histones**

Si les histones variantes sont facilement différenciables des histones canoniques, une même histone dite canonique dans un espace chromatinien et/ou à un temps différent peut présenter une fonction biologique distincte. Cette propriété s'opère à travers la/les modification(s) chimique(s) réversible(s) de certains des acides aminés présents dans les extrémités libres des histones, plus accessibles aux enzymes que le domaine globulaire. Ces réactions sont réalisées par des protéines « éditrices » capables d'interagir sur des résidus spécifiques d'histones présents sur certains compartiments génomiques. Les modifications d'histones ont un effet sur la structure de la chromatine, soit de manière directe en altérant la stabilité du nucléosome, soit de manière indirecte en servant de plateforme d'ancrage spécifique pour des protéines « lectrices » (*e.g.* complexes remodelleurs ATP dépendant, protéines affines pour l'hétérochromatine type HP1, facteurs de transcriptions, etc...) utilisées pour engendrer un espace chromatinien adapté à une situation biologique (*e.g.* transcription, réparation et réplication de l'ADN). La plupart de ces modifications sont dynamiques et évoluent rapidement.

En effet, certaines des protéines lectrices possèdent des activités enzymatiques ayant la capacité d'effacer les modifications apportées par les protéines éditrices (acétylation/désacétylation, méthylation/déméthylation, etc.). Comprendre les fonctions et les régulations des modifications post-traductionnelles des histones est l'un des grands enjeux scientifiques du début du XXI<sup>e</sup> siècle.

### **I-III-1 Le code Histone**

#### **Les premières études biochimiques, les tâtonnements d'Allfrey**

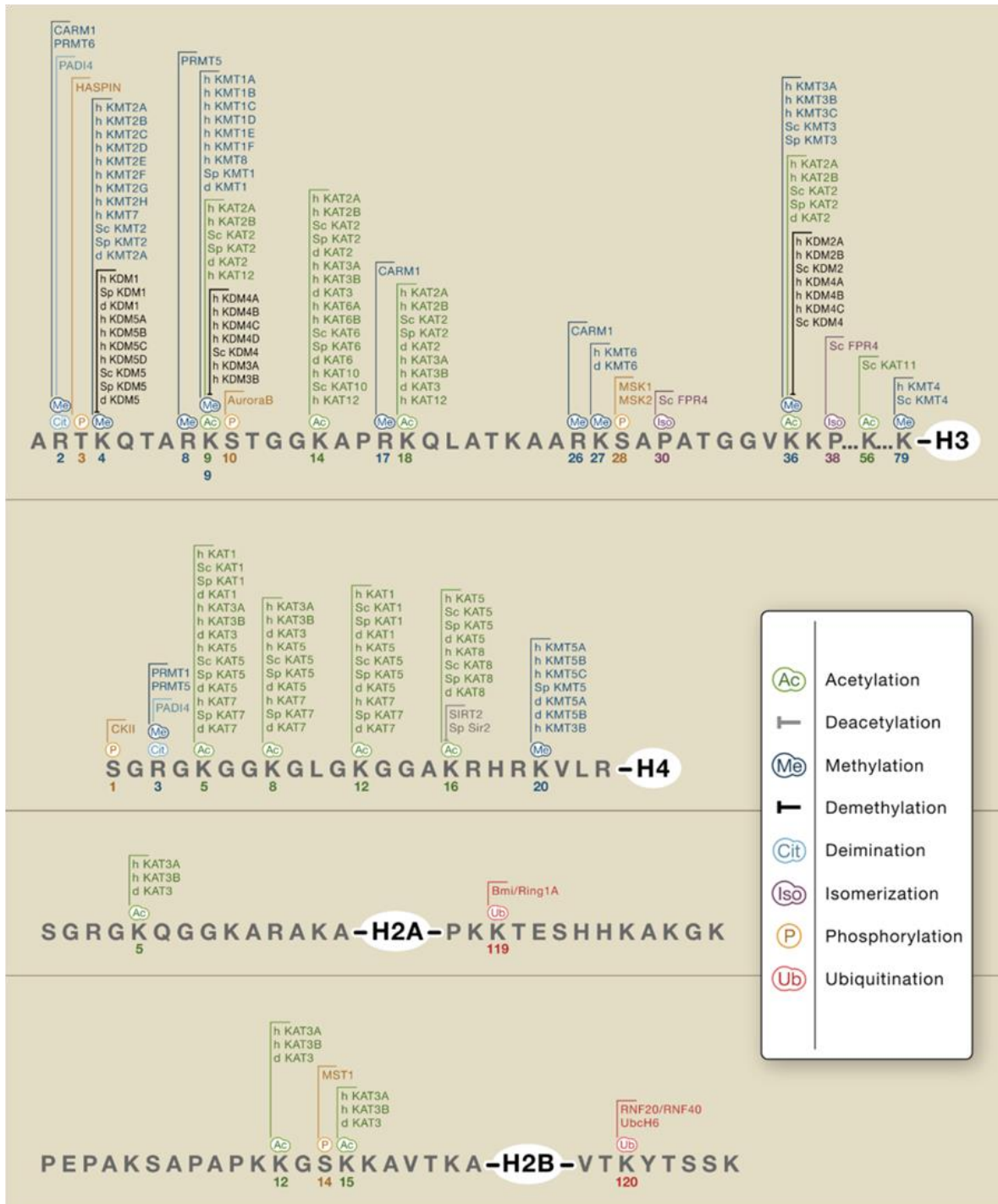
On a commencé à s'intéresser à la fonction des histones dans les années 50. Stedman et Stedman suggèrent notamment un rôle d'inhibiteur des fonctions chromosomiques dans les cellules différenciées qui permettrait la spéciation des tissus du vivant. Allfrey démontre leur fonction dans l'inhibition de la synthèse des ARNs (Allfrey, Littau, et Mirsky 1963) pendant que l'on identifie les premières modifications d'histone telles que l'acétylation (Phillips 1963) et la méthylation (Murray 1964). En 1964, Allfrey, Faulkner et Mirsky font le lien entre les modifications d'histones et l'expression génique : l'acétylation des histones conduit à l'augmentation de la synthèse des ARNs. Ces auteurs sont les premiers à évoquer l'aspect fondamental des modifications d'histones dans la régulation transcriptionnelle : « This would allow a means of switching-on or -off RNA synthesis at different times, and at different loci of the chromosomes » (Allfrey, Faulkner, et Mirsky 1964). En caractérisant la séquence protéique de l'histone H3 en 1972, Delange, Hopper et Smith identifient deux lysines spécifiques soumises à la mono-, di- et tri-méthylation : la lysine 9 (H3K9me) et la lysine 27 (H3K27me). Avec la méthylation de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4me), découverte par Brandt et Honda respectivement en 1974 et 1975, ces trois modifications restent, à ce jour, les mieux caractérisées.

#### **Le « langage histone » et l'épigénétique moderne**

Les techniques modernes de protéogénomique et l'avancée des technologies de spectrométrie de masse ont permis de découvrir toute une pléiade de nouvelles modifications d'histones (Kouzarides 2007; Arnaudo et Garcia 2013). On en recense aujourd'hui plus d'une centaine impliquant différents résidus et issues de différentes réactions enzymatiques : acétylation, méthylation, phosphorylation, ADP-ribosylation, ubiquitination, sumoylation, déimination, proline isomérisation, hydroxylation, crotonylation, N-formylation, succinylation,



malonylation, propionylation, butyrylation, O-GlcNacylation et glutathionylation. Cette liste n'est probablement pas exhaustive (fig. 6).



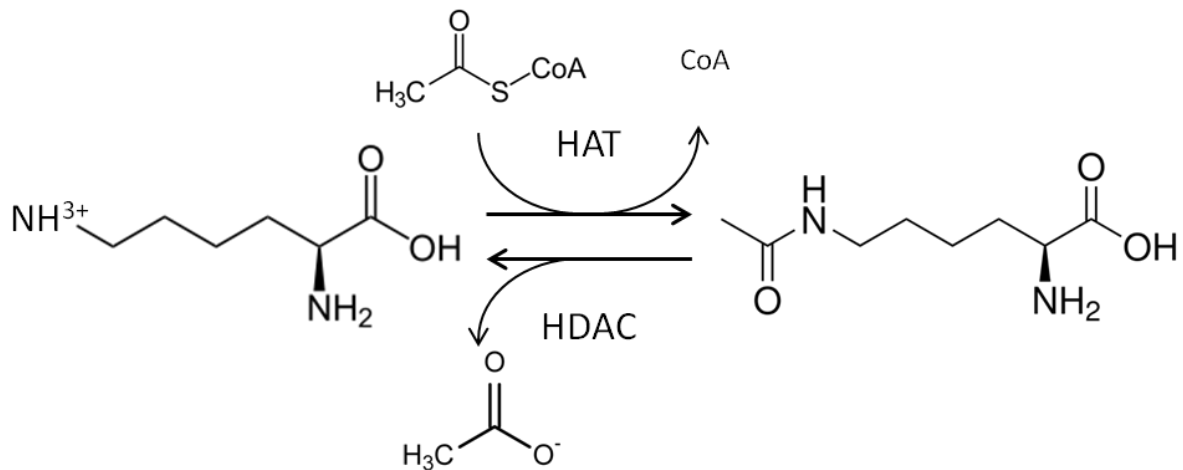
**Figure 6. Panorama des principales modifications affectant les extrémités N-terminales des histones et des protéines remodeleurs de la chromatine (Kouzarides 2007)**

Les protéines mentionnées catalysent la réaction indiquée sur le résidu concerné dans différentes espèces (*Homo sapiens* (h), *D. melanogaster* (d), *S. cerevisiae* et *S. pombe*). Ceci n'est pas une liste exhaustive.

L'effet de certaines de ces réactions sur la chromatine est maintenant bien connu. Par exemple, l'acétylation des lysines et la phosphorylation conduisent de manière générale à la déstabilisation des nucléosomes concernés en fragilisant le contact histone-ADN, respectivement en diminuant les charges positives ou en ajoutant des charges négatives. Certaines de ces modifications ont toujours le même rôle vis à vis de l'expression des gènes alors que d'autres sont plus versatiles. Ainsi, l'acétylation est invariablement associée à l'activation transcriptionnelle, alors que la méthylation des lysines et des arginines peut promouvoir ou restreindre l'activité transcriptionnelle en fonction du résidu concerné, de son état de méthylation (mono-, di- ou tri-méthylé) et de sa localisation dans le génome. Si le contexte est aussi important, c'est parce qu'un état chromatinien ne dépend pas de l'action d'une seule modification mais de la combinaison et/ou de la distribution séquentielle d'une palette de modifications ainsi que des protéines lectrices recrutées en conséquence et associées à des tâches spécifiques (expression, réparation, recombinaison, etc.). Cette propriété est définie par Stahl et Allis en 2000 par le terme « code histone ».

### **I-III-2 L'acétylation des histones**

L'acétylation des histones concerne exclusivement les résidus lysines de la chaîne latérale. Au cours de cette réaction, les histones acétyltransférases (HATs) utilisent une molécule d'acétyl-CoA comme cofacteur pour catalyser le transfert du groupement acétyle sur le résidu amine de la lysine (Dutnall et al. 1998) (fig. 7). Le groupement amine chargé positivement est alors neutralisé et perd son effet positif sur la stabilité électrostatique du nucléosome. Cela peut se traduire par une fragilité structurelle facilitant sa dissociation (K. Luger et al. 1997). C'est particulièrement le cas de l'acétylation des lysines situées dans le domaine globulaire qui participent à l'interaction ADN-histone. Présente au point d'entrée et de sortie de l'octamère d'histone, la lysine 56 de l'histone 3 est notamment sujette à l'acétylation et est vraisemblablement impliquée dans différents processus tels que la réparation ou la réplication (Q. Li et al. 2008; Chen et al. 2008). L'abolition des charges opère également des changements à l'échelle structurelle supérieure de la chromatine. L'acétylation de H4K16, par exemple, empêche le repliement en fibre chromatinienne de 30 nm *in vitro* (Shogren-Knaak et al. 2006). De manière générale, l'acétylation des histones induit la déstructuration locale de la chromatine. Il corrèle ainsi avec l'activation transcriptionnelle, facilite la réparation de l'ADN et participe à la maturation de la chromatine au cours de la réplication.



**Figure 7. L'acétylation des lysines**

L'acétylation concerne également des protéines non-histones. Leur régulation est prise en charge par les HATs et les histones désacétylases (HDAC) (fig. 7). Les protéines cibles identifiées sont majoritairement des facteurs de transcription mais comptent aussi des protéines impliquées dans diverses fonctions cellulaires telles que l'assemblage du cytosquelette, le transport, l'apoptose et la défense contre les éléments étrangers (*e.g.* virus). Comme l'acétylation affecte le repliement de la protéine cible, cette modification régule les interactions protéine/protéine, ou, dans le cas des facteurs de transcription, l'interaction avec la fibre d'ADN. Par ailleurs, les HATs PCAF, p300 et Rtt109 sont capables de s'auto-acétyler, ce qui augmente leur activité respective (Santos-Rosa et al. 2003; Thompson et al. 2004; Tang et al. 2008).

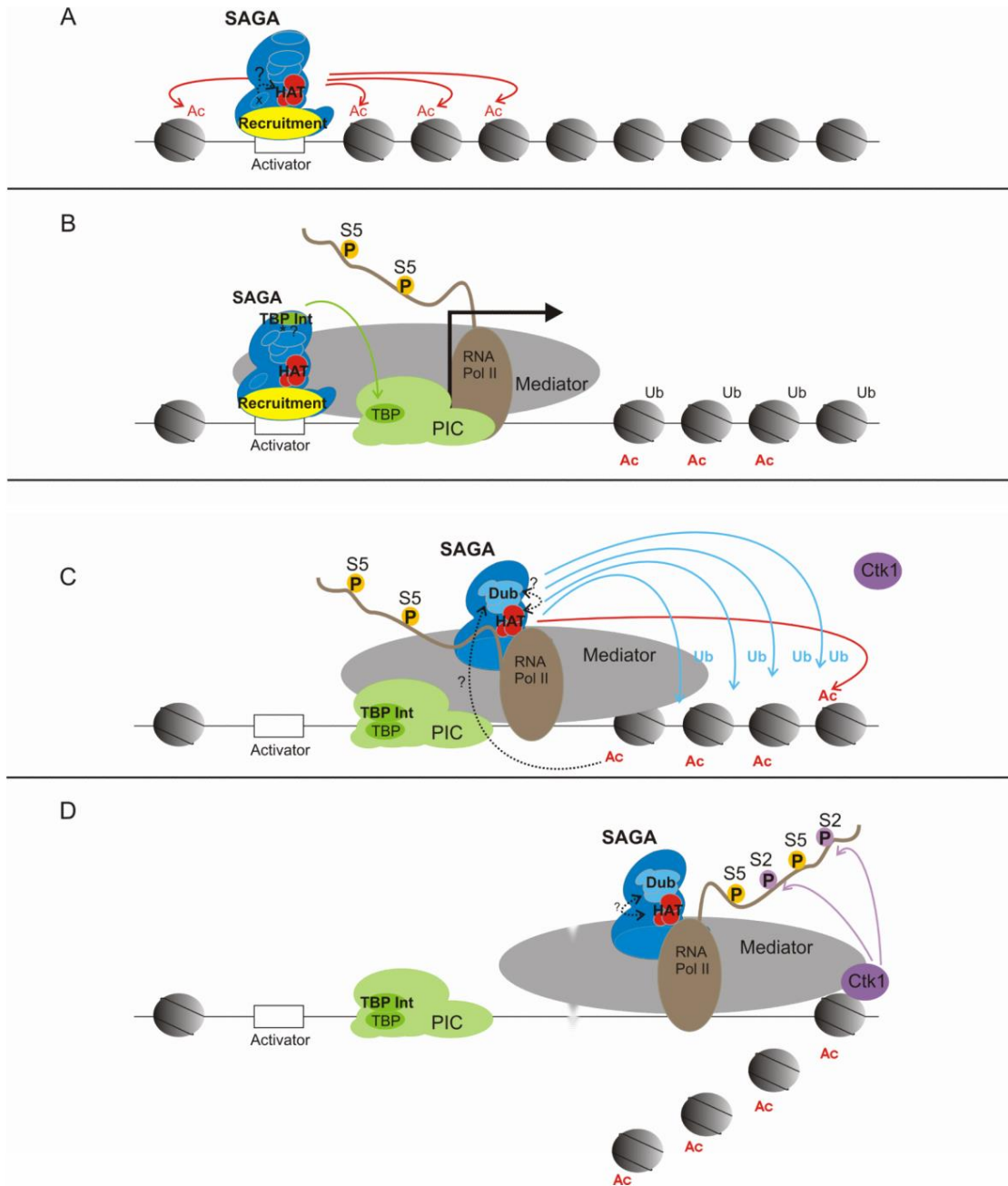
Le bromodomaine constitue le module protéique nécessaire à la reconnaissance de la lysine acétylée (Dhalluin et al. 1999). Si le nombre de protéines à bromodomaine (BRDs) varie entre l'homme (42) et la levure (14), leurs fonctions moléculaires sont conservées (Q. Zhang et al. 2010). La grande majorité des protéines à BRDs est impliquée dans la régulation transcriptionnelle. Ce sont des HATs tel que GCN5 (sous-unité catalytique du complexe SAGA, cofacteur de l'initiation de la transcription), des remodeleurs de la chromatine ATP-dépendants de la famille SWI/SNF et les protéines BET (Bromodomaine et domaine Extra Terminal). Deux protéines BET ont été identifiées chez *S. cerevisiae*, Bdf1 et Bdf2. Elles sont associées au complexe du facteur général de transcription TFIID et participent à son recrutement (Durant et Pugh 2007). Bdf1 fait également partie du complexe remodeleur ATP-dépendant SWR1 (famille INO80).

Son inactivation entraîne notamment une réduction importante de la quantité des histones H2A.Z/Htz1 incorporées dans les nucléosomes (Krogan et al. 2003; H. Zhang, Roberts, et Cairns 2005).

### **L'acétylation des histones est prise en charge par les HATs**

Les histones acétyltransférases sont répertoriées en deux catégories : le type A et le type B. Le type B est constitué de protéines homologues de Hat1 identifiée chez la levure (Kleff et al. 1995; Brownell et Allis 1996). Hat1 présente une activité cytoplasmique ; elle catalyse l'acétylation des lysines K5 et K12 de l'histone H4 libre mais n'intervient pas sur l'histone nucléosomique. Ces modifications sont utilisées dans la maturation de la chromatine en intervenant dans l'incorporation de l'histone (Parthun 2007). Une fois l'histone incorporée dans la chromatine, ces modifications sont supprimées par les HDACs. Les Hat-B n'ont pas de fonction essentielle chez la levure, cependant leur inactivation augmente la longévité répllicative (Rosaleny et al. 2005).

Le type A est plus diversifié ; il comporte deux familles principales et évolutivement conservées Gcn5/PCAF et MYST, ainsi qu'une famille spécifique aux mammifères cCBP/p300 et une spécifique aux champignons Rtt109 (Marmorstein et Zhou 2014). Si la structure principale du domaine HAT est conservée, ces enzymes se distinguent par leurs mécanismes catalytiques. Ces protéines agissent au sein de complexes de concert avec une série de sous-unités régulatrices. De manière générale, ces complexes interviennent sur plusieurs résidus, la plupart sur l'extrémité N-terminale des histones, et partagent des cibles communes. Leur régulation spatiale est en partie prise en charge par des domaines de reconnaissances de type bromodomaine (Gcn5) et chromodomaine (Esa1). Il a été montré que Gcn5 fait partie du complexe SAGA (Spt-Ada-Gcn5 acétyltransférase), agissant en tant que cofacteur de l'activation transcriptionnelle (fig. 8). Son inactivation est létale chez les mammifères (Xu et al. 2000 ; Bu et al. 2007) et entraîne une série d'anomalies développementales et des défauts de croissance chez les champignons filamenteux (Xin *et al.* 2013; Qi *et al.* 2018). Chez la levure, la mutation de *Gcn5* produit un arrêt de la méiose (Burgess, Ajimura, et Kleckner 1999).



**Figure 8. Le complexe SAGA est un cofacteur de la transcription** (Koutelou, Hirsch, et Dent 2010)

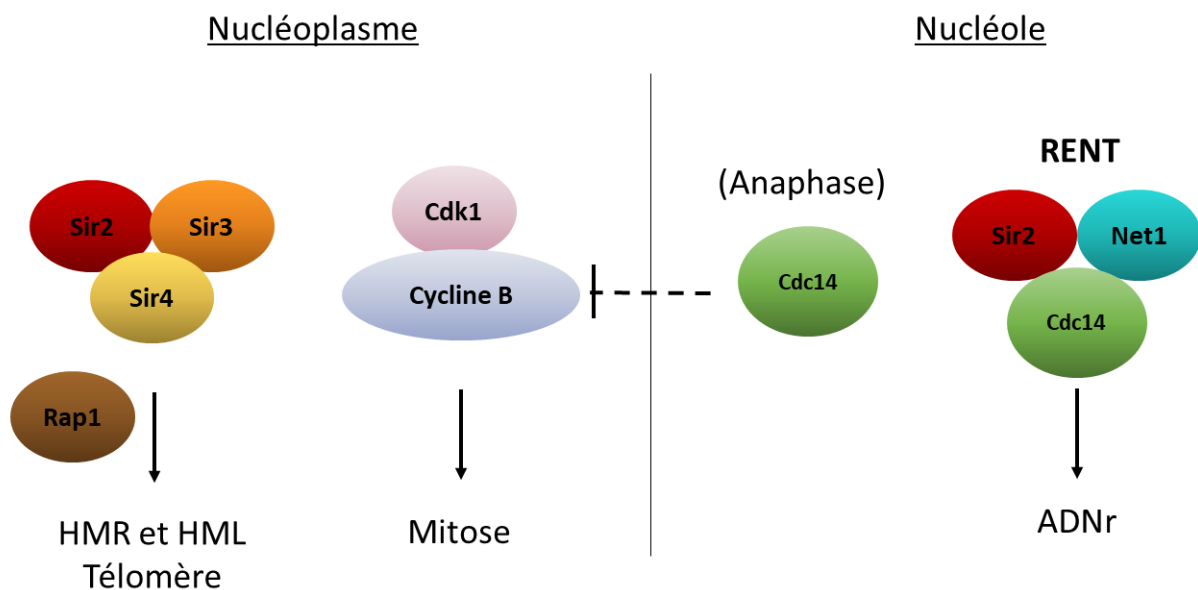
SAGA est l'un des complexes qui comporte le plus de sous-unités (15 protéines impliquées chez la levure) dont la composition peut être modulée. A. SAGA est recruté sur les loci géniques via la reconnaissance d'un élément nucléique en *cis* (activateur transcriptionnel), permettant à Gcn5 d'acétyler les histones voisines (H3K9, H3K14, H3K18 et H3K23 chez la levure). La dissociation séquentielle des nucléosomes concernés permet la fixation de facteurs de transcription et du complexe initiateur PIC. B. SAGA recrute le complexe TBP qui facilite la formation du complexe de pré-initiation (PIC) de la transcription et la phosphorylation en sérine 5 du module CTD de l'ARN polymérase II, amorçant ainsi l'initiation de l'élongation de la transcription. C. SAGA assiste l'ARN Pol II pendant l'élongation et promeut l'acétylation des histones rencontrées dans la séquence codante. La dissociation des nucléosomes est soutenue par la déubiquitination de l'histone H2A (facilitant l'accès des complexes remodeleurs ATP-dépendants) via le module Dub de la sous-unité catalytique Ubp8/USP22. D. La déubiquitination permet également l'adressage de la kinase Ctk1 pour phosphoryler la sérine 2 du module CTD. Cette dernière étape active définitivement l'élongation de la transcription.

L'abolition des modifications de type acétylation est prise en charge par les histones désacétylases (HDACs) (Taunton, Hassig, et Schreiber 1996). En restaurant les charges positives des lysines, les HDACs augmentent l'affinité des histones pour l'ADN et stabilisent le nucléosome. De manière générale, la fonction des HDAC est associée à la répression transcriptionnelle.

**Les sirtuines sont des HDACs NAD<sup>+</sup> dépendantes**

Les HDACs sont classées en deux familles (Pandey et al. 2002). Parmi elles, les sirtuines sont des enzymes qui utilisent le NAD<sup>+</sup> comme cofacteur. Ce sont des protéines homologues à Sir2, initialement identifiée et caractérisée chez *S. cerevisiae* (Imai et al. 2000; Landry et al. 2000; Smith et al. 2000). Chez cette espèce, Sir2 est une composante de deux complexes indépendants intervenant sur les résidus H4K16ac, H3K56ac et H3K4ac (F. Xu et al. 2007; Guillemette et al. 2011). En s'associant avec les protéines Net1 et Cdc14, elles forment le complexe RENT (« regulator of nucleolar silencing and telophase exit ») (fig. 9). NET1 relocalise Sir2 dans le nucléole, un compartiment nucléaire dans lequel se produit la transcription des ARN ribosomiaux. Ses ARNs sont produits à partir de cent à deux cents répétitions de séquences d'ADN ribosomiques (ADNr) (5S et 35S).

Bien que ces séquences soient regroupées dans un même territoire chromosomique et présentent des propriétés chromatiniennes communes (*e.g.* modifications d’histone), les loci sont différenciellement exprimés. Leur répression est assurée par les remodeleurs de la chromatine, dont Sir2 est l’un des acteurs majeurs chez la levure (Straight et al. 1999). De plus, Sir2 forme un deuxième complexe avec les protéines Sir3 et Sir4 qui intervient dans la répression transcriptionnelle du type sexuel et des territoires sub-téломériques (fig. 9). Sir3 et Sir4 sont exclusives à *S. cerevisiae*.



**Figure 9. Les deux complexes impliquant Sir2 et leurs fonctions chez *S. cerevisiae***

Le complexe RENT est séquestré dans le nucléole dans lequel Sir2 désacétyle les histones sur des répétitions d’ADNr. Au cours de l’anaphase, le complexe est dissocié et Cdc14 libéré. A la suite de cela, la déphosphorylation de ses cibles (Cdh1, Swi5 et Sic1) conduit à la dégradation de la cycline B et à l’inactivation de la cycline dépendante kinase CDK1, permettant ainsi la sortie de mitose. Le complexe Sir2/3/4 est adressé au type sexuel (loci HMR et HML) et aux régions sub-téломériques par Rap1, une protéine qui se fixe sur des sites nucléiques spécifiques.

### Sir2 et le vieillissement

L’une des causes du vieillissement chez la levure est l’apparition de cercles ADNr extrachromosomiques (ERC) autorépliatifs qui se forment et s’accumulent dans la cellule mère après chaque cycle de réplication de l’ADN.

Ces structures sont générées par recombinaison homologue dans la région de l'ADNr. Par ailleurs, l'inactivation de Rad52, une protéine essentielle à la recombinaison homologue, supprime cet effet physiologique (Park, Defossez, et Guarente 1999). L'effet précis de ces ERC sur la longévité répliquative n'est pas encore tout à fait établi. Il semblerait pourtant qu'une instabilité dans l'ADNr soit suffisante pour provoquer une sénescence prématurée, indépendamment de la quantité d'ERC formée (produites en conséquence) (Ganley et al. 2009). La délétion du gène codant la protéine Sir2 augmente à la fois la recombinaison du ADNr et la production de ERC, conduisant à une réduction de la longévité répliquative de 40% (Gottlieb et Esposito 1989; M. Kaeberlein, McVey, et Guarente 1999). De plus, l'ajout d'une copie ectopique du gène augmente la longévité, suggérant ainsi que Sir2 est un facteur limitant du vieillissement.

L'implication de Sir2 dans le vieillissement des organismes multicellulaires semble plus complexe. Son inactivation chez *C. elegans* et *D. melanogaster* ne conduit qu'à une faible réduction de la longévité (Newman et al. 2002; van der Horst et al. 2007). Par ailleurs, l'effet de la surexpression du gène sur l'espérance de vie de ces organismes est encore controversé (Burnett et al. 2011). Cependant, la protéine orthologue de *C. elegans* (SIR-2.1) interagit avec les cibles non-histones 14-3-3 et DAF-16 afin d'activer l'expression de leurs gènes cibles, un mécanisme stress-dépendant qui participerait à la longévité (Berdichevsky et al. 2006).

La restriction calorique (CR) est un procédé très conservé qui permet d'augmenter l'espérance de vie dans la plupart des organismes, de la levure à l'homme. Malheureusement, son mécanisme physiologique sur la longévité reste inconnu (Mair et Dillin 2008). Nous savons cependant que la CR augmente le ratio NAD<sup>+</sup>/NADH en stimulant la respiration chez la levure, ce qui favorise l'activité des sirtuines (NAD<sup>+</sup> dépendantes). De plus, la CR favorise la conversion du nicotinamide en niacine, la première étant une protéine inhibitrice des sirtuines. Sur cette base vient s'ajouter la perte de l'effet de la CR sur la longévité en absence de Sir2 observée chez *S. cerevisiae*, *C. elegans* et *D. melanogaster* (Lin, Defossez, et Guarente 2000; Rogina et Helfand 2004; Yamei Wang et Tissenbaum 2006). Au début des années 2000, Sir2 paraissait alors comme l'élément clef de l'augmentation de la durée de vie par la CR et une cible thérapeutique potentielle pour combattre le vieillissement. Depuis, ces résultats ont été remis en doute chez la levure et le ver, laissant la fonction de Sir2 dans la CR controversée (T. L. Kaeberlein et al. 2006).



Même si son effet direct peut être discuté, il est important de noter que Sir2 est impliquée dans des processus physiologiques qui touchent plus ou moins de près au vieillissement des individus. Les tumeurs sont notamment la conséquence de l'accumulation de mutations dans le génome qui favorisent une réplication anarchique des cellules. Ces mutations sont le produit de dommages de l'ADN générés par les molécules oxydées et les rayonnements. Pour lutter contre ces effets nocifs, les cellules mettent en place des systèmes de réparation de l'ADN. Parmi ces systèmes, la jonction des extrémités non homologues (Non-Homologous End-Joining ou NHEJ) est impliquée dans la réparation des cassures double brin. Or, Sir4 s'associe avec Ku70, une protéine essentielle au NHEJ. Cette observation pourrait laisser présager que Sir2 serait impliquée dans la régulation de ce type de réparation. Par ailleurs, l'absence de Sir2 augmente la sensibilité au stress oxydant chez la levure (Kang et al. 2014). Cette interaction pourrait également servir le recrutement de Sir2 aux télomères puisque Ku70 est majoritairement localisée dans ces régions en absence de stress. D'autre part, la structure chromatinienne des télomères joue un rôle majeur dans leur conformation spéciale nucléaire et dans le recrutement des protéines nécessaires à leurs fonctions. Or, les télomères sont essentiels à la protection des extrémités des chromosomes qui, sans eux, se raccourcissent à chaque division cellulaire, acheminant progressivement les cellules à leur sénescence (Harley, Futcher, et Greider 1990).

### **Les sirtuines chez les mammifères**

Les mammifères comptent sept protéines sirtuines (SIRT1 à SIRT7), impliquées dans de nombreux processus physiologiques et voies de signalisation. SIRT1, l'orthologue de Sir2, est un oncogène, ce qui signifie qu'en absence de régulation ad-hoc, cette protéine favorise la progression du cycle cellulaire et inhibe la mort programmée de la cellule. Ainsi, les mutations du gène *Sirt1* sont souvent impliquées dans la génération de tumeurs et de cancers. Cette caractéristique vient du fait qu'en plus de ces résidus histones cibles H1K26 et H4K16, SIRT1 régule l'activité de nombreuses protéines non-histones, majoritairement des facteurs de transcriptions. De manière générale, leur désacétylation entraîne l'inhibition des protéines cibles impliquées dans l'apoptose et dans l'arrêt du cycle cellulaire, et l'activation de celles impliquées dans la progression du cycle et dans la réponse aux stress (Table 1). SIRT1 participe également à la résistance aux maladies neurodégénératives, la différenciation cellulaire, la réparation de l'ADN et le métabolisme de la mitochondrie (Rahman et Islam 2011).

Protéines cibles	Fonctions de la protéine cible
<b>p53</b>	Déclenche l'apoptose
<b>E2F1</b>	Arrêt du Cycle cellulaire
<b>Protéines FOXO</b>	Arrêt du cycle cellulaire Réparation de l'ADN Réponse au stress
<b>H1F-1<math>\alpha</math></b>	Réponse au stress d'hypoxie Protéine oncogène
<b>KU70</b>	Inactive l'apoptose Réparation de l'ADN HHEJ
<b>AKT</b>	Voie de signalisation de l'insuline dépendante, inactive les protéines FOXO
<b>PI3K</b>	Défense contre les maladies neurodégénératives Promeut l'avancée du cycle cellulaire
<b>TORC1-CREB</b>	Défenses contre la maladie d'Huntington
<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	Synthèse des mitochondries et réponse au stress oxydant
<b>HSF1</b>	Réponse au stress de conformation des protéines ( <i>e.g.</i> choc thermique)
<b>NICD</b>	Voie de signalisation Notch Différenciation cellulaire
<b>DNMT1</b>	Régulation négative transcriptionnelle par la méthylation de l'ADN

**Table 1. Les cibles non-histones de SIRT1 et leurs fonctions**

La désacétylation provoquée par SIRT1 inhibe (rouge) ou stimule (bleu) la fonction de la protéine cible.

SIRT2 est majoritairement cytoplasmique. Elle est connue principalement pour désacétyler (avec HDAC6) la tubuline, un constituant fondamental du cytosquelette de la cellule. La tubuline est une composante essentielle du microtubule, impliqué dans de nombreux processus essentiels tels que le transport, la polarité de la cellule, la mobilité ou la mitose. La désacétylation de la tubuline favoriserait la dépolymérisation du microtubule quand l'acétylation le stabiliserait. Ce type de régulation est tissu dépendant, sa dérégulation favorise l'apparition de métastases et le développement de cancers. L'accumulation de protéines SIRT2 dans les cellules vieillissantes du système nerveux central et son effet sur les microtubules seraient aussi à rapprocher de la survenue de certaines pathologies neurodégénératives du vieillissement (Maxwell et al. 2011). Le deuxième rôle majeur identifié de SIRT2 est de réguler l'activité de Par-3, une protéine clef de la régulation de la polarité des cellules. Par-3 est notamment impliquée dans l'adhésion des cellules de Schwann sur la fibre synaptique du système nerveux périphérique et régule donc la formation de la myéline. La régulation par l'acétylation peut intervenir en cas lésions pour favoriser la régénération des fibres nerveuses.

SIRT3, SIRT4 et SIRT5 sont principalement localisées dans les mitochondries.

Leurs cibles sont des éléments clefs du métabolisme énergétique intervenant dans l'oxydation des acides gras, le cycle de Krebs, le transport d'électrons et la fabrication de l'Acétyl CoA. SIRT3 induit aussi l'activation de la superoxyde dismutase SOD2, une enzyme essentielle à la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (Tao et al. 2010).

SIRT6 désacétyle les résidus histones H3K9 et H3K56 (Michishita et al. 2008; B. Yang et al. 2009). La désacétylation de H3K9 promeut la méthylation de ce même résidu puisque ces deux types de modifications sont antagonistes entre elles. Or la méthylation du résidu H3K9 est essentielle à la formation et la conservation de l'hétérochromatine constitutive. L'acétylation du résidu H3K56 représente un fort pouvoir électrostatique sur la stabilité du nucléosome. L'unique protéine non-histone cible de SIRT6 identifiée est PARP1, une protéine qui permet le recrutement des systèmes de réparation en réponse aux dommages de l'ADN dont l'hyppoacétylation serait la forme active de la protéine (Mao et al. 2011).

Enfin, SIRT7 est associée à la transcription par l'ARN polymérase 1. Cette protéine participerait à la répression transcriptionnelle de l'ADNr.

### **Les sirtuines chez les champignons**

La levure compte aussi quatre protéines paralogues de SIR2 (Hst1-Hst4) ; leurs cibles identifiées sont exclusivement des histones (Frye 2000). En l'occurrence, Hst1 partage une cible commune avec Sir2, le résidu H3K4. Contrairement à Sir2 qui intervient au niveau de l'ADNr, des séquences sub-télomériques et du locus sexuel, Hst1 est relocalisée par Sum1 au niveau de gènes cibles spécifiques. En effet, Sum1 reconnaît notamment l'élément MSE (pour « Middle Sporulation Element ») situé au niveau des promoteurs d'une catégorie de gènes qui intervient dans la sporulation. La sporulation est une étape développementale du cycle de vie de la levure, initiée en condition de stress par une méiose et dont le produit final est un asque contenant quatre spores haploïdes. Quand les nutriments sont abondants, les cellules entrent dans un cycle végétatif haploïde au cours duquel elles ne se divisent que par mitose. Dans ces conditions, les gènes dont les promoteurs contiennent des motifs MSE sont réprimés par Hst1-Sum1 (Xie et al. 1999). Hst1 participe également à la régulation transcriptionnelle de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique tel que la biosynthèse du NAD<sup>+</sup> et celle de la thiamine (Bedalov *et al.* 2003; Li *et al.* 2010).

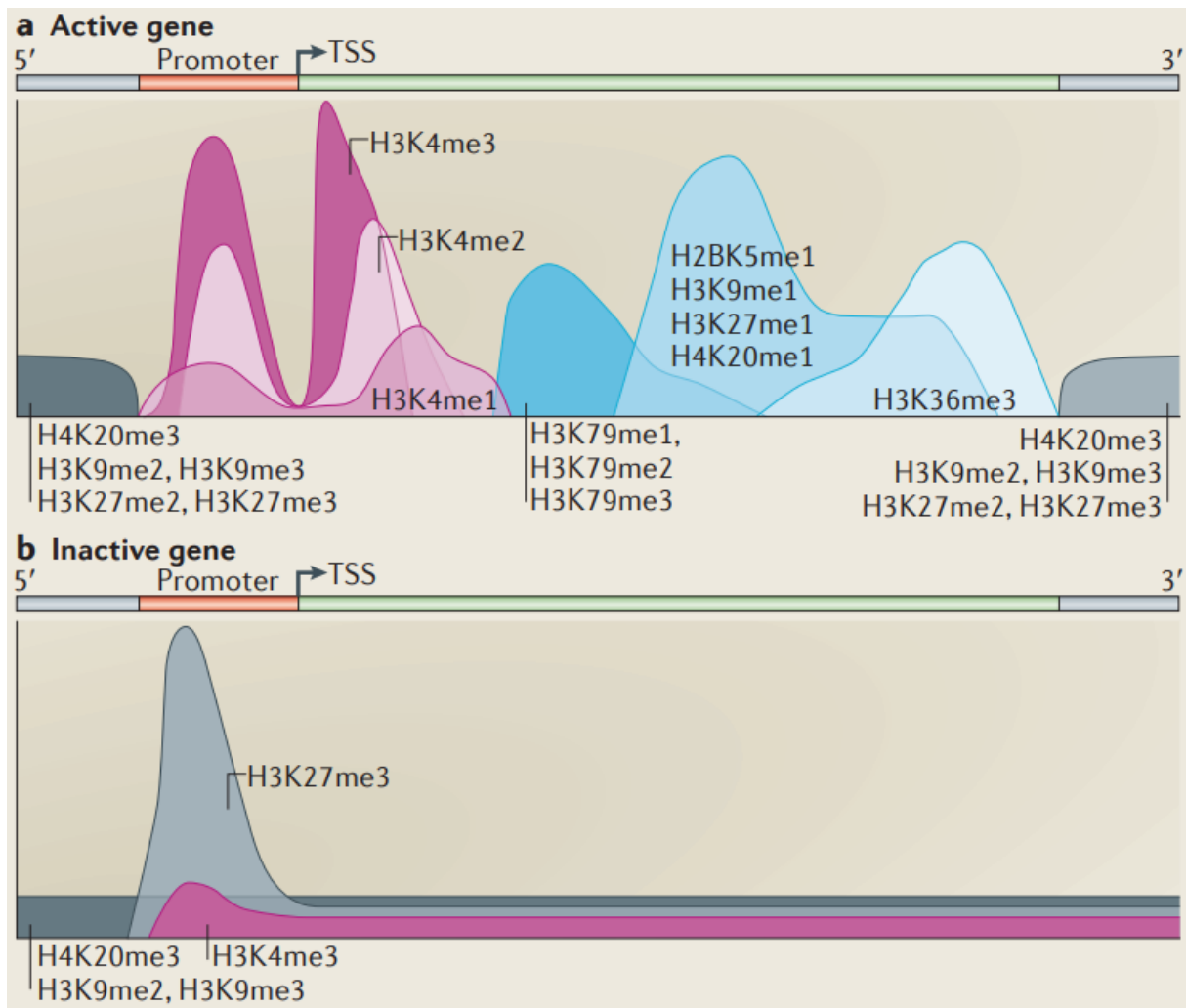
Par opposition, Hst2 est majoritairement cytoplasmique, comme son orthologue SIRT2 chez les mammifères, et participerait à la régulation de gènes situés dans les séquences subtélomériques et des unités de l'ADNr (Perrod et al. 2001). Finalement Hst3 et Hst4, à travers la désacétylation du résidu H3K56, participeraient eux à la progression du cycle cellulaire et la stabilité du génome (Celic et al. 2006). Chez les champignons filamenteux, l'inactivation de protéine homologue de Sir2 entraîne une dérégulation de l'expression de certains métabolites secondaires mais n'affecte pas leur cycle de vie (Boivin, Gaumer, et Sainsard-Chanet 2008; Shimizu *et al.* 2012).

### **I-III-3 La méthylation des histones**

La méthylation des histones concerne la chaîne latérale des résidus arginine et lysine, principalement localisés sur l'extrémité N-terminale des histones H3 et H4. Les lysines peuvent être mono-, di- ou tri-méthylées alors que les arginines sont soit mono-, soit di-méthylées. Contrairement à l'acétylation, l'ajout de groupement méthyle n'altère pas la charge de la protéine et n'intervient pas sur la stabilité électrostatique du nucléosome. Ce type de modification ne présente donc pas un effet direct sur la structure de la chromatine et son repliement. En revanche, les résidus méthylés servent de plateforme d'ancrage aux remodeleurs de la chromatine et à des protéines impliquées dans la transcription, la réparation, la réplication, la recombinaison, etc. Ces protéines ont en commun un module de reconnaissance des histones méthylées qui peut être soit de type Chromo-like (famille royale : Chromo, Tudor et MBT) soit de type PHD finger. La fonction de ces modifications dépend à la fois du résidu méthylé, de son degré de méthylation et de la position du nucléosome concerné dans le génome, notamment par rapport aux séquences codantes.

#### **I-III-3-a La méthylation des lysines**

Contrairement à l'acétylation des histones qui est toujours associée à l'euchromatine et à une transcription active, la localisation et la fonction de la méthylation dépend du résidu concerné. De manière générale, la méthylation des résidus H3K4, H3K36 et H3K79 est associée aux gènes transcriptionnellement actifs, alors que la méthylation des résidus H3K27, H3K9 et H4K20 est associée aux gènes inactifs. Les paysages épigénomiques de ces modifications sont maintenant bien caractérisés chez les mammifères (fig. 10).



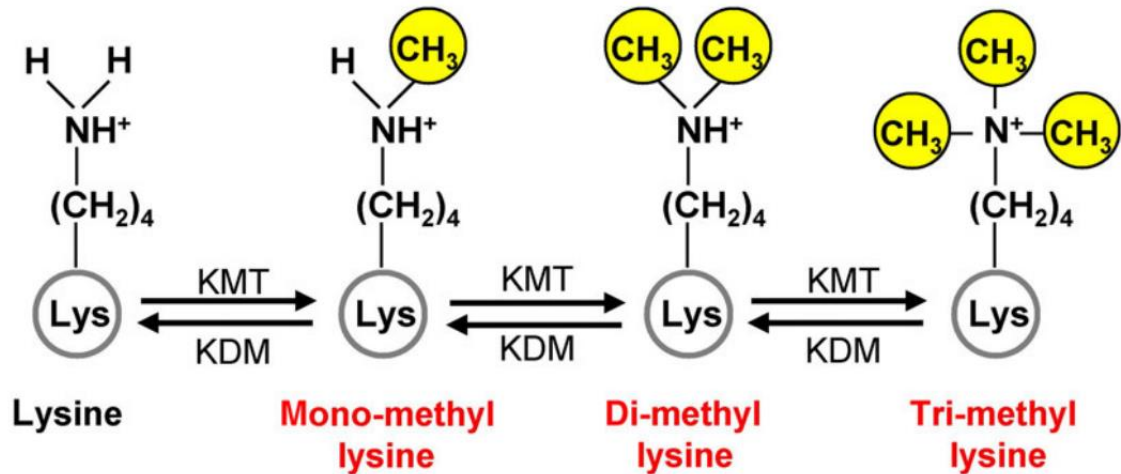
**Figure 10. Distribution de la méthylation des lysines chez les mammifères en fonction de l'état transcriptionnel d'un gène (Kooistra et Helin 2012)**

Les marques H3K4me1/2/3 colocalisent avec H3K27ac au niveau des promoteurs et des enhanceurs des gènes transcriptionnellement actifs. Sur les gènes éteints, les marques H3K9me3 et H3K20me3 sont réparties de manière homogène. Les gènes bivalents sont caractérisés par la présence concomitante des marques H3K4me1/2/3 et H3K27me3 sur les mêmes promoteurs et enhanceurs. Ces gènes sont transcriptionnellement inactifs.

Toutefois, ces paysages ne sont pas forcément représentatifs de ceux de l'ensemble des eucaryotes. Il existe notamment des différences importantes chez les plantes. En effet, alors que la marque H3K27me3 est localisée sur des promoteurs et enhanceurs des gènes inactifs chez les mammifères, chez *A. thaliana* les marques H3K27me2/3 s'étendent sur toute la longueur de la séquence codante avec une légère prééminence au niveau du TSS (Xiao, Lee, et Wagner 2016).

De plus, s'il est fréquent de trouver des régions multigéniques entièrement recouvertes avec la marque H3K27me3 chez les métazoaires ; cette marque est restreinte aux régions transcrites chez les plantes. Enfin, si chez les mammifères la marque H3K9me3 est strictement localisée au niveau de l'hétérochromatine, chez les plantes elle est enrichie au niveau des gènes transcriptionnellement actifs de l'euchromatine.

A l'exception des protéines DOT1 (ou KMT4), les lysines méthyltransférases (KMTs) font partie d'une large famille caractérisée par la présence du domaine SET nommé en référence aux trois premières KMT initialement identifiées chez la drosophile : le suppresseur de variégation 3-9 (Su(var)3-9), la protéine « Enhancer of zeste » et la protéine Trithorax (TRX). Le domaine SET confère l'activité catalytique de l'enzyme sur le groupement amine des lysines. En fonction de leurs propriétés biochimiques et de la présence de cofacteurs, les protéines à SET domaines sont capables de mono, di- et/ou tri-méthyliser leurs substrats en utilisant la S-adénosylméthionine comme groupement donneur de molécule méthyl, cette dernière étant générée par le métabolisme de la méthionine de la cellule (fig. 11). Toutes les protéines à domaine SET ne sont pas des histones méthyltransférases. Elles ont notamment pour cible des protéines ribosomales ou le facteur d'élongation eEF1, pour d'autres leur(s) cible(s) demeure(nt) inconnue(s).



**Figure 11. La méthylation des lysines** (Z. Wu, Connolly, et Biggar 2017)

La régulation des trois stades de méthylation des lysines est assurée par le domaine KMT et les lysines déméthylases. Parmi ces dernières, les protéines LSD (KDM1) catalysent la déméthylation des résidus lysines mono- et di-méthylés en utilisant la flavine.

### I-III-3-b Les marques cofacteurs de la transcription

La tri-méthylation des résidus H3K4 et H3K36 en font deux marques nécessaires à l'élongation de la transcription de l'ARN polymérase II pour une grande majorité des gènes transcrits. La méthylation du résidu H3K4 est catalysée par la famille de protéine à domaine SET TRX/KMT2 (Miller *et al.* 2001). Cette famille très conservée compte six protéines chez les mammifères (Set1A and Set1B, MLL, MLL2, MLL3, et MLL4) dont la plupart sont essentielles au développement embryonnaire (Joel C. Eissenberg et Shilatifard 2010). Chez *S. cerevisiae*, l'unique H3K4 méthylase (Set1) participe également, sans que l'on sache comment, à la répression de l'ADNr, du locus sexuel et des télomères, ce qui n'est pas le cas chez la levure *S. pombe* (Noma et Grewal 2002). L'inactivation de SET1 chez les champignons filamenteux n'est pas létale mais conduit souvent à de sévères anomalies phénotypiques (*e.g.* perte de virulence pour les pathogènes, sensibilité accrue au stress, réduction de la production de conidies, croissance végétative altérée) (Pham *et al.* 2015; Y. Liu *et al.* 2015). Les protéines KMT2 sont les composantes catalytiques du complexe COMPASS (composée de Set1, Bre2, Swd1, Spp1, Swd2, Swd3, Sdc1 et Shg1 chez *S. cerevisiae*) (Miller *et al.* 2001). Ce complexe s'associe avec l'ARN Pol II pour déposer de manière co-transcriptionnelle la marque H3K4me3 en 5' de la séquence codante des gènes transcrits. Cette modification permet le recrutement de cofacteurs de la transcription comprenant des protéines remodeleurs de la chromatine.

Parmi elles, le remodeleur ATP-dépendant CHD1 présent chez les mammifères reconnaît les marques H3K4me<sub>2/3</sub> via deux chromodomains situés à son extrémité N-terminale. La sous-unité BPTF du complexe NURF interagit avec H3K4me<sub>3</sub> via son domaine PHD (Sims et al. 2005). Chez la levure, le remodeleur ATP-dépendant Isw1 participe à la régulation de l'expression des gènes Pol II dépendants en interagissant avec les marques H3K4me<sub>2/3</sub> (Santos-Rosa et al. 2003). Plus récemment, il a été montré que Isw1 interagit et colocalise avec le résidu méthylé H3K36 via sa sous-unité régulatrice Loc4 et son domaine PWWP (au motif Pro-Trp-Trp-Pro) (Maltby et al. 2012). Pour renforcer son action, cette régulation fait également intervenir des protéines HAT, la plus connue étant GCN5, appartenant au complexe SAGA (fig. 8), recrutée sur les résidus H3K4me<sub>2/3</sub> via sa sous-unité régulatrice Sgf29 et son domaine Tudor afin d'acétyler les histones voisines chez la levure et les mammifères (Bian *et al.* 2011). Chez *S. cerevisiae*, on compte également le complexe NuA3, recruté sur H3K4me<sub>3</sub> via le domaine PHD de Yng1 afin d'acétyler le résidu H3K14 (Taverna et al. 2006), ainsi que le complexe HBO1 chez les mammifères.

La modification H3K36me<sub>3</sub> est associée à la forme d'élongation de l'ARN Pol II (phosphorylée en sérine 2 sur son domaine CTD). Cette marque s'accumule en 3' de la séquence codante des gènes. Il a été montré chez la levure qu'elle recrute la sous-unité EAF3 via son chromodomaine. Cette protéine appartient au complexe HDAC Rpd3; sa fixation permettrait de fermer la chromatine au niveau de la séquence codante afin d'empêcher l'initiation inappropriée de la transcription Pol II dépendante (Carrozza et al. 2005; Joshi et Struhl 2005).

La modification H3K79me est plus mystérieuse. Le plus souvent, les marques de type méthylation sont déposées par une ou deux enzymes chez la levure et les champignons filamenteux, et deux à dix enzymes chez les mammifères. Au contraire, cette marque est déposée par une seule histone méthyltransférase, très conservée, mais qui ne contient pas de domaine SET (voir plus bas), la protéine DOT1. De plus, le résidu concerné n'est pas localisé à l'extrémité N-terminale de l'histone H3 mais dans le domaine globulaire présent en surface extérieure, lui permettant ainsi d'interagir avec d'autres protéines. La modification H3K79me<sub>3</sub> agit comme un suppresseur local du complexe SIR2-3-4. Associée aux gènes transcrits, elle empêche l'interaction de la protéine Sir3 avec l'euchromatine et repousse indirectement Sir2 au niveau des séquences subtélomériques. L'inactivation ou la surexpression de DOT1 entraîne une délocalisation de Sir2 et affecte l'expression de l'hétérochromatine dans les régions concernées (van Leeuwen, Gafken, et Gottschling 2002; Lacoste et al. 2002).



Par ailleurs, la délétion du gène aboutit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 dans les cellules cancéreuses (Kim et al. 2012). Un résultat particulièrement intrigant lorsque l'on sait que la méthylation de H3K79 participe au recrutement de la kinase checkpoint Rad9 (53BP1 chez les mammifères) aux alentours des cassures de l'ADN via ses deux domaines Tudors (Huyen et al. 2004; Wysocki et al. 2005). Une fois phosphorylée, Rad9 active la kinase effectrice centrale p53 chargée de provoquer l'arrêt du cycle cellulaire (lors de la phase S ou aux transitions G1/S et G2/M) ainsi que l'activation transcriptionnelle des gènes impliqués dans les divers systèmes de réparation de l'ADN.

#### **I-IV-c L'assemblage de l'hétérochromatine constitutive**

##### **Les facteurs de l'hétérochromatine constitutive identifiés chez *D. melanogaster***

L'identification moléculaire de l'hétérochromatine trouve son origine dans l'étude de la variéation chez la drosophile, un phénomène observé lors de l'extinction mosaïque de gènes. Ce processus est lié à l'effet de position dans le génome du transgène en question et est dépendant de son environnement chromatinien. En l'occurrence, un transgène s'éteint s'il est intégré dans une région sujette à l'hétérochromatine telle que les territoires frontaliers euchromatine/hétérochromatine. La recherche de suppresseurs a permis d'identifier un certain nombre de gènes impliqués dans la structuration de l'hétérochromatine. Parmi eux, la Protéine de l'Hétérochromatine 1 (HP1/Su(var)205) était déjà identifiée comme une protéine non histone associée à l'hétérochromatine (James et Elgin 1986) et la protéine SU(VAR)3-9 qui s'avéra être une histone méthyltransférase spécifique du résidu H3K9 (J. C. Eissenberg et al. 1992; Tschiersch et al. 1994).

HP1 est une protéine à chromodomaine qui reconnaît spécifiquement les marques H3K9me2/3 (Ekwall et al. 1996; A. J. Bannister et al. 2001; Freitag, Hickey, et al. 2004). Sur son extrémité 3', la protéine présente un domaine Chromo-shadow qui lui permet d'interagir avec lui-même et former ainsi des ponts inter-nucléosomiques nécessaires à l'assemblage de l'hétérochromatine (Canzio *et al.* 2011). Hormis son action directe sur la structure chromatinienne, HP1 est souvent décrite pour avoir un rôle majeur dans le recrutement de remodeleurs de la chromatine et de complexes épigénétiques spécifiques comme par exemple la machinerie de l'ARNi et les protéines ADN méthyltransférases.

Par ailleurs, HP1 est une protéine très conservée (mais toutefois absente de *S. cerevisiae*), souvent essentielle au bon développement des organismes multicellulaires et à la croissance des organismes macroscopiques (J. C. Eissenberg et al. 1992; Lorentz et al. 1994; Freitag, Hickey, et al. 2004).

### **Les protéines SUV(AR)3-9 sont essentielles au développement embryonnaire chez les mammifères**

Chez les mammifères, la méthylation du résidu H3K9 est majoritairement prise en charge par cinq histones méthyltransférases : deux protéines homologues de SU(VAR)3-9 (SUV39H1 et SUV39H2), l'hétérodimère G9-GLP, et SETDB1 (Rea *et al.* 2000). SETDB1 catalyse la mono-méthylation du résidu H3K9 sur les régions péri-centromériques riches en séquences répétées et éléments transposables (Liu *et al.* 2014). Cette modification est utilisée comme substrat par les protéines SUV39H1/2 afin de catalyser les marques H3K9me<sub>2/3</sub> dans ces régions. SUV39H1/2 présentent un chromodomaine à leur extrémité N-terminale, ce qui permet d'étendre la modification aux nucléosomes adjacents et d'assurer son maintien à chaque division cellulaire. Cette caractéristique a été conservée de manière générale chez les métazoaires (*e.g.* drosophile) et est présente également chez la levure *S. pombe*. A l'inverse, l'hétérodimère G9-GLP catalyse les marques H3K9me<sub>1/2</sub> dans les régions de l'euchromatine et participe à la régulation de l'expression des gènes. Si la simple délétion de SUV39H1 et de SUV39H2 n'entraîne aucun phénotype particulier chez la souris, la viabilité post et pré natale est fortement déficiente chez les doubles mutants. La croissance est retardée et les gonades des individus mâles sont atrophiées (Rea *et al.* 2000). SETDB1 et G9-GLP sont eux essentiels au développement embryonnaire précoce (Dodge *et al.* 2004; Tachibana *et al.* 2002, 2005).

### **L'hétérochromatine constitutive régule la méthylation de l'ADN chez *A. thaliana***

Chez la plante modèle *A. thaliana*, les marques H3K9me<sub>1/2</sub> sont les formes prédominantes de H3K9me. Ces marques sont majoritairement présentes dans les régions intergéniques et les éléments transposables, particulièrement dans les régions péri-centromériques riches en CG (Sequeira-Mendes *et al.* 2014).

Contrairement aux mammifères, H3K9me3 est présente en faible quantité et est majoritairement localisée au niveau des gènes de l'euchromatine, transcriptionnellement actifs (70%), et faiblement dans les éléments transposables (16%) (Charron et al. 2009; Roudier *et al.* 2011). L'arsenal protéique de type SUV(AR)3-9 est particulièrement diversifié chez la plante. Ces protéines sont regroupées en deux familles structurellement distinctes : les SUVH et les SURV. Malgré la présence d'un domaine SET, seules cinq d'entre elles présentent une activité méthyltransférase spécifique du résidu H3K9 *in vitro* : SUVH1, SUVH4, SUVH5, SUVH6 et SURV4 (Fabienne Malagnac, Bartee, et Bender 2002; Naumann et al. 2005; Ebbs et Bender 2006). SUVH4/KRYPTONITE fut identifiée en premier lieu au cours de deux cribles génétiques indépendants à la recherche de suppresseur de l'épiallèle *superman* (qui induit des défauts dans la formation des organes floraux) et *pai2* (gène codant la phosphoanthrinilate isomérase) (Jackson et al. 2002; Fabienne Malagnac, Bartee, et Bender 2002). La protéine génère presque l'intégralité de la marque H3K9me2 mais son absence n'altère pas la mono-méthylation (Jackson *et al.* 2004).

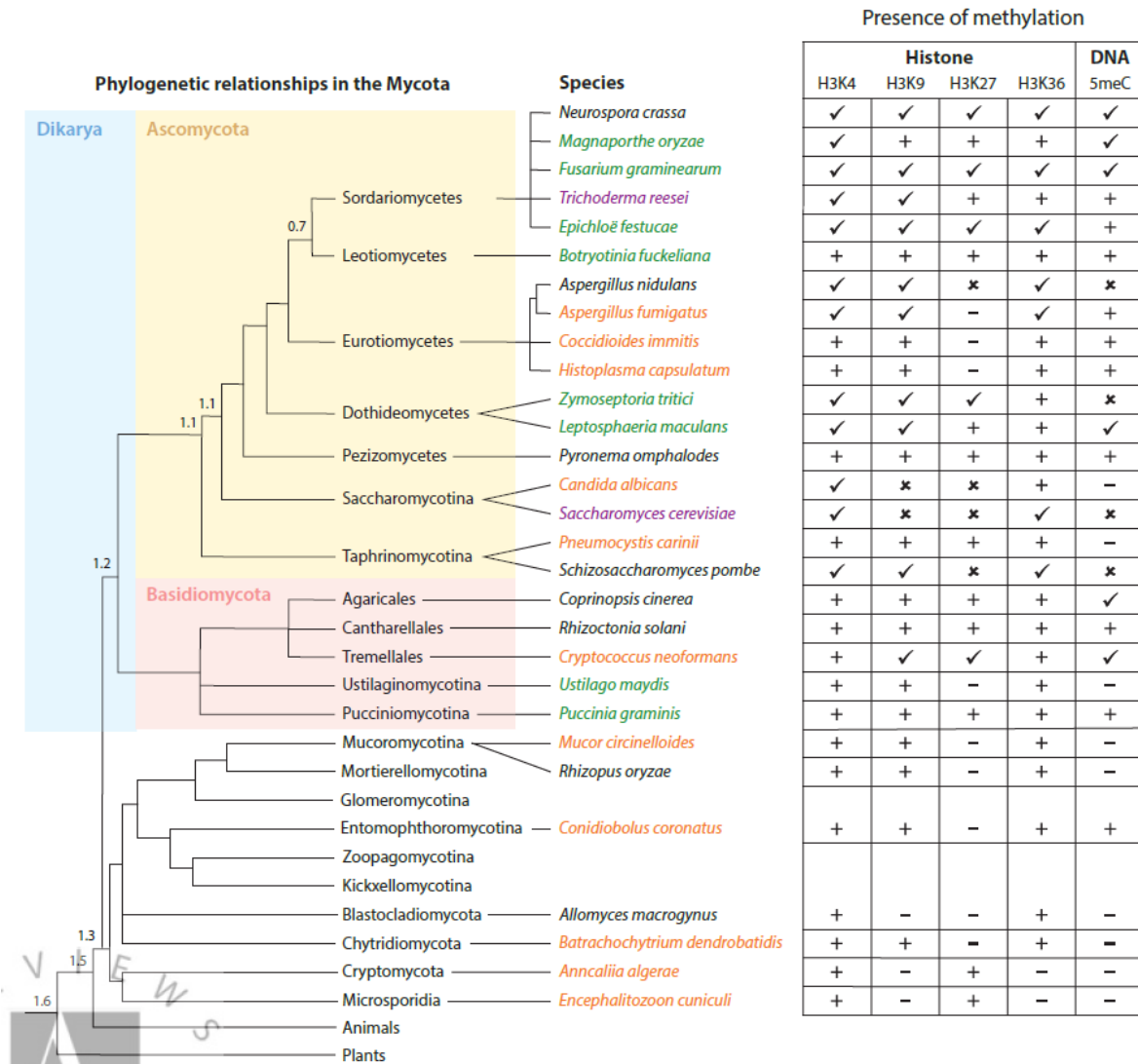
La mise en place de l'hétérochromatine constitutive chez la plante ne fait pas appel à une protéine à chromodomaine de type HP1, mais à la mise en place de méthylation de cytosines (Jackson *et al.* 2002). L'action de SUVH4 régule l'activité de l'ADN méthyltransférase de maintenance CMT3 sur les motifs CHG, ce qui conduit à l'extinction transcriptionnelle de ses séquences cibles (Anders M. Lindroth et al. 2004). En retour, la méthylation des cytosines exerce un rétrocontrôle positif sur l'activité des protéines SUVH par adressage via leur domaine additionnel SRA (SET and RING finger-associated). L'existence d'une telle régulation est conservée chez le champignon filamenteux *Neurospora crassa* et chez les mammifères, chez lesquels HP1 interagit directement avec l'ADN méthyltransférase de maintenance Dnmt1. Chez *N. crassa*, cet adressage assure l'intégralité de la maintenance des profils de méthylation de l'ADN qui de ce fait colocalisent avec la modification H3K9me3 (Fig. 14) (H. Tamaru et Selker 2001). Chez les mammifères, HP1 permet l'adressage de DNMT3 sur les séquences répétées péri-centromériques (Lehnertz *et al.* 2003).

De manière surprenante, les simples mutants *svh4*, *svh5* et *svh6* ainsi que le triple mutant ne présentent pas de défaut développemental apparent. Seul la triple délétion *svh2*, *svh4* et *svh6* conduit à des défauts dans la formation des feuillets liés à l'absence de méthylation des cytosines de gènes développementaux (Johnson *et al.* 2008).

SUVR4 est la seule histone méthyltransférase d'*A. thaliana* capable de déposer la marque H3K9me3. Cette enzyme semble toutefois confinée dans le nucléole et interviendrait uniquement aux locis contenant des éléments transposables et au locus de l'ADNr (Thorstensen *et al.* 2006; Veiseth *et al.* 2011). Bien que les protéines SURV soient dépourvues du domaine SRA, certaines (SURV1, SURV2 et SURV4) présentent un domaine WYLD dans leur partie N-terminale, composé de trois hélices alpha (Thorstensen *et al.* 2006). La fonction de ce domaine spécifique aux plantes reste toutefois méconnue. Veiseth *et al.* proposent qu'il soit impliqué dans la fixation de l'ubiquitine libre permettant ainsi de réguler l'activité de SURV4.

### **Les espèces de la classe des Saccharomyces sont dépourvues d'enzyme KMT1**

Le lignage des champignons est très hétérogène en ce qui concerne la diversité et la fonction des systèmes épigénétiques par rapport à la mise en place de l'hétérochromatine (fig. 12). En l'occurrence, les levures du sous embranchement des Saccharomycotina (*e.g.* *S. cerevisiae* et *Candida glabrata*) sont dépourvues de protéines SU(VAR)3-9 et de marque H3K9me. En revanche, la levure à fission *S. pombe* (sous embranchement des Taphrinomycotina) est plus proche des organismes multicellulaires pour ce type de mécanisme. En particulier, elle est pourvue d'hétérochromatine au niveau des centromères. Contrairement aux plantes et aux métazoaires, les eumycètes ne possèdent qu'une protéine homologue de SU(VAR)3-9, une enzyme appelée Clr4/DIM5/KMT1 selon les espèces, qui assurerait à elle seule l'intégralité de la mono-, di- et tri-méthylation du résidu H3K9 (Ekwall *et al.* 1996; Tamaru et Selker 2001).

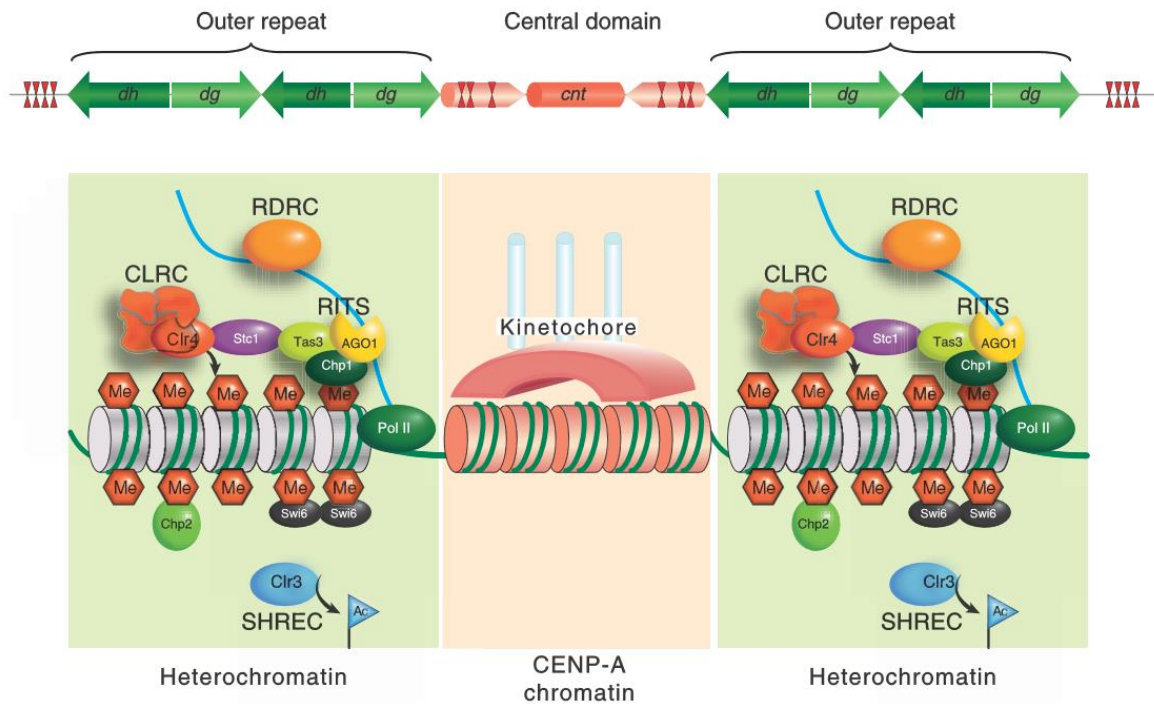


**Figure 12. Présence et absence de méthylation de l’histone H3 et des cytosines dans le règne des Mycota (Freitag 2017)**

L’arbre phylogénétique est constitué d’organismes modèles (noir), de phytopathogènes (vert), d’espèces industrielles (violet) et de pathogènes animaux (orange). Le tableau représente la distribution validée expérimentalement de la méthylation des résidus indiqués chez ces espèces (coche pour présence du résidu méthylé et croix pour son absence) ou basée sur la présence génétique des enzymes requise (KMT et DNMT) (plus pour leur présence et moins pour leur absence).

## Le modèle *S. pombe* : l'assemblage de l'hétérochromatine par l'ARN interférent

Chez *S. pombe*, Clr4 est essentielle à la formation et au maintien de l'hétérochromatine présente dans les régions centromériques, au locus de l'ADNr et au locus sexuel. La mise en place de l'hétérochromatine au centromère implique une régulation très bien décrite aboutissant au recrutement de la machinerie ARN interférent (ARNi) (fig. 13).



**Figure 13.** Mise en place de l'hétérochromatine chez *S. pombe* (Allshire et Ekwall 2015)

Chez la levure *S. pombe*, les territoires péri-centromériques sont constitués de séquences répétées qui sont réprimées par les remodeleurs de la chromatine et le système ARNi. La région centrale sur laquelle viennent se fixer les kinétochores au cours de la mitose est riche en histone variante CENP-A. La protéine Clr4 est l'unité fonctionnelle du complexe CLRC (Clr4-Rik1-Cul4). Le complexe est adressé sur les marques H3K9me<sub>2/3</sub> via le chromodomaine de Clr4. De la même manière, le complexe ARNi RITS (Ago1-Tas3-Chp1) se fixe sur la marque via celui de Chp1. RITS est également recruté par la reconnaissance de séquence des ARNsi centromériques générés par l'ARN polymérase II. Les complexes RITS et CLRC sont liés physiquement par la protéine Stc1. RITS génère le substrat double brin du complexe RDRC qui amplifie le système de répression en synthétisant de longs ARNnc double brin pris en charge par Dcr1. Les deux protéines homologues de HP1 (Swi6 et Chp2) sont recrutées au niveau de H3K9me via leur chromodomaine et participent entre autres au recrutement de l'histone désacétylase Clr3.

La/les cinétique(s) de recrutement impliquée(s) dans la mise en place et/ou le maintien de l'hétérochromatine constitutive est encore en débat.

Expérimentalement, le mutant  $\Delta Clr4$  est déficient dans la formation de l'ARNsi centromérique (Noma *et al.* 2004). D'un autre côté, la délétion des facteurs essentiels au ARNi conduit à la réduction de la marque H3K9me2 et à la dérégulation des séquences répétées péri-centromériques (Volpe *et al.* 2002). L'un des modèles implique alors que Clr4 soit recrutée après la fixation du complexe CLRC sur l'ARN naissant et que le premier ARNsi soit généré par DICER à partir du repliement spontané du transcrit en ARN double brin (Djupedal et Ekwall 2009). Dans le second modèle, la méthylation H3K9me2 est requise avant la formation de l'ARNsi et fait intervenir les composantes du complexe CLRC (Partridge *et al.* 2007).

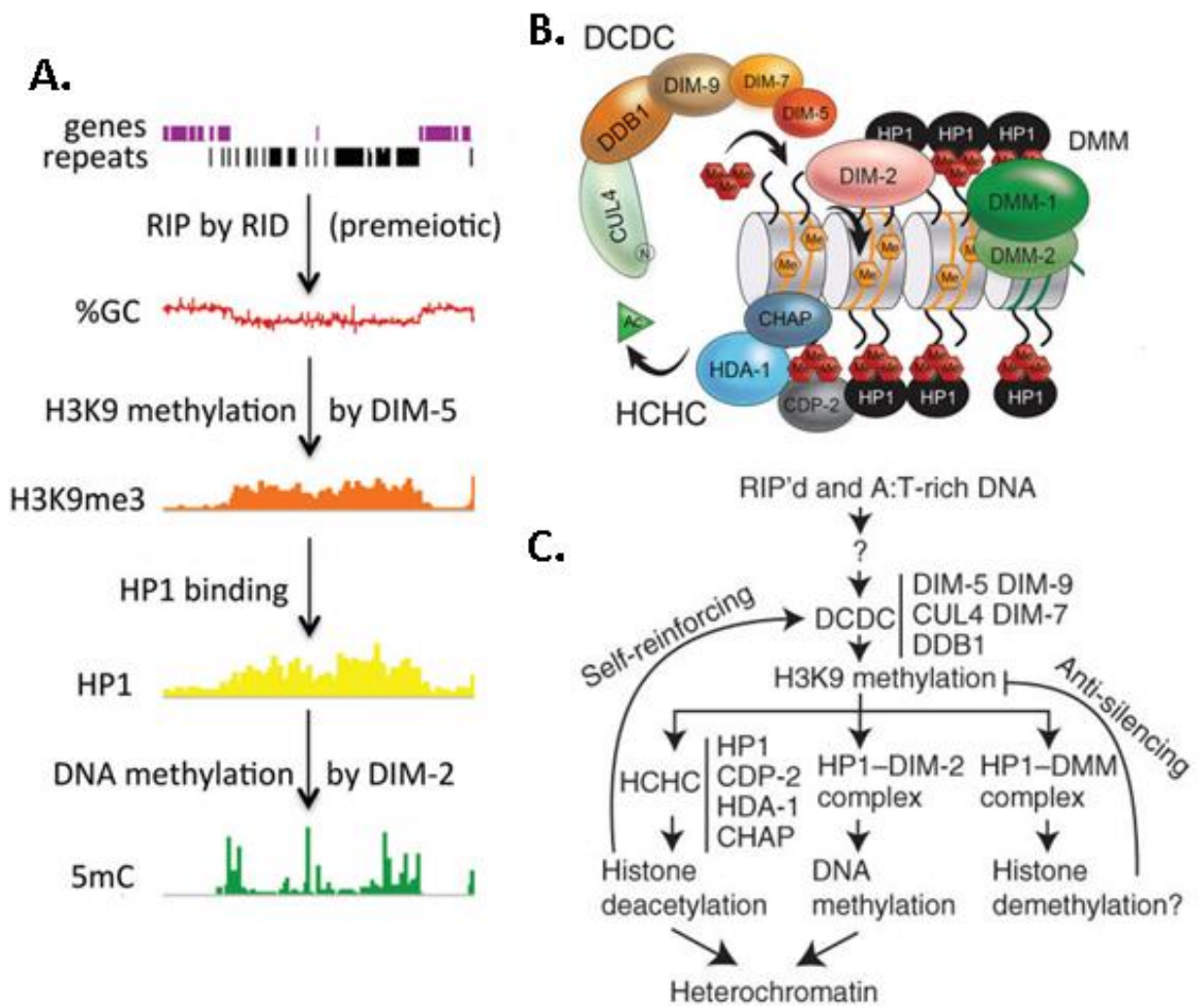
*S. pombe* contient dans son génome des séquences CenH homologues à ses régions répétées péri-centromériques. Ces séquences suffisent à assembler en cis l'hétérochromatine dépendante de Clr4 via l'ARNi. De telles séquences sont présentes au niveau du locus sexuel (entre les loci *mat2* et *mat3*) et aux extrémités des séquences sub-téломériques, adjacentes aux répétitions terminales synthétisées par la télomérase (Noma, Allis, et Grewal 2001; Nimmo, Cranston, et Allshire 1994; Allshire *et al.* 1995). Contrairement à ce qui est observé aux centromères, l'inactivation des protéines essentielles au ARNi (*e.g.* Ago1 et Dcr1) n'altère pas la localisation de H3K9me sur le locus sexuel. Dans cette région, la mise en place de la marque est renforcée par les protéines Atf1 et Clr5 qui sont capables de se fixer sur des séquences spécifiques localisées près du CenH et des allèles *mat* (Hansen *et al.* 2011). Ces protéines permettent l'adressage des histones désacétylases Clr3, Clr4 et Clr6. Puisque l'acétylation de l'histone H3 diminue l'affinité de Clr4 pour H3K9, les HDACs faciliteraient l'activité de la protéine dans cette région (Xhemalce et Kouzarides 2010). Aux télomères, le recrutement de Clr4 est en partie assuré par la protéine Taz1 capable d'interagir avec les séquences terminales (Kano *et al.* 2005). A l'instar de *S. cerevisiae*, la fonction de l'hétérochromatine au locus de l'ADNr est incertaine (stabilité de l'ADNr ?). De toute évidence ce territoire reste enrichi en H3K9me3. Conformément à ce qui est observé chez *A. thaliana*, Clr4 et Swi6 ne sont pas essentiels à la viabilité de *S. pombe*. En revanche, leur absence et donc la perte consécutive de la marque H3K9me2/3 entraîne des pertes de chromosomes liées à un défaut de ségrégation par les microtubules, aggravé à basse température (Lorentz *et al.* 1994; Ekwall *et al.* 1996).

## **L'assemblage de l'hétérochromatine constitutive chez les champignons filamenteux a été mis en évidence chez *Neurospora crassa***

Au sein des champignons filamenteux, l'assemblage de l'hétérochromatine a principalement été étudié par l'équipe d'Éric Selker chez l'organisme modèle *Neurospora crassa*, peu de temps après les premières études réalisées chez les mammifères (Freitag, Hickey, et al. 2004), puis s'est étendue aux aspergilli en 2008 (Palmer *et al.* 2008; Reyes-Dominguez *et al.* 2010). A partir de 2013 sont apparues les premières études sur l'assemblage de l'hétérochromatine chez quelques champignons phytopathogènes (Connolly, Smith, et Freitag 2013; Chujo et Scott 2014; Soyer *et al.* 2014; Schotanus *et al.* 2015) ainsi que quelques espèces fongiques d'intérêt industriel (Seiboth *et al.* 2012 ; Xiujun Zhang, Qu, et Qin 2016) (table 2). Bien qu'un corpus substantiel de données de Chip-Seq/Chip-qPCR ait été constitué depuis lors, le système *N. crassa* reste le système modèle le mieux décrit.

Chez *N. crassa*, la modification la plus fréquente du résidu H3K9 est la forme tri-méthylée (Hisashi Tamaru *et al.* 2003). Une expérience d'immunoprécipitation suivie d'une étape d'hybridation sur des puces à ADN (Chip-on-chip) a permis d'établir le premier profil de localisation de la marque H3K9me3 sur l'ensemble du chromosome VII (Lewis et al. 2009a). Cette étude montre que cette modification post-traductionnelle colocalise strictement, d'une part avec les cytosines méthylées, dont la proportion s'élève chez cette espèce à 1,5% des cytosines totales (Foss *et al.* 1993), et d'autre part avec la protéine affine pour l'hétérochromatine NcHP1. La modification H3K9me3 est majoritairement enrichie en un bloc de 346 kb au niveau du centromère, puis distribuée le long des bras chromosomiques en domaines de 0,5 à 21,6 kb, notamment dans les territoires sub-téломériques. Les régions concernées sont pauvres en gènes et correspondent à des reliques d'éléments transposables qui ont été la cible du RIP (Repeat Induced Point Mutation (E. U. Selker et Stevens 1987)), un système spécifique aux champignons filamenteux qui catalyse la conversion d'une partie des cytosines en thymines dans les régions répétées du génome (voir partie I-V-2). Chez *Neurospora*, les séquences RIPées présentent aussi un fort taux de méthylation des cytosines.





**Figure 14. Mise en place de l'hétérochromatine constitutive chez *N. crassa*** (Lewis *et al.* 2010; Honda *et al.* 2012)

A. NcKMT1 et NcHP1 ont toutes les deux été identifiées en tant que suppresseur de méthylation d'ADN (Tamaru et Selker 2001). Dans ce système, l'assemblage de l'hétérochromatine constitutive implique le recrutement initial de NcKMT1/DIM-5 au niveau des séquences riches en AT afin d'apposer la marque H3K9me3. En conséquence, on observe la fixation de la protéine à chromodomaine NcHP1 sur la chromatine enrichie en H3K9me3, protéine qui interagit à son tour avec l'ADN méthyltransférase de maintenance DIM-2 via son chromo-shadow domaine.

B et C. La méthylation du résidu H3K9 par NcKMT1 dépend de chacun des membres du complexe DCDC (DIM-5,-7,-9, DDB1, CUL4). DIM-7 interagit avec NcKMT1/DIM5 ; l'association de ces deux protéines est nécessaire pour cibler les régions d'intérêts. La synthèse de la marque H3K9me3 par NcKMT1 nécessite la présence de CUL4 (Cullin 4), DDB1 (Damaged DNA Binding Protein-1), dont l'interaction forme une unité catalytique E3 ubiquitine ligase, et DIM-9 dont la fonction n'est pas connue (Lewis *et al.* 2010b). NcHP1 interagit avec H3K9me3 via son chromodomaine et permet le recrutement de trois complexes nécessaires à la mise en place de l'hétérochromatine. Parmi eux, le complexe HCHC est constitué de la protéine à chromodomaine CDP-2 qui interagit également avec H3K9me. Elle permet le recrutement de l'histone désacétylase HDA-1 via CHAP (Honda *et al.* 2012b). HP1 interagit avec l'unique ADN méthyltransférase de maintenance DIM-2 afin de générer la totalité des 5mC. L'absence d'HP1 et CDP-2 induit à la fois une perte de H3K9me3 et de 5mC dans certaines régions. En l'occurrence, la désacétylation de l'histone H3 favorise l'activité de NcKMT1. La désacétylation des histones, la méthylation de l'ADN et le recrutement de NcHP1 sont les acteurs actifs de l'assemblage de l'hétérochromatine constitutive. NcHP1 forme également un complexe avec l'hétérodimère DMM-1/DMM-2 qui présente une activité histone déméthylase. En son absence, les régions hétérochromatiniennes peuvent déborder au-delà des frontières des domaines de l'hétérochromatine (régions constituées d'ADN répété) jusqu'à s'étendre sur les territoires euchromatiniens (régions riches en gènes et pauvres en ADN répétés) (Honda *et al.* 2010). Le complexe DMM servirait alors à confiner la marque H3K9me3 aux séquences répétées et aux éléments transposables. On peut imaginer qu'une autre marque et/ou une protéine interagissant avec l'ADN présente(s) dans l'euchromatine participera(en)t à la régulation de son activité.

**L'hétérochromatine constitutive intervient dans la croissance végétative et le développement sexué et asexué du champignon modèle *N. crassa***

De manière générale, la perte des facteurs essentiels à la formation de l'hétérochromatine constitutive (*e.g.* KMT1 et HP1) chez les champignons filamenteux n'a que peu d'effet sur leur développement (Table. 2) (Palmer *et al.* 2008; Reyes-Dominguez *et al.* 2010, 2012; Soyer *et al.* 2014; Xiujun Zhang, Qu, et Qin 2016; Gu *et al.* 2017). Il semblerait que sa fonction soit donc principalement réservée à la défense contre les ETs et à la stabilité du génome.

Cependant *N. crassa* fait figure d'exception puisque l'absence de KMT1 entraîne des défauts majeurs de croissance végétative et de reproduction sexuée, encore aggravés en l'absence de HP1 (table. 2). Par ailleurs, ces mutants montrent une perte massive de la marque H3K27me3 sur les territoires de l'hétérochromatine facultative redirigée en grande partie sur les domaines de l'hétérochromatine constitutive aboutissant à une modification durable de leurs épigénomes. De ce fait, les défauts phénotypiques survenant chez ces mutants ne seraient pas liés directement à l'absence de la voie KMT1-HP1 mais plutôt à la redistribution de la modification H3K27me3 (Jamieson et al. 2016a).

**Table 2. Liste des phénotypes associés au développement chez les mutants *Kmt1*, *Hp1* et *Kmt6* de champignons filamenteux**

Les phénotypes observés dans les mutants *Kmt1* et *Hp1* sont similaires ou peuvent être aggravés dans le mutant *Hp1* comme indiqué. Se référer à la figure 12 pour la couleur des espèces référencées, les anomalies sévères sont accentuées en rouge. L'abréviation ND (non déterminé) est utilisée en l'absence de données et « sauvage » lorsque les auteurs n'ont mentionné aucun phénotype associé. Cette liste peut ne pas être exhaustive. \* L'inactivation de *Kmt1* chez cette espèce a été réalisée par ARNi, les autres, par délétion complète du gène. \*\* La délétion du gène *Hp1* chez cette espèce n'entraîne aucune anomalie développementale.

	<i>Kmt1</i> et/ou <i>Hp1</i>	<i>Kmt6</i>	Articles de référence
<i>Neurospora crassa</i>	Croissance végétative très réduite, phénotype aggravé dans le mutant <i>Hp1</i> (croissance irrégulière) Quasiment stérile Production de conidies retardée, très retardée dans le mutant <i>Hp1</i>	Sauvage	(Freitag, Hickey, et al. 2004; Basenko et al. 2015)
<i>Magnaporthe oryzae</i>	Pathogénicité et croissance végétative faiblement altérée	Pathogénicité et croissance végétative faiblement altérée Production de conidie grandement diminuée Développement de l'appressorium faiblement altérée	(Pham et al. 2015)
<i>Epichloë festucae</i>	Croissance végétative très réduite Incapacité à coloniser son hôte	Sauvage	(Chujo et Scott 2014)
<i>Fusarium graminearum</i>	Sauvage	Croissance très réduite, Phénotype aggravé sur milieu riche Pigmenté Stérile Incapacité à coloniser son hôte Absence d'anastomose	(Connolly, Smith, et Freitag 2013)
<i>Fusarium fujikuroi</i>	ND	Croissance végétative sévèrement réduite et irrégulière Production de conidies très réduite voir absente	(Studt, Rösler, et al. 2016)
<i>Fusarium verticillioides</i>	Pigmenté, croissance et production de conidies légèrement altérée Pathogénicité réduite Défaut de production de périthèce	ND	(Gu et al. 2017)
<i>Aspergillus nidulans</i>	Sauvage	<i>Kmt6</i> et H3K27me absents	(Reyes-Dominguez et al. 2010)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Croissance végétative peu altérée Pigmentée Production de conidies retardée mais peu altérée	<i>Kmt6</i> absent	(Palmer et al. 2008)
<i>Leptosphaeria maculans</i> *	Croissance végétative faiblement réduite Reproduction sexuée sauvage	ND	(Soyer et al. 2014)
<i>Penicillium oxalicum</i>	Croissance faiblement réduite dans le mutant <i>Hp1</i>	ND	(Zhang, Qu, et Qin 2016)
<i>Botrytis cinerea</i> **	Croissance végétative faiblement réduite Production de conidiophores très réduite et retardée Production de sclérotes très réduite Pathogénicité très altérée	ND	(Xiaoli Zhang et al. 2016a)

### **I-III-d L'assemblage de l'hétérochromatine facultative par les protéines PcG**

#### **La marque H3K27me3 est apposée par le complexe PRC2**

L'hétérochromatine facultative se forme dans un environnement euchromatinien au niveau de sites spécifiques sur lesquels les protéines de l'hétérochromatine ciblent de manière durable les séquences géniques. Ces protéines appartiennent à la classe Polycomb (PcG) et se déclinent en différents complexes fonctionnels. Parmi eux, le complexe PRC2 contient l'histone méthyltransférase canonique E(z)/KMT6 qui assure la totalité de la di- et tri- méthylation du résidu H3K27 de la plupart des espèces eucaryotes (Chamberlain, Yee, et Magnuson 2008).

Chez les mammifères, la marque H3K27me3 est principalement enrichie en foyers localisés au niveau des îlots CpG non méthylés des promoteurs de gènes. Cependant, dans certaines régions, PRC2 et H3K27me3 couvrent de larges domaines (de 10 à 140 kb) qui s'étendent sur des segments génomiques riches en gènes. C'est notamment le cas dans les clusters des gènes Hox. D'une manière générale, les loci concernés abritent souvent des facteurs clefs du développement, dont la répression sélective définit la différenciation des cellules. Par ailleurs, PRC2 et H3K27me3 sont aussi requis pour le maintien de la pluripotence des cellules souches (Pauler *et al.* 2009). L'acteur responsable de la mono-méthylation H3K27me1 n'est pas identifié de façon certaine. En effet, bien qu'il ait été proposé que la protéine E(Z) puisse mono-métyler le résidu H3K27, l'absence de cette dernière n'altère pas la quantité générale de H3K27me1. Chez les mammifères cette marque pourrait en revanche être assurée par l'hétérodimère G9a-GLP (Wu *et al.* 2011). Par ailleurs, contrairement à la tri-méthylation du résidu H3K27, la mono-méthylation est uniquement trouvée dans le corps des gènes activement transcrits et dans le territoire de l'hétérochromatine constitutive (Peters *et al.* 2003; Ferrari *et al.* 2014).

Chez la drosophile, le complexe PRC2 est recruté sur les éléments de réponse aux protéines PcG (PREs) constitués de motifs spécifiques reconnus par des protéines à doigt de zinc qui interagissent directement avec l'ADN (Müller et Kassis 2006). Certains facteurs de transcription (*e.g.* Pleiohomeotique, facteur GAGA, ZEST) sont notamment impliqués dans l'adressage site-spécifique des PcG. Les mammifères étant dépourvus d'éléments PREs, le mécanisme d'adressage du complexe PRC2 dans ces organismes n'est pas complètement élucidé.

Malgré tout, le complexe PRC2 étant associé aux îlots CpG dans les cellules embryonnaires, il se pourrait que certaines protéines à doigt de zinc CXXC, qui présentent une forte affinité pour les îlots CpG non méthylés, interviennent dans le positionnement du complexe (Birke *et al.* 2002). Dans certains cas, le positionnement de PRC2 implique son association avec un long ARN non codant. Ainsi, au cours de l'inactivation de l'une des deux copies du chromosome X présente dans les cellules des femelles de mammifères, le positionnement de PRC2 sur le chromosome à inactiver nécessite son recouvrement initial par l'ARNnc XIST (IncRNA X inactive-specific transcript). Le deuxième exemple bien caractérisé implique l'ARNnc HOTAIR qui correspond au transcrit antisens du gène HOX qui promeut le placement de PRC2 en *cis* des cluster de gènes HOXD (Hajjari et Salavaty 2015).

A l'inverse, les marques de l'euchromatine telles que H3K4me3 et H3K36me2/3 inhibent l'activité de PRC2 (C. Lu *et al.* 2016). En contrepartie, le complexe intervient en association avec des histones déméthylases (*e.g.* KDM2 dans le complexe RAF) capables d'effacer la mono- et di-méthylation du résidu H3K36 ainsi que la tri-méthylation du résidu H3K4.

D'un autre côté, PRC2 sert de plateforme d'ancrage à différents complexes PcG. Parmi eux, PRC1 catalyse l'ubiquitination du résidu H2AK119, une marque connue pour réduire l'accessibilité de certaines protéines telles que celles des complexes remodeleurs ATP-dépendant SWI/SNF (Bantignies et Cavalli 2011). L'adressage de PRC2 serait alors assuré après chaque cycle cellulaire via la reconnaissance de H3K27me3 par la sous-unité EED à domaine WD40 (Justin *et al.* 2016). Par ailleurs, le modèle de régulation de PRC1 par PRC2 a été récemment remis en question au profit du modèle inverse : PRC1 serait d'abord recruté sur les marques locales H3K9me3 et H3K27me3 via la sous-unité à chromodomaine PC/CBX qui serait suivi de la fixation de PRC2, via la marque H2AK119 et la protéine JARID2/Jumonji (Holoach et Margueron 2017).

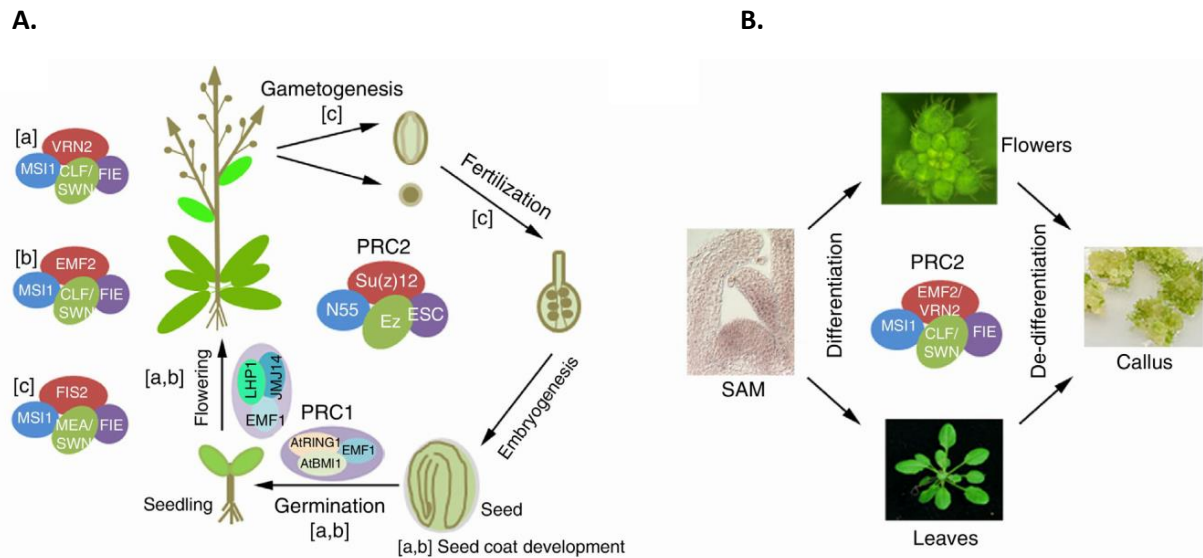
### **L'hétérochromatine facultative est essentielle au cycle de vie d'*A. thaliana***

La plante modèle *A. thaliana* présente trois protéines homologues de KMT6 qui interviennent en tant que sous-unités catalytiques du complexe PRC2 : CURLY LEAF (CLF), SWINGER (SWN) et MEDEA (MEA) (Baumbusch *et al.* 2001). A elles trois, ces enzymes catalysent l'intégralité de la tri-méthylation du résidu H3K27, assurant la mise en place de l'hétérochromatine facultative (fig. 15).

Contrairement aux mammifères et à la drosophile, les modifications H3K27me3 sont localisées préférentiellement dans la partie transcrite des gènes, sous forme de blocs de moins de 1 kb de longueur, avec un enrichissement significatif juste après le promoteur. Chez *A. thaliana*, 17% des gènes sont réprimés par H3K27me3 incluant des gènes régulateurs de la prolifération cellulaire et de la différenciation, ainsi que des facteurs de transitions développementales liées aux changements environnementaux (Zhang *et al.* 2007). CLF et SWN sont exprimées durant tout le développement post-embryonnaire et présentent des fonctions redondantes alors que l'expression de MEA est restreinte au gamétophyte femelle et est nécessaire pendant le développement embryonnaire précoce (Grossniklaus *et al.* 1998; Chanvivattana *et al.* 2004).

HP1 LIKE (LHP1) est la seule protéine homologue de HP1 identifiée chez *A. thaliana* (Gaudin *et al.* 2001). Elle est l'homologue fonctionnel de PC/CBX qui reconnaît les marques H3K27me3 via son chromodomaine et interagit avec le complexe PRC1 via son chromo-shadow domaine.

A contrario, la mono-méthylation des résidus H3K27 (H3K27me1) participe à la mise en place de l'hétérochromatine constitutive et colocalise avec la marque H3K9me2. La mono-méthylation de H3K27 est catalysée par les protéines à SET domaine ARABIDOPSIS THRITHORAX RELATED PROTEIN 5 (ATXR5) et ATXR6 (Mathieu, Probst, et Paszkowski 2005). La double délétion *atxr5/6* n'entraîne qu'une diminution de la taille de la plante et des feuilles (Jacob *et al.* 2009). De ce fait, la marque H3K27me1 ne semble pas essentielle à la viabilité et au développement de la plante à l'instar de H3K9me2. Malgré la concordance fonctionnelle de H3K27me1 et H3K9me2, leurs mises en place semblent être indépendantes l'une de l'autre (Jacob *et al.* 2009).



**Figure 15. PRC2 et PRC1 sont nécessaires au cycle de vie d'*A. thaliana* (Xiao et Wagner 2015)**

A. Trois complexes PRC2 ([a] VRN-PRC2, [b] EMF-PRC2, et [c] FIS-PRC2) sont requis pendant les phases de transitions morphologiques du développement sexué. FIS-PRC2 a un impact majeur dans le développement du gamétophyte femelle et est essentiel à la formation complète de l'endosperme (le tissu nourricier utilisé par l'embryon après fécondation) et donc au développement précoce. EMF-PRC2 et PRC1 sont requis pour réprimer les gènes nécessaires à la maturation de la graine et au développement embryonnaire, pour permettre la germination des graines et la croissance végétative de la plante. Le développement des organes sexués nécessite l'inactivation des répresseurs floraux par les complexes EMF-PRC2 et VRN-PRC2, ainsi que l'éviction des protéines PcG sur les activateurs.

B. La formation de nouveaux organes latéraux tels que les feuilles, les fleurs et les racines requiert une plasticité génomique permettant d'alterner entre processus de différenciation et dé-différenciation (formation d'un nouveau méristème) et maintenance d'un état de pluripotence. Ces étapes nécessitent l'intervention des complexes PRC2 et des autres protéines PcG.

### **L'hétérochromatine facultative chez *S. pombe* fait appel au système Clr4/ARNi**

La situation des Ascomycota est contrastée en ce qui concerne la conservation de la méthylation du résidu H3K27. En l'occurrence, la marque est absente dans la majorité des levures étudiées (Taphrinomycotina et Saccharomycotina e.g. *S. pombe*, *S. cerevisiae*, *C. glabrata*). Chez les champignons filamenteux (Pezizomycotina), certains lignages ont perdu les gènes requis pour l'établissement de la marque (e.g. *Mucor*, *Rhizopus*, *Ustilago*, *Aspergillus*) (fig. 12) alors qu'ils ont été conservés chez d'autres (Connolly, Smith, et Freitag 2013).



Cependant, l'absence de machinerie de méthylation des résidus H3K27 peut être remplacée par l'émergence de systèmes analogues aboutissant à une convergence fonctionnelle quant à la structuration de la chromatine. Chez *S. pombe* par exemple, l'assemblage de l'hétérochromatine facultative est assuré par la marque H3K9me2. Ainsi, Zofall *et al.* ont identifié des îlots d'hétérochromatine dans des régions d'euchromatine (Zofall *et al.* 2012). Ces îlots, fonctionnellement analogues à l'hétérochromatine facultative, sont localisés à proximité des séquences répétées terminales et péri-centromériques et englobent jusqu'à une trentaine de loci où l'on trouve en majorité des gènes méiotiques, dont l'expression est réprimée au cours de la croissance végétative. La mise en place de la marque H3K9me2 dans les séquences codantes, requiert la présence de l'histone désacétylase Sir2 et est régulé par Epe1 (anti-silencing factor). En l'absence de Epe1 les îlots enrichis en H3K9me2 sont significativement plus nombreux, ce qui a pour effet d'étendre la marque H3K9me2 au-delà des extrémités définies dans un contexte génétique de souche sauvage.

### **Le complexe PRC2 assemble l'hétérochromatine facultative dans les régions sub-téломériques des chromosomes de la levure *Cryptococcus neoformans***

En ce qui concerne les basidiomycota, le premier complexe PRC2 identifié a été caractérisé récemment par Dumesic *et al.* chez la levure pathogène *Cryptococcus neoformans* (Dumesic *et al.* 2015). Dans cette étude, les auteurs ont identifié un complexe de cinq protéines comprenant deux orthologues de métazoaire, Ezh2 (EZH2/KMT6) et Eed1 (EED), ainsi que trois protéines additionnelles dont une à chromodomaine, Ccc1, et une protéine à domaine WD40, Msl1. Ces protéines assurent la répartition de la marque H3K27me3 exclusivement sur les séquences sub-téломériques de chaque chromosome sur de larges régions (41 kb de moyenne). L'absence de Esh2 conduit à la perte totale de la marque et à la dérégulation transcriptionnelle de 75 loci, majoritairement localisés dans les régions sub-téломériques normalement enrichies en H3K27me3. L'adressage du complexe dans ces régions est assuré par le chromodomaine de Ccc1 qui interagit avec la marque H3K27me2/3. En son absence, le complexe est redirigé et la marque est redistribuée dans l'hétérochromatine constitutive des centromères, enrichie en H3K9me2. Cet événement original de relocalisation est sous le contrôle de Eed1 qui, chez *C. neoformans*, semble présenter une affinité faible mais significative pour H3K9me2.

Par ailleurs, la répression transcriptionnelle des compartiments génomiques d'hétérochromatine facultative nécessite la présence de la HDAC Clr3, qui fonctionne de manière analogue à ce qui a été décrit chez les métazoaires. Seules les délétions des sous-unités *Msl1* et *Ccc1* semblent entraîner un défaut de croissance. Ceci pourrait signifier que les deux protéines interviennent pour d'autre(s) fonction(s) indépendante(s) de PRC2. En l'occurrence, la dérégulation des gènes est plus importante dans ces mutants qu'en absence de *Ezh2*, et ce, malgré la perte totale de la marque H3K27me3.

### **Le complexe PRC2 est conservé dans le sous-embranchement des Pezizomycotina**

Chez les Pezizomycotina, le complexe PRC2 a été identifié initialement chez le champignon modèle *N. crassa*. Ce dernier comporte une protéine homologue pour chaque sous-unité référencée chez les métazoaires, soit une protéine à SET domaine KMT6/SET-7 (E(z)) ainsi que les sous-unités régulatrices EED, SU(Z)12 et NPF (p55) (Jamieson *et al.* 2013). Il semble cependant que ce sous-embranchement ait perdu les sous-unités du complexe PRC1 et la plupart des protéines connues pour interagir avec le complexe PRC2 (Connolly, Smith, et Freitag 2013). Ceci laisse penser que le mécanisme de répression transcriptionnel qui découle de l'action de PRC2 est radicalement différent de celui décrit chez les plantes ou les animaux.

La cartographie génomique de la marque H3K27me a été réalisée chez trois espèces : le champignon modèle *N. crassa* (Jamieson *et al.* 2013) et les champignons phytopathogènes *Fusarium graminearum* (Connolly, Smith, et Freitag 2013) et *Zymoseptoria tritici* (Schotanus *et al.* 2015). *N. crassa* et *F. graminearum* appartiennent à la classe des Sordariomycètes et présentent tous les deux un génome partiellement méthylé. *Z. tritici* est plus éloigné phylogénétiquement (classe des Dothideomycètes) et est dépourvu de cytosines méthylées.

Chez *N. crassa*, la modification H3K27me3 est répartie en 223 domaines qui s'étendent en moyenne sur 12,5 kb, recouvrant 6,8% du génome (Jamieson *et al.* 2013). Ces domaines sont majoritairement présents dans les territoires sub-télomériques et sont exclus de l'hétérochromatine constitutive. Les régions concernées sont riches en gènes, ce qui représente environ un millier de gènes (soit approximativement un dixième du répertoire annoté), dont la grande majorité n'a pas de fonction prédite. Ces gènes sont peu/pas exprimés en accord avec la fonction de la modification post-traductionnelle H3K27me3. De manière surprenante, si l'absence de NcKMT6 conduit bien à la perte complète de la marque H3K27me3 dans le génome des mutants correspondants, seulement 130 gènes dont 21 présents uniquement dans les domaines H3K27me3 voient leur expression transcriptionnelle réactivée.

Par ailleurs, alors que la disparition de la marque est aussi observée pour chacun des simples mutants correspondant à chacun des gènes codant des protéines du complexe PCR2, les mutants portant un allèle nul du gène *npf* présentent seulement une réduction à la fois en nombre et en taille des domaines enrichis en modification H3K27me3, principalement aux télomères. Si les autres simples mutants ne présentent aucun phénotype particulier de croissance ou de reproduction sexuée, la perte de la protéine NPF provoque une légère baisse de la vitesse de croissance radiale. Cette protéine faisant potentiellement partie du complexe chaperon d'histone CAF-1, il se pourrait que le défaut de croissance soit lié à la fonction de ce complexe plutôt qu'à la réduction de la modification H3K27me3.

### **L'hétérochromatine facultative participe à la régulation de clusters de métabolites secondaires et de facteurs de virulence chez certains champignons phytopathogènes**

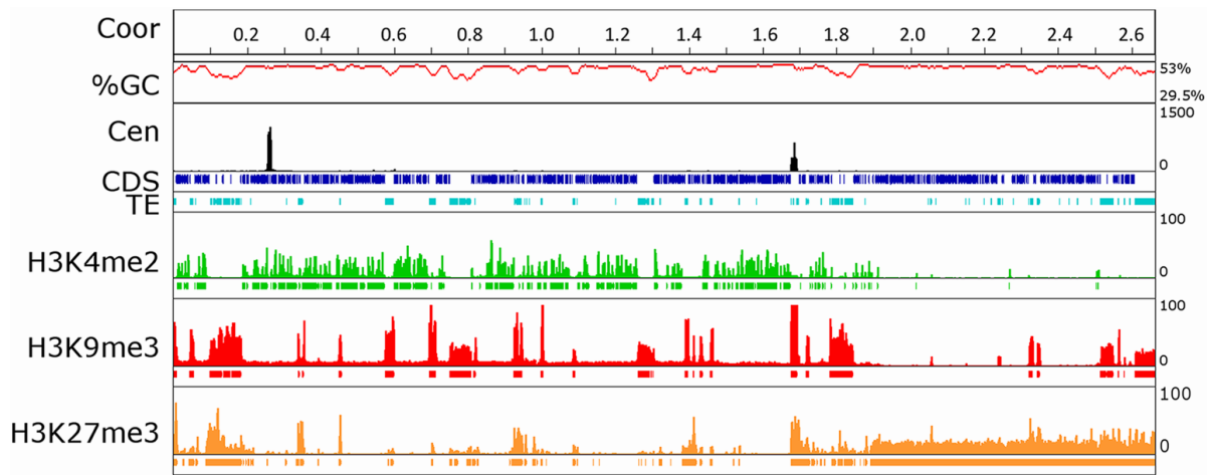
Chez *F. graminearum*, H3K27me3 recouvre près d'un tiers du génome en de large segments extensifs qui prédominent dans les régions sub-télomériques à l'instar de *N. crassa* (Connolly, Smith, et Freitag 2013). Des domaines enrichis sont également présents dans le corps des chromosomes mais exclus de l'hétérochromatine constitutive (*e.g.* régions péri-centromériques, éléments transposables). En l'occurrence, la moitié du chromosome 2 est enrichie de cette façon. Le génome de *F. graminearum* étant constitué de fusions de chromosomes appartenant aux autres espèces de *Fusarium*, ces régions internes sont susceptibles de correspondre à des télomères ancestraux. L'enrichissement génétique de la marque concerne 46% du set complet de gènes, qui, pour la plupart, sont non exprimés. En l'occurrence 76% des gènes non exprimés dans une souche sauvage sont associés à la marque. Contrairement à *N. crassa*, ce sont près de 14% des gènes totaux (soit approximativement 2000 gènes) qui sont transcriptionnellement déréprimés en absence totale de la marque chez le mutant *Fgkmt6*. Parmi eux, une grande partie correspond à des gènes de détoxification des métabolites secondaires et d'effecteurs impliqués dans la pathogénicité. En l'occurrence, FgKMT6 participe à la répression de clusters de métabolites secondaires, localisés pour la plupart dans les régions sub-télomériques. Ainsi, sur 45 clusters, 35 sont enrichis en H3K27me3. Les clusters déréprimés en l'absence de FgKMT6 sont entre autres ceux de la biosynthèse de caroténoïdes, de la fusarine, de cytochromes P450, des polycétides synthases (PKS) et des peptides non ribosomiques (NRPS) ainsi que de diverses mycotoxines.

Des résultats similaires ont été obtenus par ChIP-qPCR chez l'espèce *Epichloë fertucae* pour laquelle H3K9me3 participe également activement à ce type de régulation (Chujo et Scott 2014). Il est intéressant de noter que lorsque *E. fertucae* rentre en symbiose avec sa plante hôte, certains clusters situés près des télomères sont déréprimés après avoir perdus les marques H3K27me3 et H3K9me3 présentes dans des conditions de culture axénique. Le fait est que si ces deux espèces présentent des caractéristiques similaires en termes de paysages épigénomiques, les mutants sont de phénotypes opposés (Table 2). Alors que le mutant *Fgkmt6* présente à la fois un défaut de croissance, aggravé en milieu riche, et la perte de sa capacité à coloniser un fruit, l'absence de KMT6 chez *E. fertucae* n'induit aucun phénotype visible malgré la perte totale de la marque H3K9me3. Inversement, l'absence de H3K9me3 dans le mutant *Fgkmt1* n'altère pas la croissance du champignon alors que la perte de CLRD/KMT1 (et de la modification associée) chez *E. fertucae* entraîne un défaut sévère de croissance radiale et la perte de la capacité à coloniser sa plante hôte (Chujo et Scott 2014). Il est également à noter qu'en plus d'être altéré dans la production de pigment (dû à l'absence de la marque H3K27me3 sur les clusters de pigments comme celui de la biosynthèse de caroténoïdes), le mutant *Fgkmt6* qui présente un défaut d'anastomose est également stérile parce qu'incapable de réaliser les stades précoces du développement sexué (Connolly, Smith, et Freitag 2013).

#### **I-III-e La relation entre l'hétérochromatine constitutive et facultative**

##### **La modification H3K27me3 colocalisée avec H3K9me3 dans l'hétérochromatine constitutive chez *Zymoseptoria tritici***

La modification H3K27me3 partage également des domaines partiellement recouverts par la modification H3K9me3 lorsque ceux-ci comprennent des éléments transposables et des séquences répétées. Le caryotype de *Zymoseptoria* se compose de 13 chromosomes corps et 8 chromosomes accessoires (Schotanus *et al.* 2015). Les chromosomes accessoires sont pauvres en gènes et riches en éléments transposables. Les gènes présents sur les chromosomes accessoires sont peu ou pas exprimés. En l'occurrence, l'étude de Schotanus *et al.* a montré que les chromosomes accessoires sont entièrement recouverts par la marque H3K27me3 et presque entièrement dépourvus de la marque activatrice H3K4me3. En revanche, la distribution de la modification H3K9me3 est la même que sur les chromosomes corps, c'est-à-dire strictement enrichie sur les éléments transposables (fig. 16).



**Figure 16. Enrichissement des marques épigénétiques sur le chromosome 7 de *Z. tritici*** (Schotanus *et al.* 2015)

La figure est une représentation de l'enrichissement significatif des marques épigénétiques référencées sur chromosome 7 dont la longueur en Mb est indiquée sur la première ligne, suivi du pourcentage G+C sur une fenêtre de 10 kb, de l'enrichissement en histone variante CenH3 (présent au centromère et sur l'ADNr), de l'emplacement des CDS et des ETs.

Le chromosome 7 est par ailleurs particulier puisqu'il présente sur toute une partie du bras chromosomique droit les caractéristiques précédemment citées des chromosomes accessoires, à la différence que cette région est très riche en gènes qui sont en l'occurrence très peu ou pas exprimés. Le reste du chromosome est associé au type chromosome corps avec la présence de deux copies d'ADNr de 1,69Mb, enrichies en H3K9me3.

### **La méthylation de l'ADN empêche le chevauchement des deux types d'hétérochromatine**

Le chevauchement des deux marques entre elles (H3K9me3 et H3K27me3) est peu fréquente mais parfois observée. Par exemple, chez la paramécie, les marques H3K27me3 et H3K9me3 sont toutes les deux requises en *cis* pour l'excision des éléments transposables et des microsatellites au cours du développement du macronoyau (Khaled Bouhouche et al. 2011). Certaines cellules cancéreuses montrent également un recrutement massif des protéines PcG dans les régions péri-centromériques hétérochromatiniennes enrichies en H3K9me3 sans que l'on sache comment (Simon et Kingston 2013). Il a récemment été montré que PRC2 coopère avec les histones méthyltransférases qui ont pour substrat le résidu H3K9 pour réprimer les gènes développementaux dans les cellules souches (Bilodeau *et al.* 2009).

Par ailleurs, la méthylation de l'ADN pourrait intervenir dans la mise en place des deux marques. Il a été montré, notamment chez les mammifères, que l'absence de méthylation de l'ADN dans les régions péri-centromériques permet l'adressage des protéine PcG via le recrutement de l'intermédiaire BEND3 sur les séquences satellites (répétitions de dinucléotides CpG, présents dans les régions promotrices des gènes) non méthylées (Saksouk *et al.* 2014). Des résultats similaires ont été obtenus chez la plante *A. thaliana* où l'inactivation de l'ADN méthyltransférase MET1 engendre une délocalisation de la marque H3K27me3 au niveau des transposons et de la marque H3K9me3 sur les locis régulés par PcG (Deleris *et al.* 2012). Sachant cela, le profil divergent de H3K27me3 chez *Z. tritici* par rapport à ceux observés chez *Neurospora* et *Fusarium* pourrait dériver de l'absence de méthylation de l'ADN dans l'espèce concernée. Cependant, la perte de la méthylation de l'ADN chez *N. crassa* n'altère pas la localisation de H3K27me3 (Jamieson *et al.* 2016a). En revanche, la perte de la marque H3K9me3 dans le mutant *NcKmt1* entraîne la relocalisation partielle de la modification H3K27me3 dans l'hétérochromatine constitutive. De plus, les deux marques colocalisent dans l'hétérochromatine constitutive en absence de HP1, indépendamment du complexe HDHC. Ce résultat présente une analogie avec ce qui a été montré chez *C. neoformans* pour lequel une autre protéine à chromodomaine (CCC1) régule la position des marques H3K27me3 dans le génome (Dumesic *et al.* 2015). A noter que CCC1 n'est pas conservée chez *N. crassa* et *F. graminearum*. Cependant, ni l'inactivation de *HP1* ou de *KMT1* n'altère la localisation de H3K27me3 chez *F. graminearum* (Connolly, Smith, et Freitag 2013). Un rôle de la méthylation de l'ADN dans le positionnement des marques chez ces espèces n'est donc pas à exclure. En l'occurrence, si la maintenance de la méthylation de l'ADN est assurée par la voie *Kmt1/HP1/DIM2*, l'introduction de nouvelles cytosines méthylées est générée par l'ADN méthyltransférase *de novo* RID à travers le Repeat Induced Point Mutation (RIP).

#### **I-IV « Repeat Induced Point Mutation », assemblage de l'hétérochromatine et reproduction sexuée chez les champignons filamenteux**

Les segments d'ADN mobiles (éléments transposables ou ETs) sont présents dans les génomes de presque tous les organismes. Ils peuvent être bénéfiques, notamment en accélérant l'adaptation évolutive ou en propageant de la diversité génétique, mais leur impact est souvent considéré comme délétère (*e.g.* mutation par insertion, perte d'expression, instabilité du génome par recombinaison somatique entre éléments répétés et dispersés) (Arkhipova et Meselson 2005). Pour contrer la multiplication des ETs dans le génome, les organismes ont mis au point des systèmes de défense.

Ces mécanismes diffèrent selon leurs stratégies de reconnaissance et d'éradication des ETs mais tous sont confrontés au même défi initial, celui de pouvoir différencier leurs cibles du reste de leur génome. Cependant, l'activité des ETs laisse des traces spécifiques reconnaissables. Ces caractéristiques peuvent être liées à une réplication ou une transcription anormale, la présence de copies multiples dans le génome hôte ainsi que l'apparition de sites d'insertion. Une fois détectées, l'activité des ETs peut être contrée par un certain nombre d'approches moléculaires. Les systèmes canoniques mettent en jeu des marques épigénétiques hétérochromatiniennes (*e.g.* H3K9me3 et 5mC) qui limitent leur expression transcriptionnelle et/ou utilisent des mécanismes de répression post-transcriptionnelle tels que l'interférence à ARN (ARNi), ou l'édition d'ARNm (ARN Editing). En plus de ces processus liés à la transcription, les ETs peuvent également être éliminés physiquement comme c'est le cas lors du développement macronucléaire de la paramécie (Khaled Bouhouche et al. 2011).

#### **I-IV-1 Les mécanismes de défenses contre les ETs chez les Pezizomycotina**

Chez les Pezizomycotina, les ETs sont la cible de plusieurs mécanismes de défenses, incluant le RIP (Repeat-induced point mutation, (Eric U. Selker 2002)), le MIP (methylation induced premeiotically, (Rhounim, Rossignol, et Faugeron 1992a)), le MSUD (Meiotic silencing by unpaired DNA, (Shiu *et al.* 2001)), le SIS (Sex-Induced Silencing, (X. Wang et al. 2010)), la co-suppression (Somatic quelling, (Romano et Macino 1992)) et certains processus de surveillance des ARN co-transcrits.

#### **Un exemple de système de surveillance des ARN co-transcrits chez *C. neoformans***

Les ETs sont souvent associés à une transcription anormale reconnue par des systèmes de surveillance des ARN co-transcrits et sont réprimés par l'assemblage local d'hétérochromatine ou par ARNi. Ces mécanismes interviennent en outre sur des copies uniques dans les cellules végétatives qui ne produisent naturellement pas d'ARNds. Un système de ce type a récemment été décrit chez la levure basidiomycète *C. neoformans*, dans laquelle le spliceosome est en perpétuelle compétition avec le complexe ARNi SCANR (Spliceosome-coupled and nuclear RNAi) (Dumesic *et al.* 2013). Les ARNm d'ETs constitués d'introns sous-optimaux induisent ainsi une déficience de l'épissage (sous la forme d'un retard d'épissage et d'une accumulation ARN pré-messagers) qui permet à l'ARN polymérase, ARN-dépendante du complexe SCANR, de générer les précurseurs de l'ARNsi.

## **L'inactivation des transgènes multicopies par le Quelling chez *N. crassa* dépend de la recombinaison homologue**

Le quelling est un système d'interférence à ARN (ARNi) décrit pour la première fois chez l'ascomycète modèle *N. crassa* (Romano et Macino 1992), mais plus connu sous le nom de co-suppression chez les plantes et les animaux. Le quelling aboutit à la production spécifique de petits ARN interférents (ARNsi) correspondant aux loci pourvus de séquences d'ADN répétées (*e.g.* transgènes insérés en tandem ou en multi-copies dispersées dans le génome). En plus de dépendre des complexes ARNi canoniques (*e.g.* ARN polymérase ARN-dépendante, Dicer et Argonaute), le quelling inclut des facteurs de réparation l'ADN et de recombinaison (*e.g.* RPA, QDE-3, Rad51) (Q. Yang, Ye, et Liu 2015). Le modèle proposé implique l'utilisation de séquences simples brins intermédiaires générées par la recombinaison homologue pour synthétiser des ARN aberrants précurseurs de l'ARNi.

Le SIS est un mécanisme analogue au quelling puisqu'il implique les mêmes mécanismes de répression (ARNi) et les mêmes cibles (répétitions en tandem). Cependant, contrairement au Quelling qui intervient pendant le stade végétatif, le SIS provoque une extinction post-transcriptionnelle bien plus importante et survient au stade préméiotique chez la levure *C. neoformans* (X. Wang et al. 2010). Par ailleurs, au cours de cet intervalle, les facteurs de l'ARNi sont transcriptionnellement surexprimés. Une fois initié, le SIS se propage en croissance végétative et est conservé pendant plusieurs générations sans impliquer de modifications d'histone. Ce mécanisme partage des propriétés communes avec le RIP des ascomycètes (voir plus bas) notamment quant à ses cibles et son moment d'action.

## **Le MSUD inactive l'expression des gènes contenus dans les segments chromosomiques non appariés au cours de la méiose**

Chez *N. crassa*, dans les cellules méiotiques, les gènes contenus dans des segments d'ADN non appariés voient l'expression de toutes leurs copies éteinte de manière réversible (Shiu *et al.* 2001). Ce système, décrit chez *N. crassa*, utilise la diploïdie d'après caryogamie afin de réprimer les ETs présents dans le génome d'un seul des deux parents haploïdes. Un fragment chromosomique non apparié de 1 à 2 kb suffit à enclencher le mécanisme dont l'effet est proportionnel à la longueur du segment en question (Hammond 2017). Ce système est complémentaire du RIP qui intervient sur les copies multiples de manière indépendante dans chaque génome parental de la cellule dicaryotique (voir plus bas) alors que le MSUD serait actif après la caryogamie pendant le bref stade diploïde.



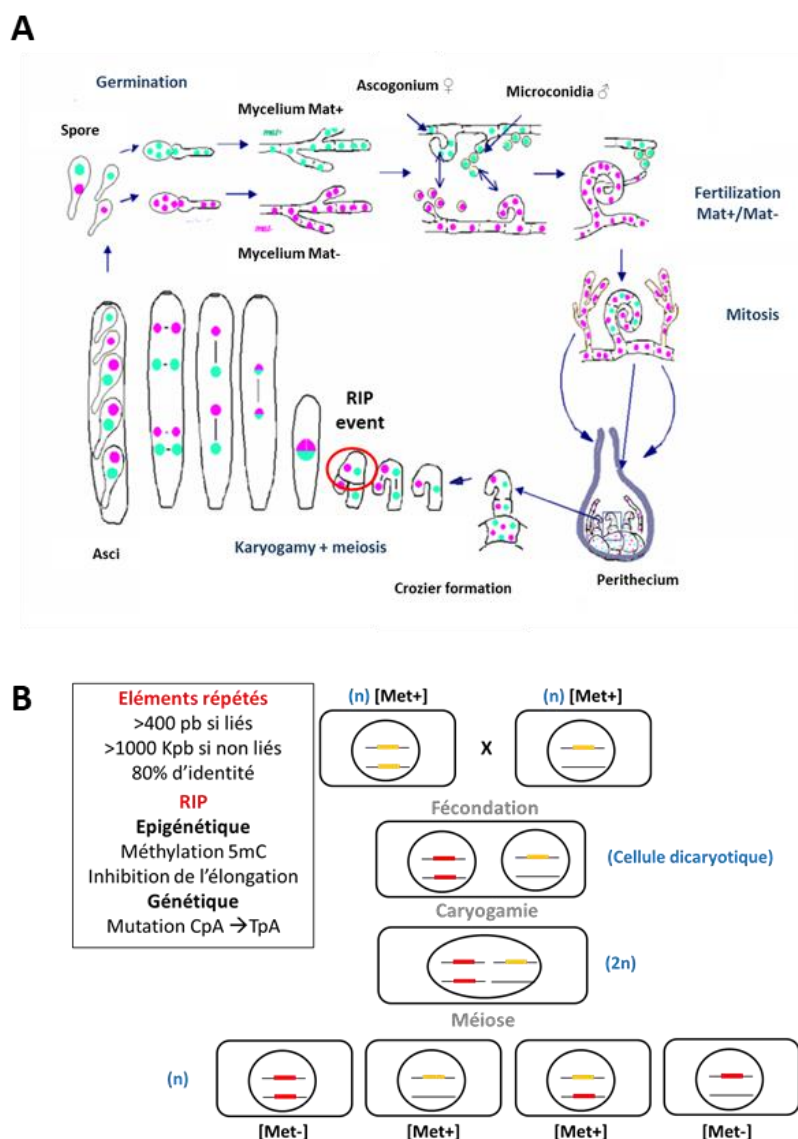
Par ailleurs, le MSUD peut interrompre la reproduction sexuée en provoquant l'extinction de gènes nécessaires à son bon déroulement. De ce fait, la fonction initiale du MSUD pourrait concerner la prévention des croisements interspécifiques. A la suite de son intervention, les gènes concernés sont déréprimés en phase végétative.

Un procédé analogue au MSUD existe chez les mammifères. Au cours de la méiose, dans la lignée germinale mâle, les chromosomes sexuels XY, dissemblables, sont progressivement condensés et associés aux marques épigénétiques de l'hétérochromatine. La répression méiotique n'est pas restreinte aux chromosomes sexuels mais requiert une taille de segment plus importante que chez les *N. crassa* (Turner *et al.* 2005). Si dans les deux cas (animal et champignon) la répression méiotique se produit au cours de la prophase I de méiose, phase au cours de laquelle les chromosomes homologues progressivement condensés interagissent entre eux, chez les mammifères l'inactivation est générée au niveau transcriptionnel via la modification post-traductionnel d'histone (H3K9me3), alors que chez le champignon l'extinction de l'expression génique est post-transcriptionnelle via un mécanisme de type ARNi. La méthode de reconnaissance des segments non appariés par le MSUD reste un mystère. Il semblerait cependant que sa capacité d'intervention et son efficacité soient proportionnelles à la distance qui sépare deux loci homologues localisés à des positions génétiques différentes (Samarajewwa *et al.* 2014). Cette contrainte spatiale supposerait qu'un appariement physique entre deux séquences soit nécessaire pour invalider l'action du MSUD.

### **Le RIP est un mécanisme préméiotique qui cible les séquences répétées présentes dans un génome fongique haploïde**

En 1985, Eric Selker et Judith Stevens rapportent un taux de mutation anormalement élevé des cytosines vers des thymines, associé à une méthylation importante des cytosines restantes sur un tandem naturel de gènes ribosomiques ARN 5S chez *N. crassa* (E. U. Selker et Stevens 1985). Ce processus a depuis été nommé « Repeat-Induced Point Mutation » (RIP) (Eric U. Selker 2002). Initialement, les propriétés clefs ont été décrites comme suit : le RIP intervient spécifiquement et indépendamment dans les noyaux haploïdes parentaux lorsqu'ils sont présents à l'état haploïde dans une cellule dicaryotique (fig. 17). Les séquences dupliquées d'une taille minimum de 400 pb sont reconnues indépendamment de leurs statuts transcriptionnels, de leur origine et de leurs positions dans le génome, bien que l'efficacité du RIP soit inversement proportionnelle à la distance génétique qui les sépare.

Les mutations surviennent sur les deux brins de chaque duplex ADN avec la même intensité, cependant elles touchent de préférences les cytosines suivies d'un résidu adénine (CpA en TpA). Ce biais mutationnel permet de repérer dans les génomes fongiques la présence de signatures de RIP dans les séquences répétées. L'activité du RIP peut se déborder occasionnellement sur les séquences voisines non répétées. La méthylation de l'ADN s'étend sur toute la longueur des répétitions cibles et peut survenir sur n'importe quelle cytosine (pas de contexte nucléotidique préférentiel de type CpG ou CpNpG à la manière des mammifères ou des plantes). Chez *N. crassa*, la méthylation de l'ADN bloque l'élongation de la transcription mais n'influence pas son initiation ou la stabilité des ARN messagers (Rountree et Selker 1997).



**Figure 17. Le RIP chez *N. crassa***

A. Stade d'intervention du RIP au cours du cycle de vie. (<http://podospora.i2bc.paris-saclay.fr/>)

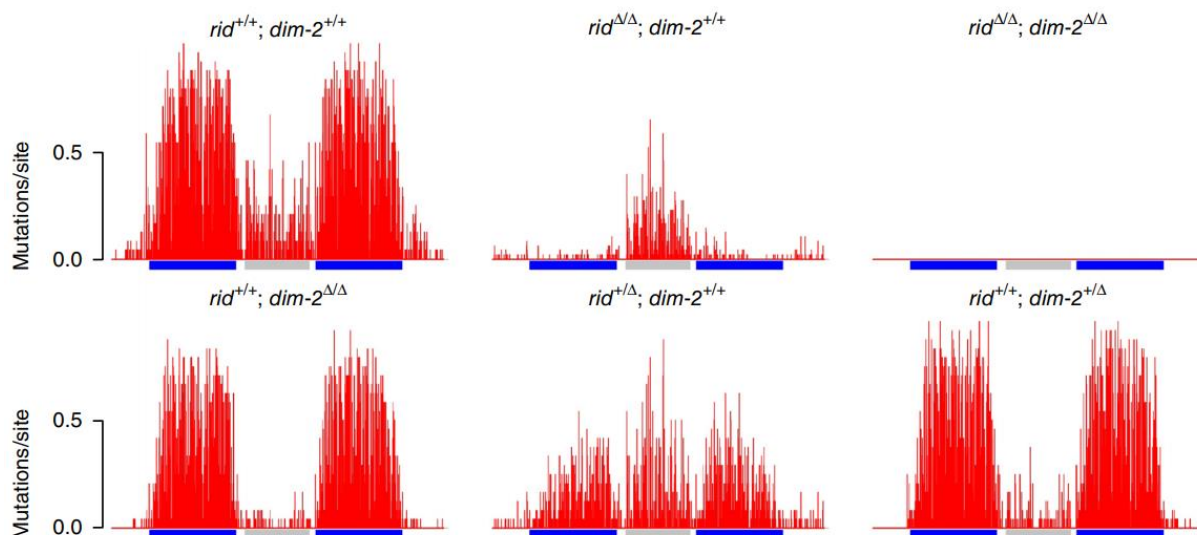
B. Le RIP conduit à l'inactivation des séquences répétées dans les noyaux haploïdes de la cellule dicaryotique. Son action est noyau dépendant.

Peu de temps après, un système analogue au RIP a été découvert chez l'ascomycète *Ascobolus immersus* (Goyon et Faugeron 1989). Contrairement au RIP, le MIP (Methylation Induced Premeiotically) promeut l'inactivation réversible des séquences répétées uniquement via la méthylation des cytosines, sans l'altération permanente de la séquence d'ADN par des mutations (Rhounim, Rossignol, et Faugeron 1992a; Rossignol et Faugeron 1994). Il s'est avéré que le MIP et le RIP sont deux manifestations résultant d'un même mécanisme puisqu'ils partagent les mêmes caractéristiques (*e.g.* stade d'intervention, séquences cibles, taille d'homologie requise pour la détection, etc.) (Goyon *et al.* 1996).

#### **I-IV-2 Le mécanisme moléculaire du RIP**

##### **L'ADN méthyltransférase RID est essentiel au RIP**

La méthylation de l'ADN chez les ascomycètes est assurée par deux cytosines méthyltransférases. DIM2 est l'ADN méthyltransférase de maintenance. C'est elle qui assure à chaque cycle de réplication, le maintien des profils de méthylation des cytosines des séquences associées à l'hétérochromatine constitutive mise en place par KMT1 (Lewis *et al.* 2010b). La seconde est une ADN méthyltransférase putative *de novo* qui intervient en amont du système NcKMT1-NcDIM2 sur les séquences d'ADN répétées. Initialement identifié chez *A. immersus* par Fabienne Malagnac *et al.*, MASC1 est un facteur essentiel du MIP (Fabienne Malagnac *et al.* 1997). Il a été montré par la suite que l'homologue de *N. crassa*, RID (RIP defective), joue un rôle critique dans le RIP, puisque cette protéine est à la fois essentielle à la méthylation *de novo* et à l'introduction des mutations (Freitag *et al.* 2002a). RID présente toutefois une activité noyau-dépendant. En effet, au cours d'un croisement hétérozygote mutant pour l'allèle *RID*, seul le génome haploïde mutant échappera au RIP bien que les deux noyaux parentaux partagent la même cellule (dicaryon). L'utilisation récente de systèmes de séquençages à haut débit ont permis cependant d'identifier une activité résiduelle de RIP en l'absence de RID, suggérant que la protéine n'est pas le seul médiateur de ce système (Fig. 18) (Gladyshev et Kleckner 2017). Ces résultats ont montré que ce « RIP partiel » est dépendant de la voie KMT1-DIM2 et intervient préférentiellement sur l'ADN voisin des séquences homologues et notamment dans la région intermédiaire d'un tandem. cible.



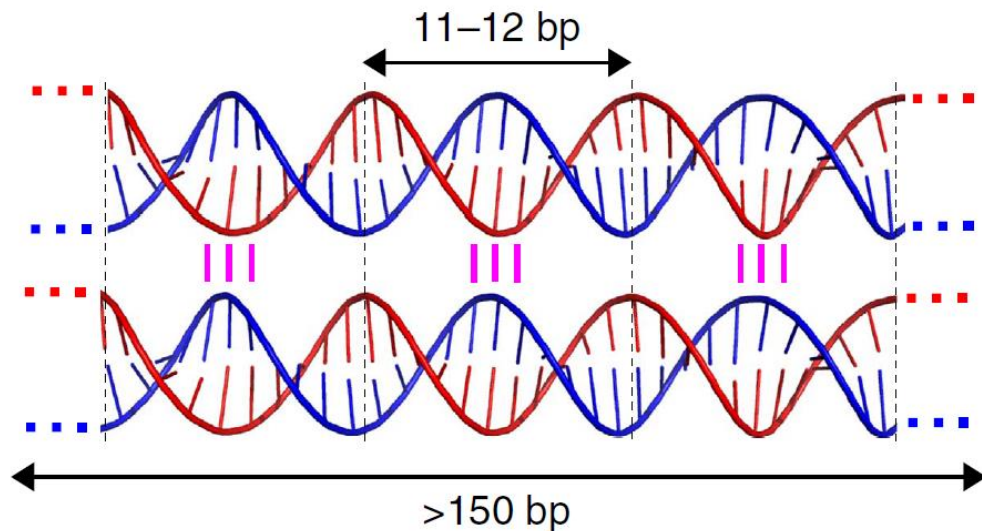
**Figure 18. Efficacité mutationnelle du RIP dans les mutant *NcDim-2* et *NcRid* chez *N. crassa*** (Gladyshev et Kleckner 2017)

Les graphiques illustrent le nombre de mutation par site survenant sur des séquences répétées (rectangle bleu, 802 pb chacune) et sur la séquence intermédiaire (600 pb) à la suite de croisements impliquant les génotypes référencés.

Bien que le système présente une analogie avec le SIS de *C. neoformans*, le RIP, contrairement à ce dernier, n'est pas dépendant de la voie de l'ARNi chez *N. crassa* (Chicas *et al.* 2005).

### **Le modèle de reconnaissance par alignement de séquences homologues de deux doubles hélices d'ADN**

Les études de reconnaissance d'homologie partielle de séquences répétées ont montré que le cycle du RIP est mis en place tant que les segments partagent un taux d'homologie substantiel soit environ 80% d'identité (Cambareri, Singer, et Selker 1991). Cette caractéristique prend sens dans un contexte d'alignement d'ADN simple brin comme c'est le cas pour certains mécanismes de recombinaison. Cependant, une étude récente a montré qu'une homologie continue n'est pas un élément essentiel de la reconnaissance (Gladyshev et Kleckner 2014). En l'occurrence, une répétition de 3 à 4 acides nucléiques espacés de 11 à 12 pb sur plus ou moins 200 pb suffit pour enclencher le mécanisme de mutation. L'espacement déterminé correspondant à un tour de double hélice, l'auteur a proposé un modèle où la reconnaissance initiale des séquences répétées est dirigée par l'appariement direct de deux hélices d'ADN via l'homologie d'au moins trois résidus semblables à chaque tour d'hélice (fig.19).



**Figure 19. Représentation de l'association de deux doubles hélices d'ADN** (Gladyshev et Kleckner 2014)

Deux hélices d'ADN de 150 pb de long peuvent engager une association stable séquence spécifique par l'interaction entre des triplets de nucléotides une fois par tour et sur plusieurs tours.

### **Les signatures du RIP sont conservées chez les Pezizomycotina**

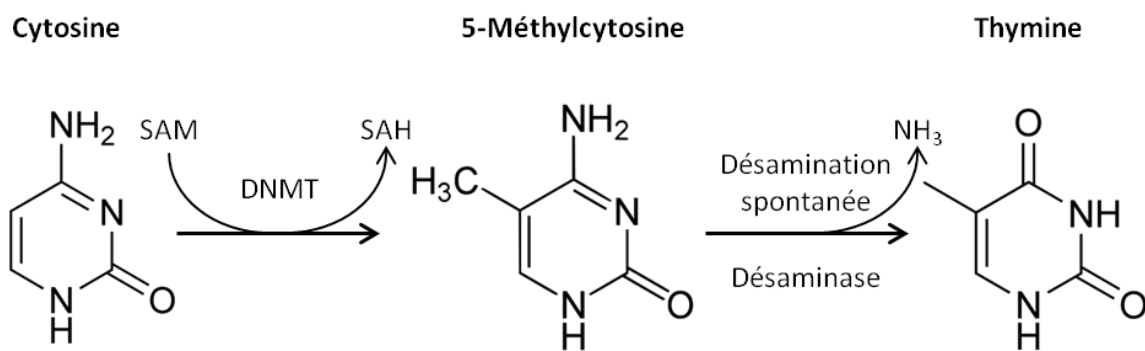
Le RIP a été démontré expérimentalement chez les Pezizomycotina *Podospora anserina* (Graña et al. 2001a), *Magnaporthe grisea* (Ikeda et al. 2002), *Leptosphaeria maculans* (Idnurm et Howlett 2003), *Nectria haematococca* (Coleman et al. 2009) et plus récemment chez *Trichoderma reesei* (W.-C. Li et al. 2017). A l'inverse, aucune preuve de RIP n'a été trouvée chez *Sordaria macrospora* (Le Chevanton, Leblon, et Lebilcot 1989) et chez *Aspergillus nidulans* (D. W. Lee et al. 2008b). Cependant, l'analyse des séquences des ETs suppose l'existence d'une activité ancestrale du RIP chez *A. nidulans*, bien que celle-ci soit aujourd'hui débattue. La présence sur les séquences des ETs d'une signature mutationnelle (*e.g.* CpA vers TpA, CpG vers TpG, CpT vers TpT) typique du RIP a été découverte chez un grand nombre d'espèces du sous-embranchement des Pezizomycotina (John Clutterbuck 2011). Cependant, aucune signature du RIP, *sensu stricto*, n'a été trouvée ni chez les levures ascomycètes, chez lesquelles RID et DIM2 sont par ailleurs absents, ni chez les basidiomycètes, même si, chez ces derniers, des traces de mutations dans des séquences répétées de *Microbotryum violaceum* pourraient être attribuées à un RIP ancestral (Johnson et al. 2010).

Le MIP a également été détecté chez le basidiomycète *Coprinus cinereus* (Eric U. Selker 2002).

L'absence de système RIP est vraisemblablement reliée à certaines caractéristiques génomiques de l'espèce en question. Chez *Tuber melanosporum* par exemple, l'absence de RIP pourrait avoir un impact sur la taille de son génome (125 Mb contre 30 Mb en moyenne) et sa densité d'ETs (> 50% du génome). Ces observations pourraient témoigner du rôle clef du RIP dans la lutte contre la propagation des ETs dans les génomes fongiques. Par ailleurs, le RIP intervient aussi sur la duplication de segments génomiques endogènes, ce qui peut être à la fois un avantage et un inconvénient. En effet, une divergence rapide supprime les effets délétères de recombinaison entre les séquences concernées prévenant le réarrangement chromosomique par recombinaison ectopique. Cependant, les mutations tendent également à créer des pseudo-gènes. Ce fardeau évolutif serait le prix à payer pour le gain de fitness qu'apporte ce système de défense du génome. A l'inverse, lorsque l'activité mutagène du RIP est modérée, elle permet l'émergence rapide de collections d'allèles qui évoluent beaucoup plus vite que s'ils étaient soumis à la seule horloge moléculaire. Ce mécanisme pourrait alors expliquer la grande plasticité génomique des Pezizomycotina (Idnurm et Howlett 2003).

Si chez *N. crassa*, les mutations sont générées de préférences sur les CpA (en TpA) et moins sur les CpT (en TpT), les cibles privilégiées des aspergilli sont les cytosines incluses dans les motifs CpG et CpA, alors qu'il s'agit des cytosines incluses dans les triplets A/TpCpA/T chez *M. grisea* (Ikeda *et al.* 2002; Clutterbuck 2004). D'une manière générale, lorsque des signatures de RIP sont détectées dans des génomes de Pezizomycotina, les cytosines des séquences cibles ne sont pas méthylées contrairement à celles de *Neurospora*. C'est le cas pour le champignon modèle *P. anserina*, où aucune 5-méthylcytosine n'est détectée en phase végétative y compris dans les séquences mutées par le RIP (Khaled Bouhouche *et al.* 2004). Quant au mode d'action du RIP, deux modèles se dégagent. Il fut initialement proposé que les modifications des cytosines durant le RIP se déroulent en deux étapes (fig. 20). En premier lieu, les cytosines seraient méthylées en position C5 (5-mC) par l'ADN-méthyltransférase RID, cette modification initiale serait alors suivie par la N4-désamination des 5-mC par un mécanisme encore non élucidé. Selon cette hypothèse, on aurait donc chez *P. anserina* une présence transitoire de cytosines méthylées au cours de la reproduction sexuée, méthylation qui serait soit perdue au cours des divisions, soit utilisée pour induire les mutations du RIP. Cependant, aucune étude n'est parvenue jusqu'ici à montrer une éventuelle activité ADN-méthyltransférase des DNMT-like RID *in vitro*.

De fait, si des espèces de champignons filamenteux montrant des mutations de type RIP ne présentent pas de 5mC dans leurs génomes, l'activité de la protéine pourrait être tout autre, ou dépendre de cofacteurs essentiels spécifiques perdus au cours de la diversification des espèces de Pezizomycotina et/ou avoir pour cible un autre type de molécules que l'ADN (*e.g.* protéine et ARN). Une alternative propose en l'occurrence que RID lui-même promeuve les mutations des cytosines vers les thymines via la modulation de son activité catalytique. Cette hypothèse est appuyée par des études impliquant une cytosine méthyltransférase canonique dans la désamination des cytosines en l'absence de groupement méthyle donneur S-adenosylméthionine (Yebra et Bhagwat 1995).



**Figure 20. La genèse du RIP en deux étapes**

Dans ce modèle, les DNMT RID et DIM-2 catalysent la méthylation des cytosines via l'utilisation de S-adenosylméthionine (SAM) en tant que donneur de groupement méthyle. Dans un deuxième temps, la désamination spontanée ou enzymatique par une 5mC désaminase les convertit en thymine.

### **Masc1 est essentielle pour l'établissement du cycle sexué chez *A. immersus***

*A. immersus* possède un cycle sexué typique des pézizomycètes, composé d'une série ordonnée d'étapes de différenciation qui conduisent séquentiellement à la formation des organes sexuels à partir du mycélium végétatif, la fertilisation et la formation de la fructification (apothécie) dans lesquels l s'effectue la compartimentation de la cellule dicaryotique puis la caryogamie suivie de la méiose pour finalement aboutir à la formation des ascospores. Dans un croisement homozygote *Amasc1*, si la fécondation a bien lieu et conduit à la formation de cellules polynucléées contenant les noyaux haploïdes des deux souches parentales, la compartimentation en cellules dicaryotiques n'est pratiquement pas observée et par conséquent ces croisements ne produisent pas d'ascospores (Fabienne Malagnac et al. 1997).

Un résultat similaire a été obtenu chez *Aspergillus nidulans*, qui malgré un RIP absent ou peu efficace et aucune méthylation détectable des cytosines, possède une protéine homologue à MASC1/RID, la protéine DmtA qui serait responsable des traces de mutations ancestrales identifiées dans ses séquences répétées. De manière surprenante, la délétion du gène *DmtA* conduit également à une stérilité (D. W. Lee et al. 2008b). A l'inverse, l'inactivation du gène codant la protéine RID chez *Neurospora* ne conduit pas à un défaut de fertilité. RID semble donc posséder une fonction additionnelle au RIP qui interviendrait au même moment que le système de défense et serait nécessaire au bon déroulement de l'étape préméiotique de la reproduction.

### **I-V Introduction du sujet d'étude : le rôle de l'hétérochromatine au cours du développement sexué de l'ascomycète modèle *Podospora anserina***

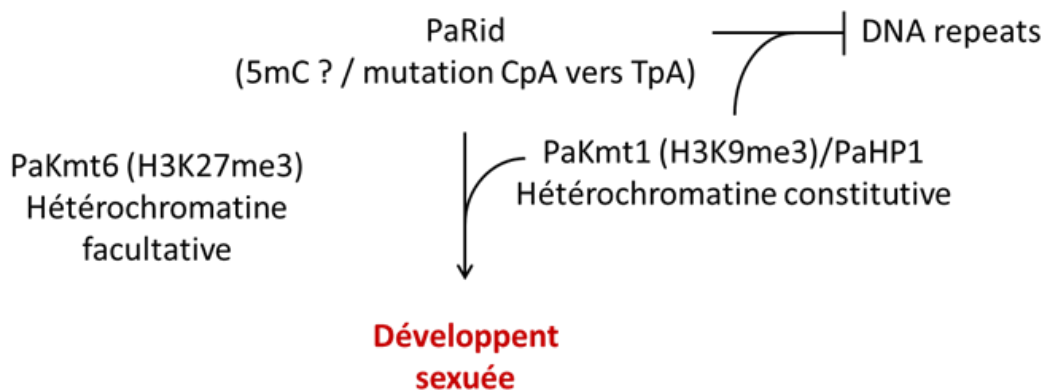
Pour se défendre contre les effets délétères des ETs, les ascomycètes ont développé un système de défense génétique et épigénétique appelé le RIP (E. U. Selker et Stevens 1987). Chez le champignon modèle *N. crassa*, le RIP conduit, par un procédé encore méconnu, à identifier les séquences répétées dans un génome haploïde, à méthyler *de novo* une partie des cytosines qu'elles contiennent et à en muter d'autres (C::G vers T::A). L'acteur majeur du RIP est une cytosine méthyltransférase putative, RID (« RIP déficient ») découverte initialement chez *A. immersus* (Fabienne Malagnac et al. 1997). Ce dernier possède une forme de RIP plus ancestrale ou MIP (Méthylation Induite Préméiotiquement) qui aboutit uniquement à la méthylation des cytosines sans altérer la séquence d'ADN (Rhounim, Rossignol, et Faugeron 1992a). La perte de l'homologue de RID chez cette espèce abolit le MIP mais conduit également à une stérilité, ce qui n'est pas le cas de *N. crassa*. Afin de préciser la fonction de RID dans le développement sexué, Timpano *et al.* ont inactivé l'homologue de RID chez *P. anserina*. Ce champignon, proche phylogénétiquement de *N. crassa*, présente un autre cas de figure puisque malgré l'absence d'une quantité significative de 5mC dans son génome, les mutations installées par le RIP subsistent. Conformément à *A. immersus*, la perte de PaRID conduit à une stérilité femelle induite par l'absence de formation de cellules dicaryotiques. De manière intéressante, malgré l'absence de 5mC dans le génome en phase végétative, la stérilité des mutants  $\Delta PaRid$  ne peut pas être complétée par un allèle portant une mutation ponctuelle au niveau du site catalytique. Ce résultat suggère que l'activité cytosine méthyltransférase de PaRID est nécessaire pour établir le stade dicaryotique. Ces résultats ont permis de formuler deux hypothèses concernant le rôle de RID dans le développement sexué. La première propose que



(i) RID régit la distinction des noyaux parentaux entre eux (*mat+* et *mat-*) via la mise en place d'une empreinte épigénétique au moment de la formation des gamètes.

Cette théorie pourrait en effet expliquer l'absence de 5mC en phase végétative, qui ne serait que transitoire au cours de la reproduction sexuée et ne concernerait qu'une petite partie du génome. La seconde hypothèse serait liée à la fonction de RID par rapport au RIP, (ii) ce dernier pouvant servir de point de contrôle obligatoire de la qualité du génome avant de former des cellules dicaryotiques.

Chez *N. crassa*, il a été montré que l'action de RID provoque la formation d'hétérochromatine sur les loci cibles. Il existe deux types d'hétérochromatine générique chez les eucaryotes. L'hétérochromatine constitutive chez les ascomycètes est initiée par la marque épigénétique H3K9me3 synthétisée par l'histone méthyltransférase KMT1, puis mise en place par HP1. Sa fonction canonique est d'inactiver les Ets (qui sont la cible du RIP) et de marquer les télomères et centromères, également constitués de répétitions. A l'opposé, l'hétérochromatine facultative est mise en place par le complexe protéique PRC2 qui catalyse la modification H3K27me3. L'hétérochromatine facultative permettrait de réguler l'expression de gènes spécifiques tels que les gènes développementaux et les clusters de métabolites secondaires.



### Figure 21. Hypothèses de travail

Le schéma représente la fonction de l'hétérochromatine par homologie avec le système *N. crassa*.

Dans cette étude nous nous sommes proposés d'explorer le rôle de l'hétérochromatine constitutive et facultative au cours du cycle de vie de *P. anserina*. Nous nous sommes en particulier demandé si PaRID avait pour rôle de cibler des séquences où assembler de l'hétérochromatine constitutive afin de réguler l'expression de gènes impliqués dans le développement sexué.

Cette étude a aussi été l'occasion d'introduire la technologie ChiP-Seq chez ce champignon afin de constituer les paysages épigénomiques et d'analyser la distribution des marques H3K4me2, H3K9me3 et H3K27me3 dans la souche sauvage de référence ainsi que dans les mutants hétérochromatiniens que nous avons générés.

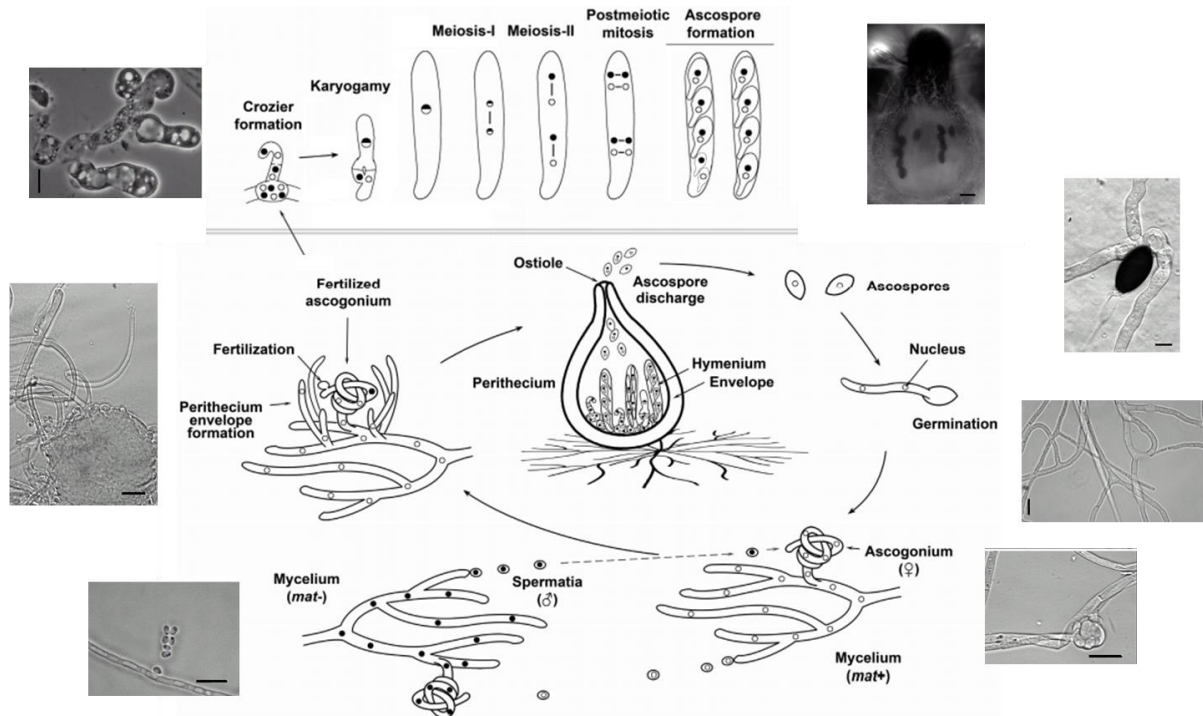


Figure 22. Cycle de vie de *P. anserina*

## II Matériels et méthodes supplémentaires

### *Podospora anserina*

*Podospora anserina* est un champignon filamenteux ascomycète de la classe des Sordariomycètes, phylogénétiquement proche de l'espèce modèle *Neurospora crassa* et du phytopathogène *Fusarium graminearum*. Dans la nature, on trouve cette espèce sur les excréments d'herbivores où elle accomplit son cycle de vie complet. L'espèce fut introduite en laboratoire par Georges Rizet dans les années 50 qui mit en évidence les phénomènes génétiques d'incompatibilité du mycélium et de dégénérescence des ascospores (aussi appelé le « Spore Killer »). Il observera plus tard la sénescence du champignon pourvu d'une longévité définie, caractérisée par une croissance limitée très reproductible. Ces études ont été poursuivies par Léon Belcour et plus récemment par Annie Sainsard-Channet qui ont montré que ce processus physiologique est provoqué par l'instabilité de l'ADN mitochondriale. Actuellement, des études visent à utiliser les enzymes de *P. anserina* pour la dépollution des sols et le recyclage de la biomasse ainsi qu'à caractériser différents processus épigénétiques, tels que le prion HET-s qui contrôle l'incompatibilité végétative (Saupe 2011) ou la dégénérescence cellulaire Crippled Growth (Nguyen, Lalucque, et Silar 2018).

Son génome a été séquencé en 2008 (Espagne et al. 2008a). Il est constitué de 35 Mb et comporte environ 10500 gènes répartis sur sept chromosomes. Depuis, plusieurs séquençages d'ARNm ont été réalisés sur des cinétiques de croissance et de développement. Contrairement à *N. crassa* et *F. graminearum*, *P. anserina* semble dépourvu de méthylation de l'ADN à moins que celle-ci ne soit présente en quantité infime dans le génome et/ou de manière fugace à des stades développementaux non identifiés à ce jour. Cette propriété est commune à beaucoup de champignons filamenteux et ne semble pas dépendante de l'absence dans leur génome de gènes codant des ADN-méthyltransférases (fig. 12).

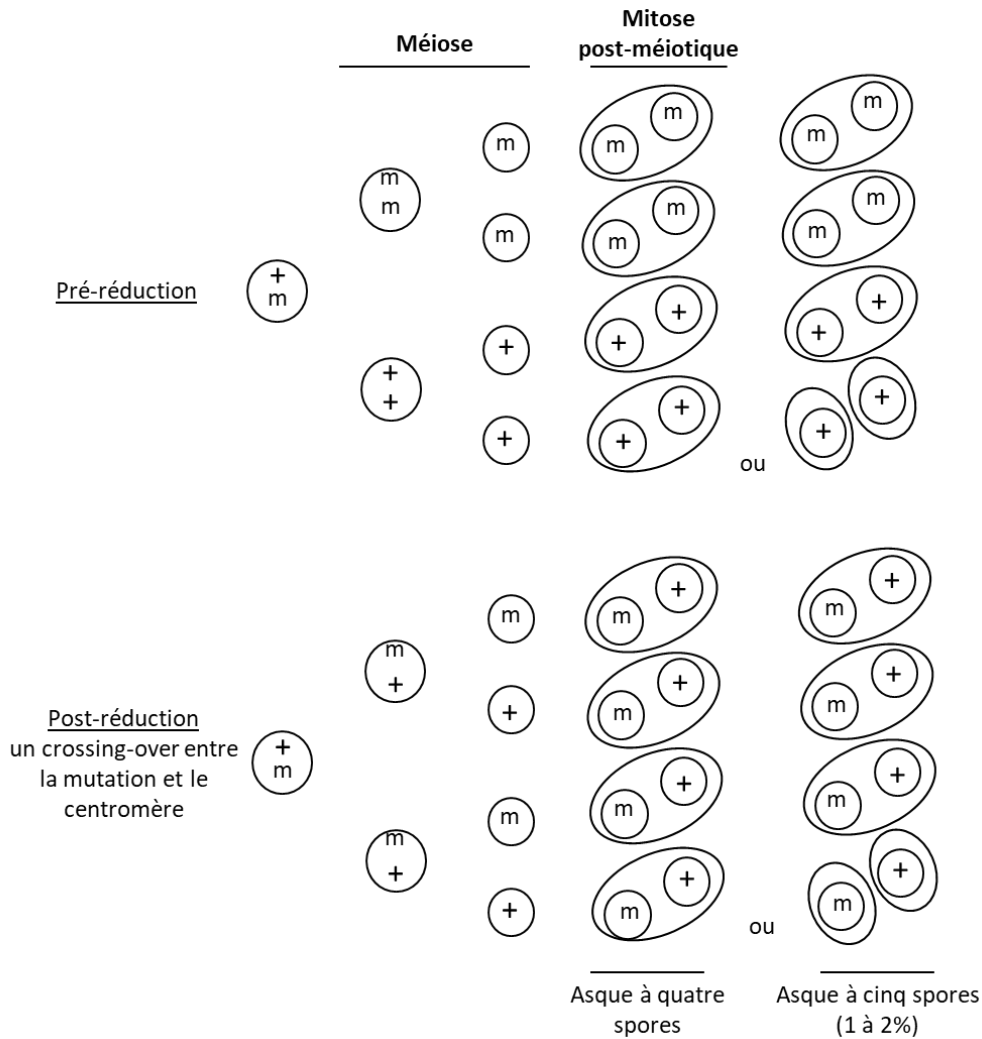
*P. anserina* possède un cycle de vie typique des Ascomycètes, qui commence avec la germination d'une ascospore unicellulaire sous forme d'un tube mycélien. (fig. 22) Cette étape est réalisée en laboratoire sur un milieu synthétique en présence d'acétate d'ammonium (milieu G). Sa croissance végétative est réalisée sur milieu minimum pourvu de dextrine comme source de carbone (milieu M2). *P. anserina* est un champignon hermaphrodite et hétérothallique, c'est-à-dire qu'il produit à la fois des gamètes mâles (spermaties) et des gamètes femelles (ascogones) mais que la fécondation ne peut se faire qu'entre deux souches de types sexuels différents (*mat+* et *mat-*).

La reconnaissance intercellulaire entre un ascogone et une spermatie dépend d'un système phéromone/récepteur qui ne permet la fécondation qu'entre deux souches parentales de type sexuels différents et donc compatibles. La fécondation conduit à la formation de la fructification du champignon (périthèce). Le périthèce est issu d'un tissu maternel qui en constitue l'enveloppe et d'un tissu germinal. Ce dernier dérive d'une cellule syncytiale à partir de laquelle deux noyaux haploïdes de type sexuels différents migrent conjointement dans une cellule appelée dicaryon. La fusion des noyaux, ou caryogamie, est suivie d'une méiose, puis d'une mitose, qui donne naissance à quatre ascospores hétérocaryotiques, englobant deux noyaux non frères.

Parfois, il se forme des asques à cinq spores, dont deux ayant un seul noyau : ce sont des ascospores homocaryotiques et elles permettent de réaliser les croisements dirigés utilisés pour les études génétiques (fig. 23). Les asques sont projetés du périthèce par l'ostiole quatre jours après la fécondation. Le développement sexué de *P. anserina* est maîtrisé au laboratoire, il a lieu sur milieu M2, à 27°C et 70% d'hygrométrie, en présence d'une source lumineuse. Un cycle s'accomplit en sept jours (Georges Rizet et Engelmann 1949; Philippe Silar 2013).

### **Le croisement en tricaryon avec la souche *Amat***

Chez *P. anserina*, l'enveloppe du périthèce et les organes extérieurs sont issus des hyphes maternels, alors que l'hyménium à partir duquel sont formés les ascospores est issu du tissu zygotique résultant de la fécondation. Dans un tricaryon, le noyau *Amat* apporte les éléments maternels nécessaires pour la formation des périthèces mais ne peut faire partie du tissu zygotique puisque cette souche est dépourvue de phéromone et de récepteur, le locus du type sexuel étant absent. Si l'ajout du noyau *Amat* A<sup>+</sup> complète le phénotype de reproduction sexué d'un croisement homozygote mutant a<sup>-</sup>, cela signifie que l'origine du phénotype mutant provient d'un défaut du tissu maternel, dans le cas contraire, le défaut est d'ordre zygotique.



**Figure 23. La ségrégation d'un couple d'allèles m/+ au cours de la formation des ascospores suit un schéma de post-réduction ou de pré-réduction**

La ségrégation d'un locus spécifique chez *P. anserina* dépend des processus de recombinaison en première division de méiose. Dans le cas de la pré-réduction, il y a absence de crossing-over entre le centromère et le locus, les allèles sont donc directement séparés en première division de méiose. Les ascospores qui en résultent comportent des noyaux génétiquement identiques. En présence de recombinaison méiotique, la ségrégation du locus suit un schéma de post-réduction aboutissant à la formation d'ascospores dicaryotiques pour l'allèle en question. Le locus sexuel est présent sur le chromosome 1 et suit toujours une ségrégation de type post-réduction. C'est pour cela qu'un asque à cinq ascospores comporte une ascospore homocaryotique mat<sup>-</sup>, une ascospore homocaryotique mat<sup>+</sup> et trois ascospores hétérocaryotiques mat<sup>-</sup>/mat<sup>+</sup> qui génèrent des mycéliums auto-fertiles.



### III Résultats et discussions

#### II-I Première étude

##### Avant-propos

L'étude présentée ci-après brosse les premières recherches réalisées par le laboratoire sur les mécanismes épigénétiques de la chromatine chez *P. anserina*. Ce travail montre entre autres que PaRid est essentiel au développement sexué, et que l'allèle muté au site catalytique ne complémente pas le phénotype mutant. Ma contribution au sein de ce projet s'est portée sur le clonage de l'allèle *Masc1* (l'homologue de RID chez *A. immersus*) disposant de la même mutation dans une souche *Masc1* mutante afin de vérifier si l'allèle pourrait compléter le défaut de reproduction sexuée chez *A. immersus*. Faut de temps, je n'ai pas eu l'opportunité de reproduire des conditions expérimentales optimales pour générer des croisements suffisamment fertiles afin de pouvoir tester le phénotype. L'article sera soumis à publication au mois de novembre 2018.



**A RID-like Cytosine Methyltransferase Homologue Is Essential for Sexual Development  
in *Podospora anserina***

**Timpano H., Grognet P., Carlier F., Aït-Benkhalil J., Berteaux-Lecellier V., Debuchy R.,  
Bidard F. and Malagnac F.**

**Key words: Cytosine Methyltransferase, sexual development, *Podospora anserina***

**Correspondence to:**

**Pr. Fabienne Malagnac**

**France**

**tel: + 33 1 69 15 46 56**

**email: [fabienne.malagnac@u-psud.fr](mailto:fabienne.malagnac@u-psud.fr)**

## Abstract

In filamentous fungi, the Repeat Induced Point mutation (RIP) system, which is active during sexual reproduction, introduces G/C to A/T mutations within the repeats thus creating AT-rich regions. Originally described in *Neurospora crassa*, the presence of active RIP has then been evidenced in various other filamentous fungi, including *P. anserina*. To date the RID protein (RIP deficient), encoding a DNA methyltransferase-like protein, is the only one that has been demonstrated to be essential for RIP. But while RIP is conserved among filamentous fungi, DNA methylation does not seem so. Indeed, no significant levels of methylcytosines have been detected so far in the genomes of *P. anserina* and the chromatin status of their RIPped loci is still unknown.

To gain insight into the PaRID function, we constructed knocked-out  $\Delta PaRid$  defective mutants. Remarkably, in contrast to *N. crassa* RID defective mutants, crosses involving *P. anserina*  $\Delta PaRid$  mutants are sterile. We have shown that, although gametes are readily formed and fertilization occurs in a  $\Delta PaRid$  mutant background, sexual development is blocked just before the individualization of dikaryotic cells. Conversely, knockout of the *PaDim2* gene, encoding a second putative DNA methyltransferase related to *N. crassa* *DIM-2*, had no effect on *Posdospora* complete life cycle. Complementation of the  $\Delta PaRid$  mutants with ectopic alleles of *PaRid*, including GFP-tagged, point-mutated, inter-specific and chimeric alleles, demonstrated that the catalytic motif of the putative PaRid methyltransferase is essential to ensure proper sexual development and that the expression of PaRid is spatially and temporally tightly regulated. A microarray transcriptomic analysis of the  $\Delta PaRid$  mutant highlighted the genetic network differentially regulated in the absence of this putative DNA methyltransferase. Altogether, this study sheds a new light on sexual development regulation in a heterothallic model ascomycete.

## Introduction

A covalently modified DNA base, the 5-methylcytosine (5-meC) is common in genomes of organisms as diverse as bacteria, fungi, plants and animals. In eukaryotes, when present, this epigenetic modification is associated with regulation of gene expression and suppression of transposon activity. Patterns of cytosine methylation are installed and maintained through subsequent DNA replication cycles by the cytosine DNA methyltransferases (DMTs), a class of enzymes showing sequence conservation from bacteria to mammals. Based on *in vivo* enzymatic properties, four families of eukaryotic DMTs can be distinguished (Goll et Bestor 2005; Law et Jacobsen 2010) 1) the “maintenance” DMT family which includes the mammalian DNMT1 (Bestor 1988), the plant MET1 (Finnegan et Dennis 1993) and the fungal DIM-2 enzymes (Kouzminova et Selker 2001); 2) the “*de novo*” DMT family which includes the mammalian DNMT3A and DNMT3B (Okano, Xie, et Li 1998) and the plant Domains Rearranged Methyltransferase DRM2 (Cao et al. 2000); 3) the flowering plant-specific “maintenance” chromomethylase (CMT) family, which includes the *Arabidopsis thaliana* CMT2 and CMT3 enzymes (Henikoff et Comai 1998; A M Lindroth et al. 2001; Bartee, Malagnac, et Bender 2001); 4) the fungal-specific DMT-like family which includes the *Ascobolus immersus* Masc1 (F Malagnac et al. 1997) and the *Neurospora* RID proteins (Freitag et al. 2002b). DMTs from the first three families have been shown to methylate cytosines *in vitro*, while no such activity has ever be demonstrated for the fungal DMT-like protein (F Malagnac et al. 1997; Freitag et al. 2002b). A fifth family, typified by Dnmt2 which is now known as a tRNA methyltransferase, was therefore discarded from the *bona fide* DMT group (Goll et al. 2006). Surprisingly, genes encoding putative DMTs can also be found in genome of species showing, very few, if any, 5-meC (e.g. *Dictyostelium discoideum* (Kato et al. 2006), *Drosophila melanogaster* (Selker and Stevens 1987; Freitag et al. 2002; Hane et al. 2015), *Aspergillus nidulans* (D. W. Lee et al. 2008a). These DMT-like sequences might be pseudogenes or might be endowed with a still undetermined function. By contrast, most of the ascomycetous yeasts, including the model organisms *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* completely lack cytosine methylation as well as genes encoding putative DMT-like enzymes.

In mammals and higher plants, cytosine DNA methylation is mostly associated with stable and inheritable repression of gene transcription. As such, it plays an essential role in genome stability and developmental programs such as imprinting and X chromosome inactivation (Panning et Jaenisch 1996).

In mice, loss of function of DNMT1 results in embryonic lethality (E. Li, Bestor, et Jaenisch 1992) whereas flowering plants that present mutation in MET1, display a palette of viable developmental abnormalities (Ronemus et al. 1996; Finnegan, Peacock, et Dennis 1996). In fungi however, alteration of 5-meC content results in more contrasted outcomes. In the model ascomycete *Neurospora crassa* inactivation of the *dim-2* gene, which encodes an enzyme from the “maintenance” DMT family results in complete loss of DNA methylation. Remarkably, the *dim-2* mutants behave as wild type strains with respect to their vegetative life cycle and their sexual reproduction cycle (Kouzminova et Selker 2001). This indicates that even if *N. crassa* displays substantial cytosine methylation in some genomic compartments, this epigenetic modification is dispensable for all developmental processes observed in laboratory conditions. RID, the second putative DMT of *N. crassa* belongs to the fungal-specific DMT-like family. The RID (RIP Deficient) protein plays an essential role in RIP (Repeat-Induced point mutation), a genome defense mechanism conserved among pezizomycotina fungi (E U Selker et Stevens 1987; Freitag et al. 2002b; Hane et al. 2015). As defined in *N. crassa* by Selker and colleagues, RIP occurs in the haploid parental nuclei when those are grouped together after fertilization in the dikaryotic cells, a fugace step prior to karyogamy. Repetitive DNA sequences originally described as longer than 400 bp, are detected during the RIP process and are subsequently subjected to extensive conversion of cytosine to thymidine (C to T). Over the extent of the RIP targeted repeats, the remaining cytosines are heavily methylated. Extensive bioinformatic analysis of the sequenced genomes of Pezizomycotina revealed widespread signatures of specific RIP-like (C to T) mutation (Clutterbuck 2011; Testa, Oliver, et Hane 2016) and along with conservation of RID orthologs. Because the vast majority of filamentous fungi are endowed with RIP or RIP-like mechanisms, this genome defense system has a major impact on fungal genome stability and plasticity. Yet, although conserved, the RIP-like processes are somehow polymorph. Indeed, 5-meC is often absent from RIP targets as in *Podospora anserina* (K Bouhouche et al. 2004) whereas the analogous MIP (Methylation Induced Premeiotically) process discovered in *Ascobolus immersus* leads to cytosine methylation only (Rhounim, Rossignol, et Faugeron 1992b).

Interestingly, if the absence of RID abolishes the RIP in *N. crassa*, it does not result in any additional defect since these mutants display wild-type vegetative growth and sexual cycle. By contrast, disruption of *Masc1* from *A. immersus*, which encodes a member of the fungal-specific DMT-like family, result in abolition of the MIP *de novo* methylation of repeats but also in severely impaired sexual development (F Malagnac et al. 1997).

Indeed when *Masc1* is absent in both parental strains, the resulting crosses are arrested at an early stage of sexual reproduction since no dikaryotic cells are formed. Similar defects on sexual development had been observed when knockout mutants from the RID fungal-specific DMT-like family were constructed in *Aspergillus nidulans* (D. W. Lee et al. 2008a), *Aspergillus flavus* (K. Yang et al. 2016) and *Trichoderma reesei* (W.-C. Li, Chen, et Wang 2018a) (Wan-Chen Li and Ting-Fang Wang, personal communication). This suggests that unlike RID of *N. crassa*, some of the members of the fungal-specific DMT-like family could be involved in both genome-defense and developmental regulatory functions (Gladyshev 2017). This is the case of *Masc1*, which appears as the founding prototype of this family of putative DMTs. It is likely that during the course of evolution, some members of this family have lost the developmental function to retain the RIP genome defense function only (e.g. RID).

To address the question of a conserved dual role of other members of the fungal-specific DMT-like family, we used the model ascomycete *P. anserina*. Indeed, this fungus displays canonic RIP features, but with a weaker mutagenic process than that of *N. crassa* and no associated cytosine methylation (Graïa et al. 2001b; K Bouhouche et al. 2004; Espagne et al. 2008b). Importantly, these characteristics are shared by most of the Pezizomycotina where RIP signature is found. To investigate the potential roles of the two putative DMTs of *P. anserina*, namely PaRid and PaDim2 in developmental programs and fungal genome defense system, we deleted the two corresponding genes. In this present study, we show that PaDim2 is dispensable through the entire life cycle whereas PaRid is essential to ensure proper sexual development. Moreover, we demonstrated that PaRid is required in the maternal parental strain. Indeed, in absence of PaRid in the female gametes only, the sexual development is blocked before the dikaryon formation. This result is in line with the subcellular localization of PaRid. We also present transcriptional profiling in the  $\Delta PaRid$  mutant background during the course of early sexual development.

## Materials and methods

### Strains and culture conditions

The strains used in this study derived from the « S » wild-type strain that was used for sequencing (Espagne et al. 2008b; Grognet, Bidard, et al. 2014). Standard culture conditions, media and genetic methods for *P. anserina* have been described (G Rizet et Engelmann 1949; Philippe Silar 2011) and the most recent protocols can be accessed at <http://podospora.i2bc.paris-saclay.fr>. Construction of the  $\Delta mus51::su8-1$  strain lacking the mus-51 subunit of the complex involved in end-joining of broken DNA fragments was described previously (Lambou et al. 2008a). In this strain, DNA integration mainly proceeds through homologous recombination. Mycelium growth is performed on M2 minimal medium. Ascospores do not germinate on M2 but on a specific G medium. The methods used for nucleic acid extraction and manipulation have been described (Ausubel et al. 1987; Lecellier et Silar 1994). Transformations of *P. anserina* protoplasts were carried out as described previously (Brygoo et Debuchy 1985).

### Identification and deletions of the *Podospora PaRid* gene and *PaDim2* gene

The *PaRid* and *PaDim2* genes were identified by searching the complete genome of *P. anserina* with tblastn (Altschul et al. 1990), using respectively RID (Freitag et al. 2002b) and DIM-2 (Kouzminova et Selker 2001, 2) as query. Two CDS resembling these queries with significant scores were retrieved. Pa\_1\_19440 (accession number CDP24336) is the *Podospora*'s ortholog of *rid* (NCU NCU02034.7) whereas Pa\_5\_9100 (accession number CDP30033) is the *Podospora*'s ortholog of *dim-2* (NCU02247.7). To confirm gene annotations, *PaRid* transcripts and *PaDim2* transcripts were amplified by RT-PCR experiments performed on total RNA extracted from developing perithecia (2 days post-fertilization) using primers 5s-*PaRid*/3s-*PaRid* and primers 5m-*PaDIM2*/3m-*PaDIM2* (See Table S1). Sequencing of the PCR products did not identify any intron neither into the *PaRid* ORF nor into the *PaDim2* ORF, thus confirming the annotation.

Deletions were performed on a  $\Delta mus51::su8-1$  strain as described in (Lalucque et al. 2012) and verified by southern blot as described in (Grognet, Lalucque, et Silar 2012). Because *PaRid* is strongly linked to the mating-type locus, the gene deletion has been performed in the two mating-type backgrounds to get sexually compatible  $\Delta PaRid$  mutants.

## Allele construction

Two plasmids were mainly used in this study: the pAKS106 plasmid which derived from the pBCPhleo plasmid (P Silar 1995) and the pAKS120 plasmid which derived from pAKS106. pAKS106 contains an HA tag sequence followed by the *ribP2* terminator at the unique *ClaI* and *ApaI* sites (Kicka et al. 2006). The pAKS120 was generated by cloning the promoter of the *AS4* gene, which is highly and constitutively expressed throughout the life cycle (P Silar et Picard 1994), at the unique *NotI* site. Thus, recombinant C-terminus HA-tagged proteins can be produced from pAKS106 and pAKS120, the expression of the corresponding fusion gene being either under the control of its own promoter (pAKS106) or under the control of the constitutive highly expressed *AS4* promoter (pAKS120). Because our allele construction strategy required high-fidelity DNA synthesis, all PCR amplifications were performed using the Phusion High Fidelity DNA polymerase (Thermofisher), accordingly to the manufacturer protocol. The resulting alleles were none of the less systematically sequenced to ensure that no mutation was introduced during PCR amplification (see Table S1 for primers sequences) and that, if relevant, the HA-tag or GFP sequences were in frame.

### - Constructing the *PaRid*-HA and *AS4*-*PaRid*-HA alleles and their GFP-tagged version

To complement the  $\Delta PaRid::hygR$  mutant strain, the wild-type *PaRid* allele was cloned into the pAKS106 plasmid. To this end, the wild-type *PaRid* allele was PCR amplified from the GA0AB186AD09 plasmid (Espagne et al, 2008; <http://podospora.i2bc.paris-saclay.fr/download.php>), using the primers PaRIDHAFXbaI and PaRIDHAREcoRI (see Table S1). The 2914-bp amplicons, which correspond to 653-bp of promoter sequence followed by the complete *PaRid* ORF, at the exception of the stop codon, were digested with the *XbaI/EcoRI* restriction enzymes and cloned into the pAKS106 plasmid, also hydrolyzed with the *XbaI/EcoRI* restriction enzymes. This resulted into the *PaRid*-HA allele which was proven to be functional when transformed into the  $\Delta PaRid::hygR$  mutant strain (see results section). Then, to get the *PaRid* allele under the control of a highly and constitutively expressed promoter, we constructed the *AS4*-*PaRID*-HA allele. To do so, the wild-type *PaRid* allele was PCR amplified from the GA0AB186AD09 plasmid (Espagne et al, 2008; <http://podospora.i2bc.paris-saclay.fr/download.php>), using the primers PaRIDAS4XbaI and PaRIDHAREcoRI (see Table S1). This pair of primers was designed to amplify the complete *PaRid* ORF, at the exception of the stop codon.

The resulting 2263-bp amplicons were digested with the *XbaI/EcoRI* restriction enzymes and cloned into the pAKS120 plasmid, also hydrolyzed with the *XbaI/EcoRI* restriction enzymes. When transformed into the  $\Delta PaRid::hygR$  strain, the *AS4-PaRid-HA* allele fully complemented the phenotypes associated with the *PaRid* null allele (see results section).

To tag the PaRID protein with the Green Fluorescent Protein (GFP), we PCR amplified the ORF of the *eGFP*, at the exception of the stop codon, with primers RIDGFPF*EcoRI* and RIDGFPRC*l*aI (see Table S1), using the pEGFP-1 plasmid (Clontech, Mountain View, CA) as template. The resulting 713-bp fragment was digested with *EcoRI* and *ClaI* and cloned in frame with the *PaRid* allele either into the PaRid-HA plasmid or the AS4-PaRid-HA plasmid (see above), previously digested with the same restriction enzymes. This yielded the chimeric PaRid-GFP-HA and AS4-PaRid-GFP-HA protein. When transformed into the  $\Delta PaRid::hygR$  mutant strain, the *PaRid-GFP-HA* and *AS4-PaRid-GFP-HA* alleles were able to restore fertility, showing that the tagged version of the PaRid protein is functional (see results section).

#### - Constructing the site-directed mutant *PaRID*<sup>C403S</sup>-HA

*PaRID*<sup>C403S</sup> allele was constructed by *in vitro* site-directed mutagenesis. The GA0AB186AD09 plasmid (Espagne et al, 2008; <http://podospora.i2bc.paris-saclay.fr/download.php>) harbouring the wild-type *PaRid* allele was amplified by inverse PCR, using the divergent overlapping primers RIDmut1 and RIDmut2. The RIDmut1 primer contains a G to C substitution at position 1208 of the *PaRid* sequence (see Table S1, marked in bold italics), which matches to the converse C to G substitution located in the RIDmut2 primer (see Table S1, marked in bold italics). The PCR amplicons were digested using the *DpnI* enzyme (Fermentas), self-ligated and then transformed into *E. coli* competent cells. The *PaRid* allele was sequenced from several plasmids extracted from independent chloramphenicol resistant *E. coli* colonies. One allele showing no other mutation but the directed TGT (cysteine) to TCT (serine) substitution was selected as the *PaRid*<sup>C403S</sup> allele. The *PaRid*<sup>C403S</sup> allele was then PCR amplified using the primers PaRIDHAF*XbaI* and PaRIDHARE*EcoRI*. The 2914-bp amplicons, which correspond to 653-bp of promoter sequence followed by the complete *PaRid* ORF, at the exception of the stop codon, were digested with the *XbaI/EcoRI* restriction enzymes and cloned into the pAKS106 plasmid, also hydrolysed with the *XbaI/EcoRI* restriction enzymes. This resulted into the *PaRID*<sup>C403S</sup>-HA allele. Then, to get the *PaRid* allele under the control of a highly and constitutively expressed promoter, we constructed the *AS4-PaRid*<sup>C403S</sup>-HA allele.



To do so, the *PaRid*<sup>C403S</sup> allele was PCR amplified from the pAKS106-*PaRid*<sup>C403S</sup>-HA, using the primers PaRIDAS4XbaI and PaRIDHAREcoRI (see Table S1). This pair of primers was designed to amplify the complete *PaRid* ORF, at the exception of the stop codon. The resulting 2263-bp amplicons were digested with the *XbaI/EcoRI* restriction enzymes and cloned into the pAKS120 plasmid, also hydrolyzed with the *XbaI/EcoRI* restriction enzymes. This yielded the pAKS120-AS4-*PaRid*<sup>C403S</sup>-HA plasmid. All the PCR amplified fragments were sequenced.

- *Constructing the interspecific NcRID-HA, dmtA-HA and Masc1-HA alleles*

In order to introduce the *Neurospora* wild-type *rid* allele (Freitag et al. 2002b), into *Podospora*  $\Delta PaRid::hygR$  mutant strain, we constructed the pAKS106-*rid*-HA allele. To this end, the *Rid* allele was PCR amplified from a wild-type *Neurospora* genomic DNA, using primers NcRIDHAFNotI and NcRIDHARBamHI (see Table S1). The resulting 3420-bp amplicons, which correspond to 861-bp of promoter sequence followed by the complete *Rid* ORF, at the exception of the stop codon, were digested with the *NotI/BamHI* restriction enzymes and cloned into the pAKS106 plasmid, also hydrolyzed with the *NotI/BamHI* restriction enzymes. This resulted into the *NcRid*-HA allele.

A different strategy was used to clone the *DmtA* gene (D. W. Lee et al. 2008a) from *A. nidulans* and the *Masc1* gene (F Malagnac et al. 1997) from *A. immersus*. Indeed, because these fungi were more distantly related to *P. anserina* than *N. crassa*, the wild-type ORFs were cloned into the pAKS120 plasmid and thus fused with the *Podospora* AS4 promoter. To do so, the *DmtA* allele was PCR amplified from a wild-type *A. nidulans* genomic DNA, using primers dmtAFXbaI and dmtARBamHI (see Table S1). The resulting 1898-bp amplicons, which correspond to the complete *DmtA* ORF, at the exception of the stop codon, were digested with the *XbaI/BamHI* restriction enzymes and cloned into the pAKS120 plasmid, also hydrolyzed with the *XbaI/BamHI* restriction enzymes. This resulted into the *DmtA*-HA allele. Similarly, the *Masc1* allele was PCR amplified from a wild-type *A. immersus* genomic DNA, using primers AiRIDAS4XbaI and AiRIDHAREcoRI (see Table S1). The resulting 1666-bp amplicons, which correspond to the complete *Masc1* ORF, at the exception of the stop codon, were digested with the *XbaI/EcoRI* restriction enzymes and cloned into the pAKS120 plasmid, also hydrolyzed with the *XbaI/EcoRI* restriction enzymes. This resulted into the *Masc1*-HA allele.

All the PCR amplified fragments were sequenced.

## **Cytology & microscopy analysis**

Perithecia were harvested from 12 to 96H after fertilization. Tissues fixation was performed as in (Berteaux-Lecellier et al. 1995). Pictures were taken with a Leica DMIRE 2 microscope coupled with a 10-MHz Cool SNAP<sub>HQ</sub> charge-coupled device camera (Roper Instruments), with a z-optical spacing of 0.5mm. The GFP filter was the GFP-3035B from Semrock (Ex: 472nm/30, dichroic: 495nm, Em: 520nm/35). The Metamorph software (Universal Imaging Corp.) was used to acquire z-series. Images were processed using the ImageJ software (NIH, Bethesda).

## **Phenotypic analyses**

Spermatium counting was performed as follows: each strain was grown on M2 medium at 27°C for 21 days. To collect spermatia, cultures were washed with 1.5 mL of sterile water added with 0.05% of Tween 20. Numeration proceeded through Malassez counting chamber.

Grafting was assayed as in (Philippe Silar 2011).

Western blot analyses were performed on two days growing perithecia as in (Kicka et al. 2006). We used the anti-HA high affinity monoclonal antibody from rat to the HA-peptide (clone 3F10, ref 11 867 423 001, Sigma-Aldrich).

## **Phylogenetic analysis**

Orthologous genes were identified using Fungipath (Grossetête, Labedan, et Lespinet 2010) and MycoCosm portal (Grigoriev et al. 2014) and manually verified by reciprocal Best Hits Blast analysis. Sequences were aligned using Muscle (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) and trimmed using Jalview to remove non-informative regions (i.e. poorly aligned regions and/or gaps containing regions). Trees were constructed with PhyML 3.0 software with default parameters and 100 bootstrapped data set (Guindon et al. 2010). The tree was visualized with the iTOL server (<http://itol.embl.de/>). Functional annotation was performed using Interproscan analysis (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>), Panther Classification System (<http://www.pantherdb.org/panther/>), PFAM (<http://pfam.xfam.org/>), Prosite (<http://prosite.expasy.org/>). Proteins were drawn using IBS software (<http://ibs.biocuckoo.org/>)

## RNA preparation for microarray

To perform the microarray experiments, the male partner was grown 6 days at 27°C on M2 medium. Afterwards, spermatia (the male gametes) were collected by washing the resulting mycelium with 1.5 ml of H<sub>2</sub>O per Petri-dish (10<sup>4</sup> spermatia / ml). The female partner strains were grown 4 days at 27°C on M2 covered with cheesecloth (Sefar Nitex 03-48/31 Heiden). The sexual development time-course experiment started when female partners were fertilized by the spermatia (1.5 10<sup>4</sup> spermatia / cross). This time was referred to as T0 (0 hours). By scraping independent crosses, samples of 20 to 100 mg of growing perithecia were harvested six hours (T6), 24 hours (T24) and 30 hours (T30) after fertilization from the wild-type cross and 42 hours (T42) after fertilization from the  $\Delta PaRid$  and  $\Delta Smr1$  crosses and immediately flash frozen in liquid nitrogen. For each time point of the time-course, we collected three biological replicates originating from three independent crosses. The frozen samples materials were grinded using a Mikro-dismembrator (Sartorius, Goettingen, Germany). Total *P. anserina* RNAs were extracted using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) with DNase treatment. The quality and quantity of total RNA was assessed using a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA) and the Bioanalyzer 2100 system (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). This protocol was performed on three genetically distinct crosses as specified in Table 2.

Crosses	Strains involved in the crosses	Female strain	Male strain
Wild type cross	<i>S mat+</i> x <i>S mat-</i>	<i>S mat+</i>	<i>S mat-</i>
$\Delta PaRid$ cross	<i>S mat+</i> $\Delta PaRid$ x <i>S mat-</i>	<i>S mat+</i> $\Delta PaRid$	<i>S mat-</i>
$\Delta SMR1$ cross	<i>S mat+</i> x <i>S mat-</i> $\Delta Smr1$	<i>S mat+</i>	<i>S mat-</i> $\Delta Smr1$

Table 2 : crosses used in transcriptome analysis

## Labelling and microarray hybridization

Gene expression microarrays for *P. anserina* described in (F Bidard et al. 2010) consisted of a custom 4×44 K platform (AMADID 018343, Agilent, Santa Clara, USA) containing 10,556 probes on each array with each probe in four replicates. Microarray hybridization experiments including target preparation, hybridization and washing were performed as described (Frédérique Bidard et al. 2011).

The experimental samples were labelled with Cy5 dye and reference sample with Cy3 dye. The reference sample is a mixture of RNA extracted from different growth conditions (F Bidard et al. 2010).

### **Microarray data acquisition, processing and analyses**

Microarrays were scanned using the Agilent Array Scanner at 5µm/pixel resolution with the eXtended Dynamic Range (XDR) function. Array quality and flagging were performed as described (Frédérique Bidard, Clavé, et Saupe 2013). Pre-processing and data normalization were performed with Feature Extraction (v9.5.3) software (Agilent technologies), with the GE2-v4\_95\_Feb07 default protocol. Statistical differential analysis were done using the MAnGO software (Marisa et al. 2007), a moderate *t*-test with adjustment of *p*-values (Benjamini et Hochberg 1995) was computed to measure the significance with each expression difference. Differential analyses have been performed between each of the two mutant crosses (i.e.  $\Delta PaRid$  cross and  $\Delta SMR1$  cross) and the wild-type cross at 12 (T12), 24 (T24) and 30 (T30) hours after fertilization. Fold change values (FC) were calculated from the ratio between normalized intensities at each time of the time course. Differentially expressed (DE) genes in the  $\Delta PaRid$  cross were defined as those whose adjusted *P*-values are inferior to 0,001 and the absolute value of FC higher than 2. In order to identified genes which differential expression is specific of the deletion of *PaRid* and not of the micro-perithecium phenotype (see Results Section for details), genes with an adjusted *P*-values inferior to 0,05 and with a FC of up and down regulation greater than 1.8 in the  $\Delta Smr1$  cross were removed from the complete set of genes differentially expressed in a  $\Delta PaRid$  cross. The resulting list was called genes DE specific of  $\Delta PaRid$  cross. Microarray data reported in this paper have been deposited in the Gene Expression Omnibus database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo> (GEO, accession no. GSE104632).

### **Data clustering**

An expression matrix of 435 genes was built from all the genes DE specific of the  $\Delta PaRid$  cross. From these matrix, a clustering analysis was performed using the MultiExperiment Viewer software (Howe et al. 2010). A combination of unsupervised hierarchical clustering and K-means algorithms was used to sort genes into clusters. First, an ascending hierarchical clustering was done using the Euclidean distance metric and the average linkage method.

Results were used to determine the optimal number  $K$  of clusters ( $K=9$ ). The  $K$ -means algorithm was applied using Euclidean distance on the 435 gene expression profiles. In order to improve the robustness of results, five independent runs of  $K$ -means with a random initialization have been performed. Then, an aggregation method using a co-occurrence threshold of 80% was used to obtain the final clusters. 433 CDS have been classified and 2 CDS were not robustly classified.

## Results

### Two putative DNA methyltransferases genes are present in the *Podospora* genome

The *P. anserina* genome displays two genes encoding putative DNA methyltransferases (Fig. 1A), namely *PaRid* (Pa\_1\_19440) and *PaDim2* (Pa\_5\_9100) (Espagne et al. 2008b). Like other putative eukaryotic DNA methyltransferases (DMTs), *PaRid* and *PaDim2* show conserved DMT domain motifs (I to X) and expected target recognition domain (TRD) variable regions (between motifs VIII and IX). No other putative DMTs could be detected.

Although *PaRid*, a 752 amino-acid protein, shows typical signatures of cytosine methyltransferases (PF00145, PS51679, PR00105) (Fig. 1B), it belongs to the same phylogenetic group (DMT-like fungal family) as the previously described *Neurospora* RID protein (41% identity) (D. W. Lee et al. 2008a), *Ascobolus* Masc1 protein (33% identity) (F Malagnac et al. 1997) and *Aspergillus* DmtA (31% identity) (Fig. 1C). As already pointed out for Masc1/Rid DMT-like proteins (Gladyshev 2017), these proteins, including *PaRid* have peculiar features. They show a non-canonical EQT (glutamate-glutamine-threonine) triad in motif VI instead of the ENV (glutamate-asparagine-valine) triad shared by all other eukaryotic C5-cytosine methyltransferases (Fig. 1D) as well as a remarkably short TRD domain (80 aa).

On the contrary, *PaDim2*, a 1287 amino-acid protein, which also shows typical cytosine methyltransferase features (PF00145, PR00105, PS00094, PS51038) (Fig. 1B), clusters with the DIM2 protein of *Neurospora* (48% identity) (Kouzminova et Selker 2001) and the Masc3 protein of *Ascobolus* (32% identity) (Murat et al., 2018) (Fig. 1C). Unlike *PaRid*, the *PaDim2* enzyme harbors the canonical ENV triad (Fig. 1D) and TRD domain (165 aa) as the *bona fide* cytosine methyltransferases.

EST database generated from vegetatively grown *Podospora* shows no expression of either *PaRid* or *PaDim2* at this stage. However, the *PaRid* expression profile extract from a microarray transcriptional time-course analysis performed during the *Podospora*'s sexual development (Bidard and Berteaux-Lecellier, personal communication) showed a peak at T12 (12 hours post fertilization) followed by a decrease at T30 (30 hours post fertilization) (Fig. S1). Besides RT-PCR experiments indicated that scarce *PaRid* transcripts could be detected up to T96 (96 hours post fertilization).

By contrast, *PaDim2* expression profile extract from the microarray transcriptional time-course analysis mentioned above remains unchanged throughout sexual development (Fig. S1). RT-PCR experiments indicated none of the less that the *PaDim2* transcripts could be detected at T48 and at T96 (48 and 96 hours post-fertilization).

We also assayed global DNA methylation level from the reference *S mat+* wild-type strain. To this end, we extracted total genomic DNA from mycelium grown for two days at 27°C. Once digested to individual nucleoside components, two independent samples were analyzed by HPLC (High-performance liquid chromatography). In both replicates, the 5-meC content of genomic DNA, if any, accounted for 0.07 % (+/- 0.01) of total of the cytosine residues (Ponts, personal communication). This result is in line with the previously reported lack of cytosine DNA methylation on RIP targets (K Bouhouche et al. 2004).

### **PaRid is essential to ensure proper sexual development**

To gain insight about a potential function of PaRid and PaDim2 during *Podospora* life cycle, we deleted the corresponding genes.

Replacement of the *PaRid* wild-type allele with hygromycin-B resistance marker generated the  $\Delta PaRid$  null allele (Materials and methods and Fig. S2A). The  $\Delta PaRid$  mutant strains showed wild-type phenotypes with respect to vegetative growth and vegetative developmental programs (i.e. germination, growth rate, mycelium pigmentation, aerial hypha production, branching, anastomosis, longevity, etc. see Table S2, Fig. S4, Fig. S5), indicating that the *PaRid* gene is dispensable for the vegetative phase of *Podospora*'s life cycle.

We then investigated the ability of the  $\Delta PaRid$  mutant strains to perform sexual reproduction (see Fig. S3 for description). During the first 30 hours post-fertilization, the sexual development of homozygous  $\Delta PaRid$  crosses is indistinguishable from that of wild-type crosses. Indeed, in homozygous  $\Delta PaRid$  crosses, the fruiting bodies are formed normally, both in timing (24 hours post-fertilization) and in number (4333 per cross +/- 368, N=5), as compared to homozygous wild-type crosses (4477 per cross +/- 458 N=5) (Table S3, Fig. 2A). However, while the fructifications originating from homologous wild-type crosses continued to develop up to 45 hours post-fertilization, those originating from homozygous  $\Delta PaRid$  crosses stopped to mature around 30 hours after fertilization, forming distinctive micro-perithecia only. Although these micro-perithecia never grew into fully mature fruiting bodies, they displayed no significant morphological defects (Fig. 2B) (Lalucque et al. 2017).

Importantly, they were fully pigmented and harbored canonical necks and ostioles. This phenotype was clearly reminiscent of that of the previously described  $\Delta Smr1$  deficient mutants (Arnaise et al. 2001; Dyer, Inderbitzin, et Debuchy 2016). As a consequence of this early developmental arrest, while a fully matured perithecium would produce hundreds of asci after 96 hours post fertilization, the  $\Delta PaRid$  micro-perithecia are barren (Fig. 2C).

Furthermore, heterozygous orientated crosses showed that when the wild-type *PaRid* allele was present in the female gamete genome (i.e. asgononia) and the  $\Delta PaRid$  null allele was present in the male gamete genome (i.e. spermata), the fruiting-body development was complete and resulted in the production of asci with ascospores. The progeny isolated from this cross showed the expected 1:1 segregation of the  $\Delta PaRid::hygR$  allele. On the contrary, when the  $\Delta PaRid$  null allele was present in the female gamete genome and the wild-type *PaRid* allele was present in the male gamete genome, the fruiting body development was blocked and the resulting micro-perithecia did not produce asci. Altogether, these results indicate that (1)  $\Delta PaRid$  mutants formed both male and female gametes and that these gametes are able to fuse since (2) fertilization occurred as efficiently in homozygous  $\Delta PaRid$  mutant crosses than in wild-type crosses, yielding a similar number of fruiting bodies per crosses (3) the wild-type *PaRid* allele must be present in the maternal haploid genome for completing the sexual development. Notably, because reciprocal heterozygous orientated crosses with *mat*<sup>-</sup> and *mat*<sup>+</sup> wild-type strains behaved similarly, the observed  $\Delta PaRid$  phenotype was not dependent on mating type.

### **PaRid does not contribute to the development of maternal tissues**

Fruiting bodies in Pezizomycotina are integrated structure made of two major kinds of tissues. The outer part, also called envelope or peridium, is exclusively made of maternal tissue whereas the inner part, the dikaryotic hyphae is issued from fusion of the two parental haploid gametes (Peraza-Reyes et Malagnac 2016). To check whether the  $\Delta PaRid$  mutation associated sterility resulted from a peridium defect or a developmental defect of the dikaryotic hyphae, we set up trikaryon crosses involving the  $\Delta mat$  strain (E. Coppin et al. 1993; Jamet-Vierny et al. 2007a). Because the  $\Delta mat$  strain lacks the genes required for fertilization, it does not participate either as male or female in sexual reproduction. However, the  $\Delta mat$  mycelium is able to provide maternal hyphae required to build fruiting bodies. Consequently, the  $\Delta mat$  strain can only complement mutants defective for fruiting body tissues formation but cannot complement any zygotic tissue dysfunction.



We observed that the  $\Delta mat/\Delta PaRid\ mat^+/\Delta PaRid\ mat^-$  trikaryon crosses yielded micro-perithecia only (Fig. S6A). As those were equivalent in size and shape to the micro-perithecia generated by the  $\Delta PaRid\ mat^+/\Delta PaRid\ mat^-$  dikaryon crosses, these results indicated that the defect of the  $\Delta PaRid$  mutants comes from a defect in the development of the zygotic tissue. Moreover, grafting  $\Delta PaRid$  micro-perithecia onto a wild-type mycelium did not result in further development of the fruiting bodies and did not restore ascus production either (Table S4). In addition, because  $\Delta PaRid$  grafted perithecia did not resume growth or ascus production, the  $\Delta PaRid$  mutant strain defects are not likely due to a metabolic deficiency or nutrient shortage (Philippe Silar 2011). Conversely, not yet mature wild-type perithecia were grafted onto  $\Delta PaRid$  mycelia, within three days. They continued to develop into fully mature perithecia and expelled the usual amount of ascospores confirming that the  $\Delta PaRid$  mutant mycelium is able to provide all required nutrients.

### **PaDim2 is dispensable throughout Podospora's life cycle**

By contrast,  $\Delta PaDim2$  mutants obtained by the replacement of the *PaDim2* sequence with the nourseothricin-resistant-marker behaved as wild-type strains (Fig. S4). No specific phenotype was observed during the vegetative phase or during the reproductive phase of the *Podospora*'s life cycle. Double knockout mutant strains were then constructed. All the phenotypes displayed by the double  $\Delta PaRid\ \Delta PaDim2$  mutant strains are those of the single mutant  $\Delta PaRid$  strains, indicating no synergistic effects of the two mutations (Table S2, Fig. S5).

### **In absence of PaRid in the female gametes, the sexual development is blocked before the dikaryon formation**

As mentioned above, in *Podospora*, fertilization results in formation of a plurinucleate ascogonium located inside the fruiting bodies. This ascogonium gives rise to dikaryotic cells that differentiate specialized cells (croziers) in which karyogamy leads to the formation of zygotes (Fig. S3). The diploid cells immediately enter meiosis to give ascospores. In homozygous  $\Delta PaRid$  crosses, dissection of micro-perithecium contents (N=5) performed 48 hours post-fertilization, showed plurinucleate ascogonial cells, but an absence of dikaryotic cells. This observation indicated that the sexual development was blocked before their compartmentalization (Fig. 2D). Control experiment performed in the same conditions on perithecium contents collected from homozygous wild-type crosses (N=5), typically showed 20 to 30 dikaryotic cells per perithecium (Fig. 2D).

As mentioned above, heterozygous orientated crosses where the  $\Delta PaRid$  null allele was present in the female gamete genome and the wild-type *PaRid* allele was present in the male gamete genome resulted in the formation of micro-perithecia. When their content was dissected, no dikaryotic cells were observed as in the homozygous  $\Delta PaRid$  crosses. By contrast, heterozygous orientated crosses where the wild-type *PaRid* allele was present in the female gamete genome and the  $\Delta PaRid$  null allele was present in the male gamete genome resulted in the formation of fully mature perithecia that contain dikaryotic cells. Altogether, these results show that a wild-type *PaRid* allele must be present in the haploid genome of Podospora female gametes but not in the haploid genome of Podospora male gametes for the dikaryotic cells to be formed.

Nevertheless, when homozygous  $\Delta PaRid$  crosses are incubated from three to four weeks in the culture room (as opposed to the 96 hours post-fertilization needed for wild-type crosses to yield offspring), a few asci could be produced from quite a low number of micro-perithecia. Typically, while tens of thousands of asci can be recovered from a wild-type cross, less than 12 asci had been collected from 20 independent homozygous  $\Delta PaRid$  crosses. Interestingly, each of the  $\Delta PaRid$  ascospores issued from these later mutant crosses displayed wild-type shape, germinated efficiently and generated *bona fide*  $\Delta PaRid$  mutant strains.

### **Complementation of the $\Delta PaRid$ mutants with ectopic alleles**

To verify that the *PaRid* deletion was responsible for the sexual development arrest when absent from the female gamete haploid genome, we transformed a *PaRid-HA* allele (see Material and Method section) into a  $\Delta PaRid$  strain. Among the phleomycin resistant transformants that were recovered (N=109), 84% showed a complete restoration of the  $\Delta PaRid$  fertility defect (Table 1). Moreover, when the expression of *PaRid* was driven by the highly and constitutively expressed *AS4* promoter (*AS4-PaRID-HA* allele) (P Silar et Picard 1994), 67% of the phleomycin resistant transformants (N=78) completed sexual development and produced ascospores (Table 1, Fig S7). Interestingly, among the complemented transformants, no noticeable additional vegetative or reproductive phenotypes were observed, despite the potential constitutive overexpression of the *AS4-PaRID-HA* transgenic alleles. Searching the available Podospora RNA-seq data (Philippe Silar et al. 2018a), we did not find any evidence of non-coding RNA at the *PaRid* locus, as described for sense-antisense DmtA/tmdA transcripts found in *A. nidulans* (D. W. Lee et al. 2008a). More over, in Neurospora, the *Rid* transcripts can be subjected to two events of A-to-I RNA editing before ascus development (H. Liu et al. 2016, 2017).

No such RNA editing was found for *PaRid* transcripts in RNA-seq experiments performed on either two-day old or four-day old perithecia.

To ask whether the putative enzymatic function of the PaRid protein was essential to *Podospora*'s sexual development, we constructed the *PaRID*<sup>C403S</sup>-*HA* and the *AS4-PaRID*<sup>C403S</sup>-*HA* point-mutated alleles, which both encode a catalytically-dead PaRid protein (Goll et Bestor 2005). Indeed, to perform the methylation transfer, this cysteine residue of the conserved PCQ triad (proline-cysteine-glutamine) located in motif IV forms a covalent bond with the cytosines that will be modified (Fig. 1D). This cysteine residue is invariant in all eukaryotic C5-cytosine methyltransferases and its substitution resulted in loss of activity by mammals DNA methyltransferases Dnmt3A and Dnmt3B (Bestor et Verdine 1994). After transformation into a knockout  $\Delta PaRid$  strain, independent phleomycin resistant transformants were recovered (N=89 for the *PaRID*<sup>C403S</sup>-*HA* allele and N=55 for the *AS4-PaRID*<sup>C403S</sup>-*HA* allele). Although they presented at least one full-length copy of either the *PaRID*<sup>C403S</sup>-*HA* allele or the *AS4-PaRID*<sup>C403S</sup>-*HA*, none of these transformants showed any complementation of the  $\Delta PaRid$  sterility defect (Table 1). For a subset of them, we confirmed that the corresponding point-mutated protein PaRID<sup>C403S</sup> was readily expressed (Fig. S7). Again, these transformants could not be distinguished from  $\Delta PaRid$  mutants when crossed to either wild-type strains or  $\Delta PaRid$  mutant strains.

Finally, because the Masc1/RID proteins are phylogenetically and structurally related but also because they might play a conserved role during sexual development, at least for the *A. nidulans* and *A. immersus* alleles, we transformed the *DmtA-HA* and *Masc1-HA* alleles but also the *NcRid-HA*, independently into the  $\Delta PaRid$  background. None of the independent phleomycin resistant transformants that were recovered showed restoration of sexual reproduction (N=120 for the *NcRid-HA* allele, N=112 for the *DmtA-HA* allele and N=86 for the *Masc1-HA* allele, Table 1), indicating that inter-species complementation is not possible.

### **PaRid cellular localization**

To gain some insight into the subcellular localization of PaRid, we expressed two GFP-tagged chimeric versions of this protein (Table 1 and Fig. 3). The *PaRid-GFP-HA* allele was driven by its own promoter, while the *AS4-PaRid-GFP-HA* allele was driven by the highly and constitutively expressed *AS4* promoter. After transformation into a  $\Delta PaRid$  strain, independent phleomycin resistant transformants were recovered (N=63 for the *PaRid-GFP-HA* allele and N=95 for the *AS4-PaRid-GFP-HA* allele).

Both tagged-alleles were proven to be expressed and to encode functional chimeric proteins since 32% of the phleomycin resistant strain obtained after transformation with the *PaRid-GFP-HA* allele and 64% of those obtained after transformation with the *AS4-PaRid-GFP-HA* allele showed a complete restoration of the  $\Delta PaRid$  fertility defect (Table 1). Since fluorescence under the native promoter was too weak to be monitored, overexpression constructs were subsequently analyzed. All the complemented *AS4-PaRid-GFP-HA* transformants had a wild-type phenotype (i.e. displayed no extra phenotypes that could be linked to *PaRid* constitutive overexpression). The PaRid-GFP fluorescence was observed in the female gametes (ascogonia and protoperithecia) but neither in mycelium nor in the male gametes (spermatia) (Fig. 3). This expression pattern is in line with both the  $\Delta PaRid$  maternal sterility defect and the absence of *PaRid* ESTs in vegetative databases. Surprisingly, we did not observed fluorescence into croziers (formed around 30 hours post-fertilization), while it resumed during the ascospore formation (from 42 to 96 hours post-fertilization). In ascospores, PaRid-GFP was both nuclear and cytoplasmic.

### **Micro-perithecium arrest induced an extensive transcriptional reprogramming**

Taking advantage of the *Podospora* microarrays, representing 10556 predicted coding sequences (CDS) (F Bidard et al. 2010), we explored gene expression changes during early sexual development in a  $\Delta PaRid$  mutant background. To this end,  $\Delta PaRid$  female gametes were fertilized by wild-type male gametes of compatible mating-types, which constituted the start point of the experiment (T0). Crosses were then incubated at 27°C and samples of developing distinctive micro-perithecia were collected 42 hours post-fertilization (T42). This time point was chosen to unravel the broader set of differentially expressed genes, given that the micro-perithecia originating from  $\Delta PaRid$  crosses stopped to mature around T30 (Fig 4A). To identify potential PaRid regulatory targets, we compared the transcriptional profile of the  $\Delta PaRid$  mutant crosses to that of the wild-type crosses at four time points of the sexual development: 12 (T12), 24 (T24), 30 (T30) and 42 (T42) hours post-fertilization (Bidard and Berteaux-Lecellier, unpublished data). This time line was chosen because 1) T12 represents the peak of expression of *PaRid*, 2) proto-perithecia start to develop into perithecia at T24 3) crozier cells are formed at T30 so that karyogamy can proceed, plus micro-perithecia originating from homozygous  $\Delta PaRid$  crosses stopped to developed around this time point (Fig. 4A). The initial set of genes that were found to be differentially expressed ('initial set') by a fold change of two or more (Fig. AB et 4C) was then filtered using transcriptomic data from  $\Delta Smr1$  mutant crosses.

Indeed, the *ΔSmr1* mutants are blocked at the same cytological stage and display the same micro-perithecium phenotype than those of the *ΔPaRid* mutants (Arnaise et al. 2001), however *PaRid* was not found differentially expressed in the *ΔSmr1* genetic background and conversely, *Smr1* was not found differentially expressed in the *ΔPaRid* background. Moreover, *ΔPaRid ΔSmr1* double mutants do not display aggravated phenotypes when compared to the *ΔPaRid* and the *SMR1* single mutants. These results indicate that, although displaying the same micro-perithecium phenotype (Fig. S6C), *PaRid* and *Smr1* do not interact genetically and therefore are likely involved in two distinct developmental pathways, using different gene networks. Nevertheless, among the 833 differentially expressed genes (DE genes) in the *ΔPaRid* background at T42, 736 (88%) shared the same pattern of transcriptomic deregulation, either up or down, than the ones observed in the *ΔSmr1* mutant background (Fig. S8). Concordant observations of the same nature drew our attention to the fact that the micro-perithecium phenotype by itself might be responsible for a sizeable part of the differentially expressed genes. This hypothesis implies that developmental arrest of micro-perithecia, prior dikaryotic cell formation, might generate cellular stresses that results in transcription reprogramming irrespective of the initial mutation, either *ΔPaRid* or *ΔSmr1*. Because our aim was to establish a specific set of *PaRid* regulatory targets, we removed the genes differentially expressed the same way in both *ΔPaRid* crosses and *ΔSmr1* crosses ('common set') from the initial set of genes differentially expressed in *ΔPaRid* crosses (Fig. 4B, Table S5). The remaining set of genes found to be differentially expressed by a fold change of two or more was designated as '*ΔPaRid* DE specific set'. In addition, the 'common set' also contains the genes differentially expressed between the collecting time point of the mutant crosses (T42) and earlier time points of the wild-type sexual development time course (T12, T24 and T30). Therefore, this filtering method allowed us to compare the *ΔPaRid* DE specific set with the T12, T24 and T30 time points of wild-type crosses transcriptomic analysis (Bidard and Berteaux-Lecellier, unpublished data).

### ***PaRid* genetic network**

Once filtered as described above, we found 430 genes specifically differentially expressed by a fold change of two or more (4.2% of *Podospora* predicted genes, Table S5) in the *ΔPaRid* mutant compared to wild-type strain at T12, T24 and T30. We identified significantly more (p-value=0.005) up-regulated genes (247) than down-regulated genes (183) (Fig. 5A, Fig. 5B). Among them, 14 were up-regulated at the three-time points, while only three of them were down-regulated at the three time points (Fig. 5A).

Globally, this transcriptional profiling indicates that a relatively small number of genes are under the control of *PaRid*. A hierarchical clustering analysis of these specifically DE genes led to the identification of 8 clusters (C1 to C8, Fig. 5C). Most of the DE genes are contained in the clusters C1 (31%) and C2 (45%) while the rest of them is distributed among clusters C3 (7%) to C8 (1%).

Among the up- and down-regulated gene set, we observed a striking overrepresentation of non-conserved genes (only 54.7% of the 433 DE genes show orthologs in *N. crassa*, 33.2% in *A. nidulans* and 17.3% in *S. cerevisiae*) and non-annotated genes (192 unclassified genes,  $p=0.002$ , Fig. 5D) compared with the rest of the genome. A FunCat analysis of DE genes revealed a significant enrichment for some functional categories. The “Metabolism” category (i.e. amino acid metabolism; lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism; secondary metabolism) is significantly enriched in both the up- and down-regulated genes, which is in line with the already documented crucial role of peroxisomes during sexual development (Peraza Reyes et Berteaux-Lecellier 2013). These organelles are involved in fatty acid  $\beta$ -oxidation and the glyoxylate cycle, producing energy and biosynthetic precursors used throughout the progression of karyogamy and meiosis. The enrichment of the “secondary metabolism” subcategory was more of an unexpected finding, since to date no such production has been reported in *Podospora*. The predicted secondary metabolite clusters identified in this study are mostly composed of genes encoding proteins of unknown function. Yet, some of them contain genes encoding putative secondary metabolite related function : HC-toxin synthetase (Pa\_3\_11193, Pa\_3\_11200, Pa\_3\_11220), polyketide synthase (Pa\_6\_11230, Pa\_6\_11250) and putative multidrug efflux system (Pa\_4\_3775, Pa\_4\_3840, Pa\_4\_3858, Pa\_4\_3880). Accordingly, the category “Energy” (i.e. glycolysis and gluconeogenesis, fermentation, oxidation of fatty acids) is also enriched, especially among the up-regulated genes. In homozygous  $\Delta PaRid$  crosses some of the CAZymes genes are over-expressed, especially Pa\_7\_10520 a putative  $\beta$ -glucosidase, Pa\_4\_2050 a putative xylanase, Pa\_1\_8880 a putative chitinase, Pa\_0\_1360 a putative candidate exo-1,5-a-L-arabinofuranosidase and Pa\_0\_190 a putative putative GMC oxidase.

We also searched the  $\Delta PaRid$  DE specific set for genes of interest. Notably, few genes involved in epigenetic mechanisms are differentially expressed. Among the down-regulated genes, we identify Pa\_7\_3820, encoding a putative histone-lysine N-methyltransferase homologous to Set-9/KTM5, which methylates the H4K20 residues (Yu Wang et al. 2009).

The expression of the Pa\_7\_9570 gene encoding the SNF2-family ATP dependent chromatin remodeling factor snf21 is down-regulated as well as the expression of the Pa\_5\_8910 gene, encoding the suppressor of meiotic silencing-2 (sms-2, (D. W. Lee et al. 2003)) and that of Pa\_3\_6550, encoding the velvetA-like-1 protein (ve-1, (S. Li et al. 2006)). Among the up-regulated genes, we identify Pa\_3\_7680, encoding a set-domain histone methyltransferase homologous to Set-6 of *S. pombe*. This list of DE genes did not draw a clear picture of a potential epigenetic regulation process in which PaRid might be involved. Notably, we established that no meiosis specific genes were differentially regulated which was consistent with the early blockage of fruiting body development in the  $\Delta PaRid$  mutant background.

We then search for transcriptional factors (TF) that might be good candidates to be direct PaRid targets.

## Discussion

Sexual reproduction is considered to be essential for long-term persistence of eukaryotic species (Goddard, Godfray, et Burt 2005). If only a few asexual lineages are known to persist over a long period of time without sex (Judson et Normark 1996), most eukaryotes engage in sexual reproduction at some point in their life cycle. Studies have shown that sex reduces the accumulation of deleterious mutations compared to asexual reproduction (Bruggeman et al. 2003) but also provide a faster adaptive response, by bringing together favorable gene combinations and allowing their fixation in the populations (Becks et Agrawal 2012). In multicellular eukaryotes, sexual reproduction is controlled by strict mechanisms governing which haploids can fuse (mating) and which developmental paths the resulting zygote will follow. These strict mechanisms are made of both genetic and epigenetic determinisms. Among the epigenetic modifications that control gene expression, DNA methylation reprogramming allows cells to shape their identity by launching and maintaining differential transcriptional programs in each cell type. In mammals, specific differential genomic DNA methylation patterns of parental gametes, known as ‘DNA methylation imprints’ are not essential to karyogamy but to the zygotic development (Okano et al. 1999) while global genomic demethylation in *Arabidopsis thaliana* results in male-fertile but female-sterile plants (Ronemus et al. 1996; Finnegan, Peacock, et Dennis 1996). It has been hypothesized that the regulation of gene expression by DNA methylation during the development of higher eukaryotes might have been acquired from ancestral mechanisms of genome defense against invasive repetitive elements such as transposons. Interestingly, some of the multicellular fungi are endowed with a homology-based genome defense system (RIP or RIP-like) showing epigenetic features in addition to a functional link to sexual development (F Malagnac et al. 1997; D. W. Lee et al. 2008a). But yet, very little is known about epigenetic regulation of gene expression and development in multicellular fungi, although animal and fungi are each other closest relatives.

In this study, we took advantage of a model ascomycete that displays on-going RIP but no DNA methylation, to explore the role of PaRid, a DNMT-like protein homologous to the fungal conserved group of Masc1 (F Malagnac et al. 1997) and Rid (Freitag et al. 2002b). We report that this protein plays a central role in the sexual development of *P. anserina*. Indeed, although male gametes harboring a  $\Delta PaRid$  nul allele can fertilize female gametes of the same mutant genotype, the *PaRid* wild-type allele must be expressed in the female gametes for the dikaryotic cells to be formed.



If absent from the maternal lineage, the perithecia stop prematurely to grow (micro-perithecia phenotype) and no croziers emerged from the biparental plurinucleate ascogonial cells that they contained. Furthermore providing surrogate maternal tissue either by grafting the mutant micro-perithecia to a wild-type mycelium or by introducing a *Amat* partner to the *ΔPaRid mat+ / ΔPaRid mat-* parental strains did not rescue the maturation defect of the fruiting bodies, as previously shown for some of the *Podospora* female sterile mutants (F Malagnac et al. 2004; Jamet-Vierny et al. 2007a; Lalucque et al. 2012; Ait Benkhali et al. 2013). This demonstrates that the *ΔPaRid* mutant sterility is neither due to a perithecium envelope building failure nor to an improper feeding of the maturing fruiting body, but to the lack of ascogenous tissue. To date, among the *Podospora* sterile mutants that have been studied, these macroscopic (micro-perithecia) and microscopic (no dikaryotic cells) phenotypes are both found in the *ΔSmr1* mutant only (Arnaise et al. 2001). SMR1/MAT1-1-2 is a conserved protein of yet unknown function, which is required for the initial development of the dikaryotic stage (*Giberella zae* (Zheng et al. 2013), *Sordaria macrospora* (Klix et al. 2010)). It has been proposed that SMR1 might release the developmental arrest following inter-nuclear recognition (IR) between two compatible nuclei and consequently would trigger the crozier formation (Turgeon et Debuchy 2007). The knowledge about IR is still limited but, based on our observations, it is tempting to speculate that PaRid plays a key role in this process and/or in the bulging of the croziers. However, if so, our results indicate that it would not likely be through the same pathway than that of SMR1 since the expression of *PaRid* is not deregulated in the *ΔSmr1* mutant background and conversely the expression of *Smr1* is not deregulated in the *ΔPaRid* mutant background. Besides, by contrast to the *ΔPaRid* and *ΔSmr1* deletions, the previously identified *Podospora* mutants affecting the zygotic lineage generate either uninuclear croziers (Graña et al. 2000; Arnaise et al. 2001; K Bouhouche et al. 2004) or plurinuclear croziers (Berteaux-Lecellier et al. 1998). Consequently, because the corresponding mutants do form these early hook-shaped structures, PaRid probably acts at earlier developmental steps than Smr2, Cro1 and Ami1, which is in line with its expression pattern.

The *ΔPaRid* mutant phenotype resembles the ones observed in *A. immersus* (F Malagnac et al. 1997) and in *A. nidulans* (D. W. Lee et al. 2008a), where development of croziers and of the subsequent ascospores was never observed in *Masc1* mutant and *DmtA* mutant, respectively. Remarkably, development of *Trichoderma reesei* deleted for the *rid* homologue gives also rise to barren perithecia, it allows the formation of dikaryotic cells.

Indeed, the sexual development of homozygous *Trichoderma rid* mutant crosses is blocked latter on, during the prophase of the first meiotic division Wan-Chen Li and Ting-Fang Wang, personal communication. On the contrary, no such fertility defect was observed in *Neurospora* crosses homozygous for the *rid* null allele (Freitag et al. 2002b) although this fungus shows heavy DNA methylation of repeats subjected to RIP. Subsequently, the function of *rid* orthologs has also been addressed in fungal species that reproduce asexually (*Aspergillus flavus* (K. Yang et al. 2016), *Cryphonectria parasitica* (So et al. 2018), *Metarhizium robertsii*, (Yulong Wang et al. 2017)). Interestingly, in addition to a decrease of DNA methylation contents, the absence of DNMT-like fungal specific Rid/Masc1 proteins resulted in a large palette of phenotypes including reduction of clonal dispersion (conidiation and sclerotial production), defects of mycelium morphology, decrease in secondary metabolite production and/or virulence toward plant hosts. In *Magnaporthe grisea*, a pathogenic fungus that can reproduce through both sexual and asexual reproduction, deletion of the *rid* ortholog has also a negative impact on conidiation and mycelium morphology but not on virulence (Jeon et al. 2015).

Altogether, these observations are puzzling. It led us to consider why a quite conserved gene known to be involved in RIP-like genome defense systems would be functional and play a essential role during the sexual development in organisms showing RIP mutations at low level and very little genomic DNA methylation if any. One can wonder if the RIP, as a genome defense mechanism operating in the dikaryotic cells, is by itself a checkpoint. In this hypothesis, in absence of the ‘quality control’ of the two haploid parental nuclei performed by the RIP before every single karyogamy, the sexual development might stop. In this study, it was not possible to test whether PaRid is also required for RIP since homozygous  $\Delta PaRid$  mutant crosses were barren unless for rare sporadic asci (only 12 recovered to date) and RIP frequency is low in *Podospora*. Yet, all of the 48 ascospores that we recovered from these mutant crosses were indistinguishable of that of wild-type: their shape and pigmentation were standard, they germinated efficiently and subsequent genetic analyses showed that they did not result from uniparental lineages. This means that the development of the few dikaryotic cells that escaped the blockage proceeded normally. Consequently, if RIP functions as a checkpoint, once circumvented, there is no further obstacle to the sexual development in absence of PaRid.

Alternatively, PaRid might play a dual role, possibly relying on two independent enzymatic functions: one as the central effector of RIP and the other as a regulator of gene expression during developmental processes.

Our results show that during sexual development the PaRid function relies on its methyltransferase activity and that this enzymatic activity has to be present in the female partner. We also demonstrated that PaDim2, a canonical DNA methyltransferase is dispensable to every aspect of *Podospora* life cycle we looked at. One possibility is that PaRid *de novo* methylation may occur in female gamete genome establishing maternal transient imprinting patterns. Then, during the early phase of sexual development, this specific pattern may be further sustained by PaRid itself but not maintained beyond the formation of the dikaryotic cells. If true, this also explains why DNA methylation is not detected in vegetative tissues. Indeed, ascogonia, the female gametes, are small structures of specialized hyphae that differentiate within the mycelium (Peraza-Reyes et Malagnac 2016). As such, they represent an extremely low fraction of the so-called “vegetative” tissue when four-day-old mycelium was collected to extract total RNA. This might be why no *PaRid* mRNAs were detected at this stage while genetic data further supported by cytoplasmic observations indicate that PaRid is specifically present in the female gametes. Besides, it is interesting to note that regulation of the *PaRid* pattern of expression, both in terms of timing and cell-type specificity, might as well proceed through post-transcriptional and/or post-translational mechanisms since driving its expression from a constitutive promoter did not result in any unusual phenotypes. Although we did not detect any evidence of antisense *PaRid* transcript as described in *A. nidulans* (D. W. Lee et al. 2008a), regulation of expression through non-coding RNA (ncRNA) is widely conserved in eukaryotes and could be in *Podospora* as well. Since it has been exemplified in many organisms (mammals, drosophila, plants, *S. pombe* (Keller et Bühler 2013; Taylor et al. 2015)) we cannot rule out that pattern of expression of *PaRid* is also regulated by ncRNA. Alternatively, the PaRid half-life might be tightly regulated by the ubiquitin proteasome system (van der Lee et al. 2014; Collins et Goldberg 2017). Again, this hypothesis remains to be further explored.

Masc1/RID proteins form a quite ancient group of proteins, which initial DNA-methyltransferase function might have evolved during the evolutionary time scale. The predicted structures of RID homologues, although conserved, are not identical (Amselem, Lebrun, et Quesneville 2015). The predicted sequences of the Masc1/DmtA/TrRid/PaRid proteins include a compact catalytic domain with a short C-terminal extension (at most 133 aa for *Podospora*) when compared to that of *Neurospora* (260 aa). Mutant analyses revealed that the Masc1/DmtA/TrRid/PaRid proteins fulfill both sexual developmental functions and genome defense (either RIP is still active or present as relics in the genomes), whereas the *Neurospora* RID protein plays a more specialized role, limited to its genome defense function.

Taken these observations altogether, one can ask whether the long C-terminal extension of *Neurospora* RID would be responsible for its restricted function. However, neither the *Masc1* allele nor the *DmtA* allele restored the fertility defect of  $\Delta PaRid$  mutants. This may indicate that despite a structural and a functional conservation of the Masc1/DmtA/TrRid/PaRid group of proteins, some species-specific co-factors would be required for enzymatic catalysis. To date, none of them has been identified, although it has been suggested that the DIM-2 ortholog of *M. grisea*, MoDIM-2, mediates the MoRID *de novo* methylation (Ikeda et al. 2013; Jeon et al. 2015). Our results established that it is probably not the case in *Podospora*.

Finally, since the Masc1/DmtA/TrRid/PaRid group appears to have a non-canonical motif VI structure when compared to all other prokaryotic and eukaryotic C5-cytosine methyltransferases (Goll et Bestor 2005) it is possible that this class of enzymes might have acquired exclusive catalytic and/or substrate properties (Gladyshev 2017). Although they do not share the features of Dnmt2, the mammal tRNA methyltransferase, it is tempting to hypothesize that some of these fungal DNMT-like enzymes could methylate RNA substrate(s). If true, this might explain why no clear nuclear localization signal was found in the PaRid protein and provide a consistent molecular basis to explain the maternal effect of the  $\Delta PaRid$  mutation.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RD, FB, VB, FM. Performed the experiments: HT, RB, FB, ABJ, PG, VB, FC, FM. Analyzed the data: HT, PG, RD, FB, FM. Contributed reagents/materials/analysis tools: HT, RB, FB, ABJ, PG, VB, FC, FM. Wrote the paper: FM.

## Acknowledgments

We acknowledge the technical assistance of Sylvie François. We are thankful to Philippe Silar for providing resources to start the project as well as for fruitful scientific discussion and to Ting-Fang Wang for sharing unpublished data and stimulating scientific discussion. P. G., FC. and F.M. were supported by grants from UMR8621, UMR9198 and Agence Nationale de la Recherche Grant ANR- 05-Blan-O385-02. We thank the Podospora Consortium for the gift of GA0AB186AD09 and of GA0AB186AD09.

## Figure legends

### Figure 1. Structure and Phylogenetic analysis of DNA methyltransferases proteins.

(A) Structure of *Podospora anserina*'s putative DNA methyltransferases. The catalytic domains contain 10 conserved motifs (I - X) and a target recognition domain (TRD) located between the motifs VIII and IX. The amino acid length of each protein is indicated.

(B) Structure of DNA methyltransferase proteins. The functional domain analysis was performed using InterProScan and visualized using IBS. *Mus musculus*: MmDnmt1 (AAH53047.1), MmDnmt2 (AAC40130.1), MmDnmt3 (AAF73868.1); *Ascobolus immersus*, AiMasc1 (AAC49849.1), AiMasc3; *Aspergillus nidulans* AnDmtA (AAO37378.1), *Neurospora crassa* NcRid (AAM27415.1), NcDim2 (AAK49954.1); *Podospora anserina* PaRid, PaDim2; *Trichoderma reesei* TrRid (), TrDim2 (). Cytosine-specific DNA methyltransferase domains: PF00145, PR00105, PS51679, PS00095, PS00094; protein-DNA interaction domains: bromo-associated homology (BAH) domain PS51038, Replication foci targeting sequence (RFTS) PF12047, Zinc finger motif (CXXC) PS51058, PWWP domain, PF00855).

(C) Phylogenetic analysis of mammal, plant and fungal DNA methyltransferases. The maximum likelihood tree resolved five groups i) the Dnmt1/Met1/CMT group (purple), ii) the Dnmt2, group (black) iii) the Dnmt3/DRM group (blue) iv) the fungal Dim2-like group (red) and v) the fungal-specific Rid-like group (green). Homologous CDS of *Haemophilus aegyptius* (HaeMTase, ). (homologous CDS of *Neurospora crassa* (N.c; NCU01789.1), *Magnaporthe grisea* (M.g; MG06673.4), *Fusarium graminearum* (F.g; FG10835.1), *Aspergillus fumigatus* (A.f; Afu5g13970) and *Aspergillus nidulans* (A.n; AN2701.2).).

(D) Comparison of the amino acid sequence of the catalytic motifs IV and VI. A key catalytic step is the nucleophilic attack of the DNA methyltransferases on the sixth carbon of the target cytosine. This attack is made by the cysteine residue (red arrow) of the conserved PCQ triad (motif IV). This reaction is catalyzed by protonation of the N3 position of the cytosine by the glutamate residue of the conserved ENV triad (motif VI). In the Masc1/Rid-like groups of enzymes, the ENV triad is replaced by either the EQT triad (e.g. *Neurospora* Rid, *Ascobolus* Masc1, *Podospora* Rid, etc.) or the EET triad (e.g. *Botrytis* Rid, *Geomyces* Rid, etc...). This suggests that the Masc1/RID proteins might have unique substrate and/or catalytic requirements. At: *Arabidopsis thaliana*, Mm: *Mus musculus*, Cg: *Cenococcum geophilum*, Mg: *Magnaporthe grisea*, Tr: *Trichoderma reesei*, Fg: *Fusarium graminearum*, Nc: *Neurospora crassa*, Pa: *Podospora anserina*, Gd: *Geomyces destructans*, Bc: *Botrytis cinerea*, Ci: *Coccidioides immitis*. Ai: *Ascobolus immersus*, Tm: *Tuber melanosporum*, An: *Aspergillus nidulans*. See above for accession numbers of the corresponding proteins.

**Figure 2. PaRid is essential to complete fruiting body development and to produce aconspores.**

(A) Homozygous crosses of wild-type S strains (left panel) and of  $\Delta PaRid$  strains (right panel) on M2 medium after 5 days at 27°C. Each dark dot is one fruiting body resulting from one event of fertilization. The homozygous  $\Delta PaRid$  cross forms reduced size fruiting bodies only (right panel).

(B) Close up of fruiting bodies (perithecia) originating from either a wild-type genetic background (left panel) or a  $\Delta PaRid$  genetic background (right panel, [micro-perithecium] phenotype). Scale bar 250µm.

(C) After 4 days of growth at 27°C, the wild-type fruiting bodies start to produce ascospores (left panel) while the mutant micro-perithecia are barren (right panel). Zeiss Primo Star, x40 magnification, scale bar 50µm.

(D) Light microscopy picture of 48h-old fruiting body content from homozygous crosses of wild-type S strains (left panel) and of  $\Delta PaRid$  strains (right panel), performed on M2 medium at 27°C. The nuclei are visualized thanks to histone H1-GFP allele. Croziers are readily formed in the wild-type perithecia (left panel, white arrows) while no crozier but large plurinucleate ascogonial cells only are seen in the  $\Delta PaRid$  perithecia. Pictures were taken with the Leica DMIRE2 microscope, x63 magnification, scale bar 10µm.

### **Figure 3: Subcellular localization and differential expression of PaRid during life cycle.**

PaRid-GFP expression was assayed from a  $\Delta PaRid:AS4-PaRid-GFP-HA$  strain showing wild-type phenotypes. No GFP signal can be observed in mycelium (A), nor in spermatia (B, white arrows are pointing at spermatia). However, a significative and specific GFP signal can be found in ascogonia (C, white arrows are pointing at ascogonia) and prothoperithecia (D). Surprisingly, inside the perithecia, the GFP signal can only be found in the latest stages of ascospores development. No GFP signal is observed in the croziers (E, white arrows are pointing at croziers) but a very strong signal can be noticed in the mature ascospores (F, white arrows are pointing at the nucleus of one ascospore), showing both a nuclear and cytoplasmic localization of the RID protein. From left to right: bright-field (pol), DAPI staining, GFP channel and merge of the two latest. Pictures were taken with the Leica DMIRE2 microscope, X20 (A, C and D) X40 (B) X63 (E and F) magnification, scale bar 1,5µm (A, C and D), 3µm (B), 5µm (E and F).

### **Figure 4: Transcriptomic analysis experimental design and data filtering**

(A) Schematic developmental time course from fertilization to ascospore maturation. Total RNA was extracted from wild-type crosses at T12, T24, T30 (open circles) and T42 (solid circle); from female  $\Delta PaRid$  crossed to wild-type male at T42 (solid circle); from homozygous  $\Delta Smr1$  crosses at T42 (solid circle). Light microphotographs of the upper panel illustrate the various developmental steps indicated along the time course.

**(B)** Data filtering strategy. Because micro-perithecium phenotype by itself might be responsible for a sizeable part of the differentially expressed genes, we hypothesized that developmental arrest of micro-perithecia, prior dikaryotic cell formation, might generate massive cellular stresses that results in transcription reprogramming, irrespective of the initial *ΔPaRid* mutation. Consequently, from the complete *ΔPaRid* DE gene “initial set”, we withdrew the genes differentially expressed in the *Δsmr1* background, providing that they were deregulated in the same way (either UP or DOWN). This filtering strategy gave us the *ΔPaRid* DE gene “specific set”.

**(C)** Pipeline of genes DE selected. FC: Fold Change.

### **Figure 5: PaRid genetic network**

**(A)** Venn diagrams indicate genes DE specific of the three analyzed time points (T12, T24h and T30h) and those shared between two or three time points in the mutant strain *ΔPaRid* compared to wild type strain. A : genes DE down regulated, B : genes DE up-regulated

**(B)** Heatmap of the clustering analysis of DE genes in the mutant strain *ΔPaRid* compared to wild type strain at 12, 24 et 30 hours after fertilization. At the bottom : Average profile of the clusters, at the center : Percentage of genes DE per cluster

**(C)** Funct analysis enrichment.

### **Table 1: Complementation experiments**

A collection of alleles was introduced in a *ΔPaRid* strain and subsequent transformants where crossed to a *ΔPaRid* strain of compatible mating type. Number of fertile versus sterile transformants is indicated in the table. When none of the tranformants showed a restored fertility, PCR amplifications were performed to check the presence of full length ectopic alleles. Those from which we cannot amplify the corresponding fragment were discarded. For each transformation experiments, expression of the HA-tagged proteins was assayed on a subset of transformants (see Fig sup 7). See results section for details on allele features.



### **Supplementary Figure 1: Pattern of expression of *PaRid* and *PaDim2*.**

Average expression profiles (y-axis) of *PaRid* (Pa\_1\_19440), *PaDim2* (Pa\_5\_9100), *SMR1* and *SMR2* during sexual development (x-axis, hours).

### **Supplementary Figure 2: Molecular characterization of knock-out mutants by Southern-blot hybridization.**

Schematic representations of the endogenous and disrupted loci are given in (3A and 3B). Replacement by homologous recombination of the wild-type *PaRid* allele by the disrupted  $\Delta PaRid$  allele results in the substitution of a 3.2 kb *Pst*I fragment by a 2.3 kb *Pst*I fragment as revealed by hybridization of the 5'UTR probe (3A) and in the substitution of a 2.8 kb *Pst*I fragment by a 4.0 kb *Pst*I fragment as revealed by hybridization of the 3'UTR probe (3A). Replacement by homologous recombination of the wild-type *PaDim2* allele by the disrupted  $\Delta PaDim2$  allele results in the substitution of two *Bgl*III fragments (8.4 kb and 4.5 kb) by a single 10.6 kb *Bgl*III fragment, when using both the 5'UTR and the 3'UTR probes.

### **Supplementary Figure 3: Major steps of *Podospora* life cycle as shown by a schematic representation (upper panel) and the corresponding light microphotographs (lower panel).**

*P. anserina* life cycle begins with the germination of an ascospore (A) that gives rise to a haploid mycelium (B). After three days of growth, both male gametes (spermatia, B top) and female gametes (ascogonia, B bottom) are formed. Because most of the ascospores carry two different and sexually compatible nuclei (mat<sup>+</sup> and mat<sup>-</sup>) *P. anserina* strains are self-fertile (pseudo-homothallism). Before fertilization occurs, ascogonia can mature into protoperithecia by recruiting protective maternal hyphae to shelter the ascogonial cell. A pheromone/receptor signaling system allows the ascogonia to recognize and fuse with spermatia of opposite mating type (heterothallism). Fertilization initiates the development of the fruiting bodies (perithecia, C) in which the dikaryotic mat<sup>+</sup>/mat<sup>-</sup> fertilized ascogonium forms. Further development leads to a three-celled hook-shaped structure called the crozier (D).

The two parental nuclei in the middle cell of the crozier fuse (karyogamy, schematic representation D) to form a diploid nucleus, which then immediately undergoes meiosis. The four resulting haploid nuclei undergo mitosis. In most cases, the eight nuclei are packed into four ascospores within the developing asci. On rare occasions, an ascospore is formed around only one haploid nucleus, leading to five-ascospore asci (E, photograph). Scale bar: 10  $\mu\text{m}$  in (a-d,f,h); 200  $\mu\text{m}$  in (e,g).

**Supplementary Figure 4: Morphological phenotype of  $\Delta PaRid$  and  $\Delta PaDim2$  single mutants,  $\Delta PaRid \Delta PaDim2$  double mutant and the complemented  $\Delta PaRid$ -pAS4-PaRid-HA- during vegetative growth.**

Strains were grown on M2 minimal medium for 6 days at 27°C. S : Wild-type strain. See Material and Methods section for details on the complemented  $\Delta PaRid$ -pAS4:PaRid:HA-strain.

**Supplementary Figure 5: Vegetative growth rates at various sub-optimal temperatures and longevity assays**

For each genotype, growth rate was assayed on 3 independent cultures after 4 days of growth at the indicated temperatures. Each experiment was performed three times. For each genotype, longevity was measured on three independent cultures, issued from three individual ascospores, as described (P Silar et Picard 1994).

**Supplementary Figure 6: Perithecia versus micro-perithecia development with respect to genetic backgrounds.**

(A) Perithecia obtained in the indicated trikaryons on M2 medium after 5 days at 27°C. The  $\Delta mat \times PaRid mat^- \times PaRid mat^+$  trikaryons form typical fully developed perithecia (left panels). By contrast, only blocked micro-perithecia are formed by the  $\Delta mat \times \Delta PaRid mat^- \times \Delta PaRid mat^+$  trikaryons (right panels).

(B) Heterozygous orientated crosses  $PaRid mat^- \times \Delta PaRid mat^+$  after 5 days at 27°C.

When the wild-type *PaRid* allele is present in the female gametes genome and the mutant  $\Delta PaRid$  allele is present in the male gamete genome fully developed perithecia are formed, conversely when the mutant  $\Delta PaRid$  allele is present in the female gametes and the wild-type *PaRid* allele is present in the male gamete, only blocked micro-perithecia are formed. Left panel scale bar 1 mm, right panel, scale bar 500  $\mu\text{m}$ .

(C) Morphological comparison of perithecia obtained from wild-type crosses (*PaRid*),  $\Delta PaRid$  crosses ( $\Delta PaRid$   $\Delta SMR1$ ) and crosses ( $\Delta SMR1$ ). Size and morphology of the  $\Delta PaRid$  and  $\Delta SMR1$  perithecia are alike. Scale bar 250  $\mu\text{m}$ .

**Supplementary Figure 7: Western immunoblot analysis of the HA-tagged PaRid proteins expressed from the various ectopic *PaRid* alleles.**

Western-blot was performed as described in Material and Methods section and probed with an anti-HA antibody that specifically detects the HA-tagged proteins. The PaRid protein (85 kda) was barely detectable when the expression of the ectopic alleles was driven from its native promoter ( $\Delta Rid + PaRID$ ,  $\Delta Rid + PaRID^{C403S}$ ). However, it was readily produced when the expression of the ectopic alleles was under the control of a strong and constitutive promoter ( $\Delta Rid + AS4-PaRid$ ,  $\Delta Rid + AS4-PaRid^{C403S}$ ).

Complementation of the fertility defect was obtained by insertion of the wild-type PaRid-HA allele or by insertion of a the AS4-*PaRid*-HA only.  $\Delta Rid$ :  $\Delta PaRid$  mutant strain (negative control),  $\Delta Rid + PaRID$ :  $\Delta PaRid$  mutant strain harboring an ectopic wild-type *PaRid*-HA allele (complemented strain),  $\Delta Rid + AS4-PaRid$ :  $\Delta PaRid$  mutant strain harboring an ectopic AS4-*PaRid*-HA allele (complemented strain),  $\Delta Rid + PaRID^{C403S}$ :  $\Delta PaRid$  mutant strain harboring an ectopic catalytically dead *PaRid*<sup>C403S</sup>-HA allele (non-complemented strain),  $\Delta Rid + AS4-PaRid^{C403S}$ :  $\Delta PaRid$  mutant strain harboring an ectopic AS4-*PaRid*<sup>C403S</sup>-HA allele (non-complemented strain). See the material and method section for details on the allele construction and features.

**Supplementary Figure 8: Micro-perithecium arrest induced an extensive transcriptional reprogramming.**

Venn diagrams indicate genes DE specific of the three analyzed time points (T12, T24h and T30h) and those shared between the mutant strain *ΔPaRid* and the mutant *ΔSmr1*.

**Supplementary Figure 9: *ΔPaRid* DE gene “specific set”.** Number of genes specifically DE in the mutant strain *ΔPaRid* compared to wild type strain at 12, 24 et 30 hours after fertilization

## Bibliography

Ait Benkhali J., E. Coppin, S. Brun, L. Peraza-Reyes, T. Martin, *et al.*, 2013 A network of HMG-box transcription factors regulates sexual cycle in the fungus *Podospora anserina*. *PLoS Genet.* 9: e1003642. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003642>

Altschul S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman, 1990 Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403–410. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1990.9999>

Amselem J., M.-H. Lebrun, and H. Quesneville, 2015 Whole genome comparative analysis of transposable elements provides new insight into mechanisms of their inactivation in fungal genomes. *BMC Genomics* 16: 141. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1347-1>

Arnaise S., D. Zickler, S. Le Bilot, C. Poisier, and R. Debuchy, 2001 Mutations in mating-type genes of the heterothallic fungus *Podospora anserina* lead to self-fertility. *Genetics* 159: 545–556.

Ausubel F., R. Brent, R. Kingston, D. Moore, J. Seidman, *et al.*, 1987 *Current protocols in molecular biology*. New York.

Bartee L., F. Malagnac, and J. Bender, 2001 Arabidopsis *cmt3* chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes Dev.* 15: 1753–1758. <https://doi.org/10.1101/gad.905701>

Becks L., and A. F. Agrawal, 2012 The evolution of sex is favoured during adaptation to new environments. *PLoS Biol.* 10: e1001317. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001317>

Benjamini Y., and Y. Hochberg, 1995 Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Stat Methodol* 57: 289–300.

Berteaux-Lecellier V., M. Picard, C. Thompson-Coffe, D. Zickler, A. Panvier-Adoutte, *et al.*, 1995 A nonmammalian homolog of the PAF1 gene (Zellweger syndrome) discovered as a gene involved in caryogamy in the fungus *Podospora anserina*. *Cell* 81: 1043–1051.

Berteaux-Lecellier V., D. Zickler, R. Debuchy, A. Panvier-Adoutte, C. Thompson-Coffe, *et al.*, 1998 A homologue of the yeast SHE4 gene is essential for the transition between the syncytial and cellular stages during sexual reproduction of the fungus *Podospora anserina*. *EMBO J.* 17: 1248–1258. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.5.1248>

- Bestor T. H., 1988 Cloning of a mammalian DNA methyltransferase. *Gene* 74: 9–12.
- Bestor T. H., and G. L. Verdine, 1994 DNA methyltransferases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 380–389.
- Bidard F., S. Imbeaud, N. Reymond, O. Lespinet, P. Silar, *et al.*, 2010 A general framework for optimization of probes for gene expression microarray and its application to the fungus *Podospora anserina*. 3: 171.
- Bidard F., J. Aït Benkhali, E. Coppin, S. Imbeaud, P. Grognet, *et al.*, 2011 Genome-wide gene expression profiling of fertilization competent mycelium in opposite mating types in the heterothallic fungus *Podospora anserina*. *PloS One* 6: e21476. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021476>
- Bidard F., C. Clavé, and S. J. Saupe, 2013 The transcriptional response to nonself in the fungus *Podospora anserina*. *G3 Bethesda Md* 3: 1015–1030. <https://doi.org/10.1534/g3.113.006262>
- Bouhouche K., D. Zickler, R. Debuchy, and S. Arnaise, 2004 Altering a gene involved in nuclear distribution increases the repeat-induced point mutation process in the fungus *Podospora anserina*. *Genetics* 167: 151–159.
- Bruggeman J., A. J. M. Debets, P. J. Wijngaarden, J. A. G. M. deVisser, and R. F. Hoekstra, 2003 Sex slows down the accumulation of deleterious mutations in the homothallic fungus *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 164: 479–485.
- Brygoo Y., and R. Debuchy, 1985 Transformation by integration in *Podospora anserina*. I. Methodology and phenomenology. *Mol Gen Genet* 200: 128–131.
- Cao X., N. M. Springer, M. G. Muszynski, R. L. Phillips, S. Kaeppler, *et al.*, 2000 Conserved plant genes with similarity to mammalian de novo DNA methyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 4979–4984.
- Clutterbuck A. J., 2011 Genomic evidence of repeat-induced point mutation (RIP) in filamentous ascomycetes. *Fungal Genet. Biol.* FG B 48: 306–326. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.09.002>
- Collins G. A., and A. L. Goldberg, 2017 The Logic of the 26S Proteasome. *Cell* 169: 792–806. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.023>

- Coppin E., S. Arnaise, V. Contamine, and M. Picard, 1993 Deletion of the mating-type sequences in *Podospora anserina* abolishes mating without affecting vegetative functions and sexual differentiation. *Mol. Gen. Genet.* MGG 241: 409–414.
- Dyer P. S., P. Inderbitzin, and R. Debuchy, 2016 Mating-Type Structure, Function, Regulation and Evolution in the Pezizomycotina, pp. 351–385 in *Growth, Differentiation and Sexuality*, Mycota. Springer International Publishing.
- Espagne E., O. Lespinet, F. Malagnac, C. Da Silva, O. Jaillon, *et al.*, 2008 The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserina*. *Genome Biol.* 9: R77. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-5-r77>
- Finnegan E. J., and E. S. Dennis, 1993 Isolation and identification by sequence homology of a putative cytosine methyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 21: 2383–2388.
- Finnegan E. J., W. J. Peacock, and E. S. Dennis, 1996 Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 8449–8454.
- Freitag M., R. L. Williams, G. O. Kothe, and E. U. Selker, 2002 A cytosine methyltransferase homologue is essential for repeat-induced point mutation in *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 8802–8807. <https://doi.org/10.1073/pnas.132212899>
- Gladyshev E., 2017 Repeat-Induced Point Mutation and Other Genome Defense Mechanisms in Fungi. *Microbiol. Spectr.* 5. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0042-2017>
- Goddard M. R., H. C. J. Godfray, and A. Burt, 2005 Sex increases the efficacy of natural selection in experimental yeast populations. *Nature* 434: 636–640. <https://doi.org/10.1038/nature03405>
- Goll M. G., and T. H. Bestor, 2005 Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 481–514. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721>
- Goll M. G., F. Kirpekar, K. A. Maggert, J. A. Yoder, C.-L. Hsieh, *et al.*, 2006 Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* 311: 395–398. <https://doi.org/10.1126/science.1120976>

- Graia F., V. Berteaux-Lecellier, D. Zickler, and M. Picard, 2000 *ami1*, an orthologue of the *Aspergillus nidulans* *apsA* gene, is involved in nuclear migration events throughout the life cycle of *Podospora anserina*. *Genetics* 155: 633–646.
- Graia F., O. Lespinet, B. Rimbault, M. Dequard-Chablat, E. Coppin, *et al.*, 2001 Genome quality control: RIP (repeat-induced point mutation) comes to *Podospora*. *Mol. Microbiol.* 40: 586–595.
- Grigoriev I. V., R. Nikitin, S. Haridas, A. Kuo, R. Ohm, *et al.*, 2014 MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Res.* 42: D699-704. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1183>
- Grognet P., H. Lalucque, and P. Silar, 2012 The PaAlr1 magnesium transporter is required for ascospore development in *Podospora anserina*. *Fungal Biol.* 116: 1111–1118. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.08.004>
- Grognet P., F. Bidard, C. Kuchly, L. C. H. Tong, E. Coppin, *et al.*, 2014 Maintaining two mating types: structure of the mating type locus and its role in heterokaryosis in *Podospora anserina*. *Genetics* 197: 421–432. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.159988>
- Grossetête S., B. Labedan, and O. Lespinet, 2010 FUNGIpath: a tool to assess fungal metabolic pathways predicted by orthology. *BMC Genomics* 11: 81. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-81>
- Guindon S., J.-F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk, *et al.*, 2010 New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59: 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Hane, Williams, Taranto, Solomon, and Oliver, 2015 Repeat-Induced Point Mutation in Fungi: A Fungal-Specific Endogenous Mutagenesis Process, pp. 55–68 in *Genetic Transformation Systems in Fungi*, Verlag: Springer.
- Henikoff S., and L. Comai, 1998 A DNA methyltransferase homolog with a chromodomain exists in multiple polymorphic forms in *Arabidopsis*. *Genetics* 149: 307–318.
- Howe E., K. Holton, S. Nair, D. Schlauch, R. Sinha, *et al.*, 2010 *MeV: MultiExperiment Viewer*. Springer, Boston, MA.
- Ikeda K., B. Van Vu, N. Kadotani, M. Tanaka, T. Murata, *et al.*, 2013 Is the fungus



Magnaporthe losing DNA methylation? *Genetics* 195: 845–855.  
<https://doi.org/10.1534/genetics.113.155978>

Jamet-Vierny C., R. Debuchy, M. Prigent, and P. Silar, 2007 IDC1, a pezizomycotina-specific gene that belongs to the PaMpk1 MAP kinase transduction cascade of the filamentous fungus *Podospira anserina*. *Fungal Genet. Biol.* FG B 44: 1219–1230.  
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.04.005>

Jeon J., J. Choi, G.-W. Lee, S.-Y. Park, A. Huh, *et al.*, 2015 Genome-wide profiling of DNA methylation provides insights into epigenetic regulation of fungal development in a plant pathogenic fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Sci. Rep.* 5: 8567. <https://doi.org/10.1038/srep08567>

Judson O. P., and B. B. Normark, 1996 Ancient asexual scandals. *Trends Ecol. Evol.* 11: 41–46.

Kato M., T. Curk, Q. Xu, B. Zupan, A. Kuspa, *et al.*, 2006 Developmentally regulated DNA methylation in *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryot. Cell* 5: 18–25.  
<https://doi.org/10.1128/EC.5.1.18-25.2006>

Keller C., and M. Bühler, 2013 Chromatin-associated ncRNA activities. *Chromosome Res.* 21: 627–641. <https://doi.org/10.1007/s10577-013-9390-8>

Kicka S., C. Bonnet, A. K. Sobering, L. P. Ganesan, and P. Silar, 2006 A mitotically inheritable unit containing a MAP kinase module. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 13445–13450.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0603693103>

Klix V., M. Nowrousian, C. Ringelberg, J. J. Loros, J. C. Dunlap, *et al.*, 2010 Functional characterization of MAT1-1-specific mating-type genes in the homothallic ascomycete *Sordaria macrospora* provides new insights into essential and nonessential sexual regulators. *Eukaryot. Cell* 9: 894–905. <https://doi.org/10.1128/EC.00019-10>

Kouzminova E., and E. U. Selker, 2001 dim-2 encodes a DNA methyltransferase responsible for all known cytosine methylation in *Neurospora*. *EMBO J.* 20: 4309–4323.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/20.15.4309>

Lalucque H., F. Malagnac, S. Brun, S. Kicka, and P. Silar, 2012 A non-Mendelian MAPK-generated hereditary unit controlled by a second MAPK pathway in *Podospira anserina*. *Genetics* 191: 419–433. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.139469>

Lalucque H., F. Malagnac, K. Green, V. Gautier, P. Grognet, *et al.*, 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. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.12.016>

Lambou K., F. Malagnac, C. Barbisan, D. Tharreau, M.-H. Lebrun, *et al.*, 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. <https://doi.org/10.1128/EC.00149-08>

Law J. A., and S. E. Jacobsen, 2010 Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* 11: 204–220. <https://doi.org/10.1038/nrg2719>

Lecellier G., and P. Silar, 1994 Rapid methods for nucleic acids extraction from Petri dish-grown mycelia. *Curr. Genet.* 25: 122–123.

Lee D. W., R. J. Pratt, M. McLaughlin, and R. Aramayo, 2003 An argonaute-like protein is required for meiotic silencing. *Genetics* 164: 821–828.

Lee D. W., M. Freitag, E. U. Selker, and R. Aramayo, 2008 A cytosine methyltransferase homologue is essential for sexual development in *Aspergillus nidulans*. *PloS One* 3: e2531. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002531>

Li E., T. H. Bestor, and R. Jaenisch, 1992 Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69: 915–926.

Li S., K. Myung, D. Guse, B. Donkin, R. H. Proctor, *et al.*, 2006 FvVE1 regulates filamentous growth, the ratio of microconidia to macroconidia and cell wall formation in *Fusarium verticillioides*. *Mol. Microbiol.* 62: 1418–1432. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05447.x>

Li W.-C., C.-L. Chen, and T.-F. Wang, 2018 Repeat-induced point (RIP) mutation in the industrial workhorse fungus *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8731-5>

Lindroth A. M., X. Cao, J. P. Jackson, D. Zilberman, C. M. McCallum, *et al.*, 2001 Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* 292: 2077–2080. <https://doi.org/10.1126/science.1059745>

- Liu H., Q. Wang, Y. He, L. Chen, C. Hao, *et al.*, 2016 Genome-wide A-to-I RNA editing in fungi independent of ADAR enzymes. *Genome Res.* 26: 499–509. <https://doi.org/10.1101/gr.199877.115>
- Liu H., Y. Li, D. Chen, Z. Qi, Q. Wang, *et al.*, 2017 A-to-I RNA editing is developmentally regulated and generally adaptive for sexual reproduction in *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114: E7756–E7765. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702591114>
- Lyko F., A. J. Whittaker, T. L. Orr-Weaver, and R. Jaenisch, 2000 The putative *Drosophila* methyltransferase gene *dDnmt2* is contained in a transposon-like element and is expressed specifically in ovaries. *Mech. Dev.* 95: 215–217.
- Malagnac F., B. Wendel, C. Goyon, G. Faugeron, D. Zickler, *et al.*, 1997 A gene essential for de novo methylation and development in *Ascobolus* reveals a novel type of eukaryotic DNA methyltransferase structure. *Cell* 91: 281–290.
- Malagnac F., H. Lalucque, G. Lepère, and P. Silar, 2004 Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genet. Biol.* FG B 41: 982–997. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.07.008>
- Marisa L., J.-L. Ichanté, N. Reymond, L. Aggerbeck, H. Delacroix, *et al.*, 2007 MAnGO: an interactive R-based tool for two-colour microarray analysis. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 23: 2339–2341. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm321>
- Okano M., S. Xie, and E. Li, 1998 Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat. Genet.* 19: 219–220. <https://doi.org/10.1038/890>
- Okano M., D. W. Bell, D. A. Haber, and E. Li, 1999 DNA methyltransferases *Dnmt3a* and *Dnmt3b* are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99: 247–257.
- Panning B., and R. Jaenisch, 1996 DNA hypomethylation can activate *Xist* expression and silence X-linked genes. *Genes Dev.* 10: 1991–2002.
- Peraza Reyes L., and V. Berteaux-Lecellier, 2013 Peroxisomes and sexual development in fungi. *Front. Physiol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00244>
- Peraza-Reyes L., and F. Malagnac, 2016 *Sexual Development in Fungi*. Springer.

- Rhounim L., J. L. Rossignol, and G. Faugeron, 1992 Epimutation of repeated genes in *Ascobolus immersus*. *EMBO J.* 11: 4451–4457.
- Rizet G., and C. Engelmann, 1949 Contribution à l'étude génétique d'un Ascomycète tétrasporé: *Podospora anserina*. *Rev Cytol Biol Veg* 11: 201–304.
- Ronemus M. J., M. Galbiati, C. Ticknor, J. Chen, and S. L. Dellaporta, 1996 Demethylation-induced developmental pleiotropy in *Arabidopsis*. *Science* 273: 654–657.
- Selker E. U., and J. N. Stevens, 1987 Signal for DNA methylation associated with tandem duplication in *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 7: 1032–1038.
- Silar P., and M. Picard, 1994 Increased longevity of EF-1 alpha high-fidelity mutants in *Podospora anserina*. *J. Mol. Biol.* 235: 231–236.
- Silar P., 1995 Two new easy-to-use vectors for transformations. *Fungal Genet Newsl* 42: 73.
- Silar P., 2011 Grafting as a method for studying development in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Biol.* 115: 793–802. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.06.005>
- Silar P., J.-M. Dauget, V. Gautier, P. Grognet, M. Chablat, *et al.*, 2018 A gene graveyard in the genome of the fungus *Podospora comata*. *Mol. Genet. Genomics* MGG. <https://doi.org/10.1007/s00438-018-1497-3>
- So K.-K., Y.-H. Ko, J. Chun, J. Bal, J. Jeon, *et al.*, 2018 Global DNA Methylation in the Chestnut Blight Fungus *Cryphonectria parasitica* and Genome-Wide Changes in DNA Methylation Accompanied with Sectorization. *Front. Plant Sci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00103>
- Taylor D. H., E. T.-J. Chu, R. Spektor, and P. D. Soloway, 2015 Long Non-Coding RNA Regulation of Reproduction and Development. *Mol. Reprod. Dev.* 82: 932–956. <https://doi.org/10.1002/mrd.22581>
- Testa A. C., R. P. Oliver, and J. K. Hane, 2016 OcculterCut: A Comprehensive Survey of AT-Rich Regions in Fungal Genomes. *Genome Biol. Evol.* 8: 2044–2064. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw121>
- Turgeon B. G., and R. Debuchy, 2007 *Cochliobolus* and *Podospora*: mechanism of sex determination and the evolution of reproductive lifestyle, in *Sex in Fungi, Molecular*

*Determination and Evolutionary Implications.*

van der Lee R., B. Lang, K. Kruse, J. Gsponer, N. Sánchez de Groot, *et al.*, 2014 Intrinsically Disordered Segments Affect Protein Half-Life in the Cell and during Evolution. *Cell Rep.* 8: 1832–1844. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.055>

Wang Y., B. Reddy, J. Thompson, H. Wang, K. Noma, *et al.*, 2009 Regulation of Set9-mediated H4K20 methylation by a PWWP domain protein. *Mol. Cell* 33: 428–437. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.02.002>

Wang Y., T. Wang, L. Qiao, J. Zhu, J. Fan, *et al.*, 2017 DNA methyltransferases contribute to the fungal development, stress tolerance and virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101: 4215–4226. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8197-5>

Yang K., L. Liang, F. Ran, Y. Liu, Z. Li, *et al.*, 2016 The DmtA methyltransferase contributes to *Aspergillus flavus* conidiation, sclerotial production, aflatoxin biosynthesis and virulence. *Sci. Rep.* 6: 23259. <https://doi.org/10.1038/srep23259>

Zheng Q., R. Hou, null Juanyu, null Zhang, J. Ma, *et al.*, 2013 The MAT locus genes play different roles in sexual reproduction and pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *PloS One* 8: e66980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066980>

Figure 1A

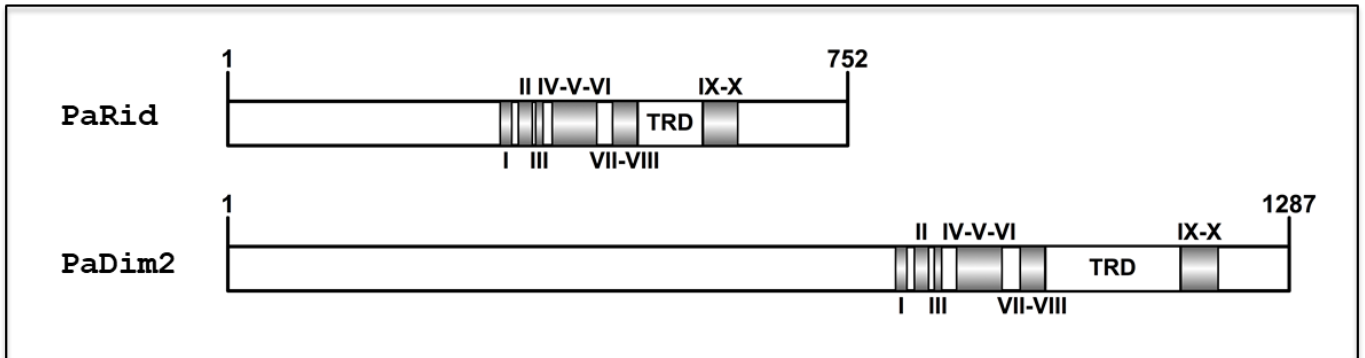


Figure 1B

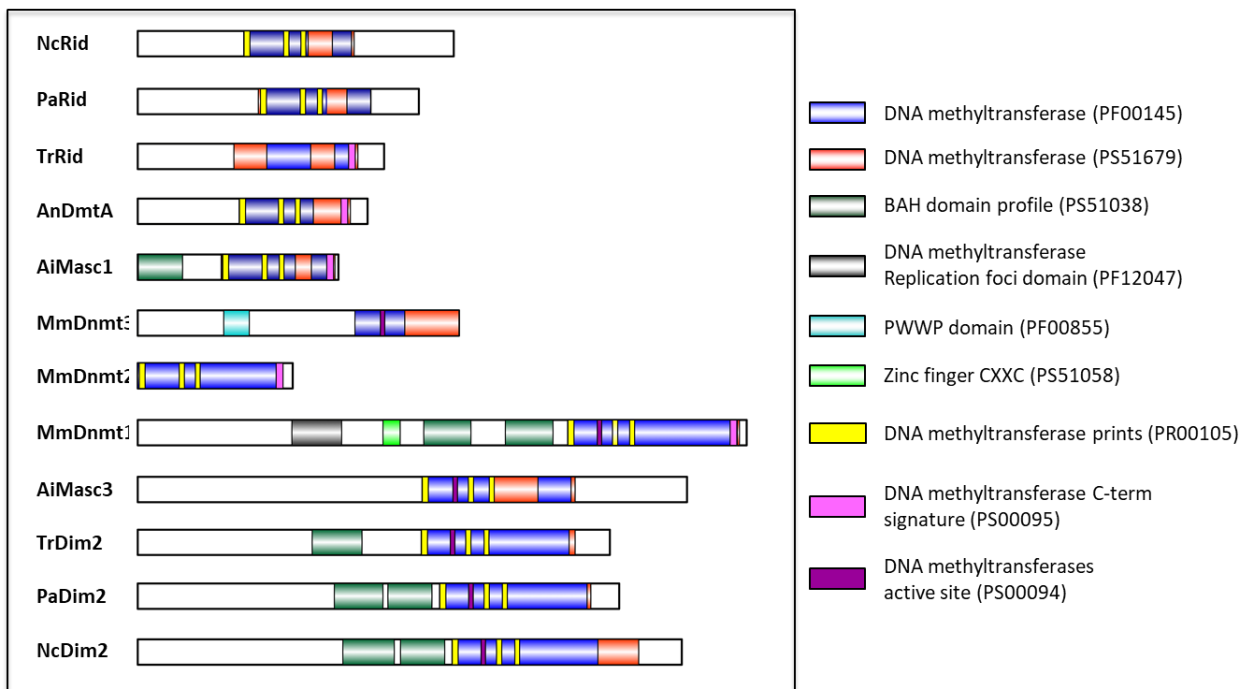
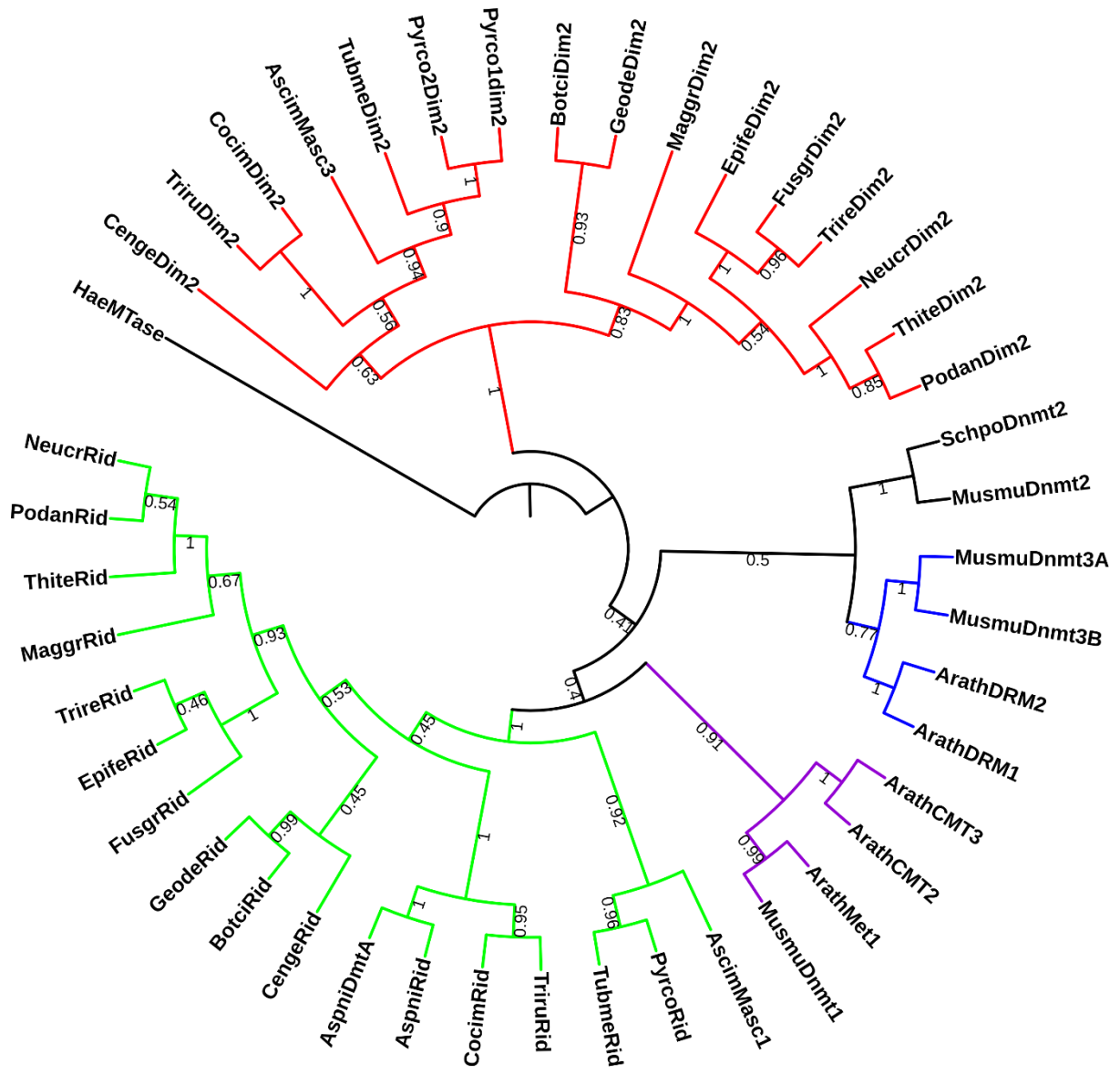


Figure 1C







**Figure 2**

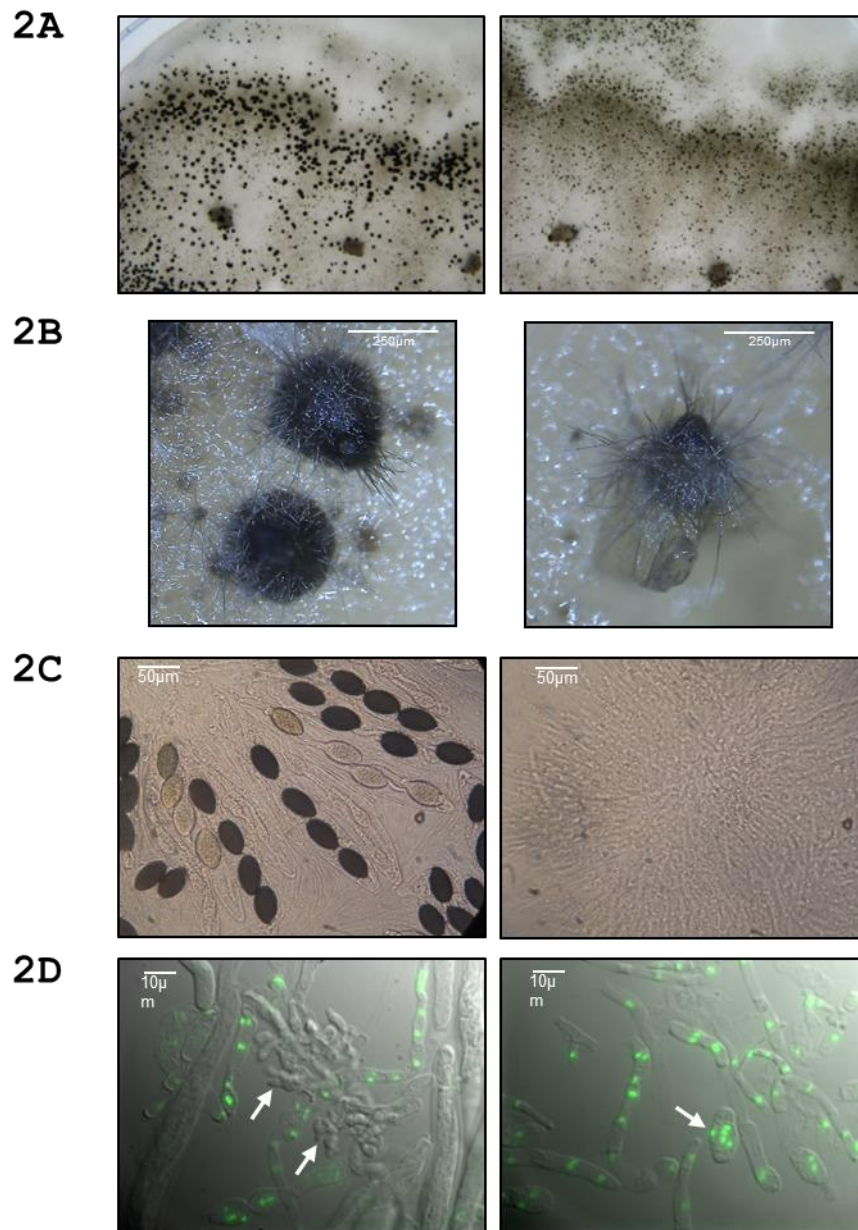


Figure 3

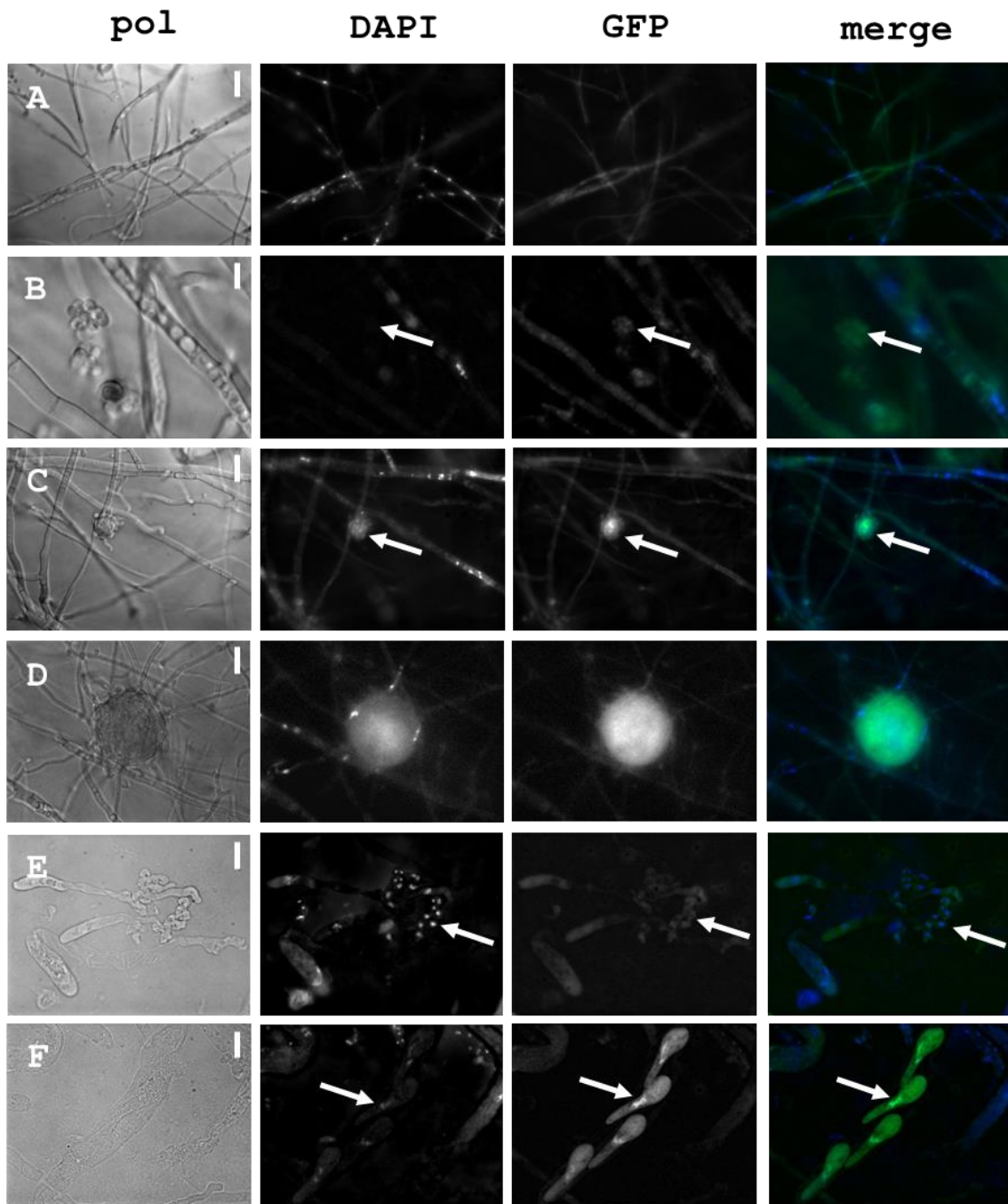


Figure 4A

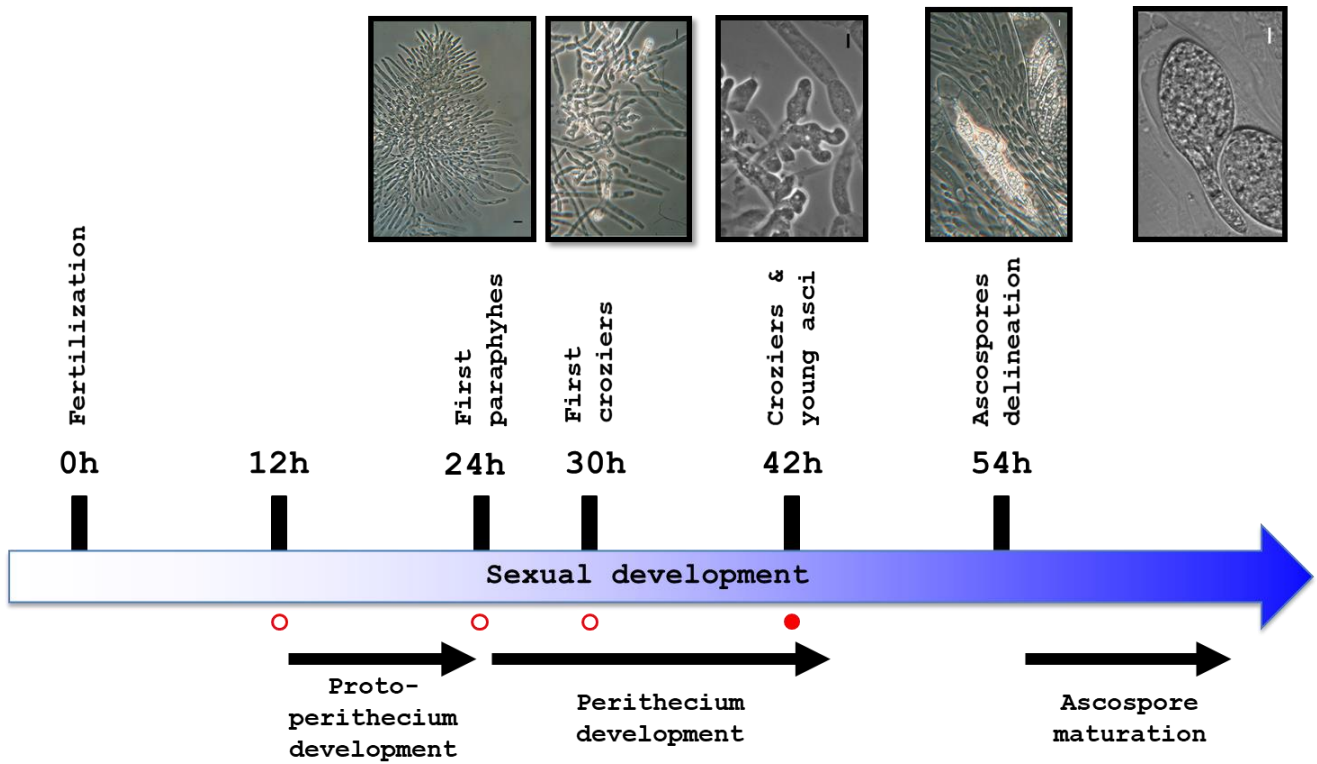
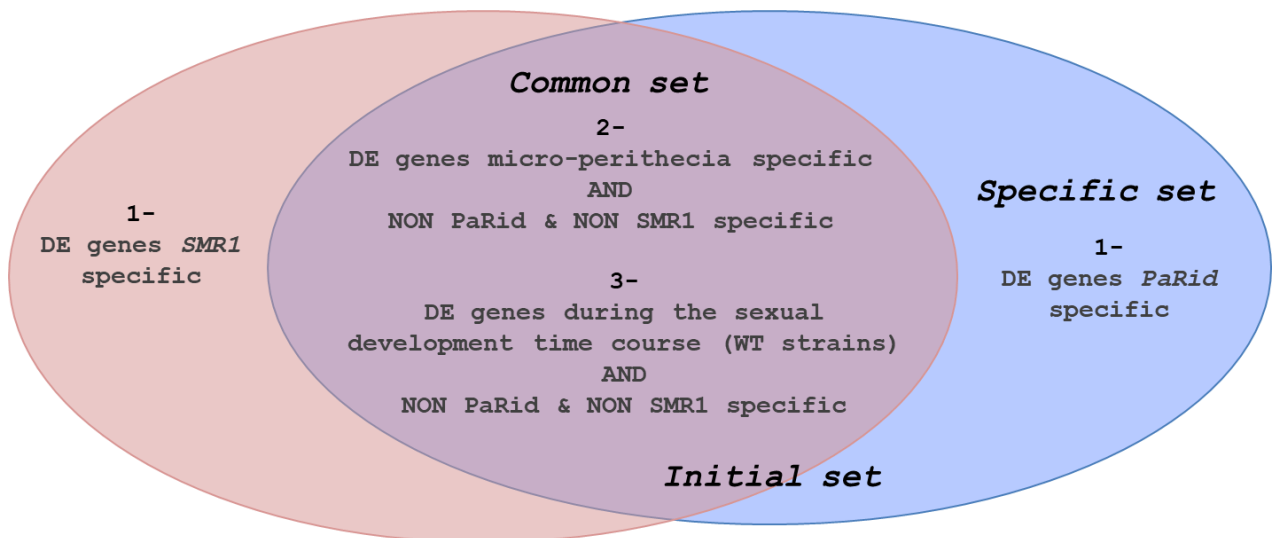


Figure 4B



**Figure 4C**

**Pipeline of genes DE selected**

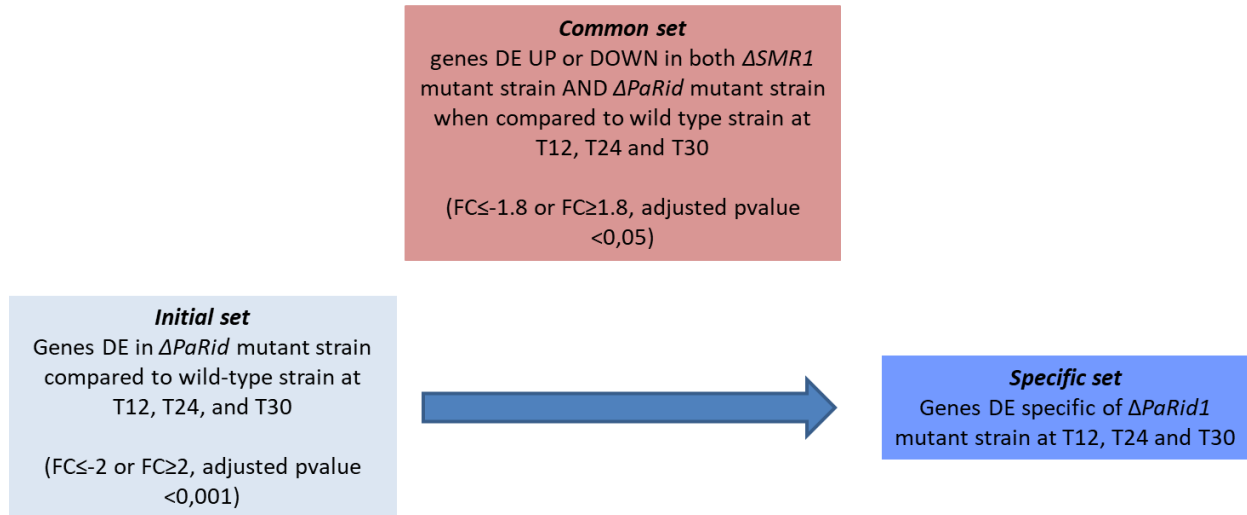


Figure 5A

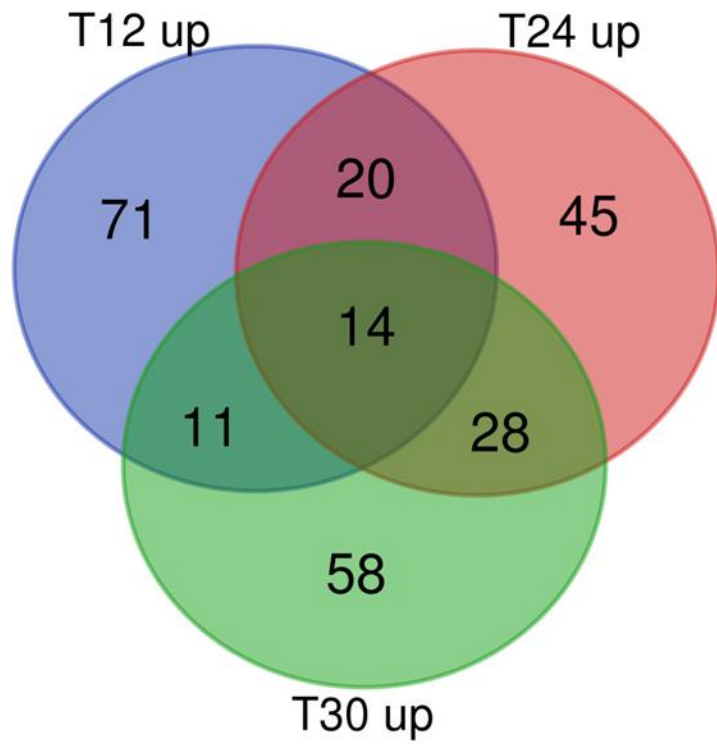


Figure 5B

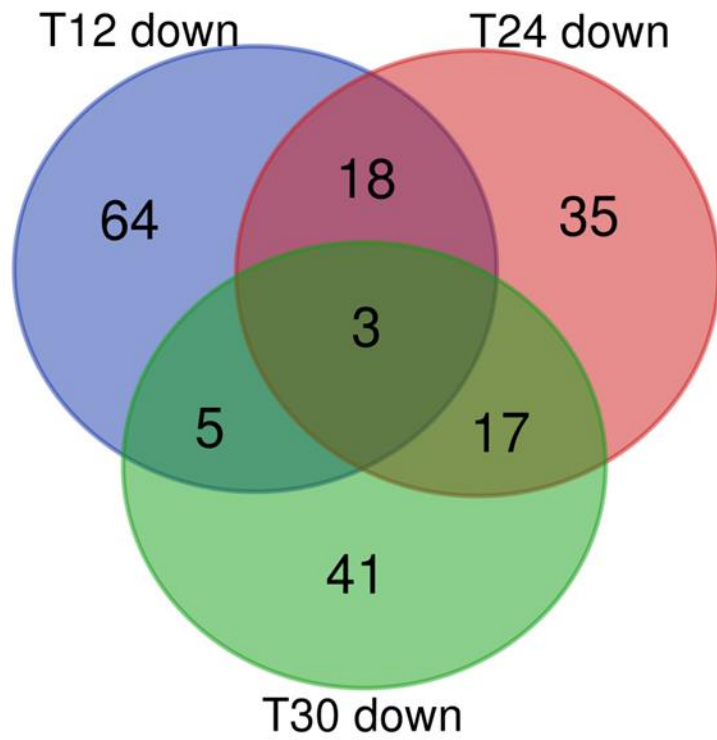
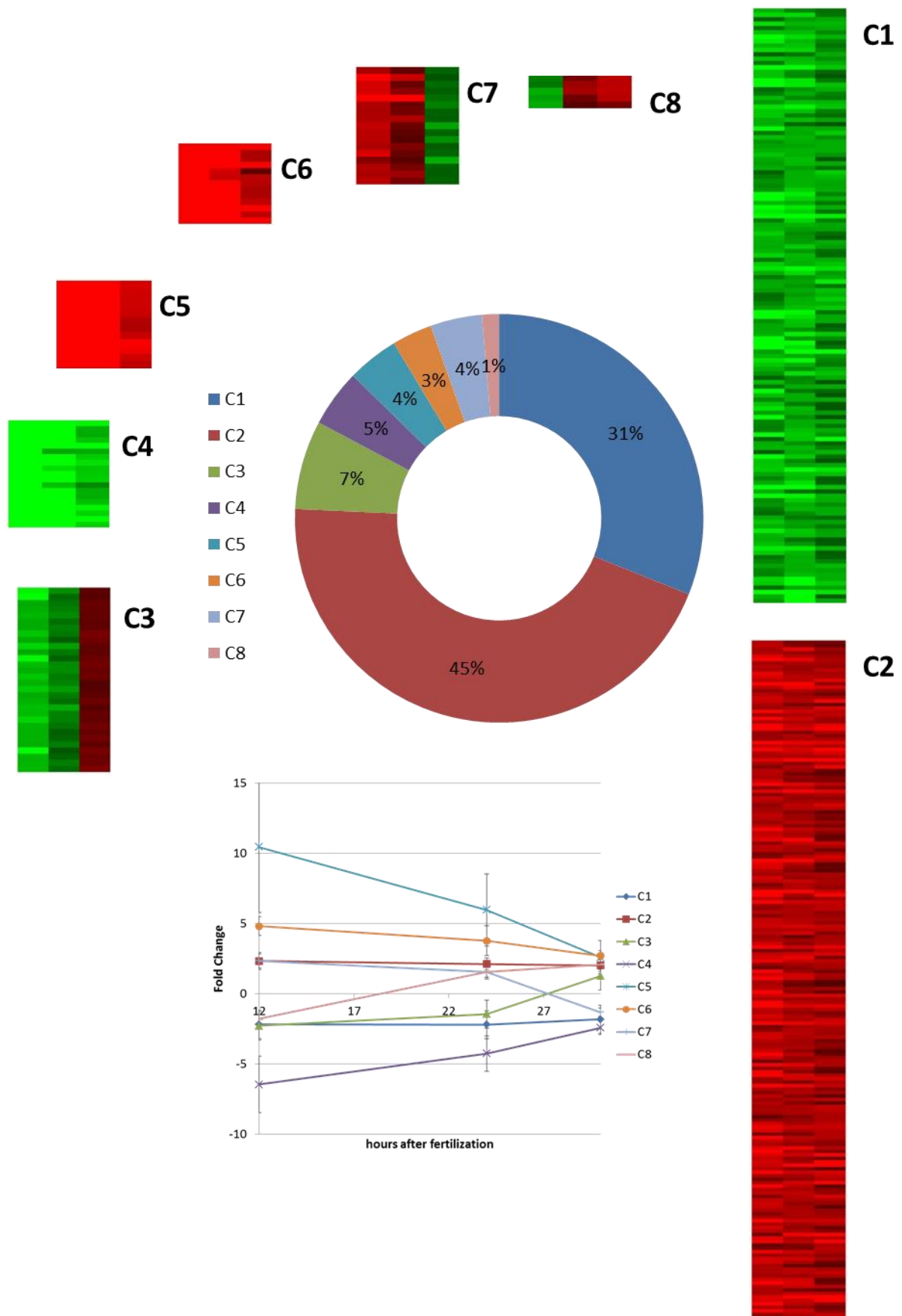
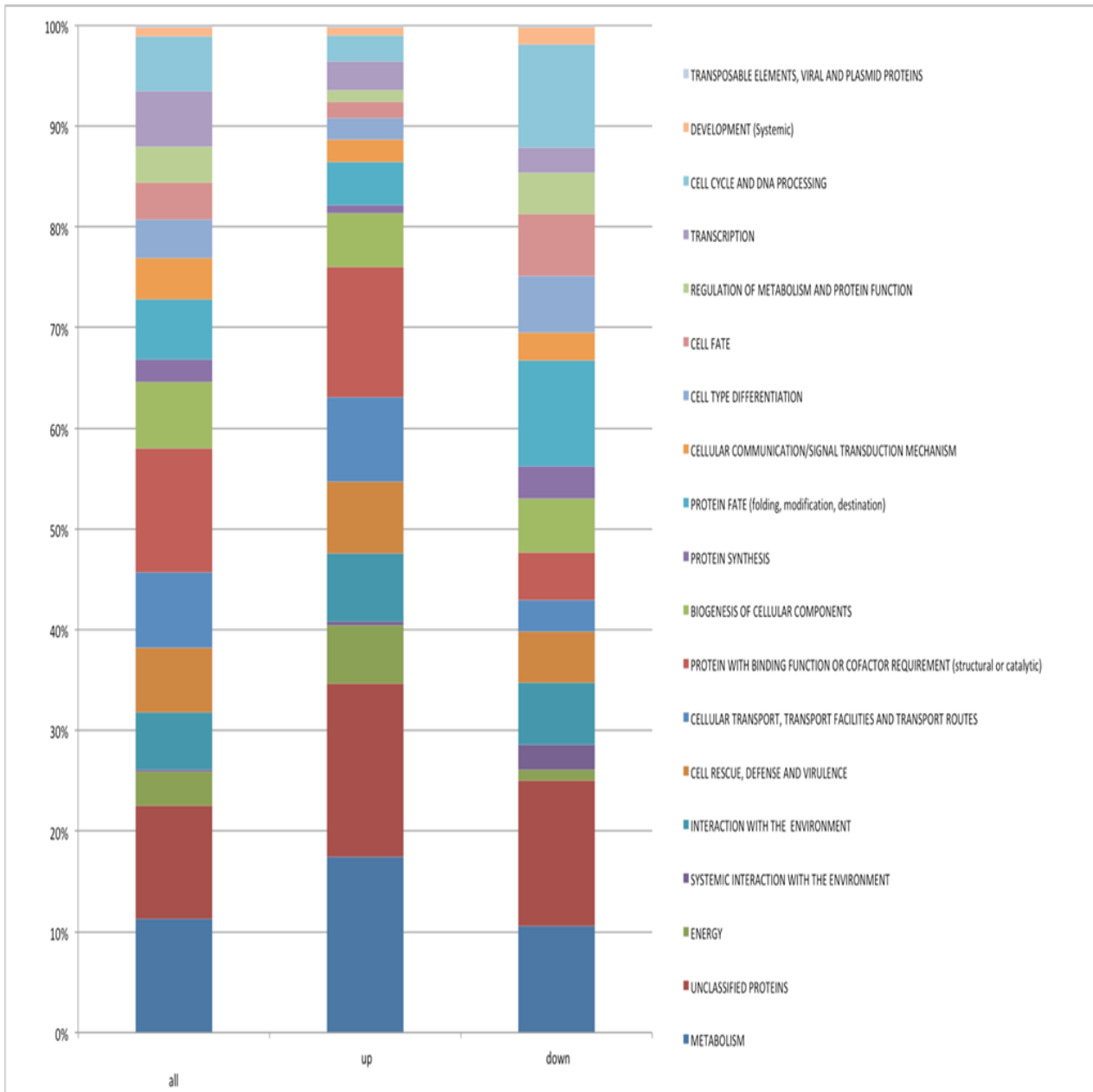


Figure 5C



**Figure 5D**

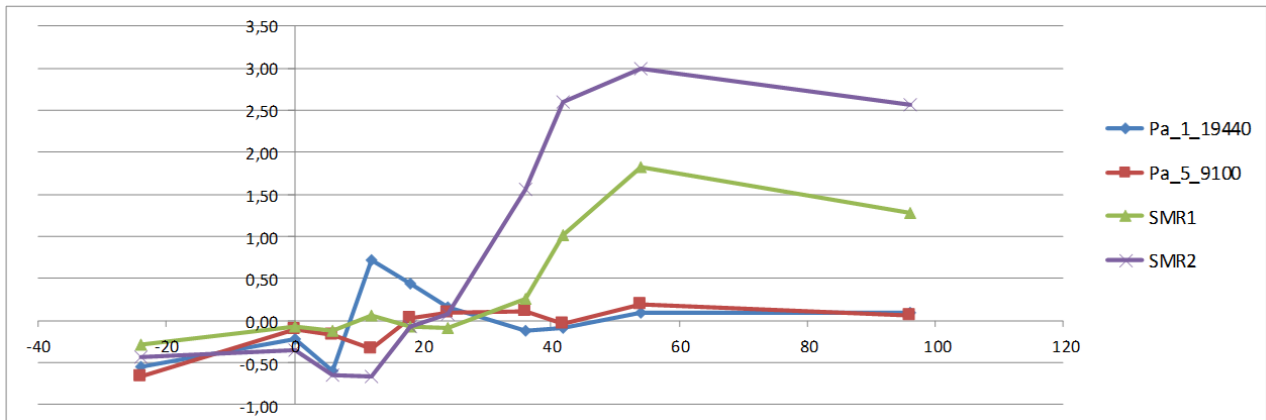


**Table 1: Complementation experiments.**

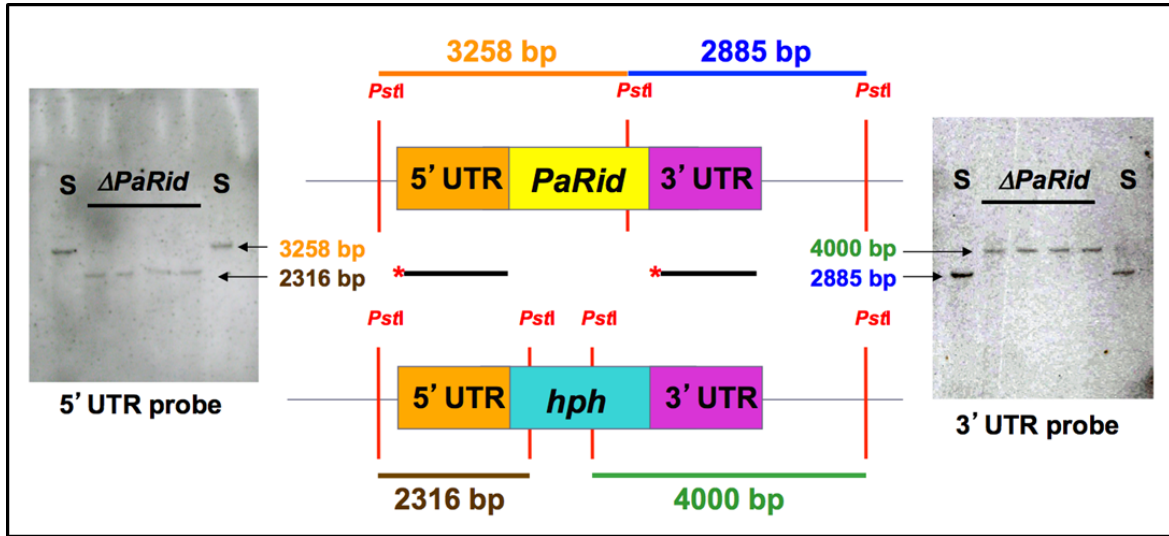
Alleles	Fertile	Sterile
<i>PaRid-HA</i>	92	17
<i>PaRid-GFP-HA</i>	20	43
<i>AS4-PaRID-HA</i>	52	26
<i>AS4-PaRid-GFP-HA</i>	61	34
<i>PaRID<sup>C403S</sup>-HA</i>	0	89
<i>AS4-PaRID<sup>C403S</sup>-HA</i>	55	0
<i>NcRID-HA</i>	0	120
<i>dmtA-HA</i>	0	112
<i>Masc1-HA</i>	0	86



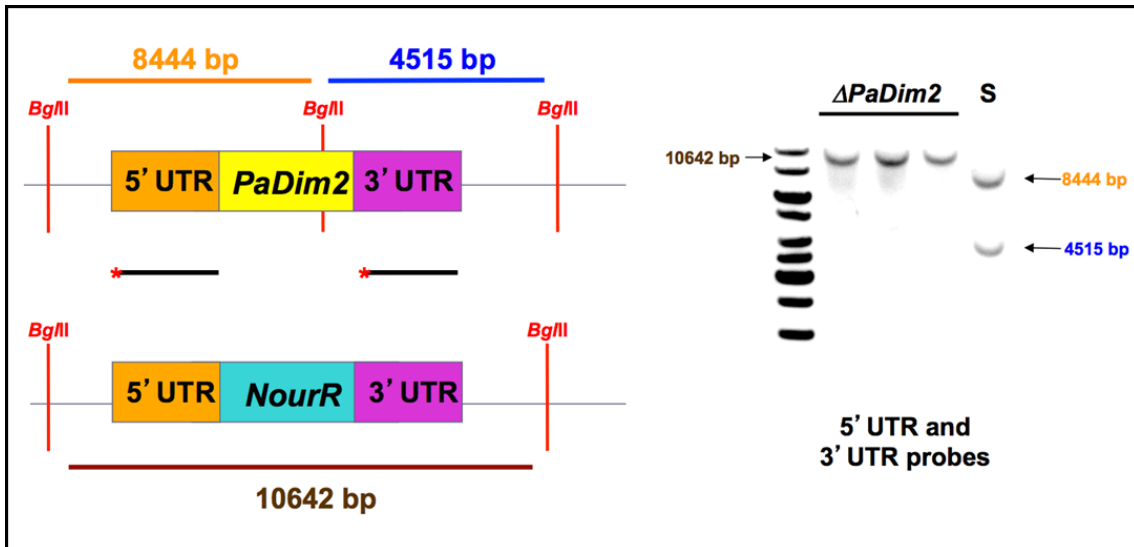
Supplementary figure 1



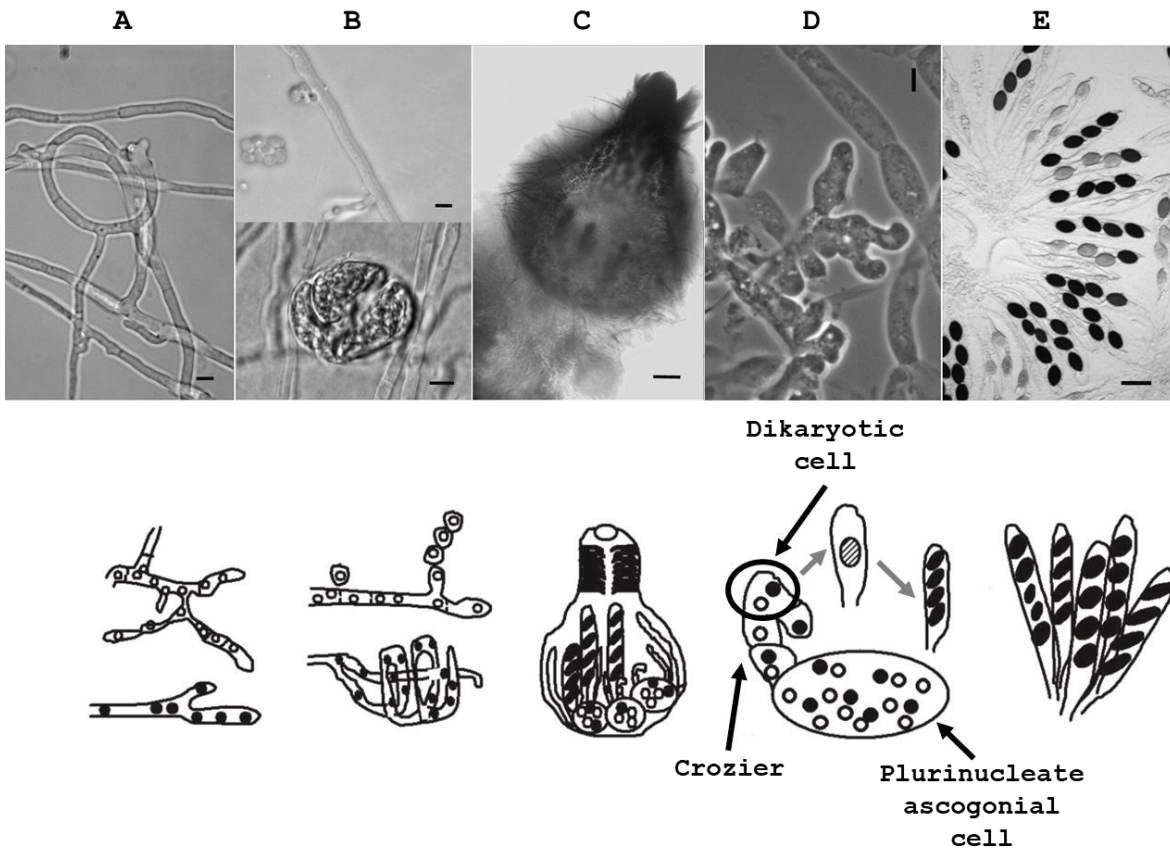
Supplementary figure 2A



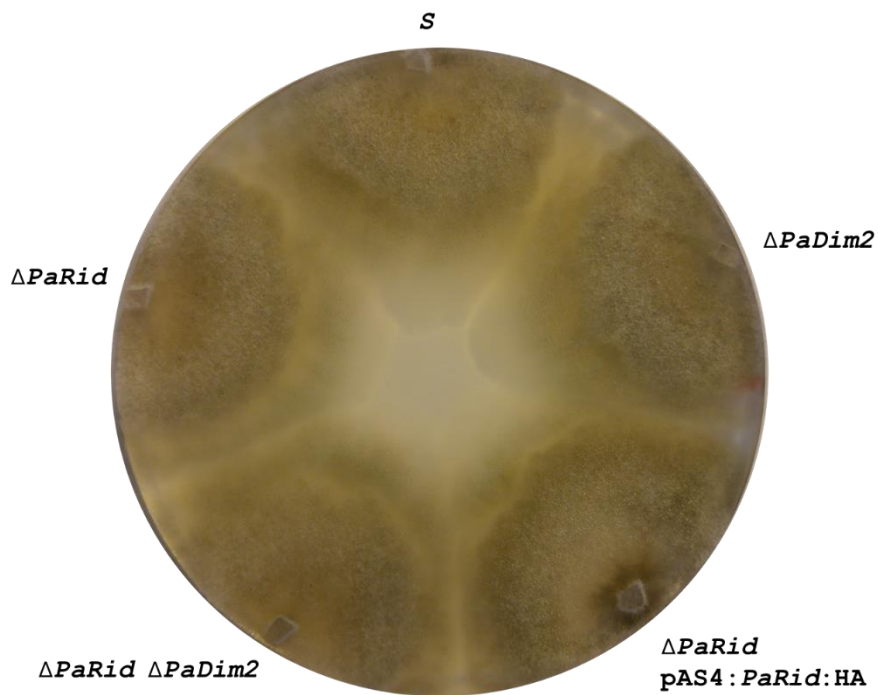
Supplementary figure 2B



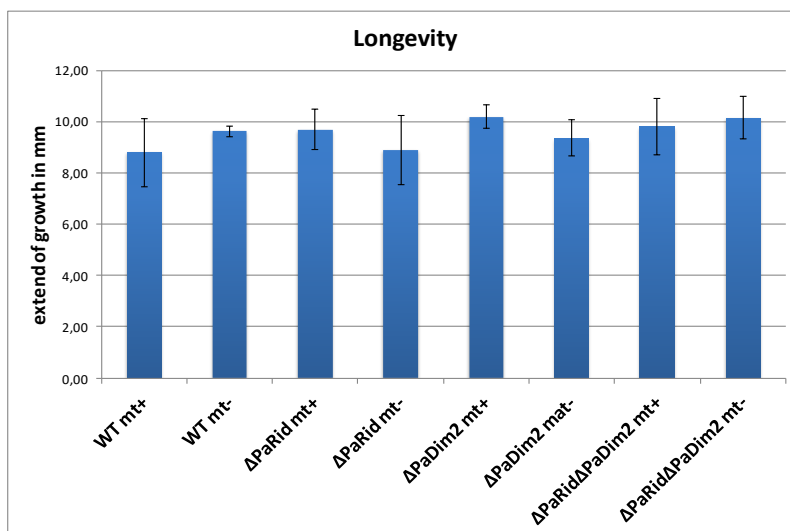
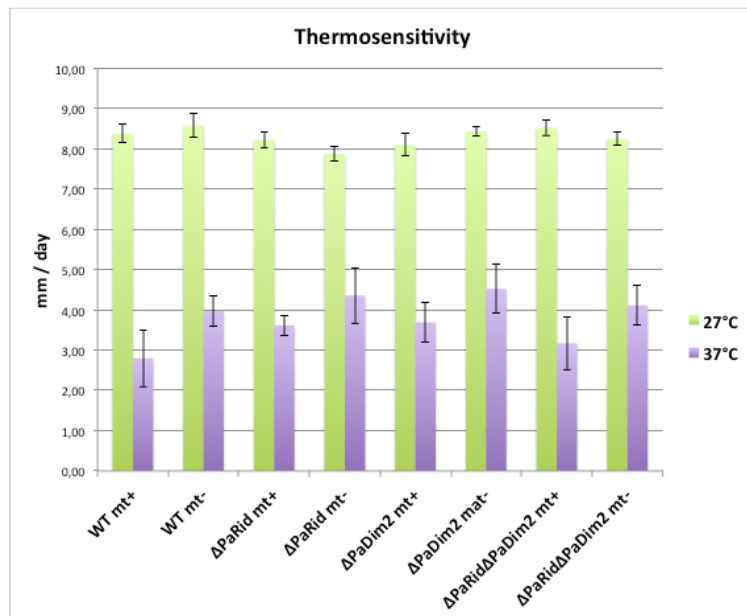
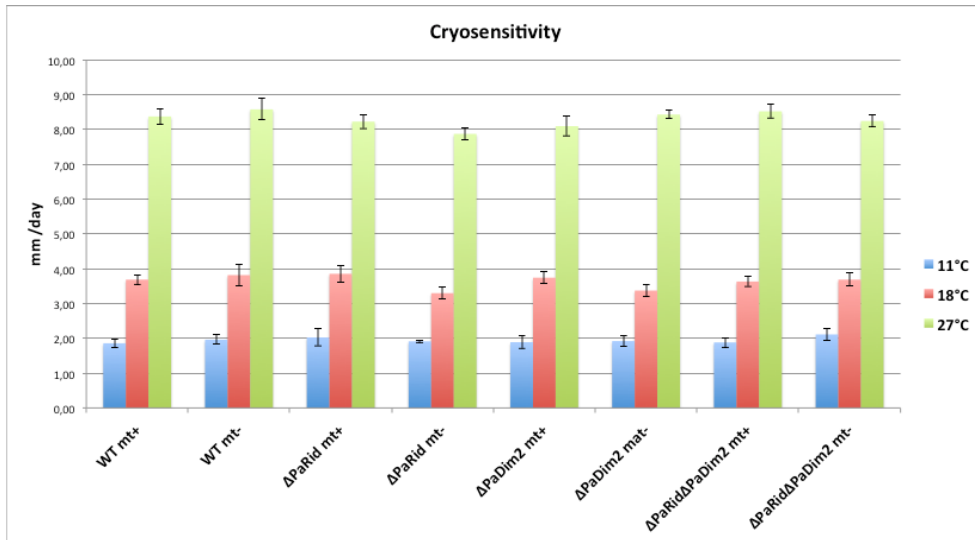
Supplementary figure 3



Supplementary figure 4

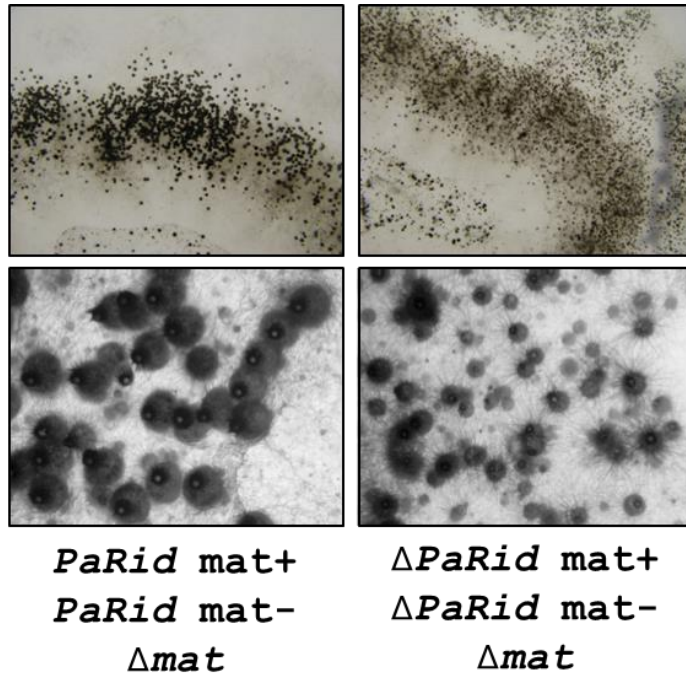


### Supplementary figure 5

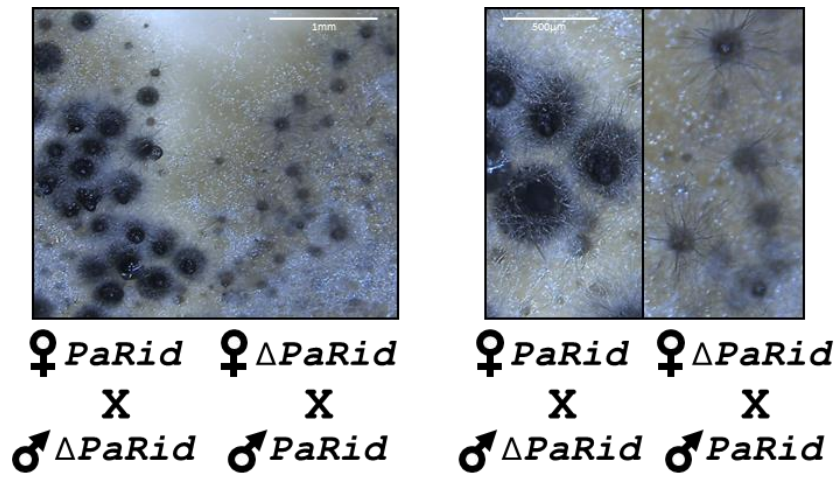


Supplementary figure 6

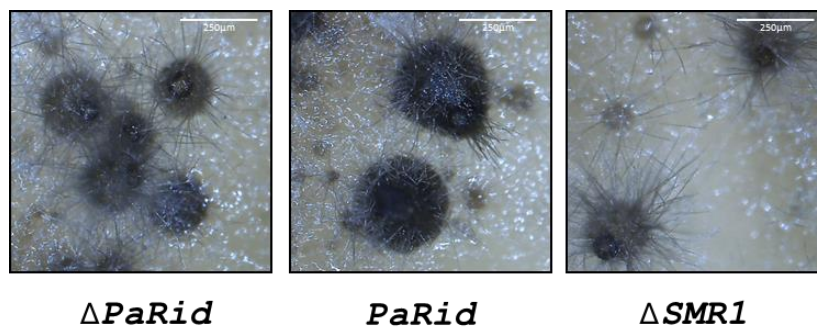
6A



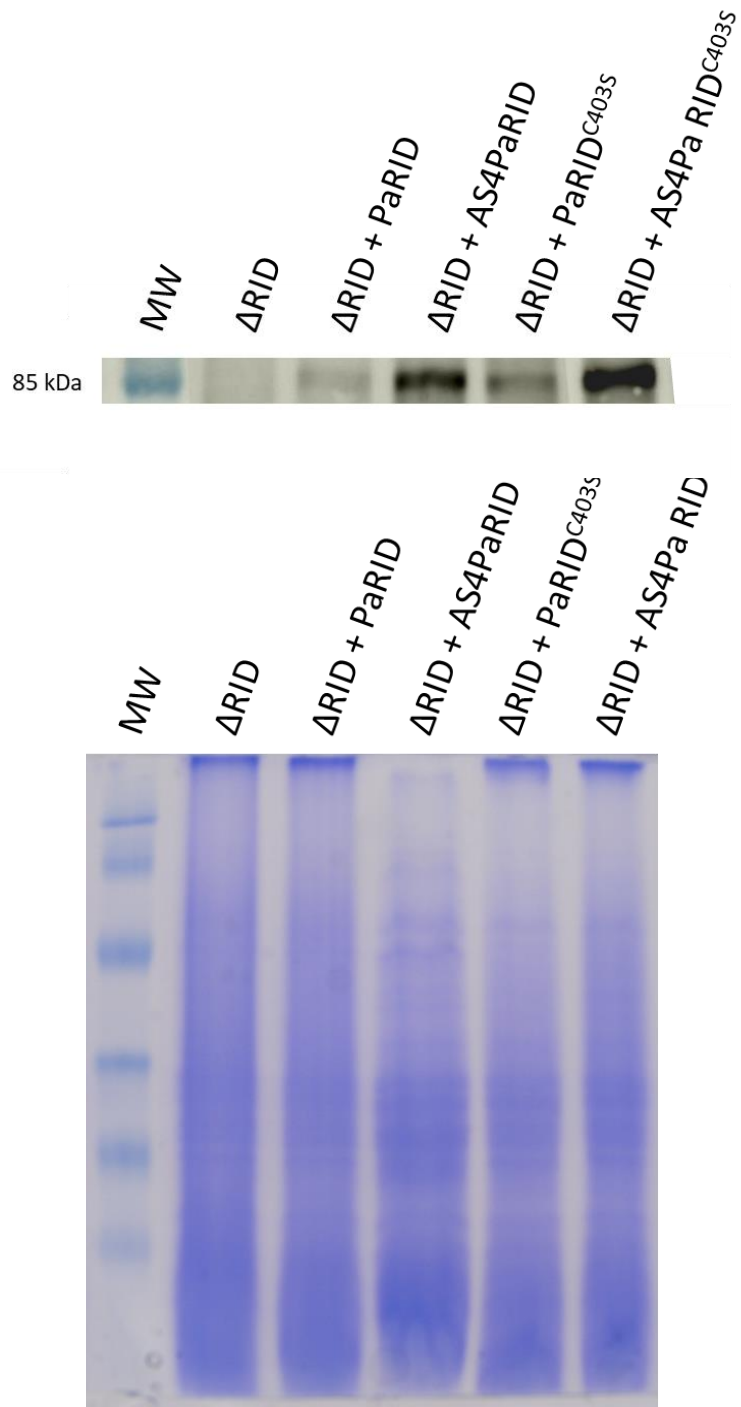
6B



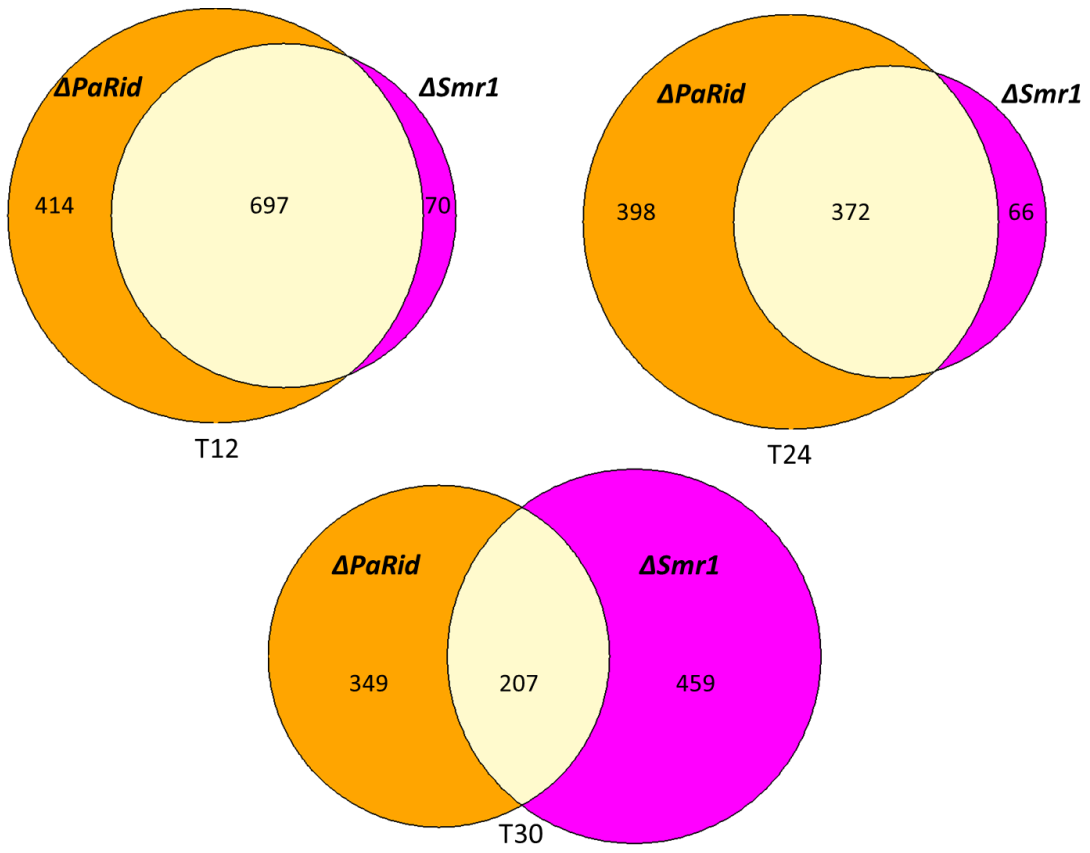
6C



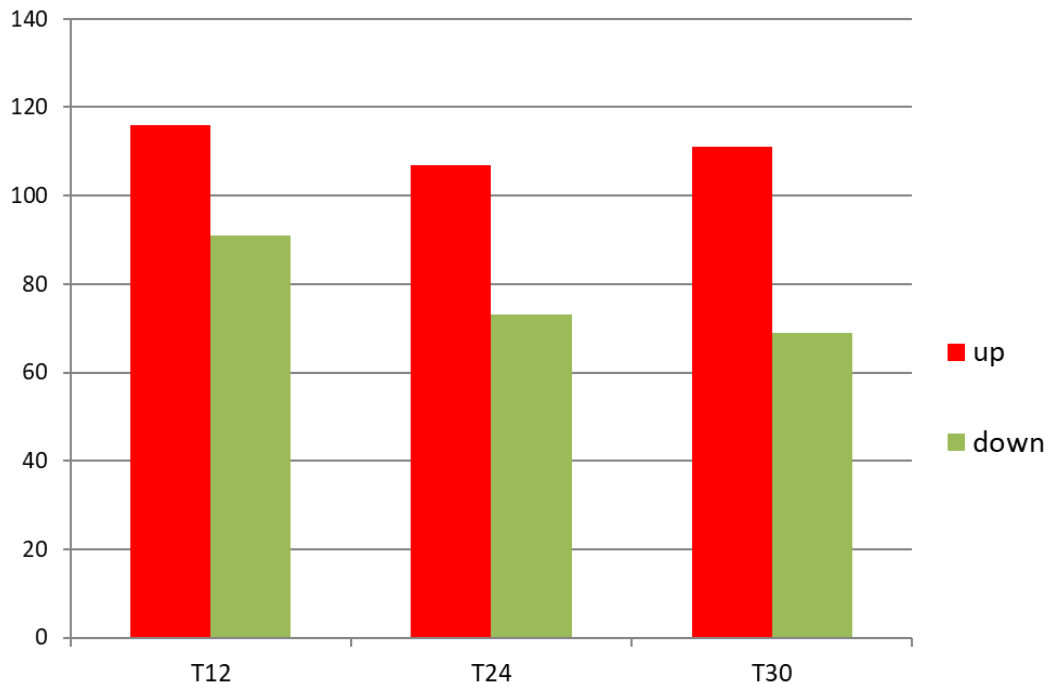
Supplementary figure 7



Supplementary figure 8



**Supplementary figure 9**





**Supplementary Table 1: Primers used in this study**

Primer Names	Primer sequences
ΔRID2F	CATTGGTCTTCCCAGTGACGTAACCAAC
ΔRID2R	CTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGAGAAGGAGCAAGAAGGATAAGGGCAACC
ΔRID3F	GGTTGCCCTTATCCTTCTTGCTCCTTCTCATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAG
ΔRID3R	GCTTCATAAGATCGCCAATAACATGCCACGGTTCAGGGCAGGGTCGTTAAATAG
ΔRID4F	CTATTTAACGACCCTGCCCTGAACCGTGGCATGTTATTGGCGATCTTATGAAGC
ΔRID4R	GCCAAATTCTGAACAGGGGTAGCTTTG
Dim2-1F	CAAGTCTCACTACAACGTCTCTCG
Mk_Dim2-2R	CTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATCCAGCACCTCATCATCC
Dim2-2_MkF	GGATGATGAGGGTGCTGGATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAG
Dim2-3_MkR	CGACTGAAACTGGAAATATGCTCGTTCAGGGCAGGGTCGTTAAATAG
Mk_Dim2-3F	CTATTTAACGACCCTGCCCTGAACCGAGCATATTTCCAGTTTCAGTCG
Dim2-4R	TTCCGAGTGGGTTATAAAGAGG
RIDmut1	TCCCCTCCGTCTCAGTTCTGGTCCCCGGC
RIDmut2	CAGAACTGAGACGGAGGGGAGAGGTGGAGG
PaRIDHAFXbal	ATCTAGATCAAATCACTGACCACTCAGC
PaRIDHAREcoRI	AGAATTCGGTCTCCCAATCAATAACC
AS4PaRIDmutF	GTGATCGCAAAACCGTCAGGAATTACAAAAAATGGCCGAAATTTACAACCCG
PaRIDmutAS4R	CGGGTTGTAAATTTGGCCATTTTTTTGTAATTCCTGACGGTTTTGCGATCAC
PaRIDAS4Xbal	ATCTAGACGTCTCCCAATCAATAACC
RIDGFPEcoRI	AGAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
RIDGFPRCln	AATCGATGGCGCTTGACTTGACAGCTCGTCC
NcRIDHAFNotI	AGCGGCCGCTGGAGGTATCCATTGACTTTCC
NcRIDHARBamHI	AGGATCCTAGTCTTGAGTCGTCGAAAAGCTCC
dmtAFXbal	ATCTAGAATGAGACAGTCAGCCTATATTTACCTAAC
dmtARBamHI	AGGATCCTTGGTTTTCTGTGCAATTCAC

AiRIDAS4Xbal	ATCTAGAACACCATGTCGGAAAGAAGATACG
AiRIDHAREcoRI	AGAATTCCTCCATCCTCTCGAAATCCTTCTCC
PaRIDF1	CGGTTGCCGACTTCTGTT
PaRIDF2	GGACATTCTCCAATACTGGACA
PaRIDF3	TTCACTGATCTGGAATATGCTG
PaRID1R	TCGGGTGTTTTGGAGTGG
NcRIDF2	AACATCTTGATGACATTCAG
NcRIDF3	ATCGATATTACAGAAGACG
NcRIDF4	ATGGTCATTTATTAGAGTGG
NcRIDF4bis	TGTCGAACAAACGTTCCGGC
NcRIDF5	TCGAATGCTTAGATAAACGGG
NcRIDF6	ACAAGGACGGGTTCAAAGGCC
NcRIDF7	TCTTGAAGGAGTTGGGCGG
AiRIDF3	TGTCGAAGCGCTTCGTCCTACGGG
5s-PaRid	GTTGTTACTCACACAAAAAATGG
3s-PaRid	CCACTCTCCTGCCAAAAGTCAATC
5m-PaDIM2	GCGGATTATTGCTAATTGTTTGG
3m-PaDIM2	GCTCATTCCAACACAACCAAGTG

**Supplementary Table 2: Vegetative phenotypic analyses**

	<i>PaRid</i>	$\Delta PaRid$	$\Delta PaDim2$
Growth rate on M2	See graph X		
Germination	100%	100%	100%
Senescence	See graph Y		
Cell fusion	Efficient	Efficient	Efficient
Vegetative Incompatibility S vs s	Cell death	Cell death	Cell death
Neutral osmo-sensitivity (saccharose 200g/l)	100%	100%	100%
Neutral osmo-sensitivity (sorbitol 200g/l)	100%	100%	100%
Ionic sensitivity (KCl 0.5M)	100%	100%	100%
Ionic sensitivity (NaCl 0.5M)	100%	100%	100%
10 <sup>-4</sup> M TBY sensitivity	100%	100%	100%
5. 10 <sup>-5</sup> M Menadione sensitivity	100%	100%	100%
50 µg/ml calcofluor sensitivity	100%	100%	100%
5mM caffeine sensitivity	100%	100%	100%

For each condition, 3 independent experiments were performed.

**Supplementary Table 3: Sexual reproduction phenotypic analyses**

	<i>PaRid mt+ X PaRid mt-</i>	$\Delta PaRid mt+ X \Delta PaRid mt-$
Spermatia	1.55 10 <sup>6</sup> +/- 3.77 10 <sup>5</sup>	1.4 10 <sup>6</sup> +/- 3.28 10 <sup>5</sup>
Perithecia	[WT] 4477 +/-456	[micro] 4333 +/- 368
Ascospores production (96H post-fertilization)	WT production	None

**Supplementary Table 4: Grafting experiments**

Réipient strain	<i>PaRid</i>		$\Delta PaRid$	
	<i>PaRid</i>	$\Delta PaRid$	<i>PaRid</i>	$\Delta PaRid$
Grafted perithecia				
Perithecium phenotype	[WT]	[micro]	[WT]	[micro]
Ascospore production	WT	None	WT	None

Grafted perithecia per experiment N=9, 3 independent experiments

**Supplementary Table 5: *ΔPaRid* DE gene specific set**

UP regulated			DOWN regulated		
T12	T24	T30	T12	T24	T30
Pa_1_1140	Pa_1_2020	Pa_1_1150	Pa_1_1000	Pa_1_1000	Pa_1_1240
Pa_1_1980	Pa_1_2740	Pa_1_2960	Pa_1_1130	Pa_1_1470	Pa_1_130
Pa_1_2700	Pa_1_4030	Pa_1_4030	Pa_1_1565	Pa_1_1690	Pa_1_1470
Pa_1_4220	Pa_1_4890	Pa_1_4230	Pa_1_1690	Pa_1_2070	Pa_1_1640
Pa_1_5070	Pa_1_4900	Pa_1_4890	Pa_1_2470	Pa_1_2250	Pa_1_1790
Pa_1_5410	Pa_1_5070	Pa_1_4900	Pa_1_2580	Pa_1_2580	Pa_1_2690
Pa_1_6120	Pa_1_5220	Pa_1_5650	Pa_1_3140	Pa_1_10640	Pa_1_3890
Pa_1_7080	Pa_1_5800	Pa_1_5765	Pa_1_5370	Pa_1_9035	Pa_1_5380
Pa_1_870	Pa_1_6620	Pa_1_6620	Pa_1_700	Pa_1_13915	Pa_1_6015
Pa_1_10390	Pa_1_670	Pa_1_830	Pa_1_90	Pa_1_15590	Pa_1_6930
Pa_1_9480	Pa_1_730	Pa_1_8330	Pa_1_10640	Pa_1_19300	Pa_1_12330
Pa_1_9500	Pa_1_830	Pa_1_10390	Pa_1_9090	Pa_1_19440	Pa_1_12820
Pa_1_14190	Pa_1_8330	Pa_1_10400	Pa_1_15530	Pa_1_20730	Pa_1_13915
Pa_1_14705	Pa_1_8540	Pa_1_11330	Pa_1_15590	Pa_1_23300	Pa_1_15530
Pa_1_14730	Pa_1_870	Pa_1_12460	Pa_1_16240	Pa_1_23610	Pa_1_17942
Pa_1_15350	Pa_1_880	Pa_1_8890	Pa_1_17570	Pa_2_13370	Pa_1_19440
Pa_1_16420	Pa_1_970	Pa_1_9370	Pa_1_19300	Pa_2_13410	Pa_1_19830
Pa_1_16985	Pa_1_10390	Pa_1_9480	Pa_1_19440	Pa_2_1380	Pa_1_20730
Pa_1_17080	Pa_1_11040	Pa_1_14705	Pa_1_19460	Pa_2_1590	Pa_2_10220
Pa_1_17210	Pa_1_12460	Pa_1_15350	Pa_1_22400	Pa_2_2240	Pa_2_12350
Pa_1_20415	Pa_1_8880	Pa_1_17920	Pa_1_22840	Pa_2_2320	Pa_2_13160
Pa_1_21040	Pa_1_9370	Pa_1_20415	Pa_1_23470	Pa_2_2560	Pa_2_1380

Pa_1_21340	Pa_1_9480	Pa_1_20490	Pa_1_24410	Pa_2_310	Pa_2_2320
Pa_1_23870	Pa_1_9500	Pa_1_21340	Pa_2_13410	Pa_2_4180	Pa_2_310
Pa_1_24560	Pa_1_14705	Pa_1_21780	Pa_2_1550	Pa_2_440	Pa_2_4370
Pa_0_1060	Pa_1_15520	Pa_1_24330	Pa_2_1870	Pa_2_4820	Pa_2_440
Pa_0_1310	Pa_1_17920	Pa_2_3250	Pa_2_2310	Pa_2_6750	Pa_2_4820
Pa_2_12390	Pa_1_18150	Pa_2_4570	Pa_2_4180	Pa_2_7555	Pa_2_740
Pa_2_5890	Pa_1_22760	Pa_2_5430	Pa_2_4210	Pa_2_7630	Pa_2_7555
Pa_2_6010	Pa_1_24330	Pa_2_60	Pa_2_4600	Pa_2_8020	Pa_2_8010
Pa_2_6930	Pa_0_800	Pa_2_6330	Pa_2_7320	Pa_2_8820	Pa_2_8820
Pa_2_8115	Pa_0_850	Pa_2_6890	Pa_2_7630	Pa_3_70	Pa_3_1530
Pa_2_9060	Pa_2_3250	Pa_2_7135	Pa_2_8010	Pa_3_2430	Pa_3_2430
Pa_2_9970	Pa_2_3900	Pa_2_7195	Pa_2_8820	Pa_3_3470	Pa_3_3470
Pa_3_1340	Pa_2_4110	Pa_2_7670	Pa_2_8970	Pa_3_6550	Pa_3_3610
Pa_3_230	Pa_2_4550	Pa_2_9350	Pa_2_13740	Pa_3_8520	Pa_3_4310
Pa_3_235	Pa_2_4570	Pa_2_9680	Pa_2_14030	Pa_3_8590	Pa_3_8450
Pa_3_820	Pa_2_6890	Pa_2_14110	Pa_3_1080	Pa_3_8820	Pa_3_8590
Pa_3_4020	Pa_2_710	Pa_2_14220	Pa_3_1170	Pa_3_9850	Pa_3_9350
Pa_3_4290	Pa_2_7766	Pa_3_1480	Pa_3_1530	Pa_3_10520	Pa_3_9970
Pa_3_7460	Pa_2_9350	Pa_3_590	Pa_3_1760	Pa_3_10530	Pa_3_10520
Pa_3_7870	Pa_3_1120	Pa_3_820	Pa_3_490	Pa_4_880	Pa_4_860
Pa_3_9450	Pa_3_1450	Pa_3_1920	Pa_3_70	Pa_4_9910	Pa_4_6620
Pa_3_9520	Pa_3_820	Pa_3_2900	Pa_3_3610	Pa_4_3720	Pa_4_7650
Pa_3_10890	Pa_3_10455	Pa_3_2970	Pa_3_4130	Pa_4_3858	Pa_4_7690
Pa_3_11220	Pa_3_2280	Pa_3_7310	Pa_3_4830	Pa_4_3880	Pa_5_2430
Pa_3_11370	Pa_3_3070	Pa_3_9450	Pa_3_5580	Pa_4_6470	Pa_5_12800
Pa_4_1870	Pa_3_4290	Pa_3_9520	Pa_3_9850	Pa_4_7040	Pa_5_12950
Pa_4_2050	Pa_3_6960	Pa_3_10810	Pa_3_10690	Pa_4_8520	Pa_5_3290

Pa_4_2130	Pa_3_7870	Pa_3_10890	Pa_4_1450	Pa_5_1290	Pa_5_4010
Pa_0_480	Pa_3_9450	Pa_3_11080	Pa_4_2120	Pa_5_2430	Pa_5_12020
Pa_4_2960	Pa_3_9520	Pa_3_11193	Pa_4_2219	Pa_5_2840	Pa_5_7700
Pa_4_3160	Pa_3_9760	Pa_3_11200	Pa_4_240	Pa_5_470	Pa_5_8390
Pa_4_3310	Pa_3_11193	Pa_4_105	Pa_4_3840	Pa_5_12800	Pa_5_8910
Pa_4_3440	Pa_3_11220	Pa_4_1330	Pa_4_3880	Pa_5_12810	Pa_6_3770
Pa_4_3935	Pa_3_11350	Pa_4_1400	Pa_4_4190	Pa_5_12950	Pa_6_5390
Pa_4_4260	Pa_4_105	Pa_4_9850	Pa_4_6000	Pa_5_4585	Pa_6_5795
Pa_4_4730	Pa_4_2050	Pa_4_3765	Pa_4_6620	Pa_5_12380	Pa_6_5880
Pa_4_5010	Pa_4_2130	Pa_4_3775	Pa_4_7760	Pa_5_7020	Pa_6_6770
Pa_4_5360	Pa_4_3765	Pa_4_3935	Pa_5_1212	Pa_5_8140	Pa_6_7030
Pa_4_9325	Pa_4_3935	Pa_4_4130	Pa_5_1290	Pa_5_9325	Pa_6_90
Pa_4_9360	Pa_4_4110	Pa_4_4260	Pa_5_150	Pa_6_2840	Pa_7_11100
Pa_5_1170	Pa_4_4130	Pa_4_5145	Pa_5_165	Pa_6_6520	Pa_7_3170
Pa_5_1460	Pa_4_4960	Pa_4_7610	Pa_5_2520	Pa_6_6770	Pa_7_6960
Pa_5_2030	Pa_4_5010	Pa_5_1170	Pa_5_10247	Pa_6_7850	Pa_7_8080
Pa_5_2130	Pa_4_5360	Pa_5_460	Pa_5_10420	Pa_6_10140	Pa_1_1470
Pa_5_2500	Pa_4_7975	Pa_5_12670	Pa_5_10910	Pa_7_2950	Pa_7_755
Pa_5_460	Pa_4_9360	Pa_5_12940	Pa_5_11480	Pa_7_3320	
Pa_0_1510	Pa_5_1170	Pa_5_3170	Pa_5_4585	Pa_7_3430	
Pa_5_3400	Pa_5_460	Pa_5_3740	Pa_5_11760	Pa_7_3820	
Pa_5_3810	Pa_5_10980	Pa_5_3760	Pa_5_6460	Pa_7_6930	
Pa_5_4830	Pa_5_3190	Pa_5_4120	Pa_5_7020	Pa_7_6960	
Pa_5_5880	Pa_5_3740	Pa_5_4590	Pa_5_7480	Pa_7_190	
Pa_5_12180	Pa_5_3760	Pa_5_5110	Pa_5_7810		
Pa_5_12330	Pa_5_12140	Pa_5_5490	Pa_5_8140		
Pa_5_6780	Pa_5_12290	Pa_5_6660	Pa_5_8150		

Pa_5_7130	Pa_5_12330	Pa_5_6670	Pa_5_9190
Pa_5_7330	Pa_5_6660	Pa_5_6740	Pa_6_320
Pa_5_7740	Pa_5_7160	Pa_5_7130	Pa_6_4100
Pa_5_8200	Pa_5_10230	Pa_5_7160	Pa_6_6820
Pa_5_9850	Pa_5_7740	Pa_5_7240	Pa_6_7250
Pa_5_9950	Pa_5_9950	Pa_5_7590	Pa_6_7710
Pa_6_11230	Pa_6_1110	Pa_5_10230	Pa_6_7840
Pa_6_11250	Pa_6_1420	Pa_5_8460	Pa_6_7850
Pa_6_1110	Pa_6_260	Pa_5_9845	Pa_6_10450
Pa_6_1320	Pa_6_435	Pa_5_9950	Pa_6_8230
Pa_6_1590	Pa_6_6450	Pa_6_11250	Pa_7_2690
Pa_6_260	Pa_6_6690	Pa_6_1110	Pa_7_2950
Pa_6_2810	Pa_6_6730	Pa_6_1420	Pa_7_3050
Pa_6_3460	Pa_6_7630	Pa_6_1590	Pa_1_1470
Pa_6_4570	Pa_6_10070	Pa_6_2120	
Pa_6_6450	Pa_6_10310	Pa_6_6690	
Pa_6_6730	Pa_6_10520	Pa_6_6730	
Pa_6_6740	Pa_6_11020	Pa_6_6990	
Pa_6_7340	Pa_6_11140	Pa_0_190	
Pa_6_750	Pa_6_8620	Pa_6_10070	
Pa_6_7820	Pa_6_8800	Pa_6_10080	
Pa_0_190	Pa_6_9420	Pa_6_11020	
Pa_6_10080	Pa_7_10520	Pa_6_8250	
Pa_6_10150	Pa_7_3690	Pa_6_8420	
Pa_6_10310	Pa_7_4025	Pa_6_8620	
Pa_6_8785	Pa_7_5050	Pa_7_10520	
Pa_7_10520	Pa_7_7170	Pa_7_2050	



Pa_7_10860	Pa_0_1350	Pa_7_2450
Pa_7_11610	Pa_0_1360	Pa_7_3480
Pa_7_2450	Pa_7_530	Pa_7_4000
Pa_7_3230	Pa_7_580	Pa_7_4120
Pa_7_3690		Pa_7_5050
Pa_7_4025		Pa_7_9660
Pa_7_5050		Pa_7_730
Pa_7_6030		Pa_7_760
Pa_7_6060		
Pa_7_7170		
Pa_0_1350		
Pa_0_1380		
Pa_3_1350		

### **III-II Etude principale**

#### Avant-propos

Suite aux résultats portant sur la fonction de PaRid chez *P. anserina*, la thématique du laboratoire s'est étendue à l'étude des modifications post-traductionnelles des histones intervenant dans la mise en place de l'hétérochromatine. Ses travaux ont constitué le cœur de mon projet doctoral. Ainsi j'ai réalisé une caractérisation phénotypique des mutants de délétion *PaKmt1*, *PaHp1* et *PaKmt6*. J'ai également élaboré la technique du ChIP-seq chez *P. anserina* afin d'analyser les paysages épigénomiques des modifications H3K9me3, H3K27me3 et H3K4me3 et observer l'incidence de la perte des histones méthyltransférases sur leur localisation. Des analyses statistiques additionnelles devront encore être effectuées pour confirmer les résultats de ChIP-seq. L'issue de ce projet se matérialisera sous forme d'un article qui sera soumis à publication en début d'année 2019.

**Loss of enhancer of zeste homologue protein (Kmt6) causes major depletion of both H3K9 and H3K27 tri-methylation which results in developmental defects in the filamentous fungi *Podospora anserina***

**Carlier F., Grognet P., Noordermeer D., Souaid C., Malagnac F.**

**Key words: Histone methylation, sexual development, ChIP-seq, *Podospora anserina***

In eukaryotes, chromosomes are packed to fit inside the nuclei. Such organization involves the wrapping of 147 pb of DNA around octamers of highly conserved histone proteins. These octamers, also called nucleosomes, are formed of four pairs of histones H3, H4, H2A, and H2B. This 'beads-on-the-string' configuration defines the lowest level of chromatin organization. The string of nucleosomes can fold in on itself, forming a 30 nm chromatin fiber, which, in association with non-histone proteins and non-coding RNAs are thought to mediate higher orders of chromatin structures that play a key role in both regulation of gene expression and genome stability. The common paradigm is that heterochromatin refers to gene-poor genomic territories that remain highly condensed throughout the entire cell cycle and exhibit low level of transcription, while euchromatin refers to gene-rich genomic territories showing much more relaxed structures during the most part of the cell cycle and therefore the active transcription (Karolin Luger 2006; Grewal et Jia 2007).

Histones are subjected to a variety of post-translational covalent modifications, such as methylation, acetylation, phosphorylation, ubiquitination, and sumoylation (Strahl et Allis 2000) that impact the overall degree of packing of the genome. In general, the opened euchromatin is enriched in acetylated histones: methylated H3K4 nearby the transcriptional start sites (TSS) of the active genes and methylated H3K36 in the body of the transcribed genes (Kouzarides 2007). By contrast, the compacted heterochromatin is hypoacetylated and either enriched in methylated H3K9 (constitutive heterochromatin) or methylated H3K27 (facultative heterochromatin) (Bhaumik, Smith, et Shilatifard 2007). If euchromatin features are essential to most of the developmental programs because they allow transcriptional memories and transcriptional ad-hoc responses to environmental stimuli, heterochromatin is also important to ensure proper centromere function and maintain genome stability by preventing illegitimate recombination between dispersed DNA repeats (Grewal et Jia 2007; Peng et Karpen 2008). Moreover, heterochromatic regions have long been considered as 'junk' parts of genomes, since they were thought to be stacks of repeats with no biological relevance. Today, this hypothesis tends to be tuned down as accumulating evidences point towards roles for heterochromatin in many biological processes, ranging from adaptative strategies to cellular plasticity.

Previous studies have shown that the conserved SET domain-containing proteins display lysine histone methyltransferase activities (KMT), which are responsible for lysine methylation of histone H3 (e.g., H3K4, H3K9, H3K27, and H3K36) (Lachner et Jenuwein 2002; Andrew J. Bannister, Schneider, et Kouzarides 2002; Grewal et Moazed 2003; Kanoh et al. 2003; Lachner, O'Sullivan, et Jenuwein 2003; Sims, Nishioka, et Reinberg 2003; García-Cao et al. 2004).

The COMPASS complex (complex of proteins associated with Set1, the catalytic subunit) that is conserved from yeast to plants and mammals (Miller et al. 2001; Krogan et al. 2002; Hughes et al. 2004; J.-S. Lee et al. 2007; M. Wu et al. 2008; Jiang et al. 2011; Shilatifard 2012) is responsible for the H3K4 methylation marks (H3K4me<sub>3</sub>). In filamentous fungi, deletions of *Set1/Kmt2* homologous genes encoding H3K4 histone methyltransferases resulted in genome-wide loss of H3K4me<sub>3</sub>, but did not impair viability (Raduwan, Isola, et Belden 2013; Studt, Janevska, et al. 2016). Yet, abolition of H3K4 methylation in *Magnaporthe oryzae* resulted in severe defect in pathogenicity on wheat host plants (Pham et al. 2015) as in *Fusarium graminearum Ccl1* mutants (Y. Liu et al. 2015). Moreover, *Fusarium fujikuroi* and *F. graminearum Ccl1* deletion also caused up-regulation of secondary metabolites (SM) produced by subtelomeric gene clusters, while biosynthesis of the species-specific virulence factors, such as gibberellic acid and deoxynivalenol, was reduced in axenic cultures (Studt, Janevska, et al. 2016). Deletion of the *Neurospora crassa Set1* gene altered both circadian- and light-regulated gene expression (Raduwan, Isola, et Belden 2013). Altogether, this suggests that, in most fungi, H3K4me<sub>3</sub> is an important epigenetic mark for gene expression of otherwise cryptic and/or specialized pathways. Remarkably, H3K4me<sub>2/3</sub> is involved in subtelomeric gene silencing in both *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus nidulans* (Mueller, Canze, et Bryk 2006; Bok et al. 2009).

However, genomic compartments containing repeats, including centromeres, telomeres, and TEs- rich loci have been shown to be marked by the H3K9me<sub>3</sub> constitutive chromatin modification as first described in *N. crassa*. Indeed, H3K9 methyltransferase DIM-5 is essential for normal growth, full fertility, and DNA methylation (H. Tamaru et Selker 2001). Accordingly, the *N. crassa* homolog of heterochromatin protein 1 (HP1), which binds methylated H3K9, is also essential for normal growth, conidiation, and DNA methylation (Freitag, Lee, et al. 2004). In *Schizosaccharomyces pombe*, HP1 homologs *swi6* and *chp2/clo2* are not essential for viability but for normal growth and chromosome structure integrity (Lorentz et al. 1994; Halverson, Gutkin, et Clarke 2000). If Chp2/Clo2, which is localized in centromeres, is involved in heterochromatin silencing at rDNA, telomeres, mating type regions, and centromeres (Thon et Verhein-Hansen 2000), Swi6 is required for the establishment and spreading of silenced constitutive heterochromatin (Grewal et Moazed 2003). Swi6 also recruits cohesin complexes to heterochromatic regions, which is a crucial step for proper chromosome segregation (Bernard et al. 2001; Nonaka et al. 2002).

In terms of regulation of gene expression, deletion of genes encoding either the *A. nidulans* homolog of heterochromatin protein 1 (HepA) or the H3K9 methyltransferase ClrD in *A. nidulans* and *F. graminearum* resulted in enhanced expression of a subset of SM clusters (Reyes-Dominguez et al. 2010, 2012). This was further accompanied by reduction of both the H3Kme3 marks and the HepA reader occupancy at the promoters of the up-regulated SM genes. The *Fusarium verticillioides* *FvDIM5* deletion mutant displayed significant defects in growth, conidiation, perithecium production, and fungal virulence. It also resulted in increased tolerance to osmotic stresses and SM production (Gu et al. 2017).

The polycomb repressive complex 2 (PRC2) is a multiprotein complex that catalyzes the methylation of H3K27 residues (H3K27me). This histone modification is a hallmark of facultative heterochromatin in most eukaryotes and maintains transcriptional repression established during early development. Although absent in *S. cerevisiae* and *S. pombe*, the PRC2 complex is present in Pezizomycotina (Shaver et al. 2010). However, contrary to animals and plants (Molitor et Shen 2013), there is no PRC1 counterpart in genomes of filamentous fungi (Jamieson et al. 2013). Yet, the methylation of H3K27 serves as a repressive mark (facultative heterochromatin), even in organisms lacking PRC1, suggesting that alternative unidentified mechanisms act downstream of PRC2. In *N. crassa*, deletion of *Set-7* gene encoding H3K27 methyltransferase established that the H3K27me modification is dispensable for normal growth and development (Jamieson et al. 2013) but was essential to maintenance of normal chromosome conformation (Klocko et al. 2016). By contrast, loss of H3K27me3 in *F. graminearum* resulted in growth defects, sterility, and constitutive expression of genes encoding mycotoxins, pigments, and other SM (Connolly, Smith, et Freitag 2013). In *Fusarium fujikuroi*, knock-down of the *Kmt6* gene encoding the H3K27 methyltransferase had drastic negative impact on fungal growth and development but induced transcription of otherwise silent SM gene clusters (Studt, Rösler, et al. 2016).

In mammals, H3K9me and H3K27me marks are mutually exclusive. Nonetheless, in *N. crassa*, loss of H3K9 methylation resulted in massive redistribution of H3K27me. Genomic compartments that were normally marked by H3K9me3 became methylated at H3K27 (Jamieson et al. 2016b). Hence, elimination of HP1 also caused similar redistribution of H3K27me. On the contrary, the absence of H3K27me machinery did not impair the H3K9me genomic pattern and thus the constitutive heterochromatin. Furthermore, both H3K9me and H3K27me can cooperate to regulate complex traits such as symbiosis.

In *Epichloe festucae*, the H3K9me3 and H3K27me3 patterns constitute altogether a key chromatin state that controls symbiosis-specific expression, which in turn defines the ability of this symbiont to form a mutualistic interaction with its plant host (Chujo et Scott 2014).

To explore the functions of the constitutive versus facultative heterochromatin, we deleted genes corresponding to the H3K9me KMT (*PaKmt1*) along with the PaHP1 reader protein that binds this specific mark (*PaHP1*), and to the H3K27me KMT (*PaKmt6*). Mutants harboring either a single or multiple mutant alleles were characterized on both the *Podospora* life cycle and epigenomics landscapes. Phenotypic assays showed that the loss of factors involved in assembly of constitutive heterochromatin have a limited impact on *Podospora* growth, differentiation, and sexual reproduction. However, inactivation of *PaKmt6* causes severe defects in most of the aspects of *Podospora* life cycle, including growth, differentiation processes, and sexual reproduction. We also demonstrated that *PaKmt6* is epistatic over *PaKmt1* and *PaHP1*, which suggested that in *Podospora*, by contrast to the model filamentous fungus *N. crassa*, the PRC2-like pathway is ubiquitous and essential to properly regulate global gene expression. We also established the genome-wide distribution patterns of H3K4me3, H3K9me3, and H3K27me3, relatively to wild-type and mutant genetic background. Epigenetic landscapes showed that H3K4me3, which is the most frequent mark, is found equally distributed on the seven chromosomes, in the gene-rich regions. Conversely, the less frequent mark H3K9me3 is restricted to repeated loci (transposable elements, centromeres, and telomeres). As expected for a mark involved in reversible gene silencing, H3K27me3 is present mostly in gene-rich regions in blocks twice as long as the H3K4me3 and H3K9me3 ones. Surprisingly, most of the H3K9me3 are found in regions also enriched in H3K27me3. In *Podospora* genome, both the H3K9me3 and H3K27me3 are co-exclusive with the H3K4me3. Interestingly, ChIP experiments performed in the mutant genetic background ( $\Delta PaKmt1$ ,  $\Delta PaHP1$ , and  $\Delta PaKmt6$ ) indicates that PaKMT6 is also involved in the deposition of the H3K9me3 modification.

## Materials and methods

### Strains and culture conditions

The strains used in this study derived from the “S” wild-type strain of *P. anserina* that was used for sequencing (Espagne et al. 2008b; Grognet, Bidard, et al. 2014). Standard culture conditions, media, and genetic methods for *P. anserina* have been described (G Rizet et Engelmann 1949; Philippe Silar 2011) and the most recent protocols can be accessed at <http://podospora.i2bc.paris-saclay.fr>. Construction of the  $\Delta mus51::su8-1$  strain lacking the mus-51 subunit of the complex involved in end-joining of broken DNA fragments was described previously (Lambou et al. 2008a). In this strain, DNA integration mainly proceeds through homologous recombination. Mycelium growth is performed on M2 minimal medium, in which carbon is supplied as dextrin and nitrogen as urea. Ascospores do not germinate on M2 but on a specific G medium containing ammonium acetate. The initial  $\Delta Pasir2$  allele was introduced in the “s” (small s) genetic background (Boivin, Gaumer, et Sainsard-Chanet 2008). The  $\Delta Pasir2$  null allele was then introgressed in the “S” (big S) reference strain by ten successive backcrosses. The methods used for nucleic acid extraction and manipulation have been described (Ausubel et al. 1987; Lecellier et Silar 1994). Transformations of *P. anserina* protoplasts were carried out as described previously (Brygoo et Debuchy 1985).

### Identification and deletions of the *PaKmt1*, *PaKmt6*, and *PaHP1* genes

*PaKmt1*, *PaKmt6*, and *PaHP1* genes were identified by searching the complete genome of *P. anserina* with blastn (Altschul et al. 1990), using the Neurospora proteins DIM-5 (NCU04402), SET-7 (NCU07496), and HP1 (NCU04017). To confirm gene annotation, *PaKmt1* transcripts were amplified by RT-PCR experiments performed on total RNA extracted from growing mycelium (1-day and 4-day growth) and developing perithecia (2 days and 4 days post-fertilization) using primers 5s-DIM5 and 3s-DIM5. Functional annotation was performed using InterProScan analysis (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>), Panther Classification System (<http://www.pantherdb.org/panther/>), PFAM (<http://pfam.xfam.org/>), and Prosite (<http://prosite.expasy.org/>).



## Cloning and tagging

The pAKS106 and pAKS120 plasmids were described in annex (Timpano et al.). All the constructs were sequenced.

### - PaHP1-GFP-HA chimeric protein construction

To gain insight into PaHP1 localisation, we constructed a PaHP1-GFP-HA fusion chimeric protein. To this end, *PaHp1* allele (Pa\_4\_7200) was PCR amplified from the S strain genomic DNA using primers FC3-BamH1 and FC4-GFP (see Table S1). The resulting amplicon harbors 520 bp of promoter sequence followed by *PaHp1* ORF cleared from its stop codon. In parallel, *GFP* ORF was amplified from peGFP plasmid using FC5-HP1 and FC6-HindIII primers. The two DNA segments were joined by fusion PCR using primers FC3-BamH1 and FC6-BamH1. This chimeric DNA fragment was digested with *Bam*HI and *Hind*III and cloned in pAKS106 linearized with the same enzymes. When transformed into  $\Delta PaHp1$  mutant strain, the *PaHp1-GFP-HA* allele is able to restore a wild-type phenotype (growth rate and aerial mycelium), showing that the tagged version of PaHP1 protein is functional.

### - PaKMT1-mCHERRY-HA chimeric protein construction

*PaKmt1-mCherry-HA* allele construction followed the same experimental design used for *PaHp1-GFP-HA* construction. First, *PaKmt1* (Pa\_6\_990) was amplified using Dim5mChFBamH1 and Dim5mChR and resulted in a DNA amplicon composed of 454 bp of promoter followed by the *PaKmt1* ORF. The *mCherry* ORF was amplified from pemCherry plasmid using mChDim5F and mChDim5RHindIII primers. Fragments were PCR fused, digested, and cloned in pAKS106. *Kmt1-mCherry-HA* allele was able to restore wild-type growth phenotype when transformed in  $\Delta PaKmt1$  mutant strains, suggesting that this chimeric protein is functional.

### - *PaHp1* over-expression

To over-express *PaKmt1* and *PaHp1* alleles, the respective endogenous promoters were replaced by the *AS4* promoter that drives high and constitutive expression throughout the life cycle (Silar and Picard 1994). *PaHp1-GFP* allele was PCR amplified from pAKS106-*HP1-GFP* (this study) using primers FC21-BamH1 and FC6-HindIII. The resulting 1877 bp amplicons harbor the chimeric construction cleared from its stop codon and promoter. It was digested with *Bam*HI and *Hind*III and then cloned in pAKS120 previously digested with the same enzymes. The *PRA54-PaHp1-GFP-HA* resulting allele was introduced in  $\Delta PaHp1$  strains by transformation.

- *PaKmt1* over-expression

*PaKmt1-mCherry-HA* over-expressed allele construction followed the same experimental procedures as the one used for *PRAS4-Hp1-GFP-HA* construction. *PaKmt1-mCherry* ORF was PCR amplified using FC22-*Bam*H1 and mChDim5R-*Hind*III with *pAKS106-Kmt1-mCherry-HA* plasmid, as DNA template. Amplified DNA fragments were then digested and cloned in *PAKS120* plasmid using *Hind*III and *Bam*H1 restriction enzymes. This allele was introduced in  $\Delta$ *PaKmt1* genome by transformation.

-*PaKmt6-GFP-HA* chimeric protein construction

*PaKmt6* (Pa\_1\_6940) was PCR amplified from *S* DNA using FC73-GA1KMT6 and FC74-GA1KMT6 primers, resulting in 4232 bp DNA amplicons composed of 912 bp of promoter followed by *PaKmt6* ORF cleared from its stop codon. In parallel, *GFP* allele was amplified from peGFP plasmid using FC75-GA1GFP and FC76-GA1GFP. Both fragments were cloned together in one step in the *pAKS-106* plasmid previously digested with *Not*1 and *Bam*H1 restriction enzymes. This cloning step was performed using Gibson Assembly kit (New England Biolabs). This yielded the chimeric *PaKMT6-GFP-HA* allele. An additional *PaKMT6-HA* allele was generated by PCR amplification from *S* DNA of *PaKmt6* along with its own promoter, using FC65-*Not*1 and FC72-*Bam*H1 primers. These amplicons were digested and cloned in *pAKS106* plasmid using *Not*1 and *Bam*H1 restriction enzymes. When transformed into  $\Delta$ *PaKmt6* mutant strain, both *PaKmt6-GFP-HA* and *PaKmt6-HA* alleles were able to restore with-type growth and sexual development, suggesting this chimeric version of the PaKMT6 protein is functional. However, no GFP fluorescence signal was detected in the  $\Delta$ *PaKmt6* + *PaKmt6-GFP-HA* complemented strains.

## Phylogenetic analysis

Orthologous genes were identified using Fungipath (Grossetête, Labedan, et Lespinet 2010) and MycoCosm portal (Grigoriev et al. 2014) and manually verified by reciprocal Best Hits Blast analysis. Sequences were aligned using Muscle (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) and trimmed using Jalview to remove non-informative regions (i.e. poorly aligned regions and/or gaps containing regions). Trees were constructed with PhyML 3.0 software with default parameters and 100 bootstrapped data set (Guindon et al. 2010). The tree was visualized with the iTOL server (<http://itol.embl.de/>).

## Phenotypic analyses

Spermatia counting was performed as follows: each strain was grown on M2 medium at 18°C for 14 days. To collect spermatia, cultures were washed with 1.5 mL of sterile water. Numeration proceeded through Malassez counting chamber.

Western blot analyses were performed on nuclear extracts made of  $5 \times 10^7$  protoplasts resuspended in 3 mL of New Cell Lysis Buffer (Tris-HCL pH 7.5 50 mM, NaCL 150 mM, EDTA 5 mM, NP-40 0.5%, Triton 1%, and protease inhibitor Roche-04693132001). The nuclear extracts are collected after centrifugation (300 G, 5 min) and resuspended in 300  $\mu$ L of Nuclei Lysis Buffer (Tris-HCL pH 8 50 mM, EDTA 10 mM, SDS 0.5%, and protease inhibitor Roche-04693132001). Nuclei were then sonicated (Diagenode bioruptor plus sonicator, 20 min at high level). Protein contents of nuclear extracts were quantified using the Qubit Protein assay kit (Invitrogen). Then, 35  $\mu$ g of nuclear extract were diluted in Laemmli sample buffer and loaded on a 10% SDS-polyacrylamide gel. To probe the membranes, we used the following high affinity ChIP-grade monoclonal antibodies: anti-Histone 3 (Abcam ab12079), anti-H3K9me3 (Abcam ab8898), anti-H3K27me3 (Millipore 17-622), and anti-H3K4me3 (Active Motif 39159).

## Cytological analysis

Light microscopy was performed on two-day-old mycelium. Explants taken from complemented strains expressing either *PaHPI-GFP-HA* or *PaKMT1-mCHERRY-HA* were analysed by fluorescence microscopy using DMRXA microscope from Leica.

## ChIP-seq experiments and high-throughput sequencing

Each ChIP-seq experiment was performed on two independent biological replicates for each genotype. Every strain used in this experiment have *mat+* mating type.

Chromatin extractions were made from mycelium grown for 60 h at 27°C in liquid culture (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.25 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.25 g/L, urea 0.5 g/L, biotin 0.05 mg/L, thiamine 0.05 mg/L, oligo-element 0.1%, yeast extract 5 g/L, and dextrin 5.5 g/L). Mycelium was filtered and quickly washed with LB buffer, resuspended, and then cross-linked in 100 mL of LB buffer with 1% paraformaldehyde for 15 min at 27°C. Reaction was stopped by addition of glycine (60 mM).

The cross-linked mycelium was filtered, washed with cold LB buffer, and dried on Whatman paper. Dried mycelium was frozen in liquid nitrogen and ground to powder in a mortar. Aliquots of mycelium powder (200 mg) were resuspended in 1 mL of Lysis Buffer (Hepes pH 7.5 50 mM, NaCl 0.5 M, EDTA pH 8 1 mM, Triton X-100 1%, Sodium deoxycholate 0.1%, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, and protease inhibitor (Roche)). Chromatin was sheared to 0.15-0.6 kb using Micrococcal nuclease enzymatic digestion treatment (NEB #M0247) for 30 min at 37°C (10000 units/mL). The enzymatic digestion was stopped by addition of EGTA (15 mM). After centrifugation (15000 G, 15 min, twice) of the digested samples, pelleted genomic DNA fragments were discarded. Concentration of the soluble chromatin fractions was assayed using the fluorescence system Qubit dsDNA HS assay kit (Invitrogen).

Prior to immunoprecipitation, 5 µg of soluble chromatin was washed in 1.1 mL of Lysis buffer containing 30 µL of magnetic beads (Invitrogen 10001D, 4 h at 4°C), and no antibody. From the 1.1 mL washed soluble chromatin cleared from magnetic beads, 100 µL was kept for non-IP input control. Specific antibodies were added individually to the remaining 1 mL of the washed soluble chromatin (IP samples) for an overnight incubation at 4°C on a rotating wheel. Antibodies used in this study are: anti-H3K9me3 (2 µL, Abcam ab8898), anti-H3K27me3 (2 µL, Millipore 17-622), and anti-H3K4me3 (1 µL, Active Motif 39159). One additional mock sample was done with 3 µL of anti-GFP antibody (ab290) in the wild-type strain only. IPed chromatin was recovered by adding 20 µL of magnetic beads, incubated for 4 h at 4°C. Beads were successively washed in 1 mL for 10 min in a series of buffers: Lysis buffer (twice), Lysis buffer plus 0.5 M NaCl, LiCl Wash Buffer (Tris-Hcl pH 8 10 mM, LiCl 250 mM, NP40 0.5%, Sodium deoxycholate 0.5%, EDTA pH 8 1mM; twice for H3K9me3 immunoprecipitation), and finally Tris-EDTA Buffer (Tris-Hcl pH 8 50 mM, EDTA pH 8 10 mM). Elution of IP samples was done with TES buffer (Tris-EDTA Buffer with SDS 1%) at 65°C. TES buffer was also added to non-IPed input. Both IP and input samples were decrosslinked at 65°C overnight and treated successively with RNase A (0.2 mg/mL, 2 h at 50°C) and Proteinase K, (0.8 mg/mL, 2 h at 50°C). DNA was then subjected to phenol-chloroform purification and ethanol precipitation. DNA pellets were resuspended in 60 µL of water.

### **qPCR Analysis**

Quantitative PCR experiments were performed with dsDNA fluorescent detection method using the FastStart Universal SYBR Green Master from Roche (04913850001).

IP enrichments were assayed with the following protocol: 5  $\mu$ L of IP DNA samples and non-IP input were diluted 10 times in nuclease free water. qPCR experiments were done on 2  $\mu$ L of the diluted samples using the pairs of primers (0.5  $\mu$ M) FC77-Actin/FC78-Actin and FC125-580/FC126-580 (see supplementary table 1). For each IP sample, relative concentrations were determined as an “Input percentage” with the following equation:

$$\%Input = \left( E^{\left( Cq_{Input} - \left( \frac{\ln(10)}{\ln E} \right) \right) - Cq_{Sample}} \right) \times 100$$

## Sequencing

ChIP-seq libraries were built using the NEB Next UltraII DNA library Prep kit for Illumina (New England Biolabs #E7645S/L) and Agencourt Ampure XP beads (Beckman Coulter, #A63880) according to the supplier protocols. PCR amplification was made of 12 cycles of DNA amplification. ChIP-sequencing was performed by the I2BC High-throughput sequencing facility (NextSeq 500/550 High Output Kit v2 (75 cycles), SR 75 bp). Reads were trimmed with Cutadapt 1.15 and filtered for control quality by FastQC v0.11.5.

## ChIP-seq sequencing data analysis

Sequencing generated between 8 and 45 million reads depending on samples. The ChIP-seq analysis was performed on sets of data that contained 8 to 10 million reads at most. If needed, the number of reads was down-sized randomly. Reads were mapped on the *S mat+ P. anserina* genome (Espagne et al. 2008a) using Bowtie 2 software (version 2.3.0, see annex for results). For visualization purpose, data were normalized using Deeptools 2.0 bamcoverage with the BPM method. Spearman correlation factors were calculated on normalized data using Deeptools 2.0multiBigwigSummary. Peak calling was performed after merging the two biological replicates using MACS2 software (version 2.1.1), using the mock sample as control. Further peaks annotations and comparisons were done using Bedtools (version 2.26.0). Genome-wide visualization of peaks was generated with DNAplotter (Carver et al. 2009).

## Results

### Heterochromatin remodelers are present in *P. anserina* genome and expressed during its life cycle

Searching the *P. anserina* genome, we found one gene (Pa\_6\_990) encoding a putative H3K9 methyltransferase, namely PaKmt1 (342 aa), and one gene (Pa\_1\_6940) encoding a putative H3K27 methyltransferase, namely PaKmt6 (1090 aa). Both of these highly conserved proteins show a canonical SET domain (PF00856), typical of the *bona fide* histone methyltransferases (fig. 1A). In addition, PaKmt1 displays a pre-SET domain (PS50867) whereas PaKmt6 harbors a CXC domain (PS51633), which consists of two copies of a cysteine-rich motif, frequently found in polycomb group (Pc-G) proteins. Phylogenetic analysis (fig.1B) established that PaKmt1 and PaKmt6 belong to two different clades of histone methyltransferase. They both cluster with already characterized KMTs, which further supports their predicted specificity.

RNA-seq experiments detected transcripts of *PaKmt6* in both vegetative mycelium and perithecia (Philippe Silar et al. 2018b). They confirmed that the *PaKmt6* ORF contains two exons (246 bp and 3027 bp), which are separated by a 50 bp intron (positions 247-296). While annotation of the *PaKmt1* gene also predicted that its ORF was made of two exons (48 bp and 981 pb), separated by a 62 pb intron (positions 49-110), RNA-seq experiments showed ambiguous profiles for *PaKmt1* transcripts. We thus performed an RT-PCR on total RNA extracted from either wild-type vegetative mycelium (one day and four days of growth) or developing fruiting bodies (two days and four days after fertilization) using primers 5s-DIM5 and 3s-DIM5 (fig. S1B). One 1108-bp fragment corresponding to the predicted *PaKmt1* spliced transcript was amplified from one-day old mycelium extract. However, from the three other RNA extracts, namely four-day mycelium, two-day and four-day post fertilization fruiting bodies, two distinct transcripts were amplified: the previously described 1108-bp fragment and an additional 1170-bp fragment. Both of them were cloned and sequenced. As expected, the 1108-bp fragment corresponds to *PaKmt1* spliced transcript (fig. S1A) whereas the 1170-bp fragment corresponds to a *PaKmt1* unspliced transcript. If translated, the 1170-pb fragment would result in a truncated protein of 76 amino acids lacking the conserved functional motifs (pre-SET and SET domains). This observation suggests that, in addition to the functional full length PaKmt1 H3K9 methyltransferase, *P. anserina* might produce a truncated version of this protein at specific point times.

Finally, because constitutive heterochromatin is known to recruit the heterochromatin protein 1, we searched the *P. anserina* genome for a homolog and identified one gene (Pa\_4\_7200) encoding the protein PaHP1 (252 aa). It displays a chromo domain (PS00598) and a chromo shadow domain (PS50013). By self-aggregation, chromo shadow domain containing proteins can bring together nucleosomes and thus condense the corresponding chromatin region. As for *PaKmt6*, RNA-seq data showed that the *PaHP1* gene is expressed in both vegetative mycelium and perithecia. They also confirmed that the *PaHP1* ORF was split in six exons (10 bp, 178 bp, 40 bp, 83 bp, 367 bp, and 78 bp), which were separated by five introns (respectively, 167 bp, 59 bp, 54 bp, 60 bp, and 56 pb).

### ***PaKmt1*, *PaKmt6*, and *PaHP1* are not essential genes**

To get some insights on the potential functions of PaKmt1, PaKmt6, and PaHP1 during *P. anserina*'s life cycle, we deleted the corresponding genes. Replacement of the *PaKmt1* wild-type allele with hygromycin-B resistance marker generated viable mutants carrying the  $\Delta PaKmt1$  null allele (fig. S2). They showed mild phenotypic defects (see below) when growing on standard medium. By contrast, the replacement of the *PaKmt6* wild-type allele with nourseothricin resistance marker generated viable mutants carrying the  $\Delta PaKmt6$  null allele (fig. S2), although they showed numerous severe phenotypic defects (see below). Nonetheless, this demonstrated that neither  $\Delta PaKmt1$  nor  $\Delta PaKmt6$  are essential genes. Double mutants harboring both  $\Delta PaKmt1$  and  $\Delta PaKmt6$  null alleles show the same phenotypes than the  $\Delta PaKmt6$  single mutants, showing that the  $\Delta PaKmt6$  mutation is epistatic upon the  $\Delta PaKmt1$  mutation.

Finally, replacement of the *PaHP1* wild-type allele with hygromycin-B resistance marker also generated viable mutants carrying the  $\Delta PaHP1$  null allele (fig. S2). As for the  $\Delta PaKmt1$  mutant, the  $\Delta PaHP1$  mutants showed mild phenotypic defects (see below) when growing on standard medium, and the double mutants harboring both  $\Delta PaHP1$  and  $\Delta PaKmt6$  null alleles show the same phenotypes than the  $\Delta PaKmt6$  single mutants, showing that the  $\Delta PaKmt6$  mutation is epistatic upon the  $\Delta PaHP1$  mutation.

### **PaKmt1 and PaKmt6 have a histone methyltransferase activity**

We then assayed the enzymatic activity of these two putative histone methyltransferases.

For this purpose, we used specific antibodies that detect H3K9me3 and H3K27me3 to probe a western blot made on nuclear proteins extracted from the wild-type, the single  $\Delta PaKmt1$  mutant, the single  $\Delta PaKmt6$  mutant, and the double  $\Delta PaKmt1 \Delta PaKmt6$  mutant strains. H3K9me3 and H3K27me3 tri-methylation (me3) are both detected in nuclear proteins extracted from the wild-type strain (fig. 2), whereas H3K9me3 is absent in proteins extracted from the single  $\Delta PaKmt1$  mutant and the double  $\Delta PaKmt1 \Delta PaKmt6$  mutant. Conversely, the H3K27me3 is absent in extracts from the single  $\Delta PaKmt6$  mutant and the double  $\Delta PaKmt1 \Delta PaKmt6$  mutant. This clearly shows that PaKmt1 is a H3K9 methyltransferase, while PaKmt6 is a H3K27 methyltransferase. Deletion of *PaHpl1* has no impact on trimethylation of either the H3K9 residues or the H3K27 residues. Because the  $\Delta PaSir2$  mutant was already available (Boivin, Gaumer, et Sainsard-Chanet 2008), we tested whether the lack of Sirtuitin2, a histone deacetylase, has an impact on histone trimethylation patterns. The H3K9me3 and H3K27me3 modifications were both readily detected in this mutant background, showing that loss of PaSir2 has no impact on methylation of lysine 9 and lysine 27 of histone H3. Seemingly, trimethylation of lysine 4 of histone 3 (H3K4me3) was detected in all samples.

### **Loss of PaKmt6 has a stronger impact on vegetative growth than loss of either PaKmt1 or PaHP1**

The single  $\Delta PaKmt1$  and  $\Delta PaHP1$  mutants display a slight growth defect at optimal temperature (27°C) (24% decrease  $\Delta PaHP1$ , 6% decrease  $\Delta PaKmt1$ ). This growth defect was stronger when the mutants were grown at cold temperature (11°C) (34% decrease  $\Delta PaHP1$ , 28% decrease  $\Delta PaKmt1$ ). Growth defect (10%) of the double  $\Delta PaKmt1 \Delta PaHP1$  mutants was not aggravated but similar to the ones of the corresponding single mutants (table 1A and fig. 3B). Interestingly, the growth defect of the double  $\Delta PaSir2 \Delta PaKmt1$  mutants was further altered than that of the single  $\Delta PaKmt1$  mutants (data not shown). Pigmentation, branching, and the overall aspect of mycelium were similar to wild-type strains, except for reduced production of aerial hyphae (fig. S3A). When cultivating the mutant strains on solid media, we noticed that they might have issues to resume vegetative development after a period of growth arrest (storage at 4°C or stationary phase at room temperature). To test this hypothesis, we took implants of wild-type strain as well as of  $\Delta PaKmt1$  and  $\Delta PaHP1$  single mutant strains from G medium and transfer them onto M2 medium. These cultures were then incubated at 27°C for eight days.



Then, from each of the eight-day old thallus, we collected three implants from three different locations: plug 1- from the apex of the colony (growing phase), plug 2- at one edge of the colony where it reached the plastic wall of the petri dish after approximately four days of growth (stationary phase), and plug 3- from the immediate vicinity of the starting point (stationary phase) (fig. S4). Each of these implants were then inoculated on fresh M2 medium and placed at 27°C. After two days of growth, the wild-type strain was able to resume growth from the three different implants, generating wild-type looking mycelia. By contrast, mycelia growing from plug\_2 and plug\_3 of either  $\Delta PaKmt1$  or  $\Delta PaHP1$  single mutants were slow and generated irregular colony margins and no aerial hyphae. This already defective and erratic growth was further degraded after five days of culture. However, mycelia of either  $\Delta PaKmt1$  or  $\Delta PaHP1$  single mutants that developed from plug\_1 were similar to the wild-type ones. Since we demonstrated that the  $\Delta PaKmt1$  and  $\Delta PaHP1$  mutations do not promote Crippled Growth (fig. S5), an epigenetically triggered cell degeneration (Nguyen, Lalucque, and Silar 2018), but behave as the wild-type strain in that respect, this reduced capability to resume growth might be indicative of a lesser plasticity to perform adaptive developmental program under changing environmental conditions. This hypothesis might be further enhanced by the fact that these mutants have a wild-type longevity (fig. S6).

By contrast,  $\Delta PaKmt6$  mutants display strong growth defects at optimal temperature (27°C). Indeed, the growth-rate of  $\Delta PaKmt6$  mutants is 43% lower than wild-type strains during the first 60 h of growth on M2 at 27°C (fig. 3A and 3B and table 1A). Surprisingly, after this time point, the mycelium growth on solid media becomes so highly erratic and irregular that the standard assays consisting in thallus radiant measures were not suitable anymore. Indeed, these over 60-hour old  $\Delta PaKmt6$  mycelia showed “stop-restart” growth resulting in patchy sectors, a pattern that was reminiscent of cauliflower inflorescences (fig. S3B). Furthermore, on M2 plus yeast extract rich medium,  $\Delta PaKmt6$  displays improved and regular growth unlike in *F. graminearum* (Connolly, Smith, et Freitag 2013). Surprisingly, we were able to grow the  $\Delta PaKmt6$  mutants in race tubes to determine that this mutation has no effect on senescence (fig. S6). When we constructed all the combination of double and triple mutants (see below), either the  $\Delta PaKmt6$  null allele was epistatic upon the other mutant alleles or alternatively it generated a more dramatic effect. This was especially noticeable for the growth rate of the triple  $\Delta PaKmt1 \Delta PaKmt6 \Delta PaSir2$  mutant (data not shown).

### **The $\Delta PaKmt6$ mutant produces more male gametes than the wild-type strain**

Beside the growth defect, the overall aspect of the  $\Delta PaKmt6$  mutant mycelium was also different from a wild-type strain. Indeed, on a macroscopic scale, it shows a powdery mycelium. When examined under the microscope, we observed a striking over-production of spermatia (see annexes) that accounts for the powdery phenotype of the  $\Delta PaKmt6$  mutants. Quantification of spermatia showed that, when the  $PaKmt6$  null allele is present, the male gamete production is approximately 2500 times higher than that of the wild-type strain. When associated with  $\Delta PaKmt1$  null allele, this ratio goes up to 7000. Neither the  $\Delta PaKmt1$  mutants nor the  $\Delta PaHP1$  mutants display any significant difference of spermatia production when compared with the wild-type strain (see annexes). This was also true for the double  $\Delta PaKmt1 \Delta PaHP1$  mutants. We then tested if the mutant gametes were as fertile as the wild-type ones. To do so, we fertilized wild-type ascogonia with a defined quantity of either mutant spermatia or wild-type spermatia of compatible mating type. After seven days of growth at 27°C, perithecia were numbered, given that each fruiting body originated from one fertilization event. Fertilization capabilities of the mutant gametes were as efficient as the wild-type ones since similar numbers of perithecia were obtained in both conditions (4 independent experiments). This indicates that the excess of spermatia has no impact on their biological properties.

### **The $\Delta PaKmt6$ mutant formed crippled perithecia yielding a reduced number of ascospores**

We then investigated the ability of the mutant strains to perform sexual reproduction. All the single mutants and the double and triple combinations produce competent male gametes, meaning that they were all able to fertilize wild-type female gametes (see above). Sexual development and ascospore production of homozygous single  $\Delta PaKmt1$  and homozygous single  $\Delta PaHP1$  mutant crosses, as well as double  $\Delta PaKmt1 \Delta PaHP1$  mutant crosses, is indistinguishable from that of wild-type crosses. However, when we performed homozygous single  $\Delta PaKmt6$  crosses, fertilization occurs, since perithecia were formed, but their developmental time frame was delayed, they display a large palette of morphological defects (e.g., lack of necks, lack of ostioles, mis-orientated, developed into the agar, harboring 2 to 3 necks, fused perithecia) (fig. 4A), and their ascospore production was reduced.

Heterozygous orientated crosses showed that when the *ΔPaKmt6* null allele was present in the female gamete genome (i.e. ascogonia) and the wild-type allele was present in the male gamete genome (i.e. spermatia), the fruiting bodies were crippled as in the homozygous *ΔPaKmt6* crosses, which resulted in a reduced production of asci. This might be indicative of a maternal effect.

Crosses involving the following double or triple mutant strains (i.e. *ΔPaKmt1 ΔPaKmt6*; *ΔPaHP1 ΔPaKmt6*; *ΔPaKmt1 ΔPaHP1 ΔPaKmt6*) displayed a typical *ΔPaKmt6* phenotype with respect to the perithecium number, morphology, and ascospore production, demonstrating that *PaKmt6* null allele was epistatic. However, crosses involving the double *ΔPaSir2 ΔPaKmt6* mutant strain or the triple *ΔPaSir2 ΔPaKmt1 ΔPaKmt6* displayed more severe developmental defects, which lead to the formation of even less perithecia and a further drop of ascospore yield. In addition, one third of the asci recovered from a homozygous *ΔPaKmt1 ΔPaKmt6* showed less pigmented ascospores than those produced by wild-type crosses (with a color panel spanning from white to green, see annexes). In general, a deficit in pigmentation is indicative of an incomplete maturation during the ascospore formation process.

The *PaRid* gene encoding a putative DNA methyltransferase is essential to sexual reproduction since homozygous *ΔPaRid* crosses produce barren micro-perithecia. To determine whether *PaRid* is involved in the same pathway than that of *PaKmt1* and *PaHP1* or that of *PaKmt6*, we constructed the following multiple mutants: *ΔPaRid ΔPaKmt6* and *ΔPaRid ΔPaKmt1 ΔPaHP1*. While *PaRid* was epistatic upon the *ΔPaKmt1* and *ΔPaHP1* mutant alleles during the sexual development, the double *ΔPaRid ΔPaKmt6* displays an aggravated phenotype since no perithecia were formed. This could mean either that, although gametes of the single mutants are able to complete fertilization, the double mutant gametes are not or that the sexual development is blocked right after fertilization. This result suggests that *PaRid* and *PaKmt6* are involved in two different pathways with respect to the sexual development.

### **PaKmt6 is essential to the development of perithecia**

Furthermore, to check whether the *ΔPaKmt6* mutation reduced fertility resulted from a peridium defect or a developmental defect of the dikaryotic hyphae, we set up tricaryon crosses involving the *Δmat* strain (Evelyne Coppin et al. 1993; Jamet-Vierny et al. 2007b). Because the *Δmat* strain lacks the genes required for fertilization, it does not participate either as male or female in the sexual reproduction. However, the *Δmat* mycelium is able to provide maternal hyphae required to build fruiting bodies.

Consequently, the *Δmat* strain can only complement mutants defective for fruiting body tissues formation but cannot complement any zygotic tissue defect. We observed that the *Δmat/ΔPaKmt6 mat<sup>+</sup>/ΔPaKmt6 mat<sup>-</sup>* tricaryon crosses yielded fully matured and well-formed perithecia only (fig. S7). In addition, these fruiting bodies produced as many asci as the ones originating from wild-type crosses.

### **The *PaKmt6* null allele reduces the ascospore germination efficiency**

In the progeny of the single *ΔPaKmt1* and *ΔPaHP1* or the double *ΔPaKmt1 ΔPaHP1* mutants, haploid ascospores germinated as wild-type ascospores (N=100, table 1B). However, two third of the ascospores produced by the homozygous *ΔPaKmt6* crosses did not germinate, although they looked as pigmented than that of the wild-type (3 independent experiments, N=100 for each experiment, table 1B). On G medium, wild-type ascospore germination occurs at a germ pore located at the anterior side of the ascospore, by the extrusion of a spherical structure. This transient structure, called a germination peg, gives rise to a polarized hypha that develops into mycelium. In the *ΔPaKmt6* mutants, the ascospore germination process is stopped at an early stage, since germination pegs are not formed (data not shown). Moreover, the *ΔPaKmt6* defect was ascospore autonomous since ascospores from wild-type progeny obtained in WT x *ΔPaKmt6* crosses germinated normally, whereas those from *ΔPaKmt6* progeny did not. *PaKmt6<sup>+</sup> / ΔPaKmt6* dikaryotic ascospores had a wild-type germination rate showing that the *ΔPaKmt6* defect was recessive (2 independent experiments, N=80 dikaryotic ascospores). It has been previously shown that unpigmented ascospores carrying the *pks1-193* mutant allele germinates at high frequency (over 95%) on both inducing and non-inducing media. Indeed, the *P. anserina pks1-193* mutants carry a recessive null mutation in the gene encoding the polyketide synthase involved in the first step of DHN melanin biosynthesis (Evelyne Coppin et Silar 2007). Therefore, these mutants form unmelanized ascospores that germinate spontaneously, even on non-inducing media. When crosses between *pks1-193 ΔPaKmt6 mat<sup>-</sup>* and *pks1<sup>+</sup> ΔPaKmt6 mat<sup>+</sup>* strains were performed, they generated the expected asci made of two unpigmented and two pigmented ascospores. If the pigmented ascospores (*pks1<sup>+</sup> ΔPaKmt6*) had to be transferred to inducing G medium for some of them to germinate, the unpigmented ones (*pks1-193 ΔPaKmt6*) germinated efficiently (over 90%) even on non-inducing medium. This result shows that the absence of melanin suppressed the *ΔPaKmt6* ascospore germination defect, as for those of the *ΔPaPls1* and the *ΔPaNox2* mutants (Lambou et al. 2008a).

The same reduced germination efficiency was observed for ascospores issued from the double  $\Delta PaHP1 \Delta PaKmt6$  double mutants. However, the germination defect was further enhanced in both  $\Delta PaKmt1 \Delta PaKmt6$  and  $\Delta PaSir2 \Delta PaKmt6$  double mutants as well as in  $\Delta PaKmt1 \Delta PaKmt6 \Delta PaSir2$  triple mutants (table 1B and data not shown). Notably, it appeared that the triple  $\Delta PaKmt1 \Delta PaHP1 \Delta PaKmt6$  germination efficiency was similar to the double  $\Delta PaHP1 \Delta PaKmt6$  rather than the one of the double  $\Delta PaKmt1 \Delta PaKmt6$  mutants. This might be due to a slightly reduced pigmentation of the ascospores produced by the homozygous  $\Delta PaKmt1 \Delta PaHP1 \Delta PaKmt6$  crosses. Indeed, even if only the darker wild-type looking ones were used in this test, slightly reduced pigmentation facilitates germination.

### Complementation experiments with GFP-tagged proteins

To verify that the *PaKmt1* deletion was responsible for the observed phenotypes, we transformed a *PaKmt1-mCherry* allele into a knockout  $\Delta PaKmt1$  strain. Because *PaKmt1-mCherry* allele was linked to a phleomycin marker, we selected the phleomycin resistant transformants. Among those that were recovered (N=55), five wild-type looking independent transgenic strains were selected and crossed to a wild-type strain. In the progeny, all the phleomycin and hygromycin resistant haploid strains behaved similarly to wild-type strain. Two of these independent transformants were selected for further phenotypic characterization (e.g., wild-type growth rate, standard production of aerial hyphae, no difficulties in growth resuming, restoration of enzymatic activity), showing full complementation of the *PaKmt1* deletion (table 1A and fig. S4B). To ask whether a constitutive and over-expression of *PaKmt1* could have an impact on the physiology of *P. anserina*, we introduced the *AS4-PaKmt1-mCherry* allele into a  $\Delta PaKmt1$  strain. Indeed, the AS4 promoter drives a highly and constitutively expression throughout the life cycle (P. Silar et Picard 1994). All the phleomycin resistant transformants looked like wild-type strains (N=30 phleomycin resistant). Two of them were crossed to wild-type strains. In their progeny, all the phleomycin resistant strains carrying either the *PaKmt1*<sup>+</sup> allele or the  $\Delta PaKmt1$  were indistinguishable from the wild-type strains (data not shown).

Similarly, we transformed a *PaHP1-GFP* allele, linked to a phleomycin marker, into a mutant  $\Delta PaPH1$  strain. Among the phleomycin resistant transformants that were recovered (N=20), we selected five independent transformants displaying a wild-type phenotype on M2 medium and crossed them to a wild-type strain. In the progeny, all the phleomycin and hygromycin resistant haploid strains behaved similarly to wild-type strain.

Two of these independent transformants were selected for further phenotypic characterization (*i.e.*, wild-type growth rate, standard production of aerial hyphae, no difficulties in growth resuming), showing full complementation of the *PaHP1* deletion. Ubiquitous over-expression of the *AS4-PaHP1-GFP* allele did not result in any additional phenotypes. Indeed, when such an allele was introduced by transformation into a mutant  $\Delta PaPH1$  strain, the phleomycin resistant transformants (N=19) showed intermediate to full complementation but no extra phenotypes. Two transformants presenting full complementation were crossed to wild-type strains. In their progeny, all the phleomycin resistant strains carrying either the *PaHP1*<sup>+</sup> allele or the  $\Delta PaHP1$  behaved like the wild-type strains (data not shown).

Finally, we transformed a *PaKmt6* allele and a *PaKmt6-GFP* allele independently into a knockout  $\Delta PaKmt6$  strain. For the two transformation experiments, among the phleomycin resistant transformants that were recovered (N=20 and N=32, respectively), we selected two independent transgenic strains displaying a wild-type phenotype on M2 medium to cross them to a wild-type strain. In the progeny of these four crosses, all the phleomycin and nourseothricin resistant haploid strains behaved similarly to wild-type strain (*i.e.*, wild-type growth rate, standard production of aerial hyphae, restoration of full fertility and germination efficiency, restoration of enzymatic activity), showing full complementation of the *PaKmt6* deletion.

### **Subcellular localization of PaKmt1-GFP, PaKmt6-GFP, and PaHP1-GFP**

Because deleted strains were fully complemented by the fluorescent-tagged proteins, we explored their cellular localization in two-day old growing mycelium. Both PaKmt1-mCherry and PaHP1-GFP signals were nuclear and punctuated. When merged, the two fluorescent signals co-localized. Although the *PaKmt6-GFP* allele complemented the *PaKmt6* deletion, no GFP signal was detectable in the condition of the experiment (two-day old growing mycelium). As expected (Freitag, Hickey, et al. 2004), when the *PaHP1-GFP* allele was introduced by crossing into a  $\Delta PaKmt1$  strain, the GFP signal was present but mislocalized (fig. 5). Instead of forming foci, the GFP fluorescence was still nuclear but fuzzy, suggesting that, without H3K9 tri-methylation, the PaHP1 protein is no longer recruited by the heterochromatin genomic territories. On the contrary, in the same experimental conditions (two-day old growing mycelium), when present either in a  $\Delta PaKmt6$  or a  $\Delta PaRid$  strain, the PaHP1-GFP protein was localized as in a wild-type background. Therefore, neither PaKmt6, by itself or through H3K27 tri-methylation, nor PaRid are involved in targeting the PaHP1 to its proper genomic compartments.

## Genome-wide distribution of H3K4me3, H3K9me3, and H3K27me3 histone modifications in *P. anserina* genome

To unravel the complex molecular mechanism of epigenetic mark establishment, we used ChIP-seq experiments (Chromatin-immunoprecipitation experiment followed by genome wide sequencing) to generate high-resolution map using anti-bodies against the euchromatin mark H3K4me3, the obligate heterochromatin mark H3K9me3, and the facultative heterochromatin mark H3K27me3 in four genetic backgrounds. Indeed, these experiments were performed on chromatin extracts from vegetatively growing mycelium of the wild-type strain and the single  $\Delta PaKmt1$ ,  $\Delta PaKmt6$ , and  $\Delta PaHP1$  mutant strains. Because the  $\Delta PaKmt6$  mutant stops growing steadily after 60 h at 27°C (fig.3B and S3B), all chromatin samples were collected at this time point.

Being a hallmark of euchromatin, the H3K4me3 modification covered 10.79 % of the *P. anserina* genome. With a total of 3050 peaks, this mark appeared to be distributed on the seven chromosomes and present in blocks of approximately 1 kb in gene-rich regions (table 2A and fig. 6C). Indeed, the mark is found in about one third of the annotated CDS (3478), mostly in the promoter region and the 5' of the ORF. As in other eukaryotes, H3K4me3 shows a positive correlation with transcriptional activity, since the H3K4me3 marked genes are mostly found to be expressed (fig. 7) when searching previous RNA-seq experiments performed on vegetative mycelium (1 day of growth and 4 days of growth). Remarkably, when H3K4me3 peaks were localized in repeats, it corresponded in most cases to TEs inserted into CDS (49 out of 63 the H3K4me3 peaks were found in the repeats).

H3K9me3 is the less abundant mark found in *P. anserina* genome (1090 peaks, 2.89% of the genome). It was present in approximately 1-kb-long blocks found at repeat-rich regions containing transposable elements (and in some genes nearby repeated regions (469), suggesting that it can spread locally), as well as centromeric and telomeric regions. Intriguingly, this mark is not equally distributed on the *P. anserina* chromosomes, since it appeared significantly enriched on chromosomes four, six, and even more highly augmented on chromosome five (fig. 6A). This is somewhat of a surprise because if chromosome five is enriched in transposable elements and repeats, the chromosomes four and six are not. H3K9me3 shows a negative correlation with transcriptional activity, since the H3K9me3-marked genes are found to be not expressed during vegetative growth (fig. 7).

Although H3K27me3 is the most common mark found in the *P. anserina* genome (1941 peaks), it covered a sizeable part of the genome (18%) with large blocks of approximately 3.5 kb. About one fourth of the annotated CDS (2800) were marked with H3K27me3. As such, most of these genes were not expressed during the vegetative growth phase (fig. 7). Being the hallmark of facultative heterochromatin, H3K27me3 was found neither at the centromere nor at the telomeres. Nonetheless, about 16% of H3K27me3 was found in repeat-rich regions. As a consequence, both H3K9me3 and H3K27me3 were found in these gene-poor compartments. Indeed, these two heterochromatin marks shared 954 common peaks, which actually represented 87% of the H3K9me3 peaks (table 2B). This result is quite divergent from the anti-correlative distribution of H3K9me3 and H3K27me3 observed in mammals (Saksouk, Barth, Ziegler-Birling, Olova, Nowak, Rey, Mateos-Langerak, Urbach, Reik, Torres-Padilla, Imhof, Déjardin, et al. 2014). Moreover, as H3K9me3, the H3K27me3 mark was not equally distributed on *P. anserina* chromosomes, since it appeared also significantly enriched on chromosomes four, six, and even more highly augmented on chromosome five (fig. 6A). However, by contrast to *Zymoseptoria tritici*, the chromosomes enriched in H3K27me3 are not dispensable (Schotanus et al. 2015). By contrast, the genomic distribution of H3H4me3 was mutually exclusive with both H3K9me3 and H3K27me3. In mammals, totipotent cells show bivalent genes where both active and repressive chromatin marks are present. Fungal nuclei conserved their totipotency features during all the life cycle. Indeed, in these organisms, any cells can give rise to a new complete and totipotent individual. However, as in other fungi, we did not find any bivalent genes harboring both H3K4me3 and H3H27me3 marks.

The distribution of H3K4me3, H3K9me3, and H3K27me3 marks might allow defining three specific epigenomic categories for *P. anserina* chromosomes. The first category would consist in chromosome one, chromosome two, and chromosome seven, which all showed high content of H3K4me3 and low content of both H3K27me3 and H3K9me3. The second category would cluster chromosome four and chromosome six, which were enriched in both H3K27me3 and H3K9me3 but showed a reduced H3K4me3 coverage. The last category would contain the chromosome five, which displayed the most abundant coverage in both H3K27me3 and H3K9me3 along with the less abundant H3K4me3 coverage. It would be of interest to investigate whether these distinct epigenetic features might correlate with specific functions.



## Deletions of *PaKmt1* and *PaKmt6* eliminates the H3K9me3 and H3K27me3 respectively

ChIP-seq experiments performed in the  $\Delta PaKmt1$  mutant strain confirmed that the corresponding protein is the only H3K9 methyltransferase of *P. anserina*, since no such marks were left in the mutant background (fig. 6C). The H3K9me3 coverage dropped from 2.89% in the wild-type background to 0% in the  $\Delta PaKmt1$  mutant background. This was in line with our western blot analysis (fig. 2). By contrast to *Neurospora* (Basenko et al. 2015), we did not detect any relocalization of the H3K27me3 marks, but a significant decrease (genome coverage dropped from 18.95% to 4.37%). Indeed, 30% of the H3K27me3 peaks were missing in the  $\Delta PaKmt1$  mutant background, especially those in the gene-rich blocks, since 70% of the CDS enriched with H3K27me3 in a wild-type background were not anymore in this mutant background (genes loss: 1915 out of 2800). Moreover, the average length of the H3K27me3 was reduced by two third, from 3.5 kb in the wild-type background to 1.2 kb in the  $\Delta PaKmt1$  mutant background. However, chromosomes four, five, and six still appeared enriched in H3K27me3. Notably, several secondary metabolite clusters (see annexes) and their H3K9me3, also lost all their H3K27me3 marks in a  $\Delta PaKmt1$  mutant background (cluster 14, cluster 21, cluster 22, cluster 34). These clusters are thus likely depressed.

The PaHP1 protein is predicted to be recruited on the constitutive H3K9me3-enriched heterochromatin. Although this protein has no histone methyltransferase activity, the genome coverage diminished from 2.89% to 1.85%. Indeed, 65% of the H3K9me3 marks were lost, most of those that were localized in CDS (gene loss: 381 out of 469). This was particularly apparent in the secondary metabolite clusters (cluster 18, cluster 28). The H3K27me3 pattern in the  $\Delta PaHpl$  mutant background was similar to that of  $\Delta PaKmt1$  (gene loss: 1914 out of 2800, genome coverage 5.06%). Yet, if the density of H3K9me3 was reduced, the average size of the peaks was quite larger, expanding from 0.9 kb in the wild-type background to 1.5 kb in the  $\Delta PaHpl$  mutant background. This suggests that, in the absence of the recruitment platform mediated by the binding of PaHP1 to the constitutive heterochromatin, the compact structuration might be partly relaxed and the histone modifications lost, but also that the boundaries between heterochromatin and euchromatin might be less clear-cut. However, neither in the  $\Delta PaKmt1$  nor the  $\Delta PaHpl$ , the H3K4me3 distribution and density was changed (genome coverage 11.64 % and 10.29%, respectively). As we previously pointed out, in a wild-type background the H3K9me3 distribution overlapped with the H3K27me3 distribution (see above).

However, in the *ΔPaHpl1* mutant, the proportion of shared peaks dropped from 87% (table 2B) to 24% (230 peaks are shared by H3K9me3 and H3K27me3 out of 418 H3K9me3 peaks).

By contrast to the *ΔPaKmt1* mutant, ChIP-seq experiments performed in the *ΔPaKmt6* mutant strain revealed that the deletion did not eliminate all the H3K27me3 marks (47 peaks were conserved out of 1941, genome coverage dropped from 18.95% to 0.03%). This was reminiscent of the western blot analysis, where a faint band was still visible in the *ΔPaKmt6* mutants but disappeared in the *ΔPaKmt1 ΔPaKmt6* double mutants. Yet, dot-blot analysis ruled out a potential cross-hybridization of the H3K27me3 marks with the H3K9me3 antibody (fig. S8). Altogether, this indicates that PaKmt1 might have a residual H3K27 histone-methyltransferase activity that would account for the remaining H3K27me3 marks. Alternatively, we could detect the H3K27me2 modification, which has not yet been characterized in *P. anserina*. Surprisingly, the H3K9me3 was also strongly impacted by the loss of PaKmt6 (genome coverage dropped from 18.95% to 0.17%). Out of the 1090 H3K9me3 peaks detected in the wild-type background, only 85 remained in the *ΔPaKmt6* mutant background. This means that the reduction of the H3K9me3 marks is as strong as that of the H3K27me3 in this mutant background. Notably, only two CDS out of 469 still showed some H3K9me3. This might indicate that if H3K9me3 could reach CDS nearby the repeats, it is no longer possible in the absence of PaKmt6. Nevertheless, the remaining H3K9me3 marks in the *ΔPaKmt6* mutant background were not mislocalized since this set of data clusters with other H3K9me3 IP experiments, as shown by Spearman correlation (fig. S9).

H3K4me3 patterns stayed unchanged in all the mutant backgrounds, suggesting that loss of methylated H3K27, methylated H3K9, or the PaHP1 H3K9me3 reader have no impact on the H3K4 methylase activity (fig. 6B).

## Discussion

In eukaryotes, the deposition of histone modification is essential to chromatin features and regulation of gene expression. Because *P. anserina* displays no DNA methylation but a conserved PRC2 complex, we aimed at understanding the impact of heterochromatin assembly on *P. anserina* life cycle in relation with its genome organization. To this end, we adopted two strategies. On one hand, we constructed mutants impaired either in the constitutive heterochromatin assembly and maintenance, namely  $\Delta PaKmt1$  and  $\Delta PaHP1$ , or in the facultative PRC2-related heterochromatin assembly, namely  $\Delta PaKmt6$ . On the other hand, we carried out ChIP-seq to uncover genome-wide distributions of (i) H3K4me3, associated with active chromatin segments, (ii) H3K9me3, associated with constitutive heterochromatin, and (iii) H3K27me3, associated with facultative heterochromatin. These experiments were performed on the wild-type strain but also on the three mutant backgrounds i.e.  $\Delta PaKmt1$ ,  $\Delta PaHP1$ , and  $\Delta PaKmt6$ .

### **Constitutive chromatin is dispensable whereas facultative chromatin is required for most of the *P. anserina* developmental programs**

Assessing the phenotype of  $\Delta PaKmt1$ ,  $\Delta PaHP1$ , and  $\Delta PaKmt6$  single mutants, we established that the loss of both PaKmt1 and PaHP1 has almost no effects on *P. anserina* life cycle, whereas the absence of PaKmt6 drastically impairs every developmental step. Hence, if briefly recapitulated, the  $\Delta PaKmt6$  inactivation resulted in (i) reduced germination efficiency of ascospores, (ii) slow, irregular, and thermo-sensitive mycelium growth, (iii) absence of aerial hyphae, (iv) striking over-production of male gametes, (v) reduced fertility of the female gametes and/or of fertilization efficiency, (vi) formation of crippled and misorientated fruiting bodies, and (vii) reduced yields of ascospores. This means that almost every aspects of *P. anserina* life cycle are impacted by the loss of most of H3K27me3 marks and consequently of the facultative heterochromatin (see below). By contrast, the single  $\Delta PaKmt1$  and  $\Delta PaHP1$  mutants showed only marginal defects on aerial hypha production and growth resuming after a period of arrest. More importantly, the single  $\Delta PaKmt1$  and  $\Delta PaHP1$  and double  $\Delta PaKmt1 \Delta PaHP1$  mutants are fully fertile. These phenotypes are the complete opposite of what had been described for those of *N. crassa*. Indeed, inactivation of *Set-7* established that the H3K27me enzymatic activity is dispensable for normal growth and development (Basenko et al. 2015).

By contrast, deletion of both *DIM-5*, a gene encoding the H3K9 methyltransferase, and *Hpo*, a gene encoding the orthologue of the HP1 protein (Freitag, Hickey, et al. 2004), resulted in defective phenotypes that resemble those of *P. anserina PaKmt6* mutants. Furthermore, loss of Kmt1 or HP1 orthologues in *L. maculans* (Soyer et al. 2014), *E. festucae* (Chujo et Scott 2014), *P. oxalicum* (Xiaoli Zhang et al. 2016b), and to a lesser extent in *A. fumigatus* (Palmer et al. 2008) also results in reduced vegetative growth and delayed conidiation, although it has no impact on sexual reproduction when assayed in *L. maculans*. Conversely, *F. graminearum kmt6* mutants show aberrant germination patterns, over-pigmented mycelium, restricted growth, reduced pathogenicity, over-production of several SM clusters, and sterility, while loss of Kmt1 or HP1 orthologues does not lead to any noticeable phenotypes (Connolly, Smith, et Freitag 2013). Similarly, *F. fujikuroi kmt6* mutants form stunted mycelia that produce a reduced yield of conidia (Studt, Rösler, et al. 2016).

### **Conserved function of PRC2 complex in fungal development**

This intriguing contrasted picture suggests that two categories of fungi might be distinguished with respect to facultative heterochromatin functions. In *P. anserina*, *F. graminearum*, and *F. fujikuroi*, methylation of H3K27 by the PRC2 complex represses developmentally regulated genes, especially by establishing and maintaining long-term gene silencing memory accordingly to cell fate specification. This is in line with what has been reported for plants (Goodrich et al. 1997), insects (Birve et al. 2001), and higher eukaryotes (O'Carroll et al. 2001) where disruption of PRC2 activity leads to abnormal differentiation of embryos and abnormal cell proliferation in cancer (Conway, Healy, et Bracken 2015). In other fungi, as in *N. crassa* (Basenko et al. 2015) and in *Cryptococcus neoformans* (Dumesic et al. 2015), the role of facultative heterochromatin-mediated gene silencing is no longer required for proper development. Furthermore, abnormal development of *Kmt1/HP1* mutants in a panel of fungi, including *N. crassa* (see above), might point toward a transfer of reversible gene silencing function from facultative to constitutive heterochromatin. However, if elimination of any member of the Neurospora DCDC complex (*DIM-5/DIM-7/DIM-9/DDB1/CUL4*) led to loss of H3K9me3, it also caused massive changes in the distribution of H3K27me2/3, since this facultative heterochromatin hallmark was then found to be localized at chromosomal segments that were originally marked by H3K9me3 (Basenko et al. 2015). The same re-localization of H3K27me2/3 was also observed in *Hpo* mutants, although loss of H3K9me3 was only partial and the mark distribution unchanged (Jamieson et al. 2016b).

This implies that, in absence of the HP1 protein, these non-overlapping marks became superimposed. Interestingly, when the H3K27me catalytic activity was lost, the density and distribution of H3K9me3 were not impacted (Jamieson et al. 2016b). Moreover, double *Set-7 DCDC* mutants grew better than single *DCDC* mutants, suggesting that part of their poor growth might be due to the mis-localization of H3K27me<sub>2/3</sub>. If this latter hypothesis were right, then the H3K27me<sub>3</sub> original distribution does not account for silencing of developmentally regulated genes in *N. crassa*, since it is not its elimination but its redistribution in otherwise H3K9me<sub>3</sub> marked genomic segments that would impair their growth.

Strikingly, in fungi showing a conserved function of PRC2, the PRC1 complex is not present. This implies that if H3K27me still serves as a repressive mark, alternative unknown mechanisms might replace the downstream PRC1 readers, although its H2A mono-ubiquitylation activity is not always required for silencing (Pengelly et al. 2015).

### **PaRID does not act upstream of the PaKmt1/PaHP1 constitutive heterochromatin machinery to signal specific sexual development gene silencing**

The demonstration that mutants lacking both PaKmt1 and PaHP1 sexually reproduced as wild-type is of particular interest. In a previous report (Timpano et al., in preparation), we hypothesized that these two proteins might act downstream of the PaRid putative DNA methyltransferase to assemble constitutive heterochromatin as in *N. crassa* (Lewis et al. 2009a). In this study, we established that the RIPed targets, the ETs mostly, are readily enriched in H3K9me<sub>3</sub>. Altogether, these findings indicate that the RIP is not mechanistically involved in silencing some of the sexual-specific developmentally regulated genes. Actually, if PaRid targeted *cis* regulatory sequences to silence the neighboring genes through constitutive heterochromatin assembly, inactivation of either PaKmt1 or PaHP1 would have resulted in the same reproductive blockage than that of the  $\Delta PaRid$  mutants (micro-perithecia and lack of croziers). On the other end, the aggravated phenotype of the double  $\Delta PaRid \Delta PaKmt6$  implies that they are involved in two distinct pathways with respect to sexual reproduction. Yet, both PaKmt6 and PaRid have to be active in the female gamete for the fertilization to occur. The crosstalk between the H3K27me<sub>3</sub> modification and the PaRid activity and/or its genomic localization will still have to be further investigated. Given the phenotype of the single and double mutants, one can hypothesize that the H3K27me<sub>3</sub> marks or the PaKmt6 enzyme by itself might help PaRid binds to its targets.

## Distribution of histone modifications in *P. anserina* chromatin

To better understand the genome organization of *P. anserina*, we took advantage of ChIP-seq to uncover genome-wide chromatin landscapes. As expected, the H3K4me3 modification was found in gene-rich segments, typically associated with active chromatin. By contrast, H3K9me3, the hallmark of constitutive heterochromatin, was present in short blocks restricted to repeats-rich regions, mostly located near telomeres and centromeres, while H3K27me3 defined larger blocks of facultative heterochromatin that contain both annotated CDS and H3K9me3 marked repeats. Yet, almost all the H3K9me3 identified peaks, which encompass TEs and repetitive regions such as centromeres and telomeres, are included within the H3K27me3 peak set. On the contrary, H3K4me3 modification is mutually exclusive with both of the repressive marks H3K9me3 and H3K27me3, as already described in a variety of eukaryotes.

Co-occurrence of H3K9me3 and H3K27me3 in the same genomic domains was surprising since in plants, mammals, and fungi such as *N. crassa* and *F. graminearum*, these two repressive marks do not normally overlap. Such H3K9me3 and H3K27me3 overlap had been described for some mammal cancer cells and ETs loci in *A. thaliana* (Deleris et al. 2012), but always associated with DNA methylation. Since very few, if any, DNA methylations is present in the *P. anserina* genome, this pattern is thus quite unusual. Besides, this suggests that different filamentous fungi use diverse combinations of the same basic chromatin-based toolkit to regulate gene expression through chromatin structure.

When we looked at the modifications found in the complete set of annotated CDS, 33% of them were marked with H3K4me3 (3478 out of 10500) versus 26% marked with H3K27me3 (2800 out of 10500). This indicates that at 2.5 days of vegetative growth, roughly one third of the *P. anserina* complete set of genes is embedded in a transcriptionally active chromatin conformation, one third is likely silenced by facultative heterochromatin, and one third is devoid of either active or repressive marks. We will have to further characterize the expression status of this last category of genes to determine whether a PRC2 independent silencing system exists in *P. anserina*.

## **Chromatin status might confer distinct epigenetic identity to *P. anserina* chromosomes**

On a broad scale, the patterns of histone modifications that we described in this study suggest that *P. anserina* chromosomes harbor three distinct combinations of epigenomic features that might be related to functional compartmentalization of its genome.

The first combination, composed of high content of H3K4me3 and low content of both H3K27me3 and H3K9me3, is shared by chromosomes one, two, three, and seven. The second combination, made of reduced content of H3K4me3 and enhanced content of both H3K27me3 and H3K9me3, is that of chromosomes four and six. The last combination, which corresponds to the highest contents in the repressive H3K27me3 and H3K9me3 marks and the lowest content in the active H3K4me3 mark concerns the chromosome five only. Remarkably, this chromosome contains a spore-killer locus, responsible for drastic distortion of meiotic segregation (Grognet, Lalucque, et al. 2014). This non-random distribution of repressive mark cannot only be accounted for by the TE/repeats content of these chromosomes. Indeed, if the fifth chromosome is enriched in repetitive sequences, the fourth and sixth are not. Although the genome structure of these two fungi is quite different, the *P. anserina* patterns of histone modifications observed are reminiscent of those of *Z. tritici* (Schotanus et al. 2015), *i.e.* *Z. tritici* is endowed with 13 core chromosomes plus 8 accessory ones, whereas *P. anserina* has seven core chromosomes but no accessory ones. Accessory chromosomes showed dramatically higher enrichment of H3K9me3 and H3K27me3, in line with the twofold higher proportion of repetitive DNA. In consequences, the few genes still present on these chromosomes are silenced by H3K9me and H3K27me modifications. It has been proposed that the epigenetic imprint of these accessory chromosomes would signal that they can be lost, by opposition to the core chromosome that has to be retained. Since no such dispensable chromosomes are present in the *P. anserina* genome, it would be of interest to investigate whether these distinct epigenetic features might correlate with specific functions.

## **PaKmt1 and PaKmt6 are not independent actors of chromatin remodeling**

To test for potential crosstalk between constitutive and facultative heterochromatin we carried out ChIP-seq in single  $\Delta PaHP1$ ,  $\Delta PaKmt1$ , and  $\Delta PaKmt6$  mutants using antibodies rose against H3K4me3, H3K9me3, and H3K27me3.

Elimination of PaKmt1 suppressed all the H3K9me3, which demonstrates that there is no other H3K9 methyltransferase activity in *P. anserina*. Importantly, loss of constitutive heterochromatin does not lead to the redistribution of H3K27me3 as seen in *N. crassa*. Moreover, we observed a slight reduction of H3K27me3 in this mutant background. This finding indicates that PaKmt1 might have a residual H3K27 histone-methyltransferase activity that would account for the remaining H3K27me3 marks. In the absence of PaHP1, both of the repressive marks are moderately reduced indicating that there is no positive loop between PaHP1 and PaKmt1 to install and maintain the constitutive chromatin. As already described in other filamentous fungi, PaHP1 is only a H3K9me3 reader. The reduction in H3K27me3 content might then be due to the lack of recruitment of histone deacetylases through the PaHP1 platform. The *PaKmt6* mutants showed the most massive changes in the distribution of H3K27me but also a significant reduction of H3K9me3. This might be explained if PaKmt6, which, according to our ChIP-seq experiments cannot be a catalytic substitute to PaKmt1, directs *PaKmt1* to its genomic compartment. Interestingly, the content of H3K4me3, the active mark, is almost unchanged in all of the mutant backgrounds, suggesting that even massive changes in both of the repressive marks distributions had no impact on euchromatic territories.

Altogether, our findings using *P. anserina* as model organism shed new light on interactions of facultative and constitutive heterochromatin in eukaryotes.



## Figure legends

### Figure 1. Structure and phylogeny of heterochromatin proteins

Species referenced here are filamentous fungi *Podospora anserina* (Pa), *Neurospora Crassa* (Nc), *Fusarium graminearum* (Fg), *Trichoderma reesei* (Tr), *Epicholë festucae* (Ef) *Botrytis cinerea* (Bc), *Magnaporthe oryzae* (Mo), *Zymoseptoria tritici* (Zt), *Leptosphaeria maculans* (Lm), *Aspergillus nidulans* (An), *Aspergillus fumigatus* (Af), *Penicillium oxalicum* (Po), *Ascobolus immersus* (Ai), *Puccinia graminis* (Pg), *Pneumocystis jirovecii* (Pj), *Conidiobolus coronatus* (Cc), *Mucor circinelloides* (Mc); yeasts *Schizosaccharomyces pombe* (Sp) and *Cryptococcus neoformans* (Cn); the worm *Caenorhabditis elegans* (Ce), the fruit-fly *Drosophila melanogaster* (Dm), the mouse *Mus musculus* (Mm), and the model plant *Arabidopsis thaliana* (At). Accession numbers for proteins used in alignments are listed in Supplementary Table. Abbreviation: aa, amino acids

A. Domain structure comparison of histone methyltransferase KMT1 (a) and KMT6 (b) and HP1 (c) proteins including LHP1 from a panel of species (left). Sizes in amino acid (aa) are given (right). Pre-SET (red, IPR007728), SET (orange, IPR001214), and Post-SET (green, IPR003616) conserved domains are required for H3K9 methyltransferase activity of KMT1 homologue proteins. Chromodomain (turquoise, IPR023780) recognizes H3K9me<sub>2/3</sub> histone modification. SRA (SET and RING finger-associated, purple, IPR003105), SANT (blue, IPR001005), and Chromo-shadow (dark green, IPR008251) are protein-protein interaction domains. CXC (yellow, IPR026489) is a cysteine rich conserved domain located in the H3K27 methyltransferase catalytic domain of KMT6 homologues.

B. Phylogenetic analysis of histone methylases and H3K9me<sub>3</sub> readers involved in heterochromatin assembly. First tree regroups both families of H3K9 (orange) and H3K27 (purple) methyltransferase proteins. Second tree regroups HP1 orthologues from fungi (blue), plant (green), and metazoan (red). Bootstraps are given.

### Figure 2. Detection of histone post-translational modifications

Immunoblot analysis of H3K9me<sub>3</sub>, H3K27me<sub>3</sub>, and H3K4me<sub>3</sub> modifications in wild-type (WT); single mutants  $\Delta PaKmt1$ ,  $\Delta PaKmt6$ ,  $\Delta PaSir2$ ,  $\Delta paHP1$ ,  $\Delta PaRid$ ; double mutant  $\Delta PaKmt1 \Delta PaKmt6$ ; complemented strains  $\Delta PaKmt1 -PaKmt1^{+-}$ ,  $\Delta PaKmt6 -PaKmt6^{+-}$ . Nuclear protein samples were extracted from protoplasts. 35  $\mu$ g of total nuclear protein were loaded in each lane.

Antibodies were raised against native H3 histone (H3), H3K9me3, H3K27me3, and H3K4me3 modifications. Expected size of histone 3 is 17 kDa (arrows). Probing with H3K27me3 and H3 antibodies reveals an additional signal, lower than 15 kDa.

### **Figure 3. Phenotypic characterisation of heterochromatic mutant strains**

A. *mat+* strains were grown on M2 minimal medium for 5 days at 27°C (right) or M2 plus yeast extract for 3 days at 27°C (left).

B. Vegetative growth kinetics on M2 minimum medium.

**Table 1A.** Relative growth rates (WT %) at optimal temperature (27°C) and sub-optimal temperature (11°C and 35°C) on M2 minimal medium.  $\Delta PaKmt6$  mutant strains display irregular and slow growth (ir) at 27°C and 35°C, which cannot be quantified (see supplementary figure 3). At 11°C, growth is too weak to be measured (Nd). At 27°C, double and triple mutants containing  $\Delta PaKmt6$  allele display aggravated (agr)  $\Delta PaKmt6$ -like growth defects.

**Table 1B.** Number of germinated ascospores out of a 100 issued from homozygote  $\Delta PaKmt6$  crosses and transferred on appropriate G medium. WT means wild-type germination efficiency (>95 %).

### **Figure 4. *PaKmt6* mutants are impaired for perithecia development**

A.  $\Delta PaKmt6$  homozygote crosses result in non-homogeneous distribution of late appearing perithecia showing multiple morphological defects: crippled structures that could either be due to lack of neck, lack of ostiols, lack setae, non-canonical pear-shape envelopes, or to supernumerary necks (up to three in panel XX); misdirected orientation, growing upside down in agar; fusions of perithecia, etc.

B. Heterozygote oriented crosses between WT strain and  $\Delta PaKmt6$  mutant strain. Fertilization of WT ascogonia with  $\Delta PaKmt6$  spermatia results in normal perithecia development, while fertilization of  $\Delta PaKmt6$  ascogonia with WT spermatia results in fewer crippled  $\Delta PaKmt6$ -like perithecia.

### **Figure 5. Specific PaHP1 localization is disturbed in $\Delta PaKmt1$ mutant strain**

Fluorescence microscopy pictures show PaHP1-GFP chimeric protein during vegetative growth in mycelium.

Nuclei are marked using *PaH1-mCherry* ectopic locus that encoded histone H1 protein tagged with mCHERRY fluorophore (red) in the indicated strain (left) or with DAPI (1 $\mu$ g/ $\mu$ l, blue) for  $\Delta$ *PaKmt6 PaHP-GFP* strain. Indicated scale is the same for all the pictures (2  $\mu$ m).

PaHP1-GFP displays nucleus localization and forms foci that correspond to heterochromatin domains (arrows). This specific localization is disturbed only in  $\Delta$ *PaKmt1* mutants.

**Figure 6. Epigenetic landscapes in wild-type and heterochromatin mutant strains of *P. anserina***

A. Distribution of detected peaks concentration for each IP samples on chromosomes. Drop of H3K4me3 on chromosome three is biased by rDNA array.

B. Venn diagram corresponding to the common peaks for each histone mark in various genotypes (blue for WT, orange for  $\Delta$ *PaKmt1*, red for  $\Delta$ *PaHP1*, and green for  $\Delta$ *PaKmt6*).

C. Panorama of genome-wide peak localization for each genotype. Telomeres sequences were arbitrarily defined as the segment going from the end of each arm of the chromosomes to the first annotated gene (at the exception of the rDNA cluster localized on chromosome 3). Therefore, it probably includes also peri-centromeric regions.

**Table 2A.** Table shows numbers, sizes, and genome occupancies of significative detected peaks. Numbers of genes and repeats included in these domains are specified.

**Table 2B.** Numbers of overlapping mark domains for each genotype.

**Figure 7. Histone mark distributions compared to gene expressions**

The violin plot shows peak distributions compared to gene expression status. The y axis corresponds to gene expression converted in TPM unit (log 2). The middle line corresponds to the average median, top and bottom lines to the interquartiles.

**Supplementary Figure 1. Expression kinetics of PaKmt1 in WT strain**

A. Schematic representation of the *PaKmt1* locus (DNA). mRNA1 corresponds to the spliced form of the transcripts while mRNA2 (1108 bp) corresponds to the unspliced form (1170 bp). Translation of the unspliced form would lead to a premature termination and thus to a truncated protein. Primers used for the reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) are drawn as arrows above and below the *PaKmt1* CDS.

B. RT-PCR on RNA extraction from WT vegetative growing mycelium (one day and four days), perithecia (two days and four days after the fertilization), and input genomic DNA. Two amplicons of distinct sizes are obtained, corresponding to both spliced (1108 bp) and unspliced (1170 bp) *PaKmt1* mRNAs. MW: molecular weight.

**Supplementary Figure 2. Molecular characterization of knock-out mutants by southern blot hybridization.**

Left. Schematic restriction maps of endogenous and disrupted loci. Coloured rectangles correspond to ORF. Slashing rectangles correspond to endogen sequences used for gene replacement by homologous recombination and for southern blot probe hybridizations.

Right. Enzymatic restriction profiles on genomic DNA using double probe hybridization on each locus.

**Supplementary figure 3. Vegetative growth characterization of heterochromatic mutant strains**

A.  $\Delta PaKmt1$  and  $\Delta PaHP1$  single mutants are impaired in aerial mycelium production. This defect was more pronounced for the single  $\Delta PaHP1$  mutants.  $\Delta PaKmt1 \Delta PaHP1$  double mutants show  $\Delta PaKmt1$  morphologic phenotype.

B.  $\Delta PaKmt6$  mutant displays slower and irregular vegetative growth with stop and arrest phases, which results in a “cauliflower” growing pattern. Vegetative growth is improved on M2 + YE rich medium.

**Supplementary figure 4. Experimental procedure for growth resuming**

A. Mycelium implants issued from germination thalli are inoculated onto a fresh M2 medium and incubated at 27°C for eight days (1). Two independent plugs from each location (red cross, eight-day stationary phase; orange cross, four-day stationary phase; and green cross, growing phase) are next transferred on a M2 solid medium and incubated for three days (2). The growing phase of each thallus is transplanted again on a M2 solid medium and incubated for three days (3).

B. Growth restart from stationary phase, from both plug\_2 and plug\_3, is impaired for  $\Delta PaKmt1$  and  $\Delta PaHp1$  single mutants and  $\Delta PaKmt1 \Delta PaHp1$  double mutants, which results in irregular, delayed, and over pigmented mycelia. Continuous growth is not altered for each of these mutants.

### **Supplementary figure 5. Crippled growth analyses**

Crippled growth (CG) process can be shown using a 'band test'. Strains were incubated on M2 medium for 7 days at 27°C. Two 1-mm-width slices of agar were then inoculated onto fresh M2 media with or without yeast extract in the following method for 3 days. Picture shows actively-growing apical hyphae (right) and resting stationary phase hyphae (left). The surface side of the slice on plate has been orientated at the top.

CG is a degenerative process caused by C element production in the stationary phase. When inoculated on yeast extract medium, it displays slow growth, alteration of pigmentation, inability to differentiate aerial hyphae, and female sterility. *ΔPaMpk1* mutant strain is impaired for CG development while *PDC2208* strain is supposed to display CG on M2 medium without yeast extract. The single *ΔPaHP1* and *ΔPaKmt1* mutants and the double *ΔPaHP1 ΔPaKmt1* mutants are not impaired for CG.

### **Supplementary figure 6. Heterochromatic mutants are not impaired for longevity**

Graphs show the maximum growth length on M2 medium at 27°C in race tube for heterochromatin mutant strains *Mat* – and *Mat* +. Data correspond to the mean of 3 technical samples from 5 biological samples.

### **Supplementary figure 7. Mosaic analyses with the *Δmat* mutant strain.**

WT or *ΔPaKmt6 mat* + and *mat* - strains were mixed with or without *Δmat* mycelium and inoculated onto fresh M2 medium. After a week of incubation under optimal condition, *ΔPaKmt6* dikaryon displayed crippled and mis-orientated perithecia, resulting in scattered and reduced ascospore production. The tricaryon *ΔPaKmt6 mat* + / *ΔPaKmt6 mat* - / *Δmat* showed wild-type mycelium, perithecia, and ascospore production.

### **Supplementary figure 8. Antibody specificity analysis**

Dot blot experiment results using H3K9me3 and H3K27me3 peptides (left) at different concentration (top). Membranes were inoculated with the corresponding antibody (right).

Signal intensity comparison shows a cross reactivity between anti-H3K9me3 antibody and H3K27me3 evaluated at 3% compared to the immunogen reaction.

### **Supplementary figure 9. Heat map of Spearman correlation coefficient comparison between ChIP-Seq samples**

Spearman correlation confirms the reproducibility of the experiments since biological replicates cluster together with high correlation coefficient. Moreover, H3K9me3 and H3K27me3 IP share a same cluster that negatively correlates with the H3K4me3 cluster. Both display no correlation with non-IP input and negative sample (Mock and H3K27me3 in the *ΔPaKmt6*), which means that IP results are significative and specific.

### **Supplementary figure 10. Assaying IP sample enrichment by qPCR**

The IP enrichments are calculated as follows: the input percentage (% Input) for *Pa\_5\_80* locus is divided by the % Input for Actin locus, both measured by qPCR. The actin gene (*Pa\_2\_11200*) is ubiquitously expressed and therefore embedded in euchromatin (*i.e.* poor in H3K9me3 and H3K27me3 and enrich in H3K4me3). On the contrary, *Pa\_5\_80* encoded an unknow protein but is localized near repeats, likely in a heterochromatic territory (*i.e.* rich in H3K27me3 and H3K9me3). The Mock enrichment is 1.7 which is clearly different from IP enrichments.

### **Supplementary table 1 Primers used in this study**

### **Supplementary table 2 Strains used in this study**

## Bibliography

- Altschul, S F, W Gish, W Miller, E W Myers, and D J Lipman. 1990. "Basic Local Alignment Search Tool." *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403–10. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1990.9999>.
- Ausubel, FM, R Brent, RE Kingston, DD Moore, JG Seidman, JA Smith, and K Struhl. 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience. New York.
- Bannister, Andrew J., Robert Schneider, and Tony Kouzarides. 2002. "Histone Methylation: Dynamic or Static?" *Cell* 109 (7): 801–6.
- Basenko, Evelina Y., Takahiko Sasaki, Lexiang Ji, Cameron J. Prybol, Rachel M. Burckhardt, Robert J. Schmitz, and Zachary A. Lewis. 2015. "Genome-Wide Redistribution of H3K27me3 Is Linked to Genotoxic Stress and Defective Growth." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (46): E6339-6348. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511377112>.
- Bernard, P., J. F. Maure, J. F. Partridge, S. Genier, J. P. Javerzat, and R. C. Allshire. 2001. "Requirement of Heterochromatin for Cohesion at Centromeres." *Science (New York, N.Y.)* 294 (5551): 2539–42. <https://doi.org/10.1126/science.1064027>.
- Bhaumik, Sukesh R., Edwin Smith, and Ali Shilatifard. 2007. "Covalent Modifications of Histones during Development and Disease Pathogenesis." *Nature Structural & Molecular Biology* 14 (11): 1008–16. <https://doi.org/10.1038/nsmb1337>.
- Birve, A., A. K. Sengupta, D. Beuchle, J. Larsson, J. A. Kennison, null Rasmuson-Lestander A, and J. Müller. 2001. "Su(z)12, a Novel Drosophila Polycomb Group Gene That Is Conserved in Vertebrates and Plants." *Development (Cambridge, England)* 128 (17): 3371–79.
- Boivin, Antoine, Sébastien Gaumer, and Annie Sainsard-Chanet. 2008. "Life Span Extension by Dietary Restriction Is Reduced but Not Abolished by Loss of Both SIR2 and HST2 in Podospora Anserina." *Mechanisms of Ageing and Development* 129 (12): 714–21. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.09.011>.
- Bok, Jin Woo, Yi-Ming Chiang, Edyta Szewczyk, Yazmid Reyes-Dominguez, Ashley D. Davidson, James F. Sanchez, Hsien-Chun Lo, et al. 2009. "Chromatin-Level Regulation of Biosynthetic Gene Clusters." *Nature Chemical Biology* 5 (7): 462–64. <https://doi.org/10.1038/nchembio.177>.
- Brygoo, Y, and R Debuchy. 1985. "Transformation by Integration in Podospora Anserina. I. Methodology and Phenomenology." 200: 128–31.
- Carver, Tim, Nick Thomson, Alan Bleasby, Matthew Berriman, and Julian Parkhill. 2009. "DNAPlotter: Circular and Linear Interactive Genome Visualization." *Bioinformatics (Oxford, England)* 25 (1): 119–20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn578>.

- Chujo, Tetsuya, and Barry Scott. 2014. "Histone H3K9 and H3K27 Methylation Regulates Fungal Alkaloid Biosynthesis in a Fungal Endophyte–Plant Symbiosis." *Molecular Microbiology* 92 (2): 413–34. <https://doi.org/10.1111/mmi.12567>.
- Connolly, Lanelle R., Kristina M. Smith, and Michael Freitag. 2013. "The *Fusarium Graminearum* Histone H3 K27 Methyltransferase KMT6 Regulates Development and Expression of Secondary Metabolite Gene Clusters." *PLoS Genetics* 9 (10): e1003916. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003916>.
- Conway, Eric, Evan Healy, and Adrian P. Bracken. 2015. "PRC2 Mediated H3K27 Methylations in Cellular Identity and Cancer." *Current Opinion in Cell Biology* 37 (December): 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.10.003>.
- Coppin, Evelyne, Sylvie Arnaise, Véronique Contamine, and Marguerite Picard. 1993. "Deletion of the Mating-Type Sequences in *Podospora Anserina* Abolishes Mating without Affecting Vegetative Functions and Sexual Differentiation." *Molecular and General Genetics MGG* 241 (3): 409–14. <https://doi.org/10.1007/BF00284694>.
- Coppin, Evelyne, and Philippe Silar. 2007. "Identification of PaPKS1, a Polyketide Synthase Involved in Melanin Formation and Its Use as a Genetic Tool in *Podospora Anserina*." *Mycological Research* 111 (Pt 8): 901–8. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.05.011>.
- Deleris, Angelique, Hume Stroud, Yana Bernatavichute, Elizabeth Johnson, Gregor Klein, Daniel Schubert, and Steven E. Jacobsen. 2012. "Loss of the DNA Methyltransferase MET1 Induces H3K9 Hypermethylation at PcG Target Genes and Redistribution of H3K27 Trimethylation to Transposons in *Arabidopsis Thaliana*." *PLoS Genetics* 8 (11): e1003062. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003062>.
- Dumesic, Phillip A., Christina M. Homer, James J. Moresco, Lindsey R. Pack, Erin K. Shanle, Scott M. Coyle, Brian D. Strahl, Danica G. Fujimori, John R. Yates, and Hiten D. Madhani. 2015. "Product Binding Enforces the Genomic Specificity of a Yeast Polycomb Repressive Complex." *Cell* 160 (1–2): 204–18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.039>.
- Espagne, Eric, Olivier Lespinet, Fabienne Malagnac, Corinne Da Silva, Olivier Jaillon, Betina M Porcel, Arnaud Couloux, et al. 2008a. "The Genome Sequence of the Model Ascomycete Fungus *Podospora Anserina*." *Genome Biology* 9 (5): R77. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-5-r77>.
- Espagne, Eric, Olivier Lespinet, Fabienne Malagnac, Corinne Da Silva, Olivier Jaillon, Betina M. Porcel, Arnaud Couloux, et al. 2008b. "The Genome Sequence of the Model Ascomycete Fungus *Podospora Anserina*." *Genome Biology* 9 (5): R77. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-5-r77>.
- Freitag, Michael, Patrick C. Hickey, Tamir K. Khlafallah, Nick D. Read, and Eric U. Selker. 2004. "HP1 Is Essential for DNA Methylation in *Neurospora*." *Molecular Cell* 13 (3): 427–34.
- Freitag, Michael, Dong W. Lee, Gregory O. Kothe, Robert J. Pratt, Rodolfo Aramayo, and Eric U. Selker. 2004. "DNA Methylation Is Independent of RNA Interference in *Neurospora*." *Science* 304 (5679): 1939–1939. <https://doi.org/10.1126/science.1099709>.



- Freitag, Michael, Rebecca L Williams, Gregory O Kothe, and Eric U Selker. 2002. "A Cytosine Methyltransferase Homologue Is Essential for Repeat-Induced Point Mutation in *Neurospora Crassa*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (13): 8802–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.132212899>.
- García-Cao, Marta, Roderick O'Sullivan, Antoine H. F. M. Peters, Thomas Jenuwein, and María A. Blasco. 2004. "Epigenetic Regulation of Telomere Length in Mammalian Cells by the Suv39h1 and Suv39h2 Histone Methyltransferases." *Nature Genetics* 36 (1): 94–99. <https://doi.org/10.1038/ng1278>.
- Goodrich, J., P. Puangsomlee, M. Martin, D. Long, E. M. Meyerowitz, and G. Coupland. 1997. "A Polycomb-Group Gene Regulates Homeotic Gene Expression in *Arabidopsis*." *Nature* 386 (6620): 44–51. <https://doi.org/10.1038/386044a0>.
- Grewal, Shiv I. S., and Songtao Jia. 2007. "Heterochromatin Revisited." *Nature Reviews. Genetics* 8 (1): 35–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2008>.
- Grewal, Shiv I. S., and Danesh Moazed. 2003. "Heterochromatin and Epigenetic Control of Gene Expression." *Science (New York, N.Y.)* 301 (5634): 798–802. <https://doi.org/10.1126/science.1086887>.
- Grigoriev, Igor V., Roman Nikitin, Sajeet Haridas, Alan Kuo, Robin Ohm, Robert Otilar, Robert Riley, et al. 2014. "MycoCosm Portal: Gearing up for 1000 Fungal Genomes." *Nucleic Acids Research* 42 (Database issue): D699-704. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1183>.
- Grognet, Pierre, Frédérique Bidard, Claire Kuchly, Laetitia Chan Ho Tong, Evelyne Coppin, Jinane Ait Benkhali, Arnaud Couloux, Patrick Wincker, Robert Debuchy, and Philippe Silar. 2014. "Maintaining Two Mating Types: Structure of the Mating Type Locus and Its Role in Heterokaryosis in *Podospora Anserina*." *Genetics* 197 (1): 421–32. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.159988>.
- Grognet, Pierre, Hervé Lalucque, Fabienne Malagnac, and Philippe Silar. 2014. "Genes That Bias Mendelian Segregation." *PLoS Genetics* 10 (5): e1004387. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004387>.
- Grossetête, Sandrine, Bernard Labedan, and Olivier Lespinet. 2010. "FUNGIpath: A Tool to Assess Fungal Metabolic Pathways Predicted by Orthology." *BMC Genomics* 11 (February): 81. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-81>.
- Gu, Qin, Tiantian Ji, Xiao Sun, Hai Huang, Hao Zhang, Xi Lu, Liming Wu, Rong Huo, Huijun Wu, and Xuewen Gao. 2017. "Histone H3 Lysine 9 Methyltransferase FvDim5 Regulates Fungal Development, Pathogenicity and Osmotic Stress Responses in *Fusarium Verticillioides*." *FEMS Microbiology Letters* 364 (19). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx184>.
- Guindon, Stéphane, Jean-François Dufayard, Vincent Lefort, Maria Anisimova, Wim Hordijk, and Olivier Gascuel. 2010. "New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0." *Systematic Biology* 59 (3): 307–21. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.

Halverson, D., G. Gutkin, and L. Clarke. 2000. "A Novel Member of the Swi6p Family of Fission Yeast Chromo Domain-Containing Proteins Associates with the Centromere in Vivo and Affects Chromosome Segregation." *Molecular & General Genetics: MGG* 264 (4): 492–505.

Hughes, Christina M., Orit Rozenblatt-Rosen, Thomas A. Milne, Terry D. Copeland, Stuart S. Levine, Jeffrey C. Lee, D. Neil Hayes, et al. 2004. "Menin Associates with a Trithorax Family Histone Methyltransferase Complex and with the Hoxc8 Locus." *Molecular Cell* 13 (4): 587–97.

Jamet-Vierny, Corinne, Robert Debuchy, Magali Prigent, and Philippe Silar. 2007. "IDC1, a Pezizomycotina-Specific Gene That Belongs to the PaMpk1 MAP Kinase Transduction Cascade of the Filamentous Fungus *Podospora Anserina*." *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 44 (12): 1219–30. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.04.005>.

Jamieson, Kirsty, Michael R. Rountree, Zachary A. Lewis, Jason E. Stajich, and Eric U. Selker. 2013. "Regional Control of Histone H3 Lysine 27 Methylation in *Neurospora*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (15): 6027–32. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303750110>.

Jamieson, Kirsty, Elizabeth T. Wiles, Kevin J. McNaught, Simone Sidoli, Neena Leggett, Yanchun Shao, Benjamin A. Garcia, and Eric U. Selker. 2016. "Loss of HP1 Causes Depletion of H3K27me3 from Facultative Heterochromatin and Gain of H3K27me2 at Constitutive Heterochromatin." *Genome Research* 26 (1): 97–107. <https://doi.org/10.1101/gr.194555.115>.

Jiang, Danhua, Nicholas C. Kong, Xiaofeng Gu, Zicong Li, and Yuehui He. 2011. "Arabidopsis COMPASS-like Complexes Mediate Histone H3 Lysine-4 Trimethylation to Control Floral Transition and Plant Development." *PLoS Genetics* 7 (3): e1001330. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001330>.

Kanoh, Junko, Stefania Francesconi, Ada Collura, Vera Schramke, Fuyuki Ishikawa, Giuseppe Baldacci, and Vincent Géli. 2003. "The Fission Yeast SpSet1p Is a Histone H3-K4 Methyltransferase That Functions in Telomere Maintenance and DNA Repair in an ATM Kinase Rad3-Dependent Pathway." *Journal of Molecular Biology* 326 (4): 1081–94.

Klocko, Andrew D., Tereza Ormsby, Jonathan M. Galazka, Neena A. Leggett, Miki Uesaka, Shinji Honda, Michael Freitag, and Eric U. Selker. 2016. "Normal Chromosome Conformation Depends on Subtelomeric Facultative Heterochromatin in *Neurospora Crassa*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (52): 15048–53. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615546113>.

Kouzarides, Tony. 2007. "Chromatin Modifications and Their Function." *Cell* 128 (4): 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>.

Kouzminova, E, and E U Selker. 2001. "Dim-2 Encodes a DNA Methyltransferase Responsible for All Known Cytosine Methylation in *Neurospora*." *The EMBO Journal* 20 (15): 4309–23. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.15.4309>.

- Krogan, Nevan J., Jim Dover, Shahram Khorrami, Jack F. Greenblatt, Jessica Schneider, Mark Johnston, and Ali Shilatifard. 2002. "COMPASS, a Histone H3 (Lysine 4) Methyltransferase Required for Telomeric Silencing of Gene Expression." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (13): 10753–55. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200023200>.
- Lachner, Monika, and Thomas Jenuwein. 2002. "The Many Faces of Histone Lysine Methylation." *Current Opinion in Cell Biology* 14 (3): 286–98.
- Lachner, Monika, Roderick J. O'Sullivan, and Thomas Jenuwein. 2003. "An Epigenetic Road Map for Histone Lysine Methylation." *Journal of Cell Science* 116 (Pt 11): 2117–24. <https://doi.org/10.1242/jcs.00493>.
- Lambou, Karine, Fabienne Malagnac, Crystel Barbisan, Didier Tharreau, Marc-Henri Lebrun, and Philippe Silar. 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." *Eukaryotic Cell* 7 (10): 1809–18. <https://doi.org/10.1128/EC.00149-08>.
- Lecellier, G, and P Silar. 1994. "Rapid Methods for Nucleic Acids Extraction from Petri Dish-Grown Mycelia." *Current Genetics* 25 (2): 122–23.
- Lee, Jung-Shin, Abhijit Shukla, Jessica Schneider, Selene K. Swanson, Michael P. Washburn, Laurence Florens, Sukesh R. Bhaumik, and Ali Shilatifard. 2007. "Histone Crosstalk between H2B Monoubiquitination and H3 Methylation Mediated by COMPASS." *Cell* 131 (6): 1084–96. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.046>.
- Lewis, Zachary A., Shinji Honda, Tamir K. Khlafallah, Jennifer K. Jeffress, Michael Freitag, Fabio Mohn, Dirk Schübeler, and Eric U. Selker. 2009. "Relics of Repeat-Induced Point Mutation Direct Heterochromatin Formation in *Neurospora Crassa*." *Genome Research* 19 (3): 427–37. <https://doi.org/10.1101/gr.086231.108>.
- Liu, Ye, Na Liu, Yanni Yin, Yun Chen, Jinhua Jiang, and Zhonghua Ma. 2015. "Histone H3K4 Methylation Regulates Hyphal Growth, Secondary Metabolism and Multiple Stress Responses in *Fusarium Graminearum*." *Environmental Microbiology* 17 (11): 4615–30. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12993>.
- Lorentz, A., K. Ostermann, O. Fleck, and H. Schmidt. 1994. "Switching Gene Swi6, Involved in Repression of Silent Mating-Type Loci in Fission Yeast, Encodes a Homologue of Chromatin-Associated Proteins from *Drosophila* and Mammals." *Gene* 143 (1): 139–43.
- Luger, Karolin. 2006. "Dynamic Nucleosomes." *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology* 14 (1): 5–16. <https://doi.org/10.1007/s10577-005-1026-1>.
- Miller, T., N. J. Krogan, J. Dover, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M. Johnston, J. F. Greenblatt, and A. Shilatifard. 2001. "COMPASS: A Complex of Proteins Associated with a Trithorax-Related SET Domain Protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (23): 12902–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.231473398>.

- Molitor, Anne, and Wen-Hui Shen. 2013. "The Polycomb Complex PRC1: Composition and Function in Plants." *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao* 40 (5): 231–38. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2012.12.005>.
- Mueller, John E., Megan Canze, and Mary Bryk. 2006. "The Requirements for COMPASS and Paf1 in Transcriptional Silencing and Methylation of Histone H3 in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Genetics* 173 (2): 557–67. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.055400>.
- Nguyen, Tinh-Suong, Hervé Lalucque, and Philippe Silar. 2018. "Identification and Characterization of PDC1, a Novel Protein Involved in the Epigenetic Cell Degeneration Crippled Growth in *Podospora Anserina*." *Molecular Microbiology*, August. <https://doi.org/10.1111/mmi.14096>.
- Nonaka, Nobuhiro, Tomoya Kitajima, Shihori Yokobayashi, Guoping Xiao, Masayuki Yamamoto, Shiv I. S. Grewal, and Yoshinori Watanabe. 2002. "Recruitment of Cohesin to Heterochromatic Regions by Swi6/HP1 in Fission Yeast." *Nature Cell Biology* 4 (1): 89–93. <https://doi.org/10.1038/ncb739>.
- O'Carroll, D., S. Erhardt, M. Pagani, S. C. Barton, M. A. Surani, and T. Jenuwein. 2001. "The Polycomb-Group Gene *Ezh2* Is Required for Early Mouse Development." *Molecular and Cellular Biology* 21 (13): 4330–36. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.13.4330-4336.2001>.
- Palmer, Jonathan M., Robyn M. Perrin, Taylor R. T. Dagenais, and Nancy P. Keller. 2008. "H3K9 Methylation Regulates Growth and Development in *Aspergillus Fumigatus*." *Eukaryotic Cell* 7 (12): 2052–60. <https://doi.org/10.1128/EC.00224-08>.
- Peng, Jamy C., and Gary H. Karpen. 2008. "Epigenetic Regulation of Heterochromatic DNA Stability." *Current Opinion in Genetics & Development* 18 (2): 204–11. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2008.01.021>.
- Pengelly, Ana Raquel, Reinhard Kalb, Katja Finkl, and Jürg Müller. 2015. "Transcriptional Repression by PRC1 in the Absence of H2A Monoubiquitylation." *Genes & Development* 29 (14): 1487–92. <https://doi.org/10.1101/gad.265439.115>.
- Pham, Kieu Thi Minh, Yoshihiro Inoue, Ba Van Vu, Hanh Hieu Nguyen, Toru Nakayashiki, Ken-Ichi Ikeda, and Hitoshi Nakayashiki. 2015. "MoSET1 (Histone H3K4 Methyltransferase in *Magnaporthe Oryzae*) Regulates Global Gene Expression during Infection-Related Morphogenesis." *PLoS Genetics* 11 (7): e1005385. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005385>.
- Raduwan, Hamidah, Allison L. Isola, and William J. Belden. 2013. "Methylation of Histone H3 on Lysine 4 by the Lysine Methyltransferase SET1 Protein Is Needed for Normal Clock Gene Expression." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (12): 8380–90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.359935>.
- Reyes-Dominguez, Yazmid, Stefan Boedi, Michael Sulyok, Gerlinde Wiesenberger, Norbert Stoppacher, Rudolf Krska, and Joseph Strauss. 2012. "Heterochromatin Influences the Secondary Metabolite Profile in the Plant Pathogen *Fusarium Graminearum*." *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 49 (1): 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.11.002>.

- Reyes-Dominguez, Yazmid, Jin Woo Bok, Harald Berger, E. Keats Shwab, Asjad Basheer, Andreas Gallmetzer, Claudio Scazzocchio, Nancy Keller, and Joseph Strauss. 2010. "Heterochromatic Marks Are Associated with the Repression of Secondary Metabolism Clusters in *Aspergillus Nidulans*." *Molecular Microbiology* 76 (6): 1376–86. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07051.x>.
- Rizet, G, and C Engelmann. 1949. "Contribution à l'étude Génétique d'un Ascomycète Tétraspore: *Podospora Anserina*" 11: 201–304.
- Saksouk, Nehmé, Teresa K. Barth, Celine Ziegler-Birling, Nelly Olova, Agnieszka Nowak, Elodie Rey, Julio Mateos-Langerak, et al. 2014. "Redundant Mechanisms to Form Silent Chromatin at Pericentromeric Regions Rely on BEND3 and DNA Methylation." *Molecular Cell* 56 (4): 580–94. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.10.001>.
- Schotanus, Klaas, Jessica L. Soyer, Lanelle R. Connolly, Jonathan Grandaubert, Petra Happel, Kristina M. Smith, Michael Freitag, and Eva H. Stukenbrock. 2015. "Histone Modifications Rather than the Novel Regional Centromeres of *Zymoseptoria Tritici* Distinguish Core and Accessory Chromosomes." *Epigenetics & Chromatin* 8: 41. <https://doi.org/10.1186/s13072-015-0033-5>.
- Shaver, Scott, J. Armando Casas-Mollano, Ronald L. Cerny, and Heriberto Cerutti. 2010. "Origin of the Polycomb Repressive Complex 2 and Gene Silencing by an E(z) Homolog in the Unicellular Alga *Chlamydomonas*." *Epigenetics* 5 (4): 301–12.
- Shilatifard, Ali. 2012. "The COMPASS Family of Histone H3K4 Methylases: Mechanisms of Regulation in Development and Disease Pathogenesis." *Annual Review of Biochemistry* 81: 65–95. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-051710-134100>.
- Silar, P., and M. Picard. 1994. "Increased Longevity of EF-1 Alpha High-Fidelity Mutants in *Podospora Anserina*." *Journal of Molecular Biology* 235 (1): 231–36.
- Silar, Philippe. 2011. "Grafting as a Method for Studying Development in the Filamentous Fungus *Podospora Anserina*." *Fungal Biology* 115 (8): 793–802. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.06.005>.
- Silar, Philippe, Jean-Marc Dauget, Valérie Gautier, Pierre Grognet, Michelle Chablat, Sylvie Hermann-Le Denmat, Arnaud Couloux, Patrick Wincker, and Robert Debuchy. 2018. "A Gene Graveyard in the Genome of the Fungus *Podospora Comata*." *Molecular Genetics and Genomics*, October. <https://doi.org/10.1007/s00438-018-1497-3>.
- Sims, Robert J., Kenichi Nishioka, and Danny Reinberg. 2003. "Histone Lysine Methylation: A Signature for Chromatin Function." *Trends in Genetics: TIG* 19 (11): 629–39. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.09.007>.
- Soyer, Jessica L., Mennat El Ghalid, Nicolas Glaser, Bénédicte Ollivier, Juliette Linglin, Jonathan Grandaubert, Marie-Hélène Balesdent, et al. 2014. "Epigenetic Control of Effector Gene Expression in the Plant Pathogenic Fungus *Leptosphaeria Maculans*." *PLoS Genetics* 10 (3): e1004227. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004227>.

Strahl, B. D., and C. D. Allis. 2000. "The Language of Covalent Histone Modifications." *Nature* 403 (6765): 41–45. <https://doi.org/10.1038/47412>.

Studt, Lena, Slavica Janevska, Birgit Arndt, Stefan Boedi, Michael Sulyok, Hans-Ulrich Humpf, Bettina Tudzynski, and Joseph Strauss. 2016. "Lack of the COMPASS Component Ccl1 Reduces H3K4 Trimethylation Levels and Affects Transcription of Secondary Metabolite Genes in Two Plant-Pathogenic *Fusarium* Species." *Frontiers in Microbiology* 7: 2144. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02144>.

Studt, Lena, Sarah M. Rösler, Immo Burkhardt, Birgit Arndt, Michael Freitag, Hans-Ulrich Humpf, Jeroen S. Dickschat, and Bettina Tudzynski. 2016. "Knock-down of the Methyltransferase Kmt6 Relieves H3K27me3 and Results in Induction of Cryptic and Otherwise Silent Secondary Metabolite Gene Clusters in *Fusarium Fujikuroi*." *Environmental Microbiology* 18 (11): 4037–54. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13427>.

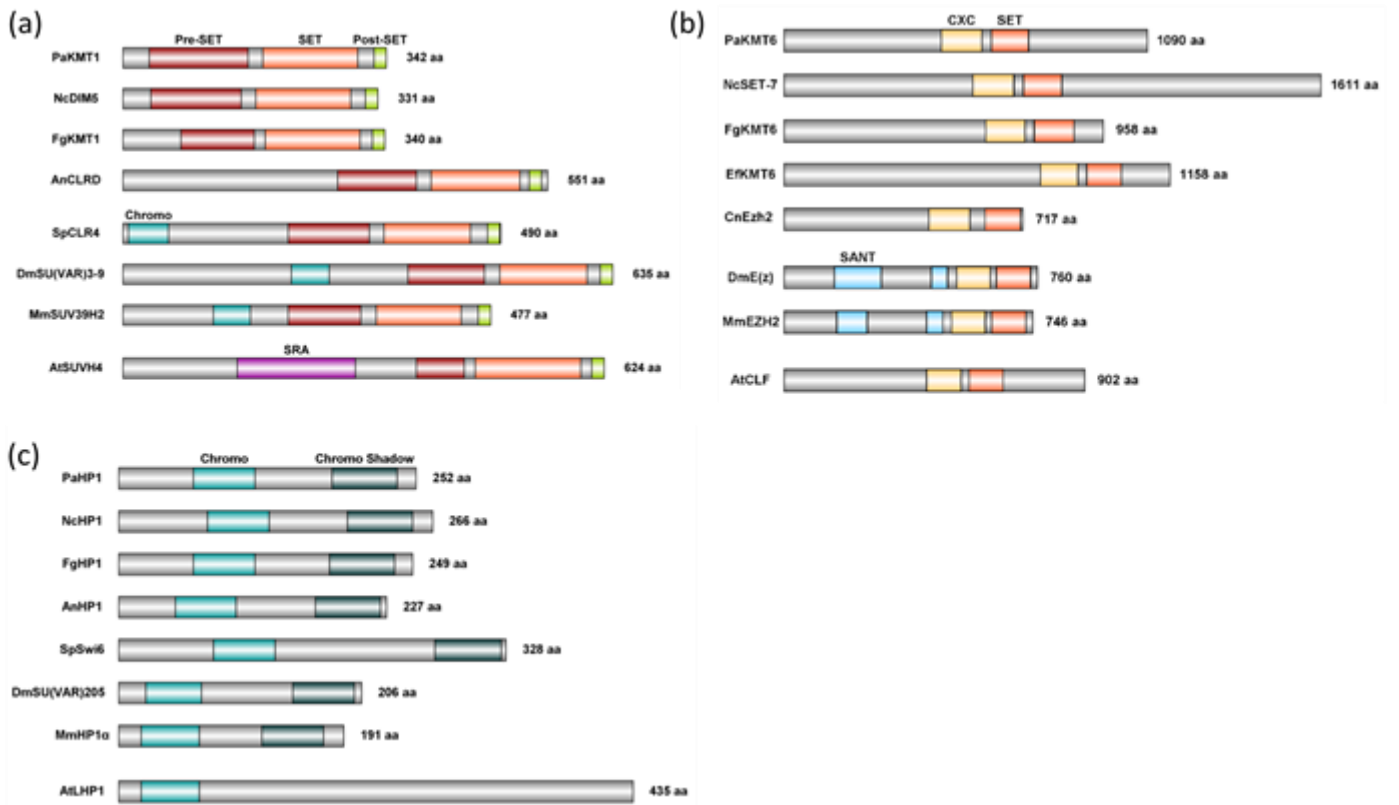
Tamaru, H., and E. U. Selker. 2001. "A Histone H3 Methyltransferase Controls DNA Methylation in *Neurospora Crassa*." *Nature* 414 (6861): 277–83. <https://doi.org/10.1038/35104508>.

Thon, G., and J. Verhein-Hansen. 2000. "Four Chromo-Domain Proteins of *Schizosaccharomyces Pombe* Differentially Repress Transcription at Various Chromosomal Locations." *Genetics* 155 (2): 551–68.

Wu, Min, Peng Fei Wang, Jung Shin Lee, Skylar Martin-Brown, Laurence Florens, Michael Washburn, and Ali Shilatifard. 2008. "Molecular Regulation of H3K4 Trimethylation by Wdr82, a Component of Human Set1/COMPASS." *Molecular and Cellular Biology* 28 (24): 7337–44. <https://doi.org/10.1128/MCB.00976-08>.

Zhang, Xiaoli, Xinqiang Liu, Yanli Zhao, Jiasen Cheng, Jiatao Xie, Yanping Fu, Daohong Jiang, and Tao Chen. 2016. "Histone H3 Lysine 9 Methyltransferase DIM5 Is Required for the Development and Virulence of *Botrytis Cinerea*." *Frontiers in Microbiology* 7 (August). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01289>.

Figure 1A

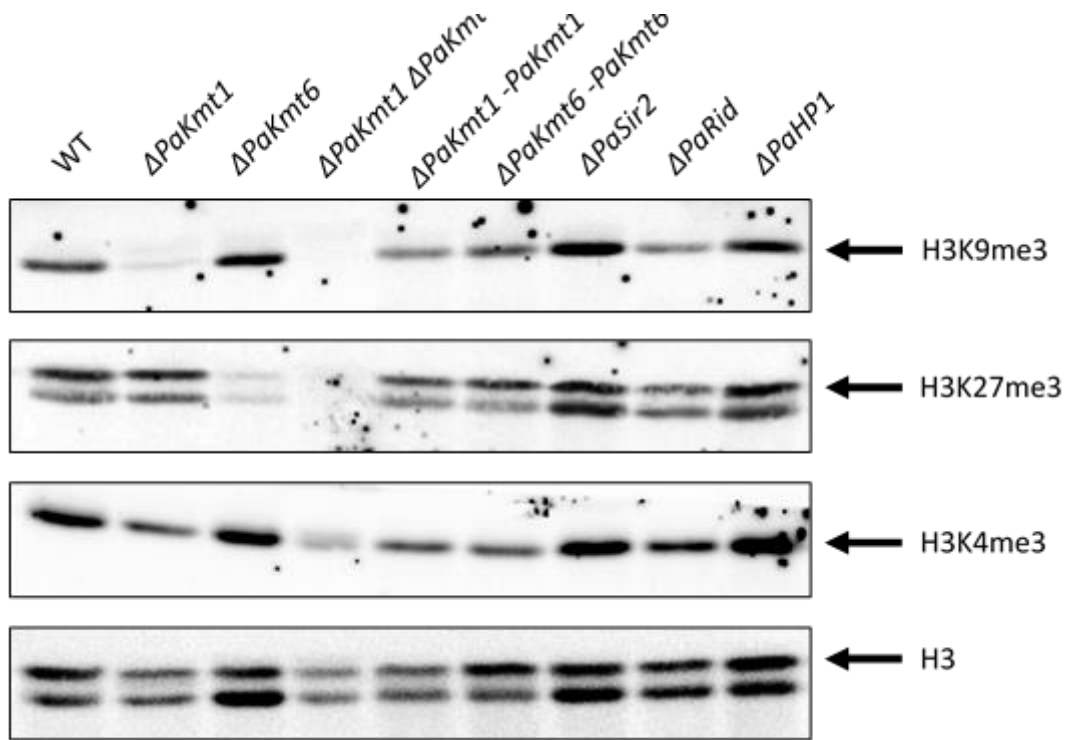


**Figure 1B**





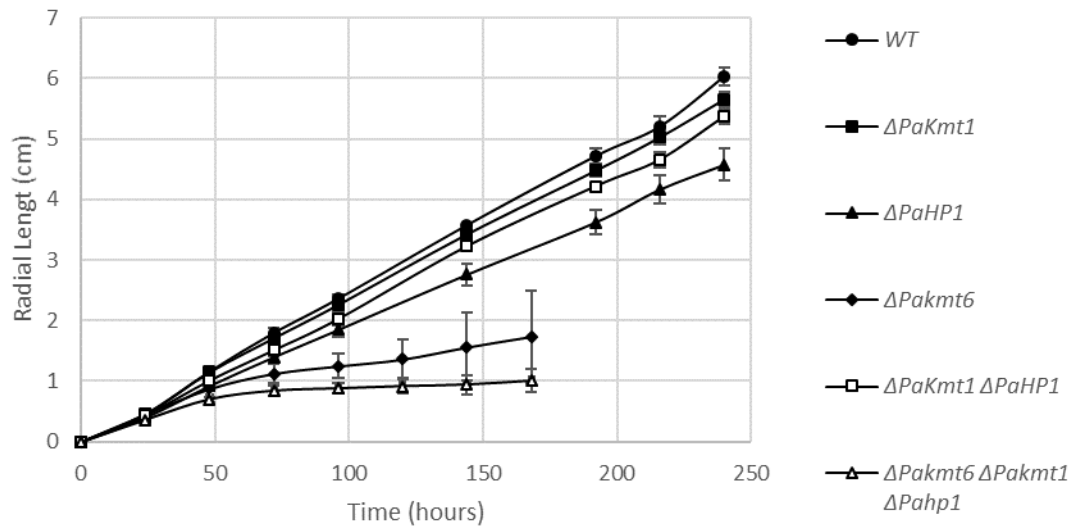
**Figure 2**



**Figure 3A**



**Figure 3B**



**Table 1A**

	27°C	11°C	35°C
<b>WT</b>	100	100	100
<b><i>ΔPaKmt1</i></b>	94,2	72,4	91,8
<b><i>ΔPaKmt1 -PaKmt1<sup>+</sup></i></b>		104	
<b><i>ΔPaHP1</i></b>	76,2	65,7	74,9
<b><i>ΔPaHP1 -PaHP1<sup>+</sup></i></b>		99,1	
<b><i>ΔPaKmt6</i></b>	Ir weak	Nd	Ir weak
<b><i>ΔPaKmt6 -PaKmt6<sup>+</sup></i></b>	99		
<b><i>ΔPaKmt1 ΔPaHP1</i></b>	89,8	60,7	80,7
<b><i>ΔPaKmt1 ΔPaKmt6</i></b>	<i>ΔPaKmt6</i> agr	Nd	<i>ΔPaKmt6</i>
<b><i>ΔPaHP1 ΔPaKmt6</i></b>	<i>ΔPaKmt6</i> agr	Nd	<i>ΔPaKmt6</i>
<b><i>ΔPaKmt1 ΔPaHP1 ΔPaKmt6</i></b>	<i>ΔPaKmt6</i> agr	Nd	<i>ΔPaKmt6</i>

**Table 1B**

	Spore germination efficiency
<b>WT</b>	92,8 ± 4,26
<b><i>ΔPaKmt1</i></b>	WT
<b><i>ΔPaHP1</i></b>	WT
<b><i>ΔPaKmt6</i></b>	29,3 ± 0,44
<b><i>ΔPaKmt6 Kmt6<sup>+</sup></i></b>	WT
<b><i>ΔPaKmt1 ΔPaHP1</i></b>	WT
<b><i>ΔPaKmt1 ΔPaKmt6</i></b>	11,4 ± 3,54
<b><i>ΔPaHP1 ΔPaKmt6</i></b>	25,2 ± 2,31
<b><i>ΔPaKmt1 ΔPaHP1 ΔPaKmt6</i></b>	21,1 ± 11,2

Figure 4A

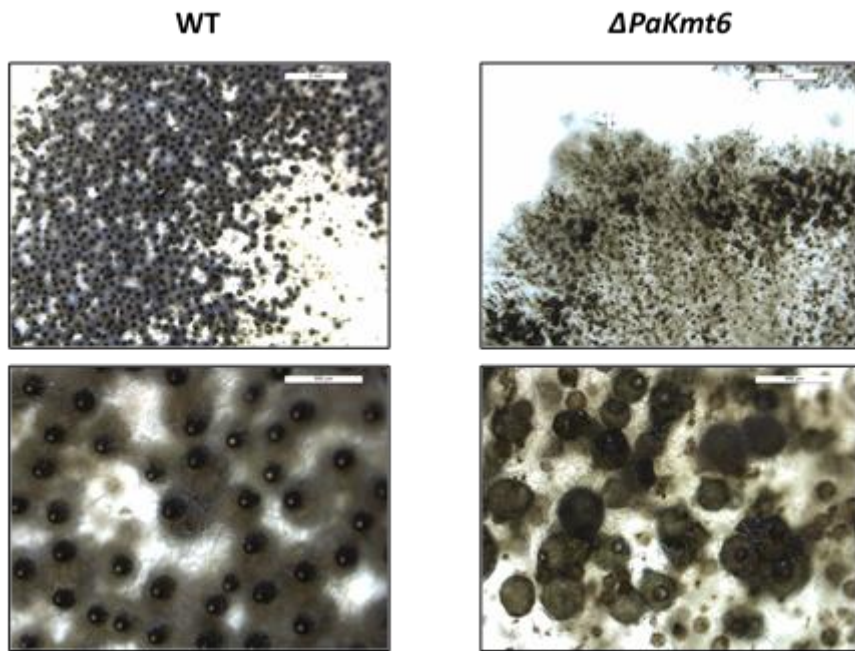


Figure 4B

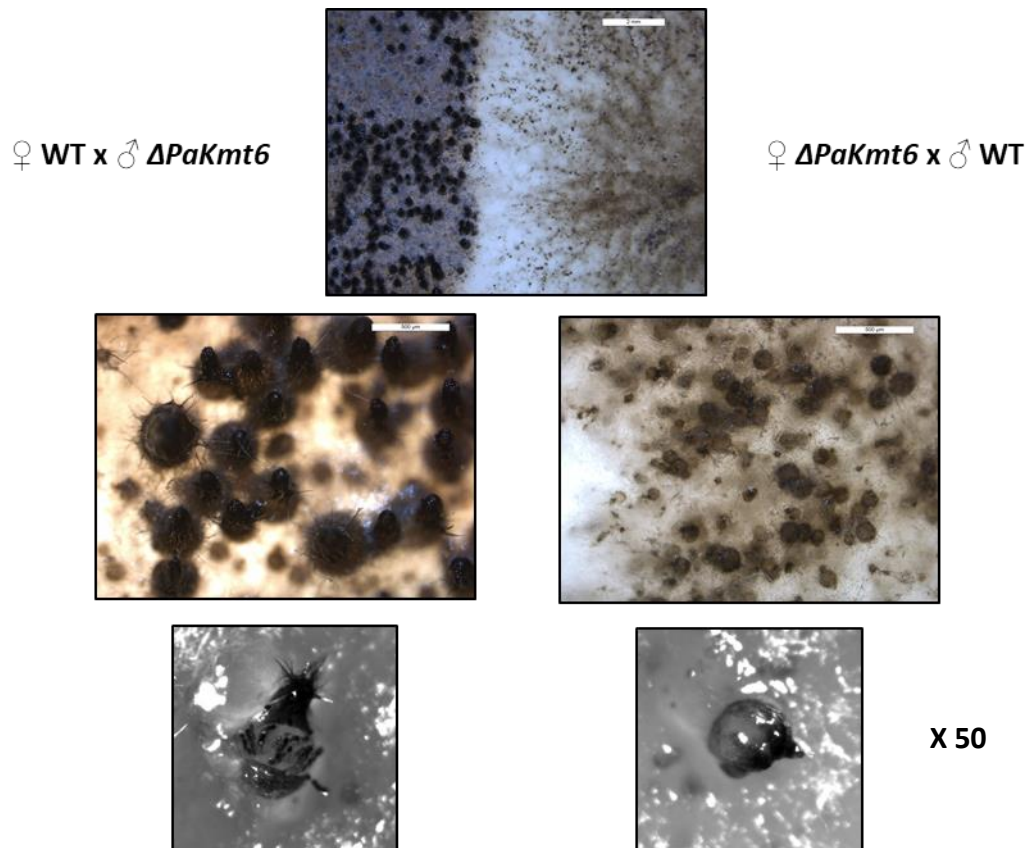


Figure 5

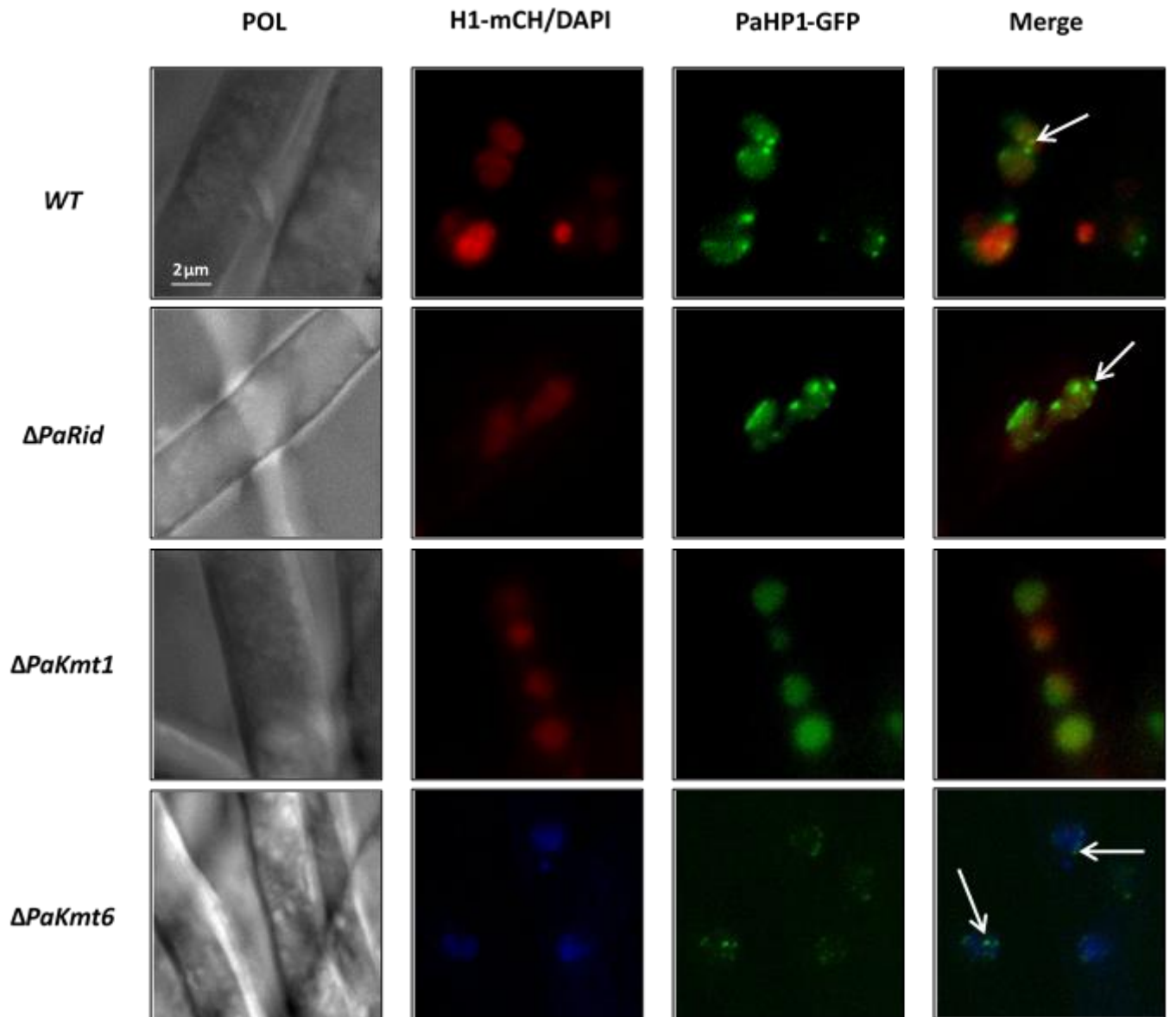


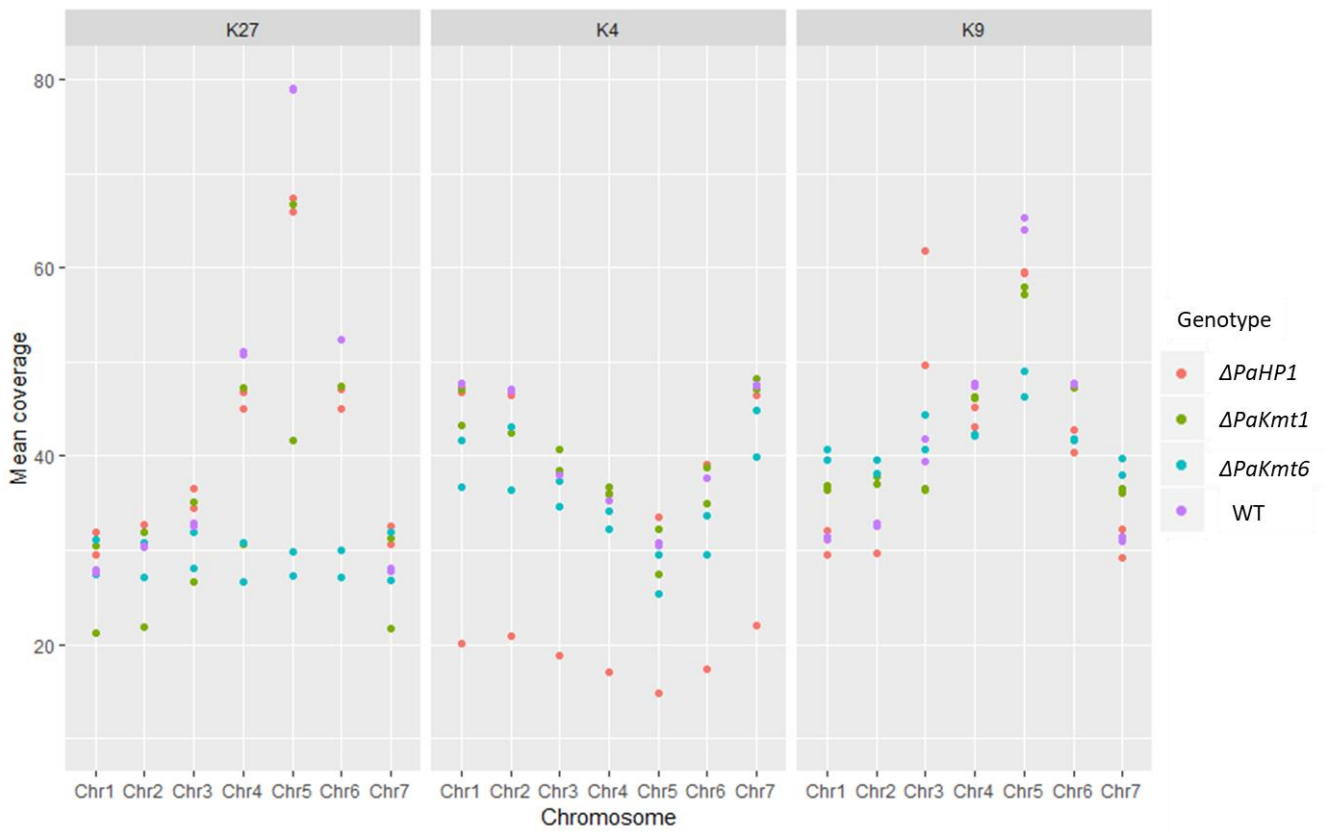
Table 2A

		Peaks detected		Peaks Size		Genome occupancy				
		Total	WT %	Average	WT %	Mb	Genome %	Genes enriched	Repeat enriched	Repeat enriched in CDS
H3K4me3	WT	3050	100,0	1260	100,0	3,842	10,79	3478	63	49
	$\Delta PaKmt1$	3306	108,4	1254	99,5	4,146	11,65	3743	67	58
	$\Delta PaHP1$	3139	102,9	1168	92,7	3,664	10,29	3564	64	52
	$\Delta PaKMT6$	3434	112,6	1221	96,9	4,192	11,78	3894	85	69
H3K9me3	WT	1090	100,0	945	100,0	1,030	2,89	469	728	213
	$\Delta PaKmt1$	0	0,0	0	0,0	0,000	0,00	0	0	0
	$\Delta PaHP1$	418	38,3	1572	166,3	0,659	1,85	88	861	71
	$\Delta PaKMT6$	85	7,8	731	77,3	0,062	0,17	2	129	4
H3K27me3	WT	1941	100,0	3477	100,0	6,748	18,96	2800	1042	307
	$\Delta PaKmt1$	1325	68,3	1174	33,8	1,557	4,37	885	538	259
	$\Delta PaHP1$	1443	74,3	1250	36,0	1,804	5,07	886	551	239
	$\Delta PaKMT6$	47	2,4	266	7,7	0,013	0,04	37	0	0

Table 2B

	Peak overlap between IP1 and IP2		
	IP1	IP2	Overlap
WT	K27	K9	954
	K4	K27	15
	K4	K9	0
PaKmt1	K27	K9	0
	K4	K27	0
	K4	K9	0
PaHP1	K27	K9	230
	K4	K27	0
	K4	K9	1
PaKmt6	K27	K9	0
	K4	K27	43
	K4	K9	0

**Figure 6A**



**Figure 6B**

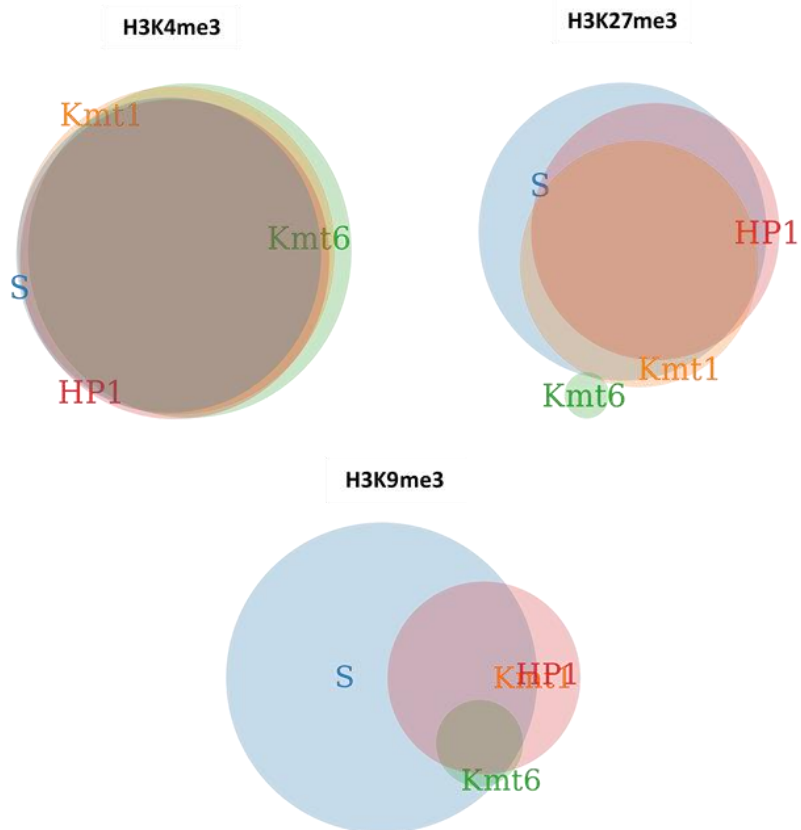


Figure 6C

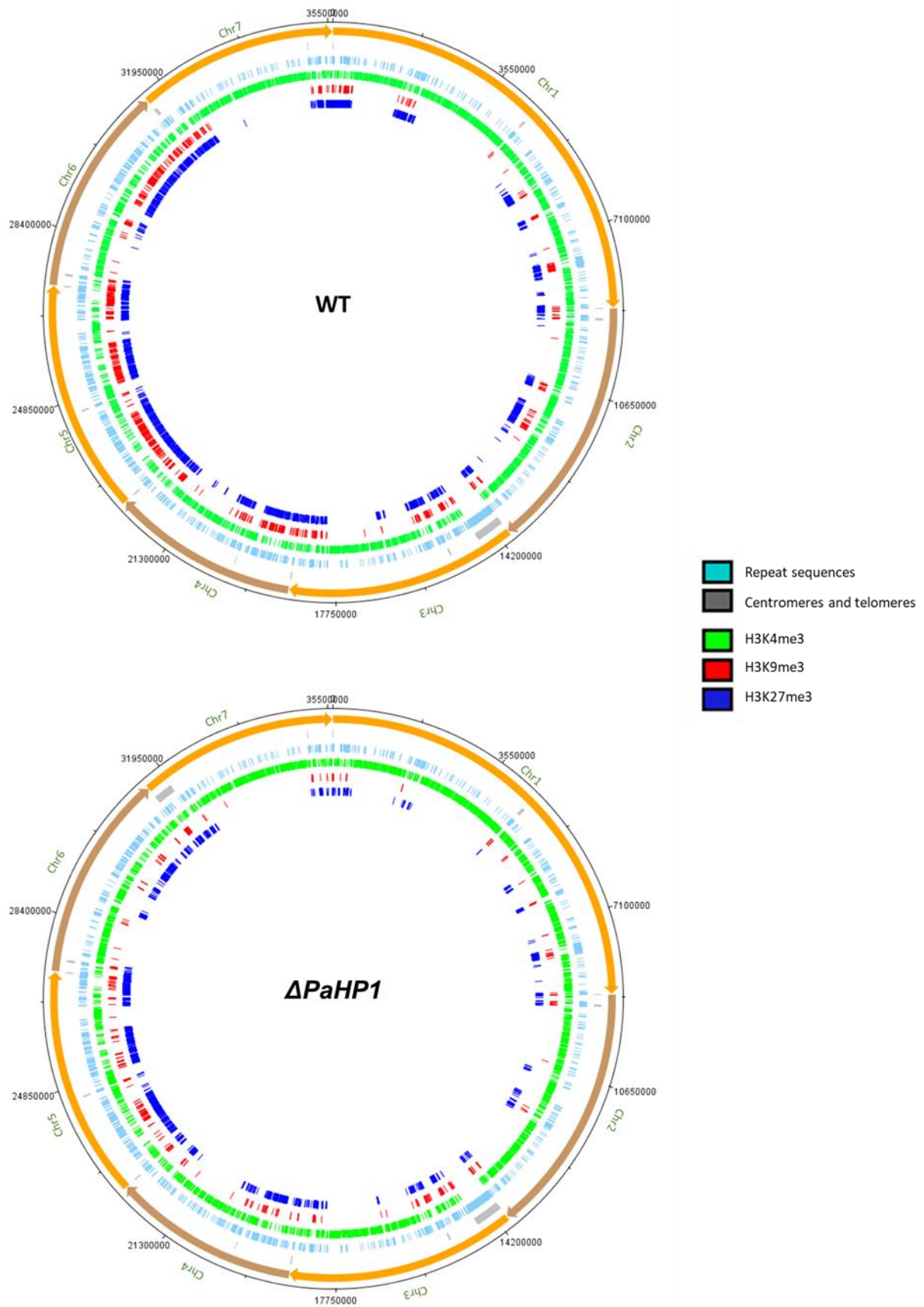
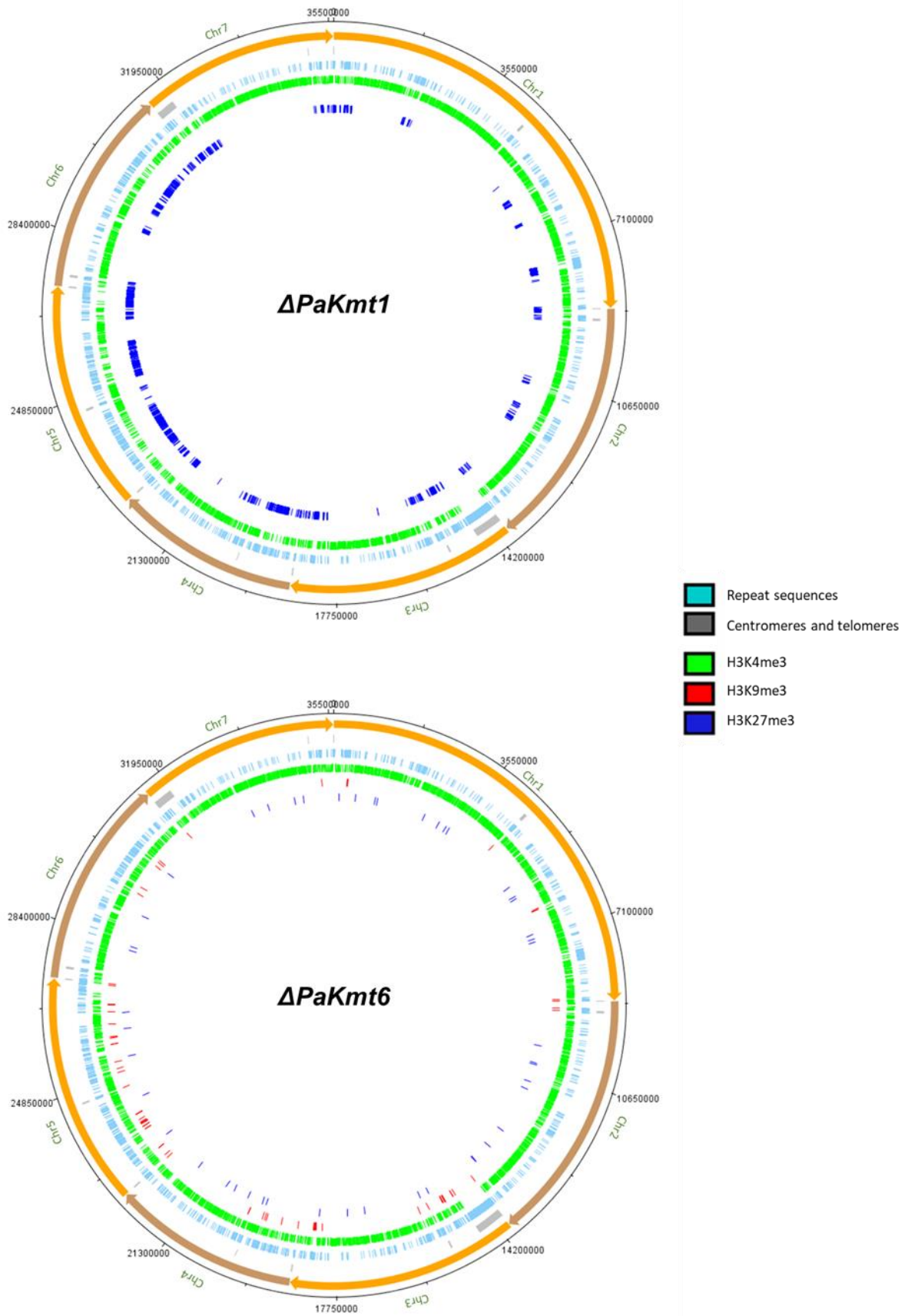
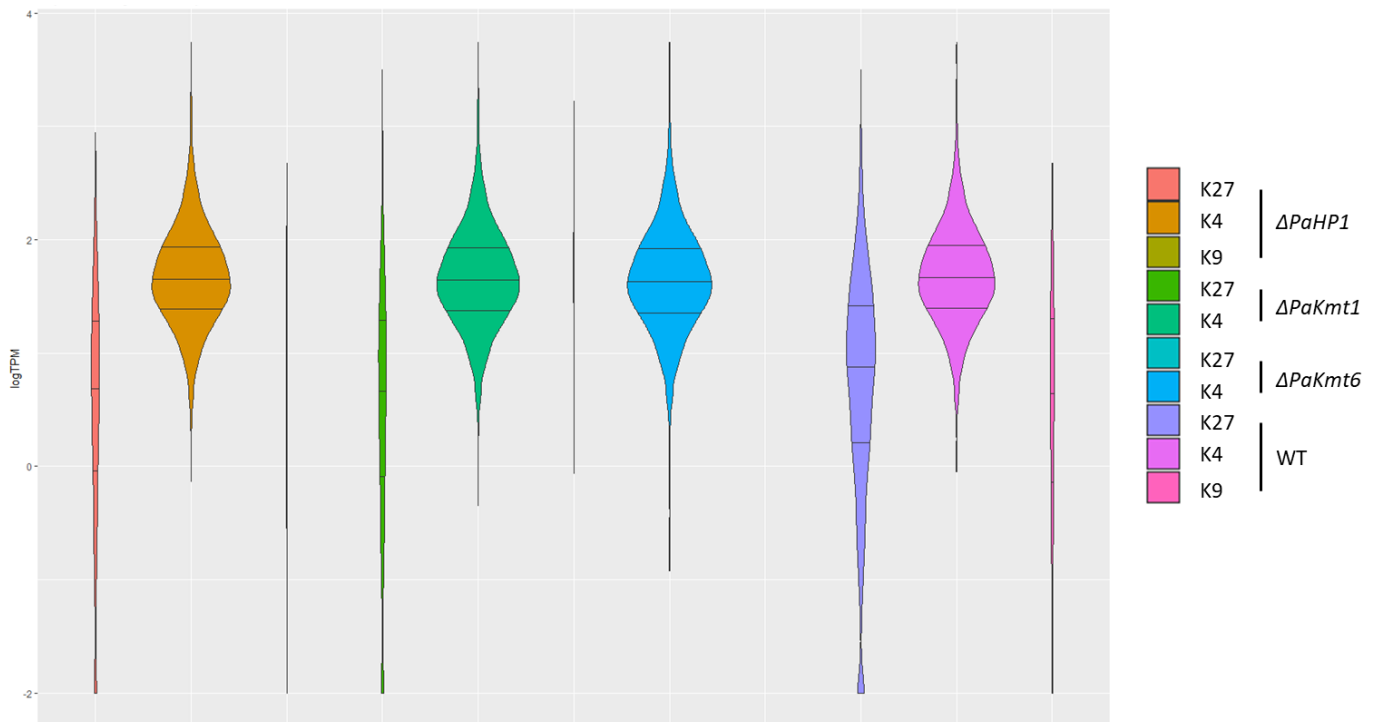




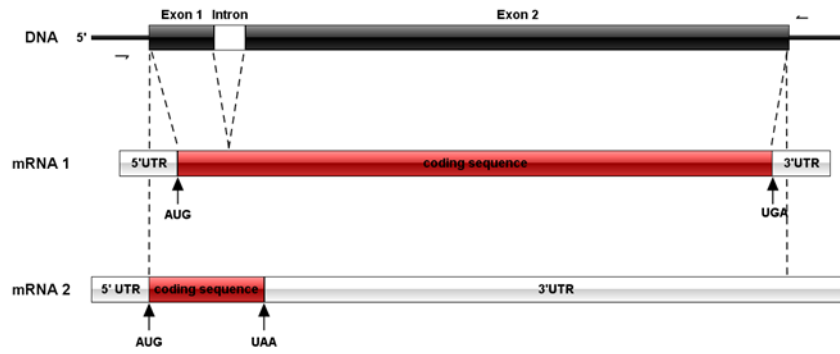
Figure 6C



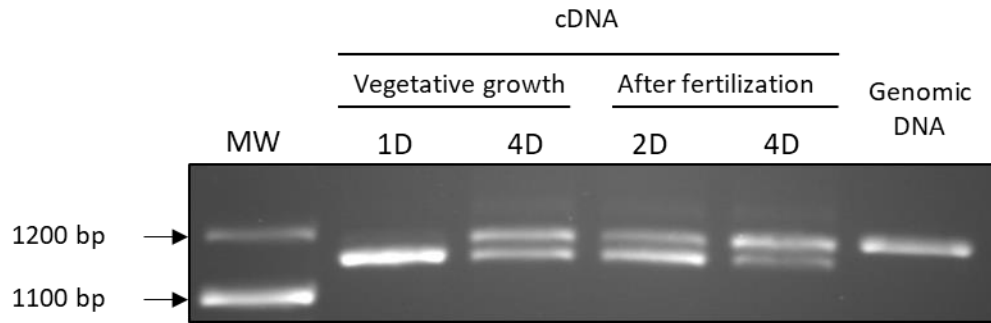
**Figure 7**



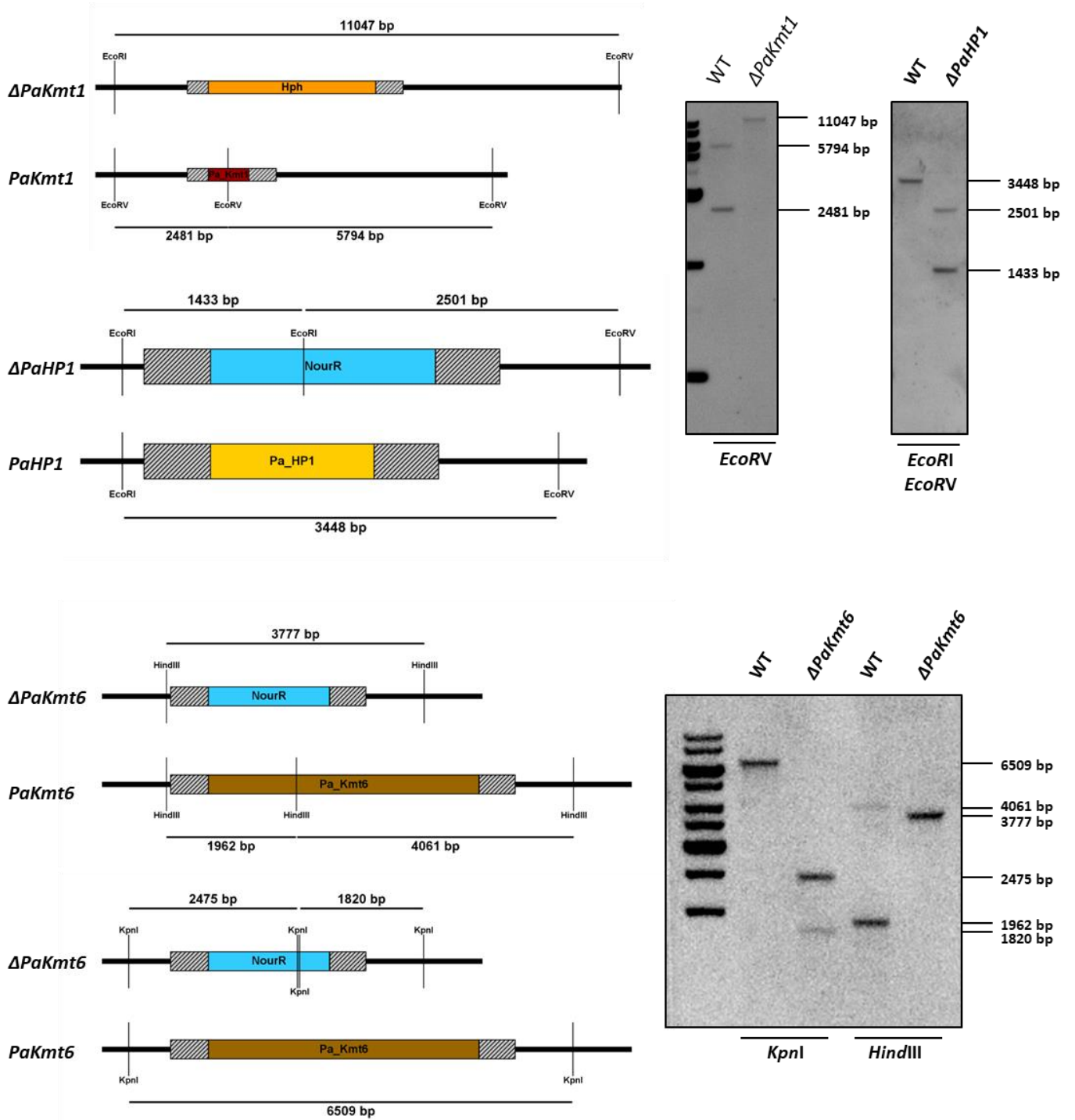
### Supplementary figure 1A



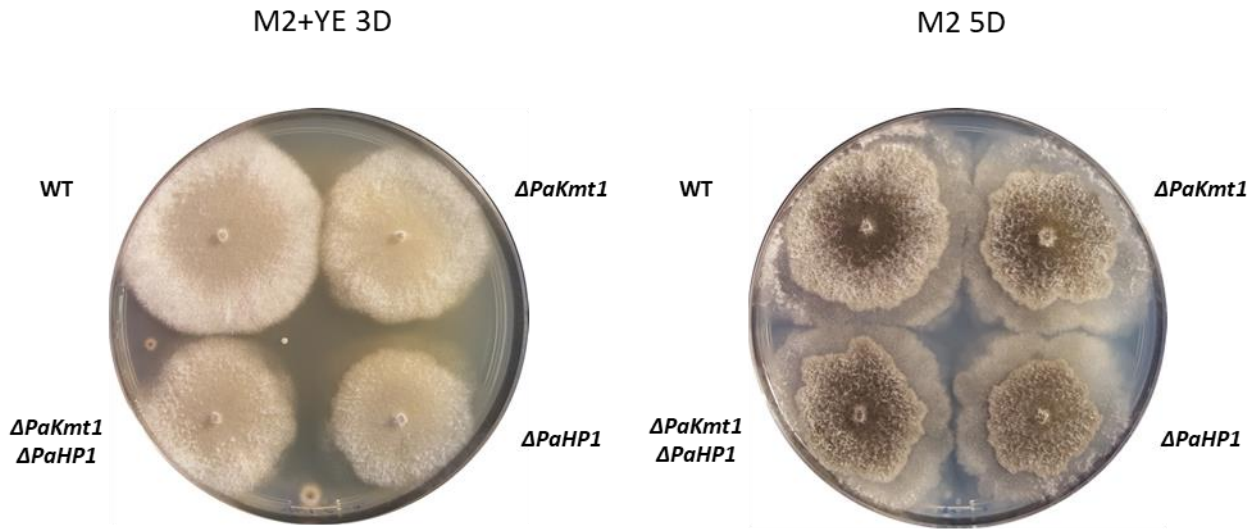
### Supplementary figure 1B



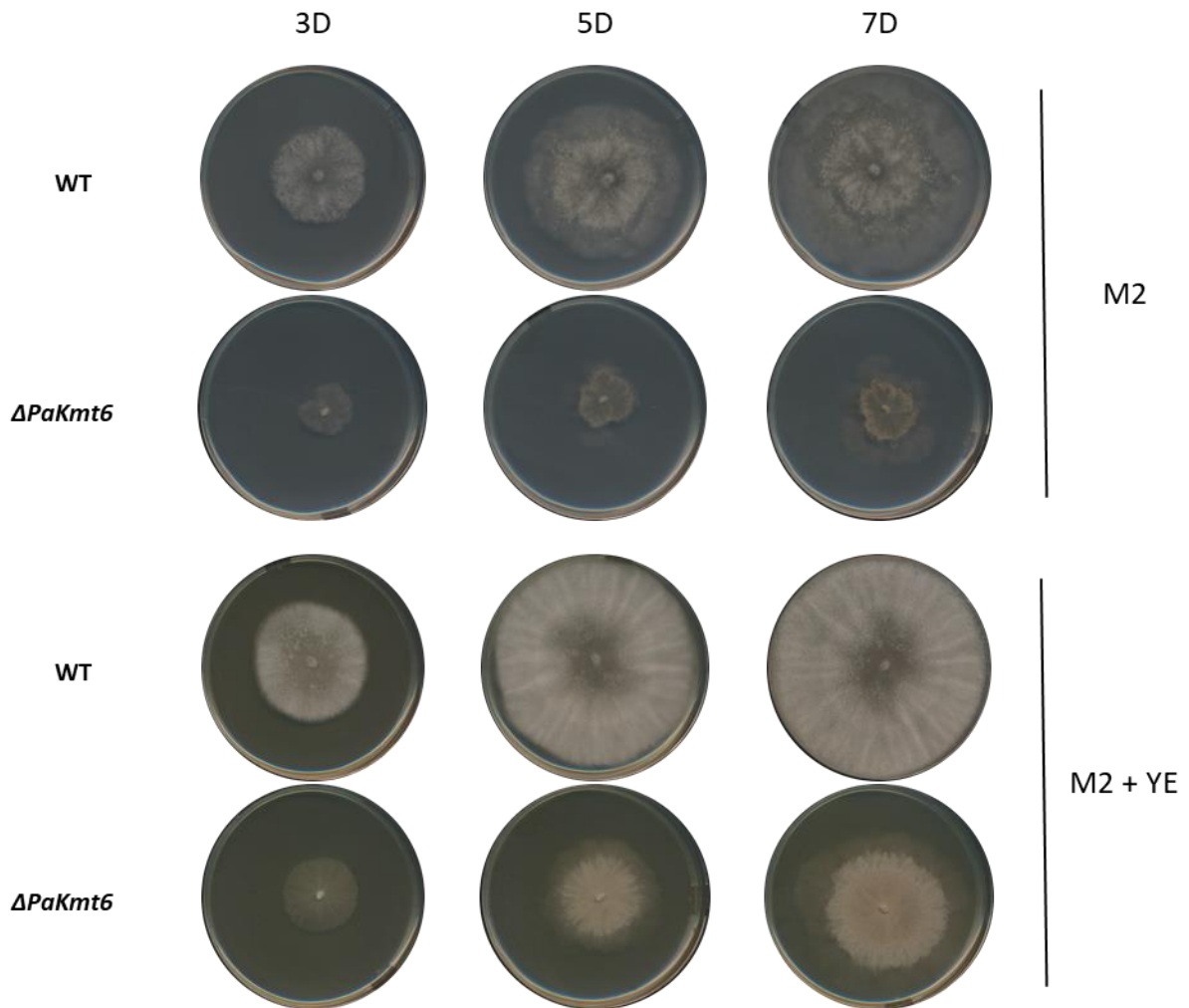
## Supplementary figure 2



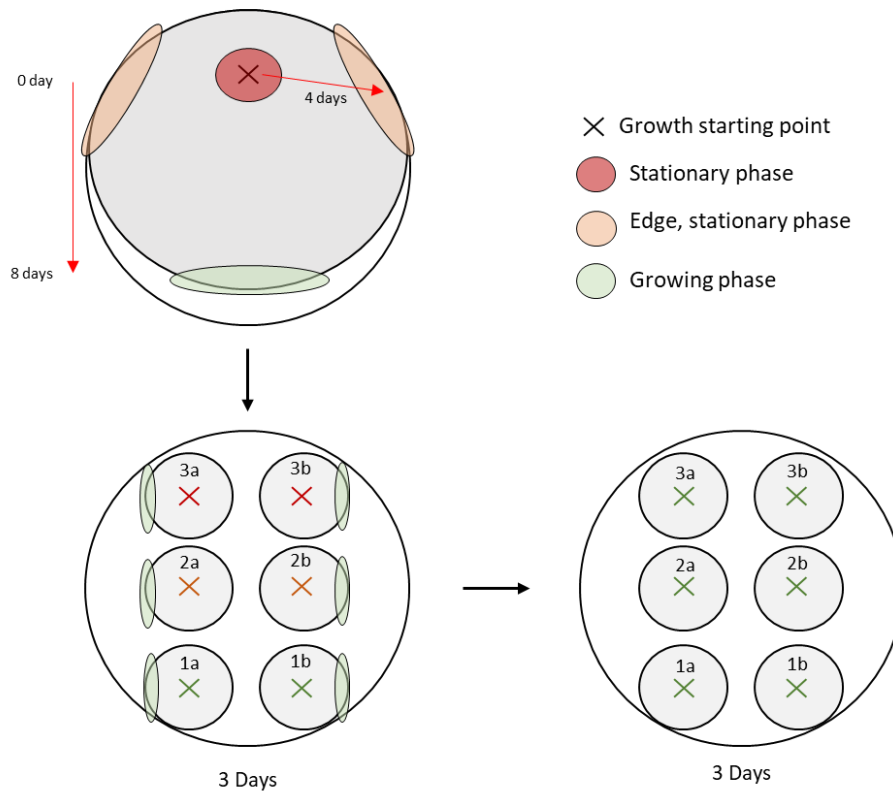
### Supplementary figure 3A



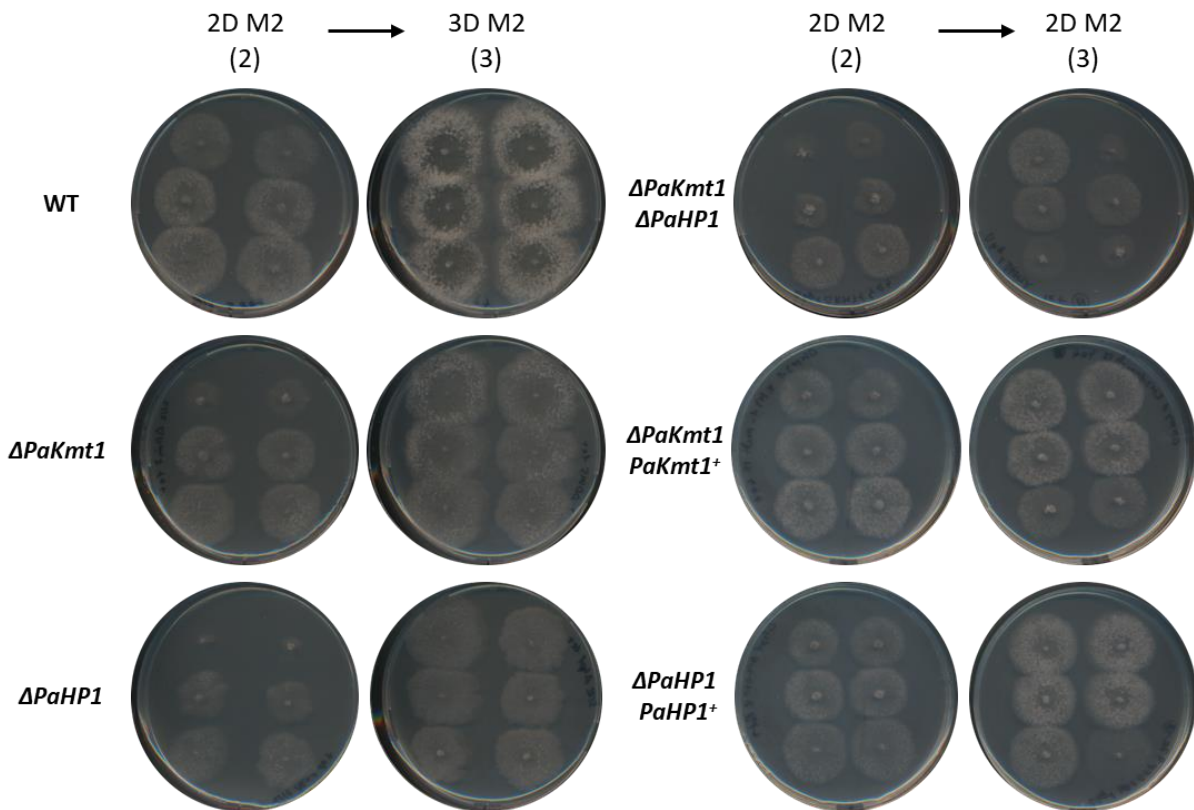
### Supplementary figure 3B



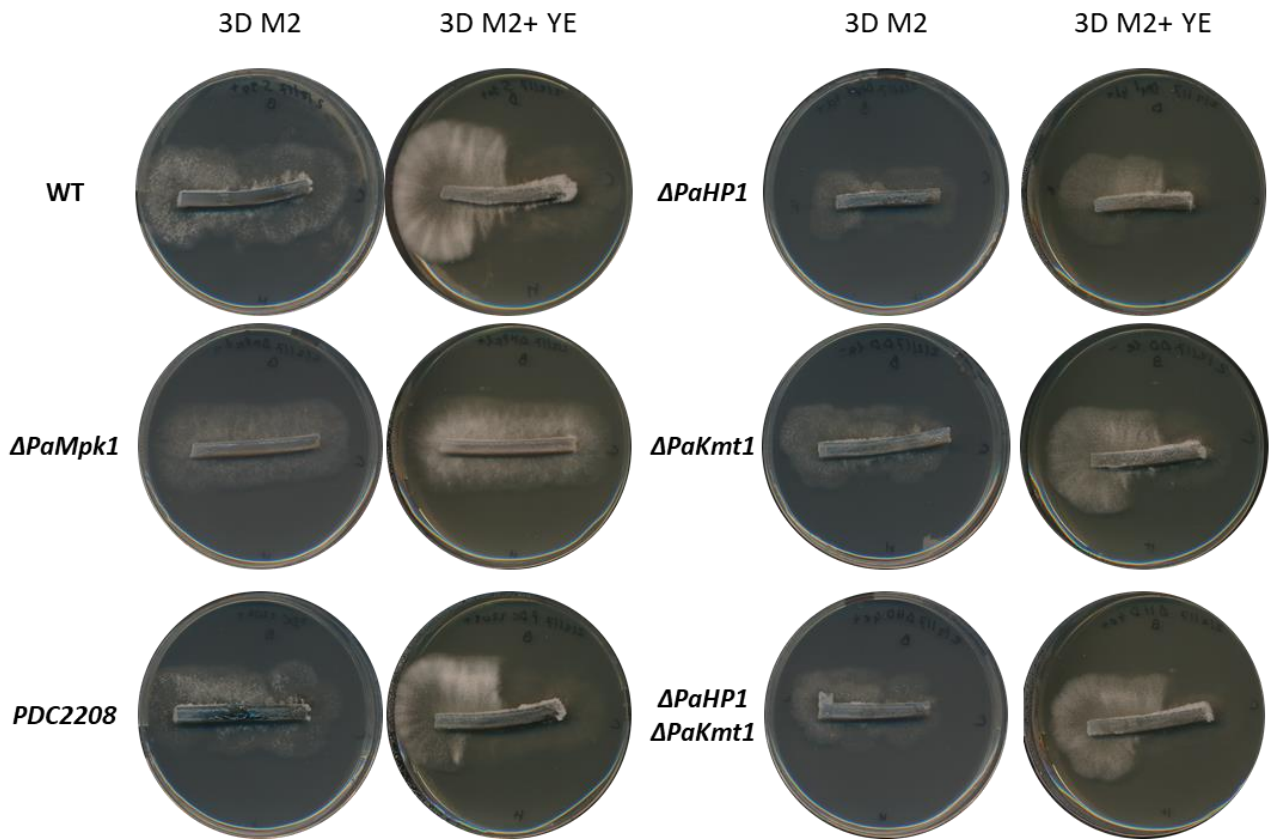
### Supplementary figure 4A



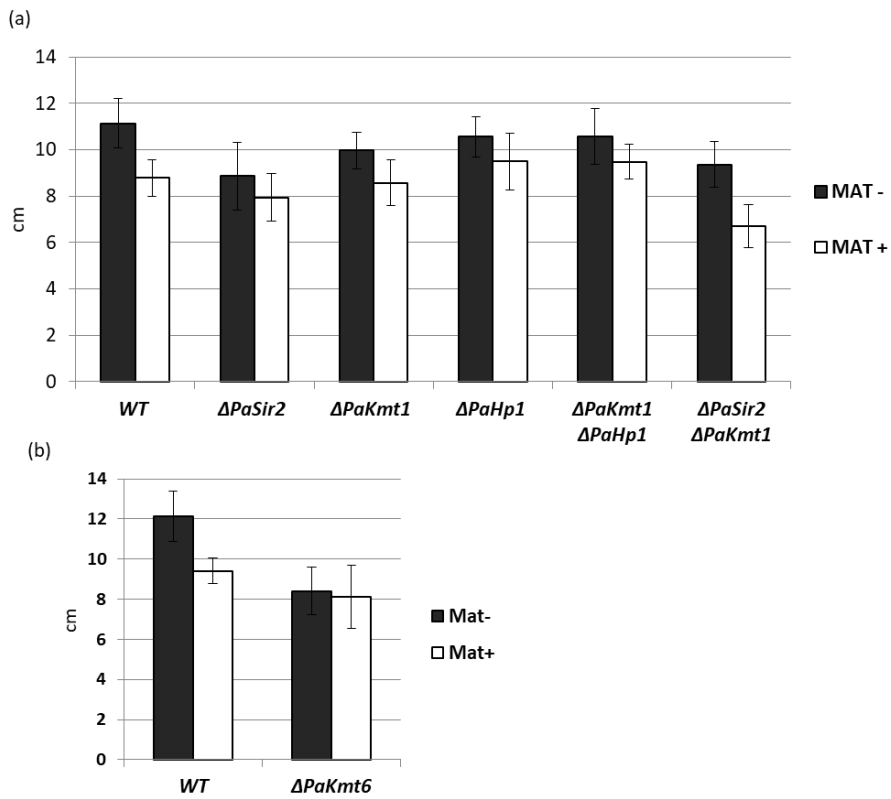
### Supplementary figure 4B



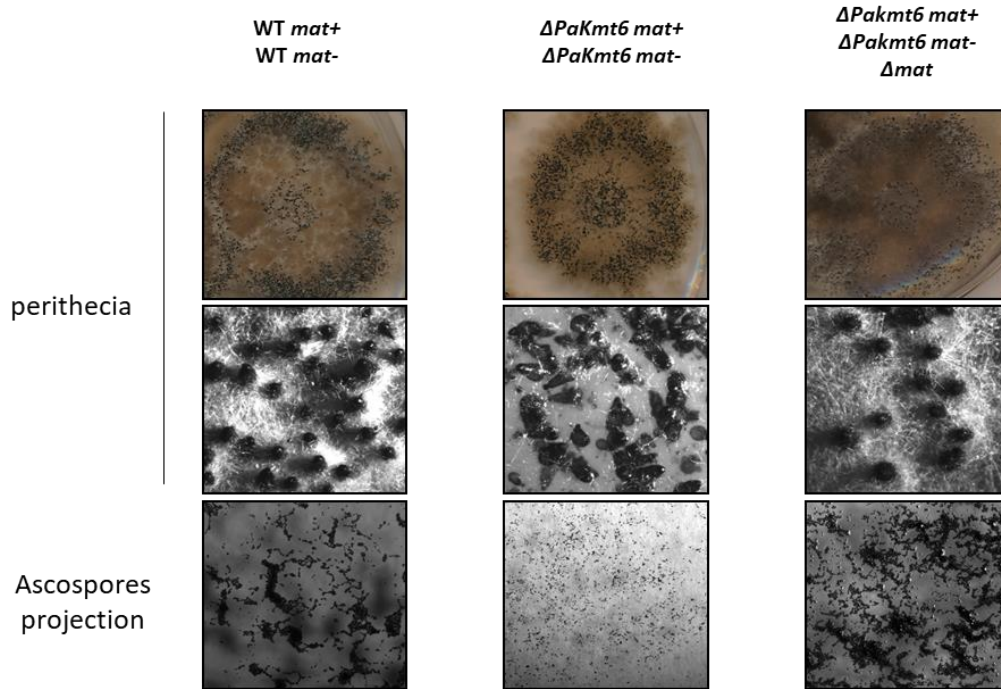
**Supplementary figure 5**



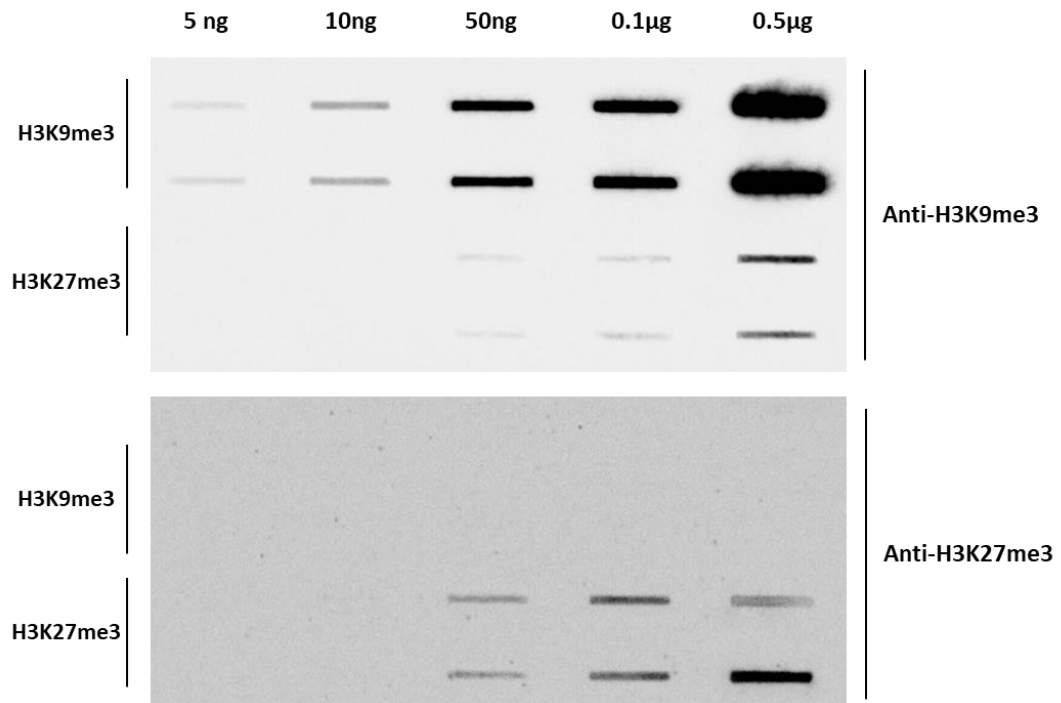
**Supplementary figure 6**



### Supplementary figure 7



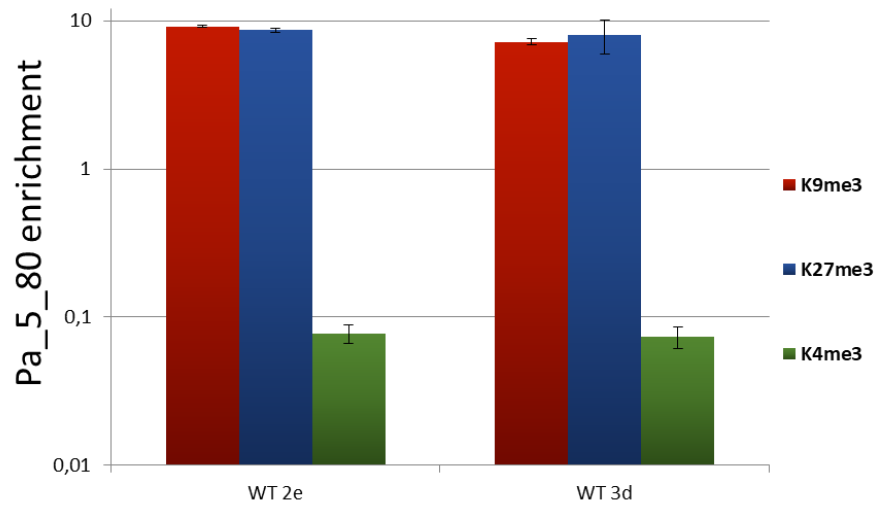
### Supplementary figure 8







Supplementary figure 10



**Supplementary table 1**

Experiment	Name	Sequence
PaKmt1 RT-PCR	5s-DIM5	CCCAGTCGAACAACCTCACCAAC
	3s-DIM5	CCCTGTCAAGCCAGCAGTTTTG
<i>ΔPaHp1</i> allele construction	HP1L-2_MkF	CCAAACAAACCACCCCTCGTCGGTTCAGGGCAGGGTCGTAAATAG
	HP1L-3_MkR	GCCATCCCTCTGCTCGAAAACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAG
	HP1L-1F	CACTCCTCGCCTCATCTTCC
	Mk_HP1L-2R	CTATTTAACGACCCTGCCCTGAACCGACGAGGGGTGGTTTGTGGTGG
	Mk_HP1L-3F	CTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTTTTTCGAGCAGAGGGATGGC
	HP1L-4R	AGGTTGGCAAATGTGGGAGC
<i>ΔPakMT1</i> allele construction	DIM5-1F	TTTGTCTTGTTTTTGGGTATGC
	Mk_DIM5L-2R	CTATTTAACGACCCTGCCCTGAACCGTTCGTTGACGATGGTGATGG
	Mk_DIM5L-3F	CTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTGGATGAACAAGAGAAACAAACG
	DIM5-4R	CTCACAACAACAAGACTCCAACG
	DIM5L-2_MkF	CCATCACCATCGTCAACGAAGTTCAGGGCAGGGTCGTAAATAG
	DIM5L-3_MkR	CGTTTGTCTCTTGTTCATCCACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAG
<i>ΔPaKmt6</i> allele construction	KMT6-1F	ACACCGCGAGTATTGATAAACCC
	Mk_KMT6-2R	CTATTTAACGACCCTGCCCTGAACCGTCAAATCCACCACAATTCTCC
	Mk_KMT6-3F	CTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGACGGAATTGCTTGACACTAAGG
	KMT6-4R	GAGGTGATAGGTGACGATGAGG
	KMT6-2_MkF	GGAGAATTGTGGTGGATTTGACCGGTTTCAGGGCAGGGTCGTAAATAG
	KMT6-2_MkR	CCTTAGTGTCAAGCAATTCGGTCATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAG
<i>PaHp1-GFP-HA</i> allele constructions	FC3-BamH1	AAGGATCCGAGATGCTTGTCCGTCCTCC
	FC4-GFP	GCCCTTGCTCACCATGGAGTTGGCAGGGGGTGAGTCG
	FC5-HP1	CCCCCTGCCAACTCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
	FC6-HindIII	TTAAGCTTCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGAT
	FC21-BamH1	AAGGATCCATGCCACCAGGTATGCTTCC
<i>PaKmt1-mCH-HA</i> allele constructions	Dim5mChFBamH1	AAGGATCCGAGCCTTGAGGATGTCTTTAGC
	Dim5mChR	TTGATGATGGCCATCCATAAGAACCCCTACACTTC
	mChDim5F	AGGGGGTTCTTATGGATGGCCATCATCAAGGAGTTC
	mChDim5RHindIII	TTAAGCTTCTTGTACAGCTCGTCCATGC
	FC22-BamH1	AAGGATCCATGGAGGAGGCAATGAAACAGC
<i>PaKmt6-GFP-HA</i> allele construction	FC73-GA1KMT6	AAAGCTGGAGCTCCACCGGGTGGCGAATGGCATGTATGGTCTG
	FC74-GA1KMT6	CCTTGCTCACCATCTCCTTCTCATCCCTATATCTC
	FC75-GA1GFP	GGATGAGAAGGAGATGGTGAGCAAGGGCGAG
	FC76-GA1GFP	GATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGCCCTTGTACAGCTCGTCCATGC
<i>PaKmt6-HA</i> allele construction	FC72-BamH1	TTGGATCCCTCCTTCTCATCCCTATATCTCC
	FC65-Not1	TTGCGGCCGCGAATGGCATGTATGGTCTGTGC
ChIP-QPCR	FC77-Actin	CTCCCATCAACCCCAAGAGC
	FC78-Actin	GATGGAGACGTAGAAGGCGG
	FC125-580	AGCTACTGTTGTCGTGCTGG
	FC126-580	TCGATGAAGAATACGGCGGC

**Supplementary table 2**

<i>S</i> (WT)	Rizet 1957
$\Delta mat$	Copin <i>et al.</i> 1993
<i>PDC2208</i>	unpublished data
$\Delta PaMPK1$	Jamet-Vierny <i>et al.</i> 2007
$\Delta PaPKS1$	Coppin and Silar 2007
$\Delta PaSir2$	Boivin <i>et al.</i> 2008
$\Delta PaRID$	Timpano <i>et al.</i>
$\Delta PaHp1$	This study
$\Delta PaKmt1$	This study
$\Delta PaKmt6$	This study
$\Delta PaHp1 \Delta PaKmt1$	This study
$\Delta PaHp1 \Delta PaKmt6$	This study
$\Delta PaKmt1 \Delta PaKmt6$	This study
$\Delta PaHp1 \Delta PaKmt1 \Delta PaKmt6$	This study
$\Delta PaSir2 \Delta PaHp1$	This study
$\Delta PaSir2 \Delta PaKmt1$	This study
$\Delta PaSir2 \Delta PaKmt6$	This study
$\Delta PaSir2 \Delta PaKmt1$ $\Delta PaKmt6$	This study
$\Delta PaRID \Delta PaKmt1$	This study
$\Delta PaRID \Delta PaHp1$	This study
$\Delta PaRID \Delta PaKmt6$	This study
<i>PaHp1-GFP</i>	This study
<i>PaKmt1-mCH</i>	This study
<i>PaKmt6-GFP</i>	This study
<i>AS4-PaHp1</i>	This study
<i>AS4-PaKmt1</i>	This study

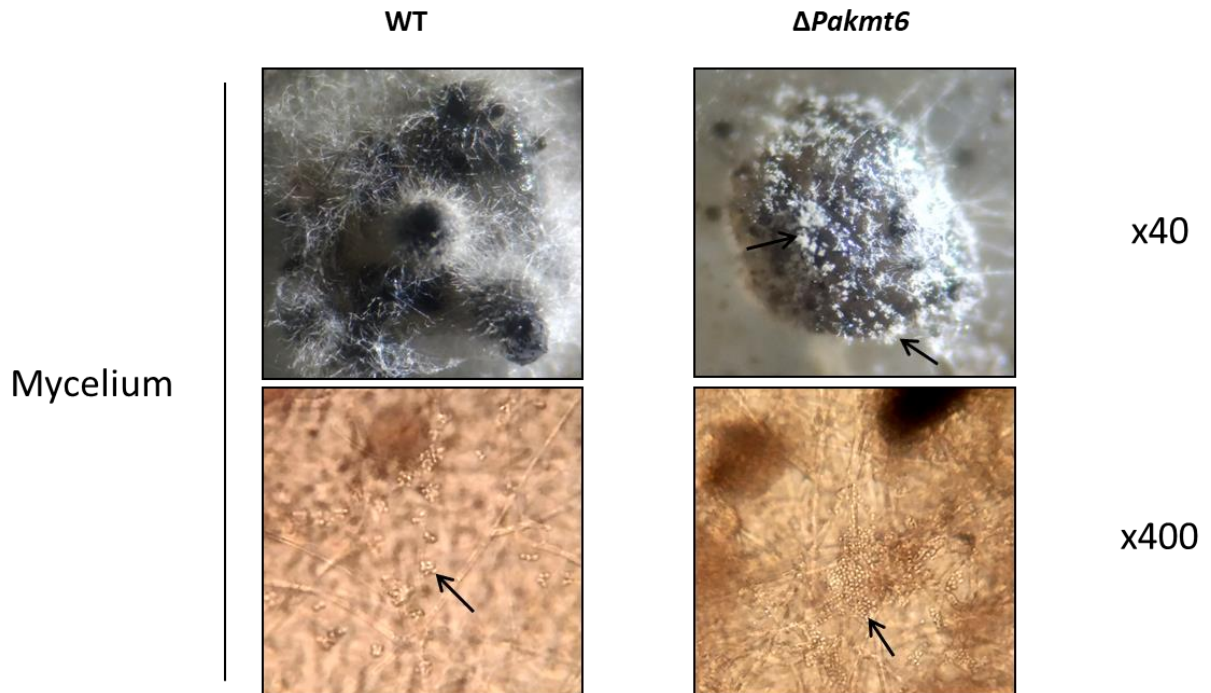
## Annexes

### Annexes 1 - Spermatic production

	Spermata/ cm2	WT %
WT	45833,3333	100
$\Delta PaKmt1$ $\Delta PaHP1$	63750	139,090909
$\Delta PaKmt6$	65909090,9	143801,653
$\Delta PaKmt6$ $\Delta PaKmt1$ $\Delta PaHp16$	150666667	328727,273

### Annexes 2 – $\Delta PaKmt6$ mycelium

Black structures are perithecia, arrows show spermata aggregates.



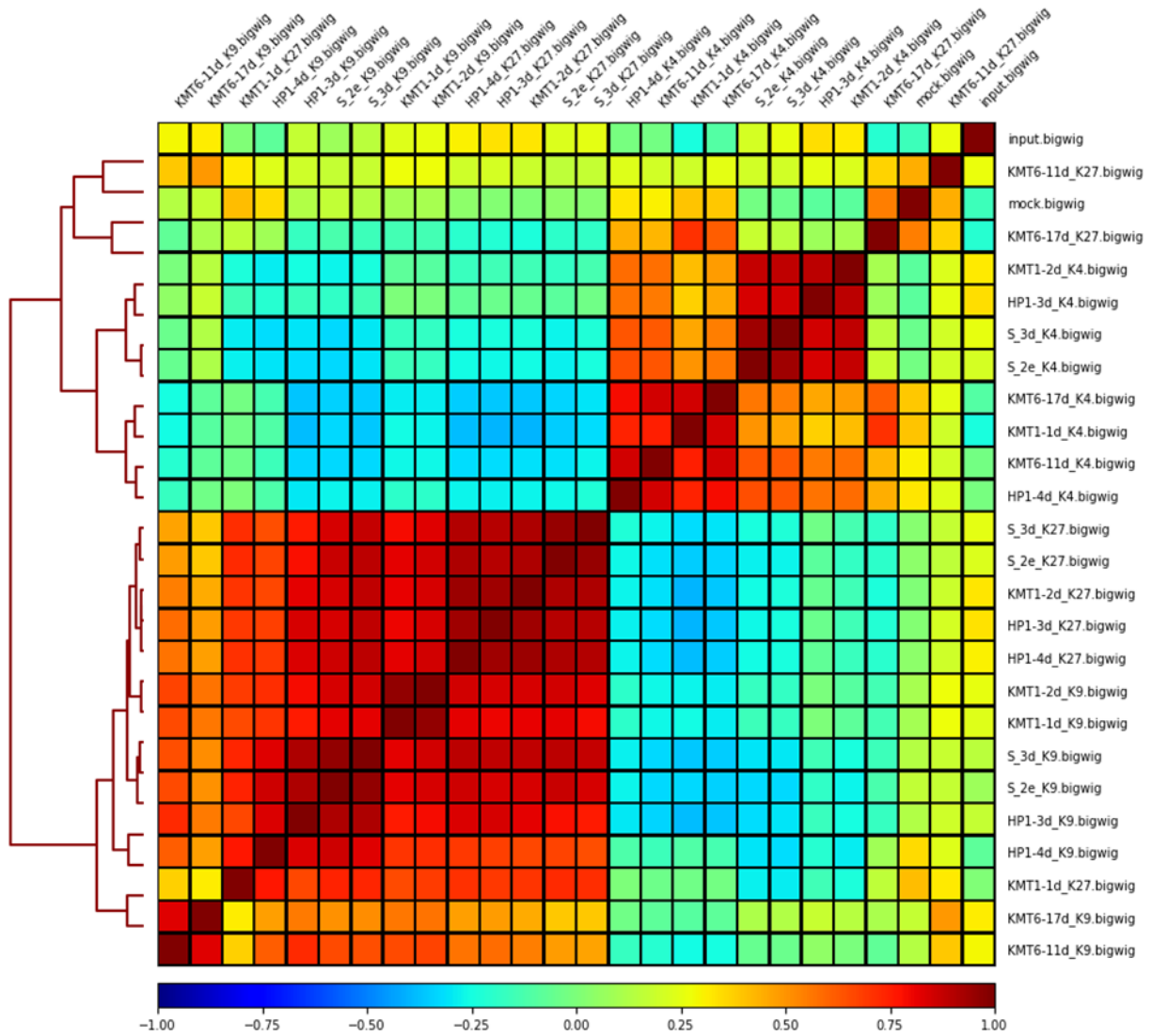
### Annexes 3 – Mapping resulted

See material et methods

Strains	IP	Reads used for mapping	aligned 0 time	aligned exactly 1 time	aligned reads >1 times	overall alignment rate
WT 2e	K9me3	10000000	2.65%	87,71%	9,64%	97,35%
	K27me3	10000000	2.53%	92,96%	4,51%	97,47%
	K4me3	10000000	1,67%	97,19%	1,14%	98,33%
	GFP	7946851	30,08%	62,36%	7,56%	69,92%
	Non-IP Input	10000000	1,57%	94,58%	3,85%	98,43%
WT 3d	K9me3	10000000	3,35%	87,12%	9,52%	96,64%
	K27me3	10000000	2.43%	92,68%	4,89%	97,57%
	K4me3	10000000	1,42%	97,28%	1,29%	98,57%
$\Delta PaKmt1$ 1d	K9me3	10000000	0,66%	95,87%	3,47%	99,34%
	K27me3	10000000	36,29%	57,24%	6,47%	63,71%
	K4me3	10000000	6,13%	92,79%	1,09%	93,88%
$\Delta PaKmt1$ 2d	K9me3	10000000	1,00%	95,08%	3,92%	99,00%
	K27me3	10000000	4,85%	88,74%	4,41%	93,15%
	K4me3	10000000	0,89%	97,66%	1,46%	99,12%
$\Delta PaHp1$ 3d	K9me3	10000000	2,07%	81,23%	15,70%	96,93%
	K27me3	10000000	3,03%	90,30%	6,67%	96,97%
	K4me3	10000000	1,00%	97,36%	1,64%	99,00%
$\Delta PaHp1$ 4d	K9me3	10000000	3,81%	70,65%	25,54%	96,19%
	K27me3	10000000	7,78%	85,56%	6,65%	92,21%
	K4me3	6033424	25,60%	72,20%	2,20%	74,40%
$\Delta PaKmt6$ 11d	K9me3	10000000	1,23%	89,12%	9,65%	98,77%
	K27me3	8740696	25,90%	69,96%	4,14%	74,10%
	K4me3	10000000	9,10%	88,59%	2,31%	90,90%
$\Delta PaKmt6$ 17d	K9me3	10000000	1,54%	89,87%	8,59%	98,46%
	K27me3	10000000	26,59%	69,25%	4,16%	73,41%
	K4me3	10000000	19,52%	78,71%	1,77%	80,48%

## Annexes 4 – Spearman correlation

See figure 9 for description



### Annexes 5 – Peak calling result for each duplicate

Detected peaks numbers after input and mock removing

IP	Input	Mock	Overlap
$\Delta$ PaHP1-3d K27	1337	1658	1654
$\Delta$ PaHP1-3d K4	3134	3002	3001
$\Delta$ PaHP1-3d K9	1456	891	887
$\Delta$ PaHP1-4d K27	1258	1609	1606
$\Delta$ PaHP1-4d K4	3476	3037	3028
$\Delta$ PaHP1-4d K9	1535	1055	1056
$\Delta$ PaKmt1-1d K27	2755	2014	2034
$\Delta$ PaKmt1-1d K4	5284	4401	4372
$\Delta$ PaKmt1-1d K9	1758	1027	1027
$\Delta$ PaKmt1-2d K27	1278	1715	1713
$\Delta$ PaKmt1-2d K4	3131	3026	3028
$\Delta$ PaKmt1-2d K9	1636	1070	1071
$\Delta$ PaKmt6-11d K27	1331	62	62
$\Delta$ PaKmt6-11d K4	3799	3226	3222
$\Delta$ PaKmt6-11d K9	864	262	262
$\Delta$ PaKmt6-17d K27	5890	2822	2803
$\Delta$ PaKmt6-17d K4	4685	3801	3783
$\Delta$ PaKmt6-17d K9	597	182	181
S 2e K27	1286	1742	1742
S 2e K4	3227	3131	3130
S 2e K9	2212	2094	2096
S 3d K27	1392	1934	1931
S 3d K4	3191	3099	3099
S 3d K9	2238	2283	2283

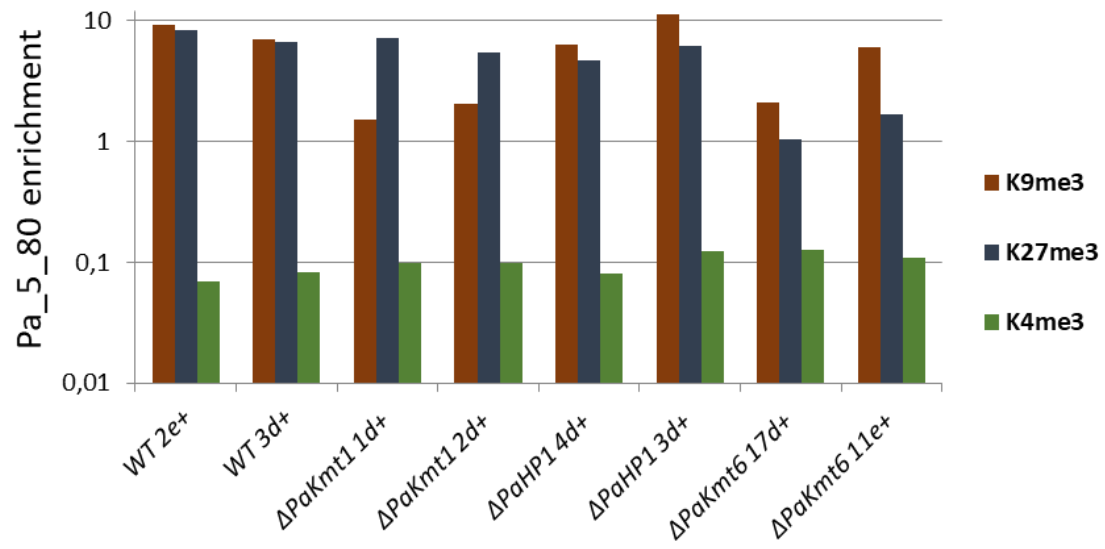
### Annexes 6 – Peak overlap between ChIP replicate samples

Overlap between replicate samples		% Replicate 1	% Replicate 2
$\Delta$ PaHP1 K27	1625	98,2466747	100
$\Delta$ PaHP1 K4	2879	95,9346884	95,0792602
$\Delta$ PaHP1 K9	674	75,9864713	63,8257576
$\Delta$ PaKmt1 K27	1810	88,9872173	100
$\Delta$ PaKmt1 K4	2810	64,2726441	92,8005284
$\Delta$ PaKmt1 K9	829	80,7205453	77,4042951
$\Delta$ PaKmt6 K27	55	88,7096774	1,96218337
$\Delta$ PaKmt6 K4	3012	93,4823091	79,6193497
$\Delta$ PaKmt6 K9	175	66,7938931	96,6850829
WT K27	1922	100	99,5339202
WT K4	3097	98,9456869	99,9354631
WT K9	2038	97,2328244	89,2685064

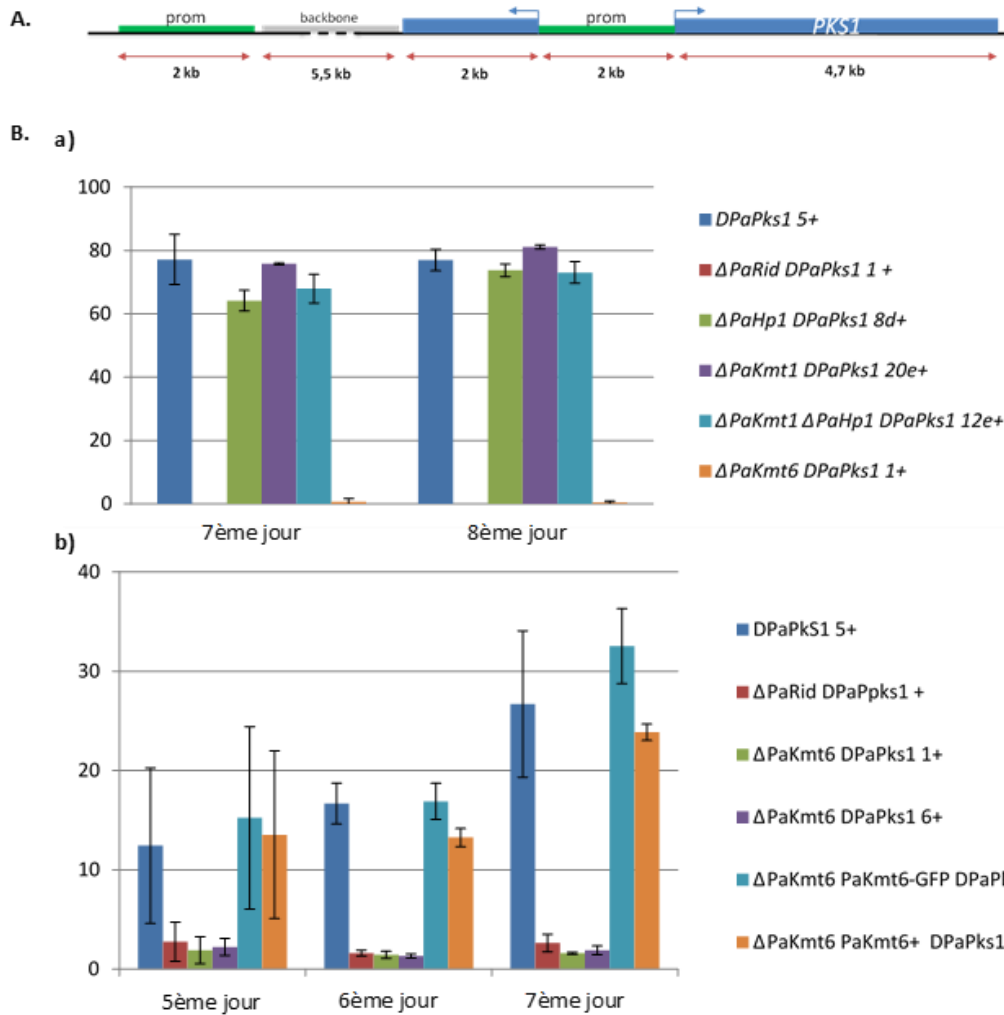


## Annexes 6 – ChIP-QPCR results

See supplementary figure 10 for description.







### Résultats annexes - Figure 1. Implication des protéines remodeleurs de la chromatine dans le RIP

A. Le locus *DPaPks1* permet de quantifier l'activité du RIP (Grognet *et al.* résultats non publiés). Le principe de ce système rapporteur repose sur l'expression du gène *PaPks1* codant une protéine essentielle à la pigmentation des ascospores. Cette construction comprend une duplication de 2 kb de la partie 5' du gène, localisée en amont du promoteur endogène. Après chaque cycle de reproduction sexuée, le RIP introduit des mutations à la fois sur le segment rapporteur et sur la copie endogène de *PaPks1*. Certaines d'entre elles réduisent ou abolissent l'activité de la protéine, ce qui se traduit par une perte partielle ou complète de la pigmentation des ascospores.

B. Les graphiques représentent l'efficacité du RIP dans les contextes génétiques mutants indiqués. Dans cette expérience, les gamètes mâles des souches mutantes contenant le système rapporteur *DPaPks1* ont été croisés avec des ascogones (gamètes femelles) sauvages. Les ascospores issues de ces croisements, ont été collectées après 5, 6, 7 et 8 jours de projection. Les asques montrant une mutation inactivant *PaPks1* (deux ascospores noires et deux ascospores blanches ou vertes) ont été comptés. Deux croisements indépendants ont été réalisés pour chaque génotype, 300 asques ont été comptés de manière aléatoire par croisements.

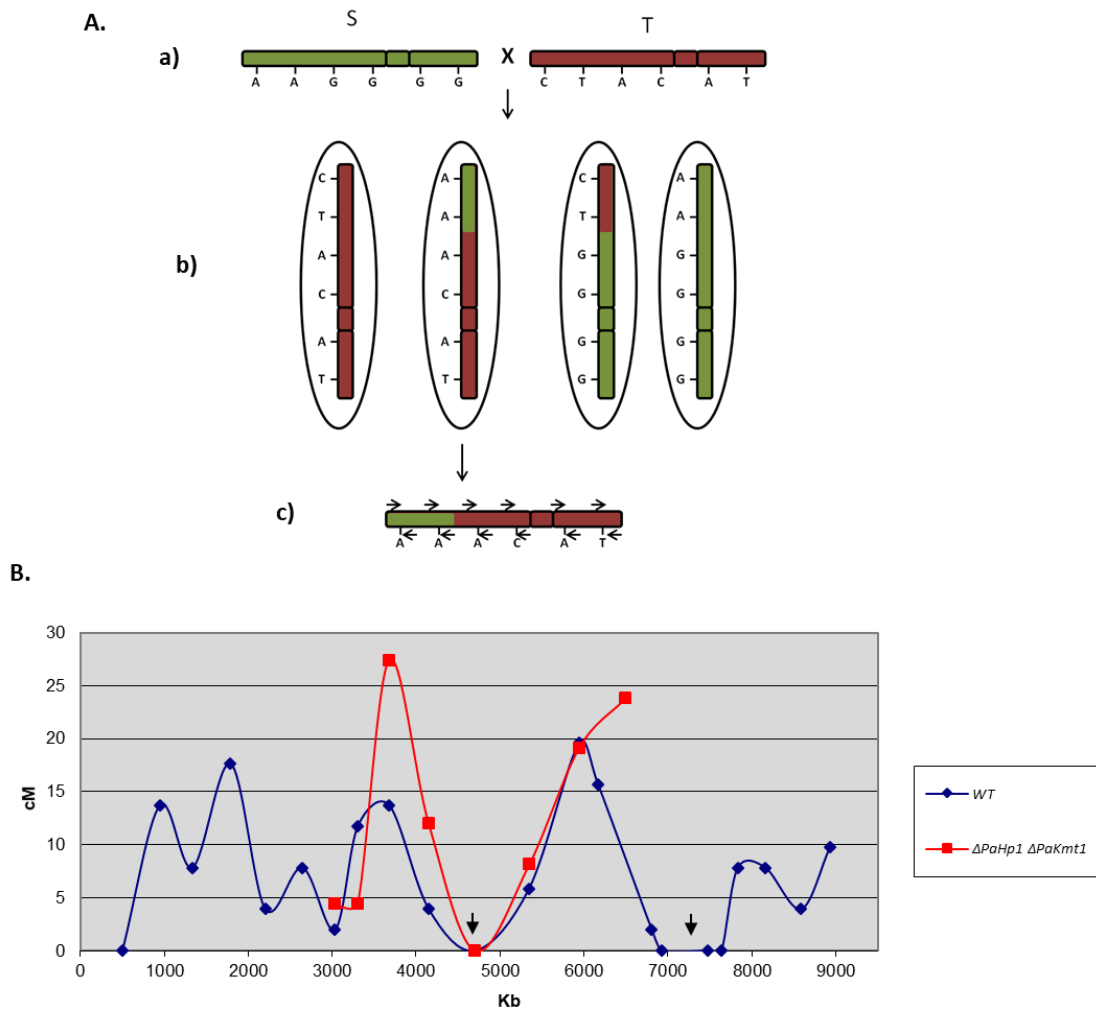
### III-III Résultats Annexes

#### III-III-1 Implication de l'hétérochromatine sur le Repeat Induced Point Mutation chez *P. anserina*

Au cours de ma thèse, un système rapporteur permettant de quantifier l'efficacité d'inactivation du RIP chez *P. anserina* a été mis au point dans le laboratoire (Grognet *et al.* résultats non publiés). Ce système repose sur une construction génétique intégrée dans l'ADN génomique au locus du gène *PaPks1* (Pa\_2\_510). Cette construction (*DPaPks1*) est composée des 2 kb en 5' de la séquence codante de *PaPks1* et des 2 kb du promoteur de ce même gène (résultats annexe - Fig. 1A). Les 2kb d'homologie entre *DPaPks1* et *PaPks1* sont la cible du RIP. Au cours de chaque reproduction sexuée, le RIP génère des mutations de manière équivalente sur ces deux segments et de manière moins fréquente sur la séquence promotrice intermédiaire. Comme *PaPks1* code une polycétide synthase essentielle pour la biosynthèse de la mélanine dans les ascospores, son inactivation conduit à une réduction ou à une perte de pigmentation des ascospores alors respectivement vertes ou blanches. En effet, le gène étant localisé à proximité du centromère du chromosome 2, il subit dans 100% des méioses une ségrégation de type pré-réduction (voir matériel et méthodes supplémentaire). Ainsi, lorsque le RIP génère au stade dicaryotique une mutation perte de fonction dans *PaPks1* dans l'un des deux noyaux haploïdes, les asques résultants sont composés de deux spores blanches et deux spores noires. Si les mutations affectent l'expression du gène *PaPks1* (en survenant dans la séquence promotrice par exemple) ou aboutissent à une perte partielle d'activité de PaPKS1, les ascospores peuvent présenter un phénotype intermédiaire caractérisé par un dégradé de vert. Avec ce système nous pouvons ainsi quantifier de façon simple et directe l'efficacité du RIP dans différents contextes mutants (résultats annexe - Fig.1B). Pour diminuer la complexité des analyses, nous avons réalisé des croisements hétérozygotes pour l'allèle *DPaPks1* qui aboutissent à deux combinaisons d'asques dans la descendance. La première catégorie correspond à des asques contenant deux spores noires et deux spores blanches ou vertes suite aux mutations engendrées par le RIP. La seconde catégorie correspond à des asques contenant quatre spores noires, soit parce que le système rapporteur a échappé au RIP, soit parce que les mutations du RIP n'ont pas eu de conséquences sur la fonction de la protéine PaPKS1. J'ai commencé par introduire le système rapporteur *DPaPks1* dans les mutants  $\Delta PaKmt1$ ,  $\Delta PaHP1$  et  $\Delta PaKmt6$  par croisement. J'ai ensuite réalisé des croisements orientés et analysé la production d'asques issus uniquement d'ascogones sauvages afin de ne pas biaiser l'expérience à cause du développement retardé des périthèces chez le mutant  $\Delta PaKmt6$ .

Dans un contexte sauvage, Pierre Grognet a montré que l'efficacité du RIP varie en fonction du temps. En effet, il est possible de définir une cinétique d'action du RIP tout au long de la production des asques. En effet, l'action du RIP est détectable seulement trois jours après que la sporulation ait débuté pour atteindre un pic au sixième et septième jour. Lorsque j'ai réalisé cette même expérience avec les mutants  $\Delta PaKmt1$ ,  $\Delta PaHp1$  et le double mutant correspondant, j'ai observé que l'efficacité du RIP n'est pas affectée. En revanche, et de façon surprenante, l'inactivation de *PaKmt6* conduit à une perte presque totale de l'activité du RIP (résultats annexe - Fig.1B). Ce résultat suggère que *PaKmt6* est essentielle au RIP chez *P. anserina*. Bien qu'il ait été décrit chez *N. crassa* que les cibles du RIP sont soumises à la mise en place de l'hétérochromatine constitutive (H. Tamaru et Selker 2001; Gladyshev et Kleckner 2017), notre système ne montre pas d'implication essentielle des protéines *PaKmt1* et *PaHP1* dans l'inactivation des séquences ripées chez *P. anserina*. A l'inverse, le RIP semble dépendre directement de la protéine *PaKmt6*, connue pour mettre en place l'hétérochromatine facultative. Sachant que Pierre Grognet a montré que *PaRid* est essentielle au RIP, ce résultat inédit suggère les hypothèses suivantes concernant la fonction de *PaKmt6* dans le RIP : (i) *PaKmt6* intervient en amont de *PaRid* et serait essentielle à son activité de mutation mais pas à sa fonction pendant la reproduction sexuée. Dans ce cas, *PaKmt6* pourrait intervenir directement ou indirectement dans la reconnaissance des cibles du RIP par son activité chromatinienne (favorisant une structure chromatinienne essentielle comme cela a pu être proposé par Gladyshev et Kleckner), par exemple en permettant l'acheminement de *PaRid* via une interaction protéine/protéine ou en régulant l'expression de gènes dont les produits seraient essentiels à sa localisation et/ou à son activité. (ii) *PaKMT6* agit en aval de *PaRid* et éteint l'activité transcriptionnelle des gènes cibles via la mise en place locale d'hétérochromatine.





## Résultats annexes - Figure 2. Utilisation d'un croisement entre les souches géographiques S et T pour analyser la recombinaison méiotique chez *Podospora*

A. L'analyse de la recombinaison méiotique nécessite a) la possibilité de croiser deux souches séquencées présentant des marqueurs polymorphes (S et T) puis b) de générer une descendance homocaryotique à partir de ce croisement et c) de les génotyper par séquençage du génome ou en analysant les marqueurs polymorphes par PCR pour détecter les événements de recombinaison. Dans la figure, les barres représentent des chromosomes issus de S (vert) et T (rouge). Le chromosome chimérique en c) est issu d'un événement de crossing over entre le deuxième et le troisième marqueur. Les flèches correspondent aux amorces potentiellement utilisées pour génotyper ces marqueurs par PCR.

B. Le graphique donne un bref aperçu des distances génétiques mesurées sur le chromosome 1 entre les marqueurs polymorphes dans un contexte génétique sauvage et mutant  $\Delta PaHp1 \Delta PaKmt1$ . Les distances génétiques, données sur l'axe y en centiMorgans (cM) ont été mesurées en génotypant les marqueurs polymorphes de type microsatellites et transposons par PCR de 51 descendants homocaryotiques issues d'un croisement entre la souche S et T (Espagne et al. 2011) ou issues d'un croisement entre la souche S  $\Delta PaHp1 \Delta PaKmt1$  et T  $\Delta PaHp1 \Delta PaKmt1$ . L'axe x représente la position physique sur le chromosome 1, la première flèche correspondant à son centromère, la deuxième au locus sexuel et les extrémités du graphique aux télomères. Les distances génétiques ont été placées au point intermédiaire physique entre les deux marqueurs concernés. La résolution de ce graphique correspond à la distance physique moyenne entre deux paires de marqueurs (environ 400 Kb).

### III-III-2 Mise en place d'un système d'analyse à haut débit de la recombinaison méiotique chez *P. anserina*

*Podospora comata* est une espèce proche de *P. anserina* (anciennement appelée souche « T ») qui partage une identité génomique de 94-99% avec la souche de référence S (Philippe Silar et al. 2018c). Les croisements interspécifiques entre *P. comata* et *P. anserina* sont suffisamment fertiles pour obtenir une descendance viable en F1 (Espagne et al. 2008a).

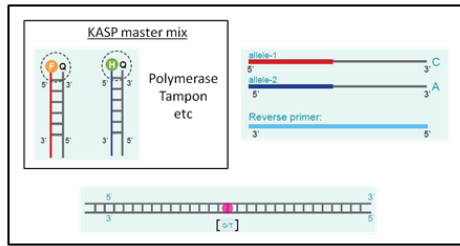
Chez *P. anserina*, comme chez de nombreuses espèces, il a été établi que certains territoires chromosomiques ne sont pas permissifs à la recombinaison tels que le centromère, les télomères et le locus sexuel. De ce fait, la formation des crossing-over est redirigée dans les zones adjacentes définissant ainsi des points chauds de recombinaison. Nous savons par ailleurs, que l'état de la chromatine locale est une composante déterminante de ce processus. En effet, la forme compacte de l'hétérochromatine est moins accessible aux événements de recombinaison alors que l'euchromatine, moins condensée, est plus susceptible de l'être. Dans ce contexte, les protéines remodelleurs de la chromatine pourraient présenter une fonction primordiale dans la localisation des crossing-over au cours de la méiose. Une partie de mon travail d'étude a consisté à déterminer si l'absence des protéines PaHP1 et PaKmt1 modifie les profils de recombinaisons méiotiques, en fréquence et en localisation. L'hypothèse initiale étant que l'hétérochromatine constitutive, canoniquement localisée dans les régions péri-centromériques et sub-télomériques, empêche la formation de crossing-over et que la levée de cette inhibition dans les territoires concernés pourrait se faire au détriment des points chauds identifiés en condition sauvage.

Pour tester cette hypothèse, j'ai construit une souche double mutante  $\Delta PaHP1 \Delta PaKmt1$  dans un fond génétique de type « T » par introgression (dix croisements successifs). J'ai ensuite croisé cette souche avec une souche double mutante  $\Delta PaHP1 \Delta PaKmt1$  dans un fond génétique de type « S » puis isolé 50 descendants haploïdes (F1). A partir de cette F1, j'ai réalisé une première évaluation des profils de recombinaison dans les séquences péri-centromériques qui montrent un enrichissement en marques H3K9me3 dans un contexte sauvage, en utilisant les marqueurs polymorphes de type microsatellites (Espagne et al. 2008a, 2011). J'ai effectivement observé des différences de fréquence de recombinaison (résultats annexe - Fig. 2B). Cependant, un test statistique de type Chi2 n'a pas validé leur caractère significatif. Nous en avons conclu que notre échantillon initial était trop faible (N=50) et nous avons décidé de la doubler. Par ailleurs, nous avons également décidé d'adopter une autre méthode de détection des événements de recombinaison afin d'établir une carte de liaison génétique à plus haute densité.

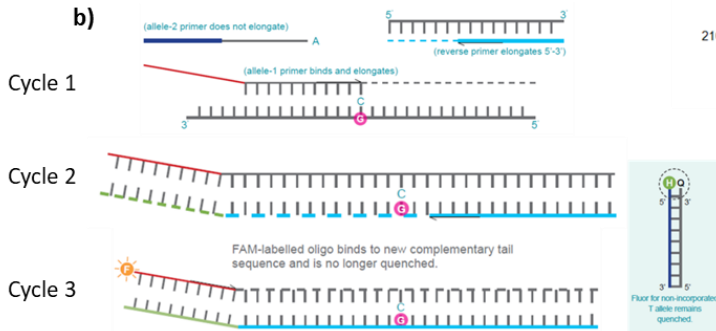


A.

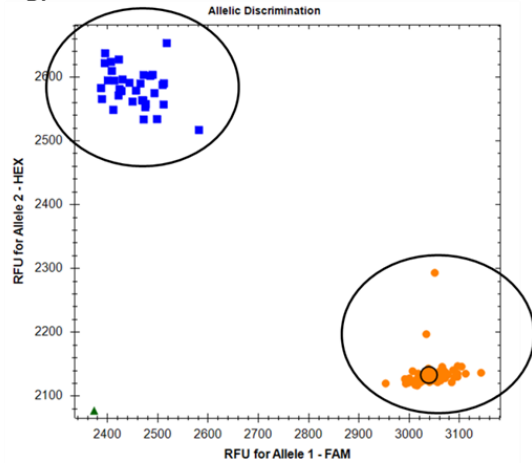
a)



b)



B.



### Résultats annexes - Figure 3. Le génotypage des SNP par PCR en duplex

A. La détection des SNP dans la descendance « S x T » utilise la technologie KASPar. a) le principe repose sur l'utilisation simultanée de deux amorces « forward » (FD) homologues en amont du SNP et une amorce « reverse » commune. Les amorces FD se distinguent par leur extrémité 3'-OH correspondant au nucléotide polymorphe, ce qui permet leur hybridation spécifique soit sur l'allèle S soit sur l'allèle T. Ces amorces sont par ailleurs couplées à une séquence nucléotidique correspondant à des étiquettes différentes (bleu et rouge). Le mélange KASP contient deux fluorophores associés à une courte séquence d'ADN double brin, homologue à l'une des étiquettes présente sur les amorces FD. Dans cette configuration, les signaux fluorescents émis par les fluorophores sont bridés par une molécule désactivatrice (Quencher). b) L'amplification d'une des deux amorces aboutie à la dissociation du fluorophore correspondant avec son quencher et à l'émission d'un signal fluorescent spécifique (HEX ou FAM) mesurable en fin de PCR (<https://www.lgcgroup.com/products/kasp-genotyping-chemistry/#.W70QAIQzbc5>).

B. Cette technique nous permet de génotyper jusqu'à 96 descendants pour un SNP donné au cours d'une expérience de PCR en duplex. La descendance F1 étant haploïde, chaque point représente à un génotype portant soit l'allèle S, soit l'allèle T et ce pour un SNP donné.

Pour cela nous avons choisi une méthode de PCR en duplex (résultats annexe - Fig.3A). J'ai donc poursuivi cette méthode en isolant de nouveaux descendants homocaryotiques issus à la fois de croisements polymorphes mutants (*S ΔPaHP1 ΔPaKmt1* X *T ΔPaHP1 ΔPaKmt1*) mais aussi de croisements polymorphes sauvages. Malheureusement, alors que nous attendions une ségrégation en proportion équivalente des allèles S et T dans la descendance F1, j'ai détecté un biais significatif en faveur des allèles provenant de la souche S dans la descendance du croisement polymorphe sauvage devant servir à établir la carte de recombinaison de référence (résultats annexes - table 1). Un tel biais peut être due à la présence de distorateurs de ségrégation méiotique tels que des « spores killer » (Grognet, Lalucque, et al. 2014). Ce résultat invalide toute possibilité d'utiliser la descendance que j'ai générée et qui doit maintenant être remplacée avant de poursuivre ces analyses de recombinaison méiotique.

		Marqueur 1	Marqueur 2	Marqueur 3
Observés	Nb S	43	41	42
	Nb T	17	19	18
	Total	60	60	60
Espérés	Nb S	30	30	30
	Nb T	30	30	30
	Total	60	60	60

Test Chi2
ddl = 2
Alpha = 0,05
P(T<5,99)=14,46
<b>14,46&gt;5,99</b>

**Résultats annexes – Table 1. La nouvelle génération de descendants S par T présente un biais génétique en faveur du contexte S.**

Le tableau de gauche représente les résultats de génotypage de trois marqueurs polymorphes réalisés avec la technologie KASPar sur la nouvelle descendance issue d'un croisement entre les souches sauvages S et T. Le tableau de droite montre le résultat d'un test Chi2 montrant un avantage significatif en faveur du génotype S.

Malgré l'absence de résultats significatifs pour le moment dans ce projet, nous avons pu mettre au point la technique de PCR en duplex qui pourra être réutilisée pour analyser la recombinaison méiotique dans les futures souches mutantes du laboratoire. Par ailleurs, la délétion de gène *PaKmt6* a été générée récemment dans la souche T et pourra bientôt être utilisée pour produire une descendance polymorphe propre à établir une carte de liaison génétique.



#### **IV- Discussion générale et conclusion**

Les champignons constituent une grande famille d'espèces aux multiples activités. Ce sont avant tout des décomposeurs, qui régissent la dépollution des sols forestiers en recyclant les matières mortes telles que les feuilles, le bois ou les cadavres d'animaux. Si la présence de certains d'entre eux est mutuellement bénéfique pour les espèces au sein de leur écosystème (*e.g. mycorhizes*), d'autres parasitent leurs espèces hôtes et peuvent engendrer des pathologies (*e.g. aspergillose, chancre du platane*). Depuis leur domestication par l'homme, leurs capacités à fabriquer et sécréter des molécules d'intérêts sont utilisées dans l'industrie moderne alimentaire et médicale. Au sens large, les eumycètes forment un règne évolutif majeur des espèces eucaryotes au même titre que les animaux et les plantes. En l'occurrence, ils partagent avec ces deux familles des étapes clés du développement telle que la méiose, la formation de gamètes mâles et femelles, la fécondation et la caryogamie. Ces étapes sont régies et/ou mettent en jeu des mécanismes épigénétiques qui régulent spécifiquement l'expression d'un ensemble de gènes. Jusqu'à présent, l'exploration de ces mécanismes s'est concentrée sur les mammifères chez lesquels il est particulièrement difficile de les comprendre dans leur intégralité puisque faisant intervenir une diversité importante de protéines, souvent essentielles. Les champignons ont conservé en partie ces mécanismes dans une forme ancestrale, beaucoup moins complexe à étudier.

#### **PaRID est essentielle au développement sexué**

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés aux mécanismes épigénétiques qui régissent le développement sexué des ascomycètes. Parmi eux, le RIP constitue un système de défense contre les éléments mobiles de l'ADN. Chez *N. crassa*, le RIP conduit à la méthylation *de novo* des cytosines et à la mutation C::G vers T::A des séquences répétées pendant le stade dicaryotique qui précède la caryogamie. Cette étape dépend de la DNMT putative RID et est suivie par la mise en place locale de l'hétérochromatine constitutive via la voie KMT1-HP1 permettant ainsi le recrutement de la DNMT de maintenance DIM-2 (Lewis et al. 2009b). Malgré l'absence de 5mC dans son génome, *P. anserina* a conservé les DNMTs RID et DIM-2. En construisant le mutant  $\Delta PaRid$ , nous avons démontré que PaRid est nécessaire à la formation des cellules dicaryotiques comme c'est le cas chez *A. immersus*. Par ailleurs, il a été montré que l'absence de RID conduit également à une stérilité chez *A. nidulans* et chez *T. reesei* (D. W. Lee et al. 2008c; W.-C. Li, Chen, et Wang 2018b).

Nous avons alors supposé que RID assure la même fonction dans ces trois espèces ; néanmoins ni l'allèle *Masc1* d'*A. immersus*, ni l'allèle *DmtA* d'*A. nidulans* n'ont été capables de compléter le phénotype du mutant  $\Delta PaRid$ . Par ailleurs, nous avons montré que l'activité putative de cytosine méthyltransférase de PaRid est essentielle pour assurer sa fonction dans la reproduction sexuée. De ceci découle les hypothèses suivantes concernant la fonction moléculaire de PaRid. (i) La méthylation des cytosines générée par PaRid est trop faible et/ou ne concerne qu'une partie du génome pour être efficacement détectée par l'utilisation des techniques de biologie moléculaire actuelles (*e.g.* bisulfite, spectrométrie de masse) ; (ii) la méthylation de l'ADN n'est que transitoire et restreinte au cours du développement sexué ; (iii) PaRid cible une autre molécule que les cytosines (*e.g.* adénine, ARN, protéines). En parallèle, nous avons pu observer, au travers d'expériences de ChIP-Seq, que les séquences répétées sont la cible de l'hétérochromatine constitutive caractérisée par la présence de la marque épigénétique H3K9me3. Des expériences de cytologie montrent que cette même modification est la cible de PaHP1, une caractéristique conservée aussi bien chez les animaux que chez les autres champignons filamenteux (Ekwall et al. 1996; A. J. Bannister et al. 2001; Freitag, Hickey, et al. 2004). Chez *N. crassa*, NcHP1 recrute directement NcDIM-2 qui perpétue la totalité des 5mC du génome. Il se pourrait donc que la maintenance de la méthylation (i) ne se produise pas chez *P. anserina* ou que (ii) PaDim2 soit privée de sa capacité à méthyler l'ADN en raison d'un défaut d'activité catalytique (mutation) ou qu'elle soit régulée négativement par une tierce protéine (*e.g.* ADN déméthylase). Il reste cependant difficile de déterminer la fonction précise de PaDim2 puisque son absence n'entraîne aucun phénotype. Pour approfondir, il serait intéressant de déterminer si l'interaction PaHP1-PaDim2 a bien lieu chez *P. anserina* par le biais d'une expérience de double-hybride. De manière plus générale, pour déterminer les partenaires/cibles protéiques et/ou nucléiques de PaRid et PaDim2, il serait envisageable de réaliser des expériences d'immunoprécipitations suivie de spectrométrie de masse ou de séquençage à haut débit. Une expérience néanmoins complexe à mettre en place concernant PaRid qui semble subir une répression post-transcriptionnelle pendant la majeure partie de son cycle de vie (Timpano et al., manuscrit en préparation).

Si PaRid est nécessaire à l'établissement de la cellule dicaryotique, ce n'est pas le cas de son homologue chez *N. crassa* puisque la perte de fonction de *NcRid* n'altère en rien son cycle de vie (Freitag et al. 2002a). Ce résultat suggère que RID pourrait intervenir dans deux fonctions distinctes : l'une permettant d'établir le stade dicaryotique et l'autre impliquée dans les mutations de RIP.

De manière surprenante, nous avons constaté que PaRid est exprimée dans l'ascogone et le protopérithèce et dans les ascospores. Cette observation nous a permis de proposer un modèle dans lequel (i) PaRid permettrait la distinction des noyaux parentaux entre eux via la mise en place d'une empreinte épigénétique sur le génome maternel au moment du développement du gamète femelle. Selon cette hypothèse, l'intervention de PaRid pourrait faire appel à l'utilisation de marques additionnelles de type modifications d'histones comme c'est le cas pour les gènes soumis à empreinte chez les plantes et les animaux (Weaver et Bartolomei 2014) ou lors de l'inactivation du chromosome X chez les mammifères (Brinkman et al. 2006). Néanmoins, nous avons montré que l'absence de l'hétérochromatine constitutive et facultative ne génère pas de blocage de la reproduction. Ceci nous indique que la fonction de PaRid dans le développement sexué ne dépend pas de la mise en place de l'hétérochromatine. Bien qu'il ait été montré chez *N. crassa* que le système à ARNi n'intervient pas dans le RIP, nous n'excluons pas la possibilité de son intervention dans la mise en place de la cellule dicaryotique si les deux fonctions de PaRid sont bien indépendantes l'une de l'autre chez *P. anserina*. Il n'est pas à exclure non plus que l'empreinte fasse appel à des protéines éditrices autres que PaKmt1 et PaKmt6 ou à des protéines capables d'effacer les marques activatrices. La seconde hypothèse serait liée à la fonction de PaRid par rapport au RIP, (ii) ce dernier servant d'étape obligatoire de contrôle de la qualité du génome avant d'établir la cellule dicaryotique. Une fois ce contrôle franchi la caryogamie puis la méiose pourraient avoir lieu.

### **Le RIP est dépendant de PaKmt6**

L'efficacité du RIP chez *P. anserina* est maintenant quantifiable via l'utilisation d'un système génétique rapporteur mis au point récemment dans le laboratoire. L'utilisation de ce système nous a permis en outre de montrer que PaRid assure la totalité des mutations engendrées par le RIP (Grognet *et al.*, données non publiées). Nous avons montré que la double inactivation de PaHP1 et PaKmt1, provoquant la perte de l'hétérochromatine constitutive, n'altère pas l'efficacité du RIP à introduire des mutations dans les séquences répétées. Sans être un résultat surprenant (car déjà démontré chez *N. crassa*, (Gladyshev et Kleckner 2017), nous pensions éventuellement que l'absence de méthylation de l'ADN pouvait être complétée par la formation d'hétérochromatine constitutive via la voie KMT1-HP1. En revanche, de manière totalement inédite, l'absence de PaKmt6 conduit à la perte totale de la capacité d'inactivation du rapporteur cible par le RIP. Ce résultat préliminaire demande à être complété afin de savoir si dans le mutant  $\Delta PaKmt6$ , l'effet mutagène du RIP est aboli ou seulement réduit.

Dans le cas contraire, PaKmt6 serait nécessaire en amont du moment d'intervention de PaRid, en étant par exemple impliquée dans le processus de reconnaissance des séquences répétées. Cette régulation pourrait avoir lieu de manière directe ou indirecte via la marque H3K27me3. Néanmoins, afin de ne pas affecter les séquences uniques également marquées par la modification H3K27me3, un échelon supplémentaire de régulation est requis. Un second modèle rejoindrait l'hypothèse proposée chez *N. crassa*, selon laquelle le mécanisme de reconnaissance des séquences répétées se ferait via l'interaction par homologie de séquences de deux hélices d'ADN, une structure favorisée par la mise en place d'hétérochromatine (Gladyshev et Kleckner 2017). En effet, si le mutant  $\Delta PaKmt1$  conserve la marque H3K27me3 dans les régions de l'hétérochromatine constitutive, dans le mutant  $\Delta PaKmt6$  les deux marques sont absentes. Ce résultat surprenant remet finalement en question la seconde hypothèse concernant le rôle de PaRid dans le développement puisque l'absence de RIP dans le mutant  $\Delta PaKMT6$  n'empêche pas la formation des cellules dicaryotiques.

### **Mise au point du protocole de ChIP-Seq chez *P. anserina***

Cette étude nous a permis de mettre au point les conditions d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) chez *P. anserina*. Pour ce faire nous nous sommes inspirés du protocole récemment établi chez *Z. tritici* (Soyer et al. 2015).

- Condition de culture du champignon

Nous avons choisi d'extraire la chromatine à partir de mycélium en croissance végétative cultivé en fioles de roux pour des raisons expérimentales. Nous nous sommes placés à 60 h de croissance pour permettre au mutant  $\Delta PaKmt6$  de pousser suffisamment longtemps (puisque sa croissance est ralentie) mais sans que la souche sauvage ne parvienne à confluence. De plus, ce temps correspond au point d'inflexion de la courbe de croissance du mutant  $\Delta PaKmt6$ . Il ne faut pas oublier enfin que les noyaux présents dans un hyphe mycélien ne sont pas tous strictement identiques entre eux. Il existe notamment des différences d'expressions entre les noyaux situés à l'apex et ceux situés plus en amont. Ce que nous observons alors dans cette expérience correspond à la somme des enrichissements ayant lieu dans l'ADN génomique de l'ensemble des noyaux du mycélium.

Après plusieurs tests préliminaires, nous avons conclu que la digestion de la chromatine par la MNase était tout à fait adaptée à notre modèle fongique.

Son utilisation nous a permis de segmenter la quasi-totalité de la chromatine extraite en fragments de tailles adaptées aux expériences d'immuno-précipitation (inférieure à 500 pb) et ce, dans la souche sauvage comme dans les souches mutantes hétérochromatiniennes. De plus, le séquençage de l'échantillon témoin non immunoprécipité n'a montré aucun biais de digestion non homogène par la MNase. De ce fait, nous n'avons pas eu le besoin de tester une digestion mécanique par sonication.

-spécificité des anticorps

Puisque les histones sont des protéines très conservées (90% d'identité entre l'histone 3 de *P. anserina* et celui de *M. musculus*), nous avons choisi d'utiliser des anticorps adaptés aux mammifères dont nous avons testé la spécificité chez *P. anserina* par western blot sur des extraits protéiques nucléaires. Les résultats ont montré une reconnaissance spécifique et exclusive des modifications ciblées pour l'utilisation des anticorps anti-H3K9me3 et anti-H3K4me3. En revanche, l'emploi des anticorps anti-H3 et anti-H3K27me3 a révélé une protéine additionnelle de plus faible poids moléculaire, protéine qui n'est plus détectée, de même que la modification H3K27me3 dans le mutant  $\Delta PaKmt6$ . Par sa signature, ce signal peut correspondre au variant d'histone CenH3 de *P. anserina*. Cependant, ce variant est dépourvu de l'épitope normalement reconnu par l'anticorps anti-H3K27me3. Cette protéine peut également correspondre à une version tronquée non fonctionnelle de l'histone H3 (produit de dégradation), dépourvue notamment de sa séquence N-terminal reconnue par les anticorps anti-H3K9me3 et anti-H3K4me3. La persistance d'un signal de faible intensité dans les extraits protéiques tirés des mutants  $\Delta PaKmt1$  pour la marque H3K9me3 peut correspondre à une reconnaissance non spécifique de la marque H3K27me3 par l'anticorps anti-H3K9me3. Cette faible reconnaissance croisée est confirmée par dot-blot avec l'utilisation de peptides commerciaux H3K9me3 et H3K27me3. Cette reconnaissance croisée n'a cependant pas d'incidence sur les résultats de ChIP-Seq puisque l'on ne détecte plus la marque H3K9me3 dans le génome du mutant  $\Delta PaKmt1$ . De plus, le faible signal perçu par l'anti-H3K9me3 dans les extraits protéiques des mutants  $\Delta PaKmt1$  disparaît dans les extraits protéiques du double mutant  $\Delta PaKmt1 \Delta PaKmt6$ . Il n'est donc pas à exclure qu'il puisse exister une redondance fonctionnelle entre les histones méthyltransférases. De ce fait, PaKmt1 pourrait catalyser, dans une moindre mesure, la tri-méthylation du résidu H3K27.



#### - Analyse informatique des données de séquençage

Pour réaliser l'alignement, nous avons choisi d'utiliser au plus 10 millions de reads de 50 pb par échantillon, correspondant à une couverture de 14 fois la taille du génome de *P. anserina*. Puisque nous travaillons sur des marques potentiellement présentes dans les régions répétées de l'ADN, nous avons conservé les reads identiques qui, dans nos conditions, ne correspondent pas forcément à des duplicas de PCR générés pendant la fabrication des banques. Néanmoins, leur proportion est relativement faible (< 2%). Sur les 10 millions de reads utilisés, plus de 95% d'entre eux ont pu être alignés sur le génome pour la majorité des échantillons. Quelques échantillons ont présenté 25 à 30% de reads non alignés. Notons que cela concerne surtout des échantillons pour lesquels nous attendions peu de matériel précipité tel que le mock ou l'échantillon  $\Delta PaKmt6$  immunoprécipité avec l'anticorps dirigé contre la marque H3K27me3. Pour ces cas-là, les reads non alignés correspondent en grande partie à des contaminations expérimentales (en partie de séquences d'ADN de mammifères et ou non référencées). Pour les mêmes raisons que pour les reads identiques, nous avons conservé les reads qui présentent plusieurs possibilités d'alignements (e.g. ETs, ADNr, répétitions des centromères). Ces derniers ont été répartis chacun aléatoirement à un emplacement sélectionné parmi les meilleurs scores d'alignement. A l'inverse, le Mock, correspondant à une immunoprécipitation de la chromatine d'une souche sauvage avec un anticorps dirigé contre la GFP, présente de nombreux enrichissements souvent localisés dans des régions susceptibles de contenir de l'hétérochromatine (ETs, régions sub-téломériques et péri-centromériques). Bien entendu, la souche sauvage de référence de *P. anserina* ne produit pas de GFP. Nous pensons que l'état chromatinien de ces régions favorise grandement des interactions non spécifiques avec les anticorps (régions 'hyper-Chipable'). Néanmoins, afin de générer les jeux de données les plus robustes, nous avons réalisé l'analyse de « peak calling » en soustrayant à la fois l'input non-immunoprécipité et le Mock. Nous avons finalement conservé les enrichissements significatifs détectés dans ces deux conditions malgré la perte potentielle de territoires enrichis pour les marques de l'hétérochromatine. Les régions identifiées comme enrichies en une marque donnée sont donc très spécifiques.

#### - Robustesse de l'expérience

Les corrélations de Spearman entre les répliques biologiques sauvages sont excellentes pour les trois marques étudiées. De plus les profils de localisations des enrichissements sont très similaires entre eux. Ces résultats montrent une bonne reproductibilité de l'expérience.

Les différences observables entre les répliques des mutants peuvent être dues au déplacement non identique des marques étudiées en réponse à la perte des protéines chromatiniennes, PaHP1, PaKmt1 et PaKmt6. Cependant, ces différences restent mineures et n'influencent que très peu les paysages épigénomiques caractérisés. S'il ne semble faire aucun doute que les différences de distributions des marques observées dans les contextes mutants par rapport au contexte sauvage sont significatives, nous allons bien entendu effectuer les tests statistiques requis pour le démontrer. Malheureusement, l'obtention tardive, au cours de ma thèse, des derniers résultats de ChIP-seq ne m'a pas permis de les réaliser à temps pour les inclure dans ce manuscrit.

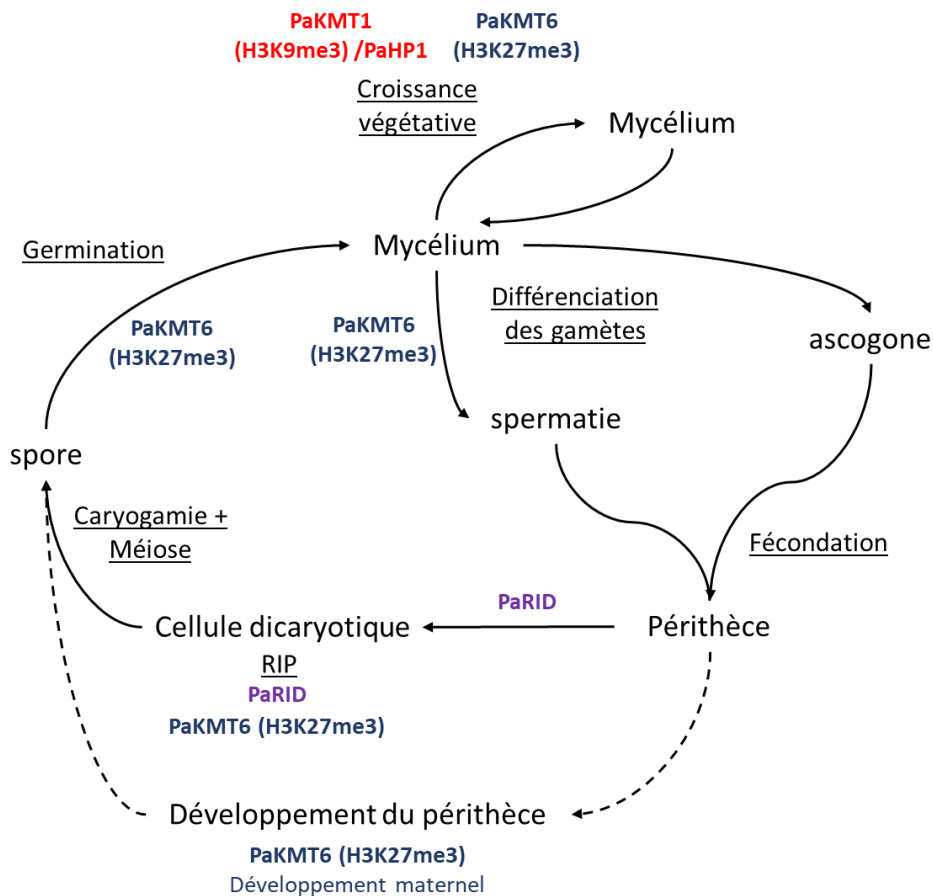
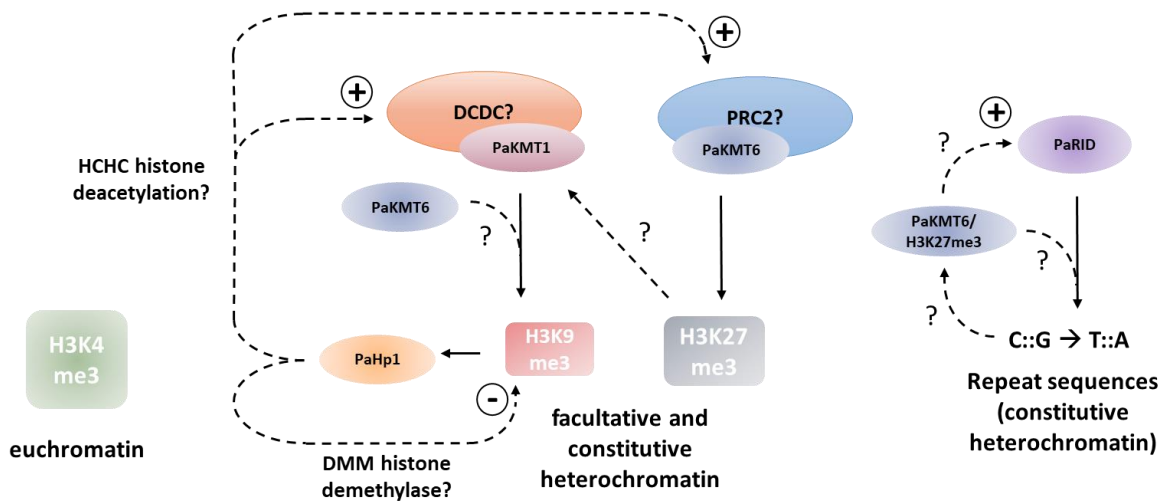
### **Les marques H3K9me3 et H3K27me3 colocalisent sur l'hétérochromatine constitutive**

Les paysages épigénomiques de *P. anserina* décrits dans cette étude suivent le modèle établi chez *Z. tritici* (Schotanus et al. 2015). Notons en particulier la co-localisation des marques H3K27me3 et H3K9me3 qui sont mutuellement exclusives chez la majorité des eucaryotes. Dans notre système, la quasi-totalité des régions enrichies en H3K9me3 sont comprises dans les régions marquées par H3K27me3. Ces territoires englobent à la fois des séquences répétées et des gènes transcriptionnellement réprimés (Philippe Silar et al. 2018b). De ce fait, les deux marques assurent la mise en place des deux formes de l'hétérochromatine (constitutive et facultative). A l'inverse, chez les ascomycètes proches phylogénétiquement de *P. anserina*, *N. crassa* (Jamieson et al. 2013) et *F. graminearum* (Connolly, Smith, et Freitag 2013), ces modifications sont exclusives entre elles. Il avait été alors proposé que la méthylation de l'ADN présente chez ces deux espèces, absente chez *Z. tritici*, intervienne dans la distinction des deux territoires comme cela avait été démontré sous certaines conditions chez les plantes (Deleris et al. 2012) et les mammifères (Saksouk et al. 2014). La méthylation des cytosines étant absente chez *P. anserina*, nos observations convergeraient vers cette hypothèse. Cependant, il a récemment été montré chez *N. crassa*, que l'absence de méthylation de l'ADN ne modifie pas la localisation des deux marques (Jamieson et al. 2016). En l'occurrence, dans notre système, la présence de PaKmt6 est primordiale pour le dépôt et/ou le maintien de la marque H3K9me3. Une régulation qui n'a jamais été observée auparavant, suggérant une intervention du complexe PRC2 dans l'adressage de PaKmt1 sur les régions d'intérêts (Discussion – Fig. 1A). Par ailleurs, les quelques régions enrichies en H3K9me3 dans le mutant  $\Delta PaKmt6$  correspondent aux points où cette marque est la plus densément présente dans le génome de la souche sauvage, soit exclusivement dans l'hétérochromatine constitutive.

La mise en place de cette marque pourrait alors être assurée par deux mécanismes indépendants et partiellement redondants. L'utilisation d'un gène rapporteur transcriptionnellement éteint et localisé dans ces territoires distincts nous permettrait en l'occurrence d'identifier les éléments intervenant dans ces deux voies au cours d'un crible de suppression visant à rétablir son expression.

### **PaHP1 favorise la mise en place de H3K9me3 et H3K27me3**

L'absence de PaHP1 provoque des effets qui peuvent sembler contradictoires sur la localisation de la marque H3K9me3. En effet, si le nombre de domaines enrichis diminue dans le mutant  $\Delta PaKmt1$ , les territoires H3K9me3 restants s'allongent. Ce résultat a également été observé chez *N. crassa* et est expliqué par l'interaction de NcHP1 dans deux complexes protéiques indépendants (Honda et al. 2012). En effet, d'un côté NcHP1 permet le recrutement du complexe HCHC dont l'activité aboutie à la désacétylation de l'histone 3, une action qui favorise la méthylation des résidus H3K9. Par ailleurs, NcHP1 interagit avec l'hétérodimère DMM-1/DMM-2 qui présente une activité histone déméthylase et participe à la mise en place des frontières de l'hétérochromatine constitutive. Les domaines enrichis sont donc à la fois diminués en quantité à cause de la perte du rétrocontrôle positif par HCHC, et s'étendent au-delà des frontières de l'hétérochromatine en absence de l'activité H3K9 déméthylase du complexe DMM. Nos résultats tendent à penser que ces complexes sont également à l'oeuvre chez *P. anserina*. De fait, on trouve les orthologues des gènes codant DMM-1 (NCU01554) et DMM-2 (NCU08289) chez ce champignon, soit respectivement *Pa\_3\_5340* et *Pa\_6\_6170* (Espagne et al. 2008a). La perte des marques H3K27me3 observée en l'absence de PaHP1 pourrait également être liée à la perte de l'activité désacétylase de HCHC puisque ces marques colocalisent dans les mêmes régions.



**Figure de discussion. Fonctions des protéines de l'hétérochromatine chez *P. anserina***

A. Fonctions et régulations moléculaires. Les flèches en pointillé peuvent concerner une régulation directe ou indirecte. Nos hypothèses concernant la fonction de PaKmt6 dans la régulation de l'activité de PaKmt1 et PaRID sont indiquées (?).

B. Fonctions identifiées au cours du cycle de vie.

## **PaKmt1 et PaHP1 sont impliquées dans le développement végétatif**

Comme chez les plantes, certaines levures et la plupart des champignons filamenteux, les protéines canoniques de la mise en place de l'hétérochromatine constitutive, PaKmt1 et PaHP1, ne sont pas essentielles à la viabilité de *P. anserina*. Au contraire, leur inactivation n'entraîne que de légers défauts au cours de la croissance végétative du champignon. Ce résultat peut être dû au fait que la marque H3K27me3 catalysée par PaKmt6 assure la mise en place de l'hétérochromatine constitutive en absence de H3K9me3 puisque les deux marques colocalisent sur ces régions. Néanmoins, si chez *A. nidulans* l'inactivation de *AnKMT1* ne produit aucun phénotype particulier, ni la marque H3K27me3 ni la méthylation de l'ADN ne sont présentes pour compléter l'absence de marque H3K9me3 (Reyes-Dominguez et al. 2010). Il serait plus probable que la méthylation du résidu H3K9 ait principalement pour fonction la répression de la mobilité des ETs qui se trouvent inactivés génétiquement par le RIP chez les ascomycètes.

Parmi les défauts observables, les souches  $\Delta PaKmt1$  et  $\Delta PaHp1$  présentent un léger retard de croissance aggravé à basse température, un phénotype similaire à celui décrit chez la levure *S. pombe* et expliqué par la présence d'anomalies de ségrégation mitotique des chromosomes (Lorentz et al. 1994; Ekwall et al. 1996). Un effet similaire a été observé chez *N. crassa* pour lequel les mutants correspondant développent des ponts internucléaires d'ADN après mitose (Lewis et al. 2010a). Ces anomalies n'ont pour l'instant pas été détectées par microscopie classique mais une étude en microscopie confocale plus poussée ou une caractérisation de l'intégralité des chromosomes en électrophorèse en champ pulsé, pourrait nous révéler si de telles structures sont présentes dans les mutants hétérochromatiniens de *P. anserina*.  $\Delta PaKmt1$  et  $\Delta PaHp1$  présentent également un défaut de reprise de croissance. Pour expliquer cette observation nous proposons les deux hypothèses suivantes. (i) Le mycélium des mutants peut en effet développer une sénescence précoce, diminuant ainsi le nombre d'articles non sénescents susceptibles de pouvoir se remettre à croître. Cette hypothèse pourra être vérifiée en utilisant un colorant tel que le bleu d'Evans qui permet de mettre en évidence les hyphes mortes. (ii) La deuxième explication propose que des remaniements de la chromatine soient nécessaires pour le passage d'un état stationnaire à un mycélium en croissance. Un phénomène analogue a été décrit dans certains cancers pour lesquels l'activité de SUV39H2, la protéine homologue de PaKmt1 chez les mammifères, interviendrait dans la prolifération des cellules métastatiques (Devin et al. 2015; Shuai et al. 2018).

Par ailleurs, nous avons pu observer que l'ARN pré-messager de PaKmt1 est sujet à un événement d'épissage alternatif, un mécanisme jamais encore mis en évidence chez *P. anserina*. Plus précisément, l'excision ou non de l'unique intron en 5' de l'ARN pré-messager aboutit soit à une forme épissée fonctionnelle soit à une forme non-épissée. L'intron non épissé provoque un décalage de la phase de lecture qui fait apparaître un codon stop prématuré. Si ce messager est stable et traduit, la protéine tronquée est vraisemblablement non fonctionnelle puisque dépourvue de son domaine SET. De plus, cet épissage est régulé au cours de la croissance du champignon. En effet, la forme fonctionnelle est majoritaire voire exclusive dans le mycélium jeune, puis la forme non épissée apparaît en quantité équivalente en phase stationnaire pour devenir à son tour majoritaire en fin de reproduction sexuée. Ce résultat fait écho avec ce que nous avons vu précédemment concernant un rôle potentiellement accru de PaKmt1 dans les cellules en prolifération. Par ailleurs, la réduction/perde de la marque H3K9me3 via ce type de système pourrait être nécessaire pour déréprimer une partie du génome pendant certains stades du développement sexué. Une régulation similaire a été observée chez *A. thaliana* pour laquelle la présence de l'intron en 5' du messager de *SUVH3* (qui code la protéine homologue de PaKmt1) est requise pour une expression différentielle de la protéine selon le tissu (Casas-Mollano, Lao, et Kavanagh 2006). Il existe cependant de nombreuses protéines homologues de SU(VAR)3-9 chez *A. thaliana* dont l'orchestration requière un système de régulation plus complexe. Néanmoins il n'est pas à exclure qu'une telle régulation ait été conservée chez d'autres champignons filamenteux, tel que *N. crassa* qui conserve également un intron en 5' de *NcKmt1*. La seconde hypothèse voudrait que l'épissage alternatif ne soit pas spécifique d'une fonction particulière. Pour aller plus loin, il serait envisageable de cloner l'allèle *PaKmt1* dépourvu de son intron sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire dans la souche mutante correspondante, ceci afin de déterminer l'impact de l'absence de la forme non épissée sur le cycle de vie du champignon.

Les phénotypes similaires des deux simples mutants  $\Delta PaKmt1$  et  $\Delta PaHpl$  suggèrent que les deux protéines interviennent dans une même voie de régulation. De plus, nous avons montré que la localisation de PaHP1 dans les foyers d'hétérochromatine constitutive dépend de la présence de PaKmt1, ce dernier assurant l'intégralité des modifications H3K9me3. Ces éléments suggèrent que ces deux protéines suivent le même modèle de régulation que chez *N. crassa*, avec l'intervention initiale de PaKmt1 sur les séquences cibles du RIP afin de catalyser la marque H3K9me3 reconnue par PaHP1 via son chromodomaine.

## **PaKmt6 intervient dans la plupart des étapes de développement**

Contrairement à PaKmt1 et PaHP1, l'inactivation de PaKmt6 et la perte consécutive de la marque H3K27me3 entraîne des anomalies de développement majeures au cours de plusieurs étapes du cycle de vie du champignon (Discussion – Fig. 1B). Parmi elles, l'altération de la germination est totalement inédite. En effet, si jusqu'ici les mutants de germinations précédemment décrits montrent une perte totale de cette capacité et donc un blocage du cycle de vie (Lambou et al. 2008b), le mutant *PaKmt6* est partiellement altéré sans que l'on sache pourquoi. En outre, dans le double mutant  $\Delta PaKmt6 \Delta PaKmt1$ , une partie des ascospores produites apparaît dépigmenté. Ces signes montrent que le développement des ascospores ainsi que leur capacité à générer des hyphes germinatifs pourrait impliquer une régulation chromatinienne comme c'est le cas chez les plantes (Xiao et Wagner 2015). La croissance végétative irrégulière en « choux fleurs » observée dans ce mutant est une caractéristique présente dans le mutant de *F. fujikuroi* (Studt, Rösler, et al. 2016) et dans les mutants *Hpl* et *Kmt1* de *N. crassa* dans lesquels H3K27me3 est délocalisée (Jamieson et al. 2016a). Ce défaut de croissance du mycélium explique sans doute les anomalies de développement des périthèces dont l'enveloppe et les tissus de soutien sont d'origine maternelle. En revanche, la surproduction de spermaties observée chez *P. anserina* dénote avec la réduction du nombre de conidies asexuelles fréquemment associée à ce mutant chez les autres ascomycètes. Il apparaît ainsi que cette étape clef du cycle de vie des champignons implique une régulation transcriptionnelle faisant appel à la mise en place de l'hétérochromatine.







## V Bibliographie

Adam, M., F. Robert, M. Larochelle, et L. Gaudreau. 2001. « H2A.Z Is Required for Global Chromatin Integrity and for Recruitment of RNA Polymerase II under Specific Conditions ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (18): 6270-79.

Ait Benkhali, Jinane, Evelyne Coppin, Sylvain Brun, Leonardo Peraza-Reyes, Tom Martin, Christina Dixelius, Nouredine Lazar, Herman van Tilbeurgh, et Robert Debuchy. 2013. « A Network of HMG-Box Transcription Factors Regulates Sexual Cycle in the Fungus *Podospira Anserina* ». *PLoS Genetics* 9 (7): e1003642. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003642>.

Albig, W., et D. Doenecke. 1997. « The Human Histone Gene Cluster at the D6S105 Locus ». *Human Genetics* 101 (3): 284-94.

Allan, J., P. G. Hartman, C. Crane-Robinson, et F. X. Aviles. 1980. « The Structure of Histone H1 and Its Location in Chromatin ». *Nature* 288 (5792): 675-79.

Allfrey, V. G., R. Faulkner, et A. E. Mirsky. 1964. « ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 51 (mai): 786-94.

Allfrey, V. G., V. C. Littau, et A. E. Mirsky. 1963. « ON THE ROLE OF HISTONES IN REGULATING RIBONUCLEIC ACID SYNTHESIS IN THE CELL NUCLEUS\* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 49 (3): 414-21.

Allis, C. D., C. V. Glover, J. K. Bowen, et M. A. Gorovsky. 1980. « Histone Variants Specific to the Transcriptionally Active, Amitotically Dividing Macronucleus of the Unicellular Eucaryote, *Tetrahymena Thermophila* ». *Cell* 20 (3): 609-17.

Allshire, R. C., E. R. Nimmo, K. Ekwall, J. P. Javerzat, et G. Cranston. 1995. « Mutations Derepressing Silent Centromeric Domains in Fission Yeast Disrupt Chromosome Segregation ». *Genes & Development* 9 (2): 218-33.

Allshire, Robin C., et Karl Ekwall. 2015. « Epigenetic Regulation of Chromatin States in *Schizosaccharomyces Pombe* ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (7): a018770. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018770>.

Altschul, S F, W Gish, W Miller, E W Myers, et D J Lipman. 1990. « Basic local alignment search tool ». *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403-10. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1990.9999>.

Ammar, Ron, Dax Torti, Kyle Tsui, Marinella Gebbia, Tanja Durbic, Gary D. Bader, Guri Giaever, et Corey Nislow. 2012. « Chromatin Is an Ancient Innovation Conserved between Archaea and Eukarya ». *ELife* 1 (décembre): e00078. <https://doi.org/10.7554/eLife.00078>.

- Amselem, Joëlle, Marc-Henri Lebrun, et Hadi Quesneville. 2015. « Whole Genome Comparative Analysis of Transposable Elements Provides New Insight into Mechanisms of Their Inactivation in Fungal Genomes ». *BMC Genomics* 16 (1): 141. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1347-1>.
- Arkhipova, Irina, et Matthew Meselson. 2005. « Deleterious Transposable Elements and the Extinction of Asexuals ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 27 (1): 76-85. <https://doi.org/10.1002/bies.20159>.
- Arnaise, S., D. Zickler, S. Le Bilot, C. Poisier, et R. Debuchy. 2001. « Mutations in Mating-Type Genes of the Heterothallic Fungus *Podospora Anserina* Lead to Self-Fertility ». *Genetics* 159 (2): 545-56.
- Arnaudo, Anna M, et Benjamin A Garcia. 2013. « Proteomic characterization of novel histone post-translational modifications ». *Epigenetics & Chromatin* 6 (août): 24. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-6-24>.
- Attikum, Haico van, Olivier Fritsch, et Susan M. Gasser. 2007. « Distinct Roles for SWR1 and INO80 Chromatin Remodeling Complexes at Chromosomal Double-Strand Breaks ». *The EMBO Journal* 26 (18): 4113-25. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601835>.
- Ausubel, FM, R Brent, RE Kingston, DD Moore, JG Seidman, JA Smith, et K Struhl. 1987. *Current protocols in molecular biology*. Wiley Interscience. New York.
- Bannister, A. J., P. Zegerman, J. F. Partridge, E. A. Miska, J. O. Thomas, R. C. Allshire, et T. Kouzarides. 2001. « Selective Recognition of Methylated Lysine 9 on Histone H3 by the HP1 Chromo Domain ». *Nature* 410 (6824): 120-24. <https://doi.org/10.1038/35065138>.
- Bannister, Andrew J., Robert Schneider, et Tony Kouzarides. 2002. « Histone Methylation: Dynamic or Static? » *Cell* 109 (7): 801-6.
- Bantignies, Frédéric, et Giacomo Cavalli. 2011. « Polycomb Group Proteins: Repression in 3D ». *Trends in Genetics: TIG* 27 (11): 454-64. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.06.008>.
- Barra, J. L., L. Rhounim, J. L. Rossignol, et G. Faugeron. 2000. « Histone H1 Is Dispensable for Methylation-Associated Gene Silencing in *Ascobolus Immersus* and Essential for Long Life Span ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (1): 61-69.
- Bartee, L, F Malagnac, et J Bender. 2001. « Arabidopsis *cmt3* chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene ». *Genes & Development* 15 (14): 1753-58. <https://doi.org/10.1101/gad.905701>.
- Basenko, Evelina Y., Takahiko Sasaki, Lexiang Ji, Cameron J. Prybol, Rachel M. Burckhardt, Robert J. Schmitz, et Zachary A. Lewis. 2015. « Genome-Wide Redistribution of H3K27me3 Is Linked to Genotoxic Stress and Defective Growth ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (46): E6339-6348. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511377112>.

- Baumbusch, L. O., T. Thorstensen, V. Krauss, A. Fischer, K. Naumann, R. Assalkhou, I. Schulz, G. Reuter, et R. B. Aalen. 2001. « The Arabidopsis Thaliana Genome Contains at Least 29 Active Genes Encoding SET Domain Proteins That Can Be Assigned to Four Evolutionarily Conserved Classes ». *Nucleic Acids Research* 29 (21): 4319-33.
- Becks, Lutz, et Aneil F. Agrawal. 2012. « The Evolution of Sex Is Favoured during Adaptation to New Environments ». *PLoS Biology* 10 (5): e1001317. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001317>.
- Benjamini, Y, et Y Hochberg. 1995. « Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing ». *J. R. Stat. Soc. Ser. B Stat. Methodol* 57: 289-300.
- Berdichevsky, Ala, Mohan Viswanathan, H. Robert Horvitz, et Leonard Guarente. 2006. « C. Elegans SIR-2.1 Interacts with 14-3-3 Proteins to Activate DAF-16 and Extend Life Span ». *Cell* 125 (6): 1165-77. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.036>.
- Bernard, P., J. F. Maure, J. F. Partridge, S. Genier, J. P. Javerzat, et R. C. Allshire. 2001. « Requirement of Heterochromatin for Cohesion at Centromeres ». *Science (New York, N.Y.)* 294 (5551): 2539-42. <https://doi.org/10.1126/science.1064027>.
- Berteaux-Lecellier, V., M. Picard, C. Thompson-Coffe, D. Zickler, A. Panvier-Adoutte, et J. M. Simonet. 1995. « A Nonmammalian Homolog of the PAF1 Gene (Zellweger Syndrome) Discovered as a Gene Involved in Caryogamy in the Fungus Podospora Anserina ». *Cell* 81 (7): 1043-51.
- Berteaux-Lecellier, V., D. Zickler, R. Debuchy, A. Panvier-Adoutte, C. Thompson-Coffe, et M. Picard. 1998. « A Homologue of the Yeast SHE4 Gene Is Essential for the Transition between the Syncytial and Cellular Stages during Sexual Reproduction of the Fungus Podospora Anserina ». *The EMBO Journal* 17 (5): 1248-58. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.5.1248>.
- Bestor, T H. 1988. « Cloning of a mammalian DNA methyltransferase ». *Gene* 74 (1): 9-12.
- Bestor, T. H., et G. L. Verdine. 1994. « DNA Methyltransferases ». *Current Opinion in Cell Biology* 6 (3): 380-89.
- Bhaumik, Sukesh R., Edwin Smith, et Ali Shilatifard. 2007. « Covalent Modifications of Histones during Development and Disease Pathogenesis ». *Nature Structural & Molecular Biology* 14 (11): 1008-16. <https://doi.org/10.1038/nsmb1337>.
- Bidard, F, S Imbeaud, N Reymond, O Lespinet, P Silar, C Clave, H Delacroix, V Berteaux-Lecellier, et R Debuchy. 2010. « A general framework for optimization of probes for gene expression microarray and its application to the fungus Podospora anserina » 3 (1): 171.
- Bidard, Frédérique, Jinane Aït Benkhali, Evelyne Coppin, Sandrine Imbeaud, Pierre Grognet, Hervé Delacroix, et Robert Debuchy. 2011. « Genome-wide gene expression profiling of fertilization competent mycelium in opposite mating types in the heterothallic fungus Podospora anserina ». *PloS One* 6 (6): e21476. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021476>.

- Bidard, Frédérique, Corinne Clavé, et Sven J. Saupe. 2013. « The Transcriptional Response to Nonsself in the Fungus *Podospora Anserina* ». *G3 (Bethesda, Md.)* 3 (6): 1015-30. <https://doi.org/10.1534/g3.113.006262>.
- Bilodeau, Steve, Michael H. Kagey, Garrett M. Frampton, Peter B. Rahl, et Richard A. Young. 2009. « SetDB1 Contributes to Repression of Genes Encoding Developmental Regulators and Maintenance of ES Cell State ». *Genes & Development* 23 (21): 2484-89. <https://doi.org/10.1101/gad.1837309>.
- Birke, Marco, Silke Schreiner, María-Paz García-Cuéllar, Kerstin Mahr, Fritz Titgemeyer, et Robert K. Slany. 2002. « The MT Domain of the Proto-Oncoprotein MLL Binds to CpG-Containing DNA and Discriminates against Methylation ». *Nucleic Acids Research* 30 (4): 958-65.
- Birve, A., A. K. Sengupta, D. Beuchle, J. Larsson, J. A. Kennison, null Rasmuson-Lestander A, et J. Müller. 2001. « Su(z)12, a Novel *Drosophila* Polycomb Group Gene That Is Conserved in Vertebrates and Plants ». *Development (Cambridge, England)* 128 (17): 3371-79.
- Boivin, Antoine, Sébastien Gaumer, et Annie Sainsard-Chanet. 2008. « Life Span Extension by Dietary Restriction Is Reduced but Not Abolished by Loss of Both SIR2 and HST2 in *Podospora Anserina* ». *Mechanisms of Ageing and Development* 129 (12): 714-21. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.09.011>.
- Bok, Jin Woo, Yi-Ming Chiang, Edyta Szewczyk, Yazmid Reyes-Dominguez, Ashley D. Davidson, James F. Sanchez, Hsien-Chun Lo, et al. 2009. « Chromatin-Level Regulation of Biosynthetic Gene Clusters ». *Nature Chemical Biology* 5 (7): 462-64. <https://doi.org/10.1038/nchembio.177>.
- Bouhouche, Khaled, Jean-François Gout, Aurélie Kapusta, Mireille Bétermier, et Eric Meyer. 2011. « Functional Specialization of Piwi Proteins in *Paramecium Tetraurelia* from Post-Transcriptional Gene Silencing to Genome Remodelling ». *Nucleic Acids Research* 39 (10): 4249-64. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1283>.
- Bouhouche, Khaled, Denise Zickler, Robert Debuchy, et Sylvie Arnaise. 2004. « Altering a gene involved in nuclear distribution increases the repeat-induced point mutation process in the fungus *Podospora anserina*. » *Genetics* 167 (1): 151-59.
- Brinkman, Arie B, Thijs Roelofsen, Sebastiaan W C Pennings, Joost H A Martens, Thomas Jenuwein, et Hendrik G Stunnenberg. 2006. « Histone modification patterns associated with the human X chromosome ». *EMBO Reports* 7 (6): 628-34. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400686>.
- Brownell, J. E., et C. D. Allis. 1996. « Special HATs for Special Occasions: Linking Histone Acetylation to Chromatin Assembly and Gene Activation ». *Current Opinion in Genetics & Development* 6 (2): 176-84.

- Bruggeman, Judith, Alfons J. M. Debets, Pieter J. Wijngaarden, J. Arjan G. M. deVisser, et Rolf F. Hoekstra. 2003. « Sex Slows down the Accumulation of Deleterious Mutations in the Homothallic Fungus *Aspergillus Nidulans* ». *Genetics* 164 (2): 479-85.
- Brygoo, Y, et R Debuchy. 1985. « Transformation by integration in *Podospora anserina*. I. Methodology and phenomenology. » 200: 128-31.
- Bu, Ping, Yvonne A. Evrard, Guillermina Lozano, et Sharon Y. R. Dent. 2007. « Loss of Gcn5 Acetyltransferase Activity Leads to Neural Tube Closure Defects and Exencephaly in Mouse Embryos ». *Molecular and Cellular Biology* 27 (9): 3405-16. <https://doi.org/10.1128/MCB.00066-07>.
- Burgess, Sean M., Masahiro Ajimura, et Nancy Kleckner. 1999. « GCN5-dependent histone H3 acetylation and RPD3-dependent histone H4 deacetylation have distinct, opposing effects on IME2 transcription, during meiosis and during vegetative growth, in budding yeast ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (12): 6835-40.
- Burnett, Camilla, Sara Valentini, Filipe Cabreiro, Martin Goss, Milán Somogyvári, Matthew D. Piper, Matthew Hoddinott, et al. 2011. « Absence of effects of Sir2 over-expression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila* ». *Nature* 477 (7365): 482-85. <https://doi.org/10.1038/nature10296>.
- Buschbeck, Marcus, Iris Uribealago, Indra Wibowo, Pau Rué, David Martin, Arantxa Gutierrez, Lluís Morey, Roderic Guigó, Hernán López-Schier, et Luciano Di Croce. 2009. « The Histone Variant MacroH2A Is an Epigenetic Regulator of Key Developmental Genes ». *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (10): 1074-79. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1665>.
- Cambareri, E. B., M. J. Singer, et E. U. Selker. 1991. « Recurrence of Repeat-Induced Point Mutation (RIP) in *Neurospora Crassa* ». *Genetics* 127 (4): 699-710.
- Canzio, Daniele, Evelyn Y. Chang, Smita Shankar, Kristopher M. Kuchenbecker, Matthew D. Simon, Hiten D. Madhani, Geeta J. Narlikar, et Bassem Al-Sady. 2011. « Chromodomain-Mediated Oligomerization of HP1 Suggests a Nucleosome-Bridging Mechanism for Heterochromatin Assembly ». *Molecular Cell* 41 (1): 67-81. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.016>.
- Cao, X., N. M. Springer, M. G. Muszynski, R. L. Phillips, S. Kaeppler, et S. E. Jacobsen. 2000. « Conserved Plant Genes with Similarity to Mammalian de Novo DNA Methyltransferases ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (9): 4979-84.
- Carrozza, Michael J., Bing Li, Laurence Florens, Tamaki Suganuma, Selene K. Swanson, Kenneth K. Lee, Wei-Jong Shia, et al. 2005. « Histone H3 Methylation by Set2 Directs Deacetylation of Coding Regions by Rpd3S to Suppress Spurious Intragenic Transcription ». *Cell* 123 (4): 581-92. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.023>.

- Carver, Tim, Nick Thomson, Alan Bleasby, Matthew Berriman, et Julian Parkhill. 2009. « DNAPlotter: Circular and Linear Interactive Genome Visualization ». *Bioinformatics (Oxford, England)* 25 (1): 119-20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn578>.
- Casas-Mollano, Juan A., Nga T. Lao, et Tony A. Kavanagh. 2006. « Intron-Regulated Expression of SUVH3, an Arabidopsis Su(Var)3-9 Homologue ». *Journal of Experimental Botany* 57 (12): 3301-11. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl093>.
- Celic, Ivana, Hiroshi Masumoto, Wendell P. Griffith, Pamela Meluh, Robert J. Cotter, Jef D. Boeke, et Alain Verreault. 2006. « The Sirtuins Hst3 and Hst4p Preserve Genome Integrity by Controlling Histone H3 Lysine 56 Deacetylation ». *Current Biology: CB* 16 (13): 1280-89. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.06.023>.
- Chamberlain, Stormy J., Della Yee, et Terry Magnuson. 2008. « Polycomb Repressive Complex 2 Is Dispensable for Maintenance of Embryonic Stem Cell Pluripotency ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26 (6): 1496-1505. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0102>.
- Chanvivattana, Yindee, Anthony Bishopp, Daniel Schubert, Christine Stock, Yong-Hwan Moon, Z. Renee Sung, et Justin Goodrich. 2004. « Interaction of Polycomb-Group Proteins Controlling Flowering in Arabidopsis ». *Development (Cambridge, England)* 131 (21): 5263-76. <https://doi.org/10.1242/dev.01400>.
- Charron, Jean-Benoit F., Hang He, Axel A. Elling, et Xing Wang Deng. 2009. « Dynamic Landscapes of Four Histone Modifications during Deetiolation in Arabidopsis ». *The Plant Cell* 21 (12): 3732-48. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.066845>.
- Chen, Chin-Chuan, Joshua J. Carson, Jason Feser, Beth Tamburini, Susan Zabarone, Jeffrey Linger, et Jessica K. Tyler. 2008. « Acetylated lysine 56 on histone H3 drives chromatin assembly after repair, signaling for the completion of repair ». *Cell* 134 (2): 231-43. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.035>.
- Chicas, Agustin, Emma C. Forrest, Silvia Sepich, Carlo Cogoni, et Giuseppe Macino. 2005. « Small Interfering RNAs That Trigger Posttranscriptional Gene Silencing Are Not Required for the Histone H3 Lys9 Methylation Necessary for Transgenic Tandem Repeat Stabilization in *Neurospora Crassa* ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (9): 3793-3801. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.9.3793-3801.2005>.
- Chujo, Tetsuya, et Barry Scott. 2014. « Histone H3K9 and H3K27 Methylation Regulates Fungal Alkaloid Biosynthesis in a Fungal Endophyte–Plant Symbiosis ». *Molecular Microbiology* 92 (2): 413-34. <https://doi.org/10.1111/mmi.12567>.
- Clapier, Cedric R., et Bradley R. Cairns. 2009. « The Biology of Chromatin Remodeling Complexes ». *Annual Review of Biochemistry* 78: 273-304. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223>.

- Clutterbuck, A. John. 2004. « MATE Transposable Elements in *Aspergillus Nidulans*: Evidence of Repeat-Induced Point Mutation ». *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 41 (3): 308-16. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2003.11.004>.
- Clutterbuck, A John. 2011. « Genomic evidence of repeat-induced point mutation (RIP) in filamentous ascomycetes ». *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 48 (3): 306-26. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.09.002>.
- Coleman, Jeffrey J., Steve D. Rounsley, Marianela Rodriguez-Carres, Alan Kuo, Catherine C. Wasmann, Jane Grimwood, Jeremy Schmutz, et al. 2009. « The Genome of *Nectria Haematococca*: Contribution of Supernumerary Chromosomes to Gene Expansion ». *PLoS Genetics* 5 (8): e1000618. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000618>.
- Collins, Galen Andrew, et Alfred L. Goldberg. 2017. « The Logic of the 26S Proteasome ». *Cell* 169 (5): 792-806. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.023>.
- Connolly, Lanelle R., Kristina M. Smith, et Michael Freitag. 2013. « The *Fusarium Graminearum* Histone H3 K27 Methyltransferase KMT6 Regulates Development and Expression of Secondary Metabolite Gene Clusters ». *PLoS Genetics* 9 (10): e1003916. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003916>.
- Conway, Eric, Evan Healy, et Adrian P. Bracken. 2015. « PRC2 Mediated H3K27 Methylations in Cellular Identity and Cancer ». *Current Opinion in Cell Biology* 37 (décembre): 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.10.003>.
- Coppin, E., S. Arnaise, V. Contamine, et M. Picard. 1993. « Deletion of the Mating-Type Sequences in *Podospora Anserina* Abolishes Mating without Affecting Vegetative Functions and Sexual Differentiation ». *Molecular & General Genetics: MGG* 241 (3-4): 409-14.
- Coppin, Evelyne, Sylvie Arnaise, Véronique Contamine, et Marguerite Picard. 1993. « Deletion of the Mating-Type Sequences in *Podospora Anserina* Abolishes Mating without Affecting Vegetative Functions and Sexual Differentiation ». *Molecular and General Genetics MGG* 241 (3): 409-14. <https://doi.org/10.1007/BF00284694>.
- Coppin, Evelyne, et Philippe Silar. 2007. « Identification of PaPKS1, a Polyketide Synthase Involved in Melanin Formation and Its Use as a Genetic Tool in *Podospora Anserina* ». *Mycological Research* 111 (Pt 8): 901-8. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.05.011>.
- Costanzi, Carl, et John R. Pehrson. 1998. « Histone MacroH2A1 Is Concentrated in the Inactive X Chromosome of Female Mammals ». *Nature* 393 (6685): 599-601. <https://doi.org/10.1038/31275>.
- Daujat, Sylvain, Ulrike Zeissler, Tanja Waldmann, Nicole Happel, et Robert Schneider. 2005. « HP1 Binds Specifically to Lys26-Methylated Histone H1.4, Whereas Simultaneous Ser27 Phosphorylation Blocks HP1 Binding ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (45): 38090-95. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500229200>.



- Deleris, Angelique, Hume Stroud, Yana Bernatavichute, Elizabeth Johnson, Gregor Klein, Daniel Schubert, et Steven E. Jacobsen. 2012. « Loss of the DNA Methyltransferase MET1 Induces H3K9 Hypermethylation at PcG Target Genes and Redistribution of H3K27 Trimethylation to Transposons in *Arabidopsis Thaliana* ». *PLoS Genetics* 8 (11): e1003062. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003062>.
- Devin, Julie, Elena Viziteu, Laurie Herviou, Anja Seckinger, Grandmougin Camille, Hartmut Goldschmidt, Laure Vincent, et al. 2015. « Inhibition of SUV39H Methyltransferase As a Potent Therapeutic Target in Multiple Myeloma ». *Blood* 126 (23): 1771-1771.
- Dhalluin, C., J. E. Carlson, L. Zeng, C. He, A. K. Aggarwal, et M. M. Zhou. 1999. « Structure and Ligand of a Histone Acetyltransferase Bromodomain ». *Nature* 399 (6735): 491-96. <https://doi.org/10.1038/20974>.
- Djupedal, Ingela, et Karl Ekwall. 2009. « Epigenetics: Heterochromatin Meets RNAi ». *Cell Research* 19 (3): 282-95. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.13>.
- Dodge, Jonathan E., Yong-Kook Kang, Hideyuki Beppu, Hong Lei, et En Li. 2004. « Histone H3-K9 Methyltransferase ESET Is Essential for Early Development ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (6): 2478-86. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.6.2478-2486.2004>.
- Doyen, Cécile-Marie, Woojin An, Dimitar Angelov, Vladimir Bondarenko, Flore Mietton, Vassily M. Studitsky, Ali Hamiche, Robert G. Roeder, Philippe Bouvet, et Stefan Dimitrov. 2006. « Mechanism of Polymerase II Transcription Repression by the Histone Variant MacroH2A ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (3): 1156-64. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.3.1156-1164.2006>.
- Drané, Pascal, Khalid Ouararhni, Arnaud Depaux, Muhammad Shuaib, et Ali Hamiche. 2010. « The Death-Associated Protein DAXX Is a Novel Histone Chaperone Involved in the Replication-Independent Deposition of H3.3 ». *Genes & Development* 24 (12): 1253-65. <https://doi.org/10.1101/gad.566910>.
- Drew, H. R., et A. A. Travers. 1985. « DNA Bending and Its Relation to Nucleosome Positioning ». *Journal of Molecular Biology* 186 (4): 773-90.
- Dumesic, Phillip A., Christina M. Homer, James J. Moresco, Lindsey R. Pack, Erin K. Shanle, Scott M. Coyle, Brian D. Strahl, Danica G. Fujimori, John R. Yates, et Hiten D. Madhani. 2015. « Product Binding Enforces the Genomic Specificity of a Yeast Polycomb Repressive Complex ». *Cell* 160 (1-2): 204-18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.039>.
- Dumesic, Phillip A., Prashanthi Natarajan, Changbin Chen, Ines A. Drinnenberg, Benjamin J. Schiller, James Thompson, James J. Moresco, John R. Yates, David P. Bartel, et Hiten D. Madhani. 2013. « Stalled Spliceosomes Are a Signal for RNAi-Mediated Genome Defense ». *Cell* 152 (5): 957-68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.046>.

- Dutnall, Robert N., Stefan T. Tafrov, Rolf Sternglanz, et V. Ramakrishnan. 1998. « Structure of the Histone Acetyltransferase Hat1: A Paradigm for the GCN5-Related N-Acetyltransferase Superfamily ». *Cell* 94 (4): 427-38. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81584-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81584-6).
- Dyer, Paul S., P Inderbitzin, et R Debuchy. 2016. « Mating-Type Structure, Function, Regulation and Evolution in the Pezizomycotina ». In *Growth, Differentiation and Sexuality*, Third, 351-85. Mycota. Springer International Publishing.
- Ebbs, Michelle L., et Judith Bender. 2006. « Locus-Specific Control of DNA Methylation by the Arabidopsis SUVH5 Histone Methyltransferase ». *The Plant Cell* 18 (5): 1166-76. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.041400>.
- Eissenberg, J. C., G. D. Morris, G. Reuter, et T. Hartnett. 1992. « The Heterochromatin-Associated Protein HP-1 Is an Essential Protein in Drosophila with Dosage-Dependent Effects on Position-Effect Variegation. » *Genetics* 131 (2): 345-52.
- Eissenberg, Joel C., et Ali Shilatifard. 2010. « Histone H3 Lysine 4 (H3K4) Methylation in Development and Differentiation ». *Developmental biology* 339 (2): 240-49. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.08.017>.
- Ekwall, K., E. R. Nimmo, J. P. Javerzat, B. Borgstrøm, R. Egel, G. Cranston, et R. Allshire. 1996. « Mutations in the Fission Yeast Silencing Factors Clr4+ and Rik1+ Disrupt the Localisation of the Chromo Domain Protein Swi6p and Impair Centromere Function ». *Journal of Cell Science* 109 ( Pt 11) (novembre): 2637-48.
- Espagne, Eric, Olivier Lespinet, Fabienne Malagnac, Corinne Da Silva, Olivier Jaillon, Betina M. Porcel, Arnaud Couloux, et al. 2008a. « The Genome Sequence of the Model Ascomycete Fungus Podospora Anserina ». *Genome Biology* 9 (5): R77. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-5-r77>.
- Espagne, Eric, Olivier Lespinet, Fabienne Malagnac, Corinne Da Silva, Olivier Jaillon, Betina M Porcel, Arnaud Couloux, et al. 2008b. « The genome sequence of the model ascomycete fungus Podospora anserina ». *Genome Biology* 9 (5): R77. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-5-r77>.
- Espagne, Eric, Christelle Vasnier, Aurora Storlazzi, Nancy E. Kleckner, Philippe Silar, Denise Zickler, et Fabienne Malagnac. 2011. « Sme4 Coiled-Coil Protein Mediates Synaptonemal Complex Assembly, Recombinosome Relocalization, and Spindle Pole Body Morphogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (26): 10614-19. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107272108>.
- Faast, R., V. Thonglairoam, T. C. Schulz, J. Beall, J. R. Wells, H. Taylor, K. Matthaei, P. D. Rathjen, D. J. Tremethick, et I. Lyons. 2001. « Histone Variant H2A.Z Is Required for Early Mammalian Development ». *Current Biology: CB* 11 (15): 1183-87.
- Fan, Yuhong, Tatiana Nikitina, Elizabeth M. Morin-Kensicki, Jie Zhao, Terry R. Magnuson, Christopher L. Woodcock, et Arthur I. Skoultchi. 2003. « H1 Linker Histones Are Essential for

Mouse Development and Affect Nucleosome Spacing in Vivo ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (13): 4559-72.

Fan, Yuhong, Tatiana Nikitina, Jie Zhao, Tomara J. Fleury, Riddhi Bhattacharyya, Eric E. Bouhassira, Arnold Stein, Christopher L. Woodcock, et Arthur I. Skoultchi. 2005. « Histone H1 Depletion in Mammals Alters Global Chromatin Structure but Causes Specific Changes in Gene Regulation ». *Cell* 123 (7): 1199-1212. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.028>.

Ferrari, Karin J., Andrea Scelfo, Sriganesh Jammula, Alessandro Cuomo, Iros Barozzi, Alexandra Stützer, Wolfgang Fischle, Tiziana Bonaldi, et Diego Pasini. 2014. « Polycomb-Dependent H3K27me1 and H3K27me2 Regulate Active Transcription and Enhancer Fidelity ». *Molecular Cell* 53 (1): 49-62. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.030>.

Finnegan, E J, et E S Dennis. 1993. « Isolation and identification by sequence homology of a putative cytosine methyltransferase from *Arabidopsis thaliana* ». *Nucleic Acids Research* 21 (10): 2383-88.

Finnegan, E J, W J Peacock, et E S Dennis. 1996. « Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (16): 8449-54.

Foss, H. M., C. J. Roberts, K. M. Claeys, et E. U. Selker. 1993. « Abnormal Chromosome Behavior in *Neurospora* Mutants Defective in DNA Methylation ». *Science (New York, N.Y.)* 262 (5140): 1737-41.

Freitag, Michael. 2017. « Histone Methylation by SET Domain Proteins in Fungi ». *Annual Review of Microbiology* 71 (septembre): 413-39. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095757>.

Freitag, Michael, Patrick C. Hickey, Tamir K. Khlafallah, Nick D. Read, et Eric U. Selker. 2004. « HP1 Is Essential for DNA Methylation in *Neurospora* ». *Molecular Cell* 13 (3): 427-34.

Freitag, Michael, Dong W. Lee, Gregory O. Kothe, Robert J. Pratt, Rodolfo Aramayo, et Eric U. Selker. 2004. « DNA Methylation Is Independent of RNA Interference in *Neurospora* ». *Science* 304 (5679): 1939-1939. <https://doi.org/10.1126/science.1099709>.

Freitag, Michael, Rebecca L. Williams, Gregory O. Kothe, et Eric U. Selker. 2002a. « A Cytosine Methyltransferase Homologue Is Essential for Repeat-Induced Point Mutation in *Neurospora crassa* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (13): 8802-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.132212899>.

Freitag, Michael, Rebecca L Williams, Gregory O Kothe, et Eric U Selker. 2002b. « A cytosine methyltransferase homologue is essential for repeat-induced point mutation in *Neurospora crassa* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (13): 8802-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.132212899>.

- Frye, Roy A. 2000. « Phylogenetic Classification of Prokaryotic and Eukaryotic Sir2-like Proteins ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 273 (2): 793-98. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3000>.
- Ganley, Austen R.D., Satoru Ide, Kimiko Saka, et Takehiko Kobayashi. 2009. « The Effect of Replication Initiation on Gene Amplification in the RDNA and Its Relationship to Aging ». *Molecular Cell* 35 (5): 683-93. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.07.012>.
- García-Cao, Marta, Roderick O'Sullivan, Antoine H. F. M. Peters, Thomas Jenuwein, et María A. Blasco. 2004. « Epigenetic Regulation of Telomere Length in Mammalian Cells by the Suv39h1 and Suv39h2 Histone Methyltransferases ». *Nature Genetics* 36 (1): 94-99. <https://doi.org/10.1038/ng1278>.
- Gaudin, Valérie, Marc Libault, Sylvie Pouteau, Trine Juul, Gengchun Zhao, Delphine Lefebvre, et Olivier Grandjean. 2001. « Mutations in LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 Affect Flowering Time and Plant Architecture in Arabidopsis ». *Development* 128 (23): 4847-58.
- Gladyshev, Eugene. 2017. « Repeat-Induced Point Mutation and Other Genome Defense Mechanisms in Fungi ». *Microbiology Spectrum* 5 (4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0042-2017>.
- Gladyshev, Eugene, et Nancy Kleckner. 2014. « Direct Recognition of Homology between Double Helices of DNA in Neurospora Crassa ». *Nature Communications* 5 (avril): 3509. <https://doi.org/10.1038/ncomms4509>.
- Gladyshev, Eugene, et Nancy Kleckner. 2017. « DNA Sequence Homology Induces Cytosine-to-Thymine Mutation by a Heterochromatin-Related Pathway in Neurospora ». *Nature Genetics* 49 (6): 887-94. <https://doi.org/10.1038/ng.3857>.
- Goddard, Matthew R., H. Charles J. Godfray, et Austin Burt. 2005. « Sex Increases the Efficacy of Natural Selection in Experimental Yeast Populations ». *Nature* 434 (7033): 636-40. <https://doi.org/10.1038/nature03405>.
- Goll, Mary Grace, et Timothy H Bestor. 2005. « Eukaryotic cytosine methyltransferases ». *Annual Review of Biochemistry* 74: 481-514. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721>.
- Goll, Mary Grace, Finn Kirpekar, Keith A. Maggert, Jeffrey A. Yoder, Chih-Lin Hsieh, Xiaoyu Zhang, Kent G. Golic, Steven E. Jacobsen, et Timothy H. Bestor. 2006. « Methylation of TRNA<sup>Asp</sup> by the DNA Methyltransferase Homolog Dnmt2 ». *Science (New York, N.Y.)* 311 (5759): 395-98. <https://doi.org/10.1126/science.1120976>.
- Goodrich, J., P. Puangsomlee, M. Martin, D. Long, E. M. Meyerowitz, et G. Coupland. 1997. « A Polycomb-Group Gene Regulates Homeotic Gene Expression in Arabidopsis ». *Nature* 386 (6620): 44-51. <https://doi.org/10.1038/386044a0>.
- Gottlieb, S., et R. E. Esposito. 1989. « A New Role for a Yeast Transcriptional Silencer Gene, SIR2, in Regulation of Recombination in Ribosomal DNA ». *Cell* 56 (5): 771-76.

- Goutte-Gattat, Damien, Muhammad Shuaib, Khalid Ouararhni, Thierry Gautier, Dimitrios A. Skoufias, Ali Hamiche, et Stefan Dimitrov. 2013. « Phosphorylation of the CENP-A Amino-Terminus in Mitotic Centromeric Chromatin Is Required for Kinetochore Function ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (21): 8579-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302955110>.
- Goyon, C, C Barry, A Grégoire, G Faugeron, et J L Rossignol. 1996. « Methylation of DNA repeats of decreasing sizes in *Ascobolus immersus*. » *Molecular and Cellular Biology* 16 (6): 3054-65.
- Goyon, C., et G. Faugeron. 1989. « Targeted Transformation of *Ascobolus Immersus* and de Novo Methylation of the Resulting Duplicated DNA Sequences ». *Molecular and Cellular Biology* 9 (7): 2818-27.
- Graïa, F., V. Berteaux-Lecellier, D. Zickler, et M. Picard. 2000. « Ami1, an Orthologue of the *Aspergillus Nidulans* ApsA Gene, Is Involved in Nuclear Migration Events throughout the Life Cycle of *Podospora Anserina* ». *Genetics* 155 (2): 633-46.
- Graïa, F., O. Lespinet, B. Rimbault, M. Dequard-Chablat, E. Coppin, et M. Picard. 2001a. « Genome Quality Control: RIP (Repeat-Induced Point Mutation) Comes to *Podospora* ». *Molecular Microbiology* 40 (3): 586-95.
- Graïa, F, O Lespinet, B Rimbault, M Dequard-Chablat, E Coppin, et M Picard. 2001b. « Genome quality control: RIP (repeat-induced point mutation) comes to *Podospora* ». *Molecular Microbiology* 40 (3): 586-95.
- Grewal, Shiv I. S., et Songtao Jia. 2007. « Heterochromatin Revisited ». *Nature Reviews. Genetics* 8 (1): 35-46. <https://doi.org/10.1038/nrg2008>.
- Grewal, Shiv I. S., et Danesh Moazed. 2003. « Heterochromatin and Epigenetic Control of Gene Expression ». *Science (New York, N.Y.)* 301 (5634): 798-802. <https://doi.org/10.1126/science.1086887>.
- Grigoriev, Igor V., Roman Nikitin, Sajeet Haridas, Alan Kuo, Robin Ohm, Robert Otillar, Robert Riley, et al. 2014. « MycoCosm Portal: Gearing up for 1000 Fungal Genomes ». *Nucleic Acids Research* 42 (Database issue): D699-704. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1183>.
- Grognet, Pierre, Frédérique Bidard, Claire Kuchly, Laetitia Chan Ho Tong, Evelyne Coppin, Jinane Ait Benkhali, Arnaud Couloux, Patrick Wincker, Robert Debuchy, et Philippe Silar. 2014. « Maintaining Two Mating Types: Structure of the Mating Type Locus and Its Role in Heterokaryosis in *Podospora Anserina* ». *Genetics* 197 (1): 421-32. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.159988>.
- Grognet, Pierre, Hervé Lalucque, Fabienne Malagnac, et Philippe Silar. 2014. « Genes That Bias Mendelian Segregation ». *PLoS Genetics* 10 (5): e1004387. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004387>.

- Grognet, Pierre, Hervé Lalucque, et Philippe Silar. 2012. « The PaAlr1 Magnesium Transporter Is Required for Ascospore Development in *Podospora Anserina* ». *Fungal Biology* 116 (10): 1111-18. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.08.004>.
- Grossetête, Sandrine, Bernard Labedan, et Olivier Lespinet. 2010. « FUNGIpath: A Tool to Assess Fungal Metabolic Pathways Predicted by Orthology ». *BMC Genomics* 11 (février): 81. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-81>.
- Grossniklaus, U., J. P. Vielle-Calzada, M. A. Hoepfner, et W. B. Gagliano. 1998. « Maternal Control of Embryogenesis by MEDEA, a Polycomb Group Gene in Arabidopsis ». *Science (New York, N.Y.)* 280 (5362): 446-50.
- Gu, Qin, Tiantian Ji, Xiao Sun, Hai Huang, Hao Zhang, Xi Lu, Liming Wu, Rong Huo, Huijun Wu, et Xuewen Gao. 2017. « Histone H3 Lysine 9 Methyltransferase FvDim5 Regulates Fungal Development, Pathogenicity and Osmotic Stress Responses in *Fusarium Verticillioides* ». *FEMS Microbiology Letters* 364 (19). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx184>.
- Guillemette, Benoit, Paul Drogaris, Hsiu-Hsu Sophia Lin, Harry Armstrong, Kyoko Hiragami-Hamada, Axel Imhof, Eric Bonneil, Pierre Thibault, Alain Verreault, et Richard J. Festenstein. 2011. « H3 Lysine 4 Is Acetylated at Active Gene Promoters and Is Regulated by H3 Lysine 4 Methylation ». *PLoS Genetics* 7 (3): e1001354. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001354>.
- Guindon, Stéphane, Jean-François Dufayard, Vincent Lefort, Maria Anisimova, Wim Hordijk, et Olivier Gascuel. 2010. « New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0 ». *Systematic Biology* 59 (3): 307-21. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.
- Hajjari, Mohammadreza, et Abbas Salavaty. 2015. « HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers ». *Cancer Biology & Medicine* 12 (1): 1-9. <https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0006>.
- Halverson, D., G. Gutkin, et L. Clarke. 2000. « A Novel Member of the Swi6p Family of Fission Yeast Chromo Domain-Containing Proteins Associates with the Centromere in Vivo and Affects Chromosome Segregation ». *Molecular & General Genetics: MGG* 264 (4): 492-505.
- Hammond, T. M. 2017. « Sixteen Years of Meiotic Silencing by Unpaired DNA ». *Advances in Genetics* 97: 1-42. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.11.001>.
- Hane, Williams, Taranto, Solomon, et Oliver. 2015. « Repeat-Induced Point Mutation in Fungi: A Fungal-Specific Endogenous Mutagenesis Process ». In *Genetic Transformation Systems in Fungi*, 2:55-68. Verlag: Springer.
- Hansen, Klavs R., Idit Hazan, Sreenath Shanker, Stephen Watt, Janne Verhein-Hansen, Jürg Bähler, Robert A. Martienssen, Janet F. Partridge, Amikam Cohen, et Geneviève Thon. 2011. « H3K9me-Independent Gene Silencing in Fission Yeast Heterochromatin by Clr5 and Histone Deacetylases ». *PLoS Genetics* 7 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001268>.

- Harley, C. B., A. B. Futcher, et C. W. Greider. 1990. « Telomeres Shorten during Ageing of Human Fibroblasts ». *Nature* 345 (6274): 458-60. <https://doi.org/10.1038/345458a0>.
- Hellauer, Karen, Edith Sirard, et Bernard Turcotte. 2001. « Decreased Expression of Specific Genes in Yeast Cells Lacking Histone H1 ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (17): 13587-92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011196200>.
- Henikoff, S., et L. Comai. 1998. « A DNA Methyltransferase Homolog with a Chromodomain Exists in Multiple Polymorphic Forms in Arabidopsis ». *Genetics* 149 (1): 307-18.
- Hill, D. A., et A. N. Imbalzano. 2000. « Human SWI/SNF Nucleosome Remodeling Activity Is Partially Inhibited by Linker Histone H1 ». *Biochemistry* 39 (38): 11649-56.
- Holoch, Daniel, et Raphaël Margueron. 2017. « Mechanisms Regulating PRC2 Recruitment and Enzymatic Activity ». *Trends in Biochemical Sciences* 42 (7): 531-42. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.04.003>.
- Honda, Shinji, Zachary A. Lewis, Maite Huarte, Lucy Y. Cho, Larry L. David, Yang Shi, et Eric U. Selker. 2010. « The DMM Complex Prevents Spreading of DNA Methylation from Transposons to Nearby Genes in Neurospora Crassa ». *Genes & Development* 24 (5): 443-54. <https://doi.org/10.1101/gad.1893210>.
- Honda, Shinji, Zachary A. Lewis, Kenji Shimada, Wolfgang Fischle, Ragna Sack, et Eric U. Selker. 2012a. « Heterochromatin Protein 1 Forms Distinct Complexes to Direct Histone Deacetylation and DNA Methylation ». *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (5): 471-77, S1. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2274>.
- Horst, Armando van der, Jolanda M. Schavemaker, Wendy Pellis-van Berkel, et Boudewijn M. T. Burgering. 2007. « The Caenorhabditis Elegans Nicotinamidase PNC-1 Enhances Survival ». *Mechanisms of Ageing and Development* 128 (4): 346-49. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.01.004>.
- Howe, E, K Holton, S Nair, D Schlauch, R Sinha, et J Quackenbush. 2010. *MeV: MultiExperiment Viewer*. Biomedical Informatics for Cancer Research. Springer, Boston, MA.
- Hughes, Christina M., Orit Rozenblatt-Rosen, Thomas A. Milne, Terry D. Copeland, Stuart S. Levine, Jeffrey C. Lee, D. Neil Hayes, et al. 2004. « Menin Associates with a Trithorax Family Histone Methyltransferase Complex and with the Hoxc8 Locus ». *Molecular Cell* 13 (4): 587-97.
- Huyen, Yentram, Omar Zgheib, Richard A. Ditullio, Vassilis G. Gorgoulis, Panayotis Zacharatos, Tom J. Petty, Emily A. Sheston, Hestia S. Mellert, Elena S. Stavridi, et Thanos D. Halazonetis. 2004. « Methylated Lysine 79 of Histone H3 Targets 53BP1 to DNA Double-Strand Breaks ». *Nature* 432 (7015): 406-11. <https://doi.org/10.1038/nature03114>.
- Idnurm, Alexander, et Barbara J. Howlett. 2003. « Analysis of Loss of Pathogenicity Mutants Reveals That Repeat-Induced Point Mutations Can Occur in the Dothideomycete Leptosphaeria Maculans ». *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 39 (1): 31-37.

- Ikeda, Ken-ichi, Hitoshi Nakayashiki, Tomomori Kataoka, Hiroki Tamba, Yoko Hashimoto, Yukio Tosa, et Shigeyuki Mayama. 2002. « Repeat-Induced Point Mutation (RIP) in *Magnaporthe Grisea*: Implications for Its Sexual Cycle in the Natural Field Context ». *Molecular Microbiology* 45 (5): 1355-64.
- Ikeda, Ken-ichi, Ba Van Vu, Naoki Kadotani, Masaki Tanaka, Toshiki Murata, Kohta Shiina, Izumi Chuma, Yukio Tosa, et Hitoshi Nakayashiki. 2013. « Is the Fungus *Magnaporthe* Losing DNA Methylation? » *Genetics* 195 (3): 845-55. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.155978>.
- Imai, Shin-ichiro, Christopher M. Armstrong, Matt Kaeberlein, et Leonard Guarente. 2000. « Transcriptional Silencing and Longevity Protein Sir2 Is an NAD-Dependent Histone Deacetylase ». *Nature* 403 (6771): 795-800. <https://doi.org/10.1038/35001622>.
- Iyer, V., et K. Struhl. 1995. « Poly(DA:DT), a Ubiquitous Promoter Element That Stimulates Transcription via Its Intrinsic DNA Structure ». *The EMBO Journal* 14 (11): 2570-79.
- Izzo, Annalisa, Kinga Kamieniarz, et Robert Schneider. 2008. « The Histone H1 Family: Specific Members, Specific Functions? » *Biological Chemistry* 389 (4): 333-43. <https://doi.org/10.1515/BC.2008.037>.
- Jackson, James P., Lianna Johnson, Zuzana Jasencakova, Xing Zhang, Laura PerezBurgos, Prim B. Singh, Xiaodong Cheng, Ingo Schubert, Thomas Jenuwein, et Steven E. Jacobsen. 2004. « Dimethylation of Histone H3 Lysine 9 Is a Critical Mark for DNA Methylation and Gene Silencing in *Arabidopsis Thaliana* ». *Chromosoma* 112 (6): 308-15. <https://doi.org/10.1007/s00412-004-0275-7>.
- Jackson, James P., Anders M. Lindroth, Xiaofeng Cao, et Steven E. Jacobsen. 2002. « Control of CpNpG DNA Methylation by the KRYPTONITE Histone H3 Methyltransferase ». *Nature* 416 (6880): 556-60. <https://doi.org/10.1038/nature731>.
- Jacob, Yannick, Suhua Feng, Chantal A. LeBlanc, Yana V. Bernatavichute, Hume Stroud, Shawn Cokus, Lianna M. Johnson, Matteo Pellegrini, Steven E. Jacobsen, et Scott D. Michaels. 2009. « ATXR5 and ATXR6 are novel H3K27 monomethyltransferases required for chromatin structure and gene silencing ». *Nature structural & molecular biology* 16 (7): 763-68. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1611>.
- James, T. C., et S. C. Elgin. 1986. « Identification of a Nonhistone Chromosomal Protein Associated with Heterochromatin in *Drosophila Melanogaster* and Its Gene ». *Molecular and Cellular Biology* 6 (11): 3862-72.
- Jamet-Vierny, Corinne, Robert Debuchy, Magali Prigent, et Philippe Silar. 2007a. « IDC1, a Pezizomycotina-Specific Gene That Belongs to the PaMpk1 MAP Kinase Transduction Cascade of the Filamentous Fungus *Podospira Anserina* ». *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 44 (12): 1219-30. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.04.005>.
- Jamieson, Kirsty, Michael R. Rountree, Zachary A. Lewis, Jason E. Stajich, et Eric U. Selker. 2013. « Regional control of histone H3 lysine 27 methylation in *Neurospora* ». *Proceedings of*



*the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (15): 6027-32. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303750110>.

Jamieson, Kirsty, Elizabeth T. Wiles, Kevin J. McNaught, Simone Sidoli, Neena Leggett, Yanchun Shao, Benjamin A. Garcia, et Eric U. Selker. 2016a. « Loss of HP1 causes depletion of H3K27me3 from facultative heterochromatin and gain of H3K27me2 at constitutive heterochromatin ». *Genome Research* 26 (1): 97-107. <https://doi.org/10.1101/gr.194555.115>.

Jansen, An, et Kevin J. Verstrepen. 2011. « Nucleosome Positioning in *Saccharomyces cerevisiae* ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 75 (2): 301-20. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00046-10>.

Jeon, Junhyun, Jaeyoung Choi, Gir-Won Lee, Sook-Young Park, Aram Huh, Ralph A. Dean, et Yong-Hwan Lee. 2015. « Genome-Wide Profiling of DNA Methylation Provides Insights into Epigenetic Regulation of Fungal Development in a Plant Pathogenic Fungus, *Magnaporthe Oryzae* ». *Scientific Reports* 5 (février): 8567. <https://doi.org/10.1038/srep08567>.

Jiang, Danhua, Nicholas C. Kong, Xiaofeng Gu, Zicong Li, et Yuehui He. 2011. « Arabidopsis COMPASS-like Complexes Mediate Histone H3 Lysine-4 Trimethylation to Control Floral Transition and Plant Development ». *PLoS Genetics* 7 (3): e1001330. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001330>.

John Clutterbuck, A. 2011. « Genomic evidence of repeat-induced point mutation (RIP) in filamentous ascomycetes ». *Fungal Genetics and Biology* 48 (3): 306-26. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.09.002>.

Johnson, Lianna M., Julie A. Law, Anuj Khattar, Ian R. Henderson, et Steven E. Jacobsen. 2008. « SRA-Domain Proteins Required for DRM2-Mediated de Novo DNA Methylation ». *PLoS Genetics* 4 (11): e1000280. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000280>.

Johnson, Louise J., Tatiana Giraud, Ryan Anderson, et Michael E. Hood. 2010. « The Impact of Genome Defense on Mobile Elements in *Microbotryum* ». *Genetica* 138 (3): 313-19. <https://doi.org/10.1007/s10709-009-9419-2>.

Joshi, Amita A., et Kevin Struhl. 2005. « Eaf3 Chromodomain Interaction with Methylated H3-K36 Links Histone Deacetylation to Pol II Elongation ». *Molecular Cell* 20 (6): 971-78. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.11.021>.

Jost, K. Laurence, Bianca Bertulat, et M. Cristina Cardoso. 2012. « Heterochromatin and Gene Positioning: Inside, Outside, Any Side? ». *Chromosoma* 121 (6): 555-63. <https://doi.org/10.1007/s00412-012-0389-2>.

Judson, O. P., et B. B. Normark. 1996. « Ancient Asexual Scandals ». *Trends in Ecology & Evolution* 11 (2): 41-46.

Justin, Neil, Ying Zhang, Cataldo Tarricone, Stephen R. Martin, Shuyang Chen, Elizabeth Underwood, Valeria De Marco, et al. 2016. « Structural basis of oncogenic histone H3K27M

inhibition of human polycomb repressive complex 2 ». *Nature Communications* 7 (avril). <https://doi.org/10.1038/ncomms11316>.

Kaeberlein, M., M. McVey, et L. Guarente. 1999. « The SIR2/3/4 Complex and SIR2 Alone Promote Longevity in *Saccharomyces Cerevisiae* by Two Different Mechanisms ». *Genes & Development* 13 (19): 2570-80.

Kaeberlein, Tammi L., Erica D. Smith, Mitsuhiro Tsuchiya, K. Linnea Welton, James H. Thomas, Stanley Fields, Brian K. Kennedy, et Matt Kaeberlein. 2006. « Lifespan Extension in *Caenorhabditis Elegans* by Complete Removal of Food ». *Aging Cell* 5 (6): 487-94. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00238.x>.

Kang, Woo Kyu, Yeong Hyeock Kim, Byoung-Soo Kim, et Jeong-Yoon Kim. 2014. « Growth Phase-Dependent Roles of Sir2 in Oxidative Stress Resistance and Chronological Lifespan in Yeast ». *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 52 (8): 652-58. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4173-2>.

Kanoh, Junko, Stefania Francesconi, Ada Collura, Vera Schramke, Fuyuki Ishikawa, Giuseppe Baldacci, et Vincent Géli. 2003. « The Fission Yeast SpSet1p Is a Histone H3-K4 Methyltransferase That Functions in Telomere Maintenance and DNA Repair in an ATM Kinase Rad3-Dependent Pathway ». *Journal of Molecular Biology* 326 (4): 1081-94.

Kanoh, Junko, Mahito Sadaie, Takeshi Urano, et Fuyuki Ishikawa. 2005. « Telomere Binding Protein Taz1 Establishes Swi6 Heterochromatin Independently of RNAi at Telomeres ». *Current Biology: CB* 15 (20): 1808-19. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.09.041>.

Katoh, Mariko, Tomaz Curk, Qikai Xu, Blaz Zupan, Adam Kuspa, et Gad Shaulsky. 2006. « Developmentally Regulated DNA Methylation in *Dictyostelium Discoideum* ». *Eukaryotic Cell* 5 (1): 18-25. <https://doi.org/10.1128/EC.5.1.18-25.2006>.

Keller, Claudia, et Marc Bühler. 2013. « Chromatin-associated ncRNA activities ». *Chromosome Research* 21 (6-7): 627-41. <https://doi.org/10.1007/s10577-013-9390-8>.

Kicka, Sébastien, Crystel Bonnet, Andrew K Sobering, Latha P Ganesan, et Philippe Silar. 2006. « A mitotically inheritable unit containing a MAP kinase module ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (36): 13445-50. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603693103>.

Kim, Wootae, Ranah Kim, Geunyeong Park, Jong-Wan Park, et Ja-Eun Kim. 2012. « Deficiency of H3K79 Histone Methyltransferase Dot1-like Protein (DOT1L) Inhibits Cell Proliferation ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (8): 5588-99. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.328138>.

Kleff, S., E. D. Andrulis, C. W. Anderson, et R. Sternglanz. 1995. « Identification of a Gene Encoding a Yeast Histone H4 Acetyltransferase ». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (42): 24674-77.

- Klix, V., M. Nowrousian, C. Ringelberg, J. J. Loros, J. C. Dunlap, et S. Pöggeler. 2010. « Functional Characterization of MAT1-1-Specific Mating-Type Genes in the Homothallic Ascomycete *Sordaria Macrospora* Provides New Insights into Essential and Nonessential Sexual Regulators ». *Eukaryotic Cell* 9 (6): 894-905. <https://doi.org/10.1128/EC.00019-10>.
- Klocko, Andrew D., Tereza Ormsby, Jonathan M. Galazka, Neena A. Leggett, Miki Uesaka, Shinji Honda, Michael Freitag, et Eric U. Selker. 2016. « Normal Chromosome Conformation Depends on Subtelomeric Facultative Heterochromatin in *Neurospora Crassa* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (52): 15048-53. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615546113>.
- Kooistra, Susanne Marije, et Kristian Helin. 2012. « Molecular Mechanisms and Potential Functions of Histone Demethylases ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 13 (5): 297-311. <https://doi.org/10.1038/nrm3327>.
- Kornberg, R. D. 1974. « Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA ». *Science (New York, N.Y.)* 184 (4139): 868-71.
- Koutelou, Evangelia, Calley L. Hirsch, et Sharon Y.R. Dent. 2010. « Multiple faces of the SAGA complex ». *Current opinion in cell biology* 22 (3): 374-82. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.03.005>.
- Kouzarides, Tony. 2007. « Chromatin Modifications and Their Function ». *Cell* 128 (4): 693-705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>.
- Kouzminova, E, et E U Selker. 2001. « dim-2 encodes a DNA methyltransferase responsible for all known cytosine methylation in *Neurospora* ». *The EMBO Journal* 20 (15): 4309-23. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.15.4309>.
- Krogan, Nevan J., Jim Dover, Shahram Khorrami, Jack F. Greenblatt, Jessica Schneider, Mark Johnston, et Ali Shilatifard. 2002. « COMPASS, a Histone H3 (Lysine 4) Methyltransferase Required for Telomeric Silencing of Gene Expression ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (13): 10753-55. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200023200>.
- Krogan, Nevan J., Michael-Christopher Keogh, Nira Datta, Chika Sawa, Owen W. Ryan, Huiming Ding, Robin A. Haw, et al. 2003. « A Snf2 Family ATPase Complex Required for Recruitment of the Histone H2A Variant Htz1 ». *Molecular Cell* 12 (6): 1565-76.
- Lachner, Monika, et Thomas Jenuwein. 2002. « The Many Faces of Histone Lysine Methylation ». *Current Opinion in Cell Biology* 14 (3): 286-98.
- Lachner, Monika, Roderick J. O'Sullivan, et Thomas Jenuwein. 2003. « An Epigenetic Road Map for Histone Lysine Methylation ». *Journal of Cell Science* 116 (Pt 11): 2117-24. <https://doi.org/10.1242/jcs.00493>.
- Lacoste, Nicolas, Rhea T. Utley, Joanna M. Hunter, Guy G. Poirier, et Jacques Côte. 2002. « Disruptor of Telomeric Silencing-1 Is a Chromatin-Specific Histone H3 Methyltransferase ».

*The Journal of Biological Chemistry* 277 (34): 30421-24.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.C200366200>.

Lalucque, Hervé, Fabienne Malagnac, Sylvain Brun, Sébastien Kicka, et Philippe Silar. 2012. « A Non-Mendelian MAPK-Generated Hereditary Unit Controlled by a Second MAPK Pathway in *Podospora Anserina* ». *Genetics* 191 (2): 419-33.  
<https://doi.org/10.1534/genetics.112.139469>.

Lalucque, Hervé, Fabienne Malagnac, Kimberly Green, Valérie Gautier, Pierre Grognet, Laetitia Chan Ho Tong, Barry Scott, et Philippe Silar. 2017. « IDC2 and IDC3, Two Genes Involved in Cell Non-Autonomous Signaling of Fruiting Body Development in the Model Fungus *Podospora Anserina* ». *Developmental Biology* 421 (2): 126-38.  
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.12.016>.

Lambou, Karine, Fabienne Malagnac, Crystel Barbisan, Didier Tharreau, Marc-Henri Lebrun, et Philippe Silar. 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 ». *Eukaryotic Cell* 7 (10): 1809-18.  
<https://doi.org/10.1128/EC.00149-08>.

Landry, J., A. Sutton, S. T. Tafrov, R. C. Heller, J. Stebbins, L. Pillus, et R. Sternglanz. 2000. « The Silencing Protein SIR2 and Its Homologs Are NAD-Dependent Protein Deacetylases ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (11): 5807-11. <https://doi.org/10.1073/pnas.110148297>.

Landsman, David. 1996. « Histone H1 in *Saccharomyces cerevisiae*: a double mystery solved? » *Trends in Biochemical Sciences* 21 (8): 287-88. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(96\)30030-3](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(96)30030-3).

Law, Julie A., et Steven E. Jacobsen. 2010. « Establishing, Maintaining and Modifying DNA Methylation Patterns in Plants and Animals ». *Nature Reviews. Genetics* 11 (3): 204-20.  
<https://doi.org/10.1038/nrg2719>.

Le Chevanton, L., G. Leblon, et S. Lebilcot. 1989. « Duplications Created by Transformation in *Sordaria Macrospora* Are Not Inactivated during Meiosis ». *Molecular & General Genetics: MGG* 218 (3): 390-96.

Lecellier, G, et P Silar. 1994. « Rapid methods for nucleic acids extraction from Petri dish-grown mycelia ». *Current Genetics* 25 (2): 122-23.

Lee, Dong W, Michael Freitag, Eric U Selker, et Rodolfo Aramayo. 2008. « A cytosine methyltransferase homologue is essential for sexual development in *Aspergillus nidulans* ». *PloS One* 3 (6): e2531. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002531>.

Lee, Dong W., Robert J. Pratt, Malcolm McLaughlin, et Rodolfo Aramayo. 2003. « An Argonaute-like Protein Is Required for Meiotic Silencing ». *Genetics* 164 (2): 821-28.

- Lee, Jung-Shin, Abhijit Shukla, Jessica Schneider, Selene K. Swanson, Michael P. Washburn, Laurence Florens, Sukesh R. Bhaumik, et Ali Shilatifard. 2007. « Histone Crosstalk between H2B Monoubiquitination and H3 Methylation Mediated by COMPASS ». *Cell* 131 (6): 1084-96. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.046>.
- Leeuwen, Fred van, Philip R. Gafken, et Daniel E. Gottschling. 2002. « Dot1p Modulates Silencing in Yeast by Methylation of the Nucleosome Core ». *Cell* 109 (6): 745-56.
- Lehnertz, Bernhard, Yoshihide Ueda, Alwin A. H. A. Derijck, Ulrich Braunschweig, Laura Perez-Burgos, Stefan Kubicek, Taiping Chen, En Li, Thomas Jenuwein, et Antoine H. F. M. Peters. 2003. « Suv39h-Mediated Histone H3 Lysine 9 Methylation Directs DNA Methylation to Major Satellite Repeats at Pericentric Heterochromatin ». *Current Biology* 13 (14): 1192-1200. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00432-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00432-9).
- Lewis, Zachary A., Keyur K. Adhvaryu, Shinji Honda, Anthony L. Shiver, Marijn Knip, Ragna Sack, et Eric U. Selker. 2010. « DNA Methylation and Normal Chromosome Behavior in Neurospora Depend on Five Components of a Histone Methyltransferase Complex, DCDC ». *PLoS Genetics* 6 (11): e1001196. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001196>.
- Lewis, Zachary A., Shinji Honda, Tamir K. Khlafallah, Jennifer K. Jeffress, Michael Freitag, Fabio Mohn, Dirk Schübeler, et Eric U. Selker. 2009. « Relics of Repeat-Induced Point Mutation Direct Heterochromatin Formation in Neurospora Crassa ». *Genome Research* 19 (3): 427-37. <https://doi.org/10.1101/gr.086231.108>.
- Li, E., T. H. Bestor, et R. Jaenisch. 1992. « Targeted Mutation of the DNA Methyltransferase Gene Results in Embryonic Lethality ». *Cell* 69 (6): 915-26.
- Li, Qing, Hui Zhou, Hugo Wurtele, Brian Davies, Bruce Horazdovsky, Alain Verreault, et Zhiguo Zhang. 2008. « Acetylation of Histone H3 Lysine 56 Regulates Replication-Coupled Nucleosome Assembly ». *Cell* 134 (2): 244-55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.018>.
- Li, Shaojie, Kyung Myung, Diana Guse, Brett Donkin, Robert H. Proctor, W. Scott Grayburn, et Ana M. Calvo. 2006. « FvVE1 Regulates Filamentous Growth, the Ratio of Microconidia to Macroconidia and Cell Wall Formation in Fusarium Verticillioides ». *Molecular Microbiology* 62 (5): 1418-32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05447.x>.
- Li, Wan-Chen, Chia-Ling Chen, et Ting-Fang Wang. 2018. « Repeat-Induced Point (RIP) Mutation in the Industrial Workhorse Fungus Trichoderma Reesei ». *Applied Microbiology and Biotechnology*, janvier. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8731-5>.
- Li, Wan-Chen, Chien-Hao Huang, Chia-Ling Chen, Yu-Chien Chuang, Shu-Yun Tung, et Ting-Fang Wang. 2017. « Trichoderma reesei complete genome sequence, repeat-induced point mutation, and partitioning of CAZyme gene clusters ». *Biotechnology for Biofuels* 10 (1): 170. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0825-x>.

- Lin, S. J., P. A. Defosse, et L. Guarente. 2000. « Requirement of NAD and SIR2 for Life-Span Extension by Calorie Restriction in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Science (New York, N.Y.)* 289 (5487): 2126-28.
- Lindroth, A M, X Cao, J P Jackson, D Zilberman, C M McCallum, S Henikoff, et S E Jacobsen. 2001. « Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation ». *Science (New York, N.Y.)* 292 (5524): 2077-80. <https://doi.org/10.1126/science.1059745>.
- Lindroth, Anders M., David Shultis, Zuzana Jasencakova, Jörg Fuchs, Lianna Johnson, Daniel Schubert, Debasis Patnaik, et al. 2004. « Dual Histone H3 Methylation Marks at Lysines 9 and 27 Required for Interaction with CHROMOMETHYLASE3 ». *The EMBO Journal* 23 (21): 4286-96. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600430>.
- Liu, Huiquan, Yang Li, Daipeng Chen, Zhaomei Qi, Qinhu Wang, Jianhua Wang, Cong Jiang, et Jin-Rong Xu. 2017. « A-to-I RNA Editing Is Developmentally Regulated and Generally Adaptive for Sexual Reproduction in *Neurospora Crassa* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (37): E7756-65. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702591114>.
- Liu, Huiquan, Qinhu Wang, Yi He, Lingfeng Chen, Chaofeng Hao, Cong Jiang, Yang Li, Yafeng Dai, Zhensheng Kang, et Jin-Rong Xu. 2016. « Genome-wide A-to-I RNA editing in fungi independent of ADAR enzymes ». *Genome Research* 26 (4): 499-509. <https://doi.org/10.1101/gr.199877.115>.
- Liu, Sheng, Julie Brind'Amour, Mohammad M. Karimi, Kenjiro Shirane, Aaron Bogutz, Louis Lefebvre, Hiroyuki Sasaki, Yoichi Shinkai, et Matthew C. Lorincz. 2014. « Setdb1 is required for germline development and silencing of H3K9me3-marked endogenous retroviruses in primordial germ cells ». *Genes & Development* 28 (18): 2041-55. <https://doi.org/10.1101/gad.244848.114>.
- Liu, Ye, Na Liu, Yanni Yin, Yun Chen, Jinhua Jiang, et Zhonghua Ma. 2015. « Histone H3K4 Methylation Regulates Hyphal Growth, Secondary Metabolism and Multiple Stress Responses in *Fusarium Graminearum* ». *Environmental Microbiology* 17 (11): 4615-30. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12993>.
- Lorentz, A., K. Ostermann, O. Fleck, et H. Schmidt. 1994. « Switching Gene Swi6, Involved in Repression of Silent Mating-Type Loci in Fission Yeast, Encodes a Homologue of Chromatin-Associated Proteins from *Drosophila* and Mammals ». *Gene* 143 (1): 139-43.
- Lu, Chao, Siddhant U. Jain, Dominik Hoelper, Denise Bechet, Rosalynn C. Molden, Leili Ran, Devan Murphy, et al. 2016. « Histone H3K36 mutations promote sarcomagenesis through altered histone methylation landscape ». *Science (New York, N.Y.)* 352 (6287): 844-49. <https://doi.org/10.1126/science.aac7272>.
- Lu, Xingwu, Sandeep N. Wontakal, Harsh Kavi, Byung Ju Kim, Paloma M. Guzzardo, Alexander V. Emelyanov, Na Xu, et al. 2013. « *Drosophila* H1 Regulates the Genetic Activity

of Heterochromatin by Recruitment of Su(var)3-9 ». *Science (New York, N.Y.)* 340 (6128): 78-81. <https://doi.org/10.1126/science.1234654>.

Luger, K., A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent, et T. J. Richmond. 1997. « Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution ». *Nature* 389 (6648): 251-60. <https://doi.org/10.1038/38444>.

Luger, Karolin. 2006. « Dynamic Nucleosomes ». *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology* 14 (1): 5-16. <https://doi.org/10.1007/s10577-005-1026-1>.

Luk, Ed, Ngoc-Diep Vu, Kem Patteson, Gaku Mizuguchi, Wei-Hua Wu, Anand Ranjan, Jonathon Backus, et al. 2007. « Chz1, a Nuclear Chaperone for Histone H2AZ ». *Molecular Cell* 25 (3): 357-68. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.12.015>.

Lyko, F., A. J. Whittaker, T. L. Orr-Weaver, et R. Jaenisch. 2000. « The Putative Drosophila Methyltransferase Gene Ddnmt2 Is Contained in a Transposon-like Element and Is Expressed Specifically in Ovaries ». *Mechanisms of Development* 95 (1-2): 215-17.

Mair, William, et Andrew Dillin. 2008. « Aging and Survival: The Genetics of Life Span Extension by Dietary Restriction ». *Annual Review of Biochemistry* 77 (1): 727-54. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061206.171059>.

Malagnac, F, H Lalucque, G Lepère, et P Silar. 2004. « Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospira anserina* ». *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 41 (11): 982-97. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.07.008>.

Malagnac, F, B Wendel, C Goyon, G Faugeron, D Zickler, J L Rossignol, M Noyer-Weidner, P Vollmayr, T A Trautner, et J Walter. 1997. « A gene essential for de novo methylation and development in *Ascobolus* reveals a novel type of eukaryotic DNA methyltransferase structure ». *Cell* 91 (2): 281-90.

Malagnac, Fabienne, Lisa Bartee, et Judith Bender. 2002. « An Arabidopsis SET domain protein required for maintenance but not establishment of DNA methylation ». *The EMBO Journal* 21 (24): 6842-52. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf687>.

Malagnac, Fabienne, Birgit Wendel, Christophe Goyon, Godeleine Faugeron, Denise Zickler, Jean-Luc Rossignol, Mario Noyer-Weidner, Peter Vollmayr, Thomas A Trautner, et Jörn Walter. 1997. « A Gene Essential for De Novo Methylation and Development in *Ascobolus* Reveals a Novel Type of Eukaryotic DNA Methyltransferase Structure ». *Cell* 91 (2): 281-90. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80410-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80410-9).

Maltby, Vicki E., Benjamin J. E. Martin, Julia M. Schulze, Ian Johnson, Thomas Hentrich, Aishwariya Sharma, Michael S. Kobor, et LeAnn Howe. 2012. « Histone H3 Lysine 36 Methylation Targets the Isw1b Remodeling Complex to Chromatin ». *Molecular and Cellular Biology* 32 (17): 3479-85. <https://doi.org/10.1128/MCB.00389-12>.

- Mao, Zhiyong, Chris Hine, Xiao Tian, Michael Van Meter, Matthew Au, Amita Vaidya, Andrei Seluanov, et Vera Gorbunova. 2011. « SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1 ». *Science (New York, N.Y.)* 332 (6036): 1443-46. <https://doi.org/10.1126/science.1202723>.
- Marisa, Laetitia, Jean-Laurent Ichanté, Nancie Reymond, Lawrence Aggerbeck, Hervé Delacroix, et Marie-Hélène Mucchielli-Giorgi. 2007. « MAnGO: An Interactive R-Based Tool for Two-Colour Microarray Analysis ». *Bioinformatics (Oxford, England)* 23 (17): 2339-41. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm321>.
- Marmorstein, Ronen, et Ming-Ming Zhou. 2014. « Writers and Readers of Histone Acetylation: Structure, Mechanism, and Inhibition ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (7): a018762. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018762>.
- Mathieu, Olivier, Aline V Probst, et Jerzy Paszkowski. 2005. « Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 by CpG methylation in Arabidopsis ». *The EMBO Journal* 24 (15): 2783-91. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600743>.
- Mattiroli, Francesca, Sudipta Bhattacharyya, Pamela N. Dyer, Alison E. White, Kathleen Sandman, Brett W. Burkhardt, Kyle R. Byrne, et al. 2017. « Structure of Histone-Based Chromatin in Archaea ». *Science (New York, N.Y.)* 357 (6351): 609-12. <https://doi.org/10.1126/science.aaj1849>.
- Mavrich, Travis N., Ilya P. Ioshikhes, Bryan J. Venters, Cizhong Jiang, Lynn P. Tomsho, Ji Qi, Stephan C. Schuster, Istvan Albert, et B. Franklin Pugh. 2008. « A barrier nucleosome model for statistical positioning of nucleosomes throughout the yeast genome ». *Genome Research* 18 (7): 1073-83. <https://doi.org/10.1101/gr.078261.108>.
- Maxwell, Michele M., Elizabeth M. Tomkinson, Johnathan Nobles, John W. Wizeman, Allison M. Amore, Luisa Quinti, Vanita Chopra, Steven M. Hersch, et Aleksey G. Kazantsev. 2011. « The Sirtuin 2 Microtubule Deacetylase Is an Abundant Neuronal Protein That Accumulates in the Aging CNS ». *Human Molecular Genetics* 20 (20): 3986-96. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr326>.
- Michishita, Eriko, Ronald A. McCord, Elisabeth Berber, Mitomu Kioi, Hesed Padilla-Nash, Mara Damian, Peggie Cheung, et al. 2008. « SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin ». *Nature* 452 (7186): 492-96. <https://doi.org/10.1038/nature06736>.
- Miller, T., N. J. Krogan, J. Dover, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M. Johnston, J. F. Greenblatt, et A. Shilatifard. 2001. « COMPASS: A Complex of Proteins Associated with a Trithorax-Related SET Domain Protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (23): 12902-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.231473398>.
- Misteli, T., A. Gunjan, R. Hock, M. Bustin, et D. T. Brown. 2000. « Dynamic Binding of Histone H1 to Chromatin in Living Cells ». *Nature* 408 (6814): 877-81. <https://doi.org/10.1038/35048610>.



- Mito, Yoshiko, Jorja G. Henikoff, et Steven Henikoff. 2005. « Genome-Scale Profiling of Histone H3.3 Replacement Patterns ». *Nature Genetics* 37 (10): 1090-97. <https://doi.org/10.1038/ng1637>.
- Molitor, Anne, et Wen-Hui Shen. 2013. « The Polycomb Complex PRC1: Composition and Function in Plants ». *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao* 40 (5): 231-38. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2012.12.005>.
- Mueller, John E., Megan Canze, et Mary Bryk. 2006. « The Requirements for COMPASS and Paf1 in Transcriptional Silencing and Methylation of Histone H3 in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Genetics* 173 (2): 557-67. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.055400>.
- Müller, Jürg, et Judith A. Kassis. 2006. « Polycomb Response Elements and Targeting of Polycomb Group Proteins in *Drosophila* ». *Current Opinion in Genetics & Development* 16 (5): 476-84. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.08.005>.
- Munakata, T., N. Adachi, N. Yokoyama, T. Kuzuhara, et M. Horikoshi. 2000. « A Human Homologue of Yeast Anti-Silencing Factor Has Histone Chaperone Activity ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 5 (3): 221-33.
- Murray, K. 1964. « THE OCCURRENCE OF EPSILON-N-METHYL LYSINE IN HISTONES ». *Biochemistry* 3 (janvier): 10-15.
- Muthurajan, Uma M., Steven J. McBryant, Xu Lu, Jeffrey C. Hansen, et Karolin Luger. 2011. « The Linker Region of MacroH2A Promotes Self-Association of Nucleosomal Arrays ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (27): 23852-64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.244871>.
- Naumann, Kathrin, Andreas Fischer, Ingo Hofmann, Veiko Krauss, Sameer Phalke, Kristina Irmeler, Gerd Hause, et al. 2005. « Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in *Arabidopsis* ». *The EMBO Journal* 24 (7): 1418-29. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600604>.
- Newman, Brenda L., James R. Lundblad, Yang Chen, et Sarah M. Smolik. 2002. « A *Drosophila* Homologue of Sir2 Modifies Position-Effect Variegation but Does Not Affect Life Span ». *Genetics* 162 (4): 1675-85.
- Nguyen, Tinh-Suong, Hervé Lalucque, et Philippe Silar. 2018. « Identification and Characterization of PDC1, a Novel Protein Involved in the Epigenetic Cell Degeneration Crippled Growth in *Podospora Anserina* ». *Molecular Microbiology*, août. <https://doi.org/10.1111/mmi.14096>.
- Nimmo, E. R., G. Cranston, et R. C. Allshire. 1994. « Telomere-Associated Chromosome Breakage in Fission Yeast Results in Variegated Expression of Adjacent Genes ». *The EMBO Journal* 13 (16): 3801-11.

- Noma K, null, C. D. Allis, et S. I. Grewal. 2001. « Transitions in Distinct Histone H3 Methylation Patterns at the Heterochromatin Domain Boundaries ». *Science (New York, N.Y.)* 293 (5532): 1150-55. <https://doi.org/10.1126/science.1064150>.
- Noma, Ken-ichi, et Shiv I. S. Grewal. 2002. « Histone H3 Lysine 4 Methylation Is Mediated by Set1 and Promotes Maintenance of Active Chromatin States in Fission Yeast ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 Suppl 4 (décembre): 16438-45. <https://doi.org/10.1073/pnas.182436399>.
- Noma, Ken-ichi, Tomoyasu Sugiyama, Hugh Cam, Andre Verdel, Martin Zofall, Songtao Jia, Danesh Moazed, et Shiv I. S. Grewal. 2004. « RITS Acts in Cis to Promote RNA Interference-Mediated Transcriptional and Post-Transcriptional Silencing ». *Nature Genetics* 36 (11): 1174-80. <https://doi.org/10.1038/ng1452>.
- Nonaka, Nobuhiro, Tomoya Kitajima, Shihori Yokobayashi, Guoping Xiao, Masayuki Yamamoto, Shiv I. S. Grewal, et Yoshinori Watanabe. 2002. « Recruitment of Cohesin to Heterochromatic Regions by Swi6/HP1 in Fission Yeast ». *Nature Cell Biology* 4 (1): 89-93. <https://doi.org/10.1038/ncb739>.
- Nusinow, Dmitri A., Judith A. Sharp, Alana Morris, Sonia Salas, Kathrin Plath, et Barbara Panning. 2007. « The Histone Domain of MacroH2A1 Contains Several Dispersed Elements That Are Each Sufficient to Direct Enrichment on the Inactive X Chromosome ». *Journal of Molecular Biology* 371 (1): 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.063>.
- O'Carroll, D., S. Erhardt, M. Pagani, S. C. Barton, M. A. Surani, et T. Jenuwein. 2001. « The Polycomb-Group Gene Ezh2 Is Required for Early Mouse Development ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (13): 4330-36. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.13.4330-4336.2001>.
- Okano, M., D. W. Bell, D. A. Haber, et E. Li. 1999. « DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for de Novo Methylation and Mammalian Development ». *Cell* 99 (3): 247-57.
- Okano, M., S. Xie, et E. Li. 1998. « Cloning and Characterization of a Family of Novel Mammalian DNA (Cytosine-5) Methyltransferases ». *Nature Genetics* 19 (3): 219-20. <https://doi.org/10.1038/890>.
- Oudet, P., M. Gross-Bellard, et P. Chambon. 1975. « Electron Microscopic and Biochemical Evidence That Chromatin Structure Is a Repeating Unit ». *Cell* 4 (4): 281-300.
- Palmer, Jonathan M., Robyn M. Perrin, Taylor R. T. Dagenais, et Nancy P. Keller. 2008. « H3K9 Methylation Regulates Growth and Development in *Aspergillus Fumigatus* ». *Eukaryotic Cell* 7 (12): 2052-60. <https://doi.org/10.1128/EC.00224-08>.
- Pandey, Ritu, Andreas Müller, Carolyn A. Napoli, David A. Selinger, Craig S. Pikaard, Eric J. Richards, Judith Bender, David W. Mount, et Richard A. Jorgensen. 2002. « Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional

diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes ». *Nucleic Acids Research* 30 (23): 5036-55.

Panning, B., et R. Jaenisch. 1996. « DNA Hypomethylation Can Activate Xist Expression and Silence X-Linked Genes ». *Genes & Development* 10 (16): 1991-2002.

Park, Peter U., Pierre-Antoine Defossez, et Leonard Guarente. 1999. « Effects of Mutations in DNA Repair Genes on Formation of Ribosomal DNA Circles and Life Span in *Saccharomyces cerevisiae* ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (5): 3848-56.

Parthun, M. R. 2007. « Hat1: The Emerging Cellular Roles of a Type B Histone Acetyltransferase ». *Oncogene* 26 (37): 5319-28. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210602>.

Partridge, Janet F., Jennifer L. DeBeauchamp, Aaron M. Kosinski, Dagny L. Ulrich, Michael J. Hadler, et Victoria J. P. Noffsinger. 2007. « Functional Separation of the Requirements for Establishment and Maintenance of Centromeric Heterochromatin ». *Molecular Cell* 26 (4): 593-602. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.004>.

Pauler, Florian M., Mathew A. Sloane, Ru Huang, Kakkad Regha, Martha V. Koerner, Ido Tamir, Andreas Sommer, Andras Aszodi, Thomas Jenuwein, et Denise P. Barlow. 2009. « H3K27me3 Forms BLOCs over Silent Genes and Intergenic Regions and Specifies a Histone Banding Pattern on a Mouse Autosomal Chromosome ». *Genome Research* 19 (2): 221-33. <https://doi.org/10.1101/gr.080861.108>.

Pehrson, J. R., et V. A. Fried. 1992. « MacroH2A, a Core Histone Containing a Large Nonhistone Region ». *Science (New York, N.Y.)* 257 (5075): 1398-1400.

Peng, Jamy C., et Gary H. Karpen. 2008. « Epigenetic Regulation of Heterochromatic DNA Stability ». *Current Opinion in Genetics & Development* 18 (2): 204-11. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2008.01.021>.

Pengelly, Ana Raquel, Reinhard Kalb, Katja Finkl, et Jürg Müller. 2015. « Transcriptional repression by PRC1 in the absence of H2A monoubiquitylation ». *Genes & Development* 29 (14): 1487-92. <https://doi.org/10.1101/gad.265439.115>.

Peraza Reyes, Leonardo, et Véronique Berteaux-Lecellier. 2013. « Peroxisomes and Sexual Development in Fungi ». *Frontiers in Physiology* 4. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00244>.

Peraza-Reyes, Leonardo, et Fabienne Malagnac. 2016. *Sexual Development in Fungi. The Mycota I, Growth, Differentiation and Sexuality*. Springer.

Pereira, Suzette L., et J. N. Reeve. 1998. « Histones and Nucleosomes in Archaea and Eukarya: A Comparative Analysis ». *Extremophiles* 2 (3): 141-48. <https://doi.org/10.1007/s007920050053>.

Perrod, S., M. M. Cockell, T. Laroche, H. Renauld, A. L. Ducrest, C. Bonnard, et S. M. Gasser. 2001. « A Cytosolic NAD-Dependent Deacetylase, Hst2p, Can Modulate Nucleolar and

Telomeric Silencing in Yeast ». *The EMBO Journal* 20 (1-2): 197-209.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/20.1.197>.

Peters, Antoine H. F. M., Stefan Kubicek, Karl Mechtler, Roderick J. O'Sullivan, Alwin A. H. A. Derijck, Laura Perez-Burgos, Alexander Kohlmaier, et al. 2003. « Partitioning and Plasticity of Repressive Histone Methylation States in Mammalian Chromatin ». *Molecular Cell* 12 (6): 1577-89.

Pham, Kieu Thi Minh, Yoshihiro Inoue, Ba Van Vu, Hanh Hieu Nguyen, Toru Nakayashiki, Ken-Ichi Ikeda, et Hitoshi Nakayashiki. 2015. « MoSET1 (Histone H3K4 Methyltransferase in Magnaporthe Oryzae) Regulates Global Gene Expression during Infection-Related Morphogenesis ». *PLoS Genetics* 11 (7): e1005385.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005385>.

Phillips, D. M. P. 1963. « The presence of acetyl groups in histones ». *Biochemical Journal* 87 (2): 258-63.

Qi, Shaohua, Lingaonan He, Qin Zhang, Qing Dong, Yajun Wang, Qiuying Yang, Chaoguang Tian, Qun He, et Ying Wang. 2018. « Cross-pathway control gene CPC1/GCN4 coordinates with histone acetyltransferase GCN5 to regulate catalase-3 expression under oxidative stress in Neurospora crassa ». *Free Radical Biology and Medicine* 117 (mars): 218-27.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.02.003>.

Radman-Livaja, Marta, Kitty F. Verzijlbergen, Assaf Weiner, Tibor van Welsem, Nir Friedman, Oliver J. Rando, et Fred van Leeuwen. 2011. « Patterns and Mechanisms of Ancestral Histone Protein Inheritance in Budding Yeast ». *PLoS Biology* 9 (6): e1001075.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001075>.

Raduwan, Hamidah, Allison L. Isola, et William J. Belden. 2013. « Methylation of Histone H3 on Lysine 4 by the Lysine Methyltransferase SET1 Protein Is Needed for Normal Clock Gene Expression ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (12): 8380-90.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.359935>.

Rahman, Shahedur, et Rezuanul Islam. 2011. « Mammalian Sirt1: insights on its biological functions ». *Cell Communication and Signaling: CCS* 9 (mai): 11.  
<https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-11>.

Ramakrishnan, V., J. T. Finch, V. Graziano, P. L. Lee, et R. M. Sweet. 1993a. « Crystal Structure of Globular Domain of Histone H5 and Its Implications for Nucleosome Binding ». *Nature* 362 (6417): 219-23. <https://doi.org/10.1038/362219a0>.

———. 1993b. « Crystal Structure of Globular Domain of Histone H5 and Its Implications for Nucleosome Binding ». *Nature* 362 (6417): 219-23. <https://doi.org/10.1038/362219a0>.

Rea, S., F. Eisenhaber, D. O'Carroll, B. D. Strahl, Z. W. Sun, M. Schmid, S. Opravil, et al. 2000. « Regulation of Chromatin Structure by Site-Specific Histone H3 Methyltransferases ». *Nature* 406 (6796): 593-99. <https://doi.org/10.1038/35020506>.

- Reyes-Dominguez, Yazmid, Stefan Boedi, Michael Sulyok, Gerlinde Wiesenberger, Norbert Stoppacher, Rudolf Krska, et Joseph Strauss. 2012. « Heterochromatin Influences the Secondary Metabolite Profile in the Plant Pathogen *Fusarium Graminearum* ». *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 49 (1): 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.11.002>.
- Reyes-Dominguez, Yazmid, Jin Woo Bok, Harald Berger, E. Keats Shwab, Asjad Basheer, Andreas Gallmetzer, Claudio Scazzocchio, Nancy Keller, et Joseph Strauss. 2010. « Heterochromatic Marks Are Associated with the Repression of Secondary Metabolism Clusters in *Aspergillus Nidulans* ». *Molecular Microbiology* 76 (6): 1376-86. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07051.x>.
- Rhounim, L., J. L. Rossignol, et G. Faugeron. 1992a. « Epimutation of Repeated Genes in *Ascobolus Immersus* ». *The EMBO Journal* 11 (12): 4451-57.
- Rhounim, L, J L Rossignol, et G Faugeron. 1992b. « Epimutation of repeated genes in *Ascobolus immersus* ». *The EMBO Journal* 11 (12): 4451-57.
- Rizet, G, et C Engelmann. 1949. « Contribution à l'étude génétique d'un Ascomycète tétrasporé: *Podospora anserina* » 11: 201-304.
- Rizet, Georges, et Claude Engelmann. 1949. « Contribution à l'étude génétique d'un Ascomycète tétrasporé: *Podospora anserina*. » *Rehm. Rev. Cytol. Biol. Veg.* 11: 201–304.
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova, et W. M. Bonner. 1998. « DNA Double-Stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139 ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (10): 5858-68.
- Rogina, Blanka, et Stephen L. Helfand. 2004. « Sir2 Mediates Longevity in the Fly through a Pathway Related to Calorie Restriction ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (45): 15998-3. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404184101>.
- Romano, N., et G. Macino. 1992. « Quelling: Transient Inactivation of Gene Expression in *Neurospora Crassa* by Transformation with Homologous Sequences ». *Molecular Microbiology* 6 (22): 3343-53.
- Ronemus, M J, M Galbiati, C Ticknor, J Chen, et S L Dellaporta. 1996. « Demethylation-induced developmental pleiotropy in *Arabidopsis* ». *Science (New York, N.Y.)* 273 (5275): 654-57.
- Rosaleny, Lorena E., Oreto Antúnez, Ana B. Ruiz-García, José E. Pérez-Ortín, et Vicente Tordera. 2005. « Yeast HAT1 and HAT2 Deletions Have Different Life-Span and Transcriptome Phenotypes ». *FEBS Letters* 579 (19): 4063-68. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.06.028>.
- Rossignol, J. -L., et G. Faugeron. 1994. « Gene Inactivation Triggered by Recognition between DNA Repeats ». *Experientia* 50 (3): 307-17. <https://doi.org/10.1007/BF01924014>.

Roudier, François, Ikhlak Ahmed, Caroline Bérard, Alexis Sarazin, Tristan Mary-Huard, Sandra Cortijo, Daniel Bouyer, et al. 2011. « Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in Arabidopsis ». *The EMBO Journal* 30 (10): 1928-38. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.103>.

Rountree, Michael R., et Eric U. Selker. 1997. « DNA methylation inhibits elongation but not initiation of transcription in *Neurospora crassa* ». *Genes & Development* 11 (18): 2383-95.

Saksouk, Nehmé, Teresa K. Barth, Celine Ziegler-Birling, Nelly Olova, Agnieszka Nowak, Elodie Rey, Julio Mateos-Langerak, Serge Urbach, Wolf Reik, Maria-Elena Torres-Padilla, Axel Imhof, Jérôme Déjardin, et al. 2014. « Redundant Mechanisms to Form Silent Chromatin at Pericentromeric Regions Rely on BEND3 and DNA Methylation ». *Molecular Cell* 56 (4): 580-94. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.10.001>.

Saksouk, Nehmé, Teresa K. Barth, Celine Ziegler-Birling, Nelly Olova, Agnieszka Nowak, Elodie Rey, Julio Mateos-Langerak, Serge Urbach, Wolf Reik, Maria-Elena Torres-Padilla, Axel Imhof, et Jérôme Déjardin. 2014. « Redundant Mechanisms to Form Silent Chromatin at Pericentromeric Regions Rely on BEND3 and DNA Methylation ». *Molecular Cell* 56 (4): 580-94. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.10.001>.

Samarajeewa, Dilini A., Pegan A. Sauls, Kevin J. Sharp, Zachary J. Smith, Hua Xiao, Katie M. Groskreutz, Tyler L. Malone, et al. 2014. « Efficient Detection of Unpaired DNA Requires a Member of the Rad54-like Family of Homologous Recombination Proteins ». *Genetics* 198 (3): 895-904. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.168187>.

Sandman, Kathleen, et John N. Reeve. 2006. « Archaeal Histones and the Origin of the Histone Fold ». *Current Opinion in Microbiology* 9 (5): 520-25. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.003>.

Santos-Rosa, Helena, Robert Schneider, Bradley E. Bernstein, Nickoletta Karabetsou, Antonin Morillon, Christoph Weise, Stuart L. Schreiber, Jane Mellor, et Tony Kouzarides. 2003. « Methylation of Histone H3 K4 Mediates Association of the Isw1p ATPase with Chromatin ». *Molecular Cell* 12 (5): 1325-32.

Saupe, Sven J. 2011. « The [Het-s] Prion of *Podospora anserina* and Its Role in Heterokaryon Incompatibility ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22 (5): 460-68. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2011.02.019>.

Schotanus, Klaas, Jessica L. Soyer, Lanelle R. Connolly, Jonathan Grandaubert, Petra Happel, Kristina M. Smith, Michael Freitag, et Eva H. Stukenbrock. 2015. « Histone Modifications Rather than the Novel Regional Centromeres of *Zyoseptoria tritici* Distinguish Core and Accessory Chromosomes ». *Epigenetics & Chromatin* 8: 41. <https://doi.org/10.1186/s13072-015-0033-5>.

Seiboth, Bernhard, Razieh Aghcheh Karimi, Pallavi A. Phatale, Rita Linke, Lukas Hartl, Dominik G. Sauer, Kristina M. Smith, Scott E. Baker, Michael Freitag, et Christian P. Kubicek. 2012. « The Putative Protein Methyltransferase LAE1 Controls Cellulase Gene Expression in

Trichoderma Reesei ». *Molecular Microbiology* 84 (6): 1150-64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08083.x>.

Selker, E. U., et J. N. Stevens. 1985. « DNA Methylation at Asymmetric Sites Is Associated with Numerous Transition Mutations. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82 (23): 8114-18. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.23.8114>.

Selker, E. U., et J. N. Stevens. 1987. « Signal for DNA Methylation Associated with Tandem Duplication in Neurospora Crassa. » *Molecular and Cellular Biology* 7 (3): 1032-38. <https://doi.org/10.1128/MCB.7.3.1032>.

Selker, Eric U. 2002. « Repeat-Induced Gene Silencing in Fungi ». *Advances in Genetics* 46: 439-50.

Sequeira-Mendes, Joana, Irene Aragüez, Ramón Peiró, Raul Mendez-Giraldez, Xiaoyu Zhang, Steven E. Jacobsen, Ugo Bastolla, et Crisanto Gutierrez. 2014. « The Functional Topography of the Arabidopsis Genome Is Organized in a Reduced Number of Linear Motifs of Chromatin States[C][W] ». *The Plant Cell* 26 (6): 2351-66. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.124578>.

Serrano, Lourdes, Berta N. Vazquez, et Jay Tischfield. 2013. « Chromatin Structure, Pluripotency and Differentiation ». *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 238 (3): 259-70. <https://doi.org/10.1177/1535370213480718>.

Seymour, Michael, Lexiang Ji, Alex M. Santos, Masayuki Kamei, Takahiko Sasaki, Evelina Y. Basenko, Robert J. Schmitz, Xiaoyu Zhang, et Zachary A. Lewis. 2016. « Histone H1 Limits DNA Methylation in Neurospora Crassa ». *G3 (Bethesda, Md.)* 6 (7): 1879-89. <https://doi.org/10.1534/g3.116.028324>.

Shaver, Scott, J. Armando Casas-Mollano, Ronald L. Cerny, et Heriberto Cerutti. 2010. « Origin of the Polycomb Repressive Complex 2 and Gene Silencing by an E(z) Homolog in the Unicellular Alga Chlamydomonas ». *Epigenetics* 5 (4): 301-12.

Shen, Xuetong, et Martin A Gorovsky. 1996. « Linker Histone H1 Regulates Specific Gene Expression but Not Global Transcription In Vivo ». *Cell* 86 (3): 475-83. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80120-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80120-8).

Shilatifard, Ali. 2012. « The COMPASS Family of Histone H3K4 Methylases: Mechanisms of Regulation in Development and Disease Pathogenesis ». *Annual Review of Biochemistry* 81: 65-95. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-051710-134100>.

Shimizu, Motoyuki, Shunsuke Masuo, Tomoya Fujita, Yuki Doi, Yosuke Kamimura, et Naoki Takaya. 2012. « Hydrolase Controls Cellular NAD, Sirtuin, and Secondary Metabolites ». *Molecular and Cellular Biology* 32 (18): 3743-55. <https://doi.org/10.1128/MCB.00032-12>.

Shiu, P. K., N. B. Raju, D. Zickler, et R. L. Metzenberg. 2001. « Meiotic Silencing by Unpaired DNA ». *Cell* 107 (7): 905-16.

Shogren-Knaak, Michael, Haruhiko Ishii, Jian-Min Sun, Michael J. Pazin, James R. Davie, et Craig L. Peterson. 2006. « Histone H4-K16 Acetylation Controls Chromatin Structure and Protein Interactions ». *Science (New York, N.Y.)* 311 (5762): 844-47. <https://doi.org/10.1126/science.1124000>.

Shuai, Wendi, Jiangxue Wu, Shuai Chen, Ranyi Liu, Zhihua Ye, Chunmei Kuang, Xiang Fu, et al. 2018. « SUV39H2 Promotes Colorectal Cancer Proliferation and Metastasis via Tri-Methylation of the SLIT1 Promoter ». *Cancer Letters* 422 (mai): 56-69. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.02.023>.

Silar, P. 1995. « Two new easy-to-use vectors for transformations » 42: 73.

Silar, P, et M Picard. 1994. « Increased longevity of EF-1 alpha high-fidelity mutants in *Podospora anserina* ». *Journal of Molecular Biology* 235 (1): 231-36.

Silar, Philippe. 2011. « Grafting as a method for studying development in the filamentous fungus *Podospora anserina* ». *Fungal biology* 115 (8): 793-802. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.06.005>.

Silar, Philippe. 2013. *Podospora anserina: From Laboratory to Biotechnology*. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-39339-6\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-39339-6_12).

Silar, Philippe, Jean-Marc Dauget, Valérie Gautier, Pierre Grognet, Michelle Chablat, Sylvie Hermann-Le Denmat, Arnaud Couloux, Patrick Wincker, et Robert Debuchy. 2018. « A Gene Graveyard in the Genome of the Fungus *Podospora Comata* ». *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, octobre. <https://doi.org/10.1007/s00438-018-1497-3>.

Simon, Jeffrey A., et Robert E. Kingston. 2013. « Occupying Chromatin: Polycomb Mechanisms for Getting to Genomic Targets, Stopping Transcriptional Traffic, and Staying Put ». *Molecular Cell* 49 (5): 808-24. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.02.013>.

Simpson, R. T. 1978. « Structure of the Chromatosome, a Chromatin Particle Containing 160 Base Pairs of DNA and All the Histones ». *Biochemistry* 17 (25): 5524-31.

Sims, Robert J., Chi-Fu Chen, Helena Santos-Rosa, Tony Kouzarides, Smita S. Patel, et Danny Reinberg. 2005. « Human but Not Yeast CHD1 Binds Directly and Selectively to Histone H3 Methylated at Lysine 4 via Its Tandem Chromodomains ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (51): 41789-92. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500395200>.

Sims, Robert J., Kenichi Nishioka, et Danny Reinberg. 2003. « Histone Lysine Methylation: A Signature for Chromatin Function ». *Trends in Genetics: TIG* 19 (11): 629-39. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.09.007>.

Smith, J. S., C. B. Brachmann, I. Celic, M. A. Kenna, S. Muhammad, V. J. Starai, J. L. Avalos, et al. 2000. « A Phylogenetically Conserved NAD<sup>+</sup>-Dependent Protein Deacetylase Activity in the Sir2 Protein Family ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (12): 6658-63.



- So, Kum-Kang, Yo-Han Ko, Jeesun Chun, Jyotiranjana Bal, Junhyun Jeon, Jung-Mi Kim, Jaeyoung Choi, Yong-Hwan Lee, Jin Hoe Huh, et Dae-Hyuk Kim. 2018. « Global DNA Methylation in the Chestnut Blight Fungus *Cryphonectria parasitica* and Genome-Wide Changes in DNA Methylation Accompanied with Sectorization ». *Frontiers in Plant Science* 9 (février). <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00103>.
- Soyer, Jessica L., Mennat El Ghalid, Nicolas Glaser, Bénédicte Ollivier, Juliette Linglin, Jonathan Grandaubert, Marie-Hélène Balesdent, et al. 2014. « Epigenetic Control of Effector Gene Expression in the Plant Pathogenic Fungus *Leptosphaeria Maculans* ». *PLoS Genetics* 10 (3): e1004227. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004227>.
- Soyer, Jessica L., Mareike Möller, Klaas Schotanus, Lanelle R. Connolly, Jonathan M. Galazka, Michael Freitag, et Eva H. Stukenbrock. 2015. « Chromatin Analyses of Zymoseptoria Tritici: Methods for Chromatin Immunoprecipitation Followed by High-Throughput Sequencing (ChIP-Seq) ». *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 79 (juin): 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.03.006>.
- Stoler, S., K. C. Keith, K. E. Curnick, et M. Fitzgerald-Hayes. 1995. « A Mutation in CSE4, an Essential Gene Encoding a Novel Chromatin-Associated Protein in Yeast, Causes Chromosome Nondisjunction and Cell Cycle Arrest at Mitosis ». *Genes & Development* 9 (5): 573-86.
- Strahl, B. D., et C. D. Allis. 2000. « The Language of Covalent Histone Modifications ». *Nature* 403 (6765): 41-45. <https://doi.org/10.1038/47412>.
- Straight, Aaron F., Wenying Shou, Gustave J. Dowd, Christoph W. Turck, Raymond J. Deshaies, Alexander D. Johnson, et Danesh Moazed. 1999. « Net1, a Sir2-Associated Nucleolar Protein Required for rDNA Silencing and Nucleolar Integrity ». *Cell* 97 (2): 245-56. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80734-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80734-5).
- Studt, Lena, Slavica Janevska, Birgit Arndt, Stefan Boedi, Michael Sulyok, Hans-Ulrich Humpf, Bettina Tudzynski, et Joseph Strauss. 2016. « Lack of the COMPASS Component Ccl1 Reduces H3K4 Trimethylation Levels and Affects Transcription of Secondary Metabolite Genes in Two Plant-Pathogenic Fusarium Species ». *Frontiers in Microbiology* 7: 2144. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02144>.
- Studt, Lena, Sarah M. Rösler, Immo Burkhardt, Birgit Arndt, Michael Freitag, Hans-Ulrich Humpf, Jeroen S. Dickschat, et Bettina Tudzynski. 2016. « Knock-down of the Methyltransferase Kmt6 Relieves H3K27me3 and Results in Induction of Cryptic and Otherwise Silent Secondary Metabolite Gene Clusters in Fusarium Fujikuroi ». *Environmental Microbiology* 18 (11): 4037-54. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13427>.
- Swaminathan, Jyothishmathi, Ellen M. Baxter, et Victor G. Corces. 2005. « The Role of Histone H2Av Variant Replacement and Histone H4 Acetylation in the Establishment of Drosophila Heterochromatin ». *Genes & Development* 19 (1): 65-76. <https://doi.org/10.1101/gad.1259105>.

Swanson, Mark J., Hongfang Qiu, Laarni Sumibcay, Anna Krueger, Soon-ja Kim, Krishnamurthy Natarajan, Sungpil Yoon, et Alan G. Hinnebusch. 2003. « A Multiplicity of Coactivators Is Required by Gcn4p at Individual Promoters in Vivo ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (8): 2800-2820.

Tachibana, Makoto, Kenji Sugimoto, Masami Nozaki, Jun Ueda, Tsutomu Ohta, Misao Ohki, Mikiko Fukuda, et al. 2002. « G9a Histone Methyltransferase Plays a Dominant Role in Euchromatic Histone H3 Lysine 9 Methylation and Is Essential for Early Embryogenesis ». *Genes & Development* 16 (14): 1779-91. <https://doi.org/10.1101/gad.989402>.

Tachibana, Makoto, Jun Ueda, Mikiko Fukuda, Naoki Takeda, Tsutomu Ohta, Hiroko Iwanari, Toshiko Sakihama, Tatsuhiko Kodama, Takao Hamakubo, et Yoichi Shinkai. 2005. « Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9 ». *Genes & Development* 19 (7): 815-26. <https://doi.org/10.1101/gad.1284005>.

Tamaru, H., et E. U. Selker. 2001. « A Histone H3 Methyltransferase Controls DNA Methylation in *Neurospora Crassa* ». *Nature* 414 (6861): 277-83. <https://doi.org/10.1038/35104508>.

Tamaru, Hisashi, Xing Zhang, Debra McMillen, Prim B. Singh, Jun-ichi Nakayama, Shiv I. Grewal, C. David Allis, Xiaodong Cheng, et Eric U. Selker. 2003. « Trimethylated Lysine 9 of Histone H3 Is a Mark for DNA Methylation in *Neurospora Crassa* ». *Nature Genetics* 34 (1): 75-79. <https://doi.org/10.1038/ng1143>.

Tanaka, Hiromitsu, Naoko Iguchi, Ayako Isotani, Kouichi Kitamura, Yoshiro Toyama, Yasuhiro Matsuoka, Masayoshi Onishi, et al. 2005. « HANP1/H1T2, a Novel Histone H1-like Protein Involved in Nuclear Formation and Sperm Fertility ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (16): 7107-19. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.16.7107-7119.2005>.

Tang, Yong, Marc A Holbert, Hugo Wurtele, Katrina Meeth, Walter Rocha, Marlene Gharib, Eva Jiang, et al. 2008. « Fungal Rtt109 histone acetyltransferase is an unexpected structural homolog of metazoan p300/CBP ». *Nature structural & molecular biology* 15 (7): 738-45. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1448>.

Tao, Randa, Mitchell C. Coleman, J. Daniel Pennington, Ozkan Ozden, Seong-Hoon Park, Haiyan Jiang, Hyun-Seok Kim, et al. 2010. « Sirt3-Mediated Deacetylation of Evolutionarily Conserved Lysine 122 Regulates MnSOD Activity in Response to Stress ». *Molecular Cell* 40 (6): 893-904. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.013>.

Taunton, J., C. A. Hassig, et S. L. Schreiber. 1996. « A Mammalian Histone Deacetylase Related to the Yeast Transcriptional Regulator Rpd3p ». *Science* 272 (5260): 408-11. <https://doi.org/10.1126/science.272.5260.408>.

Taverna, Sean D., Serge Ilin, Richard S. Rogers, Jason C. Tanny, Heather Lavender, Haitao Li, Lindsey Baker, et al. 2006. « Yng1 PHD Finger Binding to H3 Trimethylated at K4 Promotes

- NuA3 HAT Activity at K14 of H3 and Transcription at a Subset of Targeted ORFs ». *Molecular cell* 24 (5): 785-96. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.10.026>.
- Taylor, David H., Erin Tsi-Jia Chu, Roman Spektor, et Paul D. Soloway. 2015. « Long Non-Coding RNA Regulation of Reproduction and Development ». *Molecular reproduction and development* 82 (12): 932-56. <https://doi.org/10.1002/mrd.22581>.
- Testa, Alison C., Richard P. Oliver, et James K. Hane. 2016. « OcculterCut: A Comprehensive Survey of AT-Rich Regions in Fungal Genomes ». *Genome Biology and Evolution* 8 (6): 2044-64. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw121>.
- Thakar, Amit, Pooja Gupta, Toyotaka Ishibashi, Ron Finn, Begonia Silva-Moreno, Susumu Uchiyama, Kiichi Fukui, Miroslav Tomschik, Juan Ausio, et Jordanka Zlatanova. 2009. « H2A.Z and H3.3 Histone Variants Affect Nucleosome Structure: Biochemical and Biophysical Studies ». *Biochemistry* 48 (46): 10852-57. <https://doi.org/10.1021/bi901129e>.
- Thatcher, T. H., et M. A. Gorovsky. 1994. « Phylogenetic Analysis of the Core Histones H2A, H2B, H3, and H4 ». *Nucleic Acids Research* 22 (2): 174-79.
- Thompson, Paul R., Dongxia Wang, Ling Wang, Marcella Fulco, Natalia Pediconi, Dianzheng Zhang, Woojin An, et al. 2004. « Regulation of the P300 HAT Domain via a Novel Activation Loop ». *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (4): 308-15. <https://doi.org/10.1038/nsmb740>.
- Thon, G., et J. Verhein-Hansen. 2000. « Four Chromo-Domain Proteins of *Schizosaccharomyces Pombe* Differentially Repress Transcription at Various Chromosomal Locations ». *Genetics* 155 (2): 551-68.
- Thorstensen, Tage, Andreas Fischer, Silje V. Sandvik, Sylvia S. Johnsen, Paul E. Grini, Gunter Reuter, et Reidunn B. Aalen. 2006. « The Arabidopsis SUV4 protein is a nucleolar histone methyltransferase with preference for monomethylated H3K9 ». *Nucleic Acids Research* 34 (19): 5461-70. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl687>.
- Till, Susanne, et Andreas G. Ladurner. 2009. « Sensing NAD Metabolites through Macro Domains ». *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 14 (janvier): 3246-58.
- Tschiersch, B., A. Hofmann, V. Krauss, R. Dorn, G. Korge, et G. Reuter. 1994. « The Protein Encoded by the *Drosophila* Position-Effect Variegation Suppressor Gene *Su(Var)3-9* Combines Domains of Antagonistic Regulators of Homeotic Gene Complexes ». *The EMBO Journal* 13 (16): 3822-31.
- Turgeon, B Gillian, et R. Debuchy. 2007. « *Cochliobolus* and *Podospora*: mechanism of sex determination and the evolution of reproductive lifestyle ». In *Sex in Fungi, Molecular Determination and Evolutionary Implications*.
- Turner, James M. A., Shantha K. Mahadevaiah, Oscar Fernandez-Capetillo, André Nussenzweig, Xiaoling Xu, Chu-Xia Deng, et Paul S. Burgoyne. 2005. « Silencing of

Unsynapsed Meiotic Chromosomes in the Mouse ». *Nature Genetics* 37 (1): 41-47. <https://doi.org/10.1038/ng1484>.

van der Lee, Robin, Benjamin Lang, Kai Kruse, Jörg Gsponer, Natalia Sánchez de Groot, Martijn A. Huynen, Andreas Matouschek, Monika Fuxreiter, et M. Madan Babu. 2014. « Intrinsically Disordered Segments Affect Protein Half-Life in the Cell and during Evolution ». *Cell Reports* 8 (6): 1832-44. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.055>.

Veiseth, Silje V., Mohummad A. Rahman, Kyoko L. Yap, Andreas Fischer, Wolfgang Egge-Jacobsen, Gunter Reuter, Ming-Ming Zhou, Reidunn B. Aalen, et Tage Thorstensen. 2011. « The SUVR4 Histone Lysine Methyltransferase Binds Ubiquitin and Converts H3K9me1 to H3K9me3 on Transposon Chromatin in Arabidopsis ». *PLoS Genetics* 7 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001325>.

Verreault, A., P. D. Kaufman, R. Kobayashi, et B. Stillman. 1996. « Nucleosome Assembly by a Complex of CAF-1 and Acetylated Histones H3/H4 ». *Cell* 87 (1): 95-104.

Volpe, Thomas A., Catherine Kidner, Ira M. Hall, Grace Teng, Shiv I. S. Grewal, et Robert A. Martienssen. 2002. « Regulation of Heterochromatic Silencing and Histone H3 Lysine-9 Methylation by RNAi ». *Science (New York, N.Y.)* 297 (5588): 1833-37. <https://doi.org/10.1126/science.1074973>.

Wang, Xuying, Yen-Ping Hsueh, Wenjun Li, Anna Floyd, Rebecca Skalsky, et Joseph Heitman. 2010. « Sex-induced silencing defends the genome of *Cryptococcus neoformans* via RNAi ». *Genes & Development* 24 (22): 2566-82. <https://doi.org/10.1101/gad.1970910>.

Wang, Yamei, et Heidi A. Tissenbaum. 2006. « Overlapping and Distinct Functions for a *Caenorhabditis Elegans* SIR2 and DAF-16/FOXO ». *Mechanisms of Ageing and Development* 127 (1): 48-56. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.09.005>.

Wang, Yu, Bharat Reddy, James Thompson, Hengbin Wang, Ken-ichi Noma, John R. Yates, et Songtao Jia. 2009. « Regulation of Set9-Mediated H4K20 Methylation by a PWWP Domain Protein ». *Molecular Cell* 33 (4): 428-37. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.02.002>.

Wang, Yulong, Tiantian Wang, Lintao Qiao, Jianyu Zhu, Jinrui Fan, Tingting Zhang, Zhang-Xun Wang, Wanzhen Li, Anhui Chen, et Bo Huang. 2017. « DNA Methyltransferases Contribute to the Fungal Development, Stress Tolerance and Virulence of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium Robertsii* ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 101 (10): 4215-26. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8197-5>.

Weaver, Jamie R., et Marisa S. Bartolomei. 2014. « Chromatin Regulators of Genomic Imprinting ». *Biochimica et biophysica acta* 1839 (3): 169-77. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.12.002>.

Wierzbicki, Andrzej T., et Andrzej Jerzmanowski. 2005. « Suppression of Histone H1 Genes in Arabidopsis Results in Heritable Developmental Defects and Stochastic Changes in DNA Methylation ». *Genetics* 169 (2): 997-1008. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.031997>.

- Wu, Hui, Xiuzhen Chen, Jun Xiong, Yingfeng Li, Hong Li, Xiaojun Ding, Sheng Liu, She Chen, Shaorong Gao, et Bing Zhu. 2011. « Histone methyltransferase G9a contributes to H3K27 methylation in vivo ». *Cell Research* 21 (2): 365-67. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.157>.
- Wu, Min, Peng Fei Wang, Jung Shin Lee, Skylar Martin-Brown, Laurence Florens, Michael Washburn, et Ali Shilatifard. 2008. « Molecular Regulation of H3K4 Trimethylation by Wdr82, a Component of Human Set1/COMPASS ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (24): 7337-44. <https://doi.org/10.1128/MCB.00976-08>.
- Wu, Zhouran, Justin Connolly, et Kyle K. Biggar. 2017. « Beyond Histones - the Expanding Roles of Protein Lysine Methylation ». *The FEBS Journal* 284 (17): 2732-44. <https://doi.org/10.1111/febs.14056>.
- Wysocki, Robert, Ali Javaheri, Stéphane Allard, Fei Sha, Jacques Côté, et Stephen J. Kron. 2005. « Role of Dot1-Dependent Histone H3 Methylation in G1 and S Phase DNA Damage Checkpoint Functions of Rad9 ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (19): 8430-43. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.19.8430-8443.2005>.
- Xhemalce, Blerta, et Tony Kouzarides. 2010. « A Chromodomain Switch Mediated by Histone H3 Lys 4 Acetylation Regulates Heterochromatin Assembly ». *Genes & Development* 24 (7): 647-52. <https://doi.org/10.1101/gad.1881710>.
- Xiao, Jun, Un-Sa Lee, et Doris Wagner. 2016. « Tug of War: Adding and Removing Histone Lysine Methylation in Arabidopsis ». *Current Opinion in Plant Biology* 34 (décembre): 41-53. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.08.002>.
- Xiao, Jun, et Doris Wagner. 2015. « Polycomb repression in the regulation of growth and development in Arabidopsis ». *Current Opinion in Plant Biology*, SI: Growth and development, 23 (février): 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.10.003>.
- Xin, Qi, Yajuan Gong, Xinxing Lv, Guanjun Chen, et Weifeng Liu. 2013. « Trichoderma Reesei Histone Acetyltransferase Gcn5 Regulates Fungal Growth, Conidiation, and Cellulase Gene Expression ». *Current Microbiology* 67 (5): 580-89. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0396-4>.
- Xu, Feng, Qiongyi Zhang, Kangling Zhang, Wei Xie, et Michael Grunstein. 2007. « Sir2 deacetylates histone H3 lysine 56 to regulate telomeric heterochromatin structure in yeast ». *Molecular cell* 27 (6): 890-900. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.021>.
- Xu, W., D. G. Edmondson, Y. A. Evrard, M. Wakamiya, R. R. Behringer, et S. Y. Roth. 2000. « Loss of Gcn5l2 Leads to Increased Apoptosis and Mesodermal Defects during Mouse Development ». *Nature Genetics* 26 (2): 229-32. <https://doi.org/10.1038/79973>.
- Yang, Bo, Bernadette M. M. Zwaans, Mark Eckersdorff, et David B. Lombard. 2009. « The sirtuin SIRT6 deacetylates H3 K56Ac in vivo to promote genomic stability ». *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 8 (16): 2662-63.

- Yang, Kunlong, Linlin Liang, Fanlei Ran, Yinghang Liu, Zhenguo Li, Huahui Lan, Peili Gao, et al. 2016. « The DmtA Methyltransferase Contributes to *Aspergillus Flavus* Conidiation, Sclerotial Production, Aflatoxin Biosynthesis and Virulence ». *Scientific Reports* 6 (mars): 23259. <https://doi.org/10.1038/srep23259>.
- Yang, Qiuying, Qiaohong Anne Ye, et Yi Liu. 2015. « Mechanism of siRNA production from repetitive DNA ». *Genes & Development* 29 (5): 526-37. <https://doi.org/10.1101/gad.255828.114>.
- Yebrá, Maria J., et Ashok S. Bhagwat. 1995. « A Cytosine Methyltransferase Converts 5-Methylcytosine in DNA to Thymine ». *Biochemistry* 34 (45): 14752-57. <https://doi.org/10.1021/bi00045a016>.
- Yoda, K., S. Ando, S. Morishita, K. Houchi, K. Hashimoto, K. Takeyasu, et T. Okazaki. 2000. « Human Centromere Protein A (CENP-A) Can Replace Histone H3 in Nucleosome Reconstitution in Vitro ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (13): 7266-71. <https://doi.org/10.1073/pnas.130189697>.
- Zhang, Haiying, Douglas N. Roberts, et Bradley R. Cairns. 2005. « Genome-Wide Dynamics of Htz1, a Histone H2A Variant That Poises Repressed/Basal Promoters for Activation through Histone Loss ». *Cell* 123 (2): 219-31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.036>.
- Zhang, Qiang, Suvobrata Chakravarty, Dario Ghersi, Lei Zeng, Alexander N. Plotnikov, Roberto Sanchez, et Ming-Ming Zhou. 2010. « Biochemical Profiling of Histone Binding Selectivity of the Yeast Bromodomain Family ». *PloS One* 5 (1): e8903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008903>.
- Zhang, Xiaoli, Xinqiang Liu, Yanli Zhao, Jiasen Cheng, Jiatao Xie, Yanping Fu, Daohong Jiang, et Tao Chen. 2016a. « Histone H3 Lysine 9 Methyltransferase DIM5 Is Required for the Development and Virulence of *Botrytis cinerea* ». *Frontiers in Microbiology* 7 (août). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01289>.
- Zhang, Xiaoyu, Oliver Clarenz, Shawn Cokus, Yana V. Bernatavichute, Matteo Pellegrini, Justin Goodrich, et Steven E. Jacobsen. 2007. « Whole-Genome Analysis of Histone H3 Lysine 27 Trimethylation in *Arabidopsis* ». *PLOS Biology* 5 (5): e129. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050129>.
- Zhang, Xiujun, Yinbo Qu, et Yuqi Qin. 2016. « Expression and Chromatin Structures of Cellulolytic Enzyme Gene Regulated by Heterochromatin Protein 1 ». *Biotechnology for Biofuels* 9: 206. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0624-9>.
- Zheng, Qian, Rui Hou, null Juanyu, null Zhang, Jiwen Ma, Zhongshou Wu, Guanghui Wang, Chenfang Wang, et Jin-Rong Xu. 2013. « The MAT Locus Genes Play Different Roles in Sexual Reproduction and Pathogenesis in *Fusarium Graminearum* ». *PloS One* 8 (6): e66980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066980>.

Zofall, Martin, Jim Persinger, Stefan R. Kassabov, et Blaine Bartholomew. 2006. « Chromatin Remodeling by ISW2 and SWI/SNF Requires DNA Translocation inside the Nucleosome ». *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (4): 339-46. <https://doi.org/10.1038/nsmb1071>.

Zofall, Martin, Soichiro Yamanaka, Francisca E. Reyes-Turcu, Ke Zhang, Chanan Rubin, et Shiv I. S. Grewal. 2012. « RNA Elimination Machinery Targeting Meiotic MRNAs Promotes Facultative Heterochromatin Formation ». *Science (New York, N.Y.)* 335 (6064): 96-100. <https://doi.org/10.1126/science.1211651>.





## Fonctions et organisations de l'hétérochromatine au cours du développement sexué chez le champignon filamenteux *Podospora anserina*

Epigénétique, champignons filamenteux, hétérochromatine constitutive, hétérochromatine facultative, H3K9me3, H3K27me3, H3K4me3, Repeat Induced Point Mutation, développement sexué

Pour se défendre des effets délétères des éléments transposables, les peizomycotina ont développé un système de défense génétique et épigénétique appelé « Repeat Induced Point Mutation » (RIP). Chez *N. crassa*, le RIP survient dans la cellule dicaryotique avant la caryogamie et conduit à la méthylation *de novo* des cytosines (5mC) incluses dans les séquences répétées de chacun des noyaux parentaux haploïdes. De plus, certaines de ces cytosines sont la cible d'un processus de mutation qui les transforme en thymines. Cette étape est suivie par la mise en place locale de l'hétérochromatine constitutive permettant une répression transcriptionnelle durable des séquences cibles du RIP au cours des divisions nucléaires. L'acteur majeur du RIP correspond à une cytosine méthyltransférase putative appelée RID (RIP Defective). Bien que son génome ne montre pas une quantité significative de 5mC, l'inactivation de PaRid chez *Podospora anserina* aboutit à un blocage du développement sexué survenant après la fécondation. Dans ce contexte, nous avons voulu déterminer si la fonction de PaRid dans le développement sexué consiste à éteindre l'expression de gènes cibles via l'installation de foyers d'hétérochromatine constitutive aux loci concernés. Pour ce faire, nous avons identifié les gènes *PaKmt1* et *PaHP1*, codant respectivement l'histone méthyltransférase PaKmt1 (l'homologue de SU(VAR)39 qui catalyse la tri-méthylation du résidu H3K9 (H3K9me3) et PaHP1 (l'homologue de Heterochromatin Protein 1 qui se lie à H3K9me3). Les deux protéines interviennent dans une même voie de régulation qui aboutit à la mise en place de l'hétérochromatine constitutive. Par opposition, PaKmt6, homologue de l'histone méthyltransférase E(Z), correspond à la sous-unité catalytique du complexe PRC2 qui catalyse la marque H3K27me3 pour permettre l'établissement de l'hétérochromatine facultative. Nos résultats ont montré que l'absence de PaKmt1 et PaHP1 ne provoquent que des défauts mineurs. A l'inverse, l'inactivation du gène *PaKmt6* conduit à un ensemble de défauts sévères : croissance végétative altérée, surproduction des gamètes mâles, malformations critiques des fructifications, production très réduite d'ascospores dont la germination est pour partie déficiente. Une étude d'épistasie a montré que les protéines PaRid et PaKmt6 interviennent chacune dans deux voies développementales distinctes. Par ailleurs, nous avons établi par immuno-précipitation de la chromatine les profils de distribution à l'échelle du génome entier des modifications H3K9me3, H3K27me3 et H3K4me3. Caractéristique rare, la marque H3K9me3 colocalise avec H3K27me3 sur des gènes transcriptionnellement réprimés et les séquences répétées ripées. Conformément à sa fonction canonique, H3K4me3 est présente en 5' des gènes transcrits et est exclue des domaines H3K9me3 et H3K27me3. Comme attendue, PaKmt6 est essentielle à la mise en place de la marque H3K27me3, mais, de manière surprenante, elle serait aussi impliquée dans le dépôt et/ou le maintien d'une partie des marques H3K9me3, dévoilant ainsi une voie de méthylation non canonique de ces résidus.

---

## Heterochromatin functions and organizations during sexual development in the filamentous fungus *Podospora anserina*

Epigenetics, filamentous fungi, constitutive heterochromatin, facultative heterochromatin, H3K9me3, H3K27me3, H3K4me3, Repeat Induced Point Mutation, sexual development

In peizomycotina, transposable elements are targeted by a genome defence system named Repeat Induced Point Mutation (RIP). First described in *Neurospora crassa*, RIP occurs before karyogamy in each parental haploid nucleus of the dikaryotic cells and results, within the repeats, in *de novo* methylation of cytosine (5mC) and mutations, mainly C to T transitions. This initial step triggers local assembly of constitutive heterochromatin, which allows transcriptional gene silencing. RID (RIP Defective) is a putative cytosine methyltransferase essential for RIP. Despite the absence of 5mC in its genome, *PaRid* inactivation in *Podospora anserina* results in sexual reproduction arrest right after fertilization. In this context, we asked whether PaRid is required to silence expression of some of sexual development-specific genes by nucleation of constitutive heterochromatin. To this end, we identified *PaKmt1* and *PaHP1* genes encoding respectively the histone methyltransferase PaKmt1 (SU(VAR)39 homologue protein) and the heterochromatin protein 1 (PaHP1). To assemble constitutive heterochromatin, PaKmt1 catalyses tri-methylation of H3K9 (H3K9me3), latter on bound by PaHP1. By contrast, the E(Z) histone methyltransferase homologue PaKmt6, as part of the PRC2 complex, catalyses tri-methylation of H3K27 (H3K27me3) to form facultative heterochromatin. Our results showed that loss of either PaKmt1 or PaHP1 does not cause major defects. Conversely, *PaKmt6* gene inactivation results in severe defects: altered mycelium and vegetative growth rate, overproduction of male gamete, development of crippled fructifications, reduced production ascospores, part of which does not germinate. Furthermore, epistatic study showed that PaRid and PaKmt6 likely act in two different developmental pathways, with respect to sexual reproduction. In addition, using chromatin immuno-precipitation we characterized H3K9me3, H3K27me3 and H3K4me3 genome-wide distribution patterns. We observed an uncommon overlapping distribution between H3K9me3 and H3K27me3 on transcriptionally repressed genes and RIP target repeats. As expected, H3K4me3 localizes in 5' of the transcribed genes and is excluded from the H3K9me3 and H3K27me3 domains. As expected, PaKmt6 is essential for H3K27me3 modification, but surprisingly, could also be responsible for some of the H3K9me3 setting up or maintenance.

Florian Carlier

