

Études de motifs de signalisation amyloïde des bactéries aux champignons filamenteux

Thierry Bardin

► To cite this version:

Thierry Bardin. Études de motifs de signalisation amyloïde des bactéries aux champignons filamenteux. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2020. Français. NNT: 2020BORD0274. tel-03117817

HAL Id: tel-03117817 https://theses.hal.science/tel-03117817

Submitted on 21 Jan 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ SPÉCIALITÉ : GÉNÉTIQUE

Par Thierry BARDIN

ÉTUDES DE MOTIFS DE SIGNALISATION AMYLOÏDE DES BACTÉRIES AUX CHAMPIGNONS FILAMENTEUX

Sous la direction de : Virginie COUSTOU

Soutenue le 11 décembre 2020

Membres du jury :

M. DAIGNAN-FORNIER, Bertrand, Directeur de recherches CNRS Mme. MALAGNAC, Fabienne, Professeur à l'université de Paris Saclay Mme. VOISSET, Cécile, Chargé de recherches INSERM M. ESPAGNE, Eric, Maître de conférences à l'université de Paris Saclay Mme. COUSTOU, Virginie, Chargé de recherche CNRS M. SAUPE, Sven, Directeur de recherches CNRS

Président Rapporteur Rapporteur Directrice de thèse Invité

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury : Mesdames Cécile Voisset et Fabienne Malagnac et Messieur Eric Espagne pour avoir accepté de juger ce travail, ainsi que Monsieur Bertrand Daignan-Fornier pour avoir accepté de présider mon jury de thèse.

J'ai été dans ce labo depuis mon stage de Master 1 jusqu'à la fin de ma thèse, sur 5 années tout de même. Je tiens à remercier Corinne pour avoir accepté de me prendre en stage de Master 1, puis de Master 2, malgré mon côté « boulet », et pour avoir fait preuve d'une grande patience à mon égard.

Je tiens ensuite à remercier l'ensemble des membres du 1^{er} étage à la fois des équipes Podo et Pombe, toujours prêts à aider, pour quelque type de problème que ce soit, que ce soit pour m'aider à trouver des réactifs, pour des d'expériences, et bien d'autres choses, dont j'aurais grand peine à faire l'inventaire exhaustif.

Mais bien sûr, je tiens à remercier particulièrement mon équipe, l'équipe Podo : Sven, Corinne, Fred, Mathieu, Alex, Virginie et Asen.

Je remercie Virginie pour avoir accepté d'être ma directrice de thèse, et pour m'avoir supporté jusqu'au bout de ma thèse : d'un point de vue à la fois scientifique et psychologique, ce qui n'est sans doute pas une chance qu'ont tous les étudiants en thèse pour ce dernier point.

Je remercie les diverses personnes de l'institut qui m'ont aidé au cours de ces années.

Au final, je retiendrai la gentillesse dont ont fait preuve les différentes personnes que j'ai pu croiser ou côtoyer durant ces années.

INT	RODU	ICTION	1		
1	Préambule1				
2	Les cl	Les champignons filamenteux			
	2.1	Généralités	3		
	2.2	Le modèle <i>Podospora anserina</i>	7		
	2.3	L'incompatibilité végétative chez les champignons filamenteux	9		
		2.3.1 Généralité sur l'incompatibilité végétative (IV)	9		
		2.3.2 Déterminants génétiques de l'IV	11		
3	La sig	nalisation par oligomérisation coopérative dans le système immunitaire inné (SI) de	S		
Euc	aryote	·S	17		
	3.1	Généralités sur le SI inné des Eucaryotes supérieurs	17		
	3.2	SI inné et mort cellulaire programmée (PCD)	23		
	3.3	Le concept émergent de SCAF dans le SI inné	29		
	3.4	Les Nod-like receptors	35		
		3.4.1 Généralités	35		
		3.4.2 Les NLRs des animaux	37		
		3.4.3 Les NB-LRR de plantes	43		
		3.4.4 Les NLRs chez les champignons filamenteux	45		
		3.4.4.1 Généralités	45		
		3.4.4.2 Les domaines effecteurs	47		
		HET	47		
		HeLo	49		
		Lipase	55		
		PNP-UDP hydrolases/phosphorylases	57		
		3.4.4.3 NLRs et immunité innée	57		
4	Les a	myloïdes et les prions	63		
	4.1	Définitions : amyloïde et prion	63		
	4.2	Les maladies impliquant des prions PrP ^{sc}	67		
	4.3	Amyloïdoses	71		
	4.4	Les amyloïdes dans les maladies neurodégénératives	73		
	4.5	Les prions de levure	75		
	4.6	Les amyloïdes fonctionnels	81		
		4.6.1 Les amyloïdes fonctionnels prion-like chez les champignons filamenteux	81		
		4.6.1.1 Les systèmes HET-S/NWD2 et HET-s/HET-S chez P. anserina	81		
		4.6.1.2 Autres motifs amyloïdes prion-like dans les champignons filamenteux	85		
		Les motifs HRAM (Het-s Related Amyloid Motif)	85		
		Le motif sigma, σ	87		
		Le motif PP	87		
		<i>4.6.1.3</i> Le système HELLF/FNT1 chez <i>Podospora anserina</i>	89		
		4.6.2 Chez les mammifères : chez l'Homme en particulier	93		

	4.6.3 Chez la drosophile						
	4.6.4 Chez les virus						
	4.6.5 Chez les procaryotes 101						
5	Travail de thèse107						
RESULTATS							
1	ARTICLE 1: « Partial prion cross-seeding between fungal and mammalian amyloid signaling						
motifs »							
2 ARTICLE 2: « Identification of NLR-associated amyloid signaling motifs in filamentous							
bac	teria »157						
3	Etude de protéines à domaine BELL chez <i>P. anserina</i> 214						
DIS	DISCUSSION						
	Comparaison de PaHELLP et CgHELLP 223						
	Trois voies de signalisations parallèles 224						
	PP, RHIM et BASS3						
	Considérations sur l'évolution de la mort cellulaire programmée						
	Perspectives						
Caractérisation structurale des domaines PP et BASS par RMN du solide							
Caractérisation fonctionnelle et structurale des domaines bactériens HeLo-like, BELL							
Étude in vivo des voies de signalisation amyloïde NLR/BELL chez P. anserina et S. coelicolor							
BIBLIOGRAPHIE							

Abréviations

Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
ASC	Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domain
СС	Coiled-Coil domain
CLRs	C-type Lectin Receptors
DAMPs	Danger-Associated Molecular Patterns
EM	Electron Microscopy
ESTs	Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles
ETI	Effector Triggered Immunity
GSDMD	Gasdermine D
GFP	Green Fluorescent Protein
HD	Helical Domain
HELL	HeLo-Like domain
HET	Heterokaryon incompatibility
HRAM	Het-s Related Amyloid Motif
IFN	Interferon
IV	Incompatibilité Végétative
LRR	Leucin-Rich Repeat
MAMPs	Microbe-Associated Molecular Patterns
MAVS	Mitochondrial Antiviral Signaling protein
MLKL	Mixed Lineage Kinase domain-Like
NACHT	Famille de NTPases, nommée d'après NAIP, CIIA, HET-E et TP1
NB-ARC	Nucleotide-Binding domain sub-type
NB-LRR	Nucleotide-Binding domain Leucine-Rich Repeat (LRR)-containing
NBD	Nucleotide-Binding Domain
NLR	Nod-Like Receptor
NTPase	Nucleoside Triphosphatase domain
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PCD	Programmed Cell Death
PFD	Prion Forming Domain
PP	Pseudo-Palindromic amyloid motif
PRRs	Pattern-Recognition Receptors
ΡΤΙ	PAMP-Triggered Immunity
PYD	Pyrin Domain
RHIM	RIP Homotypic Interaction Motifs
RLRs	RIG-I-Like Receptors
RIG-I	Retinoic acid-Inducible Gene 1
RIP	Receptor-Interacting serine/threonine protein kinase
SCAF	Signaling via Cooperative Assembly Formation
SMOC	Supramolecular Organizing Centers
STAND	Signal-Transducing ATPases with Numerous Domains
TLRs	Toll-Like Receptors
TIR	Toll-Interleukin-1 Receptor
ТМ	Transmembrane helix
TRIF	TIR domain–containing adaptor-inducing IFN-β
WHD	Winged Helical Domain

Introduction

INTRODUCTION

1 Préambule

La défense immunitaire, ubiquitaire à tout le vivant, tire son origine de la nécessité pour chaque être vivant de gérer les interactions avec d'autres organismes, que ce soit des parasites, des individus conspécifiques (par exemple dans le cas de certaines espèces de champignons filamenteux ou d'organismes marins coloniaux). On distingue ainsi la xénoreconnaissance lorsqu'il s'agit de détecter et de répondre à un organisme d'une autre espèce, et l'alloreconnaissance dans le cas d'interactions entre conspécifiques. Ces dernières années, des mécanismes généraux communs impliqués dans la défense immunitaire ont été mis en évidence dans les différentes branches du vivant. Ils reposent sur un mécanisme moléculaire commun qui consiste en la formation de complexes supramoléculaires de signalisation appelés signalosomes. Parmi ces complexes, une grande partie est constituée de récepteurs participant à l'immunité innée appelés NLRs (Nod-Like Receptors). Le champignon filamenteux *Podospora anserina*, un organisme modèle pour divers mécanismes, a émergé ces dernières années comme un modèle d'étude pour ces mécanismes de mort cellulaire impliquant des récepteurs de type NLR.

Ce travail de thèse porte sur l'étude dans *Podospora anserina* de ce type de voies de mort cellulaire programmée, impliquant une transduction amyloïde du signal. La découverte de ces voies de mort cellulaire impliquant une transduction d'un signal amyloïde dérive de l'étude de systèmes d'alloreconnaissance, dits d'incompatibilité végétative, dont l'un implique un prion, le premier décrit comme étant un prion dit fonctionnel, eu égard à sa fonction biologique. Ce type de voies de transduction du signal apparait maintenant conservé des bactéries aux animaux et aux champignons filamenteux.

Nous avons besoin d'introduire plusieurs notions afin de permettre la compréhension du travail effectué durant cette thèse. Nous allons donc commencer par décrire l'organisation générale des champignons filamenteux et plus spécifiquement de notre modèle d'étude *Podospora anserina*, et l'étude de l'incompatibilité végétative dans cet organisme et dans les espèces apparentées. Puis, nous présenterons certains principes généraux de fonctionnement moléculaire de certaines voies de signalisation immunitaire impliquant la formation de signalosomes et la place des protéines de type NLR dans ces systèmes. Enfin, on finira par la description des prions et amyloïdes, protéines à la réputation sulfureuse due à leur implication dans de nombreuses pathologies, mais qui ont en réalité un rôle fonctionnel dans de nombreux organismes.



Figure 1. Vue macroscopique et microscopique du mycélium du champignon filamenteux *Podospora anserina*.

(A) La structure végétative ou mycélium est un réseau de filaments interconnectés ou d'hyphes apparaissant ici sous forme de fils noirs. Ce mycélium résulte d'une croissance de 24h après la germination des spores. (B) Les hyphes sont observés par microscopie optique. Notez la compartimentation dans les cellules par des parois transversales appelées septa (têtes de flèches) qui sont perforées. Notez également que les hyphes sont capables de créer des branches. Les noyaux peuvent être détectés à l'aide de l'optique Nomarski (flèches). (d'après (Pinan-Lucarré et al., 2007))

2 Les champignons filamenteux

2.1 Généralités

Les champignons sont un règne eucaryote dont le sous-règne dikarya est celui qui compte probablement le plus d'espèces. On y distingue en fonction du type de structures reproductives, les ascomycètes et les basidiomycètes. Dans ces deux divisions, on trouve à la fois des formes unicellulaires (levures) et des formes filamenteuses. Les champignons filamenteux différencient une structure syncytiale appelée thalle (ou mycélium) durant leur cycle végétatif **(Figure 1)**.

Le cycle de vie d'un champignon filamenteux débute par la germination d'une spore qui a un diamètre de quelques microns à quelques dizaines de microns en général. Dans un environnement humide et riche en nutriments, la spore commence sa germination. Un tube de germination se forme et s'allonge pour former une cellule filamenteuse plurinucléée appelée hyphe. Au fur et à mesure de sa croissance qui se fait par extension apicale, l'hyphe s'allonge et se cloisonne en articles séparés par des cloisons (incomplètes) appelées septa. De nouveaux hyphes se forment, se branchent entre eux par des fusions cellulaires appelées anastomoses. Cette croissance des hyphes couplée aux anastomoses aboutit à la formation d'un réseau complexe de filaments, le mycélium (Hickey et al., 2002). Le mycélium est un organe d'invasion du milieu qui permet au champignon filamenteux d'explorer le milieu afin d'en tirer ses ressources nutritives. Quand les ressources viennent à manquer ou quand certaines conditions sont réunies, des structures reproductives se différencient à partir du mycélium. Les ascomycètes peuvent aussi former des conidiophores qui produisent des spores asexuées et/ou des asques qui produisent des spores sexuées. De nombreuses espèces de basidiomycètes forment des fructifications macroscopiques constituées de mycélium dense et aérien qui génère des spores sexuées.

Les champignons filamenteux sont des organismes hétérotrophes tirant leur énergie d'une grande variété de sources nutritionnelles. La plupart des espèces de champignons filamenteux sont des saprotrophes, c'est-à-dire qu'ils se nourrissent de matière organique morte en sécrétant dans le milieu des enzymes extracellulaires telles que les cellulases, pectinases, inulases, protéases et lipases qui leurs permettent de dégrader la matière organique telle que les polysaccharides de plante. Ce sont des acteurs majeurs de la décomposition des débris de végétaux : à titre d'exemple, les polysaccharides provenant de la biomasse végétale constituent environ 80% de la biomasse sur Terre (450 sur 550 gigatonnes de carbone) (Bar-On et al., 2018). A ce titre, les champignons constituent des acteurs majeurs des écosystèmes dont ils permettent le renouvellement. Outre leur rôle majeur de décomposition des sols, ils participent à d'autres types d'interactions biologiques majeures, telles que les interactions avec d'autres organismes : un certain nombre d'espèces de champignons filamenteux

Introduction

sont des biotrophes obligatoires, c'est-à-dire qu'ils dépendent d'autres espèces pour survivre et de ce fait participent à deux grands types d'interaction : le parasitisme et la symbiose (Meyer et al., 2020).

La symbiose, l'interaction bénéfique et durable entre deux organismes vivants, est une association biotique majeure par exemple entre champignons filamenteux et plantes. Ces interactions symbiotiques entre plantes et champignons sont appelées mycorhizes (Bucher et al., 2009). Elles auraient eu lieu pour la première fois il y a 400 millions d'années et auraient permis la colonisation des terres par les plantes. On estime que 70 à 90% des plantes terrestres ont une ou plusieurs interactions symbiotiques avec des champignons appartenant au phylum des Glomeromycota (qui ne sont pas des dikarya) (Hata et al., 2010). Ces symbioses permettent l'amélioration de la captation en eau et nutriments minéraux tels que l'azote (N) et le phosphore (P) pour la plante hôte en échange de carbone fixé par la photosynthèse (sucres) pour le champignon mycorhizien. La mycorhize est un système biologique majeur qui assure l'essentiel de la captation de nutriments par les plantes terrestres et apporte en outre une résistance au stress abiotique et aux pathogènes (Hata et al., 2010). Pour ces raisons, les mycorhizes sont un champ d'étude important dans une optique d'amélioration des cultures agricoles et du bon fonctionnement des écosystèmes naturels.

Cependant, beaucoup de champignons filamenteux sont des pathogènes dévastateurs que ce soient pour les plantes, ou pour les animaux. La perte de rendement agricole annuelle causée par ces organismes atteindrait l'équivalent de ce qui permet de nourrir 600 millions de personnes (Savary et al., 2019). Les champignons pathogènes tuent de 1,5 à 2 millions de personnes annuellement, plus que la malaria et la tuberculose (Meyer et al., 2020). La plupart des plantes d'importance économique sont concernées par les pathogènes fongiques (Dean et al., 2012). Le genre *Fusarium* seul contient plusieurs espèces dont le spectre de spécificité d'hôte et de pathogénicité est très variable. *Fusarium oxysporum* est une de ces espèces capables de s'adapter à un très grand nombre d'hôtes, de la tomate au coton, et *Fusarium graminearum* infecte certaines graminées d'ordre économique important (le blé, le maïs) (Kazan et al., 2012). D'autres espèces de champignons filamenteux, du genre Aspergillus par exemple, peuvent se comporter comme des pathogènes aussi bien pour certaines plantes que pour des espèces animales (chien, homme etc.) (Dagenais and Keller, 2009).

Les *Fusarium* comme les *Aspergilli* appartiennent au règne des Ascomycètes. L'ascomycète le plus étudié est certainement la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les levures sont des organismes unicellulaires mais la grande majorité des ascomycètes connus sont des champignons filamenteux. Malgré l'existence aujourd'hui d'un nombre croissant de modèles biologiques pour cette classe d'organismes, nous pouvons citer *Neurospora crassa* comme le modèle d'étude qui s'est imposé et ce depuis les années 1940 (Perkins, 1992). Avec un cycle reproductif relativement rapide et la possibilité d'analyse de la descendance haploïde, *Neurospora* a été défendu en tant que modèle d'étude dès le



Figure 2. Cycle de vie de Podospora anserina

Les microconidies et les protopérithèces, respectivement les structures reproductrices sexuelles mâles et femelles, se différencient des hyphes végétatifs en conditions de privation et d'exposition à la lumière. La fécondation de l'organe femelle se produit après la fusion du gamète mâle du type mat opposé avec l'élément récepteur apical femelle appelé trichogyne. Chaque noyau prolifère ensuite dans les cellules plurinucléées. Ensuite, des paires de noyaux parentaux de type sexuel opposé migrent dans des cellules spécialisées, les hyphes ascogènes dans lesquelles un rapport strict de 1:1 de chaque noyau parental est maintenu. Par la suite, la pointe de ces hyphes se différencie pour former un crozier. Dans le crozier, les deux noyaux parentaux subissent une mitose coordonnée qui donne après la cellularisation deux cellules basales et latérales monocaryotiques, et une cellule dicaryotique qui peut se différencier en une cellule mère d'asque dans laquelle la caryogamie a lieu. Cette cellule diploïde est la seule observée pendant tout le cycle de vie. Le noyau diploïde commence directement la méiose tandis que la cellule s'allonge pour former l'asque. Les cellules basales et latérales peuvent fusionner et se diviser à nouveau, conduisant à un nouveau crozier. Plusieurs asques sont ainsi produits à partir de chaque cellule dicaryote initiale. Après une mitose post-méiotique, quatre grosses spores contenant chacune deux noyaux non-frères sont délimitées à l'intérieur de l'asque. Un faible pourcentage d'asques contient cinq à huit spores (ordre de % décroissant) dans lesquels une à quatre grosses spores binucléées ont été remplacées par deux spores uninucléées. L'asque sur la droite à l'intérieur du périthèce contient trois grosses spores binucléées et deux petites spores uninuclées à la place de la quatrième. Les périthèces matures relâchent des asques contenant des spores. Dans des conditions de croissance favorables, les spores également appelées ascospores sont capables de germer et de se régénérer. Après la croissance apicale, la ramification et la fusion des hyphes, la structure végétative est appelée mycélium. Le taux de croissance est d'environ 7,5 mm par jour dans des conditions de laboratoire. La fusion entre différents individus est représentée illustrant le contexte biologique de la réaction d'incompatibilité. Un cycle de vie complet prend environ 1 semaine en laboratoire à une température de croissance optimale de 26 °C. (d'après (Pinan-Lucarré et al., 2007))

début de la science de l'hérédité par le botaniste et mycologue américain Bernard Dodge. Les premières études sur *Neurospora crassa* ont grandement contribué au fondement de la biologie moléculaire et ont mené à l'établissement du paradigme « un gène-une enzyme » suite aux remarquables expériences sur le contrôle génétique des réactions biochimiques de George Beadle et Edward Tatum (Beadle and Tatum, 1941; Horowitz, 1991; Tatum and Beadle, 1942). De nos jours, *Neurospora crassa* est utilisé en tant qu'organisme modèle dans l'étude du rythme circadien, de la polarité cellulaire, des mécanismes de défense du génome et l'épigénétique ainsi que dans la biologie de l'évolution et des populations par des approches d'analyses à un niveau génomique.

2.2 Le modèle Podospora anserina

Une autre espèce de champignon filamenteux, un ascomycète proche de N. crassa, a été introduit dans les laboratoires d'analyses génétiques au milieu du siècle dernier. Il s'agit de Podospora anserina, un ascomycète filamenteux hétérothallique « pseudo-homothallique », coprophile (retrouvé dans les excréments de mammifères herbivores), saprotrophe (Figure 2). Il appartient à la même classe que N. crassa, les Sordariomycètes. Pourtant, les deux espèces présentent des différences notables autant dans leur cycle reproductif que dans d'autres processus généraux de la physiologie fongique. *N. crassa* est un champignon à cycle reproductif hétérothallique : deux souches différentes (haploïdes) portent chacune un des deux signes sexuels (A ou a) et les croisements produisent des asques à huit spores également haploïdes. P. anserina présente des thalles qui contiennent les deux signes sexuels. La plupart des souches sauvages de P. anserina sont donc auto-fertiles. Le cycle reproductif est pseudohomothallique et les croisements produisent des asques à quatre spores binucléées. Un nombre faible d'asques (de 1-5%) peuvent contenir cinq spores parmi lesquelles deux uninucléées. Ces spores uninucléées produisent des souches homocaryotiques utilisées dans les analyses génétiques. Une différence remarquable entre N. crassa et P. anserina réside dans le fait que les deux champignons ont une espérance de vie très différente. N. crassa peut croître de manière illimitée et ne présente pas de signes du vieillissement cellulaire (la sénescence). Podospora de son côté a une durée de vie limitée à 1 à 3 semaines et présente des signes de sénescence avec l'âge (diminution de la fertilité et de la croissance) (Rizet, 1953; van der Gaag et al., 1998). Des études expliquent cette différence par les ressources disponibles pour les deux espèces dans leurs habitats naturels, les ressources étant jugées dans le cas de Podospora éphémères, limitées et relativement durables, et moins limitées dans le cas de Neurospora qui croît sur de la végétation partiellement brûlée (Geydan et al., 2012).

En raison de la facilité de sa manipulation, *P. anserina* a été choisi très tôt comme modèle, d'abord pour étudier la formation des ascospores (Wolf, 1912) et la fusion des hyphes (Buller, 1933). Plus tard, Georges Rizet a élaboré l'analyse génétique complexe résultant du développement atypique

7

Introduction

de l'asque lié au pseudohomothallisme (Rizet, 1941, 1939) et a initié une école française de généticiens travaillant avec des champignons filamenteux (principalement P. anserina et A. immersus). La visite de Karl Esser au laboratoire de Rizet (Esser, 1954; Rizet and Esser, 1953) a alimenté la recherche en Allemagne, en particulier avec l'ajout d'études biochimiques (Esser, 1963). Cela a ouvert une ère où plusieurs phénomènes biologiques importants ont été découverts et leurs déterminants génétiques élucidés. Le phénomène de « barrage » (décrit ci-dessous) a conduit à l'étude de l'incompatibilité végétative (ou hétérocaryotique) et à la découverte d'une forme inhabituelle d'héritage biologique (Rizet and Delannoy, 1950; Rizet, 1952; Beisson-Schecroun, 1962), désormais connu pour être dû à un prion (Coustou et al., 1997; Maddelein et al., 2002; Ritter et al., 2005). La découverte que P. anserina ne peut être cultivé sans fin a permis des études sur la sénescence (Marcou, 1961; Rizet, 1953) et la physiologie mitochondriale (Tudzynski and Esser, 1977; Cummings et al., 1978; Jamet-Vierny et al., 1980). Parmi les autres sujets étudiés figurent le premier « drive » méiotique fongique (Padieu and Bernet, 1967) (maintenant connu sous le nom de tueur de spores (Grognet et al., 2014; Vogan et al., 2019), la précision de la traduction (Picard, 1973; Coppin-Raynal et al., 1988), la croissance rythmique (Chevaugeon and Huong, 1969; Esser, 1969) et la formation des corps de fructification (Lysek, 1976; Labarere and Bernet, 1979; Esser and Graw, 1980). En parallèle, des études sur le terrain des champignons coprophiles ont montré que P. anserina était fréquemment récupéré dans les excréments (Furuya and Udagawa, 1972). Au terme de ces premières études, l'écologie et le cycle de vie étaient connus, la reproduction sexuée était maîtrisée en laboratoire sur des milieux entièrement définis, l'analyse génétique utilisée en routine (Marcou et al., 1982) et un système de transformation génétique était disponible (Bégueret et al., 1984; Brygoo and Debuchy, 1985; Silar, 2013).

2.3 L'incompatibilité végétative chez les champignons filamenteux

2.3.1 Généralités sur l'incompatibilité végétative (IV)

Les fusions mycéliennes qui contribuent à l'expansion de thalle fongique ne sont pas exclusives à des évènements au sein du même individu. Il est possible que des souches différentes de même espèce fusionnent. En fonction des déterminants génétiques, ces fusions entre différentes souches peuvent être viables ou aboutir à la mort des cellules de fusion par le déclenchement d'une réaction de lyse cellulaire. Ce système de reconnaissance du non-soi est appelé IV (ou incompatibilité hétérocaryotique) chez les champignons filamenteux. Lorsque des souches incompatibles se rencontrent sur milieu solide, la mort des cellules de fusion conduit à l'accumulation de cellules mortes formant un bourrelet mycélien dépigmenté dans la zone de confrontation, appelé « barrage », qui constitue un marqueur de la reconnaissance du non-soi végétative (Beisson-Schecroun, 1962) **(Figure**



Figure 3. Tests de barrage chez *P. anserina*.

12 souches ont été mises en croissance sur Biomalt MM. La flèche en pointillée montre une zone claire entre les colonies (barrage) indiquant une réaction d'incompatibilité végétative, alors que la flèche pleine montre une interaction compatible. (d'après (van der Gaag et al., 2003))



Figure 4. Caractérisation microscopique de la réaction d'incompatibilité végétative.

Après la fusion cellulaire et le déclenchement de la réaction d'IV, la croissance et la synthèse peptidique sont arrêtées. La mort cellulaire se traduit par l'apparition de nombreux septa à l'intérieur des cellules et l'épaississement de la paroi cellulaire. L'expression des gènes spécifiques de la réaction est induite, et des vacuoles de grande taille apparaissent avant la désintégration de la cellule par lyse cellulaire. Des autophagosomes sont également formés au cours de la réaction d'IV chez *P. anserina*. (d'après Paoletti et Saupe, 2009)

Introduction

3). Ce barrage est visible à l'œil nu et cette possibilité de visualiser la réaction d'IV au niveau macroscopique constitue un outil très précieux pour l'étude de ce phénomène. La réaction d'incompatibilité a également été caractérisée au niveau microscopique (Figure 4). La mort cellulaire par incompatibilité initiée dans la cellule de fusion est généralement limitée à cette cellule mais s'étend parfois aux cellules immédiatement adjacentes. Le scellement des septa environnants limite la propagation de la mort cellulaire (Beisson-Schecroun, 1962). Le corps de Woronin est un organite lié au peroxysome centré sur un noyau cristallin hexagonal qui fonctionne pour sceller les septa en réponse aux dommages cellulaires dans les champignons filamenteux (Jedd and Chua, 2000). Le scellement des pores par les corps de Woronin pourrait participer au confinement de la mort cellulaire par IV à une cellule unique. Le réseau vacuolaire est également remodelé, les vacuoles passent d'une structure tubulaire à une forme sphérique et grossissent (Pinan-Lucarré et al., 2003). Des gouttelettes lipidiques ainsi que l'apparition des septa intracellulaires sont également des conséquences de la réaction (Dementhon et al., 2003). La désintégration des cellules hétérocaryotiques conséquente à la réaction d'IV chez P. anserina se manifeste après 20 minutes et 8 heures en fonction du système étudié (Beisson-Schecroun, 1962; Pinan-Lucarré et al., 2006). La destruction de la cellule de fusion limite la transmission d'éléments cytoplasmiques infectieux et l'exploitation conspécifique par des génotypes agressifs (Debets et al., 1994; Debets and Griffiths, 1998; Cortesi et al., 2001). On pense donc que l'IV est un mécanisme de défense ayant une valeur adaptative vis-à-vis des champignons filamenteux.

Des gènes induits pendant l'IV, des marqueurs moléculaires de la réaction, ont été déterminés chez *P. anserina*. Parmi ces gènes appelés *idi* (induced during incompatibility), deux sont des orthologues de gènes impliqués dans l'autophagie chez la levure *Saccharomyces cerevisiae – idi-6* (PRB1) et *idi-7* (ATG8). Il a été démontré que des autophagosomes sont formés au cours de la réaction d'incompatibilité mais que l'autophagie n'est pas à l'origine de la mort cellulaire observée (Pinan-Lucarré et al., 2003, 2005, 2006). Paradoxalement, la mort cellulaire lors de l'IV a été accélérée dans le contexte des souches déficientes pour l'autophagie, ce qui suggère que l'autophagie a un rôle de protection vis-à-vis des signaux de mort cellulaire programmée. Cette hypothèse est renforcée par la démonstration que l'autophagie semble réguler négativement la mort cellulaire programmée et restreint sa propagation dans le cas de la réponse immunitaire chez les plantes (Liu et al., 2005). Le même aspect de réponse localisée est observé dans le cas de l'IV.

2.3.2 Déterminants génétiques de l'IV

L'IV est un phénomène répandu parmi les champignons filamenteux qui a été principalement étudié chez *Cryphonectria parasitica*, *N. crassa* et *P. anserina* (Garnjobst and Wilson, 1956; Bernet, 1967; Cortesi and Milgroom, 1998). Ce phénomène résulte de polymorphismes génétiques



Cell Death

Figure 5. Conséquences de l'incompatibilité hétérocaryotique.

Des individus génétiquement distincts peuvent former des anastomoses entre leurs hyphes. S'il n'y a pas de différence de spécificité allélique au niveau des loci *het*, un hétérocaryon viable est établi et les noyaux (points bleus et bruns) sont échangés. Si la spécificité allélique est différente entre les deux souches pour ne serait-ce qu'un seul locus *het*, l'obturation au niveau des cloisons (septa) isole les hétérocaryons et la mort cellulaire se produit. (d'après (Daskalov et al., 2017))



Figure 6. Les loci het de Podospora anserina

Neuf loci *het* ont été génétiquement décrits. Cinq d'entre eux définissent les 5 systèmes d'incompatibilité alléliques. Le locus *het-V* et les quatre loci restants sont impliqués dans les 3 systèmes d'incompatibilité non alléliques. Les flèches indiquent des interactions incompatibles entre les allèles du même locus ou entre des allèles spécifiques provenant de gènes différents. Les systèmes non alléliques permettent de générer des souches auto-incompatibles par des croisements appropriés. (d'après (Pinan-Lucarré et al., 2007))

incompatibles dans les hétérocaryons au niveau de loci nommés het (heterokaryon incompatibility) (Figure 5). Ainsi, la co-expression dans la cellule de fusion de deux allèles het différents d'un même locus (systèmes alléliques) ou de deux gènes het de loci distincts (systèmes non alléliques) conduit à la mort de la cellule de fusion (Saupe, 2000; Glass and Kaneko, 2003). Toute espèce donnée compte environ 10 loci het différents. L'hétéroallélisme à l'un de ces loci spécifiques suffit à déclencher la mort des cellules de fusion. On pense que la reconnaissance du non-soi est médiée par l'interaction de différents produits protéiques codés par des gènes het incompatibles. La formation d'hétérocomplexes entre des produits de gènes het incompatibles a été mise en évidence dans Neurospora (Sarkar et al., 2002). Les mutations qui abolissent l'hétérodimérisation bloquent la réaction d'IV (Wu et al., 1998). Les gènes het fongiques codent pour diverses protéines telles que des facteurs de transcription, des enzymes ou des protéines de signalisation qui pourraient avoir une autre fonction en plus de leur fonction d'incompatibilité. Par exemple, le gène de Podospora het-c est impliqué dans la formation des spores et le gène de Neurospora un-24 opérant dans l'IV het-6 code une sous-unité de la ribonucléotide réductase impliquée dans le métabolisme de l'ADN (Saupe et al., 1994; Smith et al., 2000). Ces gènes auraient pu être recrutés au cours de l'évolution pour remplir leur fonction supplémentaire en IV. Il est intéressant de noter que de nombreuses protéines impliquées dans l'IV partagent un domaine appelé domaine HET (Smith et al., 2000). Ce domaine est présent dans presque tous les systèmes het caractérisés, soit dans le produit du gène het lui-même, soit dans un partenaire en interaction (Glass and Dementhon, 2006). Le domaine HET pourrait être responsable du déclenchement de la mort cellulaire. Ce domaine est spécifique aux champignons filamenteux et présent dans de nombreuses protéines (plus de 70) chez Aspergillus nidulans, Magnaporthe grisea, N. crassa et P. anserina (Fedorova et al., 2005; Micali and Smith, 2005). Il a été proposé que l'expansion du domaine HET dans les ascomycètes filamenteux puisse représenter une stratégie d'adaptation de niche pour traiter un grand nombre de stimuli similaires associés à la défense contre les agents pathogènes, la reconnaissance du non-soi, ou des rôles analogues (Fedorova et al., 2005).

Chez P. anserina, 8 systèmes het ont été génétiquement définis et quatre gènes het (het-c, hetd, het-e et het-s) ont été caractérisés (Figure 6). Ils définissent les systèmes d'incompatibilité nonalléliques het-c/het-d, het-c/het-e (Saupe et al., 1994, 1995; Espagne et al., 2002) et le système d'incompatibilité allélique het-s/het-S (Rizet, 1952; Turcq et al., 1991) (Figure 5). Le gène het-c code pour une protéine de transfert de glycolipides (GLTP) et a un orthologue qui intervient dans la mort cellulaire programmée chez les plantes (Saupe et al., 1994; Brodersen et al., 2002; Mattjus et al., 2003). Les gènes het-d et het-e codent pour des protéines paralogues composées de trois domaines adjacents, comprenant un domaine HET N-terminal, un domaine NACHT interne et un domaine WD C-terminal (Saupe et al., 1995; Smith et al., 2000; Koonin and Aravind, 2000; Espagne et al., 2002). Les protéines



Figure 7. Diversification de la famille de gènes HNWD de P. anserina.

(A) La famille *HNWD* compte cinq membres (*HNWD1–5*). Parmi ceux-ci, trois membres correspondent à des gènes *het* caractérisés génétiquement. De plus, il y a plusieurs pseudogènes dans cette famille, un seul gène (*NWDp*) (figuré ici), et deux gènes additionnels ne contenant pas le domaine HET (non figurés ici). Les flèches symbolisent le fait que les répétitions WD40 de chaque membre de cette famille de gènes sont facilement échangées et mélangées grâce à des recombinaisons intra- et intergéniques aboutissant à un vaste polymorphisme. (B) Quatre codons spécifiques pour chaque répétition (positions 7, 9, 25 et 27) sont soumis à un processus de diversification par sélection positive. Lorsqu'elles sont placées dans un modèle par homologie du domaine WD, ces positions sont regroupées sur la surface d'interaction du domaine de reconnaissance. En général, il y a environ 50 unités de répétitions WD40 distinctes codées par la famille de gènes *HNWD* par génome, qui peuvent être de nouveau mélangées à l'intérieur et entre les membres de la famille, être des cibles pour des mutations et être sujettes à de nouveaux tours de sélection. (d'après (Paoletti and Saupe, 2009))

à domaine NACHT appartiennent à la classe STAND NTPases (Signal-transducing ATPases with Numerous Domains) qui comprennent de nombreuses protéines de mort cellulaire organisées en protéines multidomaines (Leipe et al., 2004) (ces protéines appartiennent à la famille des Nod-like receptors (NLRs) qui seront décrits en détail dans la partie 3). Typiquement, en aval du domaine NTPase, ces protéines contiennent des répétitions formant des superstructures telles que WD40 dans HET-D, HET-E et Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1), ou des répétitions riches en leucine dans des protéines de résistance aux maladies des plantes. Enfin, un domaine effecteur se trouve en amont du domaine NTPase. Il a été montré que la liaison du GTP au domaine NACHT de HET-E était essentielle à la fonction d'IV (Espagne et al., 1997). Les domaines WD de HET-D et HET-E sont des domaines de reconnaissance responsables de la spécificité d'interaction avec différents variants HET-C (Espagne et al., 2002). Ces domaines sont composés de répétitions WD40, c'est-à-dire de répétitions de 40 acides aminés qui contiennent typiquement le dipeptide WD à leur extrémité C-terminale. Les domaines WD sont capables d'adopter des structures en hélice β dont la face supérieure définit une plate-forme d'interaction avec d'autres protéines (Smith et al., 1999). Il a été proposé que les STAND NTPases utilisent le domaine C-terminal comme levier pour transmettre les changements conformationnels provoqués par l'hydrolyse des NTPs aux domaines effecteurs. Ainsi, lorsque HET-C interagit avec des protéines HET-D/HET-E incompatibles, le changement conformationnel induit par l'hydrolyse du GTP pourrait exposer et ainsi activer le domaine effecteur HET. Un autre des gènes impliqués dans l'IV chez P. anserina code pour une protéine STAND, het-r. Le gène het-r est paralogue de het-e et het-d et fait donc partie d'une famille appelée hnwd (HET-NACHT-WD40) (Chevanne et al., 2009; Paoletti and Saupe, 2009). Les motifs répétés WD40 de ces gènes sont très conservés et subissent une évolution concertée dans des échanges génétiques constants entre différents membres de la famille afin de générer un vaste répertoire de reconnaissance du soi et/ou non-soi (Figure 7).

Les STANDs sont impliquées dans des mécanismes de l'immunité innée, tel que la mort cellulaire programmée, que ce soit chez les animaux ou les plantes. Il a été suggéré que certains des gènes de l'IV chez *Podospora*, codant pour des STANDs, aient également un rôle relevant de l'immunité innée chez cet organisme (Uehling et al., 2017). La mort cellulaire par incompatibilité et les mécanismes de mort cellulaire programmée chez les eucaryotes supérieurs peuvent donc être liés dans une certaine mesure. Cet aspect sera décrit en détails dans la partie 3.

Les systèmes alléliques d'IV *het-B1/het-B2*, *het-Z1/het-Z2* et *het-Q1/het-Q2* chez *P. anserina* sont en cours d'étude. Il est intéressant de noter qu'en fait il s'agit d'interactions entre des gènes étroitement liés et non entre les allèles du même gène (communication personnelle C. Clavé). On peut faire un parallèle entre la caractérisation des systèmes alléliques chez *N. crassa*, *C. parasitica et P. anserina*; en effet ceux-ci semblent être des systèmes d'IV non-alléliques entre des gènes liés.

15

HET-s	1	MSEPFGIVAGALNVAGLFNNCVDCFEYVQLGRPFGRDYERCQLRLDIAKARLSRWGEAVK
HET-S	1	MSEPFEIVAGALGVAGLFNNCVACFEYVQLGRHFGRDYERCQLRLDIAKVRLSRWGEAVQ
HET-s	61	INDDPRFHSSAPTDKSVQLAKSIVEEILLLFESAQKTSKRYELVADQQDLVVFEDKDMKP
HET-S	61	INDDPRFHSSAPIDKSVQLAKSIVEEILLLFESAQKTSKRYELVADQQDLVVFEDKDMKP
HET-s	121	IGRALHRRINDLVSRROKOTSLAKKTAWALYDGKSLEKIVDQVARFVDELEKAFPIEAVC
HET-S	121	IGRALHRRI K DLVSRRQKQTSLAKKTAWALYDGKSLEKIVDQVA G FVDELEKAFPIEAVC
HET-s	181	HKLAPTETEEVEDEASLTILKDAAGGIDAAMSDAAAQKIDAIVGRNSAKDIRTEERARVQ
HET-S	181	HKLAE N EIEEVEDEASLTILKDAAGGIDAAMSDAAAQ <mark>KIDAIVGRNSAKDIRTEKRARVQ</mark>
HET-s	241	LGNVVTAAALHGGIRISDQTTNSVETVVGKGESRVLIGNEYGGKGFWDN
HET-S	241	LGNVVTAAALHGEIRISDQTTNSVETVVGKGESKVLIGNEYGGKGFWDN

Figure 8. Alignement des séquences d'acides aminés des protéines HET-s et HET-S La région PFD (Prion Forming Domain) est figurée en rouge. (d'après (Saupe, 2011))



Figure 9. La réaction d'incompatibilité [Het-s]/HET-S.

Les souches [Het-s*] et [Het-s] sont confrontées à des souches [Het-S] sur milieu solide, une réaction d'incompatibilité se produit entre [Het-s] et [Het-S], et la mort cellulaire des cellules de fusion conduit à la formation d'une ligne de contact dense anormale (appelée barrage). (d'après (Saupe, 2020))

Introduction

Le système d'IV le mieux caractérisé parmi les champignons filamenteux est le système d'incompatibilité entre les deux allèles du gène het-s. Il sera abordé en détail dans la partie 3. Le locus het-s existe sous la forme de deux allèles incompatibles appelés het-s et het-S (Rizet, 1952). Les allèles incompatibles het-s et het-S codent pour des protéines cytosoliques de 289 acides aminés qui diffèrent par 13 résidus (Deleu et al., 1993) (Figure 8). La particularité du locus het-s réside dans le fait que les souches de génotype *het-s* peuvent présenter deux phénotypes alternatifs appelés [Het-s] et [Het-s*] (Rizet, 1952). Les souches [Het-s] sont incompatibles avec les souches [Het-S], alors que les souches [Het-s*] sont neutres en cas de fusion végétative (c'est-à-dire qu'elles sont compatibles à la fois avec [Het-S] et [Het-s]) (Figure 9). Les souches [Het-s*] sont issues de la descendance d'un croisement [Hets] × [Het-S]. Le phénotype [Het-s] est hérité maternellement dans les croisements [Het-s*] × [Het-s]. Les souches [Het-s*] sont systématiquement converties en phénotype [Het-s] au contact d'une souche [Het-s] (Beisson-Schecroun, 1962). Chez P. anserina, comme dans de nombreux champignons filamenteux, les parois transversales (septa) des filaments sont incomplètes. En conséquence, il existe une continuité cytoplasmique dans tout le mycélium. Par conséquent, la conversion phénotypique [Het-s*] en [Het-s] se propage du point d'anastomose à l'ensemble du mycélium. Cette conversion infectieuse se déplace jusqu'à plusieurs mm/h⁻¹ (10 fois le taux de croissance linéaire du champignon) (Beisson-Schecroun, 1962). Les souches [Het-s*] acquièrent également spontanément le phénotype [Het-s] à basse fréquence. En pratique, lors de repiquages prolongés, toutes les souches [Het-s*] acquièrent finalement le phénotype [Het-s]. La fréquence de transition spontanée vers l'état [Het-s] est fortement augmentée par la surexpression du gène het-s (Coustou et al., 1997). La propagation de [Het-s] nécessite un gène het-s fonctionnel, et les souches het-s peuvent être curées de [Het-s] (Coustou et al., 1997; Coustou-Linares et al., 2001). Il a ensuite été démontré que toutes ces propriétés étaient dues au fait que HET-s est une protéine prion (c'est-à-dire une protéine infectieuse, voir parties 3 et 4) capable de former des agrégats amyloïdes infectieux similaires à ceux trouvés dans diverses maladies humaines dues à des dépôts de protéines (Coustou et al., 1997; Balguerie et al., 2003; Riek and Saupe, 2016; Saupe, 2020). Le gène het-S est en fait impliqué dans des processus de signalisation amyloïde associés à de la mort cellulaire ce qui sera décrit en détail dans les chapitres 2 et 3.

3 La signalisation par oligomérisation coopérative dans le système immunitaire inné (SI) des Eucaryotes

3.1 Généralités sur le SI inné des Eucaryotes supérieurs

Si l'on considère les systèmes immunitaires innés d'un point de vue général, leur fonctionnement dépend de la reconnaissance précoce de pathogènes ou de signaux de danger par des

Introduction



Figure 10. Aperçu de voies de signalisation de l'immunité innée chez l'homme.

La famille TLR (Toll-like receptors) détecte les PAMPs tels que la flagelline ou les lipopolysaccharides (LPS) dans l'environnement extracellulaire, puis recrute des adaptateurs de signalisation intracellulaires MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) et MyD88-like (Mal) par des interactions avec le domaine TIR. La liaison des IRAKs (interleukin-1 receptor associated kinases) à MYD88 pour assembler le myddosome mène à l'activation de ces kinases et à l'induction des activités transcriptionnelles de NF-kB et IRF. La famille RLR (RIG-l-like receptor) détecte les ARNs viraux intracellulaires. Une RLR activée promeut la formation de filaments de MAVS (Mitohondrial Antiviral-Signaling Protein), finit par activer IRF, ce qui mène à la sécrétion d'iterferons de type I. La CGAS (cyclic GMP-AMP synthase) reconnaît l'ADN cytosolique et produit des GMP-AMP cycliques comme messagers secondaires. cGAMP et le c-di-GMP bactérien activent des stimulateurs des gènes interferons (STING), ce qui résulte en une activation d'IRF. Les récepteurs NLRs et AIM2-like (absent in melanoma 2) répondent à une grande variété de signaux pathogènes dans le cytosol et en dehors de la cellule. La protéine ASC (adaptor apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) peut être recrutée à travers l'oligomérisation de récepteurs qui assemblent des inflammasomes afin d'induire l'activation de la caspase-1, la maturation de l'interleukine-1 β (IL-1 β) et la mort cellulaire pyroptotique. \Box : Membres de la super-famille des domaines de mort. (d'après (Qiao and Wu, 2015))



Figure 11. Vision schématique du système immunitaire des plantes.

La reconnaissance des PAMPs telles que les flagellines bactériennes, les chitines fongiques ou les petits peptides DAMPs-like par les PRRs induit une signalisation intracellulaire qui mène à la PTI (PAMP-triggered immunity). Les pathogènes victorieux injectent des protéines effectrices (points rouges) dans la cellule de plante afin d'atténuer la PTI. Chez certaines plantes hôtes, les protéines effectrices sont spécifiquement reconnues par des NLRs intracellulaires via diverses stratégies, induisant l'ETI, ce qui inclut l'expression de gènes liés à l'immunité et à la mort cellulaire localisée nommée réponse hypersensible. X : une molécule de l'hôte gardée par des NLRs; ID : integrated domain. (d'après (Wang and Chai, 2020)) récepteurs membranaires ou cytosoliques, et de la transmission de signaux afin de permettre le déclenchement de contre-mesures appropriées grâce à des molécules adaptatrices et effectrices (Figure 10). Le système immunitaire inné est donc composé d'un grand nombre de récepteurs situés à la surface des cellules ou dans leur cytosol, appelés « pattern-recognition receptors » (PRRs), utilisés pour la détection de molécules appelées PAMPs, « conserved pathogen-associated molecular patterns », présents sur les bactéries, les virus et les champignons, et pour la détection des dommages faits aux cellules appelés DAMPs, « danger-associated molecular patterns » (Yin et al., 2015).

Si l'on considère plus particulièrement les systèmes immunitaires innés des plantes (Figure 11) et des animaux, on se rend compte qu'ils diffèrent de façon notable (Maekawa et al., 2011). Ainsi, à la différence des animaux gnathostomes (vertébrés à mâchoires), les plantes n'ont pas de système immunitaire adaptatif ni de cellules immunitaires spécialisées. Elles se reposent entièrement sur des réponses immunitaires innées et sur la capacité de chaque cellule à reconnaître et enclencher en conséquence des réponses immunitaires face aux envahisseurs pathogènes (virus, bactéries, champignons, oomycètes et nématodes); on parle de cell-autonomous immunity. Une caractéristique clé du système immunitaire des plantes est la présence de deux classes de récepteurs dédiés à la reconnaissance du non-soi pouvant déclencher des réponses immunitaires puissantes : la première classe permet la reconnaissance de PAMPs (aussi appelés MAMPs, pour microbe-associated molecular patterns), qui sont conservés au sein des espèces d'un groupe de microbes (Boller and Felix, 2009); la seconde classe permet la détection d'effecteurs pathogènes polymorphes spécifiques à une souche (effector triggered immunity, ETI) (Jones and Dangl, 2006). La première classe est composée de récepteurs liés à la membrane, les PRRs, pour la perception extracellulaire des MAMPs. La seconde classe comprend des protéines, principalement de la famille des NLRs (Nod-like receptors), qui détectent l'action des effecteurs pathogènes dans les cellules hôtes. La famille des PRRs de plantes comprend des récepteurs kinase (RKs) et des récepteurs appelés « receptor-like proteins » (RLPs), agissant dans le premier niveau du système immunitaire des plantes. Les PRRs contiennent un ectodomaine variable dont la fonction usuelle est la reconnaissance des signatures microbiennes conservées, les PAMPs, ou des signaux de dommages, les DAMPs (Wang and Chai, 2020). L'activation des PRRs induit une réponse immunitaire appelée PAMP-triggered immunity (PTI), qui inclut l'expression de gènes liés à l'immunité pour contrer les microbes pathogènes (Macho and Zipfel, 2014). Cependant, beaucoup de microbes pathogènes peuvent injecter avec succès des protéines effectrices dans les cellules de plante afin d'atténuer la réponse PTI grâce à la manipulation de cibles de l'hôte. Les plantes ont donc acquis au cours de l'évolution des NLRs comme récepteurs intracellulaires de l'immunité afin de constituer un second niveau de surveillance à travers la reconnaissance spécifique d'effecteurs pathogènes (Chisholm et al., 2006). Lors de la perception des effecteurs pathogènes, les



Figure 12. Le système immunitaire.

Les PRRs tels que les TLRs, les RLRs, les NLRs et les capteurs d'ADN cytoplasmique agissent comme des intégrateurs centraux d'une grande variété de signaux, répondant à divers agonistes principalement des bactéries, virus et champignons pathogènes. Ces signaux d'origine microbienne participent à l'élaboration de voies de signalisation dans plusieurs cellules d'immunité innée, et induisent à nouveau la transcription de gènes conduisant à l'inflammation, à la réparation des tissus et à l'initiation de l'immunité adaptative. (d'après Zhang et Liang, 2016)

General Innate Immune Responses



Figure 13. Vue d'ensemble des réponses immunitaires innées.

Les réponses immunitaires innées générales impliquent généralement la reconnaissance par les cellules présentatrices d'antigène (APC) de modèles moléculaires associés aux pathogènes (PAMP, carrés jaunes) ou de modèles moléculaires associés au danger (DAMP) par un récepteur de reconnaissance de pathogènes (PRR, récepteurs violets). Lors de la reconnaissance, les APC vont activer les voies inflammatoires ce qui va aboutir à la sécrétion de cytokines et chimiokines (cercles violets) pour recruter plus de cellules immunitaires sur le site, et à une régulation positive des molécules de surface impliquées dans la présentation de l'antigène (CMH et molécules costimulatrices, récepteurs bleus). Les APC peuvent également phagocyter les débris cellulaires et les agents pathogènes, les traiter et charger les peptides antigéniques sur un CMH pour être présentés aux cellules T. Les macrophages (verts) remplissent généralement ces fonctions dans un tissu, tandis que les cellules dendritiques (bleues) se trouvent généralement aux limites des tissus et peuvent migrer vers un ganglion lymphatique lors de la capture d'antigène. (d'après (Schonhoff et al., 2020))

NLRs coordonnent une réponse immunitaire rapide et puissante appelée « effector-triggered immunity » (ETI), qui mène souvent à la réponse hypersensible (mort cellulaire localisée au site de l'infection) qui limite la propagation des microbes pathogènes (Jones et al., 2016).

A la différence du système immunitaire des plantes, celui des animaux gnathostomes est constitué de deux lignes de défense : le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. L'invasion d'un hôte par des agents pathogènes déclenche une série de réponses immunitaires à travers les interactions entre les facteurs de virulence pathogènes et les mécanismes de surveillance immunitaire de l'hôte. Les interactions hôte-pathogène sont généralement initiées via la reconnaissance par l'hôte de structures moléculaires conservées, les PAMPs, essentielles au cycle de vie du pathogène (Kumar et al., 2011). Cependant, ces PAMPs sont soit absentes soit compartimentalisées dans la cellule hôte et sont reconnues par les PRRs de l'hôte exprimés sur les cellules de l'immunité innée, telles que les cellules dendritiques, les macrophages et les neutrophiles (Medzhitov, 2007; Blasius and Beutler, 2010; Kawai and Akira, 2010; Takeuchi and Akira, 2010). La reconnaissance des PAMPs induit rapidement les réponses immunitaires de l'hôte via l'activation de voies de signalisation complexes, qui mène à l'induction de réponses inflammatoires médiées par des cytokines et chemokines variées, facilitant l'éradication du pathogène. Le système immunitaire inné est la première ligne de défense contre les agents infectieux, et agit immédiatement. Il monte une défense efficace contre les agents infectieux à travers l'initiation de l'immunité adaptative qui est durable et dotée d'une mémoire immunologique. L'immunité adaptative est initiée par la génération de lymphocytes B et T antigène-spécifiques à travers un processus de réarrangement somatique (Hoebe et al., 2004; Iwasaki and Medzhitov, 2010). Jusqu'à présent, divers classes de PRRs ont été caractérisées, la plupart peuvent être classés dans une à cinq familles selon l'homologie des domaines protéiques. Ces 5 familles sont les Toll-like receptors (TLRs), les C-type lectin receptors (CLRs), les nucleotide-binding domain leucine-rich repeat (LRR)-containing (ou NOD-like) receptors (NLRs), les RIG-I-like receptors (RLRs), et les AIM2-like receptors (ALRs) (Kumar et al., 2011). Ces familles peuvent être séparées en 2 classes principales : les récepteurs liés à la membrane et les récepteurs intracellulaires. La 1^{ère} classe comprend les TLRs et les CLRs qui se trouvent à la surface de la cellule ou dans les compartiments endocytiques. Ces récepteurs surveillent la présence de ligands microbiens dans l'espace extracellulaire et dans les endosomes. Les NLRs, RLRs et ALRs composent la 2^{ème} classe et sont localisés dans le cytoplasme, où ils surveillent la présence de pathogènes intracellulaires.

Une composante majeure de la réponse immunitaire innée induite par les PRRs est transcriptionnelle, ce qui mène à la production de cytokines pro-inflammatoires et d'interférons (IFN); ces messages chimiques sont critiques pour l'initiation des réponses immunitaires innée et adaptative. L'activation des PRRs initie également des réponses non-transcriptionnelles telles que l'induction de la

21



Figure 14. Domaines de signalisation et leurs fonctions dans les voies de mort cellulaire programmée (PCD).

Cette figure montre des versions simplifiées des principales voies de PCD, en se concentrant sur les propriétés d'interaction des domaines. La disposition des protéines dans des complexes homo-oligomères n'est pas représentée. Coloration: les domaines de mort à six hélices (domaines de mort [DD], les domaines effecteur de mort [DED], les domaines d'activation et de recrutement de la caspase [CARD], les domaines pyrine [PYD]) sont représentés en cyan, les motifs d'interaction homotypiques RIP (RHIM) en orange, et les récepteurs et Toll et l'IL-1 (TIR) en violet. Les domaines centraux des STAND ATPase (à la fois de type NB-ARC et NACHT) sont bleus et les domaines de senseurs constitués de répétitions (leucine -rich repeats [LRR], WD40) sont verts. Les domaines caspases sont jaunes et les domaines censés former des pores (domaine amino-terminal de gasdermine, domaine HET et HeLo/coiled-coil [CC]) sont représentés en rouge. Tous les autres types de domaine sont affichés en gris. L'oligomérisation homotypique est indiquée par des doubles flèches colorées par type de domaine. Le clivage protéolytique est indiqué par un symbole de ciseaux, tandis que les événements de translocation sont représentés par des flèches rouges. Les stimuli de mort cellulaire sont affichés sur un fond noir. (A) Apoptose. La voie extrinsèque, déclenchée par la liaison du ligand à un récepteur de mort, et la voie intrinsèque initiée par un signal mitochondrial sont présentées. (B) Nécroptose. Seuls les principaux composants de la voie canonique, déclenchée par la liaison au récepteur TNF de type 1 (TNFR1), sont présentés ici. (C) Pyroptose. Les deux voies principales sont présentées: la caspase-11 (humaine: caspase-4/5) déclenchée par le lipopolysaccharide intracellulaire (LPS) et l'activation de la caspase-1 par la signalisation du signalosome. (D) Incompatibilité hétérocaryotique fongique (HI). Deux systèmes d'HI sont présentés : Het-E (issu d'un partenaire de fusion) étant activée par Het-C (apporté par l'autre partenaire), et Het-S (d'un partenaire de fusion) étant recrutée pour un amyloïde formé par Het-s (de l'autre partenaire de fusion). (E) Réponse hypersensible chez les plantes. Un exemple pour chaque classe de protéine R est présenté : le résistosome ZAR1 basé sur CC-NB-LRR (CNL) est déclenché par le complexe ZAR1 RKS1 reconnaissant PBL2, qui a été précédemment modifié par l'effecteur pathogène AvrAC. Le dimère des deux protéines STAND RPS4 et RRS1 à base de TIR-NB-LRR (TNL) est déclenché par liaison à l'effecteur pathogène AvrRps4 et signale la mort cellulaire via le complexe EDS1 / SAG101. (d'après (Hofmann, 2020))

phagocytose, l'autophagie, la mort cellulaire et la modification de cytokines (Drummond and Brown, 2011; Deretic et al., 2013; Lamkanfi and Dixit, 2014). Ces réponses immunitaires innées transcriptionnelles ou non sont liées à la détection des microbes par les PRRs à travers des voies de transduction du signal finement régulées. C'est la coordination de ces voies de transduction du signal qui permettent le confinement de l'infection initiale et le déclenchement de la réponse adaptative appropriée (Figures 12 et 13).

3.2 SI inné et mort cellulaire programmée (PCD)

La mort cellulaire programmée (PCD) (Figure 14) est un processus clé dans les systèmes immunitaires métazoaires et végétaux (Coll et al., 2011; Nagata and Tanaka, 2017). Chez les mammifères, les infections intracellulaires sont contenues et éliminées par des voies moléculaires dédiées déclenchant des réponses de mort cellulaire inflammatoire (Jorgensen et al., 2017). Les modalités de la mort cellulaire programmée peuvent être classées comme « nécrotiques » (c'est-à-dire accompagnées d'une rupture de la membrane et de la libération de matériel intracellulaire) et « non nécrotiques » sans libération du contenu intracellulaire (Ashkenazi and Salvesen, 2014). Parce que l'apoptose métazoaire est le principal exemple de mort cellulaire non-nécrotique, cette dernière est généralement appelée « apoptotique ». Par rapport à l'apoptose, la mort cellulaire nécrotique est moins complexe et beaucoup plus répandue. Étant donné que la mort cellulaire causée par des stress mécaniques, chimiques ou biologiques majeurs est généralement associée à la rupture cellulaire, la nécrose était initialement considérée comme une caractéristique de la mort cellulaire nonprogrammée et il a fallu longtemps avant que la nécrose programmée soit acceptée comme une réalité (Edinger and Thompson, 2004). Chez les animaux, il existe plusieurs types différents de nécrose programmée, parmi lesquels la nécroptose et la pyroptose (Figure 15) sont les exemples les mieux compriset probablement les plus importants (Cookson and Brennan, 2001; Bergsbaken et al., 2009; Vandenabeele et al., 2010).

L'étape cruciale dans l'induction de la **mort cellulaire apoptotique (Figure 16)** est l'activation de la caspase-3, une cystéine protéase clivant spécifiquement un certain nombre de substrats différents, qui, en combinaison, produisent le phénotype apoptotique. L'apoptose a été appelée à juste titre « la mort par mille coupures » (Martin and Green, 1995). L'activation de la caspase-3 se produit par traitement protéolytique d'un précurseur inactif; l'enzyme activatrice caspase-9 appartient à la même classe de protéases que la caspase-3 et plusieurs autres protéases impliquées dans la signalisation de la mort cellulaire (voir ci-dessous). La caspase-9, à son tour, est activée par la formation d'un complexe multiprotéique appelé « apoptosome ». Le composant central de l'apoptosome est Apaf-1, une ATPase de la classe STAND (Danot et al., 2009), qui est capable de détecter la présence de



Figure 15. Modalités de mort cellulaire en réponse à une infection.

Diagramme représentant certaines des caractéristiques de différents types de mort cellulaire programmée pouvant survenir en réponse à une infection chez les plantes et les mammifères. Mort des cellules suite à la réponse hypersensible chez les plantes (a), à la pyroptose (b) et à la nécroptose (c) dans les cellules de mammifères. (d'après (Coll et al., 2011))



Figure 16. Apoptose, voies extrinsèque et intrinsèque.

L'apoptose extrinsèque est induite par l'addition des ligands sur les récepteurs de mort ou par le retrait des ligands des récepteurs de dépendance. CASP8 et CASP10 initient l'apoptose extrinsèque médiée par le récepteur de mort, tandis que CASP9 initie le retrait de l'apoptose extrinsèque médiée par le ligand du récepteur de dépendance. Pro-CASP8 et pro-CASP10 sont enzymatiquement inactives jusqu'à ce qu'elles interagissent avec FADD (Fas-associated via death domain), qui est activée lors de la liaison aux récepteurs de mort cellulaire répondant à leurs ligands. Les dommages à l'ADN, l'hypoxie, le stress métabolique et d'autres facteurs peuvent induire une apoptose intrinsèque, qui commence avec MOMP et conduit à la libération de protéines mitochondriales (par exemple, CYCS) dans le cytosol. CYCS cytosolique interagit avec APAF1, qui recrute pro-CASP9 pour former l'apoptosome. MOMP est étroitement contrôlée par la famille BCL2, y compris ses membres pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. CASP3, CASP6 et CASP7 sont considérées comme les caspases effectrices courantes pour l'apoptose extrinsèque et intrinsèque. En outre, la voie extrinsèque peut déclencher l'apoptose mitochondriale intrinsèque par la génération de BID tronqué (tBID) par CASP8 activée. Le tBID peut se déplacer vers les mitochondries et provoquer la MOMP par l'activation de BAX et BAK1. (d'après (Tang et al., 2019))

cytochrome c libéré par les mitochondries. Lors de la liaison au cytochrome c, Apaf-1 subit un changement conformationnel majeur, conduisant à l'exposition de son domaine d'oligomérisation Nterminal. Ce domaine CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain) sera ensuite hétérooligomérisé avec un autre domaine CARD trouvé à l'extrémité N-terminale du précurseur inactif de la caspase-9. Dans cet état oligomérique, deux molécules de caspase-9 proximales peuvent se cliver et ainsi s'activer l'une l'autre. Il existe plusieurs voies menant à l'activation de l'apoptosome, soit de manière autonome, soit en réponse à des stimuli externes via des récepteurs de mort (Elmore, 2007). Ces voies en amont utilisent d'autres caspases (caspase-8, caspase-10) et d'autres domaines d'hétérooligomérisation, tels que le « domaine de mort » (DD) et le « domaine effecteur de la mort » (DED), qui relient les composants de signalisation apoptotiques et peut conduire à l'activation des caspases par oligomérisation et clivage induits (Hofmann, 2020). L'apoptosome constitue le paradigme le mieux caractérisé d'un signalosome induisant la mort cellulaire programmée.

L'étape clé menant une cellule à la nécroptose est l'oligomérisation et l'activation de la protéine kinase RIPK3 (Receptor-Interacting serine/threonine Protein kinase) (Figure 17). RIPK3 possède un motif amyloïde RHIM central (RIP Homotypic Interaction Motifs), qui est important pour le recrutement de RIPK3 par d'autres protéines contenant un RHIM, en particulier pour la protéine kinase apparentée RIPK1. Récemment, il a été mis en évidence que le complexe RIPK1- RIPK3 (appelé nécrosome) forme des fibres amyloïdes à base de RHIM avec une alternance de brins RIPK1 et RIPK3 (formation d'un hétérocomplexe amyloïde) (Mompeán et al., 2018) (cet aspect sera développé dans la partie 4). Une fois intégré au sein du nécrosome oligomérique, RIPK3 recrute et phosphoryle une protéine appelée MLKL (mixed lineage kinase domain-like). MLKL est une pseudo-kinase inactive avec un domaine N-terminal constitué de quatre hélices α (4HB), requis pour l'exécution de la mort cellulaire. Lors de la phosphorylation de MLKL, la protéine s'oligomérise, s'associe à la membrane cellulaire, provoque un influx ionique et finalement la rupture des cellules (Figure 18). Comment exactement ces événements sont agencés temporellement et interconnectés reste un sujet de débat. L'hypothèse prévalente à ce jour est que les oligomères de MLKL associés à la membrane forment des pores dans la membrane, soit seuls, soit à l'aide d'autres facteurs cellulaires (Petrie et al., 2019). De nombreux aspects de la mort cellulaire nécroptotique peuvent être imités par l'expression ectopique du domaine amino-terminal MLKL isolé, évitant ainsi la nécessité d'une signalisation en amont et d'une activité RIPK3 (Hofmann, 2020). Nous verrons dans la partie 4 que des systèmes de PCD similaires impliquant des motifs amyloïdes et des effecteurs de mort cellulaire présentant des homologies avec MLKL ont été caractérisés chez les champignons filamenteux.

L'événement clé dans l'exécution de la **mort cellulaire pyroptotique (Figures 14 et 15)** est le clivage protéolytique de la gasdermine D (GSDMD) à une position centrale, qui permet de séparer le


Figure 17. Structure des protéines RIP1 et RIP3 de la nécroptose humaine.

(A) Organisation du domaine des protéines humaines RIP1 et RIP3 (B) Alignement de séquences de RIP1 et RIP3 autour du motif RHIM principal. (d'après (Li et al., 2012))



Figure 18. Représentation schématique des trois cascades de la nécroptose.

VOIE A: la liaison au récepteur du TNF provoque le recrutement de RIPK1 et d'autres protéines associées dans un assemblage appelé « Complexe I ». Dans des circonstances spécifiques, l'ubiquitinase CYLD provoque la dissociation de RIPK1 du complexe I lié à la membrane. RIPK1 se liera à casp8 et à ses protéines associées, formant le « Complexe II ». Dans les situations où la casp8 est inhibée, la protéolyse normale de RIPK3 est limitée. Cette prévention du clivage de RIPK3 augmente la concentration cytosolique de RIPK3, lui permettant d'interagir avec RIPK1 via les interactions RHIM:RHIM, ce qui conduit à la phosphorylation de RIPK3. Le RIPK3 phosphorylé recrute d'autres monomères RIPK3, conduisant à une autophosphorylation et à la formation d'une structure fibrillaire appelée le nécrosome. VOIE B: le récepteur TLR3/4, lorsqu'il est activé par un ligand, recrute la protéine adaptatrice TRIF, qui s'associe à RIPK1 via des interactions RHIM:RHIM. Dans certaines circonstances, RIPK1 et TRIF se dissocient du « Complexe II » pour recruter et phosphoryler plusieurs copies de RIPK3, formant un nécrosome. VOIE C: ZBP1 est activée par l'ADN et l'ARN viral et se lie ensuite à RIPK3 via les interactions RHIM:RHIM. Ce recrutement de RIPK3 entraîne une liaison et une autophosphorylation supplémentaire de RIPK3. Dans les trois cascades, la phosphorylation et l'activation de RIPK3 dans une structure de nécrosome entraînent la phosphorylation ultérieure de MLKL, l'oligomérisation de cette pseudokinase et la mort des cellules par lyse. (d'après (Baker et al., 2018))

Introduction

domaine N-terminal d'exécution de mort cellulaire de son domaine C-terminal inhibiteur. Plusieurs caspases (non apoptotiques) sont capables de cliver GSDMD, en fonction du déclencheur initial et de la voie de signalisation en amont. Une voie de signalisation répond au lipopolysaccharide intracellulaire (LPS) et clive la GSDMD par la caspase-11 chez la souris et la caspase-4/5 chez l'homme. Une autre voie de signalisation dépend de l'activation de l'inflammasome et utilise une caspase majeure, la caspase-1 pro-inflammatoire. Une fois activées, ces caspases cliveront non seulement la GSDMD mais également d'autres protéines avec des sites de clivage accessibles, surtout la forme de l'interleukine (IL)-1 β , formant ainsi la forme mature et active de cette cytokine pro-inflammatoire. On pense que le domaine N-terminal libéré de GSDMD subit un changement conformationnel majeur, conduisant à son oligomérisation et à la formation d'un grand pore membranaire, qui permet la libération d'IL-1β activée. Outre la GSDMD, d'autres membres de la famille des gasdermines ont des domaines Nterminaux clivables qui favorisent la formation des pores (Feng et al., 2018). Récemment, la structure du pore de la gasdermine A3 a été résolue par cryo-microscopie électronique (EM) et s'est avérée former un tonneau β à 108 brins, composé de 27 unités de gasdermine (Ruan et al., 2018). Il a également été rapporté que d'autres protéases provoquent la mort des cellules pyroptotiques dépendant de la gasdermine (Xia et al., 2020). Dans les cellules infectées par le pathogène bactérien Yersinia pestis, la caspase-8 apoptotique peut être activée par un complexe multiprotéique appelé le « RIPoptosome », qui à son tour conduit au traitement de la GSDMD et de la GSDME par la caspase activée, entraînant la pyroptose (Orning et al., 2018; Sarhan et al., 2018). Il a été démontré que l'élastase ELANE spécifique des neutrophiles, une sérine-protéase sans rapport avec les caspases, clive la GSDMD à un autre endroit, ce qui entraîne la génération d'un fragment N-terminal cytotoxique (Kambara et al., 2018; Hofmann, 2020). Il est intéressant de noter qu'une protéine « gasdermin-like » appartement a un système d'IV chez N. crassa a récemment été caractérisée et se trouve donc impliquée dans un système de mort cellulaire programmée fongique (Asen Daskalov et al., 2020).

Les cellules qui meurent par nécrose programmée libèrent des contenus intracellulaires, dont plusieurs composants sont interprétés comme des DAMPs par le système immunitaire, entraînant une inflammation (Schaefer, 2014; Roh and Sohn, 2018). L'apoptose, en revanche, est un processus plus compliqué car il doit tuer la cellule de manière fiable tout en empêchant en même temps la fuite de matériel intracellulaire et de DAMPs. Au cours de l'apoptose, la cellule est divisée en un certain nombre de vésicules membranaires plus petites appelées « corps apoptotiques », qui sont ensuite éliminées par des processus phagocytaires (Elmore, 2007; Nagata, 2018). L'apoptose est donc parfaitement adaptée à la mort cellulaire programmée sur le plan du développement, un processus physiologique n'étant pas censé alerter le système immunitaire (Fuchs and Steller, 2011; Hofmann, 2020).



Figure 19. Schéma général d'assemblage d'un inflammasome.

L'activation et l'oligomérisation des PRRs permet de recruter et de nucléer des filaments de la protéine adaptatrice ASC. Le filament ASC induit à son tour la nucléation de filaments de procaspases-1 et -8. (d'après (Vajjhala et al., 2017))



Figure 20. Structures de SMOC formées par le mécanisme de polymérisation nucléée.

(A) Un diagramme en ruban de la structure en cryo-microscopie électronique des filaments polymérisés du domaine ASC pyrine (ASC^{PYD}) dans les inflammasomes (représentés en rouge, violet et orange pour chacun des trois brins hélicoïdaux), en complexe avec des filaments de protéines polymérisées AIM2^{PYD} (absent in melanoma 2 PYD) (illustré en bleu) formés lors d'une stimulation par l'ADN double brin (ADNdb). (B) Un diagramme en ruban de la structure en cryo-microscopie électronique du domaine d'activation et de recrutement de la protéine de signalisation antivirale mitochondriale polymérisée (MAVS^{CARD}) dans la voie du récepteur de type RIG-I (RLR) (illustré en violet), en complexe avec un tétramère de RIG-I^{2CARD} (retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) double CARD) (illustré en bleu, cyan, vert et jaune) lors de la stimulation par l'ARN viral. (C) Mécanisme proposé de polymérisation nucléée pour la formation des SMOC ASC^{PYD} et MAVS^{CARD}. Les récepteurs (par exemple, AIM2 et RIG-I) sont représentés par des quartiers rouges pour les monomères et par des disques rouges pour les formes oligomérisées. Les adaptateurs (par exemple, ASC et MAVS) sont représentés par des quartiers bleus pour les monomères et par des cylindres bleus pour les filaments. (d'après (Kagan et al., 2014))

3.3 Le concept émergent de SCAF dans le SI inné

Un thème commun ayant émergé dans l'étude des récepteurs dans la signalisation immunitaire innée est la nécessité de protéines adaptatrices pour lier les récepteurs aux voies de signalisation enzymatique se trouvant en aval (Brubaker et al., 2015). Les adaptateurs intègrent un signal provenant de plusieurs récepteurs et sont donc essentiels pour la détection de nombreux ligands. Ainsi, les adaptateurs sont dotés d'une fonction qui est plus essentielle que celle de chaque récepteur seul. Chaque adaptateur ou ensemble d'adaptateurs contiennent des domaines permettant les interactions protéine-protéine, que ce soit avec un récepteur en amont, ou des protéines de signalisation en aval. Bien que tous les systèmes immunitaires innés ne requièrent pas de protéines adaptatrices pour la signalisation, leur rôle est un champ de recherche actuel très actif. Pour citer quelques exemples, les TLRs utilisent une série d'adaptateurs de signalisation et de tri pour recruter les enzymes en aval. Les protéines TIRAP (TIR(Toll-Interleukin-1 Receptor)-containing adaptor protein) et MyD88 (myeloid differentiation primary response 88) constituent une série d'adaptateurs fonctionnels pour la signalisation TLR. Une seconde série est constituée du TRIF (TIR domaincontaining adaptor-inducing IFN- β) et du TRAM (TRIF-related adaptor molecule). La protéine adaptatrice pour la voie antivirale RLR a initialement été observée comme se localisant à la membrane externe de la mitochondrie et est nommée MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein). Enfin, la protéine ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) est un adaptateur pour les récepteurs qui activent les inflammasomes (Figure 19) (Akira and Takeda, 2004; Chen et al., 2009; Geijtenbeek and Gringhuis, 2009; Hornung and Latz, 2010; Loo and Gale, 2011). Le rôle des inflammasomes est de recruter et d'activer diverses caspases et cytokines pro-inflammatoires afin de médier une réponse de mort cellulaire comme la pyroptose ou l'apoptose (Vajjhala et al., 2017).

On considère que le mécanisme général « type » d'activation des voies de signalisation immunitaires innées est le suivant (Figure 20) : une fois les récepteurs PRRs activés, ils se regroupent ce qui permet le recrutement et l'oligomérisation de protéines adaptatrices qui vont-elles-mêmes permettre le recrutement et l'oligomérisation d'enzymes en aval de la voie de signalisation immunitaire qui forment des complexes amplifiant la réponse immunitaire et permettant l'activation des enzymes effectrices qui vont activer des réponses de mort cellulaire (Vajjhala et al., 2017).

Un mécanisme central de beaucoup de voies de signalisation immunitaires innées est donc l'agrégation des PRRs une fois activés, suivi par un recrutement séquentiel et l'oligomérisation des enzymes effectrices en aval, pour former des centres organisateurs supramoléculaires (SMOCs) qui amplifient la réponse et permettent l'activation induite par proximité des enzymes effectrices. Des mécanismes d'assemblage coopératifs permettent la formation de ces complexes, où l'association des composants permet d'accroitre l'affinité pour les composants en aval de la voie de signalisation.

29

Introduction



Figure 21. Modèle schématique de la voie de transduction du signal induite par les RLRs. Cette voie conduit à l'expression génique d'interferon de type 1 et de cytokines pro-inflammatoires. (d'après (Chiang et al., 2014))

La signalisation via l'assemblage de complexes multi-protéiques permettant l'activation proximale d'enzymes effectrices, est un mode de signalisation découvert pour beaucoup de PRRs (Wu, 2013; Lu and Wu, 2015; Hauenstein et al., 2015; Yin et al., 2015). Les PRRs activés s'agrègent pour recruter et initier l'oligomérisation des protéines adaptatrices, qui à leur tour recrutent et initient l'oligomérisation d'enzymes effectrices. Des études structurales et biochimiques récentes sur des PRRs et des composants de leurs complexes de signalisation ont révélé des mécanismes d'assemblage coopératifs durant leur oligomérisation (Lin et al., 2010; Lu et al., 2014; Xu et al., 2014; Lu et al., 2016). Dans la plupart des cas, l'oligomérisation des composants expose de multiples sites d'interactions à des protéines en aval afin de médier l'assemblage coopératif. Ce dernier peut aussi médier l'induction de changements conformationnels dans une protéine, ce qui facilite les interactions avec les composants en aval de la voie de signalisation. On se réfère à ce mode de signalisation en tant que « signalisation via la formation d'assemblages de façon coopérative » (« signaling via cooperative assembly formation », SCAF) qui est aussi qualifié de « prion-like ». Le SCAF fournit une sorte d'échafaudage permettant l'activation induite par la proximité des enzymes effectrices en aval et permet également aux PRRs de répondre rapidement à de faibles niveaux de DAMPs et de PAMPs.

Afin d'illustrer ce concept de SCAF, on va prendre l'exemple de la voie antivirale RLR (Figure 21). La famille des récepteurs RLRs reconnaissent l'ARN viral dans le cytosol, et activent ensuite des voies de signalisation antivirales, ce qui mène à la production d'interférons de type-I (IFNs) et d'autres cytokines pro-inflammatoires (Andrejeva et al., 2004; Yoneyama et al., 2004). Cette famille comprend 3 membres : RIG-I (retinoic acid-inducible gene 1), MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) et LGP2 (laboratory of genetic and physiology-2). RIG-I et MDA-5 partagent la même architecture de domaines, qui consiste en des tandems CARD en N-terminal (2-CARD), un domaine hélicase central avec un motif DExD/H et un domaine C-terminal (CTD). Ces 2 derniers domaines fonctionnent ensemble en tant qu'unité de reconnaissance ARN, qui forme une structure en anneau autour de l'ARN double-brin (Luo et al., 2011; Kowalinski et al., 2011; Jiang et al., 2011; Wu, 2013), tandis que les CARDs en N-terminal avec l'adaptateur MAVS de la voie de signalisation antivirale mitochondriale mènent à l'activation de voies de signalisation antivirales (Kawai et al., 2005; Meylan et al., 2005; Seth et al., 2005; Xu et al., 2005). Bien que RIG-I et MDA-5 aient en commun la même architecture de domaine et le même adaptateur de signalisation, ces deux récepteurs reconnaissent des ARNs viraux ayant des signatures distinctes (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006; Kato et al., 2008; Baum et al., 2010; Feng et al., 2012; Triantafilou et al., 2012; Goubau et al., 2014) et détectent également différents groupes de virus (Gitlin et al., 2006; Kato et al., 2006; Loo et al., 2008). Ils ont ainsi un rôle nonredondant dans la réponse antivirale innée. LGP2 contient un domaine hélicase et un CTD, mais est dépourvu de CARDs, habituellement essentiels pour la signalisation en aval. Le rôle spécifique de LGP2



Figure 22. Modèle des complexes RIG-I/MDA5:MAVS activés.

La liaison de l'ARN viral induit des changements conformationnels dans les récepteurs RIG-I/MDA5, ce qui résulte en une libération des tandems CARDs du domaine hélicase. Le récepteur CARD peut ainsi s'auto-associer et former une matrice pour le recrutement de MAVS et la formation de filaments sur la mitochondrie. (d'après (Vajjhala et al., 2017))



Figure 23. Mécanismes de base d'activation des principaux inflammasomes NLR.

NLRP3 est activé par trois événements cellulaires communs provoqués par différents stimuli : l'efflux potassique, la génération de ROS, la déstabilisation phagolysosomale et la libération de médiateurs endogènes dans le cytosol. NLRP1b est activé par la toxine létale du charbon. Chez la souris, NLRC4 est activé par des protéines NAIP liées à des ligands spécifiques. NAIP5 et NAIP6 se lient à la flagelline bactérienne, tandis que NAIP2 se lie au composant bactérien T3SS PrgJ. Ces complexes NAIP-ligand se lient ensuite à NLRC4 et l'activent. LF, lethal factor; PA, protective antigen. (d'après (Rathinam et al., 2012))

dans la signalisation RLR a donc été plus difficile à élucider, mais un ensemble croissant d'éléments suggère un rôle de régulateur positif des réponses antivirales (Venkataraman et al., 2007; Satoh et al., 2010; Bruns et al., 2014). Lors de la liaison à l'ARN double-brin, RIG-I et MDA-5 peuvent coopérer afin de s'assembler en un filament (Figure 22) (Peisley et al., 2011; Berke et al., 2012; Berke and Modis, 2012; Wu, 2013; Patel et al., 2013; Peisley et al., 2013), ce qui résulte en un regroupement des domaines CARDs, qui forment une base pour la liaison et l'oligomérisation des MAVS CARDs. Il a été démontré que dans l'état inactif, le tandem RIG-I/CARDs est protégé de l'auto-association par l'interaction avec le domaine hélicase. Lors de la liaison à l'ARN viral, des changements conformationnels entraînent la dissociation des CARDs du domaine hélicase, ce qui permet aux domaines CARDs de s'auto-associer et d'interagir avec les MAVS (Jiang et al., 2011; Kowalinski et al., 2011; Luo et al., 2011). RIG-I et l'oligomérisation en tandem de MDA-5 et des CARDs est facilitée par les poly-ubiquitinations covalentes et non-covalentes de K63 (Gack et al., 2007; Zeng et al., 2010; Jiang et al., 2012; Peisley et al., 2014). Les MAVS activent la signalisation antivirale dépendante de RIG-I et MDA-5 par le recrutement des ubiquitines ligases de type E3, TRAF2, 5 et 6, qui à leur tour activent les kinases cytosoliques, TBK1 et IKK, et les facteurs de transcription IRF3/7 et NF-kB (Liu et al., 2013). Les MAVS sont composés d'un domaine CARD N-terminal impliqué dans l'oligomérisation et l'interaction RIG-I/MDA-5, d'une région centrale non-structurée d'environ 400 acides aminés avec des sites de liaison à TRAF2 et TRAF5, et d'un domaine C-terminal transmembranaire (TM), requis pour l'ancrage à la membrane mitochondriale. Des études récentes ont montré que de façon similaire aux inflammasomes, la signalisation RIG-I/MDA-5 dépendante des MAVS implique un mécanisme de type SCAF résultant en une formation d'un filament de MAVS sur la mitochondrie (Figure 22) (Hou et al., 2011). Le filament est formé de MAVS CARDs, et est nécessaire au recrutement de TRAF2 et TRAF5 et à l'activation des éléments en aval de la voie de signalisation.

La structure du filament MAVS^{CARD} a été résolue par cryo-EM à une résolution de 3,6 Å et a révélé une structure en hélice simple brin gauche de sous-unités MAVS^{CARD} (Wu et al., 2014). De façon similaire aux filaments PYD (Pyrin Domain)/CARD de l'inflammasome, chaque sous-unité MAVS^{CARD} interagit avec ses six voisins les plus proches, en utilisant six surfaces distinctes formant trois types d'interactions intermoléculaires. Les structures cristallographiques du tandem RIG-I/CARDs seul (Peisley et al., 2014), ou en complexe avec MAVS^{CARD} (Wu et al., 2014) ont révélé que le tandem RIG-I/CARDs agit comme un modèle pour l'assemblage de MAVS^{CARD}, en formant une structure hélicoïdale tétramérique et en recrutant MAVS^{CARD} le long de sa trajectoire hélicoïdale dans ce qui a été appelé le mécanisme « lock-washer » (« lock-washer » désigne une rondelle d'arrêt dans un système de vis et de boulons). Des structures cristallographiques sont disponibles pour les oligomères MDA-5 seuls ou en complexe avec MAVS^{CARD}, et il est probable que MDA-5 induise la formation des filaments MAVS^{CARD}



Figure 24. Représentation schématique des domaines clés des NLRs de plantes et de mammifères.

Les domaines sont figurés par des boîtes colorées. Abréviations : BIR, Baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat; CARD, caspase recruitment domain; CC, coiled coil domain; HD, helical domain; ID, integrated domain; LRR, leucine-rich repeat; NBD, nucleotide-binding domain; NLR, nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat receptors; TIR, Toll/II-1 receptor; WHD, winged helix domain. (d'après (Mermigka et al., 2020))



Figure 25. Fonctions des récepteurs de type NOD-like.

Les activités des NLRs peuvent être divisées en quatre grandes catégories : autophagie, transduction du signal, activation de la transcription et formation d'inflammasomes. NOD2 induit une autophagie pour éliminer les agents pathogènes en recrutant ATG16L1 dans la membrane plasmique au site d'entrée bactérienne. NOD1 et NOD2 reconnaissent respectivement l'acide y-D-glutamyl-méso-diaminopimélique (iE-DAP) et le muramyl dipeptide (MDP); ensuite, ils activent les voies de signalisation NF-kB et MAPK. NLRP2 et NLRP4 agissent comme des régulateurs négatifs de la voie NF-kB en modifiant TRAF6. CIITA et NLRC5 sont des transactivateurs de complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH). Les NLRs formant des inflammasomes (cercle orange) convertissent les procytokines en IL-1β et IL-18 actives en activant la caspase-1. NOD, nucleotide-binding and oligomerization domain; NLR, NOD-like receptors; NF-kB, nuclear factor kappa B; MAPK, mitogen-activated protein kinase; TRAF, tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor; IL, interleukin; INF- γ , interferon- γ . (d'après (Kim et al., 2016))

via un mécanisme similaire.

Cette architecture de complexes de signalisation induite par les PRRs permet un assemblage coopératif rapide, une amplification du signal et apporte une base pour l'activation induite par la proximité. Il y a beaucoup d'avantages apportés par la signalisation de type SCAF : tout d'abord, la faible affinité de base des récepteurs pour les composants en aval prévient l'interaction entre récepteurs en absence d'évènement initial d'activation PAMP. Une telle signalisation est supposée bénéfique dans le cadre de l'immunité, où une activation prématurée des réponses immunitaires serait risquée pour l'organisme. Ensuite, cela permet un processus d'amplification du signal rapide, puisque de faibles niveaux de PAMPs permettent l'activation de quelques récepteurs qui vont recruter de nombreux adaptateurs et effecteurs en aval et ainsi, un faible niveau de PAMPs induit un signal puissant (Hauenstein et al., 2015). Enfin, dans le cas des inflammasomes par exemple **(Figure 23)**, la signalisation de type SCAF initie un système qui s'auto-entretient et continue de recruter des protéines en aval et le complexe de signalisation peut être transféré d'une cellule à l'autre (Franklin et al., 2014). Le mécanisme SCAF est parfaitement adapté pour amplifier l'effet des PRRs tels que les NLRs dans l'immunité innée.

3.4 Les Nod-like receptors

3.4.1 Généralités

La multicellularité crée des niches nutritives pour la colonisation microbienne, qui à son tour conduit à la sélection naturelle d'hôtes avec une immunité innée efficace. Chez les plantes et les animaux, l'immunité innée implique à la fois les récepteurs de surface cellulaire (Ronald and Beutler, 2010) et les récepteurs intracellulaires de la superfamille (Jones and Dangl, 2006; Elinav et al., 2011; Jacob et al., 2013) des NLRs (cet acronyme désigne tout en même temps les protéines NBS-LRR de plante [domaine de liaison nucléotidique (NBD) et des répétitions riches en leucine (LRR)] et les récepteurs Nod-like animaux) (Figures 24 et 25). Chez les plantes et les animaux; leur absence ou leur dysfonctionnement peut entraîner une défaillance d'organe et la mort. Les NLRs végétaux sont présents dans les angiospermes et les gymnospermes, et même dans les bryophytes et les marchantiophytes, mais pas dans l'algue unicellulaire *Chlamydomonas*. Les récepteurs immunitaires NLRs se trouvent également chez divers animaux, allant des coraux, des oursins (Rast et al., 2006; Hamada et al., 2013) et des chordés primitifs (Huang et al., 2008), aux poissons (Howe et al., 2016) et aux mammifères (Lamkanfi and Dixit, 2014). Même si les chordés et les génomes végétaux portent des gènes NLRs, les gènes codant pour ces protéines n'ont pas été trouvés dans plusieurs lignées animales telles que les nématodes et les arthropodes. Des protéines de type NLR avec une architecture similaire,

Subfamily	Member	Signaling pathway or function	Schematic presentation	Plant NBS-LRR
NLRA	CIITA	MHC II expression transactivator		
NLRB	NAIP	Flagellin and T3SS recognition	+-+-	
NLRC	NOD1 (NLRC1) NOD2 (NLRC2) NLRC4	Activation of NF-ĸB, autophage, type I IFN, MAPK Inflammasome formation		
	NOD3 (NLRC3) NLRC5 NLRX1(NOD9)	Anticancer, negative regulate NF-кB, STING signal MHC I expression transactivator, inhibit NF-кB, type I IFN Autophage, NF-кB and type I IFN inhibition		
NLRP	NLRP1 NLRP2	Inflammasome formation Inhibitor of NF-ĸB signaling	<mark>œ⊳-(∭)-</mark>	CARD
	NLRP3,6,7	Inflammasome formation		▲ AD ◆ BIR
	NLRP4	Negative regulator of type I IFN		O Unknown
NLRP2,5,7		Embryonic development		NACHI
	NLRP6	Regulation of NF-KB signaling, Intestinal antivirus		
	NLRP8			e pyd
	NLRP9	Inflammasome formation		FIIND
	NLRP11	Inhibitor of NF-KB/MAPK signaling		📕 CC
	NLRP12	Negative regulator of NF-KB in L cell		🛑 TIR
	NLKP13	behilder of CTINIC size of each ball fortilization		NB-ARC
	NLRP14 INDITOR OF STING Signal and neip fertilization			
	INLKP10	Denutric cell migration, i cell maturation		

Tableau 1. Représentation schématique de structures de domaines tripartites et de la fonction des NLRs humains et de plantes.

Les codes couleurs pour les domaines sont indiqués. CARD: caspase activation and recruitment domain; AD: acid transactivation domain; BIR : baculovirus IAP repeat; NACHT : un domaine retrouvé dans NAIP, CIITA, HET-E, et TP-1; LRR : leucine-rich repeat; PYD : pyrin domain; FIIND : function-to-find domain; CC : coiled coil; TIR : toll/interleukin-1 receptor; NB-ARC : domaine de liaison de nucléotides adaptateur retrouvé dans APAF1, dans les protéines de résistance de plantes, et chez CED4 de *C. elegans*. (d'après (Yang et al., 2019))



Figure 26. Stratégies pour la détection des pathogènes par les NLRs.

4 stratégies sont illustrées. Les détails de la façon dont chaque stratégie est mise en œuvre peuvent varier suivant les NLRs. Les stratégies « guard » (gardien) et « decoy » (leurre) sont analogues : dans les deux cas, les protéines « guardee » (gardées) ou « decoy » (leurre) sont impliquées dans le maintien de la NLR dans un état auto-inhibé, et dans les deux cas, l'inhibition est levée après modification par l'effecteur de la protéine gardée ou du leurre. Les protéines gardées se distinguent des leurres parce qu'elles ont une fonction additionnelle dans la défense de l'hôte, tandis que les leurres sont seulement des « imitations » des protéines de défense de l'hôte. Les gardées sont ainsi les cibles « naturelles » des effecteurs, tandis que les leurres sont ciblés accidentellement par les effecteurs. (d'après (Jones et al., 2016)) mais sans domaines LRR, sont présentes dans les champignons filamenteux, où elles peuvent jouer un rôle dans l'IV comme nous l'avons vu précédemment (Espagne et al., 2002; Leipe et al., 2004; Chevanne et al., 2010; Dyrka et al., 2014; Daskalov et al., 2015a). Ainsi, les NLRs et les protéines fongiques de type NLR représentent une architecture protéique déployée à travers les différents royaumes du vivant pour la défense de l'hôte et/ou la reconnaissance du non-soi **(Tableau 1)** (Jones et al., 2016).

Quatre stratégies de détection des pathogènes par les NLRs des animaux et des plantes ont été conceptualisées (Figure 26) (Jones et al., 2016). La première, est la stratégie de reconnaissance directe du ligand par la NLR, induisant un changement de conformation de celle-ci de l'état auto-inhibé à l'état actif à partir duquel le NLR pourrait s'oligomériser et transduire le signal. Deux hypothèses assez similaires pour la reconnaissance indirecte par les NLRs sont les modèles « gardien (guard) » et « leurre (decoy) ». Dans le modèle « gardien », le NLR est supposé agir comme un gardien d'une protéine de l'hôte, désignée sous le nom de « guardee » (gardée), qui est la cible de modifications médiée par les effecteurs pathogènes. La protéine surveillée agirait comme un inhibiteur de la NLR, et une fois modifiée, la NLR passe sous un état activé. Dans ce cas, la cible de l'effecteur pathogène est supposée avoir un rôle dans la promotion de la virulence. Dans le modèle « leurre », des protéines de l'hôte sont supposées avoir évoluées par duplication d'un gène codant une protéine « guardee » ancestrale, et auraient perdu leur fonction originelle qui faisait d'elles des cibles potentielles d'effecteurs dans les infections pathogènes. Même principe, le leurre agirait comme un inhibiteur du NLR, et une fois le leurre modifié, le NLR passe dans un état activé. Un modèle hybride de reconnaissance directe et indirecte du non-soi propose qu'une protéine hôte puisse servir de cofacteur pour l'association directe avec le NLR. La dernière stratégie, absente pour les NLRs de mammifères, s'appelle le modèle « leurre intégré (integrated decoy) » et fonctionne selon le même principe que le modèle précédent, sauf que dans ce cas-là, c'est une paire de NLRs qui surveillent le leurre. Ce dernier modifié, la paire de NLRs est activée et ces deux NLRs pourraient co-oligomériser.

3.4.2 Les NLRs des animaux

La famille des NLRs est une famille de récepteurs intracellulaires jouant un rôle important dans la régulation des réponses immunitaires innées (Kaparakis et al., 2007; Lamkanfi and Dixit, 2014; Broz and Dixit, 2016; Meunier and Broz, 2017). Les protéines NLRs partagent une structure en domaines tripartite **(Tableau 1)**, avec un domaine N-terminal d'interaction protéine-protéine (aussi appelé domaine effecteur), un domaine central de liaison de nucléotides et d'oligomérisation de type NACHT (NOD : nucleotide-binding and oligomerization domain) et un nombre variable de LRR formant le domaine C-terminal (Yang et al., 2019). Une architecture similaire est présente dans les NLRs de plantes (Jones et al., 2016) et dans la protéine Apaf-1 **(Figure 27)**, mais cette dernière contient deux

APAF-1 apoptosome	NLRC4/NAIP5 inflammasome	ZAR1 resistosome	
Apaf-1	NAIP5 NLRC4	ZAR1 PBL2	"OFF" state of scaffold proteins Scaffold proteins keep a folded form due to interactions of the C-terminal domain (LRR or WD-40) to the N-terminal part of the protein. At this state dATP or ADP is bound to the NBD domain.
Cyre		AVIAL	Ligand recognition Apaf-1 and ZAR1 sense the presence of stimuli (cytochrome-c and uridylation of PBL2, respectively) through their C-terminal domain (WD-40 and LRR, respectively). NLRC4 senses the stimuli indirectly through conformational changes triggered to NAIP from stimuli (e.g. flaggelin) binding.
~	**		Role of ATP/ADP exchange in activation Despite stimuli perception, Apaf-1 and ZAR1 are not activated unless exchange of ATP/ADP takes place at the NBD domain. When this occurs they oligomerize giving rise to the corresponding macromolecular structure. For NLRC4 oligomerization and complex formation the release of ADP seems sufficient after stimuli perception.
			Complex formation The APAF-1 apoptosome forms a wheel-shaped heptameric complex with sevenfold symmetry structure comprising in Apaf-1 and cytochrome-c in a 1:1 ratio. The NLRC4/NAIP5 inflammasome has a disk-like structure and consists of a single NAIP5-flaggelin and ten NLRC4 protomers. The ZAR1 resistosome is a pentamer with each spoke consisting of a ZAR1/RK51/PBL2 heterotrimer.
pro-caspase-9 recruitment	pro-caspase-1 recruitment	, , ,	Activation of immune responses APAF-1 and NLRC4 complex formation leads to pro-caspase recruitment and their activation ultimately leading to apoptosis and inflammation respectively. The signaling pathway after ZAR1 complex formation remains elusive.
★ Cytochrome-c ★ Flaggelin ★ AvrAC	● ATP ● ● ADP ◆	RKS1 CARD PBL2 CC don PBL2* BIR do	MACHT/NB-ARC nain WD-40 main MD-40

Figure 27. Vue d'ensemble de l'apoptosome APAF-1, du résistosome des plantes et de la voie d'activation de l'inflammasome NLRC4/NAIP.

La formation de l'apoptosome est déclenchée par la libération de cytochrome-c des mitochondries en réponse à un stimulus de mort cellulaire interne ou externe. Lors de la liaison du dATP et du cytochrome c à l'extrémité C terminale d'APAF1, la protéine cytosolique APAF-1 forme un apoptosome oligomérique. L'apoptosome APAF-1 activé forme un complexe heptamérique en forme de roue avec une structure de symétrie septuple. La formation de l'inflammasome NLRC4/NAIP5 est déclenchée par la détection de stimuli bactériens (par exemple, la flagelline), qui est détectée par NAIP5. En conséquence, les NAIP co-oligomérisent avec NLRC4, conduisant à la formation d'une structure en forme de disque, similaire à celle de l'apoptosome, contenant 11 monomères. Le déclencheur de la formation du résistosome ZAR1 est l'uridylation de PBL2 par l'effecteur AvrAC de *Xanthomonas campestris pv. campestris*. Le PBL2 uridylé (PBL2*) est reconnu par le complexe cytoplasmique préformé ZAR1/RSK1, conduisant à une libération d'ADP à partir de ZAR1, amorçant ainsi l'activation mais n'activant pas ZAR1. L'activation semble être le résultat de la liaison de l'ATP ou du dATP à la forme appauvrie en ADP de ZAR1, conduisant à l'oligomérisation du complexe ZAR1/RKS1/PBL2* en une forme plus grande, un pentamère avec une structure en forme d'entonnoir au centre. Abréviations: APAF-1, Apoptotic protease-activating factor-1; BIR, baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat; CARD, caspase recruitment domain; CC, coiled coil domain; LRR, leucine-rich repeat; NAIP, NLR family apoptosis inhibitory protein; NBD, nucleotide-binding domain; NLR, nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat receptors; PBL2, PBS1-LIKE PROTEIN 2; ZAR1, HOPZ-ACTIVATED RESISTANCE 1. (d'après (Mermigka et al., 2020))

domaines WD40 en C-terminal au lieu de domaines LRRs (Riedl et al., 2005). Le module NOD peut être divisé en un NBD, un domaine hélicoïdal 1 (HD1) et un « winged helical domain » (WHD). Le domaine NOD est suivi d'un autre domaine hélicoïdal 2 (HD2) chez les animaux mais pas chez les NLRs de plantes (Maekawa et al., 2011). Suivant leur domaine effecteur N-terminal, les NLRs des animaux peuvent être subdivisés en quatre sous-familles (Tableau 1) : les NLRA, NLRB, NLRC et les NLRP (Meunier and Broz, 2017). La sous-famille NLRA contient un seul membre nommé CIITA qui présente un domaine de transactivation acide (AD) impliqué dans la régulation transcriptionnelle des gènes MHC (Major Histocompatibility Complex) de classe II. Les trois autres sous-familles sont caractérisées par la présence de modules d'interaction homotypique protéine-protéine impliqués dans le recrutement de molécules de transduction du signal. La sous-famille NLRB se distingue par la présence du domaine BIR (Baculovirus Inhibitor Domain). La présence d'un domaine CARD est une caractéristique de la sousfamille NLRC, tandis que les membres de la sous-famille NLRP possèdent un domaine PYD (Muñoz-Wolf and Lavelle, 2016). Les NLRs appartiennent à la superfamille AAA+ d'ATPases et par conséquent leur fonctionnement est supposé être comme celui d'un « interrupteur » moléculaire avec un état inactif ADP-lié et un état actif ATP-lié comme mode d'action, ceci s'appuie sur les études sur Apaf-1 (Riedl et al., 2005; Maekawa et al., 2011; Zhou et al., 2015).

Chez les animaux, il a été montré pour plusieurs NLRs que ceux-ci fonctionnent comme des PRRs, qui détectent les PAMPs ou les DAMPs (host-derived danger signals) dans le cytosol afin d'initier la réponse immunitaire innée (Zhou et al., 2015; Jones et al., 2016; Broz and Dixit, 2016). Tandis que chez les plantes, les NLRs reconnaissent spécifiquement les protéines effectrices de pathogènes afin d'initier la réponse immunitaire. Les études, principalement chez les animaux, ont permis l'établissement d'un paradigme pour la signalisation médiée par les NLRs. La perception d'un ligand induit l'oligomérisation des NLRs. Une fois oligomérisés, les NLRs recrutent la pro-caspase-1 soit directement, soit à travers la molécule adaptatrice ASC qui contient un domaine C-terminal CARD et un domaine N-terminal PYD. Ceci résulte en la formation d'un complexe multi-protéique cytosolique appelé l'inflammasome qui contrôle l'activation de la pro-caspase-1 (Zhou et al., 2015; Hu and Chai, 2016). Les interactions homotypiques CARD-CARD ou PYD-PYD sont essentielles dans l'assemblage des inflammasomes NLRs (Yin et al., 2015). La dérégulation des inflammasomes NLRs est associée à de nombreux désordres d'ordre immunitaire et métabolique (Strowig et al., 2012), ce qui souligne encore davantage le rôle physiologique de ces complexes. L'activation de la caspase-1 médiée par des inflammasomes permet le clivage protéolytique ainsi que la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18. La caspase-1 activée peut aussi cliver le substrat de la GSDMD pour induire la pyroptose (Kayagaki et al., 2015; Shi et al., 2015). Le clivage de GSDMD par la caspase-1 lève l'effet inhibiteur du domaine C-terminal sur l'activité de formation de pore du domaine N-terminal (GSDMD-N). Ce dernier peut s'oligomériser et



Figure 28. Modèles tridimensionnels d'apoptosome humain actif, d'inflammasome humain et de résistosome de plante.

Chaque structure macromoléculaire est représentée depuis des angles différents ; vue du dessus (A) ; vue du dessous (B), et vue de côté (C). Chacune de ces structures forme des complexes en forme de roue avec différents types de symétrie (symétrie septuple pour l'apoptosome APAF-1, symétrie d'ordre 11 pour l'inflammasome NLRC4/NAIP et pentamérique pour le résistosome de plante). Abréviations: APAF-1, Apoptotic protease activating factor-1; CARD, caspase recruitment domain; CC, coiled coil domain; HD, helical domain; NAIP, NLR family apoptosis inhibitory protein; NBD, nucleotide-binding domain; NLR, nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat receptors; PBL2, PBS1-LIKE PROTEIN 2; WHD, winged helix domain; ZAR1, HOPZ-ACTIVATED RESISTANCE 1. (d'après (Mermigka et al., 2020))

former des pores dans la membrane plasmique, résultant en un gonflement puis une lyse des cellules (Aglietti et al., 2016; Ding et al., 2016). Il existe également des NLRs ne formant pas des inflammasomes et pouvant réguler négativement les inflammations tels que NLRP12, NLRX1, et NLRC3.

Jusqu'à présent, plusieurs inflammasomes NLR tels que NLRP1, NLRP3, NLRP6, et NAIP/NLRC4 ont été identifiés et certains peuvent agir de façon redondante dans l'immunité innée (Duxbury et al., 2016). L'inflammasome de mammifère le mieux étudié est celui formé par le NLRC4 humain codé par le gène NLRC4. La protéine NLRC4 est apparemment conservée au sein d'un certain nombre d'espèces de mammifères et est homologue à la protéine CED4 de C. elegans. La sous-famille protéique à laquelle appartient NLRC4 inclut également le co-activateur transcriptionnel CIITA et la protéine NLRP3. NLRC4 contient un domaine N-terminal CARD, un domaine central NBD/NACHT et un domaine C-terminal LRR. NLRC4 coopère avec les protéines NAIP pour détecter le stimulus et former un oligomère. Les protéines NAIP sont des NLRs ayant un domaine N-terminal BIR. Dans le génome humain, seul un gène NAIP a été annoté comme codant au moins deux isoformes, cependant, dans le génome murin au moins quatre gènes NAIP distincts ont été identifiés (Kofoed and Vance, 2011). Les différentes interactions NAIP/NLRC4 déterminent la spécificité de ligand (Gong and Shao, 2012). Cela inclut la détection des composants du système de sécrétion de type III de Salmonella (T3SS), que ce soit PrgJ ou la flagelline bactérienne par NAIP2 et NAIP5 respectivement (Zhao et al., 2011) chez la souris, tandis que chez l'humain, les mêmes signaux sont détectés par deux isoformes de NAIP (Yang et al., 2013; Kortmann et al., 2015). NLRC4 réside dans le cytosol dans une forme auto-inhibée (Hu et al., 2013). De façon similaire à Apaf-1, cette auto-inhibition est partiellement atteinte par les interactions interdomaines au sein du NBD, HD1, WHD et HD2, qui est stabilisé par liaison à une molécule ADP. Un autre domaine de NLRC4 contribuant à l'auto-inhibition est le domaine C-terminal LRR. Pour l'activation de NLRC4, les NAIPs détectent le ligand correspondant (la flagelline pour NAIP5), à travers le domaine NB (Tenthorey et al., 2017) et non à travers le domaine LRR, comme anticipé. La liaison de la flagelline ouvre la conformation fermée de NAIP5 par le déplacement des domaines LRR et HD2. Ce changement de conformation expose les domaines NBD et WHD, qui vont à leur tour lier NLRC4, initiant ainsi un nouvel ensemble de changements de conformations pour NLRC4 (Tenthorey et al., 2017). Le site d'oligomérisation de NLRC4, WHD, devient exposé, libérant l'ADP lié, menant ainsi à la polymérisation de NLRC4 et à la formation de l'inflammasome (Hu et al., 2013; Zhang et al., 2015; Tenthorey et al., 2017). Le complexe NAIP/NLRC4 activé, recrute et oligomérise la caspase inflammatoire, la caspase-1, ce qui initie les réponses immunitaires (Mermigka et al., 2020).

Des réponses immunitaires peuvent avoir besoin d'une paire de NLRs afin d'être initiées, c'està-dire de deux NLRs fonctionnant de façon coopérative. Il y a souvent une répartition des fonctions dans cette paire de partenaires : l'un a une fonction de détection (senseur) tandis que l'autre a une

41







Figure 30. Assemblage du résistosome ZAR1 après induction par PBL2UMP.

L'interaction de PBL2^{UMP} (en bleu) avec le complexe préformé ZAR1-RKS1 (ZAR1-RKS1 inactif) déclenche des changements de conformation dans le NBD de ZAR1 ainsi que le relargage de l'adénosine diphosphate (ADP), permettant au complexe de lier du dATP ou de l'ATP. La liaison au dATP ou à l'ATP induit un remodelage structurel et un repliement de ZAR1, ce qui résulte en une activation complète de ZAR1 (ZAR1-RKS1-PBL2^{UMP} activé) et à la formation du résistosome ZAR1 (montré en vue du dessus et vue de côté). L'hélice (α 1) en N-terminal (en rouge) de ZAR1 est cachée dans le complexe inactif ZAR1RKS1 et devient exposée au solvant dans le complexe activé ZAR1-RKS1-PBL2^{UMP}. Dans ce dernier, les hélices (α 1) forment une structure en forme d'entonnoir (entourée en violet) dans le résistosome ZAR1 qui est requise pour l'association de celui-ci avec la membrane plasmique, le déclenchement de la mort cellulaire et la résistance à la maladie. (d'après (Wang et al., 2019))

fonction d'activation de la signalisation en aval (exécuteur). C'est le cas pour l'inflammasome NAIP/NLRC4 qui est composé de paires de NLRs senseur/exécuteur (helper). Dans ce système, NAIP est le NLR senseur et NLRC4 est le NLR helper. Le NLR helper est une NLR qui fonctionne pour transduire le signal en aval du senseur NLR (Duxbury et al., 2016) **(Figure 28)**.

Comme nous l'avons vu, les NLRs chez les animaux sont également impliqués dans la mort cellulaire programmée qu'est l'apoptose. En effet, chez l'homme, la voie intrinsèque de l'apoptose est déclenchée en réponse au relargage du cytochrome c par les mitochondries et aboutit à l'activation de certaines caspases qui exécutent le programme de mort cellulaire. Ce processus physiologique est contrôlé par le facteur pro-apoptotique Apaf-1 (Figures 27 et 28) (Li et al., 1997; Zou et al., 1997; Cecconi et al., 1998), une protéine NLR-like qui constitue la brique de base de l'apoptosome, une structure macromoléculaire formée dans la voie apoptotique dite intrinsèque. Cette structure sert de plateforme pour l'activation de molécules effectrices spécifiques, les caspases apoptotiques, qui vont enclencher la mort cellulaire (Mermigka et al., 2020).

3.4.3 Les NB-LRR de plantes

Les génomes de plantes codent un grand nombre de « nucleotide-binding, leucine-rich repeat proteins » (NB-LRR) **(Figure 29)**, dont beaucoup sont actives dans les réponses de détection et de défense immunitaire (Collier et al., 2011). Les protéines NLRs contiennent usuellement un domaine Nterminal spécifique, un NBD de type NB-ARC, et un domaine C-terminal très variable LRR. Le domaine N-terminal spécifique est typiquement soit un domaine TIR, soit un domaine CC (Coiled-Coil), soit un domaine « RESISTANCE TO POWDERY MILDEW8 » (RPW8)-like. Les NLRs correspondantes sont nommées respectivement TNLs, CNLs et RNLs. CC et TIR sont des domaines de signalisation qui peuvent induire des réponses immunitaires quand ils sont exprimés seuls. Les domaines NBD et LRR ont des fonctions de régulation et de senseurs. Les effecteurs pathogènes spécifiques sont détectés par les NLRs de façon directe ou indirecte.

Une voie de signalisation impliquant une NLR induisant la mort à travers la réponse hypersensible a récemment été caractérisée. Il s'agit de l'induction d'un complexe appelé le « résistosome » par la NLR ZAR1 activée chez la plante *Arabidopsis thaliana*. Wang et collaborateurs ont reconstitué *in vitro* un complexe oligomérique ZAR1RKS1-PBL2^{UMP}, qu'ils ont nommé le résistosome (Figure 30) (Wang et al., 2019). Zar1 est une CNL de la plante modèle *A. thaliana*, codée par le gène de résistance *HOPZ-ACTIVATED RESISTANCE 1* (Burdett et al., 2019). En réponse à divers effecteurs pathogènes bactériens, ZAR1 active la défense immunitaire via un mécanisme de reconnaissance indirect de l'effecteur. Ces protéines effectrices bactériennes modifient divers kinases



Figure 31. Modèle d'assemblage du résistosome ZAR1 après induction par AvrAC.

L'assemblage du résistosome induit la formation de pores dans la membrane de la cellule végétale. (d'après (Wang et al., 2019))

(receptor-like cytoplasmic kinases) en les acétylant, en les ribosylant, ou en les uridylylant afin de promouvoir la virulence par l'altération des réponses immunitaires dépendantes des RCLKs. Cependant, d'autres kinases de plante ont évoluées comme leurres afin de faciliter la reconnaissance de ces effecteurs. ZAR1 est capable de détecter les modifications faites par les effecteurs pathogènes sur les kinases servant de leurres, et d'activer la signalisation immunitaire. Dans le cas spécifique de l'effecteur AvrAC de Xanthomonas campestris, l'uridylylation du leurre RLCK PBL2 d'Arabidopsis mène à la liaison de la protéine modifiée (PBL2^{UMP}) sur le complexe préformé de ZAR1 avec RKS1, une RLCK sans activité kinase (donc une pseudokinase), pour activer la réponse ETI. Dans l'étude de Wang et collaborateurs, les auteurs ont pu décrire pour la première fois la structure 3D d'une NLR de plante et mis en évidence son mécanisme d'action. Le modèle d'activation du résistosome ZAR1 par AvrAC est le suivant (Figure 31) : à l'état inactif, le complexe préformé ZAR1-RKS1 est maintenu par l'interaction entre le domaine LRR lié à l'ADP de ZAR1 et RKS1. Dans ce complexe, ZAR1 est maintenue dans un état auto-inhibé grâce à des interactions intramoléculaires de plusieurs domaines. Après l'infection par le pathogène, AvrAC uridyle PBL2, et ce PBL2 modifié (PBL2^{UMP}) va ensuite servir de ligand pour interagir exclusivement avec le RKS1 du complexe ZAR1-RKS1. La liaison de PBL2^{UMP} initie l'activité de facteur d'échange de nucléotide de RKS1 par la stabilisation du segment d'activation de RKS1. Une fois activée, RKS1 facilite la libération de l'ADP de ZAR1 en induisant un changement conformationnel dans le NBD de ZAR1, ce qui permet à ZAR1 de lier du dATP ou de l'ATP. La liaison de dATP ou d'ATP induit d'autres changements conformationnels de ZAR1 et conduit à un réarrangement de son domaine CC, résultant en la formation d'un complexe pentamérique ZAR1-RKS1-PBL2^{UMP}, appelé le résistosome. Les hélices N-terminales de ZAR1 dans le résistosome forment une structure en entonnoir qui facilite l'association ou l'intégration dans la membrane plasmique. Le résistosome associé ou intégré dans la membrane plasmique peut fonctionner comme un exécuteur de la mort cellulaire et/ou comme un inducteur de réponse immunitaire en perturbant l'intégrité de la membrane plasmique ou l'homéostasie ionique.

3.4.4 Les NLRs chez les champignons filamenteux

3.4.4.1 Généralités

Chez les plantes et les animaux, les NLRs sont des composants essentiels de l'immunité innée. Les travaux sur l'incompatibilité fongique ont révélé l'existence d'homologues NLRs chez les champignons avec des fonctions de détection et de réponse au non-soi (Figure 32). Chez les champignons, plus de 5600 gènes putatifs de type NLR (NLR-like est utilisé pour signifier des architectures ne contenant pas de LRR) ont été identifiés bioinformatiquement dans 198 génomes, correspondant à 164 espèces différentes (Dyrka et al., 2014). Les gènes de type NLR sont présents dans toutes les branches du règne fongique à l'exception des levures. La majorité des gènes fongiques de



Figure 32. Les récepteurs de type NOD contrôlent diverses formes de PCD chez les mammifères et les champignons filamenteux.

NLRP3 et APAF1, donnés à titre d'exemples, contrôlent respectivement la pyroptose et l'apoptose. L'activité NLRP3 est déclenchée par divers DAMPs, ce qui conduit à une mort cellulaire pyroptotique hautement inflammatoire. APAF1 contrôle la voie de mort cellulaire apoptotique intrinsèque chez les mammifères. Trois exemples sont donnés de récepteurs fongiques de type NOD contrôlant la PCD. HET-E contrôle la réaction d'incompatibilité hétérocaryotique chez *P. anserina*. La PCD est déclenchée par des variants alléliques incompatibles de HET-C, une protéine de transfert de glycolipides (GLTP). La voie de signalisation en aval de l'activation de HET-E et le mécanisme spécifique de la mort cellulaire ne sont actuellement pas clairs. Certains NLRs fongiques (par exemple, NWD2 de *P. anserina* ou PNT1 de *Chaetomium globosum*) utilisent des motifs amyloïdes courts (R0 ou PP (pseudo-palindromique) respectivement) pour induire une réaction de mort cellulaire apparentée à la nécroptose - PCD inflammatoire chez les métazoaires (d'après (Gonçalves et al., 2017))



Figure 33. Organisation des domaines des membres de la famille des gènes NWD de P. anserina.

Tous les membres de la famille NWD partagent un domaine de liaison nucléotidique et d'oligomérisation NACHT central ainsi qu'un domaine de répétition WD en C-terminal, mais diffèrent par leurs domaines effecteurs N-terminaux. Ce domaine effecteur peut être un domaine induisant la mort cellulaire de type HET (PF06985) ou autre (NWD1 à NWD5). NWD2 n'a pas de domaine effecteur N-terminal. (d'après (Daskalov et al., 2012))

type NLR codent pour un type NACHT de NBD, bien que des domaines NB-ARC soient également présents (ratio de 1:5 pour NACHT). Les protéines fongiques de type NLR présentent une grande variété de domaines N-terminaux avec au moins 12 classes différentes décrites, dont certaines codent pour des lipases putatives, des phosphorylases et des activités de toxines impliquées dans la formation de pores membranaires (Dyrka et al., 2014). Trois types différents de répétitions formant des superstructures (ANK, TPR ou WD40), sont les plus fréquentes à l'extrémité C-terminale des NLRs fongiques. Certains de ces domaines C-terminaux contenant des répétitions définissent la spécificité du signal des récepteurs et éventuellement, comme on le soupçonne pour les NLRs des plantes et des métazoaires, régulent négativement le processus d'oligomérisation médiée par les NBDs (Chevanne et al., 2010; Daskalov et al., 2015a). Pour diverses protéines fongiques de type NLR, des variations intraspécifiques du nombre de répétitions ont été signalées (Dyrka et al., 2014) et une sélection positive (résultant en une diversification) sur certains codons des répétition WD40 des protéines de type NLR HET-E, HET-D, HET-R induisant de l'IV a été identifiée (voir partie 2) (Paoletti et al., 2007). Il a été proposé que les processus de réarrangement inter- et intragénique des répétitions basés sur la sélection positive augmentent leur diversité, conduisant à un répertoire de reconnaissance du non-soi extrêmement divers et vaste pour cette classe de récepteurs (Paoletti et al., 2007; Chevanne et al., 2010).

3.4.4.2 Les domaines effecteurs

<u>HET</u>

Un domaine effecteur fréquemment trouvé dans les protéines fongiques de type NLR est le domaine HET (Paoletti and Clavé, 2007). Le domaine HET a acquis cette désignation car il a été trouvé dans différentes protéines impliquées dans la reconnaissance du non-soi sous forme d'IV chez les champignons (Smith et al., 2000). En particulier, ce domaine constitue le domaine effecteur N-terminal des membres de la famille *HNWD* (Figure 33), qui comprend les gènes d'incompatibilité *het-e, het-d* et *het-r*. Des études fonctionnelles ont identifié ce domaine comme étant un domaine effecteur de mort cellulaire et d'incompatibilité chez *P. anserina* (Paoletti and Clavé, 2007). Comme nous l'avons vu précédemment, la protéine HET-E est une ATPase de type STAND avec une architecture similaire à celle du composant de l'apoptosome, Apaf-1 et des composants NLRs de l'inflammasome. La région de répétitions C-terminale WD40 de HET-E peut détecter les produits d'allèles particuliers du gène *het-c*. Lors de la liaison de HET-C, la STAND ATPase subit un changement de conformation conduisant à l'exposition de la région N-terminale de HET-E, le domaine HET ne sont pas considérés comme des domaines de recrutement, mais plutôt comme des domaines induisant une désintégration directe de la membrane, conduisant à un type de mort cellulaire nécrotique (Paoletti and Clavé, 2007). On peut



Figure 34. Distribution in vivo des protéines de fusion HET-s(218-289)-GFP.

Fluorescence dans une souche Δhet -s exprimant la protéine de fusion HET-s(218-289)-GFP, avant (panneau supérieur) et après (panneau inférieur) contact avec une souche [Het-s]. La protéine HET-s sous forme soluble [het-s*] est visible en fluorescence diffuse, tandis que sous forme prion elle est visible sous forme de foci (dots) [het-s]. Barre d'échelle = 5 μ m. (d'après (Balguerie et al., 2003))



Figure 35. La structure du domaine N-terminal HeLo de HET-S.

(A) Diagramme en ruban de HET-S (1–227). La couleur du ruban est un dégradé arc-en-ciel de l'extrémité N-terminale (rouge) à l'extrémité C-terminale (violet). Les régions de la molécule sont mises en évidence comme suit : boucle flexible L5–6 en noir, résidus A23 et H33 sous forme de sphères noires, localisation des mutants ponctuels qui peuvent convertir HET-S en phénotype [HET-s] sous forme de sphères rouges, et résidu E86 représenté par une sphère jaune. Les hélices sont numérotées 1–9 et $\beta 1 - \beta 2$ pour les brins β . (B) Vues perpendiculaires du dimère HET-S (1–227) observé en cristallographie, les résidus consensus issus des algorithmes de prédiction d'agrégation β sont sous forme de tubes noirs. (d'après (Greenwald et al., 2010))

constater que le domaine HET est relativement fréquent en tant que domaine N-terminal de protéines fongiques de type NLR et qu'il est souvent associé à des répétitions hautement conservées, potentiellement capables de diversification rapide (Dyrka et al., 2014).

Des études bioinformatiques ont montré des similarités entre le domaine HET et le domaine effecteur TIR identifié dans diverses protéines de l'immunité innée végétale et métazoaire (Paoletti and Clavé, 2007; Dyrka et al., 2014; Duxbury et al., 2016). Ces domaines TIR fonctionnent comme des domaines adaptateurs médiant des interactions homotypiques protéine-protéine initiant des cascades de signalisation associées à différentes réactions de mort cellulaire programmée (Ve et al., 2015).

<u>HeLo</u>

Une large fraction des domaines effecteurs des NLRs est constituée de domaines HeLo ou HeLo-like (HELL), le domaine HeLo ayant été initialement caractérisé dans la protéine HET-S de P. anserina (Greenwald et al., 2010; Seuring et al., 2012). Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la protéine HET-S appartient au système d'incompatibilité allélique het-s/het-S. Ces allèles codent pour des protéines de 289 acides aminés présentant deux domaines. Un domaine α hélicoïdal N-terminal, appelé HeLo qui couvre les acides aminés 1 à \sim 227 et est responsable de l'exécution de la mort cellulaire (Seuring et al., 2012), et le domaine C-terminal appelé PFD (prion forming domain) qui occupe les positions 218 à 289 (Balguerie et al., 2003; Greenwald et al., 2010). Le PFD est appelé ainsi car il est à la fois nécessaire et suffisant pour la formation d'amyloïdes et la propagation des prions (les domaines prions fongiques seront décrits en détail dans la partie 4) (Dos Reis et al., 2002; Balguerie et al., 2003). Le domaine PFD peut adopter un repliement en solénoïde- β (détaillé dans la partie 4) et former une structure amyloïde non toxique en soi. Ainsi, lorsque la protéine HET-s est marquée avec un tag fluorescent comme la GFP, la fluorescence est diffuse lorsque la protéine est sous forme soluble, état [Het-s*], et elle apparaît sous forme de foci lorsque la protéine est sous forme prion (donc agrégée), état [Het-s] (Figure 34) (Balguerie et al., 2003). En résumé, le domaine d'exécution de mort HeLo est activé suite au changement de conformation du domaine PFD de HET-S lors d'un mécanisme de transduction du signal amyloïde (Greenwald et al., 2010; Mathur et al., 2012; Seuring et al., 2012).

La structure du domaine HeLo de HET-S (1–227) a été résolue et un modèle structural a été établi, montrant un repliement α hélicoïdal de 8 à 9 hélices avec un court feuillet β à deux brins **(Figure 35)**. La première hélice, α 1 (résidus 2-8) n'est visible que dans les cristaux HET-S. Les cinq premières hélices de HET-S se replient dans un faisceau anti-parallèle régulier suivi d'une boucle et d'un court brin β qui relie α 5 et α 6. Cette boucle comprenant les résidus 137–147 et le brin β 2 repasse à travers la molécule (entre α 2 et α 4), de sorte que α 5 et α 6 sont parallèles mais de part et d'autre de la molécule. Les trois dernières hélices (α 7- α 9) forment une sous-structure en faisceau à trois hélices qui s'assemble à peu près perpendiculairement aux six premières hélices. La forme générale du repliement



Figure 36. L'incompatibilité [Het-s]/HET-S.

(A) Lorsqu'elles sont confrontées sur un milieu solide, les souches [Het-s] et [Het-S] fusionnent et produisent une réaction de barrage (tête de flèche noire) indiquant l'apparition d'une réaction d'incompatibilité. En revanche, un contact entre deux souches [Het-S] est normal et ne montre aucune ligne de démarcation (tête de flèche blanche). (B) Schéma du résultat d'une fusion cellulaire [Het-s]/[Het-S] : un mélange cytoplasmique se produit et la forme prion de HET-s interagit avec HET-S et conduit à l'activation d'une activité de formation de pores. Lors de l'activation, HET-S est déplacée vers la membrane plasmique, exerce une toxicité et induit la mort cellulaire. (C) Lorsque HET-s est à l'état soluble (non-prion) ([Het-s *]), la fusion cellulaire avec HET-S ne conduit pas à une incompatibilité. (D) Lorsque [Het-s] fusionne avec [Het-s *], la forme prion se propage dans les cellules [Het-s *] et les convertit à l'état [Het-s]. (d'après (Riek and Saupe, 2016))



Figure 37. Perméabilisation des liposomes par HET-S en présence des amorces amyloïdes de HET-s(218-289) observée par cryo-microscopie électronique.

(A) Images en microscopie électronique des liposomes incubés à 4°C en absence de protéine. (B) Les liposomes incubés en présence de HET-S et des amorces amyloïdes de HET-s(218-289) présentent des dommages membranaires : sous forme de trous de diamètre variable entre ~10 et ~60 nm (flèches blanches). Les formes interprétées comme des agrégats protéiques sont montrées par des flèches noires. (d'après (Seuring et al., 2012))

est à peu près un triangle équilatéral d'environ 55 Å sur un côté et d'une épaisseur d'environ 25 Å (Greenwald et al., 2010).

Dans le cadre de l'incompatibilité *het-s/het-S*, la mort cellulaire est induite spécifiquement lorsque la forme prion de HET-s interagit avec la protéine partenaire HET-S (Figure 36 à 38). Fonctionnellement, les régions de formation de prions de HET-S et HET-s sont équivalentes. La différence fonctionnelle entre HET-S et HET-s réside dans le domaine HeLo qui est inactif dans la protéine HET-s comme nous le verrons ci-dessous (Balguerie et al., 2003; Deleu et al., 1993). L'interaction de HET-S avec les agrégats de prions HET-s conduit à un repliement du PFD de HET-S en une structure en solénoïde-β identique à celle du PFD de HET-s. En raison du chevauchement structural des domaines HeLo et PFD, ce repliement du PFD conduit à une déstabilisation partielle du domaine HeLo de HET-S au cours duquel un segment N-terminal d'environ 30 acides aminés est expulsé du repliement dans lequel il était précédemment enfoui. Ce segment qui est prédit come une hélice transmembranaire (TM) se retrouve alors ancré à la membrane et convertit HET-S en une protéine membranaire intégrale. Dans la bicouche lipidique, HET-S s'oligomérise en complexes qui perforent la membrane, conduisant à une toxicité via la rupture de la membrane.

In vivo, l'interaction [Het-s]/HET-S amène HET-S à se déplacer du cytoplasme vers la membrane cellulaire. Ce phénomène est visible en microscopie à fluorescence lorsque ces protéines portent un marqueur de fluorescence, telle que la GFP ou la RFP (**Figure 39**). Ce déplacement et l'induction associée de la mort cellulaire se produisent à la fois chez *Podospora* et chez la levure, ce qui suggère une toxicité directe (Mathur et al., 2012). L'interaction entre HET-S et HET-s se produit via la région du PFD C-terminale. L'interface moléculaire entre les régions PFD HET-S et HET-s a été caractérisée par RMN du solide (Seuring et al., 2012). Les mutations qui affectent le repliement du solénoïde- β abolissent l'activité HET-S, indiquant que le repliement β de cette région est nécessaire pour l'induction de la toxicité (Greenwald et al., 2010).

Il a été proposé que l'activité de HET-S dépend de deux fonctions: (i) la liaison membranaire, comme démontré par un test de fuite de liposomes, et (ii) l'oligomérisation en une entité toxique, comme démontré par des données de diffusion d'une lumière laser sous multiples angles (MALS) avec HET-S en utilisant des détergents imitant la membrane, et comme suggéré par la taille des altérations observées dans les membranes des liposomes (Seuring et al., 2012). Il avait été démontré que le domaine HeLo de HET-s était incapable d'induire la mort cellulaire (Balguerie et al., 2003). Ceci a été ensuite expliqué par le fait que certaines des substitutions d'acides aminés entre les domaines HeLo de HET-s et HET-S interférent avec l'une ou l'autre des fonctions citées ci-dessus. En effet, la mutation D23A dans HET-S élimine l'hélice TM prédite et la convertit en une protéine plus semblable à HET-s (Seuring et al., 2012). La mutation H33P n'élimine pas l'hélice TM prédite; cependant, la proline peut



Figure 38. Modèle du mécanisme de la réaction d'incompatibilité végétative entre le prion [Het-s] et la protéine HET-S.

Les points clés du modèle sont indiqués par les numéros dans l'ordre des événements. (d'après (Seuring et al., 2012))



Figure 39. Micrographie d'une fusion cellulaire entre une souche exprimant la protéine de fusion fluorescente verte HET-S-GFP et une souche exprimant la protéine fluorescente rouge HET-s-RFP. [Het-s] déclenche la relocalisation de HET-S vers la membrane cellulaire. Barre d'échelle, 10 μm. (d'après (Riek and Saupe, 2016)) restreindre la conformation de l'hélice de sorte qu'elle ne puisse pas s'oligomériser en entité toxique. Par ailleurs, la mutation E86K perturbe une interface de dimérisation identifiée précédemment dans le domaine HeLo (Greenwald et al., 2010) et affecte donc les propriétés d'oligomérisation de HET-S et en conséquence son potentiel de fuite de liposomes. HET-s est donc dépourvue d'activité de formation de pores et, par conséquent, la transconformation du PFD du prion HET-s n'induit pas de toxicité. Cette propriété permet à HET-s d'être propagée comme un prion non toxique. Contrairement à HET-s, HET-S ne forme pas de fibrilles bien ordonnées *in vitro. In vitro*, la formation ordonnée de fibrilles HET-S est probablement entravée par l'agrégation hydrophobe des domaines HeLo activés. HET-s peut être considérée comme une forme mutante de HET-S avec un domaine HeLo inactif.

Récemment, on a découvert que le gène immédiatement adjacent à het-S dans le génome de P. anserina code pour une protéine avec une courte région N-terminale présentant une homologie avec le motif élémentaire en solénoïde-β de HET-s (Daskalov et al., 2012) (Figure 40). Cette protéine, appelée NWD2, est un récepteur fongique NLR. La liaison du ligand induit une oligomérisation et une signalisation en aval via le domaine N-terminal. NWD2 a un domaine central de liaison nucléotidique et d'oligomérisation NACHT et un domaine de répétition WD C-terminal. Pour expliquer le regroupement génomique et l'homologie entre HET-S et NWD2, il a été proposé que NWD2 et HET-S soient des partenaires fonctionnels. L'oligomérisation induite par le ligand de NWD2 entraînerait le regroupement spatial des régions PFD N-terminales (Daskalov et al., 2012). Ce regroupement spatial permettrait le repliement coopératif de ces régions en un repliement solénoïde-β-like similaire à HETs et induirait une transconformation prion du PFD de HET-S. Ces résultats conduisent à un modèle dans lequel l'oligomérisation induite par le ligand de NWD2 permet le regroupement spatial du motif HET-S/s-like et fournit des conditions pour la nucléation coopérative du repliement solénoïde-β qui peut ensuite matricer la transconformation du PFD de HET-S (Figure 41). NWD2/HET-S est un système à deux composants dans lequel le processus de transduction du signal implique une transconformation amyloïde depuis la NLR vers une protéine effectrice (Daskalov et al., 2012, 2015a). Conformément à cette hypothèse, dans une étude sur la signalisation de type prion par des complexes immunitaires, X. Cai et ses collaborateurs ont constaté que le motif N-terminal HET-S/s-like de NWD2 et le PFD de HETs peuvent remplacer fonctionnellement les domaines de signalisation PYD dans un NLR humain et leurs effecteurs en aval apparentés, respectivement, NLRP3 et ASC (Figure 42) (Cai et al., 2014).

La dénomination du domaine HeLo provient d'une recherche PSI-BLAST à l'aide du domaine globulaire de HET-s ayant permis de trouver plus d'une trentaine d'homologues, tous dans des champignons filamenteux et tous de fonctions inconnues (Greenwald et al., 2010). L'un d'eux a été identifié dans un screening de mutants affectant la pathogénicité de *Leptosphaeria maculans*, c'est un champignon phytopathogène qui cause une pathologie appelée nécrose du collet (blackleg disease)

53



Figure 40. Organisation génomique du locus *Nwd2/het-S* et homologie entre la région HET-S PFD et la région N-terminale de NWD2.

(A) Structure génomique du locus *het-s/Nwd2* locus dans les souches sauvages *het-S* et *het-s*. NWD2 est codé par le gène immédiatement adjacent à *het-S* dans le génome. Les deux gènes sont transcrits de façon divergente. Les cadres ouverts de lecture sont séparés par 0,6 kb. Dans les souches sauvages *het-s*, nwd2 contient une "cicatrice" de transposon *repa* correspondant à une insertion d'environ 0,5 kb, aboutissant à l'apparition de codons stop prématurés; *nwd2* est donc un pseudogène inactif dans toutes les souches sauvages *het-s*. (B) Alignement de séquences entre la région N-terminale de NWD2 (3–23), la première (226–246) et la deuxième répétition (262–282) de 21 acides aminés de la région PFD de HET-S. (d'après (Daskalov et al., 2015))



Figure 41. Modèle proposé pour l'interaction NWD2/HET-S.

Basé sur le paradigme APAF-1 pour le mécanisme d'activation des protéines STAND, il est proposé que NWD2 soit dans un état inactif fermé en absence de ligand, et subisse une transition dans un état ouvert lors de la liaison du ligand au niveau des répétitions WD, ce qui permet l'oligomérisation via les domaines NOD. Il est proposé que cette étape d'oligomérisation amène les extrémités N-terminales des molécules NWD2 à proximité et permette leur repliement coopératif en solénoïde β . Dans ce modèle, ce repliement amyloïde sert alors de matrice pour nucléer la transconformation de HET-S et l'activation du domaine de toxicité HeLo. (d'après (Daskalov et al., 2012))

sur les plantes de la famille des Brassicaceae, qui inclut la navette, la moutarde noire, le chou et surtout le colza (*Brassica napus*). Cette protéine de 529 acides aminés a été appelée LOP-B (pour Loss-Of-Pathogenicity) et sa partie N-terminale présente 31% de similarité avec le domaine globulaire de HET-s. Dès lors, ce domaine fongique avec son repliement hélicoïdal particulier est mentionné comme domaine HeLo (<u>HE</u>T-s/LOP-B). Une forme variante de ce domaine est encore plus fréquente et est nommée HeLo-like (Dyrka et al., 2014; Daskalov et al., 2016). Ce domaine montre des pourcentages d'identité faible avec HeLo et ne répond pas à la signature pfam-A HeLo mais possède une hélice TM qui présente des homologies avec celles de HET-S. Il est de taille similaire au domaine HeLo et présente une organisation structurale prédite qui rappelle celle de HET-S d'où son nom. Il est proposé que ce domaine joue un rôle similaire à celui de HeLo dans l'exécution de la mort cellulaire (Daskalov et al., 2016; A. Daskalov et al., 2020).

La transduction du signal amyloïde à base de NLR a été reliée de manière évolutive à la mort cellulaire programmée appelée nécroptose chez les métazoaires (Daskalov et al., 2016; Grootjans et al., 2017). Comme nous l'avons vu, la mort cellulaire nécroptotique repose sur les protéines kinases RIP1 et RIP3, qui forment des complexes de signalisation à base d'amyloïde médiés par un motif court (~ 19aa) appelé RHIM (Rebsamen et al., 2009; Orozco et al., 2014). Le motif RHIM semble apparenté évolutivement à certains des amyloïdes de signalisation présents dans les protéines fongiques NLRs (Daskalov et al., 2016; Kajava et al., 2015). En outre, les deux voies de signalisation (signalisation amyloïde basée sur le NLR et nécroptose) conduisent à la mort cellulaire programmée par des dommages à la membrane plasmique à travers un domaine α -hélicoïdal conservé - nommé HeLo ou HeLo-like dans les champignons et 4HB chez les métazoaires (région N-terminale de la protéine d'exécution de la nécroptose, MLKL) (Seuring et al., 2012; Hildebrand et al., 2014). De plus, les domaines fongiques de type HeLo et HELL (et par extension le domaine 4HB de MLKL) ont une homologie avec un domaine N-terminal de type CC lié à RPW8 de certains NLR végétaux, pour lesquels une fonction de ciblage membranaire dans un contexte de réponse immunitaire innée a également été signalée (Collier et al., 2011; Daskalov et al., 2016; Zhong and Cheng, 2016). Ainsi, il semble probable que certaines voies moléculaires de la mort cellulaire programmée dans les trois grands règnes eucaryotes aient des mécanismes d'exécution de la mort cellulaire conservés.

<u>Lipase</u>

Une autre classe abondante de domaine effecteur N-terminal est le domaine de type sesB, qui correspond à un domaine lipase prédit (Graziani et al., 2004; Daskalov et al., 2012). Ce domaine lipase se trouve dans la protéine SERAC1 humaine qui est impliquée dans une maladie métabolique (Wortmann et al., 2012). SERAC1 humaine présente une activité phospholipide estérase et est capable de modifier la composition lipidique de la membrane plasmique. Il se peut que les domaines de type



Figure 42. Un PRR fongique conservé et un prion induisant la mort peuvent remplacer fonctionnellement NLRP3^{PYD} et ASC^{PYD} dans la signalisation de l'inflammasome.

(A) Représentations schématiques des voies de signalisation de l'inflammasome mammifère NLRP3 et des voies de signalisation fongiques NWD2. Le repliement prédit du domaine N-terminal de NWD2 (le même que celui du PFD de HET-s) est indiqué en utilisant une bande jaune, alors que le PFD de HET-s héberge deux de ces motifs en tandem. L'astérisque indique un domaine HeLo inactif. (B) Représentations schématiques de protéines de fusion entre NWD2/HET-s et NLRP3/ASC. (d'après (Cai et al., 2014))

sesB induisent une modification spécifique de la membrane plasmique en réponse au non-soi. La liste d'annotations contient un autre domaine lipase, à savoir le domaine Patatine. Fait intéressant, le domaine Patatine a été décrit comme impliqué dans le contrôle de la PCD et la défense chez les plantes (Cacas et al., 2009; Camera et al., 2009; Kim et al., 2014). Sur la base du fait que l'un des gènes d'incompatibilité du champignon *C. parasitica* code pour un NLR avec un domaine Patatine, on peut raisonnablement en déduire que les domaines de type Patatine pourraient également fonctionner dans le contrôle de la mort cellulaire chez les champignons. Considérant que le domaine C2, identifié comme domaine effecteur N-terminal dans des NLRs de basidiomycètes, est un domaine de liaison aux lipides (Corbalan-Garcia and Gómez-Fernández, 2014), il apparaît qu'une fraction significative des domaines N-terminaux identifiés chez les NLRs de champignons ciblent les membranes ou les lipides.

<u>PNP-UDP hydrolases/phosphorylases</u>

Le domaine RelA_SpoT n'était jusqu'à présent décrit que dans les protéines chloroplastiques, bactériennes et végétales (Atkinson et al., 2011); il est identifié à présent comme le domaine effecteur N-terminal de NLRs fongiques. Ce domaine porteur d'activité enzymatique est responsable de la synthèse de l'alarmone bactérienne ppGpp, qui médie la réponse stringente chez les bactéries (Boutte and Crosson, 2013). Une explication possible de la présence de ce domaine en tant que domaine N-terminal des NLRs fongiques serait que les champignons exploitent la cascade de signalisation procaryote ppGpp pour manipuler des pathogènes bactériens, des concurrents ou des symbiotes. La même chose pourrait être vraie pour la classe PNP_UDP. Sur la base de l'analyse du domaine PNP_UDP dans les NLRs de *P. anserina*, ces domaines prédits comme étant méthylthioadénosine/S-adénosylhomocystéine nucléosidases seraient impliqués dans la synthèse de molécules sensibles au quorum-sensing comme Al-2 (Parveen and Cornell, 2011). Il est possible que ces domaines effecteurs manipulent la signalisation procaryote dans le contexte d'interactions défavorables ou bénéfiques.

3.4.4.3 NLRs et immunité innée

Globalement, lorsque l'on considère les domaines trouvés en N-terminal du domaine NOD dans cette collection de NLRs (Figures 43 à 45), deux catégories principales émergent. Les domaines de classe 1 correspondent à des domaines qui ont une fonction enzymatique proposée ou un rôle direct potentiel dans l'induction de la mort cellulaire. Dans cette première classe, on trouve les domaines de lipase PNP-UDP, RelA-SpoT, sesB-like et Patatine ainsi que les domaines de toxines que l'on pense impliquées dans la formation de pores HeLo et HELL. Dans cette classe, le domaine Nterminal représenterait un effecteur direct de l'activation NLR. Les domaines de classe 2 correspondent aux domaines qui ont plus vraisemblablement une fonction d'adaptateur, une situation plus typique

Introduction



Figure 44. Annotation des domaines dans l'ensemble des NLRs fongiques.

Les camemberts montrent la distribution des différents types de domaine N-terminal, NOD et C-terminal, respectivement. Dans chaque camembert, le gris clair correspond à la fraction de domaines sans annotation. (d'après (Dyrka et al., 2014)) des NLRs végétaux et animaux, où des domaines tels que CARD, PYD et TIR recrutent des effecteurs par des interactions de domaine homotypique pour transmettre le signal en aval, plutôt que de représenter l'effecteur terminal de la cascade immunitaire. CARD et PYD médient la signalisation NLR par un mécanisme de type prion, impliquant la formation de complexes d'ordre supérieur (Wu et al., 2013; Lu et al., 2014; Cai et al., 2014). Les trois domaines de formation de prions (HET-s, PP et o) associés aux NLR fongiques correspondent à cette seconde classe (Daskalov et al., 2012). Nous verrons ces domaines dans la partie 4. Le domaine HET, éventuellement homologue au domaine TIR, correspond probablement également à cette seconde classe. De nombreuses protéines fongiques liées aux NLRs appartiennent à la classe 1, alors qu'apparemment dans les lignées végétales et animales, cette situation est moins fréquente, bien que les NLR PNP-UDP aient été décrits chez les coraux (Hamada et al., 2013). Dans les protéines STAND de certaines espèces bactériennes, la présence de domaines N-terminaux avec une activité enzymatique prédite comme un domaine métacaspase est courante, en particulier chez les cyanobactéries (Leipe et al., 2004; Asplund-Samuelsson et al., 2012). Il se peut qu'à la base de l'évolution de la protéine STAND, l'architecture tout-en-un soit ancestrale et que l'incorporation de domaines adaptateurs entre le récepteur NLR et l'effecteur représente une sophistication supplémentaire du processus de signalisation.

Certains domaines effecteurs N-terminaux trouvés dans les champignons filamenteux sont censés former directement des pores membranaires lors de l'oligomérisation (Paoletti and Clavé, 2007). Ce mode d'action serait analogue à ce qui a été suggéré pour ZAR1 (décrit précédemment) et éventuellement d'autres protéines R de type CC (chez les plantes). En comparant les architectures de domaine d'Apaf-1 (CARD, NB-ARC, WD40) avec celles de ZAR1 (CC, NB-ARC, LRR) ou HET-E (HET, NACHT, WD40), il devient évident que ces protéines ont la même l'architecture globale mais n'ont pas évolué par évolution divergente à partir d'un ancêtre commun. On peut supposer que les premiers eucaryotes contenaient déjà des STAND-ATPases parce que la plupart des bactéries existantes codent pour plusieurs de ces ATPases. Cependant, les STAND-ATPases bactériennes classiques n'appartiennent pas au sous-type NB-ARC ou NACHT et n'ont aucun lien avec la signalisation de la mort cellulaire (Leipe et al., 2004). Une analyse phylogénétique minutieuse de la famille STAND a conclu que les protéines STAND végétales et animales ont évolué indépendamment des précurseurs bactériens, lors d'au moins deux événements distincts (Urbach and Ausubel, 2017). Cependant, les STAND ATPases et d'autres protéines de l'immunité innée sont clairement sujettes à une évolution par « échange de domaine », et lors de l'analyse des protéomes eucaryotes disponibles de nos jours, pratiquement toutes les combinaisons de domaines effecteurs, de sous-type ATPase et de domaines senseurs Cterminaux peuvent être observées (Figure 43). Par conséquent, les hypothèses évolutives alternatives ne doivent pas être écartées, par exemple, un « mélange et appariement » omniprésent de domaines

Introduction

N-term	NBD	C-term	count	fraction
PNP_UDP	NACHT	ANK	187	15.2%
HELO-LIKE	NACHT	ANK	162	13.2%
GOODBYE-LIKE	NACHT	ANK	156	12.7%
GOODBYE-LIKE	NACHT	WID	101	8.2%
PNP_UDP	NB-ARC	TPR	85	6.9%
HELO-LIKE	NACHT	WD	78	6.4%
SESB-LIKE	NACHT	ANK	67	5.5%
SESB-LIKE	NB-ARC	TPR	57	4.6%
HET	NACHT	WID	49	4.0%
HET	NB-ARC	TPR TPR	37	3.0%
PNP_UDP	NACHT	V//D	29	2.4%
GOODBYE-LIKE	NACHT	TPR	28	2.3%
SESB-LIKE	NACHT	WD	27	2.2%
HELO	NACHT	ANK	23	1.9%
PATATIN	NB-ARC	TPR	22	1.8%
HELO-LIKE	NB-ARC	POLICE PR	21	1.7%
GOODBYE-LIKE	NB-ARC		18	1.5%
SESB-LIKE	NACHT	TPR	16	1.3%
PFD	NACHT	ANK	9	0.7%
PFD	NACHT	WID	9	0.7%
PNP_UDP	NACHT	TPR	9	0.7%
HET	NACHT	ANK	7	0.6%
C2	NACHT		6	0.5%
PEPTIDASE_S8	NACHT	WD	6	0.5%
PFD	NB-ARC	TPR	6	0.5%
RELA_SPOT	NACHT	WID	6	0.5%
PKINASE	NACHT	ANK	2	0.2%
C2	NB-ARC	WD	1	0.1%
HELO	NB-ARC	TPR	1	0.1%
HELO-LIKE	NACHT	TPR	1	0.1%
PATATIN	NACHT	ANK	1	0.1%
SESB-LIKE	NB-ARC	ANK	1	0.1%
		Total:	1228	

Figure 45. Architectures de domaines des NLRs fongiques

Répertoire des architectures de domaine trouvées dans 1228 candidats NLR avec annotation tripartite. Pour chacune des architectures, le nombre total et les pourcentages sont donnés. (d'après (Dyrka et al., 2014))

au début de l'évolution eucaryote, avec une « fixation » ultérieure d'architectures de domaines sélectionnés qui se seraient avérées les plus bénéfiques pour la lignée eucaryote particulière.

Prises ensemble, ces observations indiquent également un rôle possible dans l'immunité innée pour au moins certains NLR fongiques (Paoletti and Saupe, 2009). Cependant, le grand nombre de protéines de type NLR codées dans les génomes fongiques et leur extrême diversité architecturale suggèrent que cette famille de protéines peut être impliquée dans une variété de réponses moléculaires, dont certaines peuvent être importantes en dehors du contexte immunitaire et éventuellement ne pas résulter en de la mort cellulaire. A noter que les NLRs ne sont trouvés que chez les champignons filamenteux et sont absents des génomes de levure (Dyrka et al., 2014), ce qui suggère que la présence des NLRs est associée avec la vie multicellulaire. Il a également été proposé que de façon similaire aux NLRs des plantes et des animaux, les NLRs fongiques sont des récepteurs de l'immunité innée qui régulent les réponses contre les pathogènes.

Dans certains cas (classe 2), l'interaction entre la protéine NLR et la protéine effectrice dépend d'un court motif/domaine formant un amyloïde avec des caractéristiques de type prion qui sert à transduire le signal du NLR activé vers l'effecteur (Saupe et al., 2016). De telles unités fonctionnelles NLR/effecteur utilisant une transduction de signal à base d'amyloïde coexistent avec des architectures « tout-en-un » (où l'effecteur fait partie intégrante du NLR) dans un seul génome fongique. En outre, certains des amyloïdes de signalisation se sont diversifiés en familles distinctes qui partagent un modèle de séquence primaire spécifique, tandis que d'autres semblent avoir acquis le rôle de signalisation de manière convergente (voir partie 4) (Daskalov et al., 2016; Loquet and Saupe, 2017). L'auto-assemblage de domaines globulaires repliés ou la création de modèles amyloïdes apparaissent comme deux solutions possibles pour la même tâche de médiation d'une transmission efficace d'un signal de mort cellulaire de manière « tout ou rien ». La nature strictement coopérative du repliement amyloïde, la robustesse de leurs propriétés de propagation ainsi que leur extrême compacité font que les motifs amyloïdes sont très bien adaptés à de telles tâches de transduction de signal. Ces motifs amyloïdes sont petits et généralement plus courts que les segments qui permettent la formation de domaines globulaires repliés. Le fait que plusieurs motifs différents aient été identifiés chez les champignons suggère que ce mécanisme a connu un succès évolutif dans cette branche. Apparemment, ce mode de transduction du signal a été diversifié en différentes classes permettant la création de modules de modélisation polyvalents qui peuvent coexister dans la même cellule de la même manière que la diversification du domaine CARD permet à plusieurs cascades de signalisation parallèles d'utiliser l'auto-assemblage de variantes de ce domaine. Il est à noter que pour chaque combinaison de domaine effecteur et de type de NLR qui a été caractérisée à ce jour chez les champignons, la même association de domaine peut également être trouvée dans un seul NLR. Par


Figure 46. Avantages potentiels de la signalisation amyloïde.

Les différents modes d'activation du domaine effecteur dans les NLR fongiques. Les cases répétées représentent les domaines de répétition formant la superstructure (soit ANK, TPR ou WD), l'ovale central, le NBD (soit NB-ARC ou NACHT), le cercle les domaines effecteurs (HeLo, HeLo-like, sesA, sesB, PNP-UDP phosphorylase, etc.). (d'après (Loquet and Saupe, 2017))

exemple, alors que chez *P. anserina*, l'organisation HeLo/NACHT-WD se trouve dans la paire HET-S/NWD2, de nombreuses autres espèces affichent des NLRs avec une architecture HeLo-NACHT-WD tout-en-un. L'inverse n'est pas vrai pour l'instant car certaines associations de domaines (comme Patatine-NB-ARC-TPR) n'ont pas encore été trouvées dans l'architecture à deux gènes. Quel pourrait alors être l'avantage potentiel de l'architecture à deux gènes par rapport à la structure tout-en-un plus simple? Une possibilité évidente est que la signalisation à médiation amyloïde permet une amplification du signal. Un autre avantage possible est que ce mode d'activation permet à un seul NLR d'activer deux domaines effecteurs distincts (comme cela se produit par exemple avec le motif PP dans HELLP et SBP, voir partie 4) (Daskalov et al., 2016) ou à un seul effecteur d'être activé par différents NLRs (Loquet and Saupe, 2017) **(Figure 46)**.

4 Les amyloïdes et les prions

4.1 Définitions : amyloïde et prion

Les amyloïdes sont des assemblages protéiques fibrillaires constitués de feuillets β dont les brins β sont perpendiculaires à l'axe des fibres (Figure 47) (Chiti and Dobson, 2006; Sabaté and Ventura, 2013; Wickner et al., 2013). Les amyloïdes présentent également d'autres caractéristiques biochimiques comme une relative résistance aux agents dénaturants et à la protéolyse ainsi que la fixation des colorants spécifiques comme le rouge Congo et la thioflavine-T (Sabaté and Ventura, 2013). Ces assemblages protéiques furent initialement observés par Rudolph Virchow en 1854 comme structures pathologiques dans des coupes histologiques de cerveaux et désignés amyloïdes en vertu de leurs propriétés de coloration ressemblant à celle de l'amidon (Sipe and Cohen, 2000). La croissance des fibres amyloïdes se produit par l'addition de monomères de protéines au sommet de l'agrégat avec un changement de conformation des protéines par l'agrégat. Les amyloïdes sont donc des protéines dont la conformation est auto-propageable. Dans certains cas, ces conformations sont transmissibles/infectieuses ; ce sont des prions (« Proteinaceous Infectious particles »). Les prions sont des particules protéiques infectieuses d'abord décrites dans le cadre de l'étude des maladies à prions (Prusiner, 1982), puis leur implication dans des maladies neurodégénératives liées à l'âge telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson a été découverte (Walker and Jucker, 2015). Il faut noter que les deux termes amyloïde et prion ont des champs d'application différents, un amyloïde a une définition biophysique, un prion une définition biologique.

L'histoire de la découverte des prions est associée à l'étude de deux maladies appartenant à la famille des ESTs (pour Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles : maladies affectant le système nerveux central et aboutissant à une perte neuronale conduisant à la mort de l'individu)



Figure 47. Une protéine peut exister sous différents états.

Les populations des différents états et leurs taux d'interconversion sont déterminés leurs stabilités par thermodynamiques différentes, par les barrières d'énergie libre associées aux transitions correspondantes ainsi que par les taux de synthèse et de dégradation, la propension à interagir avec les chaperonnes et à subir des modifications post-traductionnelles et autres modifications chimiques. L'état amyloïde d'une protéine est une forme d'agrégat hautement ordonnée dans laquelle les chaînes polypeptidiques adoptent une structure fibrillaire, qui est capable de s'auto-répliquer, par exemple par des processus secondaires. Les fibrilles amyloïdes ont une structure riche en feuillets β et se forment généralement à partir de conformations dépliées ou partiellement dépliées de protéines et de peptides, dont certaines sont des fragments de protéines plus larges. L'état amyloïde est « générique » c'est-à-dire que son architecture caractéristique n'est pas codée par des

séquences d'acides aminés spécifiques. (d'après (Knowles et al., 2014))

Disease type or prion protein(s)	Disease(s)
Diseases	
Animal	Serapie (sporadie or acquired), CWD (sporadie or acquired), BSE (sporadie or acquired), transmissible mink encephalopathy (sporadie or acquired), feline spongiform encephalopathy (sporadie or acquired), exotic ungulate encephalopathy (sporadie or acquired)
Human	Kuru (sporadie and acquired), CJD (sporadie, inherited, or acquired), GSS syndrome (inherited or sporadie), FFI (inherited or sporadie), VPSPr (sporadie or familial history) ^b
Prion protein(s)	
Aβ and Tau	AD (sporadic or inherited)
a-Synuclein	PD (sporadic or inherited), dementia with Lewy bodies (sporadic), multiple-system atrophy (sporadic)
Polyglutamine- containing proteins	HD (inherited); dentatorubro-pallidoluysian atrophy (inherited); spinal and bulbar muscular atrophy (inherited); spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, 6, 7, and 17 (inherited)
Tau, TDP-43	Frontotemporal dementia (sporadic or inherited), corticobasal degeneration (sporadic), progressive supranuclear palsy (sporadic)
SOD1, TDP-43	ALS (sporadie or inherited)

Tableau 2. Maladies à prion humaines et animales et protéines pathogènes associées. (d'après (Das and Zou, 2016)) (Tableau 2), la tremblante du mouton (scrapie en anglais) et le Kuru, une EST présente chez le peuple Fore en Papouasie et reliée à des rites anthropophages (Gajdusek et al., 1966). Le premier pas crucial pour la compréhension actuelle des ESTs humaines se déroula en 1959 quand le vétérinaire pathologiste W.J. Hadlow remarqua des similitudes entre la tremblante du mouton et le Kuru (Hadlow, 1959). En se basant sur les connaissances sur la tremblante, dont on savait qu'elle était une infection lente des moutons par un agent infectieux inhabituel, C.J. Gajdusek et ses collaborateurs ont initié des expériences afin de transmettre le Kuru en inoculant des tissus de cerveaux infectés dans des primates, ce qui se révéla être un succès. La même année où W. J. Hadlow proposait que le Kuru et la tremblante avaient la même étiologie, I. Klatzo remarqua que l'histopathologie du Kuru ressemblait à celle de la maladie de Creutzfeld-Jacob (CJD), une autre maladie neurodégénérative progressive fatale à l'étiologie inconnue décrite pour la première fois en 1921 (Klatzo et al., 1959). C.J. Gajdusek et ses collègues démontrèrent que non seulement la forme sporadique plus commune de CJD mais également la forme familiale de CJD ainsi qu'une maladie similaire (syndrome Gerstmann-Straussler-Scheinker (Gerstmann et al., 1935)) étaient également transmissibles, d'abord sur des primates, puis sur d'autres animaux (Gajdusek et al., 1968, 1966). Bien plus tard, en 1996, une nouvelle variante de CJD (vCJD) a été attribuée à l'infection des humains infectés par l'agent de l'encéphalopathie bovine spongiforme (Will et al., 1996); vCJD en elle-même a causé une EST iatrogénique (par ingestion) par des transfusions de sang d'individus malades à des individus sains. Dans les années 30, il a été démontré que l'agent pathogène causant la tremblante avait un grand nombre de propriétés physiques uniques (résistance marquée à l'inactivation par des produits chimiques, à la chaleur et aux radiations), ce qui suggérait qu'il pouvait s'agir d'un agent non-conventionnel auto-réplicatif basé sur une protéine et ne contenant pas d'acide nucléique. Le travail de S.B. Prusiner dans le début des années 80 a mené à la découverte qu'une forme mal repliée d'une protéine ubiquitaire normale de l'hôte (la protéine PrP) était usuellement si ce n'est toujours détectable dans les tissus contenant des agents d'ESTs, facilitant leur diagnostic et la compréhension de leur pathogénèse (Bolton et al., 1982; Prusiner, 1982). S.B. Prusiner proposa que l'agent responsable de l'EST était probablement composé partiellement ou entièrement de la protéine anormale, pour laquelle il a inventé le terme de « protéine prion » et « prion » pour l'agent. L'expression de la protéine prion par les animaux (non essentielle à leur survie) a été ensuite montrée comme essentielle pour les infecter avec des ESTs, et une variété de mutations dans la protéine a été clairement associée avec les ESTs dans les maladies familiales, expliquant le modèle autosomal dominant de la maladie et confirmant le rôle central de la protéine dans la pathogénèse (Goldgaber et al., 1989; Gambetti et al., 2003). Cette terminologie et l'hypothèse prion sont devenues largement acceptées.



Figure 48. Diagramme schématique de la structure de la protéine PrP^c humaine d'après des études en résonance magnétique nucléaire, de ses modifications post-traductionnelles et des épitopes reconnus par les anticorps anti-PrP.

La PrP humaine mature contient 209 acides aminés. Elle est constituée d'un domaine N-terminal flexible contenant quatre répétitions d'octapeptide de liaison au cuivre et d'un domaine C-terminal replié contenant deux feuillets β et trois structures hélicoïdales α . Les cystéines aux positions 179 et 214 forment une liaison disulfure entre les domaines α 2 et α 3. Deux sites de glycosylation liés au N-terminal sont en position 181 et 197, et l'ancre GPI est liée au résidu 231. Les épitopes reconnus par les anticorps anti-PrP 1E4 et 3F4 sont situés au niveau des résidus 97 à 105 et 106 à 112, respectivement. (d'après (Das and Zou, 2016))

4.2 Les maladies impliquant des prions PrP^{sc}

Les maladies impliquant le prion PrP^{sc} concernent les animaux et les humains. Mis à part la tremblante du mouton, il existe un certain nombre d'autres maladies à prion animales, les plus notables étant la « chronic wasting disease » qui affecte le wapiti des montagnes Rocheuses, l'Elan et certaines espèces de cerfs d'Amérique du Nord, y compris le cerf de Virginie et le cerf mulet (Telling, 2013) et la maladie de la vache folle. Malgré leurs caractéristiques hétérogènes, ces maladies se caractérisent toutes par le dépôt dans le système nerveux central de la forme prion de la protéine PrP^C (PrP^{sc}) (Figure 40) (Bolton et al., 1982; McKinley et al., 1983; Prusiner, 1982; Prusiner, 1998). La découverte de PrP^{sc} comme caractéristique moléculaire pour toutes ces ESTs, a permis le diagnostic des maladies à prions aux niveaux pathologique et moléculaire. Cette découverte a grandement facilité l'identification des nouvelles maladies à prions. De plus, la découverte et la caractérisation de PrP^{sc} ont énormément apporté dans la découverte de la nature des prions, de la pathogénèse des maladies à prions et surtout sur la transmissibilité de ces maladies (Das and Zou, 2016).

PrP^c est une glycoprotéine membranaire (Figure 48) exprimée principalement dans le système nerveux central, mais qui peut être trouvée dans d'autres organes ou d'autres tissus n'appartenant pas au système nerveux central (Bendheim et al., 1992). Ses fonctions physiologiques demeurent mal définies, cependant diverses études ont mis en évidence des fonctions de PrP^c dans la réduction du stress oxydatif, dans la transduction du signal, dans la régulation de l'apoptose, dans l'absorption cellulaire ou la liaison du cuivre, l'adhésion à la matrice extracellulaire et la formation et la maintenance des synapses (Linden et al., 2008). La protéine PrP^C est codée par le gène PRNP localisé en 20p13 (Sparkes et al., 1986). Ce gène hautement conservé est composé de trois exons. L'exon terminal contient l'ORF (Open Reading Frame) et code une séquence de 253 acides aminés nommée PrP^C (C signifiant cellulaire) ou PrP. Sur les 253 acides aminés, les résidus 1 à 22 constituent le peptide signal N-terminal, tandis que les résidus 232 à 253 constituent le peptide hydrophobe C-terminal. Dans le réticulum endoplasmique rugueux, la protéine PrP^c est sujette aux modifications posttraductionnelles suivantes : la délétion des peptides de signalisation N et C-terminal, l'addition de glycanes liés au N-terminal aux résidus N-181 et N-197, la formation d'un pont disulfure entre les résidus C-179 et C-214, et l'addition de l'ancre glycophosphatidylinositol (GPI) au résidu 231 après le clivage du peptide hydrophobe C-terminal (Stahl, 1987; Turk et al., 1988; Harris, 2003). Après sa synthèse et ses modifications dans le réticulum endoplasmique, la protéine PrP^c mature de 209 acides aminés, est transportée dans la membrane cellulaire via le corps de Golgi. Les résidus 23 à 124 forment le domaine flexible N-terminal, et les résidus 125 à 228 forment un domaine globulaire. Une fois correctement assemblée, la structure tertiaire est composée de trois hélices α et de deux feuillets β anti-parallèles dans le domaine C-terminal (Riek et al., 1996; Damberger et al., 2011). La région N-

Introduction

terminale contient cinq ou six répétitions de huit résidus riches en glycine (PHGGGWGQ) qui forment la région de répétitions d'octapeptides. Ces répétitions d'octapeptides lient le cuivre (Cu(II)) et d'autres cations divalents (Brown et al., 1997; Stöckel et al., 1998; Viles et al., 1999), pouvant expliquer le rôle de PrP dans la réduction des dommages oxydatifs (Brown et al., 2001).

Contrairement aux virus et aux bactéries, les prions sont constitués d'acides aminés mais sont dépourvus d'acides nucléiques. Les prions sont capables de transmettre une variété de maladies à prions avec une diversité de phénotypes. Un concept connu sous le nom de « souches de prions » émerge quand ces phénotypes sont observés. Les souches de prions sont définies comme des particules infectieuses possédant des caractéristiques histopathologiques et cliniques distinctes quand inoculées dans des hôtes d'un même fond génétique. Ces caractéristiques variées entre les souches incluent le(s) endroit(s) de dépôt de la protéine prion, les temps d'incubation variés, le neurotropisme et la distribution particulière des lésions dans le système nerveux central (Aguzzi, 2006). L'hypothèse étant que PrP^{Sc} adopte diverses conformations, chaque conformation (ou souche) étant responsable de l'apparition d'une maladie particulière. En outre, chaque souche exhibe des propriétés biochimiques distinctes (Safar et al., 1998; Collinge and Clarke, 2007). L'interaction de telles souches avec le polymorphisme de l'hôte apporte de nombreux phénotypes. Il a également été montré que PrP^{Sc} dérive de la protéine PrP^{C} via un événement de mauvais repliement caractérisé par la transition d'hélices α en structures composées de feuillets β (Prusiner, 1998).

L'évènement moléculaire central des maladies à prion est l'auto-propagation de la protéine PrP^{sc}. Ce postulat est connu sous le nom d'hypothèse « protein-only » (Prusiner, 1982). Deux mécanismes différents de réplication des prions ont été proposés. Dans le modèle « template assistance model », PrP^{sc} existe en tant que monomère thermodynamiquement plus stable que PrP^c (Prusiner, 1991). Dans l'éventualité rare qu'une molécule de PrP^{Sc} se forme spontanément (ou soit apportée de façon exogène), elle peut transconformer les PrP^c en PrP^{sc} par interaction directe. Dans ce modèle, l'étape critique des la conversion est la formation d'un dimère entre PrP^{sc} et PrP^c, ou un intermédiaire partiellement replié de PrP^c nommé PrP*. PrP^{sc} agit comme une matrice capable de catalyser le remodelage de PrP^c en une conformation PrP^{sc} plus stable thermodynamiquement. Cette hypothèse est à l'heure actuelle totalement rejetée en faveur du modèle « nucléationpolymérisation ». Ce modèle propose que la conversion entre PrP^c et PrP^{sc} est réversible, mais que le monomère PrP^{sc} est bien moins stable que le monomère PrP^c (l'équilibre thermodynamique favorise fortement PrP^c). La stabilisation de PrP^{sc} ne se produit qu'après la formation d'un noyau oligomérique stable. Un fois le noyau formé, les PrP^c monomériques peuvent s'ajouter efficacement à ce dernier en adoptant la conformation de PrP^{Sc}. L'étape limitante dans ce mécanisme n'est pas la transconformation en elle-même mais l'étape de nucléation initiale. Cette dernière est responsable de



Figure 49. Immunoréactivité des protéines prions (violet) et dégénérescence spongiforme dans le néocortex d'un patient décédé de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Contre-coloration Nissl. (d'après (Walker and Jucker, 2015))



Figure 50. Plaque sénile [amyloïde- β (A β)] et enchevêtrements neurofibrillaires (tau) dans la maladie d'Alzheimer.

(a) Micrographie optique de tissu d'hippocampe immunocoloré deux fois: pour A β (brun dans une plaque A β) et tau hyperphosphorylé (violet dans les enchevêtrements neurofibrillaires). (b) Micrographie électronique d'une masse de fibrilles amyloïdes extracellulaires dans une plaque A β . (c) Micrographie électronique de polymères fibrillaires intraneuronaux de protéine tau, les composants ultrastructuraux des enchevêtrements neurofibrillaires. Les étiquettes désignent deux filaments hélicoïdaux appariés. (d'après (Walker and Jucker, 2015))

la longue phase de latence dans la conversion spontanée, et peut être circonvenue par l'addition de noyaux de PrP^{sc} préformés (Jarrett and Lansbury, 1993; Le et al., 2015).

4.3 Amyloïdoses

Les amyloïdoses sont des maladies dues au mauvais repliement des protéines dans lesquelles de petites (parties de) protéines d'environ 10 à 15 kDa acquièrent un état alternatif mal replié avec une énergie minimale et ensuite s'agrègent en oligomères et polymères. Trois mécanismes semblent fonctionner indépendamment ou en combinaison : la protéine précurseur peut avoir une propension intrinsèque à mal se replier qui devient évidente avec le vieillissement (transthyrétine de type sauvage) ou sous forme de taux sériques élevés (protéine amyloïde A sérique et chaînes légères libres d'immunoglobulines), une protéine mutée acquise héréditairement (transthyrétine), ou le remodelage protéolytique de la protéine précurseur (protéine précurseur b-amyloïde). L'interaction avec la matrice extracellulaire semble également importante et peut être liée à un dépôt préférentiel d'amyloïdes dans certains organes ou tissus (Merlini and Bellotti, 2003). Le dépôt extracellulaire de fibrilles amyloïdes dans les organes et les tissus entraîne une infiltration tissulaire et un gonflement conduisant à une perte progressive de la fonction de l'organe affecté. Parfois, des effets toxiques, supposés être causés par des oligomères toxiques, ont été observés (par exemple au niveau cérébral). Ces oligomères sont des agrégats intermédiaires non fibrillaires qui se forment tôt dans le processus de formation de fibrilles. Un autre constituant d'amyloïdes impliqués dans les amyloïdoses est le composant amyloïde P sérique (SAP), une glycoprotéine qui appartient à la famille des pentraxines et se lie aux amyloïdes d'une manière dépendante du calcium. Le SAP est fortement protégé contre la protéolyse et rend ainsi les fibrilles amyloïdes résistantes à la dégradation. L'apolipoprotéine E est également un constituant d'amyloïdes responsables d'amyloïdoses. Les glycosaminoglycanes (par exemple, le sulfate d'héparane) se retrouvent aussi dans des amyloïdes et interagissent avec les composants de la matrice extracellulaire tels que la laminine, l'entactine et le collagène IV. Cette interaction constitue probablement un échafaudage qui facilite la phase initiale de nucléation des fibrilles et pourrait avoir un rôle de ciblage dans la localisation des dépôts amyloïdes dans les tissus (Merlini and Bellotti, 2003; Hazenberg, 2013).

Le dépôt d'amyloïdes est localisé (les fibrilles sont produites dans un organe et limitées à cet organe ou site du corps) ou systémique (dépôt de fibrilles dans divers organes et tissus dans tout le corps). La classification actuelle de l'amyloïdose est basée sur la caractérisation chimique de la protéine précurseur (Falk et al., 1997; Sipe et al., 2012). Parmi les amyloïdoses localisées spécifiques d'un organe, on peut trouver la maladie d'Alzheimer (protéine b dans les plaques) et le diabète sucré de type 2 (amyline dans les îlots de Langerhans) (Falk et al., 1997), pour lesquelles le rôle pathogène du

71



Figure 51. La structure de l'alpha-synucléine

(A) Structure primaire de l'alpha-synucléine. Les résidus N-terminaux sont verts, les résidus de composants non amyloïdes (NAC) sont bleus, les résidus C-terminaux sont gris et les mutations ponctuelles associées à la maladie sont rouges. (B) Modèle moléculaire d'une structure cristalline d' α Syn humaine liée aux micelles, PDB 1XQ8. Le jeu de couleurs est le même que dans (A) (C) Modèle moléculaire d'une structure de cryo-microscopie électronique de quatre protéines α Syn humaines (résidus 1-121) dans une fibrille, PDB 6H6B. Le jeu de couleurs est le même que dans (A) (d'après (Twohig and Nielsen, 2019))



Figure 52. Structure des monomères, fibres et oligomères d'Aß.

(A) Séquence primaire d'acides aminés de l'isoforme Aβ de 42 acides aminés Aβ42. (B) Structure du peptide bêta amyloïde (1–28), qui forme une structure à prédominance alpha-hélicoïdale qui peut être convertie en une structure en feuille bêta dans un milieu de type membranaire (code PDB: 1AMC, 1AMB), c'est le principal composant protéinique des dépôts amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer. (C) Structure en solution du peptide bêta amyloïde (1–40). (D) Le peptide bêta amyloïde (10–35) forme une structure de bobine effondrée (code PDB: 1HZ3). (E) Voie proposée pour la conversion des monomères bêta amyloïdes en oligomères, protofibrilles et fibrilles d'ordre supérieur. Les monomères Aβ peuvent former des assemblages d'ordre supérieur allant des oligomères de bas poids moléculaire, y compris les dimères, trimères, tétramères et pentamères, aux oligomères de poids moléculaire moyen, y compris les hexamères, les nonamères et les dodécamères aux protofibrilles et fibrilles. (d'après (Chen et al., 2017)).

dépôt amyloïde dans la maladie n'est pas encore clair. L'amyloïdose systémique est souvent à l'origine de symptômes graves provoqués par une dégénérescence progressive de divers organes et tissus. Il existe de nombreux types d'amyloïdoses systémiques, mais quatre types sont observés le plus fréquemment, ce sont les amyloïdoses AL, AA, ATTR et Abeta2M (Falk et al., 1997).

4.4 Les amyloïdes dans les maladies neurodégénératives

Un nombre croissant d'éléments suggère que tout comme les maladies à prion, la plupart des maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose amyotrophique latérale (ALS) et la maladie d'Huntington sont causées par l'accumulation intracérébrale d'agrégats protéiques mal repliés (Figures 49 et 50) (Walker and Jucker, 2015). Dans chacune de ces maladies, une ou plusieurs protéines s'auto-associent en oligomères toxiques qui perturbent les fonctions et communications cellulaires, et finissent par former des agrégats amyloïdes insolubles caractérisés par une morphologie fibrillaire et une structure à feuillets β croisés. Des découvertes récentes suggèrent que des protéines ayant des propriétés prion-like jouent un rôle dans la pathogénèse de ces maladies neurodégénératives (Le et al., 2015).

Dans la maladie de Parkinson, la démence avec des corps de Lewy et l'atrophie multisystématisée, des α -synucléines (Figure 51) mal repliées s'assemblent en inclusions fibrillaires appelées corps de Lewy et neurites de Lewy (Goedert et al., 2013). De façon similaire à d'autres dépôts protéiques, ces lésions peuvent être propagées dans le cerveau de jeunes souris transgéniques pour l' α -synucléine par l'injection intracérébrale d'extraits de cerveau contenant des agrégats d' α -synucléine (Luk et al., 2012b; Mougenot et al., 2012). Les fibres recombinantes d' α -synucléine sont aussi capables d'induire l'agrégation d' α -synucléine (Luk et al., 2009; Volpicelli-Daley et al., 2011; Aulić et al., 2014) dans des modèles cellulaires et dans des souris transgéniques pour l' α -synucléines ou des souris sauvages (Luk et al., 2012a; Masuda-Suzukake et al., 2013). L' α -synucléinopathie a également été induite dans des primates par injection intracérébrale d'extraits de cerveau de patients atteints de la maladie de Parkinson (Recasens et al., 2014).

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par une dégradation lente et progressive des fonctions cognitives, et histologiquement par des plaques séniles intracérébrales et des enchevêtrements neurofibrillaires (Holtzman et al., 2011). Les plaques séniles sont des lésions hétérogènes consistant principalement en des masses extracellulaires de fibres amyloïdes- β (Figure 52) du peptide ($\alpha\beta$), tandis que les enchevêtrements neurofibrillaires sont des « paquets » intracellulaires de protéine tau (Holtzman et al., 2011; Nelson et al., 2012). D'autres lésions peuvent survenir dans le cerveau lors de la maladie d'Alzheimer, comme par exemple l'angiopathie amyloïde- $\alpha\beta$ cérébrale ou des atrophies du

Introduction

cerveau liées à l'âge (Nelson et al., 2012); cependant les plaques et enchevêtrements demeurent les caractéristiques histopathologiques définissant la maladie d'Alzheimer. L'agrégation d' $\alpha\beta$ étant devenu le signe clinique pathognomonique de la maladie (Jack et al., 2010; Holtzman et al., 2011; Bateman et al., 2012; Selkoe, 2012).

De nombreuses autres protéinopathies sont aussi susceptibles d'avoir comme origine et mécanisme de progression l'induction de l'agrégation de protéines prion-like (Jucker and Walker, 2013). Parmi celles-ci, on peut citer l'ALS et la démence fronto-temporale (FTD), deux pathologies liées qui sont impliquées dans un vaste spectre de troubles du cerveau. Parmi les protéines impliquées dans le spectre des troubles ALS/FTD (Rademakers et al., 2012; van Langenhove et al., 2012), on retrouve les protéines tau, la superoxide dismutase-1 (SOD1), la « TAR-DNA binding protein-43 » (TDP-43), la « fused in sarcoma » (FUS), la protéine C9orf72, des ribonucléotides nucléaires hétérogènes, et d'autres (Al-Chalabi et al., 2012; King et al., 2012; Rademakers et al., 2012; van Langenhove et al., 2012; Ling et al., 2013; Cruts et al., 2013; Kim et al., 2013; Li et al., 2013; Bennion Callister and Pickering-Brown, 2014). Ces protéines sont enclines à l'agrégation, et plusieurs arborent des régions susceptibles de s'agréger et nommées domaines prion-like, qui sont également présents sur des protéines de liaison à l'ARN (Han et al., 2012; Kato et al., 2012; King et al., 2012). L'acquisition réversible de l'architecture en feuillets β et l'agrégation des protéines de liaison à l'ARN peuvent aider les cellules à survivre à des conditions stressantes en régulant négativement la fonction des protéines, mais si ces assemblages se convertissent en un état amyloïde-like persistant, ils deviennent nocifs pour la cellule (King et al., 2012; Mizielinska et al., 2014). Dans l'ALS et la FTD, les lésions semblent se propager systématiquement au sein des régions cérébrales (Ravits and La Spada, 2009; Braak et al., 2013; Brettschneider et al., 2014), suggérant un transport prion-like de l'agent de la maladie (Braak et al., 2013; Cushman et al., 2010; Grad and Cashman, 2014; Ling et al., 2013; Udan and Baloh, 2011). L'agrégation de TDP-43 peut être induite par des aggrégats fibrillaires de TDP-43 préformés in vitro (Furukawa et al., 2011; Nonaka et al., 2013). Des études utilisant des culture cellulaires confirment une induction d'agrégation similaire pour les protéines SOD1 (Grad et al., 2014; Grad and Cashman, 2014; Münch et al., 2011) et huntingtine (la protéine de la maladie d'Huntington (Ren et al., 2009; Pecho-Vrieseling et al., 2014)) ainsi que leur propagation de cellule à cellule. Les informations existantes soulignent la possibilité que le « prion principle » s'applique dans l'instigation et la propagation de l'agrégation des protéines dans une grande variété de maladies neurodégénératives (Walker and Jucker, 2015).

4.5 Les prions de levure

Les prions d'ascomycètes représentent un groupe spécifique d'amyloïdes infectieux (Antonets and Nizhnikov, 2017). La levure *Saccharomyces cerevisiae* contient environ dix prions. Contrairement



Figure 53. Prions de levures et de champignons.

Les prions [URE3], [PSI+] et [PIN+] de Saccharomyces cerevisiae et [Het-s] de Podospora anserina sont formés par formation amyloïdes d'Ure2p, Sup35p, Rnq1p et HET-s, respectivement. Les fonctions normales des protéines et les phénotypes prions sont indiqués. Les domaines prions d'Ure2p et Sup35p ont des fonctions normales, expliquant leur rétention au cours de l'évolution malgré une formation de prions rare. Les amyloïdes d'Ure2p, Sup35p et Rnq1p sont chacun repliés en structure en registre de feuillets β parallèles avec une molécule par feuillet β le long du grand axe du filament, tandis que celle de HET-s est une hélice β avec une molécule pour deux couches de feuillets β . (d'après (Wickner, 2016))



Figure 54. Organisation des domaines des trois protéines prion les mieux caractérisées chez *S. cerevisiae*.

Les domaines prion (PrDs) sont montrés par les rectangles verts et les domaines qui ne font pas partie des fibres sont représentés par des ellipses jaunes. QN correspond à des régions riches en asparagines et glutamines; QG à des régions riches en glutamines et glycines; ORs est une abréviation désignant les répétitions oligopeptidiques. (d'après (Liebman and Chernoff, 2012)) aux amyloïdes non infectieux, les agrégats de prions sont constamment fragmentés par des protéines chaperonnes (Chernova et al., 2017), fournissant les propriétés infectieuses et une transmission efficace des prions pendant la division cellulaire (Wickner et al., 2015). La « prionisation » des protéines peut entraîner des changements héréditaires dans leurs activités fonctionnelles qui provoquent différentes manifestations phénotypiques. Ce phénomène est appelé héritage protéique (Wickner et al., 1999), c'est-à-dire un héritage qui n'est pas déterminé par des changements dans la structure primaire des gènes, mais plutôt par la conformation de protéines particulières. La plupart des prions de levure n'ont aucun effet significatif sur la viabilité; cependant, certains d'entre eux peuvent être nocifs dans certaines conditions (McGlinchey et al., 2011), en revanche, certains prions peuvent augmenter la survie des cellules (Suzuki et al., 2012). Les prions de levure ont été découverts par leurs propriétés génétiques inhabituelles et sont devenus des modèles importants pour un ensemble de maladies amyloïdes et prions humaines. Les prions de levure ont été détectés initialement comme les produits de gènes non chromosomiques, conférant un rôle de suppresseur de non-sens (Nonsense suppressor en anglais) [PSI+] chez Saccharomyces cerevisiae (Cox, 1965) ou une levée de la répression de la régulation du nitrogène ([URE3] chez S. cerevisiae (Lacroute, 1971)). Ce n'est que bien plus tard qu'il sera démontré que ce sont des prions (Wickner, 1994).

Le prion [URE3] **(Figures 53, 54 et Tableau 3)** de *S. cerevisiae* est une forme amyloïde d'Ure2p, un régulateur négatif de la transcription des gènes codant pour les enzymes et les transporteurs en présence de sources d'azote pauvres (Cooper, 2002; Magasanik and Kaiser, 2002). Ure2p bloque les gènes des enzymes et des transporteurs nécessaires à l'utilisation de sources d'azote pauvres lorsqu'une bonne source d'azote est disponible. Ure2p est actif lorsqu'une bonne source d'azote est disponible, inactif lorsque seule une mauvaise source d'azote est fournie ou lorsque Ure2p est en forme prion.

Sup35p (Figures 53, 54 et Tableau 3) est une sous-unité (avec Sup45p) du facteur de terminaison de la traduction de *S. cerevisiae*, arrêtant la traduction et libérant le peptide achevé de l'ARNt final. Sa conversion en une forme amyloïde auto-propagée entraîne l'apparition du prion [PSI+], avec une déficience de ce facteur produisant une lecture fréquente des codons de terminaison de nombreux gènes de levure. Le prion est généralement caractérisé par un phénomène de lecture au travers (« readthrough ») des codons de terminaison d'*ade1* et *ade2* dans la biosynthèse de l'adénine. En plus de permettre la sélection du prion [PSI+], la couleur rouge des colonies ade1 ou ade2 permet de différencier les variants du prion « fort » (blanc) ou «faible» (rose) qui dépend de l'efficacité du « readthrough » ainsi que les clones rouge vif qui ont perdu [PSI+].

Le fait que [URE3] et [PSI+] soient des prions d'Ure2p et Sup35p respectivement, a d'abord été mis en évidence à partir de leurs propriétés génétiques inhabituelles, celles-ci étant inconsistantes

Introduction

Prion	Prion protein	Prion phenotype	Protein function	References
TSE	PrP	Transmissible spongiform encephalopathy	GPI-anchored cell surface glycoprotein, function not clear	Prusiner (2004)
[URE3]	Ure2p	Derepressed nitrogen catabolism genes	Repression of nitrogen catabolism gene transcription (eg, DAL5)	Wickner (1994)
[PSI+]	Sup35p	Read-through of translation termination codons	Subunit of translation termination factor	Wickner (1994)
[PIN+]	Rnq1p	Rare priming of formation of other prions	Nonessential; function unknown	Derkatch et al. (2001)
[SWI+]	Swi1p	Deficient in utilizing nonfermentable carbon sources	Chromatin remodeling	Du et al. (2008)
[OCT+]	Cyc8p	Slow growing, with defects in mating and sporulation	Subunit (with Tup1p) of transcription repressor	Patel et al. (2009)
[ISP+]	Sfp1p	Antisuppressor, overproduces Sup35p	Transcription factor for ribosome proteins	Rogoza et al. (2010)
[MOT3+]	Mot3p	Filamentous growth on low nitrogen	Transcription factor for hypoxic, hyperosmotic stress	Alberti et al. (2009)
[MOD5+]	Mod5p	Slow growth, fluconazole- resistance	tRNA isopentenyltransferase	Suzuki et al. (2012)
[BETA]	Prb1p	Activation of Prb1p precursor by active Prb1p	Vacuolar protease B	Roberts and Wickner (2003)
[Het-s]	HET-s	Heterokaryon incompatibility in <i>Podospora anserina</i>	Heterokaryon incompatibility (no nonprion function known)	Coustou et al. (1997)

Tableau 3. Prions de levure, champignons et mammifères (d'après (Wickner, 2016))



	wild type	prion	gene mutant	
phenotype	+	—		

Figure 55. Critères génétiques pour la définition d'un prion de levure ou de prion fongique.

Les prions [URE3] et [PSI+] remplissent les trois critères (Wickner, 1994) car leurs phénotypes sont souvent dus à la déficience de la forme normale de la protéine, mais ce n'est pas le cas pour [PIN+] et [Het-s] (Coustou et al., 1997; Derkatch et al., 2001) car leurs phénotypes sont dus à de nouveaux effets de la forme amyloïde. (d'après (Wickner, 2016)) avec le fait que [URE3] ou [PSI+] soient des réplicons d'ADN ou d'ARN, mais attendues pour un prion (Wickner, 1994). Ces critères génétiques (Figure 55) étaient l'infectivité, montrée par l'hérédité nonchromosomique, la curabilité réversible (chaque prion peut être curé efficacement, mais peut (rarement) réapparaitre dans la même souche), la surexpression de la protéine qui augmente énormément la fréquence d'apparition du prion. De plus, le phénotype du prion est essentiellement celui d'un mutant récessif dans le gène chromosomique correspondant à la protéine prion, et pourtant ce gène chromosomique est nécessaire à la propagation du prion correspondant (Wickner, 1994; Wickner et al., 2015). Le fait que la forme amyloïde des protéines Sup35p et Ure2p respectives soit à la base des prions [PSI+] et [URE3] a été démontré par la résistance aux protéases d'Ure2p dans les souches [URE3] (Masison and Wickner, 1995), l'état agrégé de Sup35p et d'Ure2p dans les cellules [PSI+] et [URE3] respectivement (Patino et al., 1996; Paushkin et al., 1996, Edskes et al., 1999), ainsi que la formation d'amyloïdes de Sup35p et d'Ure2p amorcées (seedées) respectivement par des extraits de cellules [PSI+] et [URE3] (Glover et al., 1997; King et al., 1997; Paushkin, 1997; Taylor, 1999). Les parties d'Ure2p et Sup35p impliquées dans la formation et la propagation des prions sont restreintes à leurs domaines N-terminaux, tous deux riches en Q/N (Masison et al., 1997; Masison and Wickner, 1995; Ter-Avanesyan et al., 1994). Ces régions sont appelées les domaines prion, car ils sont à la fois nécessaires et suffisants pour la propagation du prion in vivo. Le domaine prion Ure2p peut propager [URE3] en l'absence de la partie C-terminale de la molécule (Masison et al., 1997). [PSI+] peut se propager avec le domaine N-terminal de Sup35p exprimé séparément du domaine C-terminal essentiel (Ter-Avanesyan et al., 1994). Des délétions dans le domaine C-terminal d'Ure2p peuvent élever considérablement l'efficacité de la conversion en forme prion, in vivo (Masison and Wickner, 1995) et in vitro (Taylor, 1999). La formation de prions Sup35p est augmentée par délétion de régions en dehors du domaine prion (Kochneva-Pervukhova et al., 1998; Balguerie et al., 2003), probablement en déstabilisant la structure native du domaine prion. Les modifications du domaine Sup35M (milieu) affectent également la propagation du prion en affectant la capacité de la chaperone Hsp104 à accéder aux filaments pour le clivage (Helsen and Glover, 2012). Cette région, enrichie en acides aminés chargés, sépare le domaine N-terminal formant le prion du domaine C-terminal. Le domaine prion d'Ure2p est important pour la stabilité de la molécule contre la dégradation des protéines, de sorte que sans le domaine prion, la régulation des catabolites azotés est défectueuse (Shewmaker et al., 2007). Le domaine prion Sup35p a également des fonctions non-prion, il est important dans la régulation du renouvellement général de l'ARNm grâce à son interaction avec la protéine de liaison et les enzymes de dégradation de polyA (Funakoshi et al., 2007; Hosoda et al., 2003).

Il existe bien d'autres prions de levure, environ 10 ont été décrits (Wickner et al., 2016).



Figure 56. Repliement amyloïde du « prion forming domain » de HET-s.

(A) Vue latérale et axiale d'un trimère de HET-s(218–289) dans sa conformation amyloïde fibrillaire. Chaque monomère apparaît dans une couleur différente (entrée PDB 2RMN). (B) Structure des répétitions R1 et R2 de HET-s(218–289) et séquences d'acides aminés correspondantes. Les résidus polaires sont colorés en vert, les résidus hydrophobes en jaune, les résidus chargés positivement en rouge, les résidus chargés négativement en bleu, les résidus aromatiques en magenta et la glycine en blanc. (d'après (Loquet and Saupe, 2017))



Figure 57. HET-S/s prion-forming domain (PFD)

(A) La structure en solénoïde- β du prion HET-s(218–289). La structure d'un monomère sous forme fibrillaire est représentée (PDB 2KJ3). Chaque barreau de brins β est représenté en jaune puis le second en rouge. La boucle centrale de connexion est représentée en bleu et la boucle C-terminale formant la poche semi-hydrophobe est en magenta. (B) Motifs solénoïdes- β individuels de HET-s et NWD2. Une représentation schématique de la forme en solénoïde β des répétitions 1 et 2 de HET-s et de NWD2(3–23) est donnée à gauche et à droite, respectivement. Le modèle NWD2(3–23) est basé sur la modélisation par homologie et sur des études par résonance magnétique nucléaire (RMN) à l'état solide. (d'après (Riek and Saupe, 2016))

4.6 Les amyloïdes fonctionnels

Le concept même du prion est étroitement associé à des situations pathologiques et ce n'est que récemment que des indications sur le rôle fonctionnel des états prion-like de certaines protéines ont été rapportées. A la différence des prions pathogènes pour lesquels l'agrégat amyloïde correspond à un dépôt de protéines mal repliées incapables d'exécuter leur fonction cellulaire (en tant que protéines natives), pour les protéines prion-like fonctionnelles c'est la forme oligomérique qui est associée à l'activité physiologique dans l'organisme.

4.6.1 Les amyloïdes fonctionnels prion-like chez les champignons filamenteux

4.6.1.1 Les systèmes HET-S/NWD2 et HET-s/HET-S chez P. anserina

Comme on l'a vu brièvement dans les chapitres précédents, [Het-s] est un prion fonctionnel du champignon filamenteux *P. anserina* (Coustou et al., 1997; Saupe, 2011). Ce prion est impliqué dans un processus de reconnaissance du non-soi commun chez les champignons filamenteux nommé IV. La population de *P. anserina* peut être séparée selon deux types de souches, les souches portant l'allèle *het-s* et celles portant l'allèle *het-S*; *het-s* et *het-S* sont deux variantes alléliques du même gène, et les protéines HET-s et HET-S correspondantes sont identiques à 95% (Turcq et al., 1991). Les souches [Het-s] et *het-S* sont incompatibles et subissent une mort cellulaire lorsqu'elles fusionnent (Rizet, 1952). Mais cette réaction de mort cellulaire se produit si, et seulement si, la protéine HET-s est sous forme de prion. La protéine HET-s est une protéine cytoplasmique soluble qui peut passer à une forme prion amyloïde assemblée et auto-propageable (Coustou et al., 1997; Saupe, 2011). Il n'y a pas d'altération de croissance détectable associée à la présence de la forme prion [Het-s]; [Het-s] n'a aucun effet néfaste sur le fitness d'un individu en laboratoire.

Le domaine C-terminal de HET-s appelé PFD occupe les positions 218 à 289 (Balguerie et al., 2003; Greenwald et al., 2010). Le PFD de HET-s contient deux répétitions imparfaites de 21 résidus (Ritter et al., 2005). Chacune de ces répétitions forme une couche de 4,7 Å d'une structure de feuillets β empilés (Figures 56 et 57) (Ritter et al., 2005; Sen et al., 2007). Contrairement à de nombreux amyloïdes, le PFD de HET-s est caractérisé par l'absence de polymorphisme structural, tel que déterminé par la résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide, ainsi que par son ordre et son caractère unique. Les deux pseudo-répétitions adoptent une structure en feuillets β rigide et sont reliées par une boucle flexible de 15 acides aminés (Ritter et al., 2005). Chaque répétition forme un anneau d'une structure de solénoïde- β à deux couches et comprend quatre brins β ; les trois premiers brins β délimitent un noyau hydrophobe triangulaire, tandis que le quatrième dépasse du noyau



Figure 58. L'extrémité N-terminale de la protéine NWD2 est comparable au consensus du PFD de HET-s.

(A) Comparaison de la séquence NWD2 avec la séquence consensus du PFD de HET-s. (B) Diagramme montrant l'organisation génomique de *het-s* et *nwd2* où les deux gènes adjacents sont transcrits de façon divergente. (C) Agencement des séquences NWD2(3-23) dans le modèle de repliement en solénoïde β (à gauche) et dans le modèle par homologie (à droite). Les résidus polaires sont en vert, les résidus hydrophobes en blanc et les résidus chargés positivement et négativement sont respectivement en bleu et en rouge. (d'après (Daskalov et al., 2012))



Figure 59. Les systèmes HET-s/HET-S et HET-S/NWD2 chez *P. anserina* Représentations schématiques de l'organisation des domaines des loci *het-s* et *het-S*. Le gène adjacent à *het-S* code pour NWD2, un récepteur NOD-like avec un domaine NACHT et des répétitions WD. Lors de la liaison d'un ligand spécifique, NWD2 acquiert une activité de matriçage en solénoïde ß. L'activation de HET-S peut être obtenue soit par matriçage par la forme prion de HET-s ou par la forme activée de NWD2. A noter que *Nwd2* est sous une forme inactive, un pseudogène, dans toutes les souches *het-s* en raison de l'insertion d'un transposon. (d'après (Riek and Saupe, 2016)) (Wasmer et al., 2008; Van Melckebeke et al., 2010). À l'extrémité C-terminale du PFD se trouve une boucle aromatique qui se replie dans une rainure délimitée par les troisième et quatrième brins β pour former une poche semi-hydrophobe (Van Melckebeke et al., 2010). Un modèle de cryo-EM de HETs(218-289) a également été obtenu et concorde largement avec la structure RMN à l'état solide (Mizuno et al., 2011). Le repliement du solénoïde- β affiche un certain nombre d'éléments structuraux clés. Deux échelles d'asparagine se trouvent au début des premier et quatrième brins β (N226 / N262 et N243 / 279), et trois ponts salins (K229 / E265, E234 / K270 et R236 / E272) stabilisent l'empilement des deux anneaux de brins β. Le noyau intérieur est composé exclusivement de résidus hydrophobes à l'exception de deux résidus hydroxyle occupant des couches différentes pouvant former une liaison hydrogène à l'intérieur du noyau (T233 / S273). Les résidus glycine occupent l'arc- β entre le troisième et le quatrième brin β dans les deux couches. Une courte boucle C-terminale contient deux résidus aromatiques (F286 et W287) et se replie sur le quatrième brin β pour former une poche semihydrophobe. Fait intéressant, toutes ces caractéristiques clés de séquence sont conservées (au moins dans une certaine mesure) dans les différents homologues HET-S/s qui pourraient être identifiés dans les génomes fongiques, ce qui plaide fortement pour une conservation évolutive du repliement en solénoïde-β (Daskalov et al., 2014).

Comme nous l'avons vu précédemment, la paire HET-S/NWD2 est impliquée dans un système de PCD grâce à une transduction du signal de type amyloïde. Des preuves fonctionnelles de l'activité de transconformation prion de NWD2 ont été obtenues *in vivo* chez *P. anserina* (Daskalov et al., 2012, 2015a). Des versions de NWD2 modifiées répondant à des ligands connus induisent efficacement la formation de [Het-s] d'une manière dépendante du ligand. La région N-terminale de NWD2 est à la fois nécessaire et suffisante pour l'activité d'induction de prions *in vivo*. *In vitro*, un peptide synthétique NWD2(3–23) correspondant à la région homologue à la répétition élémentaire de HET-S/s, s'assemble en fibrilles amyloïdes qui présentent une infectivité prion. Les résidus critiques pour la formation du repliement en solénoïde- β pour ce motif (Daskalov et al., 2012) (**Figure 58**). L'analyse en RMN du solide des fibrilles de NWD2(3–23) est tout à fait cohérente avec la proposition selon laquelle le peptide adopte un repliement de type HET-S/s. Le peptide NWD2(3–23) est la plus petite entité moléculaire qui présente une activité inductrice de prions; il apparaît ainsi que la transconformation repose strictement sur les régions en brins β (et ne nécessite ni la boucle flexible, ni la boucle aromatique C-terminale, ni la répétition du motif de 21 acides aminés).

Il est désormais possible de proposer des scénarios d'évolution plausibles pour l'émergence du prion [Het-s]. La paire HET-S/NWD2 est largement conservée dans les espèces fongiques, alors qu'apparemment le système d'incompatibilité [Het-s]/HET-S est spécifique à *P. anserina* (Daskalov et

83



Figure 61. Motifs de signalisation amyloïde PP et sigma.

(A) Architecture des gènes du locus hellp de Chaetomium globosum et architecture des domaines des protéines correspondantes. La séquence des régions PP de HELLP, de SBP et de PNT1 (NLR) est donnée. (B) Architecture des gènes du locus ses de Nectria haematococca et architecture des domaines des protéines correspondantes. La séquence des régions sigma de SESA, SESB et HET-eN (NLR) est donnée. (d'après (Loquet and Saupe, 2017))

motifs

(Het-s

al., 2012, 2014). Les protéines HET-s peuvent être propagées sous forme de prion car elles ont un domaine HeLo inactif (Deleu et al., 1993; Greenwald et al., 2010; Seuring et al., 2012), si ce dernier était actif, elles tueraient les cellules dans lesquelles elle se trouvent et ne pourraient se propager. Ces observations supportent l'hypothèse selon laquelle le système d'incompatibilité [Het-s]/HET-S dérive du complexe génétique préexistant *het-S/nwd2* par exaptation (Debets et al., 2012; Seuring et al., 2012). Une exaptation est un mécanisme évolutif par lequel un gène ou un organe est coopté pour remplir une nouvelle fonction qui n'était pas à l'origine la cible de la sélection (Gould and Vrba, 1982). Dans ce modèle, une mutation ponctuelle du domaine HeLo de HET-S a permis la formation du prion [Het-s], créant ainsi le système d'incompatibilité [Het-s]/HET-S (Daskalov et al., 2012; Debets et al., 2012; Seuring et al., 2012; Seuring et al., 2012; Ce modèle peut expliquer pourquoi *nwd2* est devenu inutile dans ce contexte comme en témoigne sa nature de pseudogène dans les souches *het-s* sauvages (Figure 59) (Debets et al., 2012).

4.6.1.2 Autres motifs amyloïdes prion-like dans les champignons filamenteux

Les motifs HRAM (Het-s Related Amyloid Motif)

En plus du motif prion canonique HET-s, d'autres motifs de signalisation amyloïde existent dans les champignons. Une recherche bioinformatique visant à définir des motifs avec une structure répétée présents aux extrémités C-terminales des domaines HeLo ou HELL a révélé l'existence de cinq sousfamilles de motifs amyloïdes apparentés à HET-s, les HRAMs (Daskalov et al., 2015a) (Figure 60). La divergence de séquence entre les familles peut être considérable, les motifs de différentes familles pouvant partager moins de 10% d'identité. Chaque sous-famille est définie par une signature de séquence spécifique, et en dépit de variations de séquences considérables au sein des signatures de motifs, des caractéristiques communes à toutes les sous-familles comme la présence de résidus hydrophobes aux positions 3,6,8 et 14 et la présence de G en position 17 sont retrouvées. Des analyses de co-variance suggèrent fortement que les sous-familles HRAM adoptent un repliement similaire à celui de HET-s de P. anserina. Les analyses de co-variance prédisent des interactions en registre entre les motifs R1 et R2. Le motif de signalisation amyloïde HET-s s'est donc diversifié dans des sous-familles différentes. Dans certaines espèces, comme P. anserina, il y a co-existence de HRAMs appartenant à différentes familles, HET-s (famille HRAM1) et HELLF (famille HRAM5, la plus divergente de HRAM1) (cf. ci-après), ce qui suggère l'existence de voies de signalisation amyloïdes parallèles. Des approches structurales sont requises afin de déterminer jusqu'à quel point le repliement dans les différentes familles HRAM ressemble au repliement canonique de HET-s et jusqu'à quel point les différents motifs peuvent ou non s'amorcer réciproquement (cross-seeding) (Daskalov et al., 2020). Dans une fraction



Figure 62. Le motif PP dans le cluster de gènes de *Chaetomium globosum*

(A) Représentation du locus CHGG 1412/13/14 avec trois gènes adjacents, un codant pour une protéine à domaine HELL appelée HELLP, un codant pour une lipase prédite apparentée à SesB (SBP) et un codant pour une protéine NB-ARC/TPR STAND (PNT1). Le motif PP est représenté par une ligne rose. (B) Alignement de la région du motif PP de HELLP, SBP et PNT1 avec une partie du motif RHIM de RIP1 et RIP3 humains. (C) Signatures des séquences des régions centrales des motifs PP et des motifs RHIM générées avec Skylign. La taille des lettres correspond au niveau de conservation. (d'après (Daskalov et al., 2016))



Figure 63. Structure de l'hétéro-amyloïde RIPK1-RIPK3 de la voie de la nécroptose.

L'interface hydrophobe comprenant les résidus 532–543 de RIPK1 et 451–462 de RIPK3 est représentée. Les résidus hydrophobes (Ile et Val) sont représentés en blanc et entourent un noyau hydrophobe rectangulaire. Asn (rouge) et Gln (bleu) participent aux liaisons H entre chaînes latérales exposées aux solvants alors que les résidus Tyr (couleur sable), Ser et Thr sont également empilés à la périphérie du noyau non polaire. Une échelle Cys-Ser est contenue à l'intérieur du noyau hydrophobe. Cette structure est déposée sous l'entrée PDB 5V7Z. (d'après (Mompeán et al., 2018))

substantielle des espèces fongiques analysées, des motifs de deux (ou trois) familles HRAM coexistent. En fonction du niveau de *cross-seeding* entre les familles, on peut imaginer que les HRAMs se sont diversifiés en cascades de signalisation fonctionnellement diverses permettant des voies de signalisation linéaires ou ramifiées. Une protéine de *Fusarium graminearum* appartenant à la famille HRAM1 (la famille englobant également HET-s de *P. anserina*) a été caractérisée, elle présente un PFD fonctionnel qui adopte une structure étroitement apparentée à celle de HET-s (Wasmer et al., 2010; Benkemoun et al., 2011). Les protéines HET-s et FgHET-s ont une identité de 38% dans la région PFD. Des transconformations réciproques et une infection prion se produisent entre les PFD homologues, mais lorsqu'ils sont co-exprimés dans la même cellule, la polymérisation homotypique est favorisée par rapport à la formation d'agrégats hétérotypiques (Wasmer et al., 2010; Benkemoun et al., 2011).

<u>Le motif sigma, σ</u>

Un élément cytoplasmique infectieux a été décrit dans le champignon filamenteux Nectria haematococca (Graziani et al., 2004). Cet élément, σ , apparaît spontanément et conduit à un phénotype d'altération de croissance appelé secteur. Le phénotype de secteur conduit à une croissance lente et anormale et à une pigmentation marquée. L'élément σ responsable de ce phénotype est transmis par contact cytoplasmique et dépend d'un locus nucléaire appelé ses. Ce locus est un locus complexe contenant trois gènes adjacents, sesA, sesB et het-eN. sesA code une protéine avec une homologie distante avec le domaine HeLo, sesB code une lipase putative et het-eN code une protéine NLR avec un domaine NACHT et des répétitions ankyrine. sesA, sesB et het-eN partagent une courte région d'homologie, le motif sigma, situé à l'extrémité C-terminale des protéines dans sesA et sesB et à l'extrémité N-terminale de la NLR het-eN (Graziani et al., 2004; Daskalov et al., 2012). Cela a conduit à la proposition que les protéines sesA et sesB sont régulées par het-eN via le motif de signalisation amyloïde sigma. Le motif de séquence sigma ne partage aucune similitude avec le motif HRAM et semble être composé de trois sous-motifs répétés immédiatement adjacents d'environ 8 à 9 acides aminés de longueur. Il est proposé que l'élément infectieux sigma corresponde à un co-prion impliqué dans l'agrégation amyloïde auto-propagée de sesA et sesB (Daskalov et al., 2012). L'expression de sesA dans la levure a montré que la protéine subit une transition de phase et forme des foci positifs à la thioflavine in vivo, en cohérence avec l'hypothèse selon laquelle l'élément σ correspond à un prion amyloïde (Khan et al., 2018) (Figure 61).

Le motif PP

Un troisième type de motif appelé PP a été caractérisé dans l'espèce Chaetomium globosum

87



Figure 64. HELLF est un homologue distant de HET-s codé dans le génome de P. anserina.

(A) Homologie de séquence entre les PFD de HELLF et HET-s. Les deux pseudo-répétitions sont encadrées. Les résidus conservés sont représentés dans la palette de couleurs de Taylor et l'intensité de la couleur reflète le degré de conservation. (B) Représentation MEME montrant la conservation des résidus spécifiques de HRAM. (C) Agrégats en forme de foci du PFD de HELLF (GFP-HELLF (209-277)) formés dans *P. anserina*. La barre d'échelle est de 5 μm. (D) HELLF contrôle une réaction de mort cellulaire programmée telle que déterminée par le phénotype « barrage » (pointe de flèche blanche) entre les souches exprimant HELLF entier et les souches exprimant le PFD de HELLF à l'état prion : [φ]. (E) Micrographie électronique d'assemblages fibrillaires du PFD de HELLF, échelle: 100 nm. (d'après (Daskalov et al., 2020))

mais se retrouve également dans une large gamme d'ascomycètes filamenteux, tout comme les motifs HRAM et sigma (Daskalov et al., 2016) (Figures 61 et 62). Chez C. globosum, le motif PP se trouve dans un cluster de trois gènes codant pour PNT1 (une NLR avec un domaine NB-ARC et des répétitions TPR), HELLP (un homologue distant de HET-S) et SBP (une lipase prédite homologue à sesB). Dans ce cas, la protéine NLR PNT1 régule l'activation de deux protéines effectrices, une protéine avec un domaine HELL induisant la mort cellulaire nommée HELLP et une lipase putative, SBP. HELLP possède un domaine HELL N-terminal et un motif PP C-terminal. Comme het-S, le gène codant pour HELLP est adjacent à un gène codant pour une NLR avec un motif N-terminal amyloïde. Il a été constaté que le domaine HELL est également un domaine inducteur de mort cellulaire ciblant la membrane et contrôlé par transduction amyloïde. Sur la base de la similitude entre HELLP et HET-S, il a été proposé que le domaine HELL pourrait également fonctionner comme un domaine de formation de pores, et que cette activité implique la région TM prédite. Comme le motif amyloïde HET-s, le motif PP doit être considéré comme un amyloïde fonctionnel soumis à des contraintes évolutives pour optimiser et maintenir la fonction. Les trois protéines partagent un motif commun de 19 à 20 acides aminés de longueur appelé PP (pour pseudopalindrome). De manière remarquable, ce motif montre une similitude de séquence avec le motif amyloïde RHIM intervenant dans la nécroptose chez les mammifères (précédemment décrite). Les deux motifs partagent une région centrale G- φ -Q- φ -G commune qui correspond au noyau central du nécrosome amyloïde RIPK1/RIPK3 avec une interdigitation serrée des chaînes latérales des deux séquences RHIM se faisant face dans le plan de la structure croisée β (Mompeán et al., 2018; Saupe, 2020) (Figure 63), soulevant la possibilité d'une conservation évolutive à long terme des motifs amyloïdes fonctionnels. Cependant, en raison de la faible complexité de la séquence et de la courte taille de ces motifs, un scénario alternatif d'évolution convergente vers une capacité de formation d'amyloïde ne peut être exclu. Il a été proposé que le motif RHIM soit apparenté au motif HRAM (Kajava et al., 2015). Mais comparé au motif HRAM1 de HET-s, le motif PP a une plus grande similitude de séquence avec RHIM. De plus, comme RHIM, le motif PP se présente comme un motif unique plutôt que comme deux pseudo-répétitions.

4.6.1.3 Le système HELLF/FNT1 chez Podospora anserina

La paire NWD2/HET-S a été utilisée comme paradigme pour un criblage bio-informatique extensif à la recherche de paires de NLR/effecteur additionnelles fonctionnant par conversion amyloïde chez les champignons (Daskalov et al., 2012, 2015a). Cela a résulté en l'identification chez *P. anserina* d'un homologue distant de HET-S nommé HELLF **(Figures 64 à 67)** (Daskalov et al., 2020). HELLF code une protéine avec un domaine N-terminal HeLo-like et un PFD C-terminal avec deux sousmotifs répétés partageant moins de 15% d'identité avec le PFD de HET-s. Le gène adjacent à *hellf* code



Figure 65. HELLF est un homologue distant de HET-S

(A) Le gène *hellf* est codé dans le génome de *Podospora anserina* et est adjacent à un gène codant pour une NLR appelé *fnt1*. Ci-contre, un schéma du groupe de gènes (*hellf/fnt1*), qui ressemble au groupe de gènes formé par *het-S* et nwd2. (B) Architecture des domaines des protéines HELLF et HET-S induisant la mort cellulaire, ainsi que celle de FNT1 et du récepteur de type NOD, NWD2. Les régions PFD de HELLF et HET-S et la région formant des amyloïdes des NLRs sont représentées par une ligne bleue et orange, respectivement. (C-D) Le prion amyloïde à base de HELLF se propage *in vivo*. Bistabilité de HELLF(209-277) (C) et de HELLF(L52K) (D) *in vivo*. Images de microscopie à fluorescence des fusions moléculaires HELLF(209-277)-RFP (C) et HELLF(L52K)-GFP (D) surexprimées, montrant les états d'agrégation de HELLF dans les souches [Φ]. Aucun agrégat n'est observé dans les souches [Φ *]. Barre d'échelle : 5 µm. (E) HELLF(209-277)-RFP (l'état prion [Φ]). Barre d'échelle: 5 µm (d'après (Daskalov et al., 2020))



Hydrophobic residues : white Acidic residues : red Basic residues : blue Others : green

Figure 66. Structure en RMN du solide du prion HELLF(209-277).

(A) Vue latérale d'une représentation en ruban de la structure du prion de HELLF(209-277), représentant cinq monomères empilés en arrangement fibrillaire. Les molécules individuelles sont représentées par des couleurs différentes. (B) Vue de dessus des pseudo-répétitions formant le solénoïde, R1 (en haut) et R2 (en bas), de HELLF(209-277). Les résidus hydrophobes sont représentés en blanc, les résidus acides en rouge, les résidus basiques en bleu et les autres en vert. (d'après (Daskalov et al., 2020))

une NLR nommée FNT1, constituée d'un domaine NB-ARC et de répétitions TPR, et d'une région Nterminale R0 homologue aux répétitions R1 et R2 du PFD de HELLF. HELLF se comporte de façon similaire à HET-S dans tous les aspects analysés. La région C-terminale de HELLF forme un prion nommé [ϕ], qui est incompatible avec la protéine HELLF entière. Lors de l'interaction avec [ϕ], HELLF se relocalise dans la région membranaire et cause la mort cellulaire. La région N-terminale de HELLF forme des fibres et est capable d'induire la formation du prion [ϕ]. La structure en RMN à l'état solide du PFD de HELLF a révélé que les prions HET-s et HELLF ont une structure quasi-identique **(Figure 67)** malgré des grandes divergences de séquence (seulement 17% d'identité entre les pseudo-répétitions R1 et R2 du PFD de HELLF et les pseudo-répétitions du PFD de Het-S/-s) (A. Daskalov et al., 2020).

Compte tenu de la similitude structurale entre les repliements prions des protéines HELLF et HET-s et que ces protéines se retrouvent dans la même espèce, les interactions croisées entre les états prions $[\Phi]$ et [Het-s] ont été étudiés dans notre laboratoire, *in vivo*. Il a été constaté que les souches $[\Phi]$ ne convertissent pas les souches non-prion [Het-s *] en état prion [Het-s] et que les souches [Het-s] n'induisent pas la formation de prions $[\Phi]$. Les fibrilles du PFD de HELLF ne présentent aucune infectivité [Het-s] et les fibrilles du PFD de HET-s ne présentent aucune infectivité $[\Phi]$ dans les tests de transfection. Les PFD de HELLF et HET-s forment des agrégats indépendants *in vivo*, indiquant que les deux prions ne co-agrègent pas. Les souches co-exprimant HELLF et HET-s peuvent afficher quatre états épigénétiques possibles ([Het-s *] $[\Phi *]$, [Het-s] $[\Phi]$ mais aussi [Het-s *] $[\Phi]$ et [Het-s] $[\Phi *]$) confirmant que [Het-s] et $[\Phi]$ sont des prions indépendants, puisqu'ils n'ont aucune influence l'un sur l'autre. Étant donné que les structures du squelette prion des PFD de HET-s et HELLF sont presque identiques, il semble qu'une forte similitude structurale et les interactions de ces squelettes à feuillets β soient insuffisantes pour la transconformation amyloïde et/ou la co-agrégation (A. Daskalov et al., 2020).

En faisant varier les résidus spécifiques de HRAM entre les PFD de HET-s et HELLF, la barrière de *cross-seeding* entre les deux prions pourrait être franchie. Des membres du laboratoire ont remplacé cinq résidus sur chacune des deux pseudo-répétitions HRAM5 de 21 acides aminés de HELLF par des résidus des positions correspondantes trouvées dans les pseudo-répétitions HRAM1 de HET-s (Daskalov et al., 2020). La séquence conçue a été appelée HEC (HET-s closer). Ils ont ciblé les résidus de remplacement qui sont essentiels pour distinguer HRAM5 (HELLF) de HRAM1 (HET-s) (Daskalov et al., 2015a). Les cinq substitutions d'acides aminés pour chaque pseudo-répétition de HELLF ont été introduites dans deux sous-motifs spécifiques de HRAM5 fortement conservés de la protéine - le QxFG (position 1-4, où x est tout résidu d'acide aminé possible) et QG (QI) (position 16-18). Ils ont exprimé HEC dans une souche de *Podospora \Delta het-s \Delta hellf* et testé la capacité de la protéine à se propager sous forme de prion et à porter la spécificité prion [Het-s] et/ou [Φ] *in vivo*. Les souches exprimant GFP-HEC ont montré deux phénotypes distincts; Les souches [HEC *] présentaient une fluorescence GFP-HEC

Introduction



Figure 67. Le repliement amyloïde du prion HELLF(209-277) présente une forte similitude avec celui du prion HET-s(218-289), mais les deux domaines prion sont incapables de *cross-seeder in vivo*.

(A) Alignement des structures formant la colonne vertébrale des PFD de HELLF (en bleu) et HET-s (en jaune) obtenues en RMN du solide. (B-C) Sont montrés ici quatre schémas représentant le noyau triangulaire hydrophobe des fibrilles amyloïdes formées par les pseudo-répétitions successivement empilées –R1 (panneaux de gauche) et R2 (panneaux de droite) - de HELLF (B) et de HET-s (C). Les résidus d'acides aminés ornant l'ossature amyloïde sont dessinés sous forme de perles de différentes couleurs. Les résidus hydrophobes sont représentés en blanc, les résidus acides en rouge, les résidus basiques en bleu et les autres en vert. (D) Images de microscopie à fluorescence de souches co-exprimant HET-s-RFP (état [Het-s *] ou [Het-s]) et le mutant HELLF (L52K)-GFP (incapable d'induire la mort cellulaire) (état [Φ *] ou [Φ]) présentant des combinaisons épigénétiques distinctes. Barre d'échelle : 2 µm. (E) Modèles 3D pour les deux pseudo-répétitions de différentes familles HRAM. (d'après (Daskalov et al., 2020))

diffuse, n'ont pas induit de prions [Het-s] ou [Φ], et n'ont pas pu déclencher la mort cellulaire par incompatibilité avec les souches exprimant HET-S ou HELLF. Il a été observé que certaines souches [HEC*] ont fait, spontanément et à faible taux (~ 10%), une transition vers un état [HEC] caractérisé par l'apparition d'agrégats fluorescents en forme de foci. Aucune des souches [HEC] spontanées n'a pu induire [Het-s] ou produire un barrage avec une souche HET-S. Pourtant, les souches [HEC] ont induit la mort cellulaire avec des souches exprimant HELLF, indiquant que la séquence HEC modifiée montre une spécificité de prion $[\Phi]$ et ce phénotype a été appelé $[HEC^{\Phi}]$. Il a ensuite été constaté qu'après un contact avec une souche [Het-s], les souches [HEC*] sans prion pouvaient également être converties en un état [HEC], caractérisé par l'apparition d'agrégats fluorescents GFP-HEC en forme de foci et la capacité d'induire la mort cellulaire avec HELLF, indiquant que l'état prion de HEC peut être induit à la fois par HELLF et HET-s. Surtout, il a été constaté que les souches [HEC] induites par [Het-s], contrairement aux souches [HEC^Φ], étaient capables de convertir les souches [Het-s*] en souches [Hets] et d'induire la mort cellulaire avec HET-S. Par conséquent, ce phénotype a été appelé [HEC^S]. De plus, il a été observé que les agrégats de GFP-HEC de souches [HEC^s] partiellement co-localisés avec [Het-s] et non avec [Φ], tandis que les agrégats HEC fluorescents de la souche [HEC^Φ] produisaient les résultats opposés et co-localisaient majoritairement avec $[\Phi]$. Il a été conclu que la séquence HEC modifiée pouvait se propager sous forme de deux souches de prions distinctes [HEC⁶] et [HEC⁵] et était capable de franchir la barrière de *cross-seeding* entre les prions [Het-s] et $[\Phi]$. Puisque HEC a été conçu par le remplacement ciblé des résidus spécifiques de HRAM, ces résidus doivent jouer un rôle clé dans le contrôle de la propagation des prions, permettant ou empêchant les cross-seeding croisés entre les familles de HRAM (Daskalov et al., 2020) (Figure 67).

Le système FNT1/HELLF constitue un deuxième système de signalisation amyloïde induisant la mort chez *P. anserina*. Le fait que les prions [Het-s] et $[\phi]$ ne puissent pas interagir et donc se convertirent l'un et l'autre indique que NWD2/HET-S et FNT1/HELLF constituent deux voies de signalisation parallèles.

4.6.2 Chez les mammifères : chez l'Homme en particulier

Chez l'homme, il a été proposé que les amyloïdes fonctionnels participent à un éventail de processus physiologiques, notamment la pigmentation, le stockage des hormones peptidiques, la fécondation des ovocytes par le sperme, les réponses antimicrobiennes, la nécrose régulée et les réponses cellulaires au stress. Les amyloïdes peuvent également être produits sous forme repliée, les fibrilles remplissant un éventail de fonctions physiologiques (Otzen, 2010). La structure fibreuse des fibrilles amyloïdes facilite leur utilisation comme échafaudages pour les processus biochimiques, tandis que la nature compacte du repliement amyloïde est idéale pour le stockage des protéines et des

Protein, Peptide or Cellular Structure	Proposed Functions	Experimental Evidence for Amyloid Fibrils
Amyloid-bodies (A-bodies)	Stores of proteins in stressed cells	A-bodies are stained by Congo red and thioflavin-S. Proteins that accumulate in A-bodies can form fibrils with a cross-β X-ray fiber diffraction pattern [11].
Acrosomes	The acrosome reaction during fertilisation of oocytes.	Acrosomes in sperm are stained by thioflavin-S and are recognised by amyloid-specific antibodies. Purified acrosomal matrix has a cross-fi X-ray fiber diffraction pattern [12].
Cystatin-related epididymal spermatogenicis (CRES) subgroup proteins	Antimicrobial activity, acrosome reaction and lysosomal function	Material from the epididymis has a cross-fi X-ray fiber diffraction pattern, is recognised by amyloid-specific antibodies and binds thioflavin-S and Congo red. CRES proteins co-localises with thioflavin-S. Fibrils of CRES proteins bind thioflavin-T and are recognised by amyloid-specific antibodies [13,14].
LL-37	Antimicrobial	Fibrils exhibit green birefringence with Congo red [15].
Peptide hormones	Storage of the hormone in secretory granules	Purified granules from endocrine cells have a cross-β X-ray fiber diffraction pattern and exhibit green birefringence with Congo red. The fibrils bind Congo red and have a cross-β X-ray fiber diffraction pattern [16].
Pigment cell-specific pre-melanosomal protein (PMEL)	Pigmentation	Purified melansomes are stained by thioflavin-S and Congo red. The fibrils have a cross- β X-ray fiber diffraction pattern, bind Congo red and thioflavin-T and have a far ultraviolet circular dichroism spectrum consistent with β -sheet content [17].
Prostatic acid phosphatase peptides	Removal of damaged sperm	The fibrils have a cross-β X-ray fiber diffraction pattern, bind thioflavin-T and exhibit green birefringence with Congo red [<u>18</u>].
Protegrin-1	Antimicrobial	The fibrils bind thioflavin-T [19].
Receptor-interacting protein 1 (RIP1)/RIP3	Regulated necrosis	The fibrils have a cross-\$ X-ray fiber diffraction pattern, a solid state NMR spectra consistent with a \$-sheet core and bind thioflavin T and Congo red [20].
Semenogelin proteins (SEM1 and SEM2)	Removal of damaged sperm	The fibrils bind thioflavin-T and Congo red and an amyloid-specific antibody pulls down SEM 1 and SEM 2 from seminal fluid [21].

Tableau 4. Amyloïdes fonctionnels : résumé des preuves expérimentales de la formation de fibrilles amyloïdes. (d'après Jackson et Hewitt, 2017)

Introduction

peptides. Chez l'homme, plusieurs peptides et protéines ont été identifiés comme s'auto-assemblant en fibrilles remplissant des fonctions physiologiques et ayant des propriétés cohérentes avec un repliement amyloïde. Les preuves expérimentales de la formation de fibrilles amyloïdes par ces peptides et protéines sont résumées dans le **Tableau 4** (Jackson and Hewitt, 2017).

Voici quelques exemples d'amyloïdes fonctionnels.Les fibrilles amyloïdes de la protéine prémélanosomale spécifique aux cellules pigmentaires (PMEL) sont localisées dans la lumière des mélanosomes, un organite spécialisé présent dans la peau et les yeux qui sert de site pour la synthèse du pigment mélanine (Fowler et al., 2006; Watt et al., 2013; Bissig et al., 2016). Les fibrilles ont une fonction d'échafaudage pour le dépôt de polymères de mélanine à base de tyrosine, et séquestrent les intermédiaires toxiques durant la synthèse de mélanine. Une fonction d'échafaudage analogue a été proposée pour les fibres amyloïdes RIP1K/RIP3K (Li et al., 2012).

Les protéines contenant des motifs RHIM sont exprimées partout dans la nature dans le contrôle de la mort cellulaire programmée. Quatre protéines de mammifères impliquées dans la nécroptose contiennent des RHIM, certains champignons filamenteux expriment des protéines à domaine amyloïde de type RHIM qui modulent les domaines induisant la mort (Daskalov et al., 2016), la drosophile utilise des agrégats de protéines avec des caractéristiques de type RHIM pour la signalisation immunitaire innée (Kounatidis and Ligoxygakis, 2012) et certains virus expriment des protéines contenant des RHIM qui sont les clés pour leur survie et leur interaction avec leurs hôtes (Kaiser et al., 2013). Les mécanismes d'interaction virus-hôte dans les systèmes d'infection des mammifères suggèrent que les complexes à base de RHIM pourraient contenir jusqu'à quatre protéines différentes (He et al., 2011; Upton et al., 2012; Blander, 2014). En 2012, il a été démontré que les RHIM favorisent la formation de fibrilles amyloïdes hétéro-oligomériques avec des fonctions de signalisation dans la nécroptose, c'est la première identification d'un amyloïde fonctionnel de mammifère avec un rôle de signalisation (Li et al., 2012). Tous les RHIM connus contiennent une séquence tétrade hautement conservée (V/I)-Q-(V/I/L/C)-G (Kaiser et al., 2013; Khan et al., 2014; Murphy and Silke, 2014; Vanden Berghe et al., 2016). Les séquences RHIM se trouvent généralement dans une région de la protéine prédite comme non-structurée, avec le RHIM situé soit en N- soit en Cterminal de larges domaines globulaires connus, avec des fonctions distinctes. Dans la nécroptose régulée : il y a trois voies majeures, elles impliquent les protéines adaptatrices contenant le RHIM connues sous le nom de RIPK1 et 3, un adaptateur induisant l'interféron- β contenant le domaine TIR (TRIF) et un capteur d'acide nucléique cytoplasmique, la protéine de liaison à l'ADN-Z 1 (ZBP1; également connu sous le nom d'activateur dépendant de l'ADN des facteurs régulateurs de l'IFN, DAI).

Dans les cellules soumises à des facteurs de stress, **les corps amyloïdes (corps A)** agissent comme des réserves de protéines (Audas et al., 2016). L'acidose et le choc thermique induisent

Introduction

l'expression de l'ARN non codant ribosomal intergénique (rIGSRNA), qui « *seed* » la formation de corps-A dans le noyau (Audas et al., 2016). Plusieurs protéines (> 180) s'assemblent dans les corps A, y compris les protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire et la synthèse de l'ADN, ce qui fait entrer les cellules dans un état dormant. Inversement, la suppression du facteur de stress provoque le désassemblage des corps-A (Audas et al., 2016). De même, de nombreuses hormones peptidiques sont stockées sous forme de fibrilles amyloïdes dans le lumen acide des granules sécrétoires des cellules endocrines (Maji et al., 2009). Il est proposé que la densité élevée des fibrilles amyloïdes confère aux granules leur noyau dense caractéristique. Cependant, lors de la sécrétion des granules, les fibrilles se dissocieront sous la forme monomère de l'hormone peptidique en raison de l'exposition au pH extracellulaire plus élevé (Maji et al., 2009).

Les **peptides antimicrobiens (AMP)** jouent un rôle central dans les réponses immunitaires innées face à des infections (Kagan et al., 2012). Ils partagent un certain nombre de caractéristiques avec les peptides et les protéines qui forment les amyloïdes, les AMP et les séquences amyloïdogènes étant capables de former des pores qui perméabilisent les membranes (Kagan et al., 2012; Last and Miranker, 2013). De plus, les AMP LL-37 et la protégrine-1 peuvent s'assembler en fibrilles de type amyloïde, suggérant qu'elles, et potentiellement d'autres AMP humaines, peuvent également être classées comme amyloïdes fonctionnels (Sood et al., 2008; Jang et al., 2011).

Il a également été proposé que des fibrilles amyloïdes fonctionnelles participent à la reproduction sexuée (Hewetson et al., 2017). Ces fibrilles sont présentes dans l'acrosome du sperme, un organite acide dans la tête des spermatozoïdes (Guyonnet et al., 2014). Ces fibrilles faciliteraient la libération contrôlée de protéines lors de la réaction acrosomique, un événement clé dans la fécondation des ovocytes au cours duquel le contenu de l'acrosome est libéré (Berruti and Paiardi, 2011; Guyonnet et al., 2014; Hewetson et al., 2017). Les amyloïdes formés par les protéines CRES2, CRES3 et cystatine E2 appartenant au sous-groupe des « cystatin-related epididymal spermatogenic » (CRES), sont présents dans l'épididyme (Whelly et al., 2012, 2016). Bien que le rôle des amyloïdes formés par ces protéines CRES ne soit pas bien compris, les CRES ont une activité antimicrobienne, sont importantes pour la réaction acrosomique et sont nécessaires pour la fonction lysosomale normale dans l'épididyme (Chau and Cornwall, 2011; Parent et al., 2011; Whelly et al., 2012). Le liquide séminal contient également des amyloïdes et des fibrilles de type amyloïde, formés respectivement par des fragments peptidiques d'enzyme phosphatase acide prostatique (PAP) et des protéines de séménogéline (SEM1 et SEM2) (Münch et al., 2007; Roan et al., 2011). Identifiées à l'origine comme des amplificateurs de l'infection virale, ces fibrilles se lient aux spermatozoïdes endommagés et les immobilisent ce qui permet leur élimination par les cellules immunitaires (Roan et al., 2017).


Figure 68. La formation d'amyloïdes est requise pour l'activation de la voie Imd de la drosophile lors de la reconnaissance des peptidoglycanes bactériens.

Dans la réponse immunitaire de la drosophile, le peptidoglycane de type acide diaminopimélique dérivé de bactéries se lie aux récepteurs PGRP-LC et PGRP-LE, ce qui, par interaction avec la protéine adaptatrice Imd, conduit à l'activation de l'homologue de NF-kB Relish et à l'expression forte du gène du peptide antimicrobien. PGRP-LC, PGRP-LE et Imd contiennent chacune un motif avec une certaine ressemblance avec le motif d'interaction homotypique RIP (RHIM), un domaine trouvé dans les protéines RIPK de mammifères formant des amyloïdes fonctionnels au cours de la nécroptose. Dans cet article, les auteurs trouvent que malgré la divergence de séquences, ces RHIM cryptiques de Drosophile forment des fibrilles amyloïdes *in vitro* et dans les cellules. La formation d'amyloïdes est nécessaire pour la signalisation en aval d'Imd et, contrairement aux RHIM de mammifères, n'est pas associée à la mort cellulaire. De plus, la formation d'amyloïdes constitue une étape régulable et pourrait être inhibée par Pirk, un régulateur à rétroaction endogène de cette voie. Ainsi, divers motifs de séquence sont capables de former des plates-formes de signalisation amyloïdes, et la formation de ces plates-formes peut présenter un point de régulation dans de multiples processus biologiques. (d'après (Kleino et al., 2017))

RHIM	MCMV M45	36 - AAGGAFGVGGGHSVPYVRIUNGVSGIQIGNHNAMSIASCWSPSYTDRRRRSY - 87
	hsDAI	181 - YQHNPINMICQNGPNSWISIANSEAIQICHGNIITRQTVSREDGSAGPRHLP - 232
	hsRIPK1	514 - TPTMPFSSLPPTDESIKYTI YNSTGIQICAYNYMEIGGTSSSLLDSTNTNFK - 565
	hsRIPK3	433 - NWSCRTPEPNPVTGRPLVNIYNCSGVQVGDNNYLTMQQTTALPTWGLAPSGK - 484
	hsTRIF	661 - AFPTASPAPPQSPGLQPLIITHHAQMVQLGLNNHMWNQRGSQAPEDKTQEAE - 712
cRHIM	F PGRP-LC	191 - VATPTSPAGGATQGIGSIALTNSTDVTFGDKHFYEGPVTIQQFLIDNRDKWK - 242
	PGRP-LE	77 - TIRDLMNSINSIQTLGNVNISNSTNVHIGNVTNINGNIQIIADGLTQNRRDR - 128
	Imd	93 - VQTNNTMNVHSAQQQVVMNFSNANNLHFCSVYNFNQNLSACSSRKGSTSTAE - 144
	PGRP-LAD	45 - PLPQNIFTNPAIQPSSVININHSTDVVIGPMTQYQGPVSIYYMDYMEAHAMQ - 96
	Pirk	155 - KNAKPTPTDAGOGKSGG E DSNLT RHGAGNIVIKNAINVSI 197

Figure 69. Fonction conservée des motifs cryptiques RHIM dans la voie Imd de la drosophile.

Protéines cRHIM de *D. melanogaster* alignées avec des séquences RHIM humaines et de cytomégalovirus murin, MCMV (M45). Les quatre acides aminés du noyau sont encadrés de rouge. Le résidu Q amyloïdogène qui est hautement conservé dans les séquences de mammifères mais absent dans les séquences cRHIM de la drosophile est montré en jaune. L'ombrage représente la conservation selon la matrice de notation Blosum 62. (d'après (Kleino et al., 2017))

4.6.3 Chez la drosophile

Récemment, A. Kleino et ses collaborateurs ont décrit la formation d'amyloïdes fonctionnels chez la drosophile (Figures 68 à 70) pour initier la signalisation NF-κB par l'interaction des protéines de reconnaissance des peptidoglycanes (PGRP-LC et PGRP-LE) et de la protéine adaptatrice Imd (Kleino et al., 2017). Ces protéines contiennent un motif qui ressemble aux RHIM des mammifères. Cependant, contrairement aux RHIM des mammifères, la signalisation en aval de Imd chez la drosophile n'est pas liée à la mort cellulaire mais à l'activation de l'homologue de NF-κB et à la promotion d'une forte expression de gènes antimicrobiens. Néanmoins, les RHIM de la drosophile ont pu former des fibrilles amyloïdes in vitro et dans les cellules, et la formation d'amyloïdes s'est révélée être essentielle pour la voie de signalisation Imd. En outre, le régulateur négatif de la voie Imd, Pirk, s'est avéré inhiber la signalisation Imd, suggérant un mécanisme probable pour limiter les effets cytotoxiques. Auparavant, par délétion et mutagenèse dirigée, T. Kaneko et ses collaborateurs avaient identifié un motif de séquence conservé dans les longs domaines de signalisation N-terminaux de PGRP-LC et PGRP-LE qui est nécessaire pour déclencher la signalisation Imd (Kaneko et al., 2006). Le cœur à 4 résidus de séquence VxxG était apparu comme partageant des similarités avec les motifs RHIM, qui ont été décrits comme des motifs courts IQIG ou VQVG médiant l'interaction entre les protéines RIPK1 et RIPK3 (Sun et al., 2002), et est donc désigné ici comme RHIM cryptique (cRHIM). Les cRHIM sont également présents dans d'autres protéines impliquées dans la voie de signalisation de la drosophile Imd, notamment PGRP-LA, Imd et Pirk (Kaneko et al., 2006; Gendrin et al., 2013; Kajava et al., 2015). Cependant, les cRHIM sont distincts des RHIM des mammifères; seul le résidu Gly en position 4 est absolument conservé, et le GIn amyloïdogénique des RHIM est absent dans les cRHIM. Par conséquent, bien que des domaines cRHIM intacts soient requis pour la signalisation Imd (Kaneko et al., 2006), les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette exigence ne sont pas clairs.

4.6.4 Chez les virus

Les herpès virus appartiennent à une famille de grands virus à ADN double brin et sont capables d'établir une latence à vie au sein de leurs hôtes naturels. Les herpès virus sont efficaces pour surmonter les défenses cellulaires de l'hôte afin d'assurer leur survie continue. Un certain nombre d'herpès virus, dont le virus de l'herpès simplex (HSV) et le cytomégalovirus murin (MCMV), ont démontré leur capacité à inhiber l'activation de la nécroptose des cellules hôtes. Cette activité dépend de l'expression de protéines virales contenant le motif RHIM qui interagissent avec les protéines humaines contenant le motif RHIM et empêchent la phosphorylation du MLKL (Baker et al., 2018).

L'équipe de E.S. Mocarski a décrit pour la première fois que M45 (Figure 71) (protéine de



Figure 70.Illustration schématique de la composition des domaines PGRP-LCx, PGRPLE et Imd. Abréviations : TM, transmembrane domain; PGRP, PGRP domain; DD, death domain. (d'après (Kleino et al., 2017))



Figure 71. Le RHIM de M45 (MCMV) est amyloïdogène, et les régions 1–90 et 1–277 de M45 confèrent une protection contre la nécroptose induite par le TNF dans les cellules humaines.

(A) Alignement de séquences des RHIM de M45, RIPK1, RIPK3 et ZBP1 humains et murins. (B) Représentation schématique des protéines M45, RIPK1, RIPK3 et ZBP1. Les régions grises indiquent les fragments englobant RHIM utilisés dans cette étude. La barre noire représente le RHIM de 19 résidus. RNR-like : inactive ribonucleotide reductase domain; DD : death domain; Z : double-stranded RNA-specific adenosine deaminase (DRADA) repeat (d'après (Pham et al., 2019))

MCMV) utilise les interactions RHIM:RHIM pour subvertir la voie de la nécroptose dépendante de RIPK1 (Upton et al., 2010). Ils ont démontré que M45 entier et une version tronquée de celle-ci (composée des acides aminés 1-277 et contenant la séquence RHIM mais pas le domaine ribonucléotide réductase inactif) co-immunoprécipitaient avec le RIPK1 humain et le RIPK3 de souris après co-transfection dans des cellules 293T. Cependant, lorsque la tétrade IQIG de base de la séquence RHIM dans M45 a été mutée en AAAA, le mutant M45 ne s'est plus lié aux protéines cellulaires partenaires contenant un RHIM. La mutation AAAA au sein de M45 a empêché l'inhibition de la nécroptose induite par le TNF dans les cellules endothéliales murines. Il s'agit spécifiquement d'un système dépendant de RIPK1, et implique donc M45 comme inhibiteur viral de l'activation de RIPK1, et montre que la tétrade centrale est cruciale à cet effet. Suite à ce travail, le virus mutant MCMV avec la mutation AAAA dans la tétrade du noyau M45 a été construit. L'infection par ce virus mutant RHIM seul a conduit à l'induction d'une nécroptose sans addition de TNF, et celle-ci n'a pas pu être bloquée par l'inhibiteur de RIPK1, la nécrostatine-1. Cela suggère donc qu'il existe une autre voie qui conduit à l'activation nécroptotique lors d'une infection virale par ce mutant (Upton et al., 2010).

Dans une étude ultérieure, le même groupe a montré que les interactions ZBP1-RIPK3 sont cruciales pour le contrôle de l'infection par le MCMV (Upton et al., 2012). Dans les cultures de cellules murines infectées par le virus M45mutRHIM, la co-immunoprécipitation révèle une interaction entre RIPK3 et ZBP1. Cette association n'était pas évidente lors de l'utilisation du virus de type sauvage. Ceci a deux implications majeures - premièrement, que pendant l'infection par MCMV il y a une interaction entre ZBP1 et RIPK3, qui induit une nécroptose et deuxièmement, que la protéine M45 de type sauvage empêche cette interaction et bloque ainsi la nécroptose. M45 de type sauvage, mais pas M45 avec la mutation AAAA, est également capable de bloquer la nécroptose induite par TLR3 et TLR4 dans les macrophages dérivés de la moelle osseuse infectés par le MCMV de type sauvage ou mutant. Le type sauvage M45 fonctionne également pour inhiber la nécroptose dans les fibroblastes humains exprimant RIPK3 humain et infectés par MCMV. Ainsi, M45 semble être un puissant inhibiteur de la signalisation RHIM et est capable de bloquer les trois voies principales menant à l'assemblage du nécrosome et à la nécroptose.

4.6.5 Chez les procaryotes

Les amyloïdes fonctionnels sont répandus dans les bactéries, et remplissent diverses fonctions en tant que composants structurels dans les biofilms ou les couches de spores, en tant que toxines et fibres tensioactives, en tant que matériel épigénétique, réservoirs de peptides ou adhésines médiant la liaison et l'internalisation dans les cellules hôtes (Van Gerven et al., 2018) **(Figure 72)**.



Figure 72. Rôles des amyloïdes bactériens dans la pathogénèse et la virulence. (d'après (Van Gerven et al., 2018))



Figure 73. Microscopie électronique à balayage d'un biofilm bactérien.

Les fibres amyloïdes Curli sont une des composantes principales de la matrice extracellulaire des biofilms bactériens. (d'après (Uhlich et al., 2006))

Introduction

Chez les bactéries, des amyloïdes d'origines différentes ont été trouvés dans les principaux phylums tels que les Protéobactéries, les Actinobactéries et les Firmicutes, et plusieurs autres n'ont probablement pas encore été découverts. Le premier amyloïde fonctionnel bactérien le mieux décrit est curli, découvert chez S. typhimurium et décrit à partir d'une mammite (une infection) de vache à E. coli. Plusieurs amyloïdes bactériens plus distincts ont depuis été décrits, souvent découverts dans le contexte d'agents pathogènes humains et animaux tels que les gammaprotéobactéries pathogènes (Escherichia, Shigella, Salmonella, etc.), Pseudomonads, Mycobacterium, Streptococcus, Staphylococcus et Bacillus (Olsén et al., 1989; Collinson et al., 1991; Alteri et al., 2007; Dueholm et al., 2010; Romero et al., 2010; Schwartz et al., 2012; Taglialegna et al., 2016). Il convient de noter cependant que le taux de découverte de nouveaux amyloïdes fonctionnels bactériens dans les genres pathogènes par rapport aux genres environnementaux est probablement biaisé par les efforts de recherche sur les premiers. Par exemple, l'analyse phylogénétique de curli a montré que cet amyloïde bactérien est largement répandu dans les protéobactéries et les bactériodètes de l'environnement (Dueholm et al., 2012). D'autres, notamment le curli-like pili (MTP) de M. tuberculosis, sont plus restreints aux espèces et souches pathogènes (Alteri et al., 2007). Dans tous les cas, la présence d'amyloïdes fonctionnels dans les bactéries pathogènes et le potentiel du repliement amyloïde ou les processus infligeant des lésions cellulaires et tissulaires posent la question de leur contribution éventuelle à la virulence bactérienne et aux maladies infectieuses. Les amyloïdes bactériens connus se trouvent principalement dans le contexte de la formation de biofilms bactériens, et pour la plupart, la contribution à la pathogénèse semble indirecte. Néanmoins, la présence d'amyloïdes bactériens peut être avantageuse pour la colonisation, la persistance et la propagation des agents pathogènes, et à ce titre peut représenter un facteur de virulence. Tout aussi importantes sont les observations selon lesquelles la présence d'amyloïdes bactériens peut déclencher des réponses de l'hôte fortes et à plus long terme pourraient déclencher des troubles de l'agrégation des protéines qui conduiraient à des lésions tissulaires et à une maladie secondaire à l'infection bactérienne.

L'occurrence la plus fréquente d'amyloïdes fonctionnels bactériens se situe dans le contexte du comportement communautaire et de la formation de biofilms **(Figure 73)**. Les biofilms sont des communautés microbiennes d'une ou de plusieurs espèces maintenues ensemble par une matrice extracellulaire (ECM) produite par le micro-organisme inclus dans ce biofilm. Les bactéries à l'intérieur de ces communautés multicellulaires auto-assemblées et bien organisées présentent des caractéristiques très différentes de leurs homologues planctoniques, et peuvent présenter une différenciation physiologique souvent contrôlée par l'excrétion de molécules de signal quorum-sensing (Shanmugam et al., 2019). Elles présentent une résistance remarquablement accrue aux antibiotiques et autres stress environnementaux et sont capables de survivre et d'échapper à l'immunité de l'hôte

Introduction

grâce à la protection physique offerte par un biofilm (Costerton et al., 1999). Ce biofilm ECM est constitué d'exopolysaccharides, d'ADN extracellulaire, de protéines et de lipides (Flemming and Wingender, 2010). Les protéines de l'ECM comprennent des enzymes, qui agissent comme le système digestif des biofilms, ainsi que des protéines structurelles (Flemming and Wingender, 2010). Parmi les protéines de structure figurent les amyloïdes fonctionnels, qui peuvent constituer l'essentiel de la matrice (McCrate et al., 2013; Serra et al., 2013). Une coloration amyloïde a été observée dans de nombreux biofilms naturels et la production d'amyloïdes fonctionnels extracellulaires a été démontrée dans des isolats environnementaux au sein des phyla Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobactéries et Gammaproteobactéries (Larsen et al., 2007, 2008). Les fonctions proposées pour les amyloïdes associés à l'ECM comprennent l'adhérence aux substrats biologiques et non biologiques et la fourniture d'une robustesse mécanique au biofilm. Les amyloïdes associés au biofilm sont le plus souvent représentés comme des échafaudages structurels (Romero et al., 2010; Schwartz et al., 2012; Serra et al., 2013; Taglialegna et al., 2016), et l'expression différentielle peut guider la structuration spatiale du biofilm (Serra et al., 2013). D'autres rôles incluent une fonction protectrice contre les attaques de phages par piégeage des particules de phages (Collinson et al., 1997). Ces biofilms ou « villes microbiennes » sont le mode de vie microbien dominant dans de nombreux environnements naturels, médicaux et industriels. En plus de constituer une niche écologique unique, les biofilms offrent une protection aux bactéries contre leur environnement, offrant une résistance accrue aux antimicrobiens, contre les organismes brouteurs, et face aux rayons UV, à la dessiccation, au stress mécanique et à diverses défenses de l'hôte. En milieu clinique, les biofilms augmentent l'échec du traitement et représentent jusqu'à 60% des infections nosocomiales. La liste des maladies infectieuses associées au biofilm est longue et comprend les infections chroniques de l'oreille, des voies urinaires et des plaies (fibrose kystique) (Davey and O'toole, 2000; Hall-Stoodley and Stoodley, 2009). Un ensemble diversifié d'amyloïdes fonctionnels a été démontré ou proposé comme étant associé aux biofilms bactériens, incluant curli (Protéobactéries et Bacteroidetes), Fap (Pseudomonas), TasA (Bacillus), Bap et PSM (Staphylococcus), MTP (M. tuberculosis) et Streptococcus mutans P1.

Alors que certains virus ont développé des protéines contenant des RHIM pour interférer avec les défenses de l'hôte basées sur RHIM (Baker et al., 2018), certaines bactéries pathogènes ont une stratégie anti-RHIM alternative (Pearson et al., 2017). Lorsque des *E. coli* entéropathogènes (EPEC) se fixent aux entérocytes tapissant l'intestin, elles transfèrent rapidement des protéines effectrices dans la cellule hôte par des systèmes de sécrétion de type III. Une cystéine protéase connue sous le nom d'EspL est incluse dans la suite de protéines effectrices transférées par EPEC. Cette protéase clive les protéines hôtes contenant un motif RHIM (RIPK1, RIPK3, TRIF et ZBP1) rendant la cellule incapable de générer une réponse nécroptotique pour limiter l'infection (Pearson et al., 2017). La protéase n'est

Introduction

contre les formes monomèriques des protéines RHIM et ne peut pas cliver les structures à base d'amyloïde formées par les protéines contenant le RHIM. L'importance du RHIM comme motif d'interaction protéine/protéine est mise en évidence par le développement de ces différentes stratégies microbiennes pour surmonter la mort des cellules hôtes par la voie de la nécroptose.

5 Travail de thèse

Comme il a été dit dans les paragraphes et chapitres précédents, ces dernières années ont été mis en évidence chez les champignons de nouvelles fonctions biologiques pour les amyloïdes infectieux dans la transduction du signal dans des cascades de PCD et de défense de l'hôte impliquant des récepteurs de type NLR (Daskalov et al., 2012). Le modèle servant de paradigme à ce type de voie de transduction du signal, est le système HET-S/NWD2 de P. anserina (Seuring et al., 2012; Daskalov et al., 2015). Récemment, un autre module analogue impliquant également un récepteur NLR et une protéine effectrice désignée HELLP induisant la mort cellulaire a récemment été mis en évidence chez le champignon C. globosum. Comme nous l'avons vu, ce système présente deux niveaux d'homologie remarquable avec la voie de mort cellulaire nécroptotique récemment mise en évidence chez les mammifères (Li et al., 2013; Murphy et al., 2013). D'une part le domaine effecteur de mort cellulaire de HELLP, HELL, présente une homologie avec le domaine 4HB de la protéine MLKL, et d'autre part le motif PP est semblable au motif amyloïde RHIM qui sert à l'assemblage des kinases régulatrices RIPK1 et RIPK3 qui contrôlent l'activation par phosphorylation de MLKL. L'étude de tel système offre ainsi une opportunité d'examiner les trajectoires évolutives des mécanismes de PCD (ayant comme principe la signalisation amyloïde) des champignons aux mammifères. Au cours de la caractérisation de HELLPCg, l'équipe a découvert son homologue chez P. anserina qui avait en fait été mal annoté.

C'est pourquoi mon projet de thèse a porté en premier lieu sur la caractérisation de l'homologue de la protéine HELLP chez *P. anserina*. Il s'agissait par ce travail de pouvoir étudier ce système dans cet organisme modèle, afin d'approfondir nos connaissances sur la signalisation amyloïde chez les champignons filamenteux. Nous nous sommes également intéressés à la ressemblance entre les motifs PP et RHIM. Ce travail a fait l'objet d'un article (article 1).

Dans la deuxième partie de ma thèse, j'ai participé à une étude sur la caractérisation chez *Podospora* d'autres motifs amyloïdes découverts dans des bactéries filamenteuses au cours d'une analyse bioinformatique visant à chercher d'autres systèmes de signalisation amyloïde de type RHIM dans le règne du vivant, l'ensemble de ce travail a fait l'objet d'un article (article 2).

Introduction

Résultats

RESULTATS

1 ARTICLE 1: « Partial prion cross-seeding between fungal and mammalian amyloid signaling motifs »

Un cluster de deux gènes portant un motif de type PP a été identifié chez P. anserina dans une configuration génique assez similaire au système de signalisation amyloïde induisant la mort identifié chez C. globosum (Daskalov et al., 2016). En effet, on retrouve un gène codant une NLR, PNT1, présentant le motif amyloïde PP en N-terminal adjacent à un gène codant une protéine, HELLP, présentant un motif PP en C-terminal et un domaine effecteur HELL. La protéine lipase SBP présente chez C. globosum n'est pas retrouvée chez Podospora. La configuration génique et la structure de ces protéines pouvaient laisser penser qu'elles constituent un nouveau système de signalisation amyloïde chez P. anserina. Or, comme nous l'avons vu précédemment, P. anserina possède deux autres systèmes parallèles de signalisation amyloïde induisant la mort, HET-S/NWD2 et HELLF/FNT1; ainsi la caractérisation du tandem HELLP/PNT1 pouvait permettre non seulement d'étudier un système basé sur le motif PP dans son contexte natif, mais offrait également pour la première fois l'opportunité d'étudier d'un point de vue fonctionnel la co-occurrence de plusieurs voies de signalisation amyloïde dans un même organisme. C'est pourquoi nous avons entrepris l'étude de ce système. Ce travail est relaté dans l'article qui suit, où nous montrons que la région du motif PP de HELLP forme un prion chez *P. anserina*, que nous appelons $[\pi]$, et que le prion $[\pi]$ est capable de déclencher l'activité d'induction de la mort cellulaire de la protéine entière HELLP. De même, le motif PP du NLR PNT1 forme un prion qui peut transconformer HELLP, déclenchant la mort de la cellule, et les motifs PP de PNT1 et HELLP peuvent s'amorcer réciproquement (cross-seeding). D'autre part, nous n'avons détecté aucune interaction croisée entre les motifs amyloïdes HRAM de Podospora et ces motifs PP, nous avons montré que les trois systèmes de signalisation amyloïde présents chez *P. anserina* sont indépendants.

Les homologies du motif PP avec le motif RHIM de la voie de la nécroptose humaine avaient été constatées sur la base de leurs séquences (Li et al., 2012; Daskalov et al., 2015b, 2016). Le motif PP ressemble également aux motifs de type RHIM-like intervenant dans des processus d'immunité innée chez la drosophile (Kleino et al., 2017). Afin d'étudier si l'homologie sur cette courte séquence reflète une similarité structurale entre ces motifs, nous avons décidé d'étudier les motifs RHIM des protéines RIP1K et RIP3K humaines dans *Podospora*. Ce travail est également relaté dans l'article qui suit. Nous avons montré que ces motifs RHIM sont capables de former des prions chez *Podospora* qui s'amorcent réciproquement. Enfin, les prions [π] et [Rhim] peuvent interagir partiellement et s'amorcer réciproquement chez *Podospora*, révélant ainsi une similitude fonctionnelle entre ces motifs amyloïdes fongiques et mammifères.

Ma contribution dans ce projet a été tout d'abord de déterminer le caractère prion des motifs amyloïdes PP de PNT1 et HELLP, à l'aide de protéines de fusions entre ces motifs et la GFP ou la RFP (suivi de la formation et de la propagation des prions en microscopie à fluorescence), puis de démontrer que ces prions appelés $[\pi]$ interagissent *in vivo* (co-localisation lors de co-expressions, induction des prions entre eux). En reconstituant un système d'incompatibilité artificiel (confrontation de souches exprimant [π] et de souches exprimant HELLP), j'ai pu démontrer que la protéine HELLP a une activité de mort cellulaire provoquée par une transconformation amyloïde de son domaine PP. J'ai également démontré que le motif PP de Podospora pouvait amorcer la conversion du motif PP de C. globosum, et donc passer la « barrière de cross seeding ». J'ai ensuite co-exprimé les différents prions [Het-s], $[\pi]$ et $[\phi]$ chez *Podospora* afin de tester les interactions croisées entre ces systèmes. Dans un deuxième temps, j'ai étudié le motif RHIM de la kinase humaine RIP3K (je n'ai pas réalisé les expériences portant sur RIP1K). J'ai déterminé in vivo chez Podospora que la région RHIM de cette protéine se comporte comme un prion (suivi de la formation et de la propagation des protéines de fusion par microscopie) et qu'elle est capable d'induire partiellement le prion [π] (co-localisation lors des co-expressions). J'ai également démontré que [RHIM] peut induire l'activité toxique de HELLP in vivo chez Podospora lors de la co-expression de [RHIM] et HELLP dans une même souche, créant ainsi une auto-incompatibilité.

Cet article est actuellement en cours d'examen (Under review) dans le journal mBio.

Partial prion cross-seeding between fungal and mammalian amyloid signaling motifs

Thierry Bardin¹, Asen Daskalov¹, Sophie Barrouilhet^{1*}, Alexandra Granger-Farbos¹, Bénédicte Salin¹, Corinne Blancard¹, Brice Kauffmann², Sven J. Saupe^{1#} and Virginie Coustou^{1#}

¹ Non-Self Recognition in Fungi, Institut de Biochimie et de Génétique Cellulaire (CNRS UMR 5095, Université de Bordeaux), 33077 Bordeaux, France.

² IECB, UMS 3033, US 001, CNRS, Université de Bordeaux, 2 rue Robert Escarpit, 33607, Pessac, France
 * Current Address: Universite de Pau et des Pays de l'Adour, E2S UPPA, CNRS, IPREM UMR 5254, Hélioparc, 64053 Pau, France
 *Corresponding authors

E-mail: virginie.coustou@ibgc.cnrs.fr (VC); sven.saupe@ibgc.cnrs.fr (SJS)

Running title: Amyloid signaling pathways in P. anserina

Key words: amyloid; prion; programmed cell death; RHIM; RIP1, RIP3

Abstract

In filamentous fungi, NLR-based signalosomes activate downstream membrane-targeting cell-death inducing proteins by a mechanism of amyloid templating. In the species Podospora anserina, two such signalosomes, NWD2/HET-S and FNT1/HELLF have been described. An analogous system, involving a distinct amyloid signaling motif termed PP was also identified in the genome of the species Chaetomium globosum and studied using heterologous expression in Podospora anserina. The PPmotif bears resemblance to the RHIM and RHIM-like motifs controlling necroptosis in mammals and innate immunity in flies. We identify here a third NLR signalosome in Podospora anserina comprising a PP-motif and organized as a two-gene cluster encoding a NLR and a HELL-domain cell-death execution protein termed HELLP. We show that the PP-motif region of HELLP forms a prion we term $[\pi]$ and that $[\pi]$ prions trigger the cell-death inducing activity of full length HELLP. We detect no prion cross-seeding between HET-S, HELLF and HELLP amyloid motifs. In addition, we find that akin to PPmotifs, RHIM motifs from human RIP1 and RIP3 kinases are able to form prions in Podospora and that $[\pi]$ and [Rhim] prions partially cross-seed. Our study shows that *Podospora anserina* displays three independent cell-death inducing amyloid signalosomes. Based on the described functional similarity between RHIM and PP, it appears likely that these amyloid motifs constitute evolutionary related celldeath signaling modules.

Importance

Amyloids are β-sheet-rich protein polymers that can be pathological or display a variety of biological roles. In filamentous fungi, specific immune receptors activate programmed cell-death execution proteins through a process of amyloid templating akin to prion propagation. Among these fungal amyloid signaling sequences, the PP-motif stands out because it shows similarity to RHIM, an amyloid sequence controlling necroptotic cell-death in mammals. We characterized an amyloid signaling system comprising a PP-motif in the model species *Podospora anserina* thus bringing to three the number of independent amyloid signaling cell death pathways described in that species. We then show that human RHIM motifs not only propagate as prions in *P. anserina* but also partially cross-seed with fungal PP-prions. These results indicate that in addition to show sequence similarity, the PP and RHIM-motifs are at least partially functionally related, supporting a model of long-term evolutionary conservation of amyloid signaling mechanisms from fungi to mammals.

Introduction

Prions are protein polymers that behave as infectious entities by propagating their amyloid structural state (1, 2). In addition to disease causing prions in mammals, prions have been identified in fungi as infectious, cytoplasmic, non-Mendelian genetic elements (3). One such prion is [Het-s] of the filamentous fungus Podospora anserina. [Het-s] functions in a non-self recognition process known as heterokaryon incompatibility. The het-s gene exists as two incompatible allelic variants termed het-s and *het-S* (Fig. 1A). The HET-s protein when assembled into the self-propagating prion form [Het-s] confers incompatibility to the HET-S protein variant. Co-expression of the [Het-s] prion with HET-S leads to cell death. At the macroscopic level, the incompatibility reaction leads to the formation of an abnormal contact line between the strains termed "barrage". The soluble non-prion form confers a phenotype termed [Het-s*] compatible with HET-S (4, 5). [Het-s*] strains acquire the prion state either spontaneously at a low frequency or systematically after fusion with a prion infected strain. HET-s and HET-S are highly homologous variants of the same protein displaying two domains, a C-terminal Prion-Forming Domain (PFD) necessary and sufficient for prion propagation and a N-terminal α -helical globular domain named HeLo responsible for cell-death inducing activity (6, 7). The HET-s PFD is natively unfolded in the soluble state and upon prion formation assembles into a specific cross- β amyloid structure (6, 8–10). The HET-s β -solenoid fold is composed of 2 rungs of β -strands per monomer, comprising two 21 amino acid long imperfect repeats (R1 and R2) connected by a flexible loop (9, 11). In [Het-s]/HET-S incompatibility cell death is triggered when the [Het-s] PFD templates conversion of the HET-S PFD region into the β -solenoid fold which in turn induces refolding of the HET-S HeLo domain that acquires pore-forming activity by exposing an N-terminal transmembrane helix targeting the cell membrane (7, 12). In this incompatibility system, HET-S acts as cell-death execution protein and [Het-s] triggers its activation. While displaying a functional PFD, HET-S in contrast to HETs cannot form a prion propagating in vivo because activation of its HeLo-domain leads to toxicity. In HET-s in turn, cell-death inducing activity of the HeLo domain is compromised by a point mutation in the transmembrane helix region. In other words, HET-s can form a prion because its HeLo-domain is inactivated (6, 7, 13).

Further work on the [Het-s] system revealed that this incompatibility system is evolutionary derived from a regulated cell death (RCD) pathway in which HET-S is activated by a specific NLR (Nod-like receptor) (14). NLR receptors are intracellular receptors that control immune defense and RCD pathways in animals, plants and fungi and function by ligand induced oligomerization (15, 16). The NWD2 NLR receptor is encoded by the gene immediately adjacent to *het-S* in the *P. anserina* genome and displays a central NACHT nucleotide binding and oligomerization domain and a C-terminal WD-repeat domain. The N-terminal region of NWD2 displays a short region of homology to the R1 and R2 motifs of HET-s. This region designated R0 is able to adopt a *het-s*-like fold. Ligand induced oligomerization of the β -

solenoid fold which then templates conversion of the homologous domain in HET-S and activation of the HeLo domain (14, 17, 18). More generally, it is proposed that a fraction of the NLR receptors in fungi activate their cognate effector domains by a mechanism of amyloid templating by which the amyloid fold formed after oligomerization of the NLR receptor is transmitted through heterotypic interactions to the amyloid motif found in the C-terminal region of the effector protein (19). The nwd2/het-S gene pair was used as a paradigm in bioinformatic screens to identify additional NLR/effector pairs functioning through amyloid templating in fungi (17, 20). These approaches resulted in particular in the identification of five *het-s*-related amyloid motifs families (HRAMs) and in the characterization in Podospora anserina of a distant homolog of HET-S termed HELLF and belonging the HRAM5 family (21). HELLF encodes a protein with a HeLo-like N-terminal domain and a C-terminal PFD with two repeated submotifs that share only 17% identity with the HET-s PFD. The HeLo-like domain shows distant homology to the HET-S HeLo domain but also to the 4HB pore-forming domain of the MLKL protein (22), the terminal effector protein of necroptotic death in mammals, which led to the proposition that this form of fungal RCD is related to mammalian necroptosis (23). The gene adjacent to hellf encodes a NLR with a NB-ARC domain and TPR repeats termed FNT1 (Fig. 1B), which bears an N-terminal R0 region homologous to the HELLF R1 and R2 PFD repeats. HELLF behaves analogously to HET-S in every aspect that was analyzed. The C-terminal region of HELLF forms a prion termed [Φ] and $[\Phi]$ is incompatible with full-length HELLF. Upon interaction with $[\Phi]$, HELLF relocates to the cell membrane region and causes cell death. The N-terminal region of FNT1 forms fibrils and is able to induce $[\Phi]$ prion formation. The FNT1/HELLF system constitutes a second cell death-inducing amyloid signaling pathway in Podospora anserina. Solid-state NMR revealed that HET-s and HELLF PFD amyloids have almost identical backbone structure in spite of extensive sequence divergence. Noteworthy is the fact that in spite of their almost identical backbone structure [Het-s] and $[\Phi]$ prions do not cross-seed thus indicating that NWD2/HET-S and FNT1/HELLF constitute two parallel signaling pathways.

In bioinformatics surveys, additional amyloid signaling motifs were identified in other fungi (15, 17). In particular, an amyloid motif termed PP was identified in the genome of *Chaetomium globosum* in a three-gene cluster (Fig. 1B). These genes were then functionally studied using heterologous expression in *Podospora anserina*. The NLR termed PNT1 regulates activation of two distinct effector proteins, a HeLo-like domain cell-death inducing protein termed HELLP and a putative lipase, SBP (renamed herein CgHELLP, CgPNT1 and CgSBP for clarity). The PP-motif is related in sequence to the RHIM amyloid motif that controls assembly of the RIP1 and RIP3 kinases in the necroptosis pathway in mammals (14, 23, 24). RHIM-like amyloid motifs also occurs in the PGRP-LC, PGRP-LE, and Imd proteins controlling anti- bacterial immunity in Drosophila (25). The structure of the mammalian RIP1-RIP3 core (forming an hetero-amyloid signaling complex) has recently been established (26). RHIM amyloids comprise two protein units per cross- β layer that run antiparallel and are interdigitated in a compact hydrophobic interface formed by the core G-(I,V)-Q-(I,V)-G motif. This central core motif is common to the PP-motif (Fig. 1C) but in the absence of structural characterization of PP-amyloids, it cannot at

present be ascertained that this short sequence homology reflects structural similarity between RHIM and PP-amyloids.

Herein, we mine the genome of *P. anserina* and identify HELLP, a novel PP-motif protein that defines, in that species, a third cell-death inducing amyloid signaling pathway comprising the HELLP cell-death execution protein and a NLR (PNT1) (Fig. 1B). We show that the C-terminal PP-motif of HELLP (HELLP(214-271)) forms a prion termed [π] in *Podospora anserina* and assembles into fibrils *in vitro*. We find that akin to HET-S and HELLF, cell-death inducing activity of HELLP is activated by [π] prions formed by HELLP(214-271) or by the N-terminal region of PNT1, PNT1(1-31). We analyze in *Podospora anserina* the functional interactions of the HET-s, HELLF and HELLP PFD prions and find that these amyloid motifs control three independent signaling systems. We further analyze prion formation by human RHIM motifs from RIP1 and RIP3 kinases and find that [Rhim] and [π] prions partially cross-seed underlying the functional similarity between these mammalian and fungal amyloid motifs.

Results

A PP-motif gene cluster in Podospora anserina

During the course of a survey of NLR encoding genes in fungi, we identified in *Podospora anserina*, a gene encoding a NLR with a NB-ARC domain and TPR repeats (*Pa_5_8060*, PNT1), (15). We found after manual re-annotation, that the adjacent gene (*Pa_5_8070*) encodes a HeLo-like domain protein we termed HELLP (Fig. 1B). HELLP shows 56 % similarity to the CgHELLP cell-death execution protein of *Chaetomium globosum* (Fig. 1C and Fig. S1) (23). As previously reported for CgHELLP and HELLF, the HeLo-like domain of HELLP shows homology to the 4HB membrane-targeting domain of the mammalian MLKL necroptosis execution protein (Fig. S1). The N-terminal region of PNT1 and the C-terminal region of HELLP share a region of homology encompassing a predicted PP-amyloid motif (Fig. 1C) (23). This region is also homologous to the RHIM motif found in the RIP1 and RIP3 kinases in humans (24, 26). Based on the resemblance with the PP gene-cluster of *C. globosum*, we reasoned that after *nwd2/het-s* and *fnt1/hellf*, the *pnt1/hellp* gene pair might encode the components of a third amyloid NLR signalosome in Podospora (Fig. 1B). We thus engaged into the functional characterization of this gene pair.

The C-terminal region of HELLP is a prion-forming domain

In order to analyze whether the C-terminal region of HELLP displays the anticipated prion forming ability, we generated different constructs with the C-terminal domain of HELLP (214-271) fused either to GFP or RFP (in a C-terminal position) or to GFP in an N-terminal position. These constructs were expressed in a Δ hellp strain of *P. anserina*. For the different constructs, a population of 25 to 47 distinct transformants was analyzed by fluorescence microscopy. We observed either dot-like or diffuse fluorescence (Fig. 2A). The fraction of transformants exhibiting dot-like fluorescence was found to increase with growth duration (Table 1). The highest rate of foci formation was observed for the fusion protein bearing the GFP in N-terminal position. Within 19 days, all tested GFP-HELLP(214-271) transformants displayed fluorescent foci. For all three fusion constructs, strains with diffuse fluorescence were systematically converted to the foci phenotype after cytoplasmic contact with strains expressing foci (Table 1), indicating that the foci state is transmitted by cytoplasmic contact and infectious. By analogy with the [Het-s] system, we term the phenotypic state with diffuse fluorescence [π^*] and the foci state [π] (Fig. 2A). We conclude from these experiments that the PP-motif region of HELLP(214-271) allows for prion formation and propagation. To determine whether as previously described for [Het-s] (27), the [π] state could be reverted to [π^*] in meiotic progeny, we analyzed 40 progeny of a $\Delta hellp \Delta het-s \Delta hellf GFP-hellp(214-271)$ [π] x $\Delta hellp \Delta het-s \Delta hellf het-s-RFP$ cross. Among the 20 progeny containing the *GFP-hellp(214-271)* transgene, three displayed a [π^*] phenotype, indicating that akin to [Het-s], the [π] prion can be cured in sexual crosses.

A larger construct with HELLP(171-271) fused to GFP either in N- or C-terminus also led to foci formation (Fig. S2A) but in contrast to analogous HET-S and CgHELLP constructs (HET-S(157-289)-GFP and CgHELLP(170-278)-GFP), HELLP(171-271) fusions did not form elongated aggregates (23, 28).

The HELLP(214-271) PFD region was also expressed in *E. coli* with a C-terminal histidine tag and purified under denaturing conditions. Upon removal of the denaturant by dialysis, the protein spontaneously formed fibrils that often associated laterally as bundles (Fig. 2B). These fibrils induce ThT-fluorescence (Fig. 2C). The ThT-fluorescence signal was relatively modest, a situation previously observed for bacterial BASS3-fibrils (29) and HET-s amyloids (30). When analyzed by X-ray diffraction, HELLP fibrils showed the characteristic band at 4.7 Å typical of the cross- β arrangement (Fig. 2D). Based on these observations, we conclude that HELLP(214-271) region forms amyloids *in vitro* as previously observed for the CgHELLP PFD (23).

$[\pi]$ prions triggers incompatibility upon interaction with full-length HELLP

It was shown that HET-S, HELLF and CgHELLP cell-death inducing activity is triggered by interaction with the prion form of their respective PFDs (7, 12, 21, 23). As a result, confrontation of strains expressing PFDs in the prion state with strains expressing the corresponding full-length protein leads to an incompatibility reaction which results in death of the fusion cells and, at the macroscopic level, in formation of an abnormal contact line termed barrage (21, 23, 28, 31). To determine whether HELLP could also cause an incompatibility reaction, strains expressing GFP-HELLP(214-271) were confronted to strains expressing full-length HELLP, either from the wild-type resident copy or from HELLP-GFP or HELLP-RFP transgene copies (in a $\Delta hellp$ background) (Fig. 3A). A barrage reaction was observed systematically and specifically in confrontations with strains expressing the [π] phenotype (as determined by presence of foci). [π^*] strains did not produce a barrage reaction. 24 transformants were analyzed in parallel for barrage formation and presence of foci and the two phenotypes were strictly correlated. The barrage reaction was stronger with strains expressing HELLP-GFP or -RFP fusions from the strong *gpd* promoter than with strains expressing HELLP from the resident copy (Fig. 3A). We verified that at the microscopic level, barrage formation was indeed associated with cell death using the vital dye methylene blue (Fig. S3A).

As expected the barrage formation phenotype was transmitted by cytoplasmic contact. Upon contact with barrage forming strains, a compatible strain invariably became capable of forming a barrage with a strains expressing full-length HELLP (Tables S1 and also S2 to S4, Fig. S2). Based on these experiments the definition of the [π] phenotype can be expanded to represent both the foci state of the PP-motif GFP and RFP fusions and the ability to produce a barrage reaction to full-length HELLP. The [π^*]/[π] phenotypes of HELLP(214-271) are in that sense analogous to the [Het-s*]/[Het-s] phenotypes of HET-s (4) and the [Φ^*]/[Φ] phenotypes of HELLF(209-277) (21).

It was shown that prion conversion of the HET-S PFD leads to the refolding of the HET-S HeLo domain that acquires pore-forming activity by exposing its N-terminal transmembrane helix, relocating it to the cell membrane and inducing cell death (7, 12). The same relocalization process was previously observed for HELLF and CgHELLP in the incompatibility reaction leading to cell death (23, 21). We thus determined whether HELLP relocates in the cell membrane region upon interaction with [π] prions. We examined the contact zone between incompatible [π] and HELLP-GFP or -RFP expressing strains (Fig. 3B). While full-length HELLP-GFP or -RFP alone yield a diffuse fluorescence signal that remains stable over time (Fig. S3C), in fusion cells co-expressing these proteins and the prion form of HELLP(214-271)-RFP or GFP-HELLP(214-271), we observed a relocalization of HELLP to the cell membrane region. We conclude that in these experiments, HELLP behaves as previously described for HET-S, HELLF and CgHELLP and locates in the cell membrane region in fusion cells. Further experiments are required to determine whether HELLP directly interacts with the membrane and if so how this interaction causes cell death.

As previously described for HELLF and CgHELLP, a synthetic incompatibility system mimicking [Het-s]/HET-S can be derived from HELLP. As will be detailed in the discussion section, we do not infer from this that HELLP functions as a natural incompatibility gene in Podospora.

The PNT1(1-31) region forms a prion and induces HELLP activation

It has been shown that the N-terminal region of NWD2 adopts an amyloid fold, displays prion infectivity and is able to activate HET-S-pore forming activity (14). Similarly, the N-terminal regions of the FNT1 and CgPNT1 NLRs behave as PFDs and trigger cell-death inducing activity of their cognate effectors proteins, HELLF and CgHELLP respectively (23, 21). To determine whether the N-terminal region of PNT1 displays similar properties, we expressed PNT1(1-31) fused to GFP or RFP in $\Delta hellp$ strains. Two phenotypic states were observed, a diffuse cytoplasmic fluorescence state, and a foci state analogous to the [π *] and [π] phenotypes observed previously with HELLP(214-271) (Fig. 4A). Spontaneous conversion to the foci form occurred upon prolonged subculture (Table 1) and cytoplasmic contact with foci-containing strain induced systematic conversion to the foci state (Table

1). PNT1(1-31)-GFP strains with fluorescent foci produced a barrage reaction to strains expressing fulllength HELLP (not shown). PNT1(1-31)-GFP [π] strains systematically convert [π^*] HELLP(214-271)-RFP strains to the [π] state. Conversely, [π] HELLP(214-271)-RFP systematically convert [π^*] PNT1(1-31)-GFP to the [π] state (Table S1B).

PNT1(1-31) and HELLP(214-271) were then co-expressed in the same strain (Fig. 4B). Fluorescence was either diffuse for both HELLP(214-271)-RFP and PNT1(1-31)-GFP or dot-like concomitantly for the two proteins. Cells in which one of the proteins formed foci while the other remained diffuse were not observed (Fig. 4B, Table S4A). HELLP(214-271)-RFP and PNT1(1-31)-GFP dots generally co-localized (Fig. 4B, Table S4B). The same was true during co-expression of PNT1(1-31)-RFP and GFP-HELLP(214-271). An initial diffuse state could however not be observed in this setting presumably as the result of the high spontaneous conversion rate of the GFP-HELLP(214-271) fusion protein (Table 1).

Finally, we observed fusion cells between strains expressing PNT1(1-31) in the [π] state and strains expressing full-length HELLP (Fig. 4C, Fig. S3A). We observed the relocalization of HELLP to the plasma membrane region and cell death of the fusion cells. Thus, consistent with the proposed role of HELLP as cell death execution protein activated by the PNT1 NLR, we find that the PP-motif region of PNT1 forms a prion and is able to activate HELLP.

HET-S, HELLF and HELLP are components of three independent cell-death inducing pathways

We recently reported the lack of cross-seeding between [Het-s] and [Φ] prions indicating the existence of two independent parallel amyloid signaling pathways in *P. anserina* (21). Here, we identify HELLP as an effector in a third amyloid signaling pathway in *P. anserina* and therefore wanted to analyze potential cross-interactions between these pathways. We thus analyzed [π^*] conversion by [Het-s] and [Φ] prions (Table S2A). Strains expressing HELLP(214-271)-GFP or -RFP and displaying the [π^*] phenotype were confronted to strains expressing [π], [Φ] or [Het-s] prions and then tested for their ability to form a barrage with tester strains expressing full-length HELLP. Barrages were observed only (and systematically) when the prion donor strain expressed [π] prions indicating that [π^*] conversion does not occur in presence of [Het-s] or [Φ] prions.

We also analyzed the cross-activation of the cell-death effectors of the three systems by the different prions (Table S2B). We used incompatibility assays and confronted $[\pi]$, $[\Phi]$ or [Het-s] prion expressing strains with strains expressing either HELLP, HELLF or HET-S full-length proteins. We observed barrage formation solely when $[\pi]$ strains were confronted with HELLP expressing strains, $[\Phi]$ with HELLF and [Het-s] with HET-S, that is, uniquely when the prion and the effector bear the same PFD. We observe no cross-interaction between these three amyloid signaling pathways.

To further analyze HELLP/HELLF and HELLP/HET-s PFD interactions, we co-expressed HELLP(214-271) with either HET-s or HELLF(209-271) in a $\Delta hellp \Delta het$ -s $\Delta hellf$ strain. We observed the diffuse and foci states co-existing in all possible combinations (Fig. 5, Fig. S4, and Table S4A). Namely, strains expressing HELLP(214-271) and HET-s could display four different phenotypes: [Het-s]/[π] and [Het-s*]/[π *] but also [Het-s]/[π *] and [Het-s*]/[π]. The same was true for HELLP(214-271) and HELLF(209-277) co-expressions (Fig. 5, S4 and Table S4A). These results are consistent with the prion conversion experiments and show that [Φ] or [Het-s] prions do not efficiently convert [π *] and conversely that [π] prions do not efficiently convert [Φ *] or [Het-s*]. We also noted an absence of co-localization between HELLP(214-271) and HET-s or HELLP(214-271) and HELLF(209-277) prion forms (Fig. 5, Table S4B).

P. anserina and *C. globosum* $[\pi]$ prions cross-seed and co-localize

It was shown previously that the HET-S-homologs from *P. anserina* and *Fusarium graminearum* which share 37% identity in the PFD region do cross-seed (32). We wondered whether the 36% identity between the PP-regions of HELLP and CgHELLP would also allow for cross-seeding (as suggested by the fact that pairwise identities between the different PP-motifs within the *C. globosum* PP-gene cluster or within the *P. anserina* PP-gene pair are in the range of 32-48%, Fig. 1C).

Upon confrontation, $[\pi]$ GFP-HELLP(214-271) donor strains invariably converted GFP-CgHELLP(215-278) $[\pi^*]$ recipient strains and conversely $[\pi]$ CgHELLP(215-278) strains converted GFP-HELLP(214-271) $[\pi^*]$ recipients (Table S3A). We analyzed the cross-induction of cell death activity of the full-length CgHELLP and HELLP proteins in barrage tests (Fig. 6B and Tables S3A and S3B). GFP-CgHELLP(215-278) $[\pi]$ strains produced a barrage reaction to strains expressing HELLP and conversely GFP-HELLP(214-271) $[\pi]$ strains produced a barrage reaction to strains expressing CgHELLP. However, this was true only when HELLP was highly expressed as a transgene. No barrages were observed in confrontations to wild type. This result suggests that heterologous activation of HELLP by GFP-CgHELLP(215-278) is less efficient than homotypic activation by GFP-HELLP(214-271).

To examine if the two PFD regions could co-localize *in vivo*, strains co-expressing HELLP(214-271)-RFP and GFP-CgHELLP(215-278) were obtained and analyzed by fluorescence microscopy (Fig. 6A, Table S4). We initially observed diffuse fluorescence corresponding to the [π *] state and after a few days, foci appeared concomitantly for the two proteins. There was no co-existence of diffuse and foci forms suggesting cross-conversion of HELLP and CgHELLP PFDs (Table S4A). Moreover, we observed a significant co-localization indicating co-aggregation of the two PFDs (Fig. 6A).

We conclude that, as previously reported for *F. graminearum* and *P. anserina* HET-S-homologs, the "species-barrier" for prion seeding can be crossed for the PP-motifs of *P.anserina* and *C. globosum*. This result is consistent with the fact that the level of within-cluster sequence identity of the PP-motifs is comparable to the identity between CgHELLP and HELLP PP-motifs. Nevertheless, the absence of barrage reaction between strains expressing $[\pi]^{Cg}$ prions and HELLP at wild-type level suggests that homotypic or within-cluster interactions are more efficient to activate the cell-death activity of the full-length protein.

The RHIM motifs of human RIP1 and RIP3 kinases form prions in P. anserina

The PP-motif as found in HELLP shows sequence homology to the mammalian RHIM amyloid motif (Fig. 1C). We thus envisioned that akin to the PP-motif, mammalian RHIMs might behave as PFDs when expressed in Podospora. We expressed the RIP1(524-551) and RIP3(444-469) regions fused to GFP or RFP in $\Delta hellp \Delta het$ - $s \Delta hellf$ strains (Fig. 7). Initially fluorescence was diffuse and cytoplasmic and foci appeared spontaneously after a few days of growth. The rate of spontaneous transition to the aggregated state was monitored as previously for HELLP (Table 1). For RIP3(444-469), the rates of foci formation were comparable to the PP-motif with the highest rate observed with GFP in N-terminal position. For RIP1(524-551), spontaneous rate of foci formation was lower especially for the two GFP fusions. The induced conversion through cytoplasmic infection (with the corresponding foci form) was equally effective for the RIP1 and RIP3 RHIM-motifs (Table 1). We designated the diffuse and infectious foci states [Rhim*] and [Rhim] respectively.

Strains expressing RIP1(524-551) foci induced formation of RIP3(444-469) foci and the converse was true (Fig. 8) showing cross-conversions between [Rhim]^{RIP1} and [Rhim]^{RIP3} prions. In these assays, heterotypic cross-induction rates between [Rhim]^{RIP1} and [Rhim]^{RIP3} were not significantly different from homotypic induction rates. To further analyze the interaction of [Rhim] prions propagated in *P. anserina*, we co-expressed RIP1(524-551) and RIP3(444-469) fused to GFP or RFP in the same strain (Fig. 9, Table S4). Strains co-expressing RIP3(444-469) fused with GFP and RFP, or RIP1(524-551) fused with GFP and RFP were used as positive controls (Fig. 9B) and showed co-localization with overlapping foci. In RIP1(524-551) and RIP3(444-469) co-expression experiments, diffuse fluorescence was observed initially. Then, foci formed concomitantly for both proteins. We observed no situation in which one of the proteins formed foci while the other remained diffuse, as previously observed for heterotypic PP-motif interactions (Fig. 9, Table S4B). RIP1(524-551) and RIP3(444-469) foci co-localized in the cell (Fig. 9, Table S4B), often in the close vicinity of the septa where they appeared as aligned dots.

We conclude that the RHIM containing RIP3(444-469) and RIP1(524-551) regions (of respectively 26 and 28 amino acids in length) behave as PFDs *in vivo* in *P. anserina* and lead to the expression of two alternate phenotypes we termed [Rhim*] and [Rhim]. In addition, the RIP1 and RIP3 [Rhim] prions efficiently cross-seed and co-localize, consistent with the fact that in mammalian cells and *in vitro* RIP1 and RIP3 interact through their RHIM regions to form amyloid heteropolymers (26).

The [Rhim] and $[\pi]$ prions partially cross-seed

Based on the similarity between PP and RHIM motifs and on the fact that RIP1 and RIP3 RHIM motifs propagate as prions *in vivo* in Podospora, it was conceivable that $[\pi]$ and [Rhim] prions might cross-seed to some extent. To examine possible interactions between [Rhim] and $[\pi]$ prions, HELLP(214-271)-RFP [π^*], GFP-RIP3(444-496) and GFP-RIP1(524-551) [Rhim*] strains were confronted

with $[\pi]$ and [Rhim] strains (Fig. 8). After four days, the recipient strains were sampled, subcultured and analyzed for the presence of foci by fluorescence microscopy. We deliberately chose transformants expressing moderate levels of the fusion proteins to decrease the rates of spontaneous prion formation in these experiments. In these test conditions, spontaneous prion formation was in the range of 10 to 20% for all constructs. Homotypic interactions led to 80 to 90% prion conversion (as mentioned above, high conversion rates were observed for heterotypic conversion of GFP-RIP3(444-496) [Rhim*] by GFP-RIP1(524-551) [Rhim] and GFP-RIP1(524-551) [Rhim*] by GFP-RIP3(444-496) [Rhim]). [π] prions induced formation of both [Rhim] prions at a rate of about 60%. Conversely, both [Rhim] prions induced formation of [π] prions. The conversion is however less efficient as in the case of homotypic or intra-kingdom [Rhim]^{RIP1}/[Rhim]^{RIP3} or [π]^{Pa}/[π]^{Cg} interactions.

We also tested the ability of the two [Rhim] prions to induce the conversion of [Het-s*] strains to the [Het-s] phenotype and observed cross-induction (18 transformants for each [Rhim] prion tested in triplicate). This result is in line with the previous results indicating the absence of cross-interaction between [π] and the other amyloid signaling pathways of *P. anserina* and are thus rather expected.

To explore the interaction between $[\pi]$ and [Rhim] further, HELLP and RIP3 (or RIP1) PFDs fused to GFP or RFP were co-expressed in the same strain and transformants analyzed by fluorescence microscopy (Fig. 10, S5, Table S4). Consistent with the conversion experiments indicating partial crossseeding, we could observe cells where one of the protein formed foci while the other remain in the diffused state as observed previously for non-cross seeding prions (Fig. 10 and S5, Table S4A). In $[\pi]/[Rhim]$ cells, the fraction of the foci that co-localized was higher (~68 %) than between non-cross seeding prions (such as HET-s and HELLP for instance, ~5 %) but lower than in homotypic or $[Rhim]^{RiP1}/[Rhim]^{RiP3}$ or $[\pi]^{Pa}/[\pi]^{Cg}$ prions (~82-96%). In addition, even in mixed foci the co-localization was imperfect with RFP and GFP fluorescence that only partially overlapped (Fig. 10). This phenomenon of patchy co-localization has already been observed during coexpression of the HET-s proteins of *F. graminearum* and *P. anserina* (32). The same $[\pi]/[Rhim]$ interaction experiments were also carried out with CgHELLP(215-278) and similar results were obtained (Fig. S6, Table S4). $[\pi]^{Cg}$ and [Rhim] prions were found to partially cross-seed. In this case also, there was a partial co-localization of [Rhim] and $[\pi]$ prions, a situation that is distinct both from the total lack of interaction seen between $[\pi]$ and [Het-s] and $[\Phi]$ prions and from the strong interactions seen between RIP1 and RIP3 [Rhim] prions on one hand and HELLP and CgHELLP $[\pi]$ prions on the other hand.

The above [Rhim]/[π] cross-seeding and co-localization experiments suggest that RHIM and PPmotifs can interact but that this interaction is less efficient than in PP-homotypic pairings. We wondered whether [Rhim] prions could nonetheless induce at least partially, HELLP or CgHELLP toxicity in a setting favoring [Rhim]/HELLP interactions. We thus co-expressed in the same strain GFP-RIP3(444-469) or GFP-RIP1(524-551) and HELLP-RFP or CgHELLP to determine whether prion conversion of

[Rhim] in this strain would lead to growth alterations (self-incompatibility). Positive controls corresponding to cross-interacting incompatible combinations ($[\pi]$ /HELLP) or negative controls corresponding to non-interacting combinations ([ϕ] or [Het-s]/HELLP or [Rhim]/HET-S) were used for comparison (Table 2). In each combination, growth of a population of 12 to 39 transformants was observed before or after infection with the respective prion. Before prion infection, growth was normal for the vast majority of the transformants. After prion infection, a large fraction of the transformants (about 80%) co-expressing RHIM constructs and full-length HELLP or CgHELLP showed growth defects (Table 2 and Fig. 11). A similar proportion of growth defects was observed in known cross-interacting combinations while growth alterations where not significantly increased in non-interacting combinations. The growth alteration phenotypes were highly heterogeneous (Table 2, Fig. 11) ranging from sublethal growth to minor growth alteration. This phenotypic heterogeneity is typical of such selfincompatible situations and was also observed for the control self-incompatible strains. Phenotypic heterogeneity is thought to result from differences in transgene copy number and integration site in the different transformants and "escape" from self-incompatibility that is strongly selected for. Escape is manifested by formation of growth sectors that recover close to normal growth and can occur by transgene mutation or deletion and from prion curing. Strains with [Rhim] prions do not lead to a barrage reaction when confronted to strains expressing full-length HELLP suggesting that the RHIM/HELLP interaction is not efficient enough to induce a massive cell-death reaction and barrage formation. We however observed cell death in fusion cells between strains expressing HELLP-RFP and GFP-RIP3(444-469) or GFP-RIP1(524-551) [Rhim] strains (Fig. S3B). These results are consistent with the conversion experiments and indicate that [Rhim] prions are able to induce to some extent toxicity of HELLP (and CgHELLP) albeit at a lower efficiency than $[\pi]$ prions.

Discussion

A number of innate immune pathways function following a principle of "signaling by cooperative assembly formation" (SCAF) (33). Upon recognition of PAMPs (Pathogen-associated molecular pattern) or MAMPs (Microbe-associated molecular pattern), receptors assemble into higher-order complexes or "supramolecular organizing centers" (SMOCs) (34). Following ligand recognition, the sensor modules oligomerize and recruit adaptor or effector proteins -often via homotypic interactions- that further amplify the oligomerization process and form cooperative, open-ended polymers (typically filaments). This general scheme applies to many immune signaling modules including the RIG-I-like receptors, the AIM2-like receptors and to NLRs. Formation of higher-order assemblies entitles such signaling cascade with signal amplification, sharp threshold behavior and noise reduction. This so-called prion-like polymerization process can involve nucleation of either folded globular domains such as the TIR or Death domains (35, 36) or short amyloid motifs such as RHIM identified in the necroptosis pathway in mammals. This motif allows for assembly of the necrosome formed by the RIP1 and RIP3 kinases (24). RHIM-like motif also regulate amyloid formation in innate immune cascades in Drosophila

(25). In addition, several NLR-associated amyloid signaling motifs were identified in filamentous fungi and more recently in multicellular bacteria (19, 29). Among them is the PP-motif that shows similarity to animal RHIM and RHIM-like motifs (23). We identify here in the species Podospora anserina, a PPmotif two-component system comprising a NLR termed PNT1 and a cell-death execution protein termed HELLP. As previously reported for CgHELLP from C. globosum, the N-terminal HeLo-like domain of HELLP shows homology to the 4HB domain of MLKL responsible for membrane permeation in mammalian necroptosis. HELLP induced RCD thus appears to be related to other evolutionary widespread forms of immune RCD which encompasses fungal cell death, necroptosis and cell death associated with the hypersensitive response in plants (23, 37, 38). We propose that PNT1 and HELLP constitute a third amyloid immune-related signaling cascade controlling cell fate in P. anserina. We show the absence of cross-induction between the three P. anserina systems allowing for the coexistence of three independent amyloid signaling cascades in the same species. It is proposed that fungal NLRs akin to their plant and animal counterparts represent innate immune receptors that regulate response to pathogen and symbiotic interactions in fungi. The three amyloid-associated NLRs identified in Podospora share the fact that their WD or TPR repeat ligand binding domain is highly polymorphic and show repeat-length variation in natural populations consistent with the proposed role as immune receptor (14, 15). Yet, except in the specific case of NLRs involved in incompatibility systems, the nature of the ligands activating these NLRs are currently unknown. Compared to the two other systems, the NWD2/HET-S is characterized by the fact that this system has been exaptated as an allorecognition system in [Het-s]/HET-S incompatibility (13). It has been proposed that point mutations inactivating the HeLo-domain converted HET-S into a naturally occurring prion. It has been possible to experimentally derive synthetic incompatibility systems analogous to [Het-s]/HET-S from both HELLP and HELLF. It will be of interest in the future to survey natural Podospora strains to determine whether exaptation of allorecognition incompatibility might have also occurred for HELLP and HELLF; that is whether derived prion forms of HELLP and HELLF altered in the HeLo-like domain exist in natural strains. Of note also is that the Chaetomium globosum and Podospora anserina PP-based signalosomes differ in the sense that the Chaetomium system has three components and involves also CgSBP, a lipase also comprising a PP-motif and that is targeted to the membrane region by CgHELLP. The present study is superior to the previous study on the PP-gene cluster in the sense that HELLP function is being studied here in the native context rather than by heterologous expression (22).

So far, four mammalian proteins involved in necroptosis and five Drosophila proteins also involved in immune signaling rely on RHIM-based amyloid signaling (24, 25). The fact that a range of viruses express RHIM containing proteins and that pathogenic bacteria express an enzyme that specifically cleaves host RHIMs to prevent necrosome assembly highlight the crucial role of RHIM-based interactions in the host innate immune response (39). PP-motifs present common features with other amyloid forming domains such as conservation of N/Q and G residues. N and Q allow for formation of H-bonded N/Q ladders and G connect short adjacent β -strands (11, 40–42). PP-motifs of CgHELLP and HELLP resemble RHIM motifs (Fig. 1B). This similarity occurs in the central G- ϕ -Q- ϕ -G core of the motif. The fungal PP-motifs show strong conservation of the pseudopalindromic structure centered on the Q residue along with conservation of flanking N and G residues. Mompeán and co-workers resolved the structure of the human RIP1-RIP3 amyloid region as a serpentine fold with turns and kinks resulting in an enclosed oblong-shaped hydrophobic core stabilized by N and Q ladders and Y stacking (26). If the sequence similarity between RHIM and PP reflect structural similarity then it would appear that the PP-fold is distinct from the HRAM β -solenoid fold of HET-s and HELLF. We find here that the RHIM motifs of RIP1 and RIP3 behave as PFDs when expressed in Podospora and thus behave analogously to PP-motifs in that respect. The simple *in vivo* Podospora model designed here might represent a useful tool to study RHIM motif assembly and interactions for instance to screen for inducers or inhibitors of RIP1/RIP3 interactions.

Importantly, we find that [Rhim] and [π] prions cross-seed, albeit not as efficiently as RHIM motifs or fungal PP-motifs. These results suggest both a structural similarity between RHIM and PP-amyloids and substantial differences since the efficiency of prion seeding is clearly distinct from that of homotypic or intraspecific seeding. Extensive structural analyses of the amyloid fibers of HELLP or CgHELLP will be required to determine to which extend PP-based amyloid polymers share the same fold as RIP1-RIP3. It appears however that the partial cross-seeding between PP and RHIM support a model of a common evolutionary origin of the two motifs. In this context, it is interesting to note that in addition to the RHIM-like motifs described in Drosophila a RHIM-related amyloid motif termed BASS3 was also identified in multicellular bacteria (29). It might be that the RHIM-related motif represent an archetypal amyloid motif largely conserved through evolution while other motifs such as HRAMs or other bacterial signaling motifs have a more restricted phylogenetic distribution.

Materials and Methods

Gene annotation

The Pa_5_8070 and Pa_5_8060 genes were annotated manually using two intron prediction GENSCAN (genes.mit.edu/GENSCAN.html) and NetGene2 (www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/) and based on blastn searches against EST sequences at ncbi and RNASEQ data from (43). A single 47pb intron was identified in nucleotide position 429 to 475 of the Pa_5_8070 ORF, this newly defined ORF encodes a 271 aa protein named HELLP. A single intron of 54 bp was identified in nucleotide position 95 to 148 of the ORF of Pa_5_8060, TPR repeat number in the 3' part of the ORF is variable in *P. anserina* strains, we described here the ORF of the S Orsay reference strain encoding a 971 aa protein named PNT1.

Strains and plasmids

The *P. anserina* strains used in this study were wild-type *het-s* or *het-S* and the strains $\Delta hellp$ (ΔPa_5_8070) *het-s*° (23) and $\Delta hellp$ (ΔPa_5_8070) $\Delta het-s$ (ΔPa_3_620) $\Delta hellf$ (ΔPa_3_9900) obtained by crossing the $\Delta het-s$ $\Delta hellf$ strain (21) with the $\Delta hellp$ het-s° strain. The $\Delta hellp$ het-s° strain was used

as recipient strain for the expression of molecular fusions of full length HELLP or PP motif-containing regions of HELLP and the GFP (green fluorescent protein) or RFP (red fluorescent protein). These fusions were expressed from plasmids based on the pGEM-T backbone (Promega) named pOP plasmids (23), containing either the GFP or RFP, or in a derivative of the pAN52.1 GFP vector (28), named pGB6-GFP plasmid. In both cases, the molecular fusions were under the control of the strong constitutive *P. anserina* gpd (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) promoter. The $\Delta hellp$ het s° strain was transformed as described (44) with a fusion construct along with a second vector carrying a phleomycin-resistance gene ble, pPaBle (using a 10:1 molar ratio). Phleomycin-resistant transformants were selected, grown for 30 h at 26°C and screened for the expression of the transgenes using fluorescence microscopy. The hellp gene and the hellp(171-271) and hellp(214-271) gene 5' fragments amplified with the respective 5' forward oligonucleotides were ggcttaattaaATGGATCCTCTCAGTATCACAGC 3', 5' ggcttaattaaATGATCACAGCGACAAACGATCAG 3' and 5' ggcttaattaaATGAAAGTACTGCATGAATCGCGC 3' and a same 3' reverse oligonucleotide 5' ggcagatcttgctccCCCCTTCGGCCAAATGTAG 3' (capital letters correspond to P. anserina genomic DNA sequences). The PCR products were cloned upstream of the GFP or RFP coding sequence in the pOP plasmids using Pacl/Bg/II restriction enzymes to generate the pOPhellp-GFP, pOPhellp-RFP, pOPhellp(171-271)-GFP, pOPhellp(171-271)-RFP, pOPhellp(214-271)-GFP and pOPhellp(214-271)-RFP vectors in which in addition to the Bg/II site, a two amino acid linker (GA) was introduced between the sequences encoding HELLP and GFP or RFP. *hellp(171-271)* and *hellp(214-271)* were also amplified with the respective 5' forward oligonucleotides 5' ggcgcggcggccgcATCACAGCGACAAACGATCAG 3', 5' ggcgcggcggccgcATCACAGCGACAAACGATCAG 3' and the same 3' reverse oligonucleotide 5' ggcggatccCTACCCCCTTCGGCCAAATG 3' and cloned downstream of the GFP using Notl/BamHI restriction enzymes to generate the plasmids pGB6-GFP-hellp(171-271) and pGB6-GFP-hellp(214-271). To investigate the co-localization of HELLP with CgHELLP or of HELLP with HELLF or HET-s, the $\Delta hellp$ Δhet-s Δhellf strain was transformed both with vectors expressing fluorescently tagged versions of fulllength or truncated HELLP described above and with fluorescently tagged versions of full-length or truncated HELLF, HET-s, HET-S or CgHELLP previously described (21, 23, 28): pOPhellf-GFP, pOPhellf(209-277)-RFP, pOPhellf(209-277)-GFP, pOPhellf(L52K)-GFP, pOPhet-s-RFP, pGPD-het-S-GFP, pOPhet-S-RFP, pGB6-GFP-Cghellp(215-278).

In the same way the sequence encoding the first 31 amino acids of *pnt1 (Pa_5_8060)* was amplified with oligonucleotides 5' ggcttaattaaATGTCAGACAGTTATCGTTTCGGC 3' and 5' ggcagatcttgctccTGGCGCCTGCAGGAAAGTATTG 3' and cloned in the pOP plasmids using *Pacl/BglII* restriction enzymes to generate the pOPpnt1(1-31)-GFP and the pOPpnt1(1-31)-RFP. The $\Delta hellp \Delta het$ *s* $\Delta hellf$ strain was transformed with these vectors (and pPaBle) either alone or with pOPhellp(214-271)-RFP or pGB6-GFP-hellp(214-271).

For heterologous expression in *E. coli*, we cloned *hellp(214-271)* in pET24 (Novagen) using the *Ndel/Xhol* restrictions sites. The gene fragment *hellp(214-271)* was amplified with oligonucleotides 5' agccatatgAAAGTACTGCATGAATCGCGC 3' and 5' agcctcgagCCCCCTTCGGCCAAATGTAG 3' and cloned in front of a polyhistidine-tag to generate pET24-hellp(214-271)-6xhis plasmid.

For the expression of RIP3(444-469) and RIP1(524-551), PCR products were amplified with 5' ggcttaattaaATGGTTACCGGTCGTCGCCGCTG 3' and 5' ggcagatcttgctccCTGCATGGTCAGGTAGTTGTTG 3' or 5' ggcgggccgcGTTACCGGTCGTCCGCTGG 3' and 5' ggcGGATCCTTACTGCATGGTCAGGTAGTTG 3' for RIP3 and with 5' ggcttaattaaATGACTGACGAATCCATCAAATACACC 3' and 5' ggcagatcttgctccGCCGCCGATTTCCATGTAGTT 3' or 5' ggcgggccgcACTGACGAATCCATCAAATACACC 3' and 5' ggcGGATCCTTAGCCGCCGCCGATTTCCATGTAGTT 3' for RIP1 and cloned as described above in the pOP plasmids using *Pacl/Bgl*II restriction enzymes, or in pGB6-GFP plasmid using *Notl/Bam*HI restriction enzymes.

Microscopy

P. anserina hyphae were inoculated on solid medium and cultivated for 24 to 72 h at 26°C. The medium was then cut out, placed on a glass slide and examined with a Leica DMRXA microscope equipped with a Micromax CCD (Princeton Instruments) controlled by the Metamorph 5.06 software (Roper Scientific). The microscope was fitted with a Leica PL APO 100X immersion lens. To observe cell-death reactions and HELLP re-localization, HELLP-GFP or HELLP-RFP expressing strains were inoculated at a distance of 2 cm from a strain expressing one of the fusion protein containing either a HELLP PFD or PNT1(1-31), RIP3(444-469) or RIP1(524-551) fused to GFP or RFP. The confrontation zone between the two strains was observed 12 to 48 hours after contact. For methylene blue staining an aqueous 0.5% solution was put directly on the mycelium for 1 min followed by washing with distilled water before observation as described above.

For HELLP fibril observations, negative staining was performed as follows. Aggregated proteins were adsorbed onto Formvar-coated copper grids (400 mesh) and allowed to dry for 15 min in air, grids were then negatively stained 1 min with 10 μ L of freshly prepared 2% uranyl acetate in water, dried with filter paper, and examined with a Hitachi H7650 transmission electron microscope (Hitachi, Krefeld, Germany) at an accelerating voltage of 120 kV. TEM was performed at the Pôle Imagerie Électronique of the Bordeaux Imaging Center using a Gatan USC1000 2k x 2k camera.

Incompatibility assays (barrage tests).

Methods for determination of incompatibility phenotypes were previously described (21, 45). In brief, incompatibility phenotypes were determined by confronting strains on solid corn-meal agar medium and a 'barrage' reaction (abnormal contact lines forming upon confrontation of incompatible strains) was assessed 3 days post-contact. The $[\pi]$ phenotype (acquisition of the $[\pi]$ prion) was assessed as the ability of a strain to form a barrage with a wild-type strain or with a *Δhellp* bearing a transgene encoding full-length HELLP in fusion with GFP or RFP, named tester strain. Cross reaction between the different prion systems was also assessed in barrage tests as the ability of a prion containing strain (either $[\pi]$, [Rhim], [Het-s] or $[\Phi]$) to form a barrage with a strain expressing one of the full length HELO or HELL containing proteins HELLP, CgHELLP, HELLF or HET-S. In these experiments strains previously described by Daskalov and colleagues were used (21, 23).

Prion propagation

Methods for determination of prion formation and propagation were previously described (21, 45). Prion formation and propagation can be observed either using microscopy by monitoring the apparition of dots or using barrage tests by observing the formation of a barrage with the tester strain. Spontaneous prion formation is first monitored as the rate of spontaneous acquired prion phenotype (dots) in the initially prion-free subculture after 5, 11 and 19 days of growth at 26°C on corn-meal agar using microscopy as described. Then transformants were re-observed at least 60 days after transformation to confirm prion acquisition. For $[\pi]$ strains, barrage tests were realized 5, 19 and after at least 60 days and a strict correlation between presence of dots and barrage formation with HELLP expressing strains was always observed.

Prion formation can also be measured as the ability to propagate prions from a donor strain (containing prion) to a prion-free strain (induced strain). In practice, prion-free strains are confronted on solid corn-meal agar medium for 4 to 6 days (this step is mentioned as previous contact with in Tables) before being subcultured and observed by fluorescence microscopy and analyzed in barrage tests. As indicated in figure legends, at least 12 different transformants were used and the tests were realized in triplicates. Again for $[\pi]$ strains, barrage and dot-formation are strictly correlated. Prion acquisition through induction can also be visualized directly on solid medium by positioning the inocula of donor and prion-free strains closer than the tester strain (see Fig. S2) to allow prion propagation before contact with the tester strain.

It is to note that transformants were randomly tested for prion formation allowing various expression levels of the transgene (high levels of expression are usually associated with very rapid spontaneous prion formation) except for the cross conversion test (see Fig. 8 and S6) where transformants expressing moderate level of transgene were preferred to limit the rate of spontaneous transition within the timing of the experiment that could mask the prion induction. For this experiment, a statistical analysis was performed using two tails Fisher's test to determine p-values and validate test result as indicated in the figure legend.

Protein preparation and fibril formation

HELLP(214-271) protein was expressed in *E. coli* BL21-CodonPlus[®]-RP competent cells as insoluble proteins and purified under denaturing conditions using its terminal 6 histidine tag as previously described (46). Briefly, cells were grown at 37°C in DYT medium to 0.6 OD_{600} and expression was induced with 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside. After, 4 h, cells were harvested by centrifugation, frozen at -80°C sonicated on ice in a lysis buffer (Tris 50 mM, 150 mM NaCl, pH 8) and centrifuged for 20 min at 20,000 g to remove *E. coli* contaminants. The pellet containing HELLP(214-271) in inclusion bodies was washed in the same buffer and resuspended in denaturing buffer (8M guanidinium HCl, 150 mM NaCl, and 100 mM Tris-HCl, pH 8) until complete solubilization. The lysate was incubated with Talon Resin (CLONTECH) for 1 h at 20°C, and the resin was extensively washed with 8 M urea, 150 mM NaCl, and 100 mM Tris-HCl, pH 8. The protein was eluted from the resin in the same buffer containing 200 mM imidazole. The protein HELLP(214-271) was pure as judged by sodium-

dodecyl-sulfate polyacrylamide-gel electrophoreses (SDS-PAGE) followed by Coomassie-Blue staining and yield was in the range of ~2-4 mg of protein per liter of culture. To eliminate urea, elution buffer was replaced by overnight dialysis at 4°C against Milli-Q water. Fibrils formation resulted spontaneously from dialysis process followed by sample storage at 4°C for 7 days. Other conditions were used for sample preparation to test the influence of salt or acidic buffer on the fibrils formation: presence or absence of 500 mM NaCl in the dialysis buffer, replacement of dialysis by 50 times dilution in Milli-Q water or in ammonium acetate buffer 100 mM pH 4.5, they all resulted in spontaneous appearance of fibrils.

ThT fluorescence assay.

The aggregated HELLP fibril samples supplied with 20 μ M ThT were transferred to a 96 well corning plate (bottom transparent) with 100 μ L/well. The fluorescence measurements were carried out on three independent samples in a CLARIOstar®Plus plate reader with ten flashes per well (excitation wavelength 440 nm and emission wavelength 480 nm). Seven independent measurements are averaged and plotted.

X-ray diffraction.

Fiber diffraction pattern was measured at 4°C on an Rigaku FRX rotating anode X-ray generator at the copper wavelength (K α , λ = 1.54 Å). The source was equipped with Osmic Varimax[®] HF optics and a Dectris Eiger 1M detector on a 2 θ arm of a Rigaku partial chi AFC11 goniometer. The sample was mounted in a MicroLoopTM from Mitegen on a goniometer head under the cold nitrogen flow. The diffraction pattern corresponds to a 360° rotation along the phi axis (perpendicular to the direct beam with Omega and Chi axis at 0 position) with an exposure time of 720 sec. Data were integrated with CrysalisPro (Rigaku Oxford Diffraction Ltd, Yarnton, Oxfordshire, England) with median filter and baseline correction.

Bioinformatics methods

Blast analyses on the P. anserina genome were achieved on the Podospora anserina Genome Project site (podospora.i2bc.paris-saclay.fr/). Sequence alignments were performed with Clustal Omega or MAFFT at (<u>www.ebi.ac.uk</u>) and edited with Jalview (<u>www.jalview.org/</u>). To generate the HMM profile signatures for PP and RHIM, psi-blast searches were performed at (blast.ncbi.nlm.nih.gov) using the HELLP PP sequence and the RHIM motif of human RIP3 and matching sequences were aligned with Clustal Omega and the alignment was analyzed with Skylign (skylign.org). Secondary structure predictions were performed with PSIPRED (bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/). Hidden Markov Model searches were performed using HHPred (toolkit.tuebingen.mpg.de) and Jackhhmer (www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/phmmer), both with default settings. The prediction of transmembrane helix was performed with the TMHMM server (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM).

Author Contributions

Conceptualization: Thierry Bardin, Asen Daskalov, Sven J. Saupe, Virginie Coustou Data curation: Thierry Bardin, Asen Daskalov, Sophie Barrouilhet, Sven J. Saupe, Virginie Coustou Formal analysis: Thierry Bardin, Asen Daskalov, Sophie Barrouilhet, Sven J. Saupe, Virginie Coustou Funding acquisition: Sven J. Saupe Investigation: Thierry Bardin, Asen Daskalov, Sophie Barrouilhet, Alexandra Granger-Farbos, Bénédicte Salin, Corinne Blancard, Brice Kauffmann, Virginie Coustou Methodology: Thierry Bardin, Asen Daskalov, Alexandra Granger-Farbos, Bénédicte Salin, Corinne Blancard, Brice Kauffmann, Sven J. Saupe, Virginie Coustou Project administration: Sven J. Saupe, Virginie Coustou Resources: Alexandra Granger-Farbos, Bénédicte Salin, Corinne Blancard, Brice Kauffmann, Sven J. Saupe, Virginie Coustou Supervision: Sven J. Saupe, Virginie Coustou Validation: Thierry Bardin, Asen Daskalov, Sven J. Saupe, Virginie Coustou

Writing: Sven J. Saupe, Virginie Coustou

References

- 1. Prusiner S. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science 216:136.
- Colby DW, Prusiner SB. 2011. Prions. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 3:a006833– a006833.
- 3. Wickner RB, Edskes HK, Son M, Bezsonov EE, DeWilde M, Ducatez M. 2018. Yeast Prions Compared to Functional Prions and Amyloids. Journal of Molecular Biology 430:3707–3719.
- 4. Coustou V, Deleu C, Saupe S, Begueret J. 1997. The protein product of the het-s heterokaryon incompatibility gene of the fungus Podospora anserina behaves as a prion analog. Proc Natl Acad Sci U S A 94:9773–9778.
- 5. Saupe SJ. 2011. The [Het-s] prion of Podospora anserina and its role in heterokaryon incompatibility. Semin Cell Dev Biol 22:460–468.
- Balguerie A, Dos Reis S, Ritter C, Chaignepain S, Coulary-Salin B, Forge V, Bathany K, Lascu I, Schmitter J-M, Riek R, Saupe SJ. 2003. Domain organization and structure-function relationship of the HET-s prion protein of Podospora anserina. EMBO J 22:2071–2081.
- 7. Seuring C, Greenwald J, Wasmer C, Wepf R, Saupe SJ, Meier BH, Riek R. 2012. The mechanism of toxicity in HET-S/HET-s prion incompatibility. PLoS Biol 10:e1001451.
- 8. Nazabal A, Dos Reis S, Bonneu M, Saupe SJ, Schmitter J-M. 2003. Conformational transition occurring upon amyloid aggregation of the HET-s prion protein of Podospora anserina analyzed by hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry. Biochemistry 42:8852–8861.
- 9. Ritter C, Maddelein M-L, Siemer AB, Lührs T, Ernst M, Meier BH, Saupe SJ, Riek R. 2005. Correlation of structural elements and infectivity of the HET-s prion. Nature 435:844–848.
- Sen A, Baxa U, Simon MN, Wall JS, Sabate R, Saupe SJ, Steven AC. 2007. Mass analysis by scanning transmission electron microscopy and electron diffraction validate predictions of stacked betasolenoid model of HET-s prion fibrils. J Biol Chem 282:5545–5550.
- 11. Wasmer C, Lange A, Van Melckebeke H, Siemer AB, Riek R, Meier BH. 2008. Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core. Science 319:1523–1526.
- 12. Mathur V, Seuring C, Riek R, Saupe SJ, Liebman SW. 2012. Localization of HET-S to the cell periphery, not to [Het-s] aggregates, is associated with [Het-s]-HET-S toxicity. Mol Cell Biol 32:139–153.
- 13. Daskalov A, Saupe SJ. 2015. As a toxin dies a prion comes to life: A tentative natural history of the [Het-s] prion. Prion 9:184–189.
- 14. Daskalov A, Habenstein B, Martinez D, Debets AJM, Sabaté R, Loquet A, Saupe SJ. 2015. Signal transduction by a fungal NOD-like receptor based on propagation of a prion amyloid fold. PLoS Biol 13:e1002059.
- 15. Dyrka W, Lamacchia M, Durrens P, Kobe B, Daskalov A, Paoletti M, Sherman DJ, Saupe SJ. 2014. Diversity and variability of NOD-like receptors in fungi. Genome Biol Evol 6:3137–3158.
- 16. Jones JDG, Vance RE, Dangl JL. 2016. Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. Science 354.
- 17. Daskalov A, Paoletti M, Ness F, Saupe SJ. 2012. Genomic clustering and homology between HET-S and the NWD2 STAND protein in various fungal genomes. PLoS ONE 7:e34854.
- 18. Cai X, Chen J, Xu H, Liu S, Jiang Q-X, Halfmann R, Chen ZJ. 2014. Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation. Cell 156:1207–1222.
- 19. Loquet A, Saupe SJ. 2017. Diversity of Amyloid Motifs in NLR Signaling in Fungi. Biomolecules 7.

- 20. Daskalov A, Dyrka W, Saupe SJ. 2015. Theme and variations: evolutionary diversification of the HET-s functional amyloid motif. Sci Rep 5:12494.
- 21. Daskalov A, Martinez D, Coustou V, El Mammeri N, Berbon M, Andreas LB, Bardiaux B, Stanek J, Noubhani A, Kauffmann B, Wall JS, Pintacuda G, Saupe SJ, Habenstein B, Loquet A. 2020. Structural and molecular basis of cross-seeding barriers in amyloids. bioRxiv 2020.07.06.188508.
- Murphy JM, Czabotar PE, Hildebrand JM, Lucet IS, Zhang J-G, Alvarez-Diaz S, Lewis R, Lalaoui N, Metcalf D, Webb AI, Young SN, Varghese LN, Tannahill GM, Hatchell EC, Majewski IJ, Okamoto T, Dobson RCJ, Hilton DJ, Babon JJ, Nicola NA, Strasser A, Silke J, Alexander WS. 2013. The Pseudokinase MLKL Mediates Necroptosis via a Molecular Switch Mechanism. Immunity 39:443– 453.
- 23. Daskalov A, Habenstein B, Sabaté R, Berbon M, Martinez D, Chaignepain S, Coulary-Salin B, Hofmann K, Loquet A, Saupe SJ. 2016. Identification of a novel cell death-inducing domain reveals that fungal amyloid-controlled programmed cell death is related to necroptosis. Proc Natl Acad Sci USA 113:2720–2725.
- 24. Li J, McQuade T, Siemer AB, Napetschnig J, Moriwaki K, Hsiao Y-S, Damko E, Moquin D, Walz T, McDermott A, Ka-Ming Chan F, Wu H. 2012. The RIP1/RIP3 Necrosome Forms a Functional Amyloid Signaling Complex Required for Programmed Necrosis. Cell 150:339–350.
- 25. Kleino A, Ramia NF, Bozkurt G, Shen Y, Nailwal H, Huang J, Napetschnig J, Gangloff M, Chan FK-M, Wu H, Li J, Silverman N. 2017. Peptidoglycan-Sensing Receptors Trigger the Formation of Functional Amyloids of the Adaptor Protein Imd to Initiate Drosophila NF-κB Signaling. Immunity 47:635-647.e6.
- 26. Mompeán M, Li W, Li J, Laage S, Siemer AB, Bozkurt G, Wu H, McDermott AE. 2018. The Structure of the Necrosome RIPK1-RIPK3 Core, a Human Hetero-Amyloid Signaling Complex. Cell 173:1244-1253.e10.
- 27. Beisson-Schecroun J. 1962. [Cellular incompatibility and nucleo-cytoplasmic interactions in the "barrage" phenomena in Podospora anserina]. Ann Genet 4:4–50.
- Balguerie A, Dos Reis S, Coulary-Salin B, Chaignepain S, Sabourin M, Schmitter J-M, Saupe SJ.
 2004. The sequences appended to the amyloid core region of the HET-s prion protein determine higher-order aggregate organization in vivo. J Cell Sci 117:2599–2610.
- 29. Dyrka W, Coustou V, Daskalov A, Lends A, Bardin T, Berbon M, Kauffmann B, Blancard C, Salin B, Loquet A, Saupe SJ. 2020. Identification of NLR-associated amyloid signaling motifs in bacterial genomes. J Mol Biol https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.10.004.
- Sabaté R, Baxa U, Benkemoun L, Sánchez de Groot N, Coulary-Salin B, Maddelein M-L, Malato L, Ventura S, Steven AC, Saupe SJ. 2007. Prion and non-prion amyloids of the HET-s prion forming domain. J Mol Biol 370:768–783.
- 31. Beisson-Schecroun J. 1962. [Cellular incompatibility and nucleo-cytoplasmic interactions in the "barrage" phenomena in Podospora anserina]. Ann Genet 4:4–50.
- 32. Benkemoun L, Ness F, Sabaté R, Ceschin J, Breton A, Clavé C, Saupe SJ. 2011. Two structurally similar fungal prions efficiently cross-seed in vivo but form distinct polymers when coexpressed. Mol Microbiol 82:1392–1405.
- 33. Nanson JD, Kobe B, Ve T. 2019. Death, TIR, and RHIM: Self-assembling domains involved in innate immunity and cell-death signaling. J Leukoc Biol 105:363–375.
- 34. Kagan JC, Magupalli VG, Wu H. 2014. SMOCs: supramolecular organizing centres that control innate immunity. Nat Rev Immunol 14:821–826.
- 35. Wu H. 2013. Higher-order assemblies in a new paradigm of signal transduction. Cell 153:287–292.
- 36. Cai X, Chen ZJ. 2014. Prion-like polymerization as a signaling mechanism. Trends Immunol 35:622–630.
- 37. Burdett H, Bentham AR, Williams SJ, Dodds PN, Anderson PA, Banfield MJ, Kobe B. 2019. The Plant "Resistosome": Structural Insights into Immune Signaling. Cell Host & Microbe 26:193–201.
- 38. Hofmann K. 2019. The Evolutionary Origins of Programmed Cell Death Signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol a036442.
- 39. Baker MODG, Shanmugam N, Pham CLL, Strange M, Steain M, Sunde M. 2018. RHIM-based protein:protein interactions in microbial defence against programmed cell death by necroptosis. Seminars in Cell & Developmental Biology https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.05.004.
- 40. Plumley JA, Dannenberg JJ. 2010. The importance of hydrogen bonding between the glutamine side chains to the formation of amyloid VQIVYK parallel beta-sheets: an ONIOM DFT/AM1 study. J Am Chem Soc 132:1758–1759.
- 41. Halfmann R, Alberti S, Krishnan R, Lyle N, O'Donnell CW, King OD, Berger B, Pappu RV, Lindquist S. 2011. Opposing effects of glutamine and asparagine govern prion formation by intrinsically disordered proteins. Mol Cell 43:72–84.
- Tuttle MD, Comellas G, Nieuwkoop AJ, Covell DJ, Berthold DA, Kloepper KD, Courtney JM, Kim JK, Barclay AM, Kendall A, Wan W, Stubbs G, Schwieters CD, Lee VMY, George JM, Rienstra CM. 2016. Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α-synuclein. Nat Struct Mol Biol 23:409–415.
- 43. Lamacchia M, Dyrka W, Breton A, Saupe SJ, Paoletti M. 2016. Overlapping Podospora anserina Transcriptional Responses to Bacterial and Fungal Non Self Indicate a Multilayered Innate Immune Response. Front Microbiol 7:471.
- 44. Bergès T, Barreau C. 1989. Heat shock at an elevated temperature improves transformation efficiency of protoplasts from Podospora anserina. J Gen Microbiol 135:601–604.
- 45. Benkemoun L, Sabaté R, Malato L, Dos Reis S, Dalstra H, Saupe SJ, Maddelein M-L. 2006. Methods for the in vivo and in vitro analysis of [Het-s] prion infectivity. Methods 39:61–67.
- 46. Dos Reis S, Coulary-Salin B, Forge V, Lascu I, Bégueret J, Saupe SJ. 2002. The HET-s prion protein of the filamentous fungus Podospora anserina aggregates in vitro into amyloid-like fibrils. J Biol Chem 277:5703–5706.

			S	pontai	neous pri	on for	matio	n			induc	od pr	
	total			(days afte	r trans	fectio	n			for	eu pr matio	n
	moni-		5			11			19		1011	matio	· · ·
transgenes	tored	diffuse	foci		diffuse	foci		diffuse	foci		diffuse	foci	
	n	n	n	%	n	n	%	n	n	%	n	n	%
HELLP(214-271)-RFP	34	27	7	21	13	21	62	2	32	94	0	24	100
HELLP(214-271)-GFP	47	40	7	15	24	23	49	8	39	83	0	24	100
GFP-HELLP(214-271)	33	11	22	67	1	32	97	0	33	100	0	24	100
RIP3(444-469)-RFP	39	18	21	54	8	31	80	2	37	95	0	24	100
RIP3(444-469)-GFP	46	30	16	35	15	31	67	4	42	91	0	24	100
GFP-RIP3(524-551)	25	8	17	68	3	22	88	0	25	100	0	24	100
RIP1(524-551)-RFP	26	23	3	12	14	12	46	10	16	62	0	24	100
RIP1(524-551)-GFP	27	27	0	0	25	2	7	23	4	15	0	24	100
GFP-RIP1(524-551)	38	38	0	0	36	2	5	35	3	8	0	24	100
PNT1(1-31)-GFP	25	18	7	28				1	24	96	0	24	100
PNT1(1-31)-RFP	25	17	8	32				0	25	100	0	24	100

Table 1. Rate of spontaneous and induced prion formation and propagation

For each transgene between 25 to 47 different transformants were monitored by fluorescence microscopy for foci formation during 19 days. After 60 days 100% of the transformants (except RIP1-GFP (33 %) and GFP-RIP1 (16%)) displayed dots. At least two other transformation experiments were achieved for each transgene and generated 100% of tested transformants (n>10) with foci in fluorescence after 60 days except for RIP1-GFP (20%) and GFP-RIP1 (15%).

•	trancfor-			grow	rth befor	e infect	ion					gro	wth afte	r infecti	ion		
co-expressed transgenes	mants analvzed	nor	mal	alte	red	sub-le	sthal	tot abnoi	tal rmal	nor	mal	alte	red	sub-le	ethal	to1 abno	al rmal
(PFD/cell-death inducer)	(u)	c	%	ч	%	c	%	c	%	c	%	c	%	с	%	ч	%
GFP-RIP3(444-469)/ HELLP-RFP	15	14	63	H	7	0	0	ст Т	7	ĸ	20	6	60	ε	20	12	80
RIP3(444-469)-RFP/ HELLP-GFP	29	26	06	2	7	1	3	e	10	5	17	17	59	7	24	24	83
GFP-RIP3(444-469)/ HET-S-RFP	18	16	89	1	9	1	9	2	11	15	83	2	11	1	9	3	17
RIP3(444-469)-RFP/ HET-S-GFP	20	18	06	2	10	0	0	2	10	17	85	2	10	1	5	3	15
GFP-RIP1(524-551))/ HELLP-RFP	36	31	86	£	ø	2	9	ъ	14	7	19	20	56	6	25	29	81
RIP3(444-469)-RFP/ HELLP-GFP	30	27	06	2	7	1	£	ε	10	9	20	18	60	9	20	24	80
GFP-RIP1(524-551))/ HET-S-RFP	18	16	89	1	9	1	9	2	11	15	83	3	17	0	0	3	17
RIP1(524-551)-RFP/ HET-S-GFP	16	15	94	7	9	0	0	1	6	14	88	2	13	0	0	2	13
GFP(RIP3(444-459)/ CgHELLP-RFP	39	35	06	4	10	0	0	4	10	9	15	22	56	11	28	33	85
GFP-RIP1(524-551)/ HELLP-RFP	27	24	89	3	11	0	0	e	11	5	19	16	59	9	22	22	81
GFP-HELLP(214-271)/ HELLP-GFP	18	15	83	2	11	1	9	e	17	3	17	10	56	5	28	15	83
HELLP(214-271)-RFP/ HELLP-GFP	12	10	83	1	8	1	80	2	17	2	17	9	50	4	33	10	83
GFP-HELLF(209-277)/ HELLP-RFP	34	31	91	7	ю	1	ю	2	9	28	82	ю	6	ю	6	9	18
HELLF(209-277)-RFP/ HELLP-GFP	16	14	87	t1	9	1	9	2	13	13	81	2	13	7	9	3	19
HET-s-RFP / HELLP-GFP	16	15	94	0	0	1	9	1	9	14	88	1	9	1	9	2	13

Table 2. Growth alteration of strains co-expressing HELLP, CgHELLP or HET-S cell death inducing proteins and different prion forming domains prior and after prion infection.

Résultats Article 1



Fig.1. NRL signalosomes in fungi.

(A) Schematic representation of the NWD2/HET-S signalosome and the [Het-s]/HET-S incompatibility system. HET-S is a cell-death execution protein with the HeLo pore forming domain and a C-terminal prion forming domain comprising two pseudorepeats (R1 and R2) which is natively unfolded in the soluble state of the protein. HET-S can be activated by two distinct pathways. In [Het-s]/HET-S incompatibility, HET-s an allelic variant of HET-S with an inactive HeLo domain can switch from a soluble state ([Het-s]) to a prion state ([Het-s]). The prion forming domain of HET-s converts the corresponding domain of HET-S to the amyloid fold which induces activation of the HeLo domain which inserts into the membrane by formation of a N-terminal transmembrane helix and causes cell death. NWD2 is a NLR with a NACHT domain and WD-repeats and an N-terminal region homologous to the elementary PFD repeats (R0). Upon binding of a ligand to the WD-repeats, the NLR is proposed to oligomerize. Oligomerization leads to amyloid formation in the R0 region which is able to convert the corresponding region of HET-S and induce its toxicity. (B) Genome organization and domain architecture of the het-s/nwd2, hellf/fnt1 and hellp/pnt1 gene clusters of P. anserina and the hellp/sbp/pnt1 cluster of C. globosum. Chromosome, gene orientation and intergenic distances and protein size are given. These loci are composed of two adjacent genes encoding an effector protein and a NLR receptor. The effector proteins are composed of a PFD and a HeLo or HELL domain. The NLRs are composed of a PFD, a NB-ARC or NACHT nucleotide binding and oligomerization domain and of WD or TPR repeats (repeat numbers are variable in different wild-isolates and varied from 2 to 11, 4 to 11 and 4 to 10 in *nwd2, fnt1* and *pnt1* respectively). (C) Alignment of the PP motifs of HELLP, PNT1, CgHELLP, CgSBP, and CgPNT1 along with the RHIM motifs of human RIP1 and RIP3.

Résultats Article 1





(A) PP-motif region of HELLP behaves as a prion forming domain *in vivo* as shown on micrographs of *P. anserina* strains expressing different molecular fusions (HELLP(214-271-RFP/GFP, GFP-HELLP(214-271)) as indicated above each micrograph, (scale bar is 5 μ m). Transformants present initially a diffuse fluorescence in the non-prion state designated [π *] (left) and systematically acquire dot-like fluorescent aggregates after contact with a strain already expressing the infectious prion state designated [π] (right). (B) PP-motif forms fibrils *in vitro* as shown on electron micrograph of negatively stained HELLP(214-271) fibrils, (scale bar is 100 nm).). (C) ThT-fluorescence signal of HELLP(214-271) fibrils and a Buffer control were incubated with ThT and fluorescence was measured (excitation wavelength 440 nm and emission wavelength 480 nm). **: pvalue=0.0028 (Welch's test) D. X-ray diffraction pattern of unoriented HELLP(214-271) fibrils are given, the reflection at 4.7 Å is marked by an arrow.



Fig 3. Activation of HELLP cell-death inducing activity by $[\pi]$ prions.

(A) Observation of incompatibility reaction (barrage) between a strain containing [π] prions and expressing HELLP. Confrontation on solid medium of transformants expressing GFP-HELLP(214-271) in soluble [π^*] or aggregated [π] states with strains expressing full-length HELLP from a transgene (labelled in white) or from the wild type *hellp* gene or with the *△hellp* strain (both labelled in black). Barrages indicative of an incompatibility reaction, are marked by white arrows. The thinner arrow indicates an attenuated barrage reaction. (B) Micrographs of fusion cells co-expressing full-length HELLP (HELLP-GFP (upper panel) or HELLP-RFP (lower panel)), and HELLP(214-271)-RFP (upper panel) or GFP-HELLP(214-271) (lower panel) in the [π] aggregated state. Note that HELLP relocalizes to the cell membrane region in presence of [π], (scale bar is 5µm).

Résultats Article 1



Fig 4. PNT1(1-31) forms [π] prions, co-localizes with HELLP(214-271) and induces toxicity of full-length HELLP

(A) Micrographs of PNT1(1-31) fusions with GFP or RFP either in the diffuse $[\pi^*]$ (left) or foci $[\pi]$ state (right). (B) Micrographs showing co-localization of PNT1(1-31) and HELLP(214-271) in diffuse (top picture) or foci states. (C) In fusion cells co-expressing full-length HELLP (fused with RFP (upper panel) or GFP (lower panel)), and foci forms of PaPNT1(1-31) (fused with GFP (lower panel), or RFP, lower panel), HELLP relocalized to the plasma membrane region, (scale bar is 2 μ m).

Résultats Article 1





(A) Micrographs of strains co-expressing HET-s-RFP ([Het-s] or [Het-s^{*}] states, noted here [s^{*}] and [s]) and GFP-HELLP(214-271) ([π^*] or [π] state). Note an absence of co-localization of the prion forms and the independent occurrence of [π] and [Het-s], (scale bar is 5 µm). (B) Micrographs of strains co-expressing HELLF(209-277)-RFP ([Φ] or [Φ^*] state) and GFP-HELLP(214-271) ([π^*] or [π] state). Note an absence of co-localization of the prion forms and the independent occurrence of [π] and [Φ] (scale bar is 5 µm), (scale bar is 5 µm).



Fig 6. Co-localization of HELLP and CgHELLP PFDs and cross induction of cell-death activity. (A) Micrographs of strains co-expressing HELLP(214-271)-RFP and GFP-CgHELLP(215-278) in diffuse $[\pi^*]$ state (upper panels) or foci $[\pi]$ state (lower panels). Note the co-localization of the two prion forms, (scale bar is 5 µm). (B) Confrontation on solid medium of strains expressing GFP-HELLP(214-271) and GFP-CgHELLP(215-278) $[\pi]$ prions with strains expressing full-length HELLP from a transgene (marked in white) or from the wild type *hellp* gene or with the *△hellp* strain (both marked in black). Barrages indicative of an incompatibility reaction, are marked by a white arrow. The thinner arrow indicates an attenuated barrage reaction.

Résultats Article 1



Fig 7. *In vivo* prion propagation of the human RIP3 and RIP1 RHIM regions in *Podospora anserina*.

(A) Micrographs of *P. anserina* strains expressing the RIP3(444-469)-RFP, RIP3(444-469)-GFP or GFP-RIP3(444-469) molecular fusions in the diffuse ([Rhim*]) and foci state ([Rhim]), (scale bar is 5 μ m). (B) Micrographs of *P. anserina* strains expressing the RIP1(524-551)-RFP, RIP1(524-551)-GFP or GFP-RIP1(524-551) molecular fusions in the diffuse ([Rhim*]) and foci state ([Rhim]), (scale bar is 5 μ m).

Résultats Article 1



Fig 8. Cross conversion between HELLP(214-271) [π] and [Rhim] prions.

Histograms representing the percentage of $[\pi]$ and [Rhim] prion containing strains obtained after contact of recipient strains (initially displaying $[\pi^*]$ or [Rhim*] phenotype) with a $\Delta hellp\Delta het$ -s $\Delta hellf$ prion-free strain (control), a GFP-HELLP(214-271) $[\pi]$ strain or GFP-RIP3(444-469) or GFP-RIP1(524-551) [Rhim] strains (as indicated on top). Phenotype after induction was determined by monitoring the acquisition of foci by fluorescence microscopy. Percentages of prion formation were expressed as the mean value ± standard deviation on 4 distinct transformants for each genotype (resulting in 56 to 108 independent infections per genotype). Homotypic inductions are showed with striped lines. P-values for cross conversion were determined using two tails Fisher's test by comparison of the number of prion free and prion containing strains obtained after induction by the prion free control or by the heterotypic prion containing strain, (*: p-values <10⁻⁸, **: p-values <10⁻¹²).

Résultats Article 1



Fig 9. Co-localization of RIP1(524-551) and RIP3(444-469) foci in Podospora anserina.

(A) Micrographs of *P. anserina* strains co-expressing the RIP3(444-469)-RFP and GFP-RIP1(524-551) or GFP-RIP3(444-469) and RIP1(524-551)-RFP molecular fusions, (scale bar is 5 μ m). Note the strong co-localization between [Rhim] foci and dots alignment close to the septa (zoomed regions). (B) Micrographs of strains co-expressing GFP-RIP3(444-469) and RIP3(444-469)-RFP or GFP-RIP1(524-551) and RIP1(524-551)-RFP of [Rhim] phenotypes. Note the almost complete overlapping of foci of [Rhim] homopolymers, (scale bar is 5 μ m).

Résultats Article 1





(A) Micrographs of strains co-expressing RIP3(444-469)-RFP ([Rhim*] or [Rhim] states) and GFP-HELLP(214-271) ([π *] or [π] states). (B) Micrographs of strains co-expressing RIP1(524-551)-RFP ([Rhim*] or [Rhim] states) and GFP-HELLP(214-271) ([π *] or [π] states). In both cases, note the co-existence in the second lane of [Rhim] and [π *] (A) or [Rhim*] and [π] (B), these situations are only observable for a short period of time and upon prolonged subculture both prion forms occur together. Note also the partial co-localization of the two prions, some of the dots were zoomed to show incomplete overlapping in foci, (scale bar is 5 µm).

Résultats Article 1



After prion-infection

Fig 11. [Rhim] prions elicit self-incompatibility in strains co-expressing HELLP or CgHELLP and RIP1 or RIP3 RHIM

Comparison of growth on solid medium of strains co-expressing HELLP-RFP (HELLP) or CgHELLP-RFP (CgHELLP) and GFP-RIP1(524-551) (RIP1 RHIM) or GFP-RIP3(444-469) (RIP3 RHIM) before (left column) and after contact with a [Rhim] prion containing strain (right column, after prion-infection). Note that infection with [Rhim] prions leads to self-incompatibility with growth alterations ranging from a sublethal phenotype to a more or less stunted growth.

Supplemental information

Tables

Table S1A. $[\pi]$ prion propagation assayed in barrage tests.

				tester	strains	
testeo (prion r	d strain ecipient)	pre	vious contact with (prion donor)	∆hellp∆h	et-s∆hellf	recipient strain
recipient strain	transgene	recipient strain	transgene	HELLP-GFP	HELLP-RFP	transgene
			no transgene	0/12	0/12	
			GFP-HELLP(214-271) [π]	12/12	12/12	
∆hellp	GFP-HELLP	∆hellp	HELLP (214-271)-GFP [π]	12/12	12/12	
het-s°	(214-271) $[\pi^*]$	het-s°	HELLP (214-271)-RFP [π*]	0/12	0/12	
			HELLP (214-271)-RFP [π]	12/12	12/12	
			HELLP (171-271)-GFP [π]	12/12	12/12	
			GFP-HELLP (171-271) [π]	12/12	12/12	

Table S1B. Test of cross-conversion between $[\pi]^{PNT1(1-31)}$ and $[\pi]^{HELLP(214-271)}$ prions

				teste	er strains	
test (prion	ed strain recipient)	previo (p	ous contact with prion donor)	∆hellp∠	lhet-s∆hellf	recipient strain
recipient strain	transgene	recipient strain	transgene	HELLP-RFP	HELLP-GFP	transgene
			PNT1(1-31)-GFP [π]	12/12	12/12	
∆hellp	HELLP (214-271)-REP	∆hellp	PNT1(1-31)-GFP [π*]	0/12	0/12	
∆het-s∆hellf	[π*]	∆het-s∆hellf	PNT1(1-31)-RFP [π]	12/12	12/12	
			PNT1(1-31)-RFP [π*]	0/12	0/12	
∆hellp ∆het-s∆hellf	PNT1(1-31)-RFP [π*]	∆hellp ∆het-s∆hellf	GFP-HELLP (214-271) [π]	12/12	12/12	

The tables S1A and B gives the number of transformants producing a barrage reaction (after contact with the given prion donor strain), to two different tester strains expressing full-length HELLP (either as GFP or RFP fusion). For each transgene, 12 different transformants were tested and the experiment were done in triplicate. All triplicates were consistent.

				tester	strains	
teste (prion	ed strain recipient)	previo (p	ous contact with prion donor)	∆hellp∆h	et-s⊿hellf	recipient strain
recipient strain	transgene	recipient strain	transgene	HELLP-RFP	HELLP-GFP	transgene
			HET-s-RFP [Het-s]	0/12	0/12	
∆hellp ∆het-s∆hellf	HELLP (214-271)-GFP [π*]	∆hellp ∆het-s∆hellf	GFP-HELLF(209-277) [Φ]	0/12	0/12	
	[,,]		GFP-HELLP (214-271) [π]	12/12	12/12	
			HET-s-RFP [Het-s]	0/12	0/12	
∆hellp ∆het-s∆hellf	HELLP (214-271)-RFP [#*]	∆hellp ∆het-s∆hellf	GFP-HELLF(209-277) [Φ]	0/12	0/12	-
	[/r]	-	GFP-HELLP (214-271) [π]	12/12	12/12	-

Table S2A. Assay in barrage tests of $[\pi*]$ conversion by [Het-s] and $[\Phi]$ prions

The table gives the number of transformants producing a barrage reaction (after contact with the given prion donor strain), to two different tester strains expressing full-length HELLP (either as GFP or RFP fusion). For each transgene, 12 different transformants were tested and the experiment were done in triplicate. All triplicates were consistent.

Table S2B. Test of cross-induction of incompatibility between three *P. anserina* amyloid signaling systems

			tester strain		
teste	ed strains	Δ	hellp∆hets∆he	ellf	recipient strain
recipient strain	transgene	HET-S-GFP	HELLF-GFP	HELLP-GFP	transgene
∆hellp∆het-s∆hellf	HET-s-RFP	18/18	0/18	0/18	
∆het-s	HET-s(218-289)-GFP	18/18*	0/18	0/18	
∆hellp∆het-s∆hellf	HELLF(209-277)-RFP	0/18	18/18	0/18	
∆hellp∆het-s∆hellf	GFP-HELLF(209-277)	0/18	18/18	0/18	
∆hellp∆het-s∆hellf	HELLF(L52K)-GFP	0/18	18/18	0/18	
∆hellp∆het-s∆hellf	HELLP(214-271)-GFP	0/18	0/18	18/18	
∆hellp∆het-s∆hellf	GFP-HELLP(214-271)	0/18	0/18	18/18	
⊿hellp het-s°	GFP-CgHELLP(215-278)	0/18	0/18	18/18	

The table gives the number of transformants producing a barrage reaction to the given tester strains. For each transgene, 18 different transformants were tested and the experiment was done in triplicate. All triplicate were consistent. *As noted previously, HET-s(218-289)-GFP produces an attenuated barrage reaction to HET-S.

				tester	strains	
testeo (prion r	d strain ecipient)	previo (¢	ous contact with prion donor)	∆hellp het-s°	∆hellp ∆het-s∆hellf	recipient strain
recipient strain	transgene	recipient strain	transgene	CgHELLP- RFP	HELLP-RFP	transgene
		∆hellp ∆het-s∆hellf	none	0/12	0/12	
∆hellp ∆het-s∆hellf	GFP-HELLP (214-271) [π*]	∆hellp ∆het-s∆hellf	GFP-HELLP (214-271) [π]	12/12	12/12	
	[//]	∆hellp het-s°	GFP-CgHELLP (215-278) [π]	12/12	12/12	
		∆hellp ∆het-s∆hellf	none	0/12	0/12	
∆hellp het-s°	GFP-CgHELLP (215-278) [π*]	∆hellp ∆het-s∆hellf	GFP-HELLP (214-271) [π]	12/12	12/12	
	[,,]	∆hellp het-s°	GFP-CgHELLP (215-278) [π]	12/12	12/12	

Table S3A. Test of cross-conversion between $[\pi]^{P_a}$ and $[\pi]^{C_g}$ prions and induction HELLP and CgHELLP toxicity

The table gives the number of transformants producing a barrage reaction (after contact with the given prion donor strain), to two different tester strains expressing either full-length HELLP-RFP or full-length CgHELLP-RFP. For each transgene, 12 different transformants were tested and the experiment done in triplicate. All triplicates were consistent.

Table S3B. Cross-induction of HELL	P and CgHELLP cel	I death activity by $[\pi]$ prions.
------------------------------------	-------------------	-------------------------------------

			te	ester strains			
tested	strains	∆hellp ∆het-s∆hellf	∆hellp ∆het-s∆hellf	∆hellp ∆het-s∆hellf	wt	∆hellp het-s°	recipient strain
Recipient strain	Transgene	none	HELLP-RFP	HELLP-GFP	none	CgHELLP -RFP	transgene
∆hellp ∆het-s∆hellf	none	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18	
∆hellp ∆het-s∆hellf	GFP-HELLP (214-271)	0/18	18/18	18/18	18/18ª	18/18	
∆hellp ∆het-s∆hellf	GFP-HELLP (171-271)	0/18	18/18	18/18	18/18ª	18/18	
∆hellp ∆het-s∆hellf	HELLP (214-271)-RFP	0/18	18/18	18/18	18/18ª	18/18	
∆hellp het-s°	GFP-CgHELLP (215-278)	0/18	18/18	18/18	0/18	18/18	
∆hellp het-s°	CgHELLP (170-278)-RFP	0/18	18/18	18/18	0/18	18/18	

The table gives the number of transformants producing a barrage reaction to the given tester strains (^a barrage was attenuated). For each transgene, 18 different transformants were tested and the experiment was done in triplicate. All triplicates were consistent.

Table S4A. Occurrence of the different phenotypes observed using fluorescence

co-expressed	phenotypes	independent	number of
transgenes	[Het-s*][π*]	30	148
	[Het-s] [π*]	14	124
HEI-S HELLP(214-271)	[Het-s*] [<i>π</i>]	21	127
	[Het-S][/]	17	1.11
	[Het-s] [π]	17	141
	[φ*] [π*]	18	85
HELLF(209-277)	[φ] [π*]	13	68
HELLP(214-271)	[φ*] [π]	17	87
	[φ] [π]	18	82
HELLP(214-271)	[π*] [π*]	6	36
CgHELLP(215-278)	[π] [π]	10	56
PNT1(1-31)	[π*] [π*]	9	88
HELLP(214-271)	[π] [π]	12	71
RIP3(444-469)	[Rhim*] [Rhim*]	2	14
RIP3(444-469)	[Rhim] [Rhim]	23	178
RIP3(444-469)	[Rhim*] [Rhim*]	16	85
RIP1(524-551)	[Rhim] [Rhim]	27	123
	[Rhim*] [π*]	5	27
RIP3(4444-469)	[Rhim] [π*]	6	33
HELLP(214-271)	[Rhim*] [π]	3	18
	[Rhim] [π]	32	170
	[Rhim*] [π*]	12	71
RIP1(524-551)	[Rhim] [π*]	6	36
HELLP(214-271)	[Rhim*] [π]	20	95
	[Rhim] [π]	10	48

Prion phenotypes are defined by presence of foci of the corresponding fusion protein.

					number	of dots	
				at least co-loo	partially calized	not co-	localized
co-expressed transgenes	co-expressed prions	independent observations	number of cells observed	n	%	n	%
HET-s HELLP(214-271)	[Het-s] [π]	17	141	50	5.1	925	94.9
HELLF(209-277) HELLP(214-271)	[φ] [π]	18	82	33	4.7	663	95.3
HELLP(214-271) CgHELLP(215-278)	[π] [π]	10	56	428	90.5	45	9.5
PNT1(1-31) HELLP(214-271)	[π] [π]	12	71	222	94.1	14	5.9
RIP3(444-469) RIP3(444-469)	[Rhim] [Rhim]	23	178	524	96.0	22	4.0
RIP3(444-469) RIP1(524-551)	[Rhim] [Rhim]	27	123	462	82.1	101	17.9
RIP3(444-469) HELLP(214-271)	[Rhim] [π]	32	170	330	68.2*	154	31.8
RIP1(524-551) HELLP(214-271)	[Rhim] [π]	10	48	293	67.4*	142	32.6

Table S4B. Count of co-localized foci observed by fluorescence microscopy during coexpression experiments.

Counts of co-localized dots correspond to counts of foci with perfect or partial superposition of GFP and RFP whereas counts of not co-localized dots correspond to the number of isolated GFP dots plus the number of isolated RFP dots. * p-values were determined using two tails Fisher's test by comparison of the number of co-localized dots in [Rhim] / [π] co-expressions to the number of not co-localized dots for non-cross interacting prion combination ([Het-s]/[π] or [ϕ]/[π]) and were <10⁻¹⁰).



Supplemental figures



Alignment of the HET-S HeLo domain and the HELLF and HELLP HELL domains of *P. anserina* with the 4HB region of the human MLKL. Alignment was generated with clustal omega with default settings.



Fig S2. $[\pi]$ prion propagation of longer HELLP constructs.

(A) Micrographs of *P. anserina* strains expressing HELLP(171-271)-GFP or GFP-HELLP(171-271) as indicated above each micrograph (scale bar is 5 μ m). Transformants presenting a diffuse fluorescence in the non-prion state designated [π^*] (left) and dot-like fluorescence after contact with a [π] strain (right). (B) Barrage tests showing conversion of [π^*] strains (expressing either HELLP(214-271)-GFP or HELLP(171-271)-GFP) to the [π] phenotype by contact with strains expressing GFP-HELLP(214-271) in the [π] state.

Résultats Article 1





Résultats Article 1



Fig S4. Absence of co-localization HELLP(214-271)-RFP and HELLF(209-277)-GFP foci. Micrographs of strains co-expressing HELLP(214-271)-RFP ([π^*] or [π] state) and HELLF(209-277)-GFP ([Φ^*] or [Φ] state). Note that HELLP(214-271)-RFP and HELLF(209-277)-GFP foci do not co-localize ([Φ] and [π]) and the existence of cells in which one of the fusion protein forms foci while the other remains diffuse, (scale bar is 5 µm).

Résultats Article 1



Fig S5. Partial co-localization HELLP(214-271)-RFP foci and GFP-RIP1(524-551) and GFP-RIP3(444-469) foci.

(A) Micrographs of strains co-expressing GFP-RIP3(444-469) ([Rhim*] or [Rhim] states) and HELLP(214-271)-RFP ([π *] or [π] states). (B) Micrographs of strains co-expressing GFP-RIP1(524-551) ([Rhim*] or [Rhim] states) and HELLP(214-271)-RFP ([π *] or [π] states). In both cases, note the co-existence on the second lane of [Rhim] and [π *] (A) or [Rhim*] and [π] (B),. Note the partial co-localization of the foci; some of the foci were magnified to show incomplete overlap of the fusion protein, (scale bar is 5 µm).

Résultats Article 1





(A) Induction of [Rhim] prion by cross conversion of [Rhim*] by $[\pi]^{cg}$ or [Rhim] prions. Histogram representing the percentage of [Rhim*] strains displaying [Rhim] phenotype after contact with a $\Delta hellp \Delta het-s \Delta hellf$ prion free strain (control), a GFP-CgHELLP(215-278) [π] containing strain or a GFP-RIP3(444-469) or GFP-RIP1(524-551) [Rhim] containing strains (indicated on top). Strains phenotype after induction was determined by monitoring the acquisition of dot-like aggregates by fluorescence microscopy. Homotypic interactions shown with striped lines. Percentages of prion formation were expressed as the mean value ± standard deviation for 3 to 5 independent experiments on 4 different

transformants. P-values for cross conversion were determined using two tails Fisher's test by comparison of the number of prion free and prion containing strains obtained after induction by the prion free control or by the heterotypic prion containing strain and are <10⁻⁸. (B) Partial co-localization of $[\pi]$ Cg and [Rhim] prions *in vivo*. Micrographs of strains co-expressing RIP3(444-469)-RFP or RIP1(524-551)-RFP ([Rhim*] or [Rhim] states) and GFP-CgHELLP(215-278) ([π *] and [π] state). Note the co-existence of [Rhim*] and [π], this situation is only observable for a short period of time, showing a low conversion rate of [Rhim*] by [π] prion. Note the partial co-localization of the two prions, some of the dots were zoomed to show incomplete overlapping, (scale bar is 5 µm).

2 ARTICLE 2: « Identification of NLR-associated amyloid signaling motifs in filamentous bacteria »

Une analyse bioinformatique effectuée par Sven Saupe, avec Witold Dyrka, dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de ce dernier, a permis d'identifier des motifs présentant des caractéristiques communes avec les motifs RHIM et PP, dans les bactéries filamenteuses. La découverte notable de cette recherche est le fait que ces nouveaux motifs amyloïdes ont été trouvés quasiment exclusivement dans des bactéries filamenteuses, essentiellement des actinobactéries et des cyanobactéries, posant la question du lien entre la présence de ces systèmes et la multicellularité. Ces motifs sont présents dans un contexte génique similaire aux systèmes fongiques, c'est-à-dire qu'ils sont associés d'une part à un effecteur portant un domaine de mort putatif qui a été nommé BELL (pour <u>b</u>acterial domain analogous to H<u>ELL</u>), et d'autre part à un NLR prédit codé par le gène adjacent. Une recherche exhaustive de ces systèmes a permis d'identifier dix familles de motifs très divergents qui ont été nommés BASS (pour bacterial amyloid signaling sequences). L'une d'entre elles, la famille BASS3, est apparentée aux motifs PP et RHIM. Ce travail est décrit dans l'article ci-dessous.

Puis, afin de déterminer si ces motifs étaient bien des motifs de signalisation amyloïde fonctionnels, des études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées. Ces études ont porté sur des motifs de la famille BASS3, proche des RHIM, et sur la famille présentant la plus grande occurrence, BASS1. Les études *in vitro* ont permis de montrer que ces motifs sont capables de former des fibres présentant des caractéristiques amyloïdes, et des études en RMN du solide et en diffraction aux rayons X montrent que le motif BASS1 présente une structure hautement ordonnée en feuillets β comparable à celle du domaine prion fongique HET-s(218-289) (Ritter et al., 2005; Siemer et al., 2005). Nous avons ensuite montré que ces motifs se comportent comme des prions dans le modèle fongique *P. anserina*, et que les motifs associés aux NLRs sont capables de convertir les motifs BASS associées aux BELL correspondants en prions. Ce dernier résultat montre une interaction fonctionnelle entre les motifs BASS du tandem NLR/BELL, ce qui est en accord avec la proposition selon laquelle ces systèmes sont comparables aux systèmes de signalisation amyloïde fongiques. Enfin, il a été montré que les motifs BASS3 sont capables d'interactions croisées au moins partielles avec les motifs PP et RHIM suggérant une conservation évolutive à long terme de ces motifs amyloïdes des bactéries aux champignons et aux animaux. Ce travail est présenté dans l'article qui suit.

Ma contribution dans ce projet a été tout d'abord de déterminer le caractère prion de deux motifs amyloïdes RHIM appartenant à la famille BASS3. Ces motifs appartiennent aux actinobactéries *Streptomyces atratus* et *Nocardia fusca*. Ce sont des bactéries gram-positives produisant des structures filamenteuses et retrouvées principalement dans des sols riches en matière organique, tels que sur la végétation en décomposition. Les streptomyces ne sont en général pas pathogènes pour l'homme mais peuvent dans de rares cas être à l'origine d'infections opportunistes, de même pour les Nocardia, qui sont pour la plupart des pathogènes à faible pouvoir de virulence. J'ai exprimé *in vivo* chez *Podospora* ces motifs et démontré leur caractère prion. J'ai déterminé par des expériences de co-expression qu'ils peuvent interagir entre eux, et à des degrés divers avec les motifs PP de *P. anserina* et de *C. globosum*, ainsi qu'avec le motif RHIM de la protéine RIP3K (je n'ai pas réalisé les expériences portant sur RIP1K). J'ai également exprimé les protéines entières BELL de *S. atratus, N. fusca* et *S. coelicolor* chez *P. anserina* et constaté que la présence du domaine effecteur inhibe fortement le passage à l'état prion, comme cela a été montré pour les protéines fongiques à domaine HeLo ou HELL (Seuring et al., 2012; Daskalov et al., 2016). Ceci suggère que le domaine BELL pourrait comme les domaines fongiques être impliqué dans des phénomènes de mort cellulaire. Cet aspect sera abordé dans le chapitre suivant.

Cet article a été accepté pour publication dans le journal JMB et est actuellement sous presse.

Identification of NLR-associated amyloid signaling motifs in bacterial genomes

Witold Dyrka², Virginie Coustou¹, Asen Daskalov⁴, Alons Lends⁴, Thierry Bardin¹, Mélanie Berbon³, Brice Kauffmann⁵, Corinne Blancard³, Bénédicte Salin³, Antoine Loquet⁴ and Sven J. Saupe¹

¹ Non-self recognition in fungi, Institut de Biochimie et de Génétique Cellulaire, UMR 5095 CNRS, Université de Bordeaux, 1 rue Camille Saint Saëns, 33077 Bordeaux CEDEX, France, <u>sven.saupe@ibgc.cnrs.fr</u>, corresponding author

² Politechnika Wrocławska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki Katedra Inżynierii Biomedycznej Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, Poland

³ Institut de Biochimie et de Génétique Cellulaire, UMR 5095 CNRS, Université de Bordeaux, 1 rue Camille Saint Saëns, 33077 Bordeaux CEDEX, France

⁴ Institute of Chemistry & Biology of Membranes & Nanoobjects, UMR5248 CBMN, IECB, CNRS, Université de Bordeaux, Allee Geoffroy Saint-Hilaire, 33607 Pessac, France

⁵ IECB, UMS 3033, US 001, CNRS, Université de Bordeaux, 2 rue Robert Escarpit, 33607, Pessac, France

Keywords

Signal transduction, programmed cell death, actinobacteria, cyanobacteria, multicellularity

Abstract

In filamentous fungi, amyloid signaling sequences allow Nod-like receptors (NLRs) to activate downstream cell-death inducing proteins with HeLo and HeLo-like (HELL) domains and amyloid RHIM and RHIM-related motifs control immune defense pathways in mammals and flies. Herein, we show bioinformatically that analogous amyloid signaling motifs exist in bacteria. These short motifs are found at the N-terminus of NLRs and at the C-terminus of proteins with a domain we term BELL. The corresponding NLR and BELL proteins are encoded by adjacent genes. We identify 10 families of such bacterial amyloid signaling sequences (BASS), one of which (BASS3) is homologous to RHIM and a fungal amyloid motif termed PP. BASS motifs occur nearly exclusively in bacteria forming multicellular structures (mainly in Actinobacteria and Cyanobacteria). We analyze experimentally a subset of seven of these motifs (from the most common BASS1 family and the RHIM-related BASS3 family) and find that these sequences form fibrils in vitro. Using a fungal in vivo model, we show that all tested BASS motifs form prions and that the NLR-side motifs seed prion-formation of the corresponding BELL-side motif. We find that BASS3 motifs show partial prion cross-seeding with mammalian RHIM and fungal PP-motifs and that proline mutations on key positions of the BASS3 core motif, conserved in RHIM and PP-motifs, abolish prion formation. This work expands the paradigm of prion amyloid signaling to multicellular prokaryotes and suggests a long-term evolutionary conservation of these motifs from bacteria, to fungi and animals.

Introduction

NLRs are intracellular receptors controlling innate immunity and host-symbiont interactions, both in plants and animals [1, 2]. NLR proteins have a typical tripartite architecture with an N-terminal effector domain, a central (NACHT or NB-ARC) nucleotide binding and oligomerization domain and a C-terminal leucine-rich repeat (LRR) domain. Filamentous fungi also display large and diverse repertoires of up to several hundreds NLR-related genes per genome [3]. These fungal NLR homologs however display WD40, ANK or TPR repeats as ligand recognition domains instead of LRRs found in most plant and animals NLRs [3, 4]. Fungal NLRs were found to control programmed cell death associated with non-self recognition in several fungal species [5-10]. These proteins are considered the fungal counterparts of plant and animal NLRs [3]. Remarkably some fungal NLRs employ an amyloid signaling mechanism to engage cell death inducing effector proteins [11]. These NLRs display a short 20-25 amino acid long N-terminal amyloid forming motif upstream of the NACHT (or NB-ARC) domain while their cognate effector protein displays a similar motif C-terminally. The amyloid fold of the activated NLR receptor serves as a structural template to convert the homologous region in the effector protein to a similar amyloid fold [7, 12, 13]. This signaling mechanism based on the prion principle (self-propagation of protein polymers) is also operating in several immune signaling cascades in mammals, albeit with a different underlying structural basis [14]. In fungi, NLR and their cognate regulated effector proteins are typically encoded by adjacent genes and thus form functional gene pairs or clusters [13, 15, 16]. Several classes of fungal amyloid signaling motifs have been described. HRAM motifs (for HET-s Related Amyloid Motifs) (Pfam PF11558) were originally identified in the [Hets] prion of Podospora anserina and have been subject to in-depth functional and structural characterization [7, 15, 17, 18]. HRAMs form a β -solenoid amyloid fold comprising 21 amino acid long pseudo-repeats, with one repeat copy on the NLR and two copies on the effector protein [19]. Another family of signaling amyloids is defined by the sigma motif, involved in the propagation of the σ cytoplasmic infectious element of Nectria haematococca [13, 20] (Pfam PF17046). Finally, the PP-motif (for pseudo-palindrome) was described in *Chaetomium globosum* and displays a sequence similarity with the mammalian RHIM amyloid sequence scaffolding the RIP1K/RIP3K necrosome [16, 21, 22]. RHIM and RHIM-related motifs were also identified in viruses and Drosophila [23, 24]. The similarity between the metazoan RHIM and fungal PP-motifs raised the possibility of an ancient evolutionary origin of this mechanism of cell death-inducing amyloid signaling [16, 25]. The relation between RHIM and PP is further supported by the observation that RHIM and PP-amyloids partially cross-seed in vivo [26].

Several types of downstream effector protein domains activated by NLR-mediated amyloid signaling were described [3, 13] but the most common are part of a family of membrane targeting

proteins including the HeLo, HELL (HeLo-like) and SesA domains (Pfam PF14479, PF17111 and PF17707 respectively). The HeLo domain forms an α -helical bundle with an N-terminal hydrophobic helix and functions as a membrane targeting pore-forming domain [27, 28]. The fungal HeLo/HeLo-like/SesA domain family shows homology with the N-terminal helical cell-death execution domain of the MLKL protein controlling mammalian necroptosis and the RPW8 and Rx-N CC-domains regulating plant immune cell death [16, 29]. The homology between the membrane-targeting domains suggests a common evolutionary origin for these defense-related programmed cell death processes in plants, animals and fungi. The plant Rx_N and the HET-S HeLo domain share a common mechanism of membrane targeting based on the membrane insertion of a hydrophobic N-terminal α -helix [27, 30]. Other amyloid-controlled effector domains in fungi are predicted to carry enzymatic activity, in particular the SesB α/β hydrolase domain and the PNP-UDP phosphorylase domain [13, 16]. Noteworthy is the observation that fungal NLRs are found in two distinct domain architectures, either as two-component gene clusters involving amyloid signaling or more frequently in an "all-in-one" architecture with the effector/NOD/repeat domains encoded as single polypeptide [3, 13].

Several bacterial proteins have received a RHIM amyloid motif annotation in the Pfam or InterPro databases [22, 31]. We have analyzed the corresponding protein sequences and found that the region annotated as RHIM occurs in a similar genomic context as fungal amyloid signaling motifs. The motif occurs at the N-terminus of a NLR-like protein and at the C-terminus of a putative effector protein encoded by an adjacent gene. Here, we systematically explore in a genome mining approach the occurrence of putative amyloid signaling sequences in bacterial and archaeal genomes and identify ten families of bacterial amyloid signaling sequences (named here BASS1 to 10). We find these motifs mainly in multicellular bacteria in particular in *Actinobacteria* and *Cyanobacteria*. We test representatives of the BASS1 and BASS3 families for fibril formation *in vitro* and prion propagation in the *Podospora anserina* fungal model. We propose that NLR-associated BASS motifs are analogous to the amyloid prion motifs identified in fungi and that this signaling mechanism is shared by filamentous fungi and filamentous bacteria.

Results

RHIM-like motifs in Bacteria

In the Pfam database, the majority of the sequences with a RHIM annotation are from Metazoan or Metazoan viruses [21, 23-25, 32]. A few hits (24/286) however occur in Bacteria. We examined these bacterial RHIM-annotated proteins and found that ten of them are homologous proteins with the RHIM annotation occurring C-terminally, downstream of ~100 amino acid long predicted α -helical domain that we termed BELL (for <u>b</u>acterial domain analogous to H<u>ELL</u>, based on shared features with

the fungal HeLo-related domains, see below). In the actinobacterium strain *Saccharothrix* sp. ALI-22-I, the gene adjacent to the gene encoding the BELL/RHIM protein (ONI86675.1) encodes a protein with NLR architecture (NB-ARC domain and TPR repeats) (ONI86674.1). Remarkably, the N-terminal region of this NB-ARC/TPR protein shows sequence homology to the C-terminal RHIM-annotated region of the BELL-domain protein (Fig. 1A and B). The ONI86675.1/ ONI86674.1 bacterial gene pair from *Saccharothrix* therefore displays the same features as effector/NLR gene pairs described in filamentous fungi [7, 13]. This similarity prompted us to analyze further BELL domain proteins in bacterial genomes.

BELL-domain occurs in multicellular Bacteria and Archaea

The predicted globular BELL domain of the ONI86675.1 protein from *Saccharothrix* was used as query in HMMER searches to recover homologous proteins. We found that the BELL-domain occurs mainly in ~120-140 amino acid long proteins and in more rare instances as N-terminal domain of proteins with a NLR domain architecture (as previously described for HeLo, HeLo-like and SesA domains) [3]. An alignment of BELL domain proteins from phylogenetically diverse prokaryotes including a sequence from an Archaea (*Methanothrix soehngenii*) is presented Figure 1C. The Nterminal region of the domain shows frequent occurrence of a negatively charged residue in position 2 or 3, a feature that is common to fungal HeLo, HELL domains, mammalian MLKL and plant RPW8 and Rx_N domains (Fig.1D, E and F) [16, 33]. Using contact prediction maps based on evolutionary covariance, the Bell domain of *Saccharothrix* sp. ALI-22-I ONI86675.1 was modelled as a five-helix bundle (Fig.1 F). Secondary structure and fold prediction for the different proteins presented in the alignment in Fig. 1C resulted in five-helix bundles for all proteins although in some cases with different topologies (Fig. S1).

We analyzed the phylogenetic distribution of the BELL domain in prokaryotic genomes using the genome-based phylogeny developed by Parks et al. which has been shown to be more accurate than the NCBI taxonomy [34]. The domain shows a heterogeneous phylogenetic distribution (Table 1, Table2, Table S1). It is most frequent in the *Cyanobacteriota, Actinobacteriota* and *Chloroflexota* (present is respectively 33, 7 and 4% of the sequenced genomes) but very rare or absent in other bacterial phyla. Within these phyla, the domain is specifically present in genera containing multicellular species (described in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) (Table S1). In the *Actinobacteria* class, the domain is frequent in families encompassing filamentous species (the domain occurs in 51% of *Streptomycetaceae*, 26% of the *Micromonosporaceae*, 46% of the *Pseudonocardiaceae*, 33% of the *Streptosporangiaceae*, 22% of the *Frankiaceae* and 2% of the *Corynebacteriaceae*) but absent in unicellulars such as the *Bifidobacteriaceae* and *Propionibacteriaceae* (Table 2, Table S1). The same is

true at higher phylogenetic resolution, within the *Corynebacteriaceae* family for instance, the domain is highly represented only in the *Nocardia* and *Dietzia* genera encompassing filamentous species (present in 35% and 21% of the genomes respectively) (Table S1). In the *Cyanobacteriota*, the domain is highly represented in the *Nostocaceae* family (found in 67% of the genomes) and present in multicellular genera like *Nostoc, Calothrix, Microcystis* or *Fischerella* but absent in the *Cyanobiaceae* family encompassing unicellular genera like *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (Table 2, Table S1) [35]. In the *Chloroflexota*, the domain is specific to the *Chloroflexus* genus (present in 66% of the genomes) encompassing filamentous species like *Chloroflexus auranticus* and *Chloroflexus aggregans*. Similarly, in Archaea, the BELL domain is found exclusively in the *Methanosarcinales* order, in particular in the genus *Methanosarcina* comprising multicellular species forming cell aggregates like *Methanosarcina acetivorans* (Table S1).

The phylogenetic distribution of the BELL domain is mirrored by the distribution of NLR-like architecture proteins (here a NB-ARC or NACHT domain associated with TPR or WD repeats) (Table 1, Table S1). The NLR-like domain architecture is frequent in phylogenetic groups in which the BELL domain is represented (for instance in *Actinobacteriota* and *Cyanobacteriota*) but rare or absent in groups lacking BELL domains (for instance *Proteobacteria* or *Firmicutes*) (Table 1). The same is true at higher phylogenetic resolution (Table 2, Table S1). For instance, in *Cyanobacteriota*, the NLR-like architecture is not found in *Cyanobiaceae* but is prevalent in *Nostocaceae*. Similarly, in Archaea, in *Methanosarcina*, the NLR-like architecture is abundant but rare or absent in other genera. The phylogenetic distributions of NLR-like architectures and BELL domain do not fully overlap though, as for instance the BELL domain is not found in the phylum *Myxococcota* where NLR-like architectures are present. Conversely, the genus *Janthinobacterium* contains many BELL domains but lacks NLR-like architectures in *Cyanobacteria* of NLR-like architectures of NLR-like architectures in *Cyanobacteria* of NLR-like architectures in *Cyanobacteria* of NLR-like architectures (NB-ARC/NACHT with TPR/WD repeats) was reported previously [4, 36, 37].

Overall, the BELL domain was found in roughly 1% of the analyzed bacterial genomes (1237 of 113 324) and 10% of the archaeal genomes (94/1183). The domain appears to be typical of Bacteria and Archaea with a multicellular organization either in filamentous or aggregate forming species. In addition, the phylogenetic distribution of the BELL domain proteins is largely mirrored by the phylogenetic distribution of proteins with NLR-like architectures.

Prediction of amyloid signaling sequence motifs in bacterial genomes

Amyloid signaling motifs in fungi occur in adjacent gene pairs [13]. Based on the observed BELLRHIM/NLR-like gene pairs (Fig. 1A), we hypothesized that an amyloid signaling mechanism akin to the one described in filamentous fungi might also operate in some bacterial species. To identify

potential amyloid signaling motifs in bacteria we extended a genome mining strategy that we have previously developed to identify amyloid signaling motifs in fungi [13, 15, 16]. We screened for sequence motifs common to C-termini of BELL-domain proteins and N-termini of NLR-like proteins, which are encoded by adjacent (or closely linked) genes. Specifically, we generated a data set of 1816 non-redundant Ctermini of prokaryotic BELL-domain proteins, searched for conserved gapless motifs using MEME and identified 117 motifs (a general flowchart of the bioinformatics procedure is given Fig. S2). For each of the conserved motifs, we created a profile HMM (pHMM) signature generalizing the motif as described in detail in the Methods section. Next, we identified all NB-ARC and NACHT domain proteins encoded by genes in the genomic vicinity (within 5 kbp) of the genes encoding our set of BELL-domain proteins. Then, we analyzed N-termini of these NLR-like proteins for occurrences of the pHMM-signatures of BELL-associated C-terminal motifs. We found that half of the motifs identified at least one gene pair encoding a BELL-domain protein and a NACHT/NB-ARC protein. To be more stringent in our analyses, we focused further investigations only on motifs that identified at least 5 non-redundant gene pairs which reduced our set to 29 motifs (comprising up to 75 non-redundant gene pairs per motif) (Table S2). The motifs were clustered based on the overlap between the matched gene pairs (Fig. S3). When at least half of the gene pairs identified for a given motif were also matched by another motif, the two motifs were considered related and were grouped in the same motif cluster. The procedure led to identification of nine clusters (some of which comprised in fact a single motif) (Fig. S3). Table S3 gives a list and an alignment of all the motif sequences grouped by cluster. In each cluster, we selected a representative motif on the basis of the number of underlying sequences (Fig. 2). The motifs families defined by each cluster were termed BASS families (for bacterial amyloid signaling sequence) (Fig. 2, Fig. S3). As expected, we recovered the already identified RHIM-related motif represented by 19 gene pairs (BASS3). We also carried out an inverse screen in which we looked for conserved gapless motifs in N-terminal sequences of the NB-ARC/NACHT protein set, generated pHMM signatures for the extracted motifs, and searched for their occurrences in C-termini of the BELL proteins (Fig. S2). We retained 12 motifs identifying at least five non-redundant gene pairs and clustered these motifs within the previously defined clusters. While eleven grouped to one of the nine previously identified families (Fig. S3), one novel motif did not, and is thus defining an additional family, we term BASS10 (Fig. 2).

We complemented the search with an alternative procedure consisting of the local pairwise alignment of adjacent BELL C-termini and NLR N-termini. Highly conserved pairs of a length of at least 15 amino acids were found in 283 gene pairs including 44 pairs not matched previously with the BASS1 to 10 motifs. In this number were two pairs from archaeal Methanosarcinales species (Table S2).

We analyzed the distance and the relative orientation between the BELL encoding gene and the adjacent NLR-encoding gene in our set of 346 matching gene pairs (Table S2). Genes were collinear in

91.3% of the cases. In most collinear gene pairs, the distance between the genes was very small, in 57% of the cases the distance between the two ORFs was 10 bp or less and in 42% of the cases the two ORFs overlapped. In one extreme case, in *Spirosome oryzae*, the BELL domain encoding gene and the NLR-encoding gene overlapped by 57 bp. Gene overlaps are not uncommon in prokaryotes, roughly 20% of the collinear gene pairs overlap, [38]. It is likely that the BELL and NLR-encoding genes pairs with short intergenic distances or gene overlaps are transcribed as polycistronic messenger RNAs reflecting the possible functional link and/or co-regulation between the genes in the pair.

Paired BASS motifs occur in multicellular species

As expected from the distribution of BELL-domains and NLRs, the vast majority of BASS-motifs pairs occur in Actinobacteria and Cyanobacteria (Table S1) with the filamentous genus Streptomyces dominating the data set with 105 pairs (Table S2). Some motifs appear specific to Actinobacteria (BASS 1, 2) others to Cyanobacteria (BASS 7, 8, 9, 10), others occur in both classes (BASS 3, 4, 5, 6), (Table S2). All actinobacterial hits occur in filamentous species with the possible exception of Arthrobacter sp. Rue61a. No direct information on the growth morphology for this specific strain could be recovered but the corresponding genus is described as unicellular. The hits in Cyanobacteria correspond essentially to multicellular filamentous species (Nostoc, Pseudoanabaena, Calothrix, Aulosira, Tolothrix, Leptolyngbya genera). Some species with hits (Microcystis aeruginosa and Crocosphaera watsonii) are described as unicellular (non-filamentous) Cyanobacteria but are also found in multicellular aggregates. One hit was found in Cyanothece sp. PCC 7424 which is a unicellular strain reported to form large amounts of mucilage, as well as in Chamaesiphon minutus PCC 6605 a unicellular species forming epiphytic colonies on aquatic plants. Cyanothece, Microcystis, Crocosphaera and Chamaesiphon are however distinct from the main group of unicellular Cyanobacteria (Prochlorococcus, Synechococcus) in terms of phylogenetic position and abundance of secondary metabolism clusters and homologs of AmiC involved in multicellular growth [35]. The remaining gene pairs occur in Archaea, Bacteriodetes and Chloroflexi, in multicellular species, which are either filamentous (like the Chloroflexi Ktedonobacter racemifer) or existing as cellular aggregates (like the Archaea Methanosarcinales species). We conclude that matching BASS-motif pairs occur with a wide phylogenetic distribution but in the vast majority of cases in multicellular strains and genera.

Sequence analysis of BASS motifs

BASS motifs were typically around 25 amino acid in length (Fig. 2). All motifs have a predicted propensity for β -sheet formation (of note is the fact that this criterion was not used for their identification). The sequence logos of the motifs show conservation of G, N and Q residues as well as

charged residues and conserved patterns of hydrophobic residues. In comparison to the total of Uniprot entries, the motifs are enriched for Q, N, G, V and I and depleted in K, P and L (Table S4). Kajava and co-workers have reported a similar bias in amino acid composition of β -helical proteins with enrichment in N, V and G and depletion in P and L [39]. Fungal amyloid motifs of the HRAM, sigma and PP family share a similar bias in composition, residue conservation and length [13] (Table S4).

Algorithms predicting amyloid propensity derived from the analysis of pathological amyloids generally perform poorly when run on fungal functional amyloid motifs [40]. In contrast, the ArchCandy program predicting propensity to form β -arch structures shows good performance for pathological amyloids but also in the case of fungal functional amyloid motifs [41]. We thus evaluated the amyloid propensity of BASS motif containing proteins with ArchCandy and found that their amyloid propensity scores were comparable to those calculated for a selection of validated fungal amyloid motifs and human RHIM-motifs (Fig. S4) (BASS1 and BASS3 scored below the recommended stringent score threshold (0.575) but this was also the case for an HRAM5 fungal prion motif [15]). In each case, the high scoring region matched the position of the identified BASS motif. Based on this analysis, the identified bacterial motifs are predicted to have amyloid forming propensity (note again that they were not selected on this criterion).

The fungal HRAM motifs exemplified by the HET-s prion-forming domain present a two-fold pseudorepeat of the motif in the effector protein [7, 42]. The two pseudorepeats are separated by a variable flexible glycine and proline-rich loop of 6-15 amino acids in length [15, 17]. We find that some BASS motifs also occur as pseudorepeats. In proteins pairs of different *Streptomyces* species, BASS1 and 6 motifs are present in the BELL-domain protein as two (or three) pseudorepeats separated by a variable proline-rich region and as a single repeat in the corresponding NLR (Fig. S5). These motifs thus are similar in this respect to fungal HRAM motifs.

Fungal amyloid signaling motifs can be associated to other effector domains not related to the HeLo-family (HeLo, HeLo-like, SesA) but equally encoded by NLR/effector gene pairs [3, 13, 16]. These domains include α/β -hydrolase and PNP-UDP phosphorylase domains. We wondered therefore whether BASS motifs could also be associated to domains distinct from BELL. Thus, we analyzed the occurrence of identified BASS motifs in gene pairs encoding a NLR and a second protein, for which the motif is found in the C-terminal region next to a domain distinct from BELL. At least four such situations were identified with BASS motifs associated to the following domains: a α/β -hydrolase domain, the TIR2 domain, the CHAT metacaspase domain and a guanylate cyclase domain (Fig. S6). All identified examples were found in multicellular species. Bacterial genomes contain genes in which the same effector domains are found in an "all-in-one" association, where the effector domain is directly associated to the NOD and repeat domains of the NLR-like protein, as describe previously for fungal NLRs [13]. While some of these domains have rather general functions, it is of interest to note that all
these domains (α/β -hydrolase, TIR2, CHAT and guanylate cyclase) are to various extends documented to be involved in immune, programmed cell death and biological conflict pathways [16, 37, 43-46] including in prokaryotes [47].

BASS1 and BASS3 motifs form fibrils in vitro

Next, for a subset of those motifs, we analyzed in vitro fibril formation. We chose to express a 4 motif sequences one corresponding to the most populated family (BASS 1) from the model species Streptomyces coelicolor A3(2) and the three others BASS3 (RHIM-like motifs) form Actinobacteria species Streptomyces atratus and Nocardia fusca and form the Cyanobacteria species Nostoc punctiforme (Table 3, Fig. S7). The three selected BASS3 sequences show less than 50% identity between species (Fig. S7). To avoid potential difficulties arising from recombinant expression of small peptides, two constructs were expressed for each sequences (except for Nostoc punctiforme ACC79696.1, a short construct limited to approximatively the 30 C-terminal residues and a larger constructs encompassing part of the BELL domain (Table 3). All polypeptides were produced in E. coli as inclusion bodies and purified under denaturing conditions in the presence of 6 M GuHCl. Upon dilution of the denaturant, all constructs led to the formation of fibrillar aggregates, either as dispersed fibrils or as laterally associated large bundles. Fibril width was in the range of 5-7 nm comparable to the previously identified fungal signaling motifs (Fig. 3A), [7, 16, 48]. We further analyzed the in vitro fibrils by ThT-binding (Fig. 3B). Both BASS1 and BASS3-fibrils induced ThT-fluorescence although the signal for BASS3 was low. HET-s(218-289) represents a precedent as an amyloid inducing only very low ThT-fluorescence [48].

For the *Streptomyces coelicolor* A3(2) BASS1 motif (CAB66307.1, residue 38 to 139) we further assessed fibril structure by X-ray fiber diffraction and solid state NMR. In unoriented BASS1 fibrils, we observed a strong ring at about 4.7 Å, and a weaker ring around 10 Å (Fig. 3C), this pattern being characteristic for a cross- β structure corresponding to the inter-strand and inter-sheet spacing respectively, typically observed in amyloid fibrils [49]. Next, we produced a BASS1 sample isotopically and uniformly ¹³C labeled to carry out solid-state NMR analysis. Cross-polarization ¹³C experiment (Fig. 3D) revealed a well-resolved spectrum, implying a high structural order at the local level [50]. In line with the X-ray diffraction analysis, solid-state NMR ¹³C chemical shifts of BASS1 indicate a protein conformation rich in β -sheet secondary structure, illustrated with a high field effect of the carbonyl region indicative of β -sheet structure [51]. Taken together, these analyses show that this BASS-motif forms β -sheet-rich amyloid fibrils, with NMR features comparable to amyloid fibrils of the fungal HETs(218-289) prion [42, 52].

BASS1 and BASS3 motifs behave as prion-forming domains when expressed in Podospora

Fungal amyloid motifs behave as prion-forming domains [7, 16]. In order to determine whether the BASS motifs could form prions, we expressed selected BASS motifs in *P. anserina*, a model used to analyze prion propagation of both homologous and heterologous amyloid signaling motifs [7, 16, 53]. P. anserina is a valuable alternate model to yeast which was also extensively used to document prion properties of heterologous sequences. In *P. anserina* prion propagation and transmission are easy to monitor because of the syncytial structure of the mycelium and because strains spontaneously fuse and mix their cytoplasmic content when confronted [54]. We expressed both the BELL-associated BASS and the corresponding NLR-associated BASS (except for N. fusca proteins for which only the BELLassociated sequence was studied) (Table 3). The seven different BASS motifs were fused with either GFP (in N-terminus) or RFP (in C-terminus) and expressed under a strong constitutive promotor in P. anserina (Fig. 4, Fig. S7, Table 3). All fusion proteins displayed bistability, initially showing a diffuse cytoplasmic fluorescence that could convert over time to discrete cytoplasmic dots as previously described for fungal prion-forming domains (Table 4, Fig. 4) [7, 16, 53, 55, 56]. By analogy with fungal prions, we denote the diffuse state [b*] and the aggregated state [b]. Transition from the diffuse [b*] to the aggregated [b] state could occur either spontaneously or be induced by cytoplasmic contact with a strain expressing the fusion protein in [b] state (Fig.5A). We conclude that all tested BASS motifs (both from the NLR and from the Bell-side) direct infectious propagation of the aggregated state and thus behave as prion-forming domains in this fungal model.

It was shown that the globular domains attached to fungal prion domains inhibit prion formation [16, 27]. To verify if this is also the case for the bacterial BELL-domain, we analyzed prion formation rates the previously tested BASS1 and BASS3 motif now in the full-length protein context. We found that rate formation of the dot state was strongly reduced (Table S5) as compared to the BASS-domain alone constructs (Table 4). Even after long culture periods the rate of dot-formation rates with full length BELL proteins remains in the 2-6% range while it is typically close to 100% with the BASS-motif alone constructs. It thus appears, has in the case of the fungal HeLo-domain proteins that presence of the BELL-domain reduces prion-formation rates.

NLR-side BASS induce prion conversion of BELL-side BASS

If BASS motifs function as fungal amyloid signaling motifs, it is expected that the NLR-side BASS is able to convert the matching BELL-side BASS to the prion state and BELL and NLR-side motifs should co-aggregate [7]. To test whether BASS motif pairs co-localize in aggregates, we co-expressed each motif pair (differentially tagged with GFP and RFP) in the same fungal strain. We found that all tested pairs co-localize in dots although in some cases the co-localization was not complete (Fig. 6, Fig. S8). Then, we tested whether the NLR-side BASS in the [b] prion state could induce prion aggregation of the corresponding BELL-side BASS. Strains expressing RFP-fused BELL-side motifs in the non-prion [b*] state were confronted with strains expressing the corresponding GFP–fused NLR-side motifs in the [b] prion state. In all tested cases, we found that the NLR-side BASS efficiently converts the BELL-side BASS to the prion state (Fig. 5B). The level of amino acid identity within cross-seeding BASS motif pairs is in the range of 43-56% (Fig. 2, Fig. S7) and comparable to the level of identity leading to prion cross seeding of fungal amyloid signaling motifs [7, 16, 53]. When expressed in this fungal model, tested BASS are functionally analogous to fungal amyloid signal motifs in the sense that the NLR-side motif is able to interact with the BELL-side motif and to induce its prion aggregation.

BASS3 motifs cross-seed with RHIM and PP-motif in a fungal model

The BASS3 motifs shows homology to the fungal PP and animal RHIM motifs. In particular all three motifs show a common G- ϕ -Q- ϕ -G core region (Fig. 1, Fig. S7). To analyze the functional importance of this region for BASS3 prion-formation, we have generated four proline mutants of the *S. atratus* BELL-side BASS3 motif on conserved position of the motif. We mutated three residues in the G- ϕ -Q- ϕ -G core region common to BASS3, PP and RHIM (Q113P, V114P and G115P) and a conserved Q residue conserved specifically in the BASS3 motif (Q120P) (Fig. S7). Wild-type and mutant BASS3 motifs fused to GFP were expressed in the *P. anserina* model and we found that all four mutations totally abolished formation of the [b] prion-state *in vivo* as assayed by the formation and propagation of GFP-dots (Table 5). These results indicate that the conserved position of the BASS3 motif are involved in prion formation and support the hypothesis that the BASS3, PP and RHIM-motifs are related.

It was reported that partial *in vivo* prion cross-seeding occurs between fungal PP motifs and mammalian RIP1K and RIP3K RHIM sequences [26]. The level of sequence identity between fungal PP and mammalian RHIM-motifs is in the range of 20-30%, comparable to the identity level between BASS3 and RHIM or PP motifs (Fig. S7). This prompted us to assay prion cross-seeding between BASS3, RHIM and PP-motifs. We analyzed the ability of RHIM or PP prions to convert BASS3 motifs to the [b] prion state and conversely the ability of BASS3 prions to convert RHIM and PP to their respective [Rhim] and [π] prion state. To that end, strains expression BELL-side BASS3 from *S. atratus* or *N. fusca* and displaying the non-prion [b*] phenotype were confronted to strain expressing mammalian [Rhim] prions (human RIP1(524-551) or human RIP3(444-496)) or fungal [π] prion status was analyzed following this confrontation. In the reverse experiment, the strains expressing BASS3 were used as prion-donor and the RHIM and PP-expressing strains as recipients. We find that as reported previously

in the case of PP and RHIM motifs [26], there is a partial prion cross-seeding between [b] and mammalian [Rhim] and fungal $[\pi]$ prions (Fig. 7). While the spontaneous prion-conversion rate was in the range of 10 to 20 % in these experiments, about 50 to 60% of the BASS3 expressing strains were converted to the [b] prion strain after contact with strains containing [Rhim] or $[\pi]$ prions. The rate of homotypic conversion is higher, typically in the range of 80 to 90 %. Both S. atratus and N. fusca BASS3 [b] prions induced [Rhim] and $[\pi]$ prions at a similar rate of 50 to 60%. BASS1 motifs were not converted to the prion state at a higher rate after contact with [Rhim] or $[\pi]$ prions indicating that cross-seeding was limited to the BASS3 motifs. These results are consistent with the side directed mutagenesis experiments indicating the functional importance of the G- ϕ -Q- ϕ -G core region and underline a functional similarity between RHIM, PP and BASS3-motifs. We have also analyzed in vivo co-localization of BASS3 motifs with either RHIM or PP-motifs tagged with RFP and GFP. As described in the case of interaction of RHIM with fungal PP-motifs, there is a partial co-localization of BASS3 and RHIM aggregates, and BASS3 and PP-motifs aggregates (Fig. S8). It is possible to observed strains coexpressing BASS3 and RHIM in which the BASS3 is aggregated and the RHIM motif remains in the [Rhim*] state, consistent with the intermediate level of prion cross-seeding measured in cross infection experiments (Fig. 7). The same is true in the case of BASS3 and PP co-expression but not when two BASS3 motif form different bacterial species are co-expressed again in agreement with the cross infection experiments. In a control experiment, we found no co-localization with the unrelated BASS1 motif with either BASS3, RHIM or PP and independent formation of [Rhim], $[\pi]$ and [b] prions (Fig. S9).

Discussion

Amyloids have initially been identified in the context of human protein-deposition diseases and correspond to protein aggregates with a cross-β structure [57]. The nucleated-polymerization process governing their assembly allows some amyloids to propagate their conformational state as prions [58, 59]. The amyloid fold can play a variety of functional roles [60, 61]. In particular, functional amyloids have been found to be involved in signal transduction cascades controlling programmed cell death processes. In mammals, the RHIM motif direct assembly of the RIPK1/RIPK3 complex in the necroptosis pathway [21, 62]. In fungi, amyloid motifs control a signal transduction mechanism based on transmission of an amyloid fold from an NLR protein to downstream cell-death execution proteins [7, 16]. In the prokaryotic reign, functional amyloids have been found to be involved in biofilm formation, development and virulence [63-65]. We show here that phylogenetically diverse bacterial lineages including *Actinobacteria* and *Cyanobacteria* display fungal-like amyloid signaling motifs and thus suggest that NLR-associated amyloid signaling is also present in these multicellular bacterial lineages.

BASS form prions

When expressed in *Podospora anserina*, selected BASS motifs behaved as prion-forming domains and thus were functionally analogous to previously characterized fungal prion signaling motifs. In other words, they are capable, *in vivo*, in this heterologous setting, to form aggregates and to propagate this aggregation state as prions. Importantly, we find that the NLR-side and BELL-side of matching motifs are able to co-aggregate and that, NLR-side motifs convert BELL-side motifs to the prion state. These results are consistent with the proposition that the motifs functionally interact and that the NLR-side motif serves as a template for the transconformation of the BELL-side motif as shown for the fungal prion signaling motifs [7, 16, 19, 26]. We find that the same motifs form fibrils *in vitro*. In case of the BASS1 motif of *Streptomyces coelicolor*, solid-state NMR analyses indicate the formation of a highlyordered cross- β structure. Comparable observations have been made using the same biophysical techniques for analogous fungal prion-forming domains such as HET-s(218-289) [42, 52, 66], HELLF [19], NWD2(1-30) [7] and PP [16]. For BASS motifs that were tested experimentally, we confirm the identified sequences form amyloid prions, again making is plausible that the other motifs also represent analogous prion amyloids.

Relation of BASS3 to RHIM and PP

Several families of amyloid signaling motifs were described in fungi and remarkably, PP, one such family appears to be related to the animal RHIM amyloid motifs [16, 21, 26]. We now find that a motif similar to RHIM/PP and occurring in the same domain architectures as the fungal PP-motif also exists in Bacteria. There is partial prion cross-seeding between BASS3, RHIM and PP-motifs as tested in the P. anserina model (this study and [26]). RHIM, PP and BASS3 motifs, all share the central G-q-Qq-G signature (Fig. S7). This signature corresponds to the central core of the RHIM amyloid structure with the tight interdigitation of two such motifs in one β -strand layer [62]. Mutation in this core region abolish BASS3 prion formation in vivo. The consensus sequences for the mammalian, fungal and bacterial motif however differ in other positions (Fig. S7), which might explain why inter-kingdom cross-seeding is only partial and not as efficient as in homotypic interactions or intra-kingdom interactions. These results suggest some level of structural similarity between the amyloid structures of these motifs in the different kingdoms but also some major differences that should account for these intermediate levels of prion cross-seeding. The extension of the presence of this amyloid motif to prokaryotic lineages supports the hypothesis of long-term conservation of this motif for amyloid signaling purposes from bacteria, to metazoan and fungi but due to the moderate sequence similarity between the motifs the possibility of a convergent evolution towards the amyloid signaling function cannot be ruled out completely.

Diversity of amyloid signaling motifs in Bacteria

In addition to BASS3, we have also identified nine other bacterial amyloid motif families. This finding suggests an extensive diversification of this type of signaling domains in prokaryotes. In fungi, amyloid signaling motifs were also found to be diverse with so far three main families described (HRAM, PP and sigma) [13, 15]. Diversity of such motifs in bacterial lineages appears even greater than in fungi, which might be expected considering the larger phylogenetic breadth of the bacterial lineages compared to fungi [67]. Diversity of bacterial motifs almost certainly exceed the 10 families described herein, considering we restricted the analysis to motifs recovering at least 5 non-redundant matching gene pairs. Except for the RHIM/PP-motifs, there is no obvious sequence homology between bacterial and fungal motifs, which is not surprising considering that some of the BASS motifs appear specific for a given bacterial phylum. In spite of the lack of direct sequence homology, bacterial and fungal motifs have common features, they show a similar length (typical 20-25 amino acids) and amino acid composition biases, apparently typical of proteins forming β -arch structures [39]. In addition, some bacterial motifs appear as double (or triple) pseudo-repeats as described in the case of fungal HRAMs [15, 42].

NLRs, BELL domains and amyloid signaling in multicellular bacteria

Proteins with NLR domain architectures control various biotic interactions in plants, animals and fungi [1, 68]. Throughout, we have used the designation NLR to specify proteins displaying a domain architecture associating a NB-ARC or NACHT-type NOD domain (nucleotide binding and oligomerization domain) and ANK, TPR, WD or LRR super-structure forming repeats (SSFR). While some authors reserve the NLR designation to plant and animal NBS-LRR proteins, we adhere to an extended assertion of the term also including NB-SSFR proteins found in fungi and prokaryotes. It has been reported previously that bacterial genomes (in particular in *Actinobacteria* and *Cyanobacteria*) display genes encoding proteins with a NBS-SSFR architecture [4, 36, 37]. In fungi, both NACHT/WD and NBARC/TPR proteins have been shown to control non-self recognition and programmed cell death in different species [5, 6, 8-10]. Urbach and Ausubel have shown that these NACHT/WD and NB-ARC/TPR architectures are ancestral to the NBS/LRR architecture, which represent a more recent acquisition (that occurred independently in plant and animal lineages).

In our survey of over 100 000 prokaryotic genomes, we find again that NLR architecture proteins are characteristic of bacterial lineages encompassing genera and species with a multicellular organization (filamentous or multicellular aggregates forming species). These are found in filamentous *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* and *Chloroflexi* and also in aggregate-forming Archaea. Characteristic of those bacterial lineages that display NLRs is also the presence of the BELL domain. Like fungal NLRs, prokaryotic NLRs typically have NB-ARC/TPR or NACHT/WD architectures and do not display LRR repeats [3, 4, 69]. Another communality between fungal and bacterial NLRs is the presence in both lineages of NLR with WD and TPR-repeats showing high levels of internal conservation (with repeat units showing 80-90% sequence identity, a situation in stark contrast with the bulk of the WD and TPR repeats in proteins), [3], [70, 71]. In fungi, this internal conservation is related to a mechanism of rapid diversification of repeat domain binding specificity [72]. These NLR-repeats are under positive Darwinian selection and diversify rapidly by a mechanism of repeat-unit reshuffling representing both the cause and consequence of their high internal conservation [3, 72, 73]. Analogous WD and TPR repeats in bacterial NLRs might similarly be under a specific evolutionary regimen allowing rapid diversification. The possibility of an ancestral role of NLR-like proteins in programmed cell death and host defense in multicellular bacteria has been raised before [37]. Together with the communalities mentioned above, the mechanistic similarity between fungal NLR/amyloid motif/HeLo and bacterial NLR/amyloid motif/BELL domain associations we report, now makes it indeed plausible to envision that the bacterial gene pairs equally function in host defense and programmed cell death. In this hypothesis, the BELL domain might correspond to a programmed cell-death execution domain. In support of this view is the sequence similarity between the signature consensus sequences in the Nterminal α -helical region of BELL, fungal HeLo, metazoan MLKL and plant CC-domains (Fig. 1). Functional studies of the BELL-domain and its possible function in cell death execution are now required to explore this hypothesis. Of note is also the fact that other protein domains related to immune functions and programmed cell death in animals and plants (such as the TIR and caspase-like CHAT domain) can also be found associated to amyloid signaling motifs and that the same domains are frequently found as N-terminal domain of NLRs in multicellular bacteria (Table S1).

Remarkably, in fungi NLRs are restricted to filamentous genera (both in Ascomycota and Basidiomycota) and are not found in yeast species [3]. This situation is mirrored in the present study by the fact that NLRs in general as well as the matching NLR/BELL gene pairs are found in *Actinobacteria* and *Cyanobacteria* species with a multicellular morphology but appear to be absent or rare in phylogenetically related unicellular classes. Although, PCD pathways also exist in unicellular species those continue to some extend to represent a paradox [74, 75]. Defense-related PCD is generally considered an attribute of multicellulars in which altruistic cell death can be directly advantageous for the survival of the organism [76]. Our results suggest that filamentous fungi and bacteria have in common the use of NLR-associated amyloid signaling processes. We propose that this shared molecular mechanistic feature between filamentous fungi and filamentous *Actino* and *Cyanobacteria* stems from their common cellular organization and life style. These fungi and bacteria are phylogenetically distant but morphologically alike. In a similar way, abundance and complexity of

secondary metabolism clusters involved in allelopathic interactions appears to be a specific feature of filamentous fungi and bacteria compared to related unicellular genera [35, 77, 78]. Presence of NLRs and amyloid signaling might represent a common genome hallmark of diverse multicellular microbes. As multicellular organisms, microbes from both reigns could have to cope with parasites and pathogens and thus might rely on altruistic cell suicide for defense, as an immune-related programmed cell death mechanism akin to those operating in multicellular plant and animals lineages. We propose based on these genomic and functional analogies that filamentous fungi and filamentous bacteria share in common the use of NLR-associated amyloid motifs in the control of immune-related functions might be ancestral and shared universally between multicellular Archaea, Bacteria, fungi, plants and animals. The mechanistic resemblance we report between prokaryotic and eukaryotic NLRs, invites to reconsider the evolutionary trajectory of this protein family, which might have a very ancient history in the control of biotic interactions. The proposed NLR-related systems described here appear to be just one specific example among a variety of recently described NTP-dependent biological conflict systems preponderantly found in multicellular prokaryotes [79].

Material and Methods

Homology searches. The N-terminal 102 amino acid-long fragment of protein ONI86675.1 (A0A1V2QF20_9PSEU) [80] was used as the BELL domain query in Jackhmmer [81, 82] (20 iterations, 2133 hits) and Psi-blast [83, 84], (5 iterations, 502 hits) homology searches in UniProtKB [85] and NCBI nr databases [86](respectively), as of March 2019. In order to extend the coverage, the searches were re-run with the lowest scoring above-the-threshold Jackhmmer hits in *Archaea* (OPX82726.1 / A0A1V4VC50_9EURY),[87], *Chloroflexi* (ACL23627.1 / B8G4Z4_CHLAD) and *Proteobacteria* (MBN58330.1 / A0A2E7JCT6_9GAMM) [88], resulting in 2383, 2553 and 939 hits, respectively. In all cases, standard website parameters were used. Combined results consisted of 2797 non-redundant sequences including 2354 sequences shorter than 200 amino acids. The length threshold was chosen to filter out BELL homologues forming "all-in-one" NLR architectures.

Neighboring NLRs identification. All sequence identifiers in the set were mapped to NCBI accessions using UniProt mapping tool. Accessions of identical sequences in the NCBI nr database were added using the Blast database command tool [89]. This resulted in set of 2810 protein accessions from genome-wide studies, restricted to GenBank and RefSeq NP and YP series accessions. An in-house Python (version 3.5) script (aided by requests (Reitz, K., n.d.) and xmltodict (Blech, n.d.) packages) was used to query NCBI Entrez E-utils in order to fetch almost 23k proteins coded by genes within the +/5000 bp neighborhood of the genes encoding these BELL homologues. Among the proteins coded

by the BELL-neighboring genes, 730 were matched with Pfam , NACHT (PF05729) [69] or NB-ARC (PF00931) [90] profiles. This included 467 sequences (426 unique) where the match bordered a relatively short N-terminus of 10 to 150 amino acids in length (396 unique extensions), which is a typical feature of fungal NLR proteins containing amyloid signaling motifs.

Motif extraction. The C-terminal boundaries of the BELL domains were delimited according to the final Profile HMM (pHMM) of the original Jackhmmer search using the hmmalign tool of the standalone HMMER distribution (version 3.2.1) [81]. The C-terminal extensions longer than 10 amino acids were extracted. The redundancy of the set was reduced to 90% using cdhit [91, 92], (version 4.6, standard parameters) resulting in 1814 unique sequences. The common motifs in the C-termini were extracted using MEME [93, 94] (version 5.0.2, standalone), allowing for motifs of any length from 6 to 30 and possibly repeated in sequence (--anr option), while requiring that each motif was found in at least 10 instances. The search yielded 66 motifs (prefixed later "all") above the standard E-value threshold of 0.1. Aiming at motifs restricted to taxonomic branches, additional MEME searches (requiring at least 5 motif instances only) were performed for taxonomic subsets of UniProtKB sequences including: *Cyanobacteria* (found 27 motifs in 359 sequences, prefixed later "cya"), combined *Proteobacteria* and *Chloroflexi* (5 in 69, "pch"), and *Streptomycetes* (19 in 608, "str"). Finally, the MEME search with the same parameters was performed in N-termini of the NLR-containing genomic neighbors of BELL domains (39 motifs found in 338 sequences, "nIr").

Motif profile generation. For each motif, a pHMM was trained using hmmbuild from the HMMER package on instances reported by MEME. Then, the pHMMs were used to re-search the BELL Cterminal domains and NLR N-terminal domains, respectively, using hmmsearch with sequence and domain E-values set to 0.01 and heuristic filters turned off for sensitivity (--max option). The resulting hits were extended each side by 5 amino acids, and then re-aligned to the pHMMs and trimmed of unaligned residues using hmmalign (--trim option). Eventually, the resulting alignments were used to train final pHMMs for the motifs again using hmmbuild with standard options. The entire procedure aimed at generalizing the motifs, especially gapped, which could be truncated or over-specialized by MEME.

Motif pairs identification. Motif pairs were identified whenever hits from the same profile HMM were found in BELL C-termini and their corresponding NLR(s) N-termini, using hmmsearch with sequence and domain E-value set to 0.01 and maximum sensitivity (--max option). There were 1157 such pairs (904 using BELL-side motifs and 253 using NLR-side motifs) in 315 (293 and 246, respectively) sequence pairs (there was a considerable overlap between motifs, see below). Only motifs with at least 5 unique pair hits (in terms of sequence) were considered. The criterion was met by 29 BELL-side motifs and 12 NLR-side motifs with 1087 hits in 295 sequence pairs.

Since the sequences selected for the BASS3 motif were not included neither in the GenBank nor RefSeq NP or YP series at the time of the genome mining, they were not processed for identifying neighboring NLRs, and hence are not covered in the motif pair list in Table S2. Nevertheless, the BASS3 motifs can be found in these sequences with the motif pHMMs at default identification threshold (E-value of 0.01), except for ACC79697.1 being slightly below (E-value of 0.1).

Motif clustering. Motifs were grouped based on overlapping matches (hits in the same sequence pairs). Motifs were joined if at least half of pairs hit by one motif profile HMM were also matched by the other. The procedure yielded ten motif classes termed BASS1 to 10. For each class, the member motif matching most sequences was used as the class representative.

Motif characterization. For each member motif in classes BASS1-10, the sequence regions matched with its pHMM were extended each side by 5 amino acids and pairwisely locally aligned using the Waterman-Eggert method [95, 96] implemented in EMBOSS (matcher tool, version 6.6.0.0) [97]. The standard parameters were used including the BLOSUM62 matrix and gap opening/extending penalties 14/4. For each motif class representative, the sequence fragments from the resulting pairwise alignments were combined into multiple sequence alignments using Clustal Omega [98, 99](version 1.2.4, standalone) with the --dealign and --auto switches. The resulting MSAs were trimmed manually and profiles were generated using weblogo3 [100] (Weblogo software repository webpage, 2019).

In addition, for each motif class and sequence, the pairwise alignments were used to obtain the combined longest fragment matching any member motif. The dealigned fragments were then combined into MSA using Clustal Omega with --full and --full-iter options, curated when necessary (BASS4) and trimmed manually. Amino acid composition of such generated MSAs was then calculated using the quantiprot package [101], after removing redundant sequences. The per-class and overall (unweighted) composition was then compared with amino acid composition of non-redundant sequence sets of fungal functional amyloid motifs including Het-s Related Amyloid Motif (HRAM) [15], Pfam NACHT_sigma (PF17106) and Ses_B (PF17046, aka PP-motif) [3, 15], beta-solenoid repeat regions extracted from the Protein Data Bank according to RepeatsDB (only reviewed entries, as of May 2019), experimentally verified amyloid fragments from AmyLoad (as of March 2017), and intrinsically disordered protein regions from DisProt [102] (as of July 2019, only unambiguous entries). Current SwissProt amino acid statistics were used as a reference.

Highly internally conserved pairs search. Local pairwise alignments of C-termini of BELL domains and their neighboring NLR(s) N-termini were performed using the matcher tool with the standard parameters. For each pair ten best alternatives were filtered for minimum alignment length of 15 amino acid and minimum score of 40. The procedure yielded in 292 hits (including 234 unique) in 283

sequence pairs. The number included 44 sequence pairs not matched with the BASS1-10 motifs, comprising 25 sequence pairs not matched with pHMM of any motif.

Phylogenetic distribution. Protein accession lists of genome assemblies listed in the Genome Taxonomy Database (GTDB) [34] metadata sheets for Bacteria (113,324 items) and Archaea (1183) were downloaded from NCBI ftp (ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/; as of April 2019). The accessions were matched with the ABC_tran (PF00005) [103], NACHT, NB-ARC, Beta_propeller (CL0186) [104], TPR (CL0020) [105], CHAT (PF12770) [106], PNP_UDP_1 (PF01048) [107] and TIR (PF01582) [108]Pfam profiles hit lists downloaded from Pfam ftp (ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/Pfam/current_release/; as of February 2019). In addition, distributions of previously found BELL domain homologues and motif pairs involving their C-termini in GTDB-listed genomes were recorded. For each, the total number of hits and the number of genomes with hits is provided. The sequence accession redundancy was resolved with the NCBI Blast nr database (as of March 2019).

Strains and plasmids. To avoid interference with endogenous prions, the P. anserina Ahet-s $(\Delta Pa_3_{620}) \Delta hell f (\Delta Pa_3_{900}) \Delta Pahellp (\Delta Pa_5_{8070})$ strain was used as recipient strain for the expression of molecular fusions of BASS motifs and the GFP (green fluorescent protein) or RFP (red fluorescent protein). These fusions were expressed either from a plasmid based on the pGEM-T backbone (Promega) named pOP plasmid [16], containing RFP, or from a derivative of the pAN52.1 GFP vector [109], named pGB6-GFP plasmid containing GFP. In both cases the molecular fusions were under the control of the constitutive P. anserina gpd (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) promoter. The *DPahellp Dhet-s Dhellf* strain was transformed as described [110] with one or two fusion constructs along with a vector carrying a phleomycin-resistance gene ble, pPaBle (using a 10:1 molar ratio). Phleomycin-resistant transformants were selected, grown for 30 h at 26°C and screened for the expression of the transgenes using a fluorescence microscope. Fragments (protein position indicated in brackets) of the following genes (accessions from GenBank or RefSeq) were amplified using specific primers: CAB66307.1 (110-139), CAB66306.1 (1-34), WP_037701008.1 (70-124), WP_037701012.1 (137), ACC79696.1 (94-126), ACC79697.1 (1-38), WP_063130184.1 (74-128). The PCR products were cloned upstream of the RFP coding sequence in the pOP plasmid using PacI/Bg/II restriction enzymes or downstream of the GFP in the pAN52.1 plasmid using Notl/BamHI restriction enzymes. For heterologous expression in E. coli, the following fragments were amplified using specific primers and cloned in pET24a (Novagen) using the Ndel/Xhol restrictions sites: CAB66307.1 (110-139) or (38-139), WP_037701008.1 (97-124), ACC79696.1 (94-126), WP_063130184.1 (100-128). RIP1 and RIP3 RHIM motif fusions as well as fungal PP-motif fusion proteins used in prion cross-seeding experiments are described in [26]. Site directed mutagenesis was performed on the pAN52 GFP vector containing WP_037701008.1 (70-124) (B3-B S.a.). We obtained 4 plasmids expressing products bearing the following specific single amino acid mutations: Q113P, V114P, G115P or Q120P. These modified vectors were used to transform the *P. anserina* Δhet -s $\Delta hellf \Delta hellp$ strain and transformants were monitored in fluorescence microscopy for the presence of dots, 4, 8 and 15 days after transfection or four days after contact with a strain expressing wild-type GFP-B3-B S.a. in [b] prion state.

Prion propagation. The [b] phenotype (acquisition of the [b] prion) was defined in *Podospora* strains expressing fluorescent fusion proteins as the absence ([b*]) or the presence ([b]) of fluorescent dotlike aggregates. To monitor the propagation of the [b] prion, prion free strains were subcultured in presence of [b] prion donor strain and after 72h (contact between tested and donor strains was established after 24h of subculture) the initially prion free tested strain was subcultured on fresh medium and monitored for the presence of aggregates using fluorescence microscopy.

Protein preparation and fibril formation. 6his-tagged proteins were expressed from pET24a constructs in E. coli BL21-CodonPlus®-RP competent cells as insoluble proteins and purified under denaturing conditions using its terminal 6 histidine tag as previously described [111]. Briefly, cells were grown at 37°C in DYT medium to 0.6 OD₆₀₀ and expression was induced with 1 mM isopropyl β -D-1thiogalactopyranoside. After, 4 h, cells were harvested by centrifugation, frozen at -80°C sonicated on ice in a lysis buffer (Tris 50 mM, 150 mM NaCl, pH 8) and centrifuged for 20 min at 20,000 g to remove *E. coli* contaminants. The pellet was washed in the same buffer and resuspended in denaturing buffer (6M guanidinium HCl, 150 mM NaCl, and 100 mM Tris-HCl, pH 8) until complete solubilization. The lysate was incubated with Talon Resin (CLONTECH) for 1 h at 20°C, and the resin was extensively washed with 8 M urea, 150 mM NaCl, and 100 mM Tris-HCl, pH 8. The protein were eluted from the resin in the same buffer containing 200 mM imidazole. The proteins were pure as judged by sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide-gel electrophoreses (SDS-PAGE) followed by Coomassie-Blue staining and yield was in the range of ~2-4 mg of protein per liter of culture. To eliminate urea, elution buffer was replaced by overnight dialysis at 4°C against Milli-Q water. Fibrils formation resulted spontaneously from dialysis process followed by sample storage in H₂O or in ammonium acetate buffer 100 mM pH 4.5 at 4°C for 7 to 30 days.

Light Microscopy. *P. anserina* hyphae were inoculated on solid medium and cultivated for 24 to 48 h at 26°C. The medium was then cut out, placed on a glass slide and examined with a Leica DMRXA microscope equipped with a Micromax CCD (Princeton Instruments) controlled by the Metamorph 5.06 software (Roper Scientific). The microscope was fitted with a Leica PL APO 100X immersion lens.

Transmission Electron Microscopy. For fibrils observations, negative staining was performed: aggregated proteins were adsorbed onto Formvar-coated copper grids (400 mesh) and allowed to dry for 15 min in air, grids were then negatively stained 1 min with 10 μL of freshly prepared 2% uranyl

acetate in water, dried with filter paper, and examined with a Hitachi H7650 transmission electron microscope (Hitachi, Krefeld, Germany) at an accelerating voltage of 120 kV. TEM was performed at the Pôle Imagerie Électronique of the Bordeaux Imaging Center using a Gatan USC1000 2k x 2k camera.

Solid-state NMR of BASS1 fibrils. The solid-state NMR spectrum of BASS 1 was recorded at 800 MHz on a Bruker Biospin magnet using a triple resonance 3.2 mm probe at a spinning frequency of 11 kHz. 64 scans were used using a recycle delay of 3 sec and an acquisition time of 17 ms.

X-ray diffraction of BASS1 and BASS3 fibrils. Fiber diffraction pattern was measured at 4°C on an Excillum MetalJet X-ray generator at the galium wavelength (K α , $\lambda = 1.34$ Å). The source was equipped with Xenocs Fox3D optics and a Dectris Eiger 1M detector on a 2 θ arm of a STOE stadivari goniometer. The detector has been turned by 90° to have the blind region vertical to hide as much as possible the shadow of the beamstop. The viscous concentrated hydrated sample was mounted in a MicroLoopTM from Mitegen on a goniometer head under the cold nitrogen flow. The diffraction pattern corresponds to a 360° rotation along the phi axis with an exposure time of 180 sec.

ThT fluorescence assay. The aggregated bacterial amyloid fibril samples and BSA (at 2 μ g/ul), supplied with 20 μ M ThT were transferred to a 96 well corning plate (bottom transparent) with 100 μ L/well. The fluorescence measurements were carried out on three independent samples in a CLARIOstar®Plus plate reader with ten flashes per well (excitation wavelength 440 nm and emission wavelength 480 nm). Ten independent measurements are averaged and plotted per sample.

Acknowledgements

The work was funded by recurrent funds from CNRS and University of Bordeaux to SJS and AL and an ANR grant to SJS and AL (ANR SFAS AAP CE11). WD was supported in part by the National Science Centre of Poland (grant no. 2015/17/D/ST6/04054). AD was supported by the Nouvelle Aquitaine Regional Council. TB was supported by the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. We thanks Jayakrishna Shenoy for assistance with the ThT-binding experiments.

Author Contributions

Witold Dyrka: conceptualization, methodology, investigation, data curation, visualization, writing, funding acquisition, **Virginie Coustou:** methodology, investigation, visualization, writing, **Asen Daskalov**: conceptualization, investigation, **Alons Lends:** investigation, **Thierry Bardin:** investigation, **Mélanie Berbon**: investigation **Brice Kauffmann :** investigation, methodology, **Corinne Blancard:** investigation, Bénédicte Salin : investigation, **Antoine Loquet:** conceptualization, methodology, writing, funding acquisition, **Sven J. Saupe :** project administration, funding acquisition, writing, conceptualization, investigation, visualization

References

- [1] Jones JD, Vance RE, Dangl JL. Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. Science. 2016;354.
- [2] Mermigka G, Amprazi M, Mentzelopoulou A, Amartolou A, Sarris PF. Plant and Animal Innate Immunity Complexes: Fighting Different Enemies with Similar Weapons. Trends Plant Sci. 2019.
- [3] Dyrka W, Lamacchia M, Durrens P, Kobe B, Daskalov A, Paoletti M, et al. Diversity and Variability of NOD-Like Receptors in Fungi. Genome biology and evolution. 2014;6:3137-58.
- [4] Urbach JM, Ausubel FM. The NBS-LRR architectures of plant R-proteins and metazoan NLRs evolved in independent events. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114:1063-8.
- [5] Chevanne D, Bastiaans E, Debets A, Saupe SJ, Clave C, Paoletti M. Identification of the het-r vegetative incompatibility gene of Podospora anserina as a member of the fast evolving HNWD gene family. Curr Genet. 2009;55:93-102.
- [6] Choi GH, Dawe AL, Churbanov A, Smith ML, Milgroom MG, Nuss DL. Molecular characterization of vegetative incompatibility genes that restrict hypovirus transmission in the chestnut blight fungus Cryphonectria parasitica. Genetics. 2012;190:113-27.
- [7] Daskalov A, Habenstein B, Martinez D, Debets AJ, Sabate R, Loquet A, et al. Signal transduction by a fungal NOD-like receptor based on propagation of a prion amyloid fold. PLoS Biol. 2015;13:e1002059.
- [8] Espagne E, Balhadere P, Penin ML, Barreau C, Turcq B. HET-E and HET-D Belong to a New Subfamily of WD40 Proteins Involved in Vegetative Incompatibility Specificity in the Fungus Podospora anserina. Genetics. 2002;161:71-81.
- [9] Heller J, Clave C, Gladieux P, Saupe SJ, Glass NL. NLR surveillance of essential SEC-9 SNARE proteins induces programmed cell death upon allorecognition in filamentous fungi. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018.
- [10] Saupe S, Turcq B, Begueret J. A gene responsible for vegetative incompatibility in the fungus Podospora anserina encodes a protein with a GTP-binding motif and G beta homologous domain. Gene. 1995;162:135-9.
- [11] Loquet A, Saupe SJ. Diversity of Amyloid Motifs in NLR Signaling in Fungi. Biomolecules. 2017;7.
- [12] Cai X, Chen J, Xu H, Liu S, Jiang QX, Halfmann R, et al. Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation. Cell. 2014;156:1207-22.
- [13] Daskalov A, Paoletti M, Ness F, Saupe SJ. Genomic clustering and homology between HET-S and the NWD2 STAND protein in various fungal genomes. PloS One. 2012;7:e34854.
- [14] Cai X, Xu H, Chen ZJ. Prion-Like Polymerization in Immunity and Inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016.
- [15] Daskalov A, Dyrka W, Saupe SJ. Theme and variations: evolutionary diversification of the HET-s functional amyloid motif. Scientific reports. 2015;5:12494.
- [16] Daskalov A, Habenstein B, Sabate R, Berbon M, Martinez D, Chaignepain S, et al. Identification of a novel cell death-inducing domain reveals that fungal amyloid-controlled programmed cell death is related to necroptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113:2720-5.
- [17] Wasmer C, Lange A, Van Melckebeke H, Siemer AB, Riek R, Meier BH. Amyloid fibrils of the HETs(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core. Science. 2008;319:1523-6.
- [18] Wasmer C, Zimmer A, Sabate R, Soragni A, Saupe SJ, Ritter C, et al. Structural similarity between the prion domain of HET-s and a homologue can explain amyloid cross-seeding in spite of limited sequence identity. J Mol Biol. 2010;402:311-25.
- [19] Daskalov A, Martinez D, Coustou V, El Mammeri N, Berbon M, Andreas LB, et al. Structural and molecular basis of cross-seeding barriers in amyloids. bioRxiv. 2020;2020.07.06.188508.
- [20] Graziani S, Silar P, Daboussi MJ. Bistability and hysteresis of the 'Secteur' differentiation are controlled by a two-gene locus in Nectria haematococca. BMC Biol. 2004;2:18.
- [21] Li J, McQuade T, Siemer AB, Napetschnig J, Moriwaki K, Hsiao YS, et al. The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. Cell. 2012;150:33950.

- [22] Sun X, Yin J, Starovasnik MA, Fairbrother WJ, Dixit VM. Identification of a novel homotypic interaction motif required for the phosphorylation of receptor-interacting protein (RIP) by RIP3. J Biol Chem. 2002;277:9505-11.
- [23] Kleino A, Ramia NF, Bozkurt G, Shen Y, Nailwal H, Huang J, et al. Peptidoglycan-Sensing Receptors Trigger the Formation of Functional Amyloids of the Adaptor Protein Imd to Initiate Drosophila NF-kappaB Signaling. Immunity. 2017;47:635-47 e6.
- [24] Pham CL, Shanmugam N, Strange M, O'Carroll A, Brown JW, Sierecki E, et al. Viral M45 and necroptosisassociated proteins form heteromeric amyloid assemblies. EMBO Rep. 2019;20.
- [25] Kajava AV, Klopffleisch K, Chen S, Hofmann K. Evolutionary link between metazoan RHIM motif and prionforming domain of fungal heterokaryon incompatibility factor HET-s/HET-s. Scientific reports. 2014;4:7436.
- [26] Bardin T, Daskalov A, Barrouilhet S, Granger-Farbos A, Salin B, Blancard C, et al. Prion crossseeding between fungal and mammalian amyloid signaling motifs. bioRxiv 20200722215483. 2020.
- [27] Seuring C, Greenwald J, Wasmer C, Wepf R, Saupe SJ, Meier BH, et al. The mechanism of toxicity in HET-S/HET-s prion incompatibility. PLoS Biol. 2012;10:e1001451.
- [28] Greenwald J, Buhtz C, Ritter C, Kwiatkowski W, Choe S, Maddelein ML, et al. The mechanism of prion inhibition by HET-S. Mol Cell. 2010;38:889-99.
- [29] Murphy JM, Czabotar PE, Hildebrand JM, Lucet IS, Zhang JG, Alvarez-Diaz S, et al. The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. Immunity. 2013;39:443-53.
- [30] Wang J, Hu M, Wang J, Qi J, Han Z, Wang G, et al. Reconstitution and structure of a plant NLR resistosome conferring immunity. Science. 2019;364.
- [31] Rebsamen M, Heinz LX, Meylan E, Michallet MC, Schroder K, Hofmann K, et al. DAI/ZBP1 recruits RIP1 and RIP3 through RIP homotypic interaction motifs to activate NF-kappaB. EMBO Rep. 2009;10:916-22.
- [32] El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, Eddy SR, Luciani A, Potter SC, et al. The Pfam protein families database in 2019. Nucleic Acids Research. 2018;47:D427-D32.
- [33] Adachi H, Contreras M, Harant A, Wu CH, Derevnina L, Sakai T, et al. An N-terminal motif in NLR immune receptors is functionally conserved across distantly related plant species. eLife. 2019;8.
- [34] Parks DH, Chuvochina M, Waite DW, Rinke C, Skarshewski A, Chaumeil PA, et al. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. Nat Biotechnol. 2018;36:996-1004.
- [35] Shih PM, Wu D, Latifi A, Axen SD, Fewer DP, Talla E, et al. Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110:1053-8.
- [36] Asplund-Samuelsson J, Bergman B, Larsson J. Prokaryotic caspase homologs: phylogenetic patterns and functional characteristics reveal considerable diversity. PLoS One. 2012;7:e49888.
- [37] Koonin EV, Aravind L. Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. Cell Death Differ. 2002;9:394-404.
- [38] Fukuda Y, Nakayama Y, Tomita M. On dynamics of overlapping genes in bacterial genomes. Gene. 2003;323:181-7.
- [39] Baxa U, Cassese T, Kajava AV, Steven AC. Structure, function, and amyloidogenesis of fungal prions: filament polymorphism and prion variants. Adv Protein Chem. 2006;73:125-80.
- [40] Ahmed AB, Kajava AV. Breaking the amyloidogenicity code: Methods to predict amyloids from amino acid sequence. Febs Letters. 2013;587:1089-95.
- [41] Ahmed AB, Znassi N, Chateau MT, Kajava AV. A structure-based approach to predict predisposition to amyloidosis. Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association. 2014.
- [42] Ritter C, Maddelein ML, Siemer AB, Luhrs T, Ernst M, Meier BH, et al. Correlation of structural elements and infectivity of the HET-s prion. Nature. 2005;435:844-8.
- [43] Nimma S, Ve T, Williams SJ, Kobe B. Towards the structure of the TIR-domain signalosome. Curr Opin Struct Biol. 2017;43:122-30.
- [44] O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol. 2007;7:353-64.

- [45] Freihat LA, Wheeler JI, Wong A, Turek I, Manallack DT, Irving HR. IRAK3 modulates downstream innate immune signalling through its guanylate cyclase activity. Scientific reports. 2019;9:15468.
- [46] Xue JY, Wang Y, Wu P, Wang Q, Yang LT, Pan XH, et al. A primary survey on bryophyte species reveals two novel classes of nucleotide-binding site (NBS) genes. PLoS One. 2012;7:e36700.
- [47] Burroughs AM, Aravind L. Identification of uncharacterized components of prokaryotic immune systems and their diverse eukaryotic reformulations. J Bacteriol. 2020.
- [48] Sabate R, Baxa U, Benkemoun L, Sanchez de Groot N, Coulary-Salin B, Maddelein ML, et al. Prion and nonprion amyloids of the HET-s prion forming domain. J Mol Biol. 2007;370:768-83.
- [49] Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, Fraser PE, Pepys MB, Blake CC. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. J Mol Biol. 1997;273:729-39.
- [50] Loquet A, El Mammeri N, Stanek J, Berbon M, Bardiaux B, Pintacuda G, et al. 3D structure determination of amyloid fibrils using solid-state NMR spectroscopy. Methods. 2018;138-139:26-38.
- [51] Wang Y, Jardetzky O. Probability-based protein secondary structure identification using combined NMR chemical-shift data. Protein Sci. 2002;11:852-61.
- [52] Siemer AB, Ritter C, Ernst M, Riek R, Meier BH. High-resolution solid-state NMR spectroscopy of the prion protein HET-s in its amyloid conformation. Angew Chem Int Ed Engl. 2005;44:2441-4.
- [53] Benkemoun L, Ness F, Sabate R, Ceschin J, Breton A, Clave C, et al. Two structurally similar fungal prions efficiently cross-seed in vivo but form distinct polymers when coexpressed. Mol Microbiol. 2011;82:1392-405.
- [54] Benkemoun L, Sabate R, Malato L, Dos Reis S, Dalstra H, Saupe SJ, et al. Methods for the in vivo and in vitro analysis of [Het-s] prion infectivity. Methods. 2006;39:61-7.
- [55] Coustou-Linares V, Maddelein ML, Begueret J, Saupe SJ. In vivo aggregation of the HET-s prion protein of the fungus Podospora anserina. Mol Microbiol. 2001;42:1325-35.
- [56] Balguerie A, Dos Reis S, Ritter C, Chaignepain S, Coulary-Salin B, Forge V, et al. Domain organization and structure-function relationship of the HET-s prion protein of Podospora anserina. Embo J. 2003;22:2071-81.
- [57] Riek R, Eisenberg DS. The activities of amyloids from a structural perspective. Nature. 2016;539:227-35.
- [58] Colby DW, Prusiner SB. Prions. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011;3:a006833.
- [59] Wickner RB, Edskes HK, Gorkovskiy A, Bezsonov EE, Stroobant EE. Yeast and Fungal Prions: Amyloid-Handling Systems, Amyloid Structure, and Prion Biology. Adv Genet. 2016;93:191-236.
- [60] Baudin A, Guichard A, Collie GW, Rousseau S, Chaignepain S, Hocquellet A, et al. (1)H, (13)C, (15)N NMR resonance assignments and secondary structure determination of the extra-cellular domain from the human proapoptotic TRAIL-R2 death receptor 5 (DR5-ECD). Biomol NMR Assign. 2018;12:309-14.
- [61] Otzen D, Riek R. Functional Amyloids. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2019.
- [62] Mompean M, Li W, Li J, Laage S, Siemer AB, Bozkurt G, et al. The Structure of the Necrosome RIPK1-RIPK3 Core, a Human Hetero-Amyloid Signaling Complex. Cell. 2018;173:1244-53 e10.
- [63] Erskine E, MacPhee CE, Stanley-Wall NR. Functional Amyloid and Other Protein Fibers in the Biofilm Matrix. J Mol Biol. 2018;430:3642-56.
- [64] Van Gerven N, Van der Verren SE, Reiter DM, Remaut H. The Role of Functional Amyloids in Bacterial Virulence. J Mol Biol. 2018;430:3657-84.
- [65] Rouse SL, Matthews SJ, Dueholm MS. Ecology and Biogenesis of Functional Amyloids in Pseudomonas. J Mol Biol. 2018;430:3685-95.
- [66] Wan W, Stubbs G. Fungal prion HET-s as a model for structural complexity and self-propagation in prions. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111:5201-6.
- [67] Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K, Brown CT, Probst AJ, Castelle CJ, et al. A new view of the tree of life. Nat Microbiol. 2016;1:16048.
- [68] Uehling J, Deveau A, Paoletti M. Do fungi have an innate immune response? An NLR-based comparison to plant and animal immune systems. PLoS Pathog. 2017;13:e1006578.

- [69] Koonin EV, Aravind L. The NACHT family a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. Trends in Biochemical Sciences. 2000;25:223-4.
- [70] Marold JD, Kavran JM, Bowman GD, Barrick D. A Naturally Occurring Repeat Protein with High Internal Sequence Identity Defines a New Class of TPR-like Proteins. Structure. 2015;23:2055-65.
- [71] Hu XJ, Li T, Wang Y, Xiong Y, Wu XH, Zhang DL, et al. Prokaryotic and Highly-Repetitive WD40 Proteins: A Systematic Study. Scientific reports. 2017;7:10585.
- [72] Paoletti M, Saupe SJ, Clave C. Genesis of a fungal non-self recognition repertoire. Plos One. 2007;2:e283.
- [73] Chevanne D, Saupe SJ, Clave C, Paoletti M. WD-repeat instability and diversification of the Podospora anserina hnwd non-self recognition gene family. BMC Evol Biol. 2010;10:134.
- [74] Durand PM, Sym S, Michod RE. Programmed Cell Death and Complexity in Microbial Systems. Curr Biol. 2016;26:R587-R93.
- [75] Koonin EV, Krupovic M. Origin of programmed cell death from antiviral defense? Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116:16167-9.
- [76] Iranzo J, Lobkovsky AE, Wolf YI, Koonin EV. Virus-host arms race at the joint origin of multicellularity and programmed cell death. Cell Cycle. 2014;13:3083-8.
- [77] van der Meij A, Worsley SF, Hutchings MI, van Wezel GP. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. FEMS Microbiol Rev. 2017;41:392-416.
- [78] Keller NP. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. Nat Rev Microbiol. 2019;17:167-80.
- [79] Kaur G, Burroughs AM, Iyer LM, Aravind L. Highly regulated, diversifying NTP-dependent biological conflict systems with implications for the emergence of multicellularity. Elife. 2020;9.
- [80] Yeager CM, Gallegos-Graves LV, Dunbar J, Hesse CN, Daligault H, Kuske CR. Polysaccharide Degradation Capability of Actinomycetales Soil Isolates from a Semiarid Grassland of the Colorado Plateau. Applied and Environmental Microbiology. 2017;83:e03020-16.
- [81] Eddy SR. Accelerated Profile HMM Searches. PLoS computational biology. 2011;7:e1002195.
- [82] Potter SC, Luciani A, Eddy SR, Park Y, Lopez R, Finn RD. HMMER web server: 2018 update. Nucleic Acids Research. 2018;46:W200-W4.
- [83] Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research. 1997;25:3389-402.
- [84] Madeira F, Park Ym, Lee J, Buso N, Gur T, Madhusoodanan N, et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. Nucleic Acids Research. 2019;47:W636-W41.
- [85] Consortium TU. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. Nucleic Acids Research. 2018;47:D506-D15.
- [86] Coordinators NR. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Research. 2018;46:D8-D13.
- [87] Nobu MK, Narihiro T, Liu M, Kuroda K, Mei R, Liu W-T. Thermodynamically diverse syntrophic aromatic compound catabolism. Environmental Microbiology. 2017;19:4576-86.
- [88] Tully BJ, Graham ED, Heidelberg JF. The reconstruction of 2,631 draft metagenome-assembled genomes from the global oceans. Scientific Data. 2018;5:170203.
- [89] Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. BLAST+: architecture and applications. BMC bioinformatics. 2009;10:421.
- [90] van der Biezen EA, Jones JD. The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. Current biology: CB. 1998;8:R226-7.
- [91] Li W, Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. Bioinformatics (Oxford, England). 2006;22:1658-9.
- [92] Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. Bioinformatics (Oxford, England). 2012;28:3150-2.
- [93] Bailey TL, Elkan C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. Proceedings International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. 1994;2:28-36.

- [94] Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, et al. MEME Suite: tools for motif discovery and searching. Nucleic Acids Research. 2009;37:W202-W8.
- [95] Waterman MS, Eggert M. A new algorithm for best subsequence alignments with application to tRNA-rRNA comparisons. Journal of Molecular Biology. 1987;197:723-8.
- [96] Huang X, Miller W. A Time-Efficient, Linear-Space Local Similarity Algorithm. Advances in Applied Mathematics. 1991;12:337-57.
- [97] Rice P, Longden I, Bleasby A. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. Trends in Genetics. 2000;16:276-7.
- [98] Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. Fast, scalable generation of highquality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Molecular systems biology. 2011;7:539.
- [99] Sievers F, Higgins DG. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. Protein Science. 2018;27:135-45.
- [100] Crooks GE, Hon G, Chandonia J-M, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. Genome Research. 2004;14:1188-90.
- [101] Konopka BM, Marciniak M, Dyrka W. Quantiprot a Python package for quantitative analysis of protein sequences. BMC bioinformatics. 2017;18:339.
- [102] Piovesan D, Tabaro F, Mičetić I, Necci M, Quaglia F, Oldfield CJ, et al. DisProt 7.0: a major update of the database of disordered proteins. Nucleic Acids Research. 2017;45:D219-D27.
- [103] Rosteck PR, Reynolds PA, Hershberger CL. Homology between proteins controlling Streptomyces fradiae tylosin resistance and ATP-binding transport. Gene. 1991;102:27-32.
- [104] [104] Murzin AG. Structural principles for the propeller assembly of beta-sheets: the preference for sevenfold symmetry. Proteins. 1992;14:191-201.
- [105] Lamb JR, Tugendreich S, Hieter P. Tetratrico peptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? Trends in Biochemical Sciences. 1995;20:257-9.
- [106] Aravind L, Koonin EV. Classification of the caspase-hemoglobinase fold: detection of new families and implications for the origin of the eukaryotic separins. Proteins. 2002;46:355-67.
- [107] Mushegian AR, Koonin EV. Unexpected sequence similarity between nucleosidases and phosphoribosyltransferases of different specificity. Protein Science: A Publication of the Protein Society. 1994;3:1081-8.
- [108] Bonnert TP, Garka KE, Parnet P, Sonoda G, Testa JR, Sims JE. The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family. FEBS letters. 1997;402:81-4.
- [109] Balguerie A, Dos Reis S, Coulary-Salin B, Chaignepain S, Sabourin M, Schmitter JM, et al. The sequences appended to the amyloid core region of the HET-s prion protein determine higher-order aggregate organization in vivo. J Cell Sci. 2004;117:2599-610.
- [110] Bergès T, Barreau C. Heat-shock at an elevated temperature improves transformation efficiency of protoplats from *Podospora anserina*. J Gen Microbiol. 1989;135:601-4.
- [111] Dos Reis S, Coulary-Salin B, Forge V, Lascu I, Begueret J, Saupe SJ. The HET-s prion protein of the filamentous fungus Podospora anserina aggregates in vitro into amyloid-like fibrils. J Biol Chem. 2002;277:5703-6.

TABLES

phylum	#genomes	NBARC-TPR	NACHT-WD	Bell
d_Bacteria;p_Acidobacteriota	91	9	0	2
d_Bacteria;p_Actinobacteriota	13236	2533	284	930
d_Bacteria;p_Bacteroidota	2858	38	8	30
d_Bacteria;p_Campylobacterota	3368	3	0	0
d_Bacteria;p_Chloroflexota	273	48	9	12
d_Bacteria;p_Cyanobacteriota	513	223	152	173
d_Bacteria;p_Deinococcota	81	6	0	0
d_Bacteria;p_Desulfobacterota	267	6	1	3
d_Bacteria;p_Firmicutes	32747	386	2	0
d_Bacteria;p_Firmicutes_A	3076	34	0	0
d_Bacteria;p_Firmicutes_B	130	3	0	0
d_Bacteria;p_Firmicutes_C	182	1	0	0
d_Bacteria;p_Fusobacteriota	195	0	0	0
d_Bacteria;p_Myxococcota	91	20	18	0
d_Bacteria;p_Omnitrophota	88	0	0	0
d_Bacteria;p_Patescibacteria	1772	10	0	0
d_Bacteria;p_Planctomycetota	178	4	0	0
d_Bacteria;p_Proteobacteria	51737	146	26	83
d_Bacteria;p_Spirochaetota	808	4	0	0
d Bacteria;p Verrucomicrobiota	582	8	0	0

Table 1. Phylogenetic distribution of Bell domains and NLRs in bacteria

		NBARC-	NACHT-	
family	#genomes	TPR	WD	Bell
cActinobacteria	12979	2523	282	927
oActinomycetales;fActinomycetaceae	201	22	6	0
oActinomycetales;fBifidobacteriaceae	558	0	0	0
oActinomycetales;fBrevibacteriaceae	45	2	0	0
oActinomycetales;fCellulomonadaceae	75	15	0	1
oActinomycetales;fDemequinaceae	32	0	0	0
oActinomycetales;fDermabacteraceae	26	0	0	0
oActinomycetales;fDermatophilaceae	79	25	2	2
oActinomycetales;fMicrobacteriaceae	415	32	0	4
oActinomycetales;fMicrococcaceae	308	14	8	5
o_Corynebacteriales;f_Corynebacteriaceae	9174	789	20	185
o_Corynebacteriales;f_Geodermatophilaceae	40	13	0	2
o_Corynebacteriales;f_Micromonosporaceae	202	202	36	53
o_Corynebacteriales;f_Pseudonocardiaceae	198	169	20	91
oFrankiales;fFrankiaceae	40	38	20	9
oJiangellales;fJiangellaceae	7	7	0	0
oNanopelagicales;fNanopelagicaceae	31	0	0	0
oPropionibacteriales;fNocardioidaceae	66	24	0	0
oPropionibacteriales;fPropionibacteriaceae	287	3	0	0
oStreptomycetales;fStreptomycetaceae	1049	1047	130	540
o_Streptosporangiales;f_Streptosporangiaceae	100	99	37	33
c_Cyanobacteriia	467	223	152	173
oCyanobacteriales;fColeofasciculaceae	7	7	6	6
oCyanobacteriales;fCyanobacteriaceae	21	2	1	3
oCyanobacteriales;fMicrocystaceae	54	39	6	37
o_Cyanobacteriales;f_Nostocaceae	127	99	84	86
oCyanobacteriales;fPhormidiaceae	32	26	11	9
o_Eurycoccales;f_Leptococcaceae	8	0	0	0
oLeptolyngbyales;fLeptolyngbyaceae	10	9	4	9
oPhormidesmiales;fPhormidesmiaceae	9	8	7	4
oPseudanabaenales;fPseudanabaenaceae	8	3	3	2
oSynechococcales_A;fCyanobiaceae	133	0	1	0

Table 2. Phylogenetic distribution of Bell-domains and NLRs in Actinobacteria andCyanobacteria

Table 3. Sequences selected for functional studies

Motif/Domain/Strain	Accession number and coordinates of <i>in vivo/in vitro</i> constructs	Code name
BASS1/Bell/Streptomyces coelicolor A3(2)	CAB66307.1 (110-139)/(110-139), (38-139)	B1-B S.c.
BASS1/NLR/Streptomyces coelicolor A3(2)	CAB66306.1 (1-34)/-	B1-N S.c
BASS3/Bell/Streptomyces atratus	WP_037701008.1 (70-124)/(70-124), (97-124)	ВЗ-В <i>S.a.</i>
BASS3/NLR/Streptomyces atratus	WP_037701012.1 (1-37)/-	B3-N S.a.
BASS3/Bell/Nostoc punctiforme PCC 73102	ACC79696.1 (94-126)/(94-126)	ВЗ-В <i>N.p.</i>
BASS3/NLR/Nostoc punctiforme PCC 73102	ACC79697.1 (1-38)/-	B3-N <i>N.p.</i>
BASS3/Bell/Nocardia fusca	WP_063130184.1 (74-128)/(74-128), (100-128)	ВЗ-В <i>N.f.</i>

transgene					time aft	er trans	fection	in days				
		5 d.			11 d.			19 d.			26 d.	
	[b*]	[b]	%	[b*]	[b]	%	[b*]	[b]	%	[b*]	[b]	%
B1-B S.c. (RFP)	30	19	39	7	30	81	3	36	92	3	37	93
B1-B S.c. (GFP)	31	5	14	11	14	56	8	17	68	0	18	100
B1-N S.c. (RFP)	32	21	39	9	29	76	8	33	81	3	34	92
B1-N S.c. (GFP)	15	17	53	7	19	73	5	26	84	0	29	100
B3-B <i>N.p.</i> (RFP)	16	1	6	5	3	38	4	4	50	3	10	77
B3-B <i>N.p.</i> (GFP)	33	2	6	12	10	46	8	14	64	1	17	94
B3-N <i>N.p.</i> (RFP)	30	7	19	6	11	65	6	16	73	3	17	85
B3-N <i>N.p.</i> (GFP)	38	8	17	20	8	29	8	12	60	0	15	100
B3-B S.a. (RFP)	33	4	11	14	16	53	8	22	73	3	25	89
B3-B S.a. (GFP)	5	171	97	1	175	99	nd	nd	nd	0	83	100
B3-N S.a. (RFP)	28	12	30	8	16	67	7	17	71	3	17	86
B3-N S.a. (GFP)	16	33	67	7	35	83	6	36	86	1	38	97
B3-B <i>N.f.</i> (RFP)	44	8	15	13	9	41	8	17	68	1	11	92
B3-B <i>N.f.</i> (GFP)	6	92	94	0	98	100	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Table 4. Sp	ontaneous prion	formation	rates of s	elected ba	acterial motifs
-------------	-----------------	-----------	------------	------------	-----------------

nd, not determined. , [b*] or [b], number of strains in the given phenotypic state, %, percentage of strains in the [b] prion state

Table 5. Effect of proline mutations of the BASS3 motif from S. atratus (B3-B S.a.) on prio	n
formation in <i>P. anserina</i>	

			Ind	luced pr	ion							
		4 days			8 days		-	15 days	5		ormatio	11
	[b*]	[b]	•	[b*]	[b]	•	[b*]	[b]		[b*]	[b]	
Transgene	n	n	%	n	n	%	n	n	%	n	n	%
B3-B S.a	4	46	92.0	1	49	98.0	0	50	100	0	24	100
B3-B <i>S.a</i> Q113P	37	0	0	37	0	0	37	0	0	24	0	0
B3-B <i>S.a</i> V114P	49	0	0	49	0	0	49	0	0	24	0	0
B3-B S.a G115P	24	0	0	24	0	0	24	0	0	24	0	0
B3-B S.a Q120P	32	0	0	32	0	0	32	0	0	24	0	0

FIGURES



Figure 1. RHIM-like motifs in bacteria are associated to BELL domains.

A. Genome and domain architecture of the ONI86675.1 and ONI86674.1 gene pair from the actinobacterium strain *Saccharothrix* sp. ALI-22-I. The relative orientation and the overlap between the two ORF are given (the two ORF overlap by 4 bp) as well as the size and domain architecture of the corresponding proteins, respectively for a BELL-domain protein with a C-terminal RHIM-like motif and a NLR-related protein with a NB-ARC and TPR repeat domain and an N-terminal RHIM-like motif. The RHIM-like motif are represented in red in the ORF diagram and the protein cartoon. **B.** Alignment of the RHIM-like motifs of the proteins encoded by the ONI86675.1 and ONI86674.1 gene pair and the RHIM-motif of the human RIP1 and RIP3 kinases. **C.** Alignment of BELL-domains from various prokaryotes (Strep, Q9RDG0 from Streptomyces coelicolor A3(2); Chlor, HBY96210.1 from *Chloroflexi* bacterium ; Sacch, ONI86675.1 from *Saccharothrix sp. ALI-22-I* ; Flavo, SDZ50707.1 from *Flavobacterium aquidurense* ; Nosto, RCJ33357.1 from *Nostoc punctiforme NIES-2108* ; Granu, ROP69996.1 from *Granulicella sp. GAS466* ; Metha, AEB69174.1 from *Methanothrix soehngenii (strain ATCC 5969)* ; Magne, ETR68090.1 from *Candidatus Magnetoglobus multicellularis str. Araruama*). **D**.

Secondary structure prediction for ONI86675.1 from *Saccharothrix sp. ALI-22-I*, red bars represent α -helical propensity, blue bar β -sheet propensity. Boxing corresponds to the α -helices predicted in the contact-based model given in F. Note that secondary structure prediction merged modelled helices 1 and 2 of the contact-based model. **E.** Consensus sequence of the 25 N-terminal residues of the BELL-domain and other predicted or known cell death execution domains in fungi, plants and mammals. The consensus sequence was generated with Weblogo from a HHMER alignment using the following sequences as queries : ONI86675.1 (BELL), *C. globosum* HELLP (Hell), *P. anserina*, HET-S (HeLo), mouse MLKL (MLKL) and *Arabidopsis thaliana* RPW8.1 (RPW8). **F.** Homology model of the BELL-domain of ONI86675.1 from *Saccharothrix sp. ALI22*- based on a contact map (model generated by RAPTOR-X contact).



Figure 2. Ten bacterial amyloid signaling sequences motifs (BASS).

For each of the ten identified motifs, a representative gene pair is given. A consensus sequence for the motif is given. The consensus was generated using Weblogo from the alignment of all motifs pairs bearing the corresponding motif. For each gene pair chosen as illustrative example, the species name, the genome architecture, the gene number and protein size are given as well as an alignment of the BELL-domain and NLR-associate motifs. The number given above the gene diagram is the distance between the BELL-domain encoding and NLR encoding ORF, negative number represent gene overlaps. The sequences encoding the BASS motif is represented in red, the BELL-domain in grey, NB-ARC domain is light blue, TPR repeats in dark blue and WD repeats in green. Under the alignment the secondary structure prediction for the individual sequences of the BELL-domain motif (Jpred) or for a HMM-alignment of the sequence (Jpred (HMM)) are given (E for extended, H for helical). The number of motif pairs identified with the different motifs is given in parentheses. The dots symbolize the phylogenetic distribution of the motif (green, cyanobacteria, beige, actinobacteria).



Figure 3. BASS-motifs form fibrils in vitro.

A. Electron micrographs of fibrils formed by selected BASS1 and BASS3 motifs as indicated (scale bar, 100nm). **B.** ThT-fluorescence signal of BASS1 and BASS3 fibrils. BASS1 or BASS3 fibrils (*Streptomyces coelicolor* A3(2) BASS1 motif from CAB66307.1, residue 38 to 139, and *Nocardia fusca* BASS3 motif from WP_063130184.1, residue 74-128), a no protein control (NC) and BSA were incubated with ThT and fluorescence was measured (excitation wavelength 440 nm and emission wavelength 480 nm). **C.** X-ray diffraction pattern of unoriented BASS1 fibrils (*Streptomyces coelicolor* A3(2) BASS1 motif from CAB66307.1, residue 34.7 Å is marked by an arrow. **D.** ¹³C solid-state NMR spectrum of BASS 1 fibrils (*Streptomyces coelicolor* A3(2) BASS1 motif from CAB66307.1, residue 38 to 139).

Résultats Article 2



Figure 4. Expression of GFP and RFP-fused BASS-motifs in Podospora anserina.

Micrographs of *P. anserina* strains expressing molecular fusions of BASS1 and BASS3 motifs with GFP (in N-terminus) or RFP (in C-terminus) as indicated above each micrograph (Scale bar 5 μ m). Transformants displayed an initial diffuse fluorescence noted [b*] phenotype (left side of the panels) and acquired dot-like fluorescent aggregates, [b] phenotype, after contact with strains already spontaneously expressing the infectious aggregated [b] prion state (right side of the panels).



Figure 5. BASS motifs propagate as prions in *Podospora anserina* and NLR-side motifs induce prion formation of BELL-side motifs.

A. Histogram representing the percentage of [b*] strains expressing the given BASS motifs (fused to RFP in C-terminus) converted to [b] prion phenotype after contact, either with a non-transfected prion-free control strain (spontaneous, in blue), or with [b] prion strains expressing the same motif in the aggregated state (induced, in orange). Percentages are expressed as the mean value ± standard deviation for three independent experiments using six subcultures of four different transformants and corresponding to the analysis of ~70 subcultures for each BASS motif. In each case, the BASS motif are fused to RFP. **B.** Histogram representing the percentage of [b*] strains expressing the given BASS motif (fused to RFP in C-terminus) as indicated, converted to the [b] prion phenotype by contact either with non-transfected prion-free control strains (spontaneous, in blue), or with strains expressing the corresponding NLR-side motif fused to GFP (in N-terminus) in the aggregated [b] prion state (induced, in orange). Percentages are expressed as the mean value ± standard deviation for experiments using six to twelve subcultures of six to ten different transformants and correspond to the analysis of 80 to 100 subcultures for each BASS motif.

Résultats Article 2





Micrographs of *Podospora anserina* strains co-expressing BELL-side BASS motifs fused to GFP (in N-terminus) as indicated and the corresponding NLR-side motif fused to RFP (in C-terminus), (Scale bar 5 μ m). Panel are from left to right, bright field, RFP, GFP and overlay.

Résultats Article 2



Figure 7. The BASS3 motif shows partial prion cross-induction with fungal PP and mammalian RHIM motifs in *Podospora anserina*.

Histogram representing the percentage of [b], [p] and [Rhim] prion containing strains obtained after contact of induced strains (initially displaying [b*], [p*] or [Rhim*] phenotype) with a $\Delta hellp \Delta het$ -s $\Delta hellf$ prion-free control strain (non transfected), or prion containing strains as indicated. Phenotype after induction were determined by monitoring the acquisition of dot-like aggregates by fluorescence microscopy as an indicator of the prion formation. Percentages of prion formation were expressed as the mean value ± standard deviation for 3 independent experiments on at least 4 different transformants corresponding to the analysis of 42 to 102 subcultures per prion motif combination. PP to RHIM prion cross-conversion results are as in [26] and are given here for comprehensiveness. The star sign (*) refer to the fact that PaHELLP(214-271) seeding by CgHELLP(215278) was not tested.

Supporting information

Tables

Tables S1, S2 and S3 are given as supplemental excel files.

Table S4

dataset	А	D	Е	F	G	I	К	L	Ν	Q	Ρ	R	S	Т	V
SwissProt	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
BASS1	1,58	1,36	1,05	0,22	1,85	0,98	0,02	0,13	0,35	2,43	0,01	1,79	1,09	0,73	0,75
BASS2	0,75	1,01	0,15	1,07	2,47	1,17	0,09	0,31	1,45	1,67	0,56	0,84	1,02	1,09	2,22
BASS3	0,71	1,26	0,16	1,74	2,08	1,01	0,24	0,17	3,50	2,20	0,42	0,52	0,26	1,72	1,16
BASS4	0,59	1,68	0,73	0,35	1,55	1,77	1,15	0,88	2,49	1,80	0,04	0,20	0,81	0,94	1,46
BASS5	1,38	0,75	0,46	1,01	2,10	1,98	1,77	0,28	2,07	1,54	0,85	0,04	0,35	0,76	1,34
BASS6	2,17	1,01	0,41	0,18	2,52	1,43	0,13	0,03	0,77	0,53	0,27	0,70	1,30	2,21	1,56
BASS7	0,07	0,41	0,84	1,80	1,89	2,48	1,37	0,09	4,94	1,05	0,43	0,12	0,41	1,69	0,39
BASS8	0,07	1,95	1,01	0,58	1,36	1,92	0,26	0,11	4,02	1,83	0,43	1,98	0,51	0,51	0,17
BASS9	0,96	1,27	0,41	0,31	2,14	1,38	0,96	0,15	2,64	2,25	0,00	0,30	0,69	1,52	0,88
BASS10	1,35	1,11	0,90	0,11	0,92	1,62	1,33	0,36	2,12	1,81	0,00	0,00	1,25	1,28	1,68
BASS-all	1,12	1,18	0,58	0,71	2,07	1,28	0,37	0,24	1,60	1,89	0,29	0,97	0,90	1,13	1,32
HRAM	1,10	0,94	0,54	0,67	1,77	1,15	0,79	0,33	2,05	1,17	0,16	0,91	1,32	1,33	1,39
Ses_B (PP)	0,78	0,26	0,21	1,26	2,37	0,79	0,22	0,44	3,58	1,28	0,60	0,16	1,94	1,49	0,84
NACHT_sigma	0,60	0,41	0,12	2,43	2,72	0,44	0,23	0,17	3,62	1,51	0,94	0,28	1,70	1,46	0,54
beta-solenoid repeats	0,86	1,08	0,64	0,85	1,63	1,30	0,79	0,68	1,74	0,58	0,78	0,56	1,12	1,41	1,29
amyloidogenic peptides	0,73	0,39	0,75	2,03	0,91	2,06	0,57	0,80	1,70	1,07	0,23	0,23	1,06	1,21	1,65
disordered proteins	0,97	1,22	1,27	0,63	1,18	0,56	1,37	0,62	1,07	1,11	1,67	1,00	1,31	1,04	0,67

Table S5: Dot-formation rate of full length bacterial Bell proteins and fungal HeLo and Helldomain proteins fused to GFP or RFP and expressed in *Podospora anserina*.

-		non-in	duced		induced				
	dif	fuse	dot	:-like	dif	fuse	dot	:-like	
transgene	fluore	scence	fluore	scence	fluore	scence	fluorescence		
-	n	%	n	%	n	%	n	%	
S. c-RFP	80	94.1	5	5.9	21	58.3	15	41.7	
S. c-GFP	86	97.7	2	2.3	26	72.2	10	27.8	
S. a-RFP	34	94.4	2	5.6	26	72.2	10	27.8	
S. a-GFP	35	97.2	1	2.8	29	80.6	7	19.4	
HELLP-RFP	23	95.8	1	4.2	20	83.3	4	16.7	
HELLP-GFP	23	95.8	1	4.2	21	87.5	3	12.5	
HET-S-RFP	26	92.9	2	7.1	24	85.7	4	14.3	
HET-S-GFP	17	94.4	1	5.6	16	88.9	2	11.1	
HELLF-GFP	24	100	0	0	22	91.7	2	8.3	

The non-induced state was assayed over 26 days after transformation. The induced state is obtained by confronting the tested strain to a strain expressing the same prion-forming domain in the prion state.

Résultats Article 2

1 11 21 31 41 51 61 MDPEIAALAG TAGTTVVTLM VTNAMESARD GMVALNERFQ PARAESVGEE LEAGREELL AREAG 1 91 191 191 111 121 133 VERELLARFE VADELEVILID ELAPSMPEEP DARHVHLRAR ASGSARIYQA GROCHITER 1 11 21 31 41 51 61 1 11 21 31 41 51 61 1 11 21 31 41 51 61 1 11 21 31 41 51 61 1 11 21 31 41 51 61 1 10 101 11 51 61 61 1 101 101 101 101 61 61 61 61 1 101 101 101 101 101 61 61 62 62 64 64 64 64 64 64 64	71 Strep 71 Strep 10 UVEENQ LINENTDIVDA Magne		
1 11 21 31 41 51 61 MEPITTAAVA LLTRQLAVKG LEKVYETTGE EVSKNAVNUL KGLIFKKOKNT ATELIRLQQK FESQA 81 91 101 111 121			
NUDSETILE TOXYFRSTA NYTRSKNINT GYLRSGOGSI HUDDYGAR.	QQSAL BEILAEKLED	8 9 8	
DQDFAAKVQR LVDDLQKGGG GRTAFDQRGQ TVHGSQTNIA GNVNRPVLSG NF3GPVNTDK SK 1 11 21 31 41 51 61 MDPV5LILAA LVAGVAAGAT DTASQAIKDG YAGLKDLIKK RLADKPQGEM VLAEYEKDPE TWEKP 81 91 101 111 121 131			200
IVRQAQQVLA LINPQQAAQG KYNIQITHSS GPAIGDNAQS HTYNVPPGKP PEPEGSSKA 1 11 21 31 41 51 61 MTDPVSLSVL AHTTIAFLAQ HSPMIADKVG GAAITQAVRE TWDTIKHKLS STPEGSTAIA RLEAQ 81 91 101 11 121 131		Z	
PQLVKALQSD PDFAAKLRNL VITGSGNQVA QGDNNKQAKV DNSTDVKIKI S		E	6.9

Figure S1. Homology models of Bell-domain proteins.

Secondary structure prediction and homology models are given for a set of phylogenetically diverse Bell-domain proteins from prokaryotes ((Strep, Q9RDG0 from Streptomyces coelicolor A3(2) ; Chlor, HBY96210.1 from *Chloroflexi bacterium* ; Sacch, ONI86675.1 from *Saccharothrix sp. ALI-22-I* ; Flavo, SDZ50707.1 from *Flavobacterium aquidurense* ; Nosto, RCJ33357.1 from *Nostoc punctiforme NIES-2108* ; Granu, ROP69996.1 from *Granulicella sp. GAS466* ; Metha, AEB69174.1 from *Methanothrix soehngenii (strain ATCC 5969)* ; Magne, ETR68090.1 from *Candidatus Magnetoglobus multicellularis str. Araruama*). Secondary structure prediction and homology models are as given by RAPTOR-X contact. Red bars represent α -helical propensity, blue bar β -sheet propensity. Secondary structure prediction are given for the full-length protein, the homology model for the Bell-domain region only. Note that secondary structure prediction often merged helix 1 and 2 which in some cases are modelled as a continuous helix.



Figure S2. Workflow of identification and classification of BASS-motifs.

Simplified outline of the bioinformatic pipeline for BASS motif identification. Major steps are specified in boxes, while major outputs are given on outgoing edges. Detailed description can be found in the Methods section of the main text. Abbreviations: aa, amino acids, bp, base pairs, len, length, nr, non-redundant (here: unique), seq., sequences.

Résultats Article 2



Figure S3. Clustering of 29 identified motifs into 10 BASS families.

29 motifs matching at least 5 non-redundant pairs of NLRs and Bell-domain proteins were clustered based on overlapping matches. Motifs (presented as profile HMM logos) were joined if at least half of the pairs hit by one motif profile HMM were also matched by the other. The number in brackets represents the number of pairs for each profile, the number on the arrow joining the motifs indicates the number of common matching underlying sequences. The grouping was preserved in an alternative clustering scheme where motifs sharing at least 40% of their underlying sequences were grouped together. A within-family alignment of all underlying sequence pairs of the motifs is given Table S3.

Figure S4. Amyloid formation propensity of the different motifs based on ArchCandy.

A. ArchCandy amyloid propensity for various amyloid signaling motifs from mammals and fungi are given. Position of the amyloid motif is highlighted in red within a 70 amino acid long sequence window. The ArchCandy prediction is given in red, the blue line gives the recommend significance threshold. For the fungal motifs, prediction of amyloid propensity in the effector domain-associated motif is given in the left column and that of the NLR-associated motif encoded by the adjacent gene is given in the right column. **B.** ArchCandy amyloid propensity is representative protein pairs corresponding to the 10 BASS motifs are give; predictions for the Bell-domain associated motif (left) and the NLR-associated motif (right) are given in the same way as in A. Gene numbers and species names of the representative pairs are as given in Fig. 2.

Résultats Article 2




Figure S5. Double and triple BASS motifs.

A. Species of origin, gene identification and gene architecture of selected pairs of gene encoding a Bell domain and a NLR and sharing an amyloid signaling motif are given together with an alignment of the two (or three motifs) found associated to the Bell domain with the motif found associated to the NLR. The consensus signature sequence of the motif is given above the alignment. The sequences encoding the BASS motifs are represented in red, the Bell-domain in grey, NB-ARC domain is light blue, TPR repeats in dark blue. **B.** Alignment of 10 orthologs of KUM87944.1 protein from *Streptomyces cellostaticus* given in A, showing the two repeats of the motif and the variable proline and glycine-rich region between the R1 and R2 repeats.



Figure S6. Other BASS-associated effector domains.

Examples of gene pairs sharing an amyloid signaling motif in which the effector domain is not a Bell domain. In each case, the species of origin, gene identification and gene architecture of the selected pairs is given together with an alignment of the motifs associated to the effector domain and associated to the NLR. The sequences encoding the BASS motif are represented in red.



Figure S7. BASS3 motif sequences selected for in vivo and in vitro expression studies.

A. Alignment of the BASS3 motif of the selected proteins, the grey and black boxing given residues similar or identical respectively in at least 4 of the 6 sequences. The colored residues highlight identical residues within a gene pair, that is, identical in the Bell (B) and NLR-side (N) motif. Accession number of the sequences are given Table 3. Residues selected for site directed mutagenesis are marked with * (Q113P, V114P, G115P and Q120P). **B.** Species of origin and genome architecture are given for the three selected the Bell-domain and NLR pairs. The number given above the gene diagram is the distance between the Bell-domain encoding and NLR encoding ORF. **C.** Comparison of the consensus sequences of the metazoan RHIM, bacterial BASS 3 and fungal PP-motifs. Logos where generated using all RHIM Pfam entries (PF17721) from Metazoans, all identified BASS 3 pairs motifs (Table S2) and all Pfam entries for PP (PF17046). **D.** Alignment of selected RHIM (human RIP1K and human RIP3K), fungal PP (*C.globosum* HELLP, SBP1 and PNT1 and *P. anserina* HELLP and PNT1 [26]) and BASS3 motifs (*S. atratus*). Residues mutated in BASS3 B3-B *S.a.* are marked with * as in panel A.

Résultats Article 2



Résultats Article 2









Figure S8. Partial co-localization of BASS3 with RHIM and PP aggregates in *P. anserina*.

Micrographs of *Podospora anserina* strains co-expressing tagged BELL-side BASS3 motifs as indicated and reciprocally tagged RIP1 or RIP3 RHIM motifs or fungal PP-motifs, (Scale bar 5 μ m). **A.** RIP1-RFP with GFP-BASS3 (*S. atratus*). **B.** RFP-BASS3 (*S. atratus*) with RIP3-GFP. **C.** PaHELLP-RFP with GFP-BASS3 (*S. atratus*). **D.** BASS3 (*S. atratus*)-RFP with GFP-CgHELLP. **E.** RIP1-RFP with GFP-BASS3 (*N. fusca*). **F.** BASS3 (*N. fusca*)-RFP with GFP-RIP3. **G.** PaHELLP-RFP with GFP-BASS3 (*N. fusca*). **H.** BASS3 (*N. fusca*)-RFP with GFP-CgHELLP. **I.** BASS3 (*N. fusca*)-RFP with GFP BASS3 (*S. atratus*). Panels are from left to right, bright field, RFP, GFP and overlay. Note that due to partial cross-seeding strain expressing the [Rhim] or [π] prion state but not the [b] prion state (noted [b*]) can be obtained in which case bacterial BASS3 is in the dot-like state but RIP and PP-motifs are in the diffuse state. In panel I, this is not the case since cross-seeding between bacterial motifs is systematic.

Résultats Article 2



Résultats Article 2





Figure S9. Lack of co-localization between BASS1 and BASS3, PP and RHIM-motifs aggregates in *P. anserina*.

Micrographs of *Podospora anserina* strains co-expressing tagged BELL-side BASS1 from *S. coelicolor* and reciprocally tagged BASS3, RHIM or fungal PP-motifs (Scale bar 5 μ m). **A.** RIP1-RFP with GFP-BASS1. **B.** RIP3-RFP with GFP-BASS1. **C.** BASS1-RFP with GFP-PaHELLP. **D.** PaHELLP-RFP with GFP-BASS1. **E.** BASS1-RFP with GFP-CgHELLP. **F.** BASS1-RFP with GFP-BASS3 (*N. fusca*). **G.** BASS1-RFP with GFP-BASS3 (*S. atratus*)-RFP with GFP-BASS1. **I.** BASS3 (*N. fusca*)-RFP with GFP-BASS1. Panels are from left to right, bright field, RFP, GFP and overlay. Note that due to lack of cross-seeding strain express the [Rhim], [π] or [b] prion states independently, therefore for every motif combination three panels are given, with one, the other or both motifs displaying the prion states.

	ا ale	%	41	26	22	19	13	14	17	17	14	11	8
	tota anorm	c	35	23	œ	œ	5	6	4	4	4	2	2
tion		\ 0		_					•	~	-		•
infec	sub- thale	~	2	1	m	LD .	m	0	0	8	4	0	0
près	e, s	C	2	1	1	2	1	0	0	2	1	0	0
ance a	êrée	%	39	25	19	14	10	14	17	8	11	11	8
Croiss	alté	Ę	33	22	7	9	4	9	4	2	3	2	2
	nale	%	59	74	78	81	88	86	83	83	86	89	92
	norn	C	50	65	28	35	35	36	20	20	24	16	22
	tal male	%	20	11	11	19	5	14	8	8	7	9	4
	to anor	c	17	10	4	8	2	9	2	2	2	1	1
ection	b- ale	%	ß	1	8	7	0	2	0	4	0	0	0
ant inf	su léth	c	4	1	S	3	0	1	0	1	0	0	0
nce av	rée	%	15	10	e	12	5	12	8	4	7	9	4
Croissa	alté	c	13	6	1	5	2	5	2	1	2	1	Ч
	Jale	%	79	89	89	81	95	86	92	92	89	94	96
	norn	c	67	78	32	35	38	36	22	22	25	17	23
	transfor- mants	analysés(n)	85	88	36	43	40	42	24	24	28	18	24
	Transgènes exprimés		S.c-RFP	S.c-GFP	S.a-RFP	S.a-GFP	N.f-RFP	N.f-GFP	HELLP-RFP	HELLP-GFP	HET-S-RFP	HET-S-GFP	HELLF-GFP

Tableau 5. Altération de croissance de transformants exprimant les protéines bactériennes BELL S.a, N.f et S.c ou les protéines fongiques à domaine HeLo ou HELL avant et après infection par les prions correspondants.

3 Etude de protéines à domaine BELL chez P. anserina

Les prédictions de structure du domaine globulaire BELL sous forme d'un faisceau de 5 hélices et la présence d'une hélice hydrophobe en N-terminal sont des caractéristiques communes avec les domaines HeLo et HELL fongiques, 4HB (présent dans MLKL) des mammifères ou <u>RPP8</u> et Rx_N des plantes, suggérant une similitude dans leurs fonctions inductrices de mort cellulaire et dans les mécanismes de perméation membranaire associés (Murphy et al., 2013; Daskalov et al., 2016). Il est ainsi possible que le domaine BELL représente un domaine d'induction de mort cellulaire analogue et homologue aux domaines HELL, MLKL et RRP8. Il s'agit donc à présent d'étudier ce domaine d'un point de vue structural et fonctionnel. Ces études fonctionnelles requièrent la mise en place d'un système expérimental impliquant l'étude de la mort cellulaire dans le contexte natif dans un hôte actinobactérien. En attendant la mise en place d'un tel système, il nous a semblé pertinent de commencer à étudier l'activité de ce domaine dans un contexte hétérologue disponible, c'est-à-dire *P. anserina*. Afin de poursuivre la caractérisation des protéines à domaine BELL bactériennes, nous avons entrepris des études préliminaires sur la capacité à induire la mort des protéines BELL issues de *S. atratus, N. fusca* (contenant toutes deux un domaine BASS3) et *S. coelicolor* (contenant un domaine BASS1) chez *P. anserina*.

Dans l'étude précédente (article 2), nous avions exprimé ces protéines entières et observé en microscopie à fluorescence leur état d'agrégation avant et après contact avec une souche exprimant le PFD correspondant. Les résultats présentés dans le Tableau S5 de l'article 2 montrent que toutes les protéines exprimées présentant des domaines effecteurs HeLo, HELL ou BELL, montrent un signal diffus stable dans le temps en l'absence de contact avec une souche exprimant le PFD. En revanche, après infection, une proportion de ces transformants présente des foci en fluorescence mais dans une bien moindre mesure que lors de l'expression du PFD seul (Tableau 5 article 2). Ainsi, l'association du domaine BELL aux domaines BASS dans les protéines entières inhibe fortement le passage à l'état agrégé. Ce phénomène avait déjà été décrit pour le domaine HeLo de la protéine HET-S (Mathur et al., 2012), et expliqué par le fait que le passage à l'état prion du PFD entraîne la transconformation du domaine de mort, son activation et la mort de la cellule. Ces résultats sont donc en accord avec un potentiel effet toxique du domaine BELL. Ces mêmes transformants ont été observés pour leur croissance sur milieu solide avant et après infection. Les résultats présentés dans le tableau 5 montrent qu'une très faible proportion des transformants présente une croissance anormale avant infection, et que cette proportion n'augmente pas après infection. Des résultats comparables sont observés pour les transformants témoins exprimant des protéines fongiques à domaine HeLo ou HELL. Seule la construction S.c.-RFP conduit à une augmentation significative (p<0.01) du nombre de transformants présentant une croissance altérée. Les phénotypes d'altération de croissance sont plus ou moins



Figure 74. Croissance sur milieu solide de souches exprimant des protéines à domaine BELL. De gauche à droite, transformants exprimant les protéines S.c-GFP, S.a-GFP et N.f-GFP. Les souches présentant des altérations de croissance sont pointées par un triangle rouge.



Figure 75. Relocalisation des protéines BELL dans les souches présentant une croissance altérée. Micrographies de souches de *P. anserina* exprimant les protéines de fusions S.c-RFP, S. a-RFP et N. f-RFP dans des souches présentant des altérations de croissance. La barre d'échelle représente 5 µm. _____

ŀ				Croiss	ance av	/ant in	fection					Croiss:	ance al	orès in	fectior		
l ransgenes co-exprimés נמבח/מללמילימעיל	transfor- mants	norr	nale	alté	irée	su léth	ıb- nale	to anor	tal male	norr	nale	alté	rée	sul léth	b- ale	toi anor	tal male
	analysés(n)	С	%	L	%	L	%	Ч	%	С	%	L	%	L	%	c	%
GFP-B3-B S.a HELLP-RFP	70	56	80	б	13	ъ	7	14	20	14	20	37	53	19	27	56	80
GFP-B3-B S.a/ CgHELLP-GFP	22	17	77	4	7	1	5	5	23	4	18	13	59	5	23	18	82
GFP-B3-B S.a/ S.a-RFP	46	38	83	7	15	1	2	8	17	20	43	22	48	4	6	26	57
GFP-B3-B N.f HELLP-RFP	61	47	17	8	13	9	10	14	23	13	21	34	56	14	23	48	79
GFP-B3-B N.f/ CgHELLP-GFP	23	19	83	4	17	0	0	4	17	3	13	13	57	7	30	20	87
GFP-B3-B N.f/ N.f-RFP	22	17	77	4	18	1	5	5	23	9	27	6	41	7	32	16	73
GFP-HELLP(214-271)/ HELLP-GFP	18	15	83	2	11	1	9	3	17	3	17	10	56	5	28	15	83
HELLP(214-271)-RFP/ HELLP-GFP	12	10	83	1	8	1	8	2	17	2	17	9	50	4	33	10	83
GFP-HELLF(209-277)/ HELLP-RFP	34	31	91	1	3	1	3	2	9	28	82	3	6	3	6	9	18
HELLF(209-277)-RFP/ HELLP-GFP	16	14	87	1	9	1	9	2	13	13	81	2	13	1	9	3	19
HET-S-RFP / HELLP-GFP	16	15	94	0	0	7	9	1	9	14	88	1	9	T	9	2	13

Tableau 6. Altération de croissance des souches co-exprimant des effecteurs (HELLP, CgHELLP, HET-S ou BELL) et différents PFD avant et après infection par les prions correspondants.

Résultats Partie 3



Figure 76. Les prions [b] provoquent une réaction d'auto-incompatibilité dans des souches coexprimant HELLP ou CgHELLP et B3-B S. a ou B3-B-N. f.

Comparaison de croissance sur milieu solide de souches co-exprimant HELLP-RFP ou CgHELLP-RFP et GFP-B3B S. a ou GFP-B3B N. f avant (à gauche) et après contact avec une souche exprimant le prion [b] (à droite). L'infection par le prion [b] conduit à une réaction d'auto-incompatibilité suscitant des altérations de croissance plus ou moins importantes. prononcés, allant d'un simple retard de pousse à une croissance sub-léthale comme le montre la **Figure 74**. Nous avons également pu observer en microscopie à fluorescence, dans certains articles des souches présentant les plus fortes altérations de croissance, une relocalisation de ces protéines à proximité de la membrane et des phénotypes de mort cellulaire caractéristiques d'une mort de type nécroptotique (gonflement ou rétrécissement des articles, présence de vacuoles en grand nombre, épaississement des membranes, etc.) (**Figure 75**), comme cela avait été décrit pour HET-S (Mathur et al., 2012). Ces phénotypes sont plus marqués dans les souches exprimant la protéine BELL de *S. coelicolor*. Par ailleurs, dans tous les transformants à croissance altérée, on observe des phénomènes d'échappement avec l'apparition de secteurs à croissance restaurée et même une pousse normale des souches après plusieurs repiquages ; ces phénotypes sont associés à une perte de fluorescence ou à l'observation d'un signal de fluorescence diffus, suggérant une contre-sélection de la polymérisation potentiellement toxique.

Ce système expérimental apparaît peu adapté pour mettre en évidence un effet toxique du domaine BELL puisque même les protéines fongiques comme HET-S, HELLP et HELLF ne conduisent pas dans ce contexte à des altérations de croissance généralisées et stables. Pour tenter d'augmenter l'efficacité de conversion du domaine BELL, nous avons alors utilisé un contexte dit « d'autoincompatibilité » en co-exprimant les domaines prion BASS3 isolés et les protéines BELL-entières de S. atratus et N. fusca dans une même souche. En parallèle, nous avons réalisé des témoins en coexprimant également les domaines BASS3 avec les effecteurs fongiques HELLP et CgHELLP. Les résultats sont présentés dans le Tableau 6. Nous avons également replacé dans ce tableau les témoins présents dans le Tableau 2 de l'article 1 à titre de comparaison montrant des combinaisons compatibles (absence d'interaction entre le PFD et l'effecteur, par exemple [Het-s]/HELLP) ou incompatibles ($[\pi]$ /HELLP). Les résultats montrent que dans le cas des co-expressions des motifs BASS3 avec les protéines HELLP ou CgHELLP fongiques, le taux de souches à croissance altérée après infection est comparable à celui des témoins auto-incompatibles basés sur une interaction homotypique (par exemple GFP-HELLP(214-271) co-exprimé avec HELLP-GFP). Les phénotypes de croissance observés sont également comparables (Figure 76 et Figure 10 de l'article 1). Ces résultats confirment dans un contexte expérimental différent de ceux utilisés dans l'article 2 que les motifs BASS3 bactériens ont la capacité de convertir les motifs PP-fongiques. Dans le cas de la co-expression de protéines BELL (S.a-RFP et N.f-RFP) avec leur PFD respectifs, il y a également une augmentation significative du nombre de transformants présentant une croissance altérée (p<0.01). En revanche, les altérations de croissance observées lors de la co-expression avec les protéines BELL sont moindres, tant dans les proportions, que dans les phénotypes observés (Tableau 6 et Figure 77A). Néanmoins, on peut observer dans



Figure 77. Les protéines BELL S. a et N. f provoquent des altérations de croissance modérées et se relocalisent dans la région membranaire en présence de prions [b]

(A) Comparaison de croissance sur milieu solide de souches co-exprimant S. a-RFP ou N. f-RFP et GFP-B3B S. a ou GFP-B3B N. f avant (à gauche) et après contact avec une souche exprimant le prion [b] (à droite). L'infection par le prion [b] conduit à une altération de croissance modérée. (B) Micrographies de souches de *P. anserina* co-exprimant les protéines de fusions, S. a-RFP ou N. f-RFP et GFP-B3B S. a ou GFP-B3B N. f et présentant une croissance altérée. On note la relocalisation de la protéine entière à proximité des membranes. La barre d'échelle représente 5 µm.

certains articles des phénomènes de relocalisation des protéines S.a et N.f à proximité de la membrane (Figure 77B).

Les résultats de ces expériences d'expression hétérologue des protéines BELL ne permettent pas à l'heure actuelle de conclure que le domaine BELL est fonctionnellement analogue au domaine HELL fongique. Néanmoins, trois éléments soutiennent cette hypothèse. En particulier, il apparaît que le domaine BELL réduit la fréquence de conversion des domaines BASS. Un phénomène similaire est observé dans le cas des protéines fongiques à domaine HELL. Mais on ne peut pas exclure que cet effet sur la fréquence de conversion ne soit pas le résultat d'un effet toxique mais résulte d'une modification directe de la capacité de conversion des domaines BASS. Les observations des souches exprimant le domaine BELL et présentant une croissance altérée laissent apparaître une localisation des protéines BELL dans la région de la membrane plasmique, comme attendu. Enfin, la fraction de souches présentant une croissance altérée, augmente lorsque des souches exprimant une protéine à domaine BELL et un domaine BASS correspondant sont infectées par un prion BASS. Ces résultats sous cette forme préliminaire nous encouragent à poursuivre l'étude fonctionnelle du domaine BELL. Il est possible que le modèle hétérologue utilisé ne soit pas adapté à ces études fonctionnelles. Par exemple, il est possible que les propriétés chimiques et structurales des membranes fongiques ne permettent pas une insertion efficace du domaine BELL. Ces considérations nous invitent à plutôt considérer les études fonctionnelles futures du domaine BELL dans le cadre du développement d'un modèle bactérien. Il s'agira de mettre en place l'expression des protéines BELL dans leur hôte natif. Streptomyces coelicolor semble être le modèle de choix pour ce type d'étude, car il s'agit du système modèle principal pour l'étude de la biologie cellulaire et du développement chez les actinobactéries. La protéine BELL à motif BASS1 identifiée dans cette espèce sera donc la cible de futures études fonctionnelles.

Discussion

DISCUSSION

Nous avons caractérisé ici une troisième voie de signalisation amyloïde chez *P. anserina* impliquée dans un système de mort cellulaire programmée. Ce système qui ne comprend que deux gènes, contrairement à celui précédemment caractérisé chez *C. globosum* (Daskalov et al., 2016) qui en comprend trois, est également basé sur le motif PP présent en C-terminal du NLR, PNT1, et en N-terminal de l'unique effecteur HELLP. L'activation du domaine HELL de HELLP par conversion amyloïde présente les mêmes caractéristiques que celle des domaines HeLo et HELL précédemment caractérisés : une relocalisation dans la région membranaire associée à la mort de la cellule. Basé sur les similarités fonctionnelles avec HET-S et sur les homologies de séquences avec les domaines HeLo, HELL et également 4HB de MLKL, notamment la prédiction d'une hélice TM hydrophobe en N-terminal, il semble raisonnable de proposer que HELLP fonctionne comme une toxine entraînant la mort de la cellule par perméation membranaire. Néanmoins, l'utilisation de marqueurs membranaires et de techniques de fractionnement cellulaire seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Comparaison de PaHELLP et CgHELLP

Dans le domaine des prions, le phénomène de barrière d'espèce empêche souvent l'induction croisée entre des séquences de prions hétérologues. Ce phénomène est déterminé par des différences dans les séquences primaires de la protéine prion en question et sont par ailleurs en relation avec l'existence de souches (Béringue et al., 2008). Un modèle courant propose que deux prions sont capables de « passer la barrière d'espèce » s'il existe un chevauchement dans les constellations de souches de prions que chacun d'eux est capable de former. Nous avons observé des interactions croisées entre HELLP et CgHELLP. De la même façon que la protéine HET-s de Fusarium graminearum est capable de nucléer la protéine HET-s de P. anserina, il existe une interaction croisée (cross-seeding) entre HELLP et CgHELLP. S'il est formellement abusif de parler dans ce cas de passage de la barrière d'espèce (puisque ces prions ne sont pas transmis d'une espèce à l'autre mais propagés dans le même hôte), il reste que l'existence de ce cross-seeding présente une analogie avec le phénomène de passage de barrière d'espèce. Ces motifs présentent 45% d'identité de séquence, ce qui est comparable à l'homologie existant entre les motifs prions des protéines HET-s de Podospora et de Fusarium. Par ailleurs, l'homologie des différents motifs PP appartenant à un même cluster (CgPNT1, CgHELLP et CgSBP ou PNT1, HELLP) est aussi du même ordre. Ainsi, la capacité de cross-seeding entre CgHELLP et HELLP était en somme attendue. Pour l'instant, des données de structure sur le motif PP de C. globosum montrent une structure ordonnée en feuillets β caractéristique des amyloïdes, ces données sont à compléter, notamment pour comprendre les interactions entre les différents motifs PP. La différence notable entre les clusters de gènes à motif PP de *C. globosum* et de *P. anserina* réside dans l'absence de protéine homologue à la lipase prédite SBP, dans le cas de *P. anserina*. SBP est localisée à la membrane par l'intermédiaire de CgHELLP et pourrait participer à l'activité de perméation de membrane. Il reste que cette protéine semble dispensable dans le cas du cluster de *Podospora*. D'ailleurs, même dans le cas du cluster de *C. globosum*, la réaction de mort cellulaire peut être induite en l'absence de SBP (Daskalov et al., 2016).

Trois voies de signalisations parallèles

La question de quelle séquence ou quel déterminant de structure sont requis entre deux amyloïdes pour l'amorçage réciproque (*cross-seeding*) est très pertinente à la fois d'un point de vue fondamental et dans le contexte des amyloïdoses. Des études récentes ont montré que l'extrême divergence entre les familles HRAM est favorable à la création de barrière de *cross-seeding* et qu'un repliement similaire n'est pas suffisant pour passer cette barrière (A. Daskalov et al., 2020). Ces données permettent de délimiter l'importance relative de la structure globale *vs* la nature des chaînes latérales dans l'efficacité du *cross-seeding*.

Nous avons montré une totale absence d'induction croisée, de cross-seeding, entre les systèmes de signalisation amyloïde de P. anserina, permettant la coexistence de trois cascades de signalisation amyloïde indépendantes dans le même organisme. Une telle diversification permettant l'existence de voies de signalisation parallèles a été rapportée pour le domaine CARD, impliqué dans des machineries de signalisation chez les mammifères tels que les filaments CARD, (Hou et al., 2011), l'inflammasome (Lu et al., 2014) ou l'apoptosome (Yuan and Akey, 2013). En réalité, le processus de polymérisation dit "prion-like" impliquant la nucléation d'amyloïdes ou de domaines globulaires particuliers apparaît être un moyen efficace de transmettre un signal présentant des atouts notables tels que l'amplification du signal, l'effet de seuil, et la réduction du bruit (Cai and Chen, 2014; Wu, 2013). Il s'avère que les motifs amyloïdes sont encore plus appropriés de par leurs propriétés intrinsèques que sont la nature coopérative du repliement amyloïde, leur robustesse, leurs propriétés propagatrices et leur compacité (Loquet and Saupe, 2017). Ce mode de transduction original basé sur un prion a donc été conservé au cours de l'évolution et a été particulièrement diversifié chez les champignons (Daskalov et al., 2015a; Dyrka et al., 2014). Les champignons colonisent quasiment tous les environnements, et de fait, interagissent avec de nombreux organismes vivants qui peuvent s'avérer être des pathogènes, des prédateurs ou de futurs symbiotes (Frey-Klett et al., 2011; Uehling et al., 2017). Dans tous les cas, ils ont besoin d'un système de reconnaissance du soi et du non-soi précis, et il a récemment été proposé que les NLRs pourraient être largement impliqués dans un tel

système d'immunité innée chez les champignons (Ipcho et al., 2016; Paoletti and Saupe, 2009; Uehling et al., 2017). Dans ce contexte, la nature infectieuse de la transmission du signal basée sur les amyloïdes, accompagnée de la structure syncytiale des champignons filamenteux, pourrait être un moyen très efficace de s'adapter rapidement à des interactions microbiennes. La diversification des amyloïdes en différentes classes de variants, que ce soit dans des sous-familles structurellement semblables ou différentes, pourrait permettre la création de modules d'assemblage polyvalents pouvant coexister dans une même cellule sans interférer entre eux aboutissant à une réponse fine et hautement régulée. Ce postulat est parfaitement illustré par les précédentes analyses informatiques décrivant une très grande diversité dans la famille HRAM, ainsi qu'une distribution très large au sein des espèces, avec le plus souvent plusieurs membres appartenant à des sous-familles semblables ou différentes dans chaque espèce (Daskalov et al., 2015a), ou par l'identification de plusieurs types de motifs amyloïdes (PP and σ) pouvant être combinés dans la même espèce (Daskalov et al., 2012; Dyrka et al., 2014). La validation expérimentale de l'existence de plusieurs voies de signalisation amyloïde fonctionnelles et indépendantes a finalement été établie chez P. anserina avec la caractérisation des HRAMs HET-S et HELLF (A. Daskalov et al., 2020), et maintenant avec l'étude fonctionnelle de HELLP. De plus, les NLRs associés à ces trois systèmes présentent un domaine de liaison au ligand (répétitions TPR ou WD) hautement polymorphe dans les populations naturelles, ce qui est parfaitement en accord avec un éventuel rôle dans la réponse immunitaire innée (Dyrka et al., 2014; Daskalov et al., 2015b).

L'existence de ces trois voies parallèles d'induction de mort souligne le caractère hautement redondant de ces voies, même s'il faut entendre redondance ici uniquement pour le niveau d'exécution de la mort, les signaux d'induction étant vraisemblablement différents pour ces différents systèmes. Ces trois systèmes s'ajoutent aux autres modules d'inductions de la mort cellulaire déjà caractérisés chez *Podospora* et correspondant à d'autres gènes d'incompatibilité comme ceux appartenant à la famille HNWD et *het-Z* notamment. Il reste cependant que l'analyse des génomes fongiques montre aussi l'existence de voies de type NLR/PFD/HELL qui fonctionnent probablement d'une manière croisée avec plusieurs NLRs convergeant sur une même protéine d'exécution de la mort, ou à l'inverse, une NLR activant plusieurs protéines d'exécution ((Loquet and Saupe, 2017) **et Figure 46**). On voit ainsi que ce mode de signalisation permettrait une réticulation modulable des voies de mort cellulaire et de défense.

Il a été proposé que le système d'incompatibilité [Het-s]/HET-S dérive par exaptation du système HET-S/NWD2 afin d'intervenir dans des processus d'allo-reconnaissance (Daskalov and Saupe, 2015). Or, nous avons pu recréer des systèmes d'incompatibilité artificiels [ϕ]/FNT1 et [π]/PNT1, il serait maintenant intéressant de savoir si dans les populations naturelles un tel phénomène d'exaptation permettant l'allo-reconnaissance s'est déjà produit pour les protéines HELLF et HELLP.

225

Pour explorer ce point, il conviendrait d'analyser les séquences génomiques de différents isolats de *P. anserina* et d'espèces proches pour y détecter les homologues de HELLP et HELLF. Il est possible que dans certains souches ou espèces, ces gènes aient subi la même trajectoire évolutive que celle proposée pour [Het-s] et le système d'incompatibilité [Het-s]/HET-S. Spécifiquement, il s'agirait de rechercher des mutations dans les séquences des domaines HELL de HELLP et HELLF permettant de lever la toxicité du domaine et ainsi la formation d'un prion et par extension la création d'un système d'incompatibilité avec les souches présentant une forme « sauvage » du même gène.

PP, RHIM et BASS3

Les motifs RHIM sont impliqués dans des processus d'immunité innée chez les mammifères et dans la drosophile (Li et al., 2012; Kleino et al., 2017). Le fait qu'une variété de virus exprime des protéines contenant des motifs RHIM et que des bactéries pathogènes expriment une enzyme clivant spécifiquement les séquences RHIM de l'hôte afin d'empêcher l'assemblage du nécrosome, souligne le rôle crucial des interactions impliquant des RHIM dans la réponse immunitaire innée contre des infections microbiennes (Baker et al., 2018). De plus, la nécroptose joue un rôle essentiel dans l'homéostasie tissulaire et sa dérégulation entraîne des lésions physiopathologiques souvent observées dans des évènements de sclérose des tissus, ou dans les dommages ischémiques suivant les infarctus du myocarde ou les accidents vasculaires cérébraux (Linkermann et al., 2013). La compréhension des mécanismes d'initiation et de propagation des assemblages impliquant des RHIM serait donc primordiale pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'empêcher la subversion des interactions hôte/pathogènes, et de prévenir les lésions tissulaires provenant des dérégulations de la nécroptose. Pour l'heure, les stratégies thérapeutiques envisagées ciblent le développement d'inhibiteurs de l'activité kinase (Degterev et al., 2008), mais il pourrait être plus approprié de chercher à moduler l'efficacité de formation des homo- ou des hétéropolymères de RIP1 et RIP3. Ceci requiert une connaissance précise des interactions moléculaires entre les motifs RHIM mammifères et aussi avec leurs partenaires pathogènes. Nous avons montré que les motifs RHIM de RIP1 et RIP3 forment des prions capables de se propager chez P. anserina et qu'ils cross-seedent partiellement avec les prions [π] formés à partir des motifs PP. Ces résultats sont en accord avec le fait que les motifs RHIM ressemblent aux motifs PP, la similarité étant centrée sur le noyau G- ϕ -Q- ϕ -G du motif (ϕ représente un résidu hydrophobe). Des analyses de conservation des motifs PP fongiques ont révélé une forte conservation de la structure palindromique centrée sur le résidu Q, ainsi que des résidus N et G de part et d'autre. Au-delà des similitudes fonctionnelles évidentes entre ces motifs, toutes ces données suggèrent des similitudes de structure au moins partielles entre les motifs PP et RHIM. La structure des hétéropolymères de la région RHIM des protéines RIP1 et RIP3 a été résolue et représente une nouvelle classe de repliement amyloïde différente des repliements de type solénoïde observés pour les HRAMs, mais présentant néanmoins des caractéristiques communes avec ceux-ci, mais également avec d'autres amyloïdes, y compris ceux impliqués dans des maladies neurodégénératives comme les patterns de résidus G/N/Q qui permettent l'établissement des échelles d'asparagine ou glutamine qui stabilisent la structure. Des analyses structurales plus poussées des fibres amyloïdes formées par les motifs PP devraient permettre de déterminer si ces polymères partagent un repliement similaire avec les fibres RIP1/RIP3 ou s'ils diffèrent significativement. De telles analyses pourraient permettre la compréhension de la polymérisation et de la propagation des amyloïdes de type PP ou RHIM. Dans ce contexte, *Podospora* pourrait offrir un modèle d'étude simple pour étudier les assemblages impliquant des motifs RHIM et également permettre de rechercher d'éventuelles molécules inductrices ou inhibitrices des interactions homo- ou hétéropolymériques des protéines RIP1 et RIP3.

Considérations sur l'évolution de la mort cellulaire programmée

Toutes ces données sont en faveur d'une origine évolutive commune des motifs RHIM et PP. C'est cette hypothèse qui a poussé l'équipe à effectuer une recherche de motifs apparentés dans le règne du vivant. La caractérisation des motifs BASS dans des espèces bactériennes filamenteuses dans un contexte génique NLR/effecteur semblable aux systèmes de signalisation amyloïde fongiques nous a permis de proposer l'existence de telles cascades de signalisation chez les Procaryotes. En effet, les données in vitro ont permis de confirmer la nature amyloïde des motifs BASS. Et l'utilisation du modèle P. anserina a permis de montrer non seulement les propriétés prion de ces motifs in vivo, mais également de renforcer l'hypothèse d'une possible transduction du signal entre NLR et effecteur en montrant des interactions fonctionnelles croisées entre les partenaires. De plus, la famille BASS3 qui partage le noyau de séquence G- ϕ -Q- ϕ -G commun avec les motifs PP et RHIM, cross-seede partiellement avec ceux-ci. La perte de capacité à former des prions lors de mutations des résidus du noyau du motif BASS3-S.a nous a permis de confirmer l'importance de ces positions dans la polymérisation de ce type d'amyloïde. Les divergences de séquence par rapport au consensus sur les autres positions sont très probablement à l'origine du caractère partiel des interactions hétérotypiques. Toutes ces données suggèrent de nouveau des similitudes de structures entre tous ces motifs et une conservation à long terme de ces derniers au cours de l'évolution. Cependant, les similitudes étant modérées et les séquences courtes, on ne peut pas se permettre d'exclure totalement l'hypothèse d'une évolution convergente. Les similitudes de structures et les différences probablement substantielles qui doivent exister entre les repliements amyloïdes seront à explorer dans le futur, afin de poursuivre l'objectif d'une meilleure compréhension de la polymérisation et de la propagation de ces motifs qui sont au cœur de processus physiologiques essentiels dans les organismes multicellulaires.

Les motifs BASS se sont considérablement diversifiés dans les bactéries, si bien que la diversité des motifs amyloïdes dans les lignées bactériennes est plus grande que dans les champignons, ce qui n'est pas forcément surprenant compte tenu de la plus grande largeur phylogénétique du groupe taxonomique des bactéries (Hug et al., 2016). Les motifs appartenant à la même famille BASS partagent des homologies de séquences primaires contrairement aux motifs appartenant à des familles différentes, qui partagent néanmoins des caractéristiques communes (taille, biais de composition en acides aminés). Ainsi, à l'intérieur d'une même famille, il est possible que les motifs BASS soient suffisamment proches pour interagir entre eux comme nous l'avons observé avec les BASS3-S.a et - N.f. En revanche, il est probable que les divergences de séquences entre familles soient suffisamment fortes pour qu'il n'y ait pas d'interactions croisées, même partielles. C'est ce que nous avons observé dans le cas du motif BASS1-S.c qui n'est pas capable de *cross-seeder* ni avec les BASS3, ni avec les RHIM ou les PP. Néanmoins, il se peut que l'organisation des fibres et même le repliement soit conservés d'une famille à l'autre, même en l'absence de *cross-seeding* comme c'est le cas pour les HRAMs issus des familles 1 ([Het-s]) et 5 ([ϕ]).

Les Bactéries et les Archaea possèdent des systèmes de défense variés essentiellement dirigés contre des attaques virales (Koonin et al., 2017). Il a été montré que des domaines essentiels de la machinerie apoptotique des Eucaryotes avaient divers homologues dans les bactéries. De plus, il a été proposé qu'un organisme monocellulaire puisse utiliser la mort cellulaire programmée (PCD) pour réguler et/ou coordonner une organisation multicellulaire dans une colonie bactérienne. (Engelberg-Kulka et al., 2006; Allocati et al., 2015). Dans ce paradigme, certaines cellules bactériennes subiraient une PCD pour maintenir la survie des cellules restantes dans la colonie (concept de suicide altruiste) (Engelberg-Kulka et al., 2006; Rice and Bayles, 2008). Bien que certains auteurs aient proposé qu'un tel comportement altruiste puisse plutôt être un sous-produit de fonctions « pro-survie » qui seraient détournées sous certaines conditions en PCD (Nedelcu et al., 2011), d'autres ont proposé que la PCD ait réellement émergée dans des formes primitives de multicellularité (regroupement de microbes unicellulaires), probablement à partir de systèmes antiviraux procaryotes, et ait co-évolué avec l'émergence d'organismes multicellulaires (Iranzo et al., 2014; Koonin and Krupovic, 2019). Dans une telle hypothèse, les mécanismes de PCD et potentiellement certains systèmes de signalisation seraient extrêmement anciens et auraient été conservés pendant des milliards d'années (Koonin and Aravind, 2002; Leipe et al., 2004). Cependant, l'évolution de la PCD reste à ce jour une question ouverte. La configuration des systèmes BELL/NLR, leur diversité et leur distribution dans les espèces bactériennes filamenteuses sont en faveur de cette dernière hypothèse. De plus, le domaine α -hélicoïdal (hélice TM) prédit des domaines BELL est situé dans des architectures de domaines similaires à celle des domaines HeLo et HELL. Et les résultats préliminaires sur l'activité toxique des domaines BELL dans le modèle *P. anserina* sont également en faveur d'un mécanisme d'action similaire à celui des domaines fongiques. S'il se confirme que le domaine BELL est homologue de manière distante au domaine HELL et par extension au domaine 4HB de MLKL et à la famille de domaine CC de type RPP8 des plantes, on serait ici en présence d'un mode d'induction de la PCD très ancien et présentant une très large couverture phylogénétique.

Ainsi, un mode de transduction du signal basé sur des motifs amyloïdes de type RHIM, PP et BASS3 semble commun aux bactéries, aux métazoaires et aux champignons, et interviendrait dans des processus d'immunité innée associés à des voies de PCD qui pourraient avoir une origine évolutive commune chez les procaryotes. On peut noter au passage, la ressemblance remarquable qui rapproche les streptomycètes des champignons filamenteux, dans leur organisation cellulaire filamenteuse, leurs habitats, leur production de métabolites secondaires. Cette ressemblance est trahie par leur désignation comme « mycètes ». Il est remarquable que cette ressemblance se retrouve à l'échelle moléculaire dans certaines machineries cellulaires (ici la signalisation amyloïde mais aussi la présence de protéines de type NLR) alors que ces deux types d'organismes sont phylogénétiquement très distants. Il y a de ce point de vue plus de ressemblance entre un streptomycète et un ascomycète filamenteux comme *Podospora*, qu'entre *Podospora* et un ascomycète unicellulaire comme *S. cerevisiae*.

Dans l'ensemble, nos résultats nous ont amené à émettre l'hypothèse que les protéines BELL-BASS sont analogues aux toxines ciblant la membrane contrôlées par transduction amyloïde, comme la toxine fongique HET-S formant des pores, et sont donc susceptibles de contrôler des voies de PCD chez les bactéries multicellulaires. Dans des travaux futurs, il s'agira d'étudier le rôle fonctionnel des protéines BELL-BASS dans des actinobactéries filamenteuses et de caractériser la base structurale et les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des signalosomes macromoléculaires procaryotes. D'une manière générale, les relations évolutives et les ressemblances mécanistiques qui se font jour entre ces systèmes microbiens et des processus de mort cellulaire et de défense décrits chez les animaux et les plantes invitent à approfondir l'étude de ces voies de mort cellulaire et d'alloreconnaissance dans les champignons en vue de contribuer à une immunologie comparée avec large couverture phylogénétique.

On peut essayer ici de proposer quelques pistes concrètes qui pourraient être mises en œuvre pour la poursuite de ce projet.

229

Perspectives

Caractérisation structurale des domaines PP et BASS par RMN du solide

Les motifs BASS s'offrent comme de nouveaux exemples d'amyloïdes fonctionnels qu'il est pertinent de comparés d'un point de vue structural aux amyloïdes fongiques (HET-s, HELLF) et animaux (RHIM). La RMN du solide (SSNMR) est avec la cryoEM la technique permettant d'établir des structures amyloïdes à haute résolution (Loquet et al., 2018; Tycko, 2011). Des futurs travaux pourront être dédiés à l'acquisition de modèles structuraux à haute résolution de domaines BASS sélectionnés et des domaines PP, en utilisant cette technique SSNMR. Cette partie du travail serait réalisée dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire du Dr Antoine Loquet à l'Institut Européen de Chimie et Biologie et le CBMN (UMR5248) à Pessac.

Plus précisément, les données préliminaires sur les motifs PP et sur les séquences BASS sélectionnées (le motif BASS 1 de *S. coelicolor*, les motifs BASS3 de *S. atratus* et *N. fusca* et un motif BASS2 (le deuxième motif le plus abondant) issu de *Streptomyces olivochromogenes*) ont montré que tous ces motifs forment des agrégats fibrillaires hautement ordonnés similaires à ceux observés pour les amyloïdes fongiques caractérisés. Des spectres SSNMR ont été obtenus pour CgHELLP et pour BASS1 donnant de premières indications de structure (Daskalov et al., 2016). Ces premières données permettent de penser qu'il sera possible de déterminer des modèles structuraux de haute résolution pour tous ces motifs. Ces résolutions de structure permettront également la comparaison de ces repliements amyloïdes avec ceux des RHIM du nécrosome humain (Mompeán et al. 2018) avec qui ils interagissent partiellement. Cela devrait notamment nous renseigner sur les caractéristiques structurales nécessaires à leurs interactions.

Caractérisation fonctionnelle et structurale des domaines bactériens HeLo-like, BELL

Les analyses *in silico* préliminaires sur le domaine BELL (étude de co-variance, prédictions de structure secondaire et de repliement) ont abouti à des modèles de faisceaux à cinq hélices qui partagent certaines caractéristiques de repliement avec les familles HeLo/4HB/CC.

Afin de confirmer ces similitudes, des études *in vitro* du domaine BELL de la protéine de *S. coelicolor* seront engagées. Les 110 premiers acides aminés pourront être exprimés dans *E. coli*, et après purification, le domaine BELL soluble soumis à diverses techniques afin d'acquérir des informations structurales à basse résolution (dichroïsme circulaire (CD), diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)) avant de tenter d'obtenir des informations structurales à haute résolution avec la diffraction aux rayons X de cristaux et/ou des techniques de RMN.

Par la suite, les interactions entre différents lipides ou liposomes et le domaine BELL purifié pourront être étudiées avec trois objectifs principaux : 1) déterminer le lipide ou type de lipides

spécifiques reconnus par le domaine BELL, 2) déterminer le mécanisme moléculaire précis d'interaction entre le ou les lipides et le domaine BELL et 3) analyser les potentiels oligomères BELL-BELL formés dans l'environnement lipidique. L'affinité et la spécificité de liaison du domaine BELL aux lipides pourra être examinée en utilisant des bandelettes lipidiques (Shirey et al., 2017). Pour explorer les interactions lipide-protéine, le domaine BELL entier et/ou seulement les 25 premiers acides aminés (l'hélice α transmembranaire putative) pourra être utilisé. Le peptide de 25 acides aminés sera synthétisé chimiquement, ce qui nous offrira la possibilité d'incorporer des acides aminés marqués aux positions souhaitées et d'étudier spécifiquement les interactions de ces résidus avec les lipides par RMN. Cela permettrait de déterminer la surface d'interaction protéine-lipide et d'explorer la formation d'oligomères protéiques BELL-BELL qui pourraient se former en présence des lipides, comme dans le cas des domaines HeLo et MLKL (Seuring et al., 2012; Wang et al., 2014). Ces expériences seront suivies en microscopie électronique afin de détecter toute perturbation de la surface des liposomes, ou leur lyse (Faudry et al., 2013).

Étude in vivo des voies de signalisation amyloïde NLR/BELL chez P. anserina et S. coelicolor

Enfin, les travaux préliminaires effectués dans P. anserina, notamment les expériences de coexpression avec la protéine BASS1 de S. coelicolor pourraient être poursuivis. On utilisera également P. anserina pour explorer davantage l'interaction entre la protéine BELL-BASS et le récepteur NLR afin de démontrer que le NLR contrôle la protéine BELL-BASS d'une manière dépendante du ligand, de manière similaire à NWD2/HET-S (Daskalov et al., 2015b). Il est possible de tirer parti des aspects modulaires et combinatoires de l'architecture des protéines de type NLR (Jones et al., 2016) et de la description récente d'un NLR contrôlant la mort cellulaire chez P. anserina, nommé HET-Z (Heller et al., 2018). HET-Z est composé d'un domaine NOD central du type NB-ARC et d'un domaine contenant des répétitions TPR C-terminal; une organisation de domaines similaire au NLR de S. coelicolor. Les variants alléliques de HET-Z induisent une réaction de mort cellulaire lorsqu'ils sont co-exprimés avec des variants alléliques d'un homologue de SEC9, une protéine contenant un motif SNARE, qui peut être impliquée dans l'exocytose et le trafic des vésicules chez la levure (Brennwald et al., 1994; Heller et al., 2018). Il a été démontré que la réaction de mort cellulaire est contrôlée spécifiquement par les répétitions TPR de HET-Z (Heller et al., 2018). Nous pourrions concevoir un ensemble de chimères moléculaires en remplaçant le domaine contenant le TPR C-terminal du NLR bactérien par le domaine TPR de HET-Z. Ainsi, nous nous attendrons à ce que les NLRs bactériens chimères répondent à différents variants alléliques de SEC9. Les chimères seront introduites dans des souches exprimant la fusion GFP-BASS [b*] soluble et différents allèles de sec9. L'activité du NLR sera suivie par la transition de l'état [b*] (fluorescence diffuse) à l'état [b] des souches transformées, où la protéine de fusion GFP-BASS s'agrège, apparaissant sous forme de dots fluorescents. Si elles sont menées avec succès, ces

expériences établiraient que les NLRs bactériens sont contrôlés de la même manière que les NLRs eucaryotes, suggérant un rôle fonctionnel similaire pour cette classe de récepteurs moléculaires dans les actinobactéries.

Enfin on peut envisager d'étudier le rôle de la signalisation NLR/BELL chez Streptomyces coelicolor. Cette approche consiste à concevoir des souches de S. coelicolor, qui exprimeraient (ou surexprimeraient) la protéine BELL-BASS de manière constitutive, tout en portant dans leur génome sous promoteurs contrôlés - le domaine BASS seul de la protéine NLR ou les constructions chimériques portant le domaine TPR de HET-Z. Dans ce dernier cas, les souches de S. coelicolor seraient également conçues pour exprimer différents variants alléliques de SEC9 de P. anserina, qui activeraient les NLR chimériques, qui à leur tour déclencheraient l'activité de la protéine BELL-BASS. La surexpression du domaine BASS seul devrait conduire à la formation spontanée d'agrégats amyloïdes dans les cellules bactériennes, qui agiraient comme déclencheur moléculaire, en modelant le domaine BASS de la protéine BELL-BASS entière et en activant son domaine BELL pour induire une cytotoxicité. La réaction de mort cellulaire serait surveillée au microscope en utilisant des méthodes précédemment développées comme l'utilisation de colorants vitaux tels que l'iodure de propidium (Yagüe et al., 2010). Des marqueurs fluorescents pourraient permettre de suivre la protéine BELL-BASS pendant la réaction de mort cellulaire et explorer si la protéine se localise près de la membrane plasmique. Cette partie de l'étude pourrait établir que le contrôle amyloïde de la protéine BELL-BASS est dépendant du ligand et basé sur la NLR, et démontrer les propriétés cytotoxiques du domaine BELL in vivo.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- Aglietti RA, Estevez A, Gupta A, Ramirez MG, Liu PS, Kayagaki N, Ciferri C, Dixit VM, Dueber EC. 2016. GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**:7858–7863. doi:10.1073/pnas.1607769113
- Aguzzi A. 2006. Prion diseases of humans and farm animals: epidemiology, genetics, and pathogenesis. *J Neurochem* **97**:1726–1739. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03909.x
- Akira S, Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. Nature Reviews Immunology 4:499–511. doi:10.1038/nri1391
- Al-Chalabi A, Jones A, Troakes C, King A, Al-Sarraj S, van den Berg LH. 2012. The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica* **124**:339–352. doi:10.1007/s00401-012-1022-4
- Allocati N, Masulli M, Di Ilio C, De Laurenzi V. 2015. Die for the community: an overview of programmed cell death in bacteria. *Cell Death Dis* **6**:e1609. doi:10.1038/cddis.2014.570
- Alteri CJ, Xicohténcatl-Cortes J, Hess S, Caballero-Olín G, Girón JA, Friedman RL. 2007. Mycobacterium tuberculosis produces pili during human infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:5145–5150. doi:10.1073/pnas.0602304104
- Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, Goodbourn S, Randall RE. 2004. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN- promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**:17264–17269. doi:10.1073/pnas.0407639101
- Antonets KS, Nizhnikov AA. 2017. Amyloids and prions in plants: Facts and perspectives. *Prion* **11**:300–312. doi:10.1080/19336896.2017.1377875
- Ashkenazi A, Salvesen G. 2014. Regulated Cell Death: Signaling and Mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **30**:337–356. doi:10.1146/annurev-cellbio-100913-013226
- Asplund-Samuelsson J, Bergman B, Larsson J. 2012. Prokaryotic Caspase Homologs: Phylogenetic Patterns and Functional Characteristics Reveal Considerable Diversity. *PLoS ONE* **7**:e49888. doi:10.1371/journal.pone.0049888
- Atkinson GC, Tenson T, Hauryliuk V. 2011. The RelA/SpoT Homolog (RSH) Superfamily: Distribution and Functional Evolution of ppGpp Synthetases and Hydrolases across the Tree of Life. *PLoS ONE* **6**:e23479. doi:10.1371/journal.pone.0023479
- Audas TE, Audas DE, Jacob MD, Ho JJD, Khacho M, Wang M, Perera JK, Gardiner C, Bennett CA, Head T, Kryvenko ON, Jorda M, Daunert S, Malhotra A, Trinkle-Mulcahy L, Gonzalgo ML, Lee S. 2016. Adaptation to Stressors by Systemic Protein Amyloidogenesis. *Developmental Cell* **39**:155–168. doi:10.1016/j.devcel.2016.09.002
- Aulić S, Le TT, Moda F, Abounit S, Corvaglia S, Casalis L, Gustincich S, Zurzolo C, Tagliavini F, Legname G. 2014. Defined α-synuclein prion-like molecular assemblies spreading in cell culture. *BMC Neuroscience* **15**:69. doi:10.1186/1471-2202-15-69
- Baker MODG, Shanmugam N, Pham CLL, Strange M, Steain M, Sunde M. 2018. RHIM-based protein:protein interactions in microbial defence against programmed cell death by necroptosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. doi:10.1016/j.semcdb.2018.05.004
- Balguerie A, Dos Reis S, Coulary-Salin B, Chaignepain S, Sabourin M, Schmitter J-M, Saupe SJ. 2004. The sequences appended to the amyloid core region of the HET-s prion protein determine higher-order aggregate organization in vivo. *J Cell Sci* **117**:2599–2610. doi:10.1242/jcs.01116
- Balguerie A, Dos Reis S, Ritter C, Chaignepain S, Coulary-Salin B, Forge V, Bathany K, Lascu I, Schmitter J-M, Riek R, Saupe SJ. 2003. Domain organization and structure-function relationship of the HET-s prion protein of Podospora anserina. EMBO J 22:2071–2081. doi:10.1093/emboj/cdg213
- Bar-On YM, Phillips R, Milo R. 2018. The biomass distribution on Earth. Proc Natl Acad Sci USA 115:6506–6511. doi:10.1073/pnas.1711842115
- Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TLS, Fagan AM, Goate A, Fox NC, Marcus DS, Cairns NJ, Xie X, Blazey TM, Holtzman DM, Santacruz A, Buckles V, Oliver A, Moulder K, Aisen PS, Ghetti B, Klunk WE, McDade E, Martins RN, Masters CL, Mayeux R, Ringman JM, Rossor MN, Schofield PR, Sperling RA, Salloway S, Morris JC. 2012. Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine* **367**:795–804. doi:10.1056/NEJMoa1202753
- Baum A, Sachidanandam R, Garcia-Sastre A. 2010. Preference of RIG-I for short viral RNA molecules in infected cells revealed by next-generation sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**:16303–16308. doi:10.1073/pnas.1005077107
- Beadle GW, Tatum EL. 1941. Genetic Control of Biochemical Reactions in Neurospora. *Proc Natl Acad Sci USA* 27:499– 506. doi:10.1073/pnas.27.11.499

- Bégueret J, Razanamparany V, Perrot M, Barreau C. 1984. Cloning gene ura5 for the orotidylic acid pyrophosphorylase of the filamentous fungus Podospora anserina: transformation of protoplasts. *Gene* 32:487–492. doi:10.1016/0378-1119(84)90023-4
- Beisson-Schecroun J. 1962. [Cellular incompatibility and nucleo-cytoplasmic interactions in the "barrage" phenomena in Podospora anserina]. Ann Genet **4**:4–50.
- Bendheim PE, Brown HR, Rudelli RD, Scala LJ, Goller NL, Wen GY, Kascsak RJ, Cashman NR, Bolton DC. 1992. Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* 42:149–149. doi:10.1212/WNL.42.1.149
- Benkemoun L, Ness F, Sabaté R, Ceschin J, Breton A, Clavé C, Saupe SJ. 2011. Two structurally similar fungal prions efficiently cross-seed in vivo but form distinct polymers when coexpressed. *Mol Microbiol* **82**:1392–1405. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07893.x
- Benkemoun L, Sabaté R, Malato L, Dos Reis S, Dalstra H, Saupe SJ, Maddelein M-L. 2006. Methods for the in vivo and in vitro analysis of [Het-s] prion infectivity. *Methods* **39**:61–67. doi:10.1016/j.ymeth.2006.04.006
- Bennion Callister J, Pickering-Brown SM. 2014. Pathogenesis/genetics of frontotemporal dementia and how it relates to ALS. *Experimental Neurology* **262**:84–90. doi:10.1016/j.expneurol.2014.06.001
- Bergès T, Barreau C. 1989. Heat shock at an elevated temperature improves transformation efficiency of protoplasts from Podospora anserina. *J Gen Microbiol* **135**:601–604. doi:10.1099/00221287-135-3-601
- Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. 2009. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature Reviews Microbiology* 7:99–109. doi:10.1038/nrmicro2070
- Béringue V, Vilotte J-L, Laude H. 2008. Prion agent diversity and species barrier. Vet Res **39**:47. doi:10.1051/vetres:2008024
- Berke IC, Modis Y. 2012. MDA5 cooperatively forms dimers and ATP-sensitive filaments upon binding double-stranded RNA: MDA5 forms dimers and filaments on binding dsRNA. *The EMBO Journal* **31**:1714–1726. doi:10.1038/emboj.2012.19
- Berke IC, Yu X, Modis Y, Egelman EH. 2012. MDA5 assembles into a polar helical filament on dsRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**:18437–18441. doi:10.1073/pnas.1212186109
- Bernet J. 1967. [Systems of incompatibility in Podospora anserina]. *CR Hebd Seances Acad Sci, Ser D, Sci Nat* **265**:1330–1333.
- Berruti G, Paiardi C. 2011. Acrosome biogenesis: Revisiting old questions to yield new insights. *Spermatogenesis* 1:95–98. doi:10.4161/spmg.1.2.16820
- Bissig C, Rochin L, van Niel G. 2016. PMEL Amyloid Fibril Formation: The Bright Steps of Pigmentation. *International Journal of Molecular Sciences* **17**:1438. doi:10.3390/ijms17091438
- Blander JM. 2014. A long-awaited merger of the pathways mediating host defence and programmed cell death. *Nature Reviews Immunology* **14**:601–618. doi:10.1038/nri3720
- Blasius AL, Beutler B. 2010. Intracellular Toll-like Receptors. Immunity 32:305–315. doi:10.1016/j.immuni.2010.03.012
- Boller T, Felix G. 2009. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* **60**:379–406. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346
- Bolton D, McKinley M, Prusiner S. 1982. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**:1309–1311. doi:10.1126/science.6815801
- Boutte CC, Crosson S. 2013. Bacterial lifestyle shapes stringent response activation. *Trends in Microbiology* **21**:174–180. doi:10.1016/j.tim.2013.01.002
- Braak H, Brettschneider J, Ludolph AC, Lee VM, Trojanowski JQ, Tredici KD. 2013. Amyotrophic lateral sclerosis—a model of corticofugal axonal spread. *Nature Reviews Neurology* **9**:708–714. doi:10.1038/nrneurol.2013.221
- Brennwald P, Kearns B, Champion K, Keränen S, Bankaitis V, Novick P. 1994. Sec9 is a SNAP-25-like component of a yeast SNARE complex that may be the effector of Sec4 function in exocytosis. *Cell* **79**:245–258. doi:10.1016/0092-8674(94)90194-5
- Brettschneider J, Del Tredici K, Irwin DJ, Grossman M, Robinson JL, Toledo JB, Fang L, Van Deerlin VM, Ludolph AC, Lee VM-Y, Braak H, Trojanowski JQ. 2014. Sequential distribution of pTDP-43 pathology in behavioral variant frontotemporal dementia (bvFTD). Acta Neuropathologica 127:423–439. doi:10.1007/s00401-013-1238-y
- Brodersen P, Petersen M, Pike HM, Olszak B, Skov S, Odum N, Jørgensen LB, Brown RE, Mundy J. 2002. Knockout of Arabidopsis accelerated-cell-death11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev* **16**:490–502. doi:10.1101/gad.218202

- Brown DR, Clive C, Haswell SJ. 2001. Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein. *J Neurochem* **76**:69–76. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00009.x
- Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D, Kretzschmar H. 1997. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **390**:684–687. doi:10.1038/37783
- Broz P, Dixit VM. 2016. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature Reviews Immunology* **16**:407–420. doi:10.1038/nri.2016.58
- Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. 2015. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. Annual Review of Immunology **33**:257–290. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112240
- Bruns AM, Leser GP, Lamb RA, Horvath CM. 2014. The Innate Immune Sensor LGP2 Activates Antiviral Signaling by Regulating MDA5-RNA Interaction and Filament Assembly. *Molecular Cell* **55**:771–781. doi:10.1016/j.molcel.2014.07.003
- Brygoo Y, Debuchy R. 1985. Transformation by integration in Podospora anserina. I. Methodology and phenomenology. *Mol Gen Genet* **200**:128–131.
- Bucher M, Wegmüller S, Drissner D. 2009. Chasing the structures of small molecules in arbuscular mycorrhizal signaling. *Curr Opin Plant Biol* **12**:500–507. doi:10.1016/j.pbi.2009.06.001
- Buller A. 1933. The formation of hyphal fusions in the mycelium of the higher fungi. *Researches on fungi Longmans Green, London* 1–74.
- Burdett H, Bentham AR, Williams SJ, Dodds PN, Anderson PA, Banfield MJ, Kobe B. 2019a. The Plant "Resistosome": Structural Insights into Immune Signaling. *Cell Host & Microbe* **26**:193–201. doi:10.1016/j.chom.2019.07.020
- Cacas J-L, Marmey P, Montillet J-L, Sayegh-Alhamdia M, Jalloul A, Rojas-Mendoza A, Clérivet A, Nicole M. 2009. A novel patatin-like protein from cotton plant, GhPat1, is co-expressed with GhLox1 during Xanthomonas campestrismediated hypersensitive cell death. *Plant Cell Reports* **28**:155–164. doi:10.1007/s00299-008-0622-x
- Cai X, Chen J, Xu H, Liu S, Jiang Q-X, Halfmann R, Chen ZJ. 2014. Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation. *Cell* **156**:1207–1222. doi:10.1016/j.cell.2014.01.063
- Cai X, Chen ZJ. 2014. Prion-like polymerization as a signaling mechanism. *Trends Immunol* **35**:622–630. doi:10.1016/j.it.2014.10.003
- Camera SL, Balagué C, Göbel C, Geoffroy P, Legrand M, Feussner I, Roby D, Heitz T. 2009. The *Arabidopsis* Patatin-Like Protein 2 (PLP2) Plays an Essential Role in Cell Death Execution and Differentially Affects Biosynthesis of Oxylipins and Resistance to Pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 22:469–481. doi:10.1094/MPMI-22-4-0469
- Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, Roth KA, Gruss P. 1998. Apaf1 (CED-4 Homolog) Regulates Programmed Cell Death in Mammalian Development. *Cell* **94**:727–737. doi:10.1016/S0092-8674(00)81732-8
- Chau KM, Cornwall GA. 2011. Reduced fertility in vitro in mice lacking the cystatin CRES (cystatin-related epididymal spermatogenic): rescue by exposure of spermatozoa to dibutyryl cAMP and isobutylmethylxanthine. *Biol Reprod* **84**:140–152. doi:10.1095/biolreprod.110.084855
- Chen G, Shaw MH, Kim Y-G, Nuñez G. 2009. NOD-Like Receptors: Role in Innate Immunity and Inflammatory Disease. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease 4:365–398. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092239
- Chen G, Xu T, Yan Y, Zhou Y, Jiang Y, Melcher K, Xu HE. 2017. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica* **38**:1205–1235. doi:10.1038/aps.2017.28
- Chernova TA, Wilkinson KD, Chernoff YO. 2017. Prions, Chaperones, and Proteostasis in Yeast. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **9**:a023663. doi:10.1101/cshperspect.a023663
- Chevanne D, Bastiaans E, Debets A, Saupe SJ, Clavé C, Paoletti M. 2009. Identification of the het-r vegetative incompatibility gene of Podospora anserina as a member of the fast evolving HNWD gene family. *Curr Genet* **55**:93–102. doi:10.1007/s00294-008-0227-5
- Chevanne D, Saupe SJ, Clavé C, Paoletti M. 2010. WD-repeat instability and diversification of the Podospora anserina hnwd non-self recognition gene family. *BMC Evol Biol* **10**:134. doi:10.1186/1471-2148-10-134
- Chevaugeon J, Huong NV. 1969. Internal determinism of hyphal growth rhythms. *Transactions of the British Mycological Society* **53**:1-IN1. doi:10.1016/S0007-1536(69)80001-X
- Chiang JJ, Davis ME, Gack MU. 2014. Regulation of RIG-I-like receptor signaling by host and viral proteins. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **25**:491–505. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.06.005
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**:803–814. doi:10.1016/j.cell.2006.02.008
- Chiti F, Dobson CM. 2006. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* **75**:333–366. doi:10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901
- Colby DW, Prusiner SB. 2011. Prions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**:a006833–a006833. doi:10.1101/cshperspect.a006833
- Coll NS, Epple P, Dangl JL. 2011. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death & Differentiation* **18**:1247–1256. doi:10.1038/cdd.2011.37
- Collier SM, Hamel L-P, Moffett P. 2011. Cell Death Mediated by the N-Terminal Domains of a Unique and Highly Conserved Class of NB-LRR Protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® **24**:918–931. doi:10.1094/MPMI-03-11-0050
- Collinge J, Clarke AR. 2007. A General Model of Prion Strains and Their Pathogenicity. *Science* **318**:930–936. doi:10.1126/science.1138718
- Collinson SK, Clouthier SC, Doran JL, Banser PA, Kay WW. 1997. Characterization of the agfBA fimbrial operon encoding thin aggregative fimbriae of Salmonella enteritidis. *Adv Exp Med Biol* **412**:247–248. doi:10.1007/978-1-4899-1828-4_37
- Collinson SK, Emödy L, Müller KH, Trust TJ, Kay WW. 1991. Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from Salmonella enteritidis. *J Bacteriol* **173**:4773–4781. doi:10.1128/jb.173.15.4773-4781.1991
- Cookson BT, Brennan MA. 2001. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends in Microbiology* **9**:113–114. doi:10.1016/S0966-842X(00)01936-3
- Cooper TG. 2002. Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. *FEMS Microbiology Reviews* **26**:223–238. doi:10.1111/j.1574-6976.2002.tb00612.x
- Coppin-Raynal E, Dequard-Chablat M, Picard M. 1988. Genetics of ribosomes and translational accuracy in Podospora anserina. *Tuite M, Picard M, Bolotin-Fukuhara M (eds) Genetics of translation: new approaches Springer-Verlag* 431–42.
- Corbalan-Garcia S, Gómez-Fernández JC. 2014. Signaling through C2 domains: More than one lipid target. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes* **1838**:1536–1547. doi:10.1016/j.bbamem.2014.01.008
- Cortesi P, Milgroom MG. 1998. Genetics of vegetative incompatibility in cryphonectria parasitica. *Appl Environ Microbiol* **64**:2988–2994. doi:10.1128/AEM.64.8.2988-2994.1998
- Cortesi P, McCulloch CE, Song H, Lin H, Milgroom MG. 2001. Genetic control of horizontal virus transmission in the chestnut blight fungus, Cryphonectria parasitica. *Genetics* **159**:107–118.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**:1318–1322. doi:10.1126/science.284.5418.1318
- Coustou V, Deleu C, Saupe S, Begueret J. 1997. The protein product of the het-s heterokaryon incompatibility gene of the fungus Podospora anserina behaves as a prion analog. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:9773–9778.
- Coustou-Linares V, Maddelein ML, Bégueret J, Saupe SJ. 2001. In vivo aggregation of the HET-s prion protein of the fungus Podospora anserina. *Mol Microbiol* **42**:1325–1335.
- Cox BS. 1965. Ψ, A cytoplasmic suppressor of super-suppressor in yeast. *Heredity* **20**:505–521. doi:10.1038/hdy.1965.65
- Cruts M, Gijselinck I, Van Langenhove T, van der Zee J, Van Broeckhoven C. 2013. Current insights into the C9orf72 repeat expansion diseases of the FTLD/ALS spectrum. *Trends in Neurosciences* **36**:450–459. doi:10.1016/j.tins.2013.04.010
- Cummings DJ, Belcour L, Grandchamp C. 1978. [Electron microscopy of mitochondrial DNA in Podospora anserina and the presence of a multimeric range of circular DNA molecules from senescent cultures]. *CR Hebd Seances Acad Sci, Ser D, Sci Nat* **287**:157–160.
- Cushman M, Johnson BS, King OD, Gitler AD, Shorter J. 2010. Prion-like disorders: blurring the divide between transmissibility and infectivity. *Journal of Cell Science* **123**:1191–1201. doi:10.1242/jcs.051672
- Dagenais TRT, Keller NP. 2009. Pathogenesis of Aspergillus fumigatus in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 22:447–465. doi:10.1128/CMR.00055-08
- Damberger FF, Christen B, Perez DR, Hornemann S, Wuthrich K. 2011. Cellular prion protein conformation and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**:17308–17313. doi:10.1073/pnas.1106325108
- Danot O, Marquenet E, Vidal-Ingigliardi D, Richet E. 2009. Wheel of Life, Wheel of Death: A Mechanistic Insight into Signaling by STAND Proteins. *Structure* **17**:172–182. doi:10.1016/j.str.2009.01.001
- Das AS, Zou W-Q. 2016. Prions: Beyond a Single Protein. *Clinical Microbiology Reviews* **29**:633–658. doi:10.1128/CMR.00046-15
- Daskalov A, Dyrka W, Saupe SJ. 2015a. Theme and variations: evolutionary diversification of the HET-s functional amyloid motif. *Sci Rep* **5**:12494. doi:10.1038/srep12494

- Daskalov A, Gantner M, Wälti MA, Schmidlin T, Chi CN, Wasmer C, Schütz A, Ceschin J, Clavé C, Cescau S, Meier B, Riek R, Saupe SJ. 2014. Contribution of specific residues of the β-solenoid fold to HET-s prion function, amyloid structure and stability. *PLoS Pathog* **10**:e1004158. doi:10.1371/journal.ppat.1004158
- Daskalov A, Habenstein B, Martinez D, Debets AJM, Sabaté R, Loquet A, Saupe SJ. 2015b. Signal transduction by a fungal NOD-like receptor based on propagation of a prion amyloid fold. *PLoS Biol* **13**:e1002059. doi:10.1371/journal.pbio.1002059
- Daskalov A, Habenstein B, Sabaté R, Berbon M, Martinez D, Chaignepain S, Coulary-Salin B, Hofmann K, Loquet A, Saupe SJ. 2016. Identification of a novel cell death-inducing domain reveals that fungal amyloid-controlled programmed cell death is related to necroptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**:2720–2725. doi:10.1073/pnas.1522361113
- Daskalov A, Heller J, Herzog S, Fleißner A, Glass NL. 2017. Molecular Mechanisms Regulating Cell Fusion and Heterokaryon Formation in Filamentous Fungi. *Microbiol Spectr* **5**. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0015-2016
- Daskalov A., Martinez D, Coustou V, El Mammeri N, Berbon M, Andreas LB, Bardiaux B, Stanek J, Noubhani A, Kauffmann B, Wall JS, Pintacuda G, Saupe SJ, Habenstein B, Loquet A. 2020. Structural and molecular basis of cross-seeding barriers in amyloids. *bioRxiv* 2020.07.06.188508. doi:10.1101/2020.07.06.188508
- Daskalov Asen, Mitchell PS, Sandstrom A, Vance RE, Glass NL. 2020. Molecular characterization of a fungal gasderminlike protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**:18600–18607. doi:10.1073/pnas.2004876117
- Daskalov A, Paoletti M, Ness F, Saupe SJ. 2012. Genomic clustering and homology between HET-S and the NWD2 STAND protein in various fungal genomes. *PLoS ONE* **7**:e34854. doi:10.1371/journal.pone.0034854
- Daskalov A, Saupe SJ. 2015. As a toxin dies a prion comes to life: A tentative natural history of the [Het-s] prion. *Prion* **9**:184–189. doi:10.1080/19336896.2015.1038018
- Davey ME, O'toole GA. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:847–867. doi:10.1128/mmbr.64.4.847-867.2000
- Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster GD. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* **13**:414–430. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x
- Debets AJM, Dalstra HJP, Slakhorst M, Koopmanschap B, Hoekstra RF, Saupe SJ. 2012. High natural prevalence of a fungal prion. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**:10432–10437. doi:10.1073/pnas.1205333109
- Debets AJM, Griffiths AJF. 1998. Polymorphism of het-genes prevents resource plundering in Neurospora crassa. *Mycological Research* **102**:1343–1349. doi:10.1017/S095375629800639X
- Debets F, Yang X, Griffiths AJ. 1994. Vegetative incompatibility in Neurospora: its effect on horizontal transfer of mitochondrial plasmids and senescence in natural populations. *Curr Genet* **26**:113–119. doi:10.1007/BF00313797
- Degterev A, Hitomi J, Germscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G, Hedrick SM, Gerber SA, Lugovskoy A, Yuan J. 2008. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol* **4**:313–321. doi:10.1038/nchembio.83
- Deleu C, Clavé C, Bégueret J. 1993. A single amino acid difference is sufficient to elicit vegetative incompatibility in the fungus Podospora anserina. *Genetics* **135**:45–52.
- Dementhon K, Paoletti M, Pinan-Lucarré B, Loubradou-Bourges N, Sabourin M, Saupe SJ, Clavé C. 2003. Rapamycin mimics the incompatibility reaction in the fungus Podospora anserina. *Eukaryotic Cell* **2**:238–246.
- Deretic V, Saitoh T, Akira S. 2013. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology* **13**:722–737. doi:10.1038/nri3532
- Ding J, Wang K, Liu W, She Y, Sun Q, Shi J, Sun H, Wang D-C, Shao F. 2016. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature* **535**:111–116. doi:10.1038/nature18590
- Dos Reis S, Coulary-Salin B, Forge V, Lascu I, Bégueret J, Saupe SJ. 2002. The HET-s prion protein of the filamentous fungus Podospora anserina aggregates in vitro into amyloid-like fibrils. *J Biol Chem* **277**:5703–5706. doi:10.1074/jbc.M110183200
- Drummond RA, Brown GD. 2011. The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections. *Current Opinion in Microbiology* **14**:392–399. doi:10.1016/j.mib.2011.07.001
- Dueholm MS, Albertsen M, Otzen D, Nielsen PH. 2012. Curli functional amyloid systems are phylogenetically widespread and display large diversity in operon and protein structure. *PLoS ONE* **7**:e51274. doi:10.1371/journal.pone.0051274
- Dueholm MS, Petersen SV, Sønderkær M, Larsen P, Christiansen G, Hein KL, Enghild JJ, Nielsen JL, Nielsen KL, Nielsen PH, Otzen DE. 2010. Functional amyloid in Pseudomonas. *Mol Microbiol* **77**:1009–1020. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07269.x

- Duxbury Z, Ma Y, Furzer OJ, Huh SU, Cevik V, Jones JDG, Sarris PF. 2016. Pathogen perception by NLRs in plants and animals: Parallel worlds. *BioEssays* **38**:769–781. doi:10.1002/bies.201600046
- Dyrka W, Coustou V, Daskalov A, Lends A, Bardin T, Berbon M, Kauffmann B, Blancard C, Salin B, Loquet A, Saupe SJ. 2020a. Identification of NLR-associated amyloid signaling motifs in bacterial genomes. *Journal of Molecular Biology*. doi:10.1016/j.jmb.2020.10.004
- Dyrka W, Lamacchia M, Durrens P, Kobe B, Daskalov A, Paoletti M, Sherman DJ, Saupe SJ. 2014. Diversity and variability of NOD-like receptors in fungi. *Genome Biol Evol* **6**:3137–3158. doi:10.1093/gbe/evu251
- Edinger AL, Thompson CB. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology* **16**:663–669. doi:10.1016/j.ceb.2004.09.011
- Edskes HK, Gray VT, Wickner RB. 1999. The [URE3] prion is an aggregated form of Ure2p that can be cured by overexpression of Ure2p fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**:1498–1503. doi:10.1073/pnas.96.4.1498
- Elinav E, Strowig T, Henao-Mejia J, Flavell RA. 2011. Regulation of the Antimicrobial Response by NLR Proteins. *Immunity* **34**:665–679. doi:10.1016/j.immuni.2011.05.007
- Elmore S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* **35**:495–516. doi:10.1080/01926230701320337
- Engelberg-Kulka H, Amitai S, Kolodkin-Gal I, Hazan R. 2006. Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLoS Genet* 2:e135. doi:10.1371/journal.pgen.0020135
- Espagne E, Balhadère P, Bégueret J, Turcq B. 1997. Reactivity in vegetative incompatibility of the HET-E protein of the fungus Podospora anserina is dependent on GTP-binding activity and a WD40 repeated domain. *Mol Gen Genet* **256**:620–627. doi:10.1007/s004380050610
- Espagne E, Balhadère P, Penin M-L, Barreau C, Turcq B. 2002. HET-E and HET-D belong to a new subfamily of WD40 proteins involved in vegetative incompatibility specificity in the fungus Podospora anserina. *Genetics* **161**:71–81.
- Esser K. 1969. The influence of pH on rythmic mycelial growth in Podospora anserina. Mycologia 61:1008–11.
- Esser K. 1963. [PHENOLOXIDASES IN THE ASCOMYCETE PODOSPORA ANSERINA. I. THE IDENTIFICATION OF LACCASE AND TYROSINASE IN THE WILD STRAIN]. Arch Mikrobiol **46**:217–226.
- Esser K. 1954. Sur le déterminisme d'un nouveau type d'incompatibilité chez Podospora. *C R Acad Sci Paris* **238**:1731– 33.
- Esser K, Graw D. 1980. Homocaryotic fruiting in the bipolar-incompatible ascomycete Podospora anserina. *Société Mycologique de France* 534–541.
- Falk RH, Comenzo RL, Skinner M. 1997. The systemic amyloidoses. *N Engl J Med* **337**:898–909. doi:10.1056/NEJM199709253371306
- Faudry E, Perdu C, Attrée I. 2013. Pore formation by T3SS translocators: liposome leakage assay. *Methods Mol Biol* 966:173–185. doi:10.1007/978-1-62703-245-2_11
- Fedorova ND, Badger JH, Robson GD, Wortman JR, Nierman WC. 2005. Comparative analysis of programmed cell death pathways in filamentous fungi. *BMC Genomics* **6**:177. doi:10.1186/1471-2164-6-177
- Feng Q, Hato SV, Langereis MA, Zoll J, Virgen-Slane R, Peisley A, Hur S, Semler BL, van Rij RP, van Kuppeveld FJM. 2012. MDA5 Detects the Double-Stranded RNA Replicative Form in Picornavirus-Infected Cells. *Cell Reports* 2:1187–1196. doi:10.1016/j.celrep.2012.10.005
- Feng S, Fox D, Man SM. 2018. Mechanisms of Gasdermin Family Members in Inflammasome Signaling and Cell Death. *Journal of Molecular Biology* **430**:3068–3080. doi:10.1016/j.jmb.2018.07.002
- Flemming H-C, Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* **8**:623–633. doi:10.1038/nrmicro2415
- Fowler DM, Koulov AV, Alory-Jost C, Marks MS, Balch WE, Kelly JW. 2006. Functional Amyloid Formation within Mammalian Tissue. *PLoS Biol* **4**. doi:10.1371/journal.pbio.0040006
- Franklin BS, Bossaller L, De Nardo D, Ratter JM, Stutz A, Engels G, Brenker C, Nordhoff M, Mirandola SR, Al-Amoudi A, Mangan MS, Zimmer S, Monks BG, Fricke M, Schmidt RE, Espevik T, Jones B, Jarnicki AG, Hansbro PM, Busto P, Marshak-Rothstein A, Hornemann S, Aguzzi A, Kastenmüller W, Latz E. 2014. The adaptor ASC has extracellular and "prionoid" activities that propagate inflammation. *Nature Immunology* **15**:727–737. doi:10.1038/ni.2913
- Frey-Klett P, Burlinson P, Deveau A, Barret M, Tarkka M, Sarniguet A. 2011. Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiol Mol Biol Rev* 75:583–609. doi:10.1128/MMBR.00020-11
- Fuchs Y, Steller H. 2011. Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. *Cell* **147**:742–758. doi:10.1016/j.cell.2011.10.033

- Funakoshi Y, Doi Y, Hosoda N, Uchida N, Osawa M, Shimada I, Tsujimoto M, Suzuki T, Katada T, Hoshino S -i. 2007. Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. *Genes & Development* 21:3135–3148. doi:10.1101/gad.1597707
- Furukawa Y, Kaneko K, Watanabe S, Yamanaka K, Nukina N. 2011. A Seeding Reaction Recapitulates Intracellular Formation of Sarkosyl-insoluble Transactivation Response Element (TAR) DNA-binding Protein-43 Inclusions. *Journal of Biological Chemistry* 286:18664–18672. doi:10.1074/jbc.M111.231209

Furuya K, Udagawa SI. 1972. . Japan I J gen Appl Microbiol 18:433–454.

- Gack MU, Shin YC, Joo C-H, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, Jung JU. 2007. TRIM25 RINGfinger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* **446**:916–920. doi:10.1038/nature05732
- Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M. 1966. Experimental Transmission of a Kuru-like Syndrome to Chimpanzees. *Nature* **209**:794–796. doi:10.1038/209794a0
- Gajdusek DC, Gibbs CJ, Asher DM, David E. 1968. Transmission of Experimental Kuru to the Spider Monkey (Ateles geoffreyi). *Science* **162**:693–694. doi:10.1126/science.162.3854.693
- Gambetti P, Kong Q, Zou W, Parchi P, Chen SG. 2003. Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *Br Med Bull* **66**:213–239. doi:10.1093/bmb/66.1.213
- Garnjobst L, Wilson JF. 1956. HETEROCARYOSIS AND PROTOPLASMIC INCOMPATIBILITY IN NEUROSPORA CRASSA. *Proc* Natl Acad Sci USA 42:613–618. doi:10.1073/pnas.42.9.613
- Geijtenbeek TBH, Gringhuis SI. 2009. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nature Reviews Immunology* **9**:465–479. doi:10.1038/nri2569
- Gendrin M, Zaidman-Rémy A, Broderick NA, Paredes J, Poidevin M, Roussel A, Lemaitre B. 2013. Functional Analysis of PGRP-LA in Drosophila Immunity. *PLoS ONE* **8**:e69742. doi:10.1371/journal.pone.0069742
- Gerstmann J, Sträussler E, Scheinker I. 1935. Über eine eigenartige hereditär- familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z f d g Neur u Psych* **154**:736–762. doi:10.1007/BF02865827
- Geydan TD, Debets AJM, Verkley GJM, van Diepeningen AD. 2012. Correlated evolution of senescence and ephemeral substrate use in the Sordariomycetes. *Mol Ecol* **21**:2816–2828. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05569.x
- Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, Diamond MS, Colonna M. 2006. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proceedings* of the National Academy of Sciences **103**:8459–8464. doi:10.1073/pnas.0603082103
- Glass NL, Dementhon K. 2006. Non-self recognition and programmed cell death in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology*, Growth and devlopment **9**:553–558. doi:10.1016/j.mib.2006.09.001
- Glass NL, Kaneko I. 2003. Fatal attraction: nonself recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. *Eukaryotic Cell* **2**:1–8. doi:10.1128/ec.2.1.1-8.2003
- Glover JR, Kowal AS, Schirmer EC, Patino MM, Liu J-J, Lindquist S. 1997. Self-Seeded Fibers Formed by Sup35, the Protein Determinant of [PSI+], a Heritable Prion-like Factor of S. cerevisiae. *Cell* **89**:811–819. doi:10.1016/S0092-8674(00)80264-0
- Goedert M, Spillantini MG, Del Tredici K, Braak H. 2013. 100 years of Lewy pathology. *Nature Reviews Neurology* **9**:13–24. doi:10.1038/nrneurol.2012.242
- Goldgaber D, Goldfarb LG, Brown P, Asher DM, Brown WT, Lin S, Teener JW, Feinstone SM, Rubenstein R, Kascsak RJ, Boellaard JW, Gajdusek DC. 1989. Mutations in familial Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Sträussler-Scheinker's syndrome. *Experimental Neurology* **106**:204–206. doi:10.1016/0014-4886(89)90095-2
- Gonçalves AP, Heller J, Daskalov A, Videira A, Glass NL. 2017. Regulated Forms of Cell Death in Fungi. *Front Microbiol* **8**:1837. doi:10.3389/fmicb.2017.01837
- Gong Y-N, Shao F. 2012. Sensing bacterial infections by NAIP receptors in NLRC4 inflammasome activation. *Protein & Cell* **3**:98–105. doi:10.1007/s13238-012-2028-3
- Goubau D, Schlee M, Deddouche S, Pruijssers AJ, Zillinger T, Goldeck M, Schuberth C, Van der Veen AG, Fujimura T, Rehwinkel J, Iskarpatyoti JA, Barchet W, Ludwig J, Dermody TS, Hartmann G, Reis e Sousa C. 2014. Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. *Nature* 514:372–375. doi:10.1038/nature13590

Gould SJ, Vrba ES. 1982. Exaptation-A Missing Term in the Science of Form. Paleobiology 8:4–15.

- Grad LI, Cashman NR. 2014. Prion-like activity of Cu/Zn superoxide dismutase: Implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Prion* **8**:33–41. doi:10.4161/pri.27602
- Grad LI, Yerbury JJ, Turner BJ, Guest WC, Pokrishevsky E, O'Neill MA, Yanai A, Silverman JM, Zeineddine R, Corcoran L, Kumita JR, Luheshi LM, Yousefi M, Coleman BM, Hill AF, Plotkin SS, Mackenzie IR, Cashman NR. 2014. Intercellular

propagated misfolding of wild-type Cu/Zn superoxide dismutase occurs via exosome-dependent and -independent mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**:3620–3625. doi:10.1073/pnas.1312245111

- Graziani S, Silar P, Daboussi M-J. 2004. Bistability and hysteresis of the "Secteur" differentiation are controlled by a two-gene locus in Nectria haematococca. *BMC Biol* **2**:18. doi:10.1186/1741-7007-2-18
- Greenwald J, Buhtz C, Ritter C, Kwiatkowski W, Choe S, Maddelein M-L, Ness F, Cescau S, Soragni A, Leitz D, Saupe SJ, Riek R. 2010. The mechanism of prion inhibition by HET-S. *Mol Cell* **38**:889–899. doi:10.1016/j.molcel.2010.05.019
- Grognet P, Lalucque H, Malagnac F, Silar P. 2014. Genes that bias Mendelian segregation. *PLoS Genet* **10**:e1004387. doi:10.1371/journal.pgen.1004387
- Grootjans S, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. 2017. Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview. *Cell Death & Differentiation* **24**:1184–1195. doi:10.1038/cdd.2017.65
- Guyonnet B, Egge N, Cornwall GA. 2014. Functional amyloids in the mouse sperm acrosome. *Mol Cell Biol* **34**:2624–2634. doi:10.1128/MCB.00073-14
- Hadlow WJ. 1959. SCRAPIE AND KURU. The Lancet 274:289-290.
- Halfmann R, Alberti S, Krishnan R, Lyle N, O'Donnell CW, King OD, Berger B, Pappu RV, Lindquist S. 2011. Opposing effects of glutamine and asparagine govern prion formation by intrinsically disordered proteins. *Mol Cell* **43**:72–84. doi:10.1016/j.molcel.2011.05.013
- Hall-Stoodley L, Stoodley P. 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* **11**:1034–1043. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x
- Hamada M, Shoguchi E, Shinzato C, Kawashima T, Miller DJ, Satoh N. 2013. The Complex NOD-Like Receptor Repertoire of the Coral Acropora digitifera Includes Novel Domain Combinations. *Molecular Biology and Evolution* **30**:167–176. doi:10.1093/molbev/mss213
- Han TW, Kato M, Xie S, Wu LC, Mirzaei H, Pei J, Chen M, Xie Y, Allen J, Xiao G, McKnight SL. 2012. Cell-free Formation of RNA Granules: Bound RNAs Identify Features and Components of Cellular Assemblies. *Cell* **149**:768–779. doi:10.1016/j.cell.2012.04.016
- Harris DA. 2003. Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *British Medical Bulletin* **66**:71–85. doi:10.1093/bmb/66.1.71
- Hata S, Kobae Y, Banba M. 2010. Interactions between plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *Int Rev Cell Mol Biol* **281**:1–48. doi:10.1016/S1937-6448(10)81001-9
- Hauenstein AV, Zhang L, Wu H. 2015. The hierarchical structural architecture of inflammasomes, supramolecular inflammatory machines. *Current Opinion in Structural Biology* **31**:75–83. doi:10.1016/j.sbi.2015.03.014
- Hazenberg BPC. 2013. Amyloidosis. *Rheumatic Disease Clinics of North America* **39**:323–345. doi:10.1016/j.rdc.2013.02.012
- He S, Liang Y, Shao F, Wang X. 2011. Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:20054– 20059. doi:10.1073/pnas.1116302108
- Heller J, Clavé C, Gladieux P, Saupe SJ, Glass NL. 2018. NLR surveillance of essential SEC-9 SNARE proteins induces programmed cell death upon allorecognition in filamentous fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* **115**:E2292–E2301. doi:10.1073/pnas.1719705115
- Helsen CW, Glover JR. 2012. Insight into Molecular Basis of Curing of [*PSI*⁺] Prion by Overexpression of 104-kDa Heat Shock Protein (Hsp104). *Journal of Biological Chemistry* **287**:542–556. doi:10.1074/jbc.M111.302869
- Hewetson A, Do HQ, Myers C, Muthusubramanian A, Sutton RB, Wylie BJ, Cornwall GA. 2017. Functional Amyloids in Reproduction. *Biomolecules* **7**. doi:10.3390/biom7030046
- Hickey PC, Jacobson D, Read ND, Glass NL. 2002. Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in Neurospora crassa. *Fungal Genet Biol* **37**:109–119. doi:10.1016/s1087-1845(02)00035-x
- Hildebrand JM, Tanzer MC, Lucet IS, Young SN, Spall SK, Sharma P, Pierotti C, Garnier J-M, Dobson RCJ, Webb AI, Tripaydonis A, Babon JJ, Mulcair MD, Scanlon MJ, Alexander WS, Wilks AF, Czabotar PE, Lessene G, Murphy JM, Silke J. 2014. Activation of the pseudokinase MLKL unleashes the four-helix bundle domain to induce membrane localization and necroptotic cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**:15072–15077. doi:10.1073/pnas.1408987111
- Hoebe K, Janssen E, Beutler B. 2004. The interface between innate and adaptive immunity. *Nature Immunology* **5**:971–974. doi:10.1038/ni1004-971
- Hofmann K. 2020. The Evolutionary Origins of Programmed Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **12**:a036442. doi:10.1101/cshperspect.a036442
- Hofmann K. 2019. The Evolutionary Origins of Programmed Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* a036442. doi:10.1101/cshperspect.a036442

- Holtzman DM, Morris JC, Goate AM. 2011. Alzheimer's Disease: The Challenge of the Second Century. *Science Translational Medicine* **3**:77sr1-77sr1. doi:10.1126/scitranslmed.3002369
- Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann K-K, Schlee M, Endres S, Hartmann G. 2006. 5'-Triphosphate RNA Is the Ligand for RIG-I. *Science* **314**:994–997. doi:10.1126/science.1132505

Hornung V, Latz E. 2010. Intracellular DNA recognition. *Nature Reviews Immunology* **10**:123–130. doi:10.1038/nri2690 Horowitz NH. 1991. Fifty years ago: the Neurospora revolution. *Genetics* **127**:631–635.

- Hosoda N, Kobayashi T, Uchida N, Funakoshi Y, Kikuchi Y, Hoshino S, Katada T. 2003. Translation Termination Factor eRF3 Mediates mRNA Decay through the Regulation of Deadenylation. *Journal of Biological Chemistry* **278**:38287– 38291. doi:10.1074/jbc.C300300200
- Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang Q-X, Chen ZJ. 2011. MAVS Forms Functional Prion-Like Aggregates To Activate and Propagate Antiviral Innate Immune Response. *Cell* **146**:448–461. doi:10.1016/j.cell.2011.06.041
- Howe K, Schiffer PH, Zielinski J, Wiehe T, Laird GK, Marioni JC, Soylemez O, Kondrashov F, Leptin M. 2016. Structure and evolutionary history of a large family of NLR proteins in the zebrafish. *Open Biology* **6**:160009. doi:10.1098/rsob.160009
- Hu Z, Chai J. 2016. Structural Mechanisms in NLR Inflammasome Assembly and Signaling In: Backert S, editor. Inflammasome Signaling and Bacterial Infections. Cham: Springer International Publishing. pp. 23–42. doi:10.1007/978-3-319-41171-2_2
- Hu Z, Yan C, Liu P, Huang Z, Ma R, Zhang C, Wang R, Zhang Y, Martinon F, Miao D, Deng H, Wang J, Chang J, Chai J.
 2013. Crystal Structure of NLRC4 Reveals Its Autoinhibition Mechanism. *Science* 341:172–175. doi:10.1126/science.1236381
- Huang S, Yuan S, Guo L, Yu Y, Li J, Wu T, Liu T, Yang M, Wu K, Liu H, Ge J, Yu Y, Huang H, Dong M, Yu C, Chen S, Xu A. 2008. Genomic analysis of the immune gene repertoire of amphioxus reveals extraordinary innate complexity and diversity. *Genome Research* 18:1112–1126. doi:10.1101/gr.069674.107
- Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K, Brown CT, Probst AJ, Castelle CJ, Butterfield CN, Hernsdorf AW, Amano Y, Ise K, Suzuki Y, Dudek N, Relman DA, Finstad KM, Amundson R, Thomas BC, Banfield JF. 2016. A new view of the tree of life. *Nature Microbiology* 1:16048. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.48
- Ipcho S, Sundelin T, Erbs G, Kistler HC, Newman M-A, Olsson S. 2016. Fungal Innate Immunity Induced by Bacterial Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMPs). *G3 (Bethesda)* 6:1585–1595. doi:10.1534/g3.116.027987
- Iranzo J, Lobkovsky AE, Wolf YI, Koonin EV. 2014. Virus-host arms race at the joint origin of multicellularity and programmed cell death. *Cell Cycle* **13**:3083–3088. doi:10.4161/15384101.2014.949496
- Iwasaki A, Medzhitov R. 2010. Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. *Science* **327**:291–295. doi:10.1126/science.1183021
- Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Trojanowski JQ. 2010. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *The Lancet Neurology* **9**:119–128. doi:10.1016/S1474-4422(09)70299-6
- Jackson M, Hewitt E. 2017. Why are Functional Amyloids Non-Toxic in Humans? *Biomolecules* **7**:71. doi:10.3390/biom7040071
- Jacob F, Vernaldi S, Maekawa T. 2013. Evolution and Conservation of Plant NLR Functions. *Frontiers in Immunology* **4**. doi:10.3389/fimmu.2013.00297
- Jamet-Vierny C, Begel O, Belcour L. 1980. Senescence in Podospora anserina: amplification of a mitochondrial DNA sequence. *Cell* **21**:189–194. doi:10.1016/0092-8674(80)90126-9
- Jang H, Arce FT, Mustata M, Ramachandran S, Capone R, Nussinov R, Lal R. 2011. Antimicrobial protegrin-1 forms amyloid-like fibrils with rapid kinetics suggesting a functional link. *Biophys J* **100**:1775–1783. doi:10.1016/j.bpj.2011.01.072
- Jarrett JT, Lansbury PT. 1993. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: A pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* **73**:1055–1058. doi:10.1016/0092-8674(93)90635-4
- Jedd G, Chua NH. 2000. A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nat Cell Biol* **2**:226–231. doi:10.1038/35008652
- Jiang F, Ramanathan A, Miller MT, Tang G-Q, Gale M, Patel SS, Marcotrigiano J. 2011. Structural basis of RNA recognition and activation by innate immune receptor RIG-I. *Nature* **479**:423–427. doi:10.1038/nature10537
- Jiang X, Kinch LN, Brautigam CA, Chen X, Du F, Grishin NV, Chen ZJ. 2012. Ubiquitin-Induced Oligomerization of the RNA Sensors RIG-I and MDA5 Activates Antiviral Innate Immune Response. *Immunity* **36**:959–973. doi:10.1016/j.immuni.2012.03.022
- Jones JDG, Dangl JL. 2006. The plant immune system. Nature 444:323–329. doi:10.1038/nature05286

- Jones JDG, Vance RE, Dangl JL. 2016. Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science* **354**. doi:10.1126/science.aaf6395
- Jorgensen I, Rayamajhi M, Miao EA. 2017. Programmed cell death as a defence against infection. *Nature Reviews Immunology* **17**:151–164. doi:10.1038/nri.2016.147
- Jucker M, Walker LC. 2013. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* **501**:45–51. doi:10.1038/nature12481
- Kagan BL, Jang H, Capone R, Teran Arce F, Ramachandran S, Lal R, Nussinov R. 2012. Antimicrobial Properties of Amyloid Peptides. *Molecular Pharmaceutics* **9**:708–717. doi:10.1021/mp200419b
- Kagan JC, Magupalli VG, Wu H. 2014. SMOCs: supramolecular organizing centres that control innate immunity. *Nat Rev Immunol* **14**:821–826. doi:10.1038/nri3757
- Kaiser WJ, Upton JW, Mocarski ES. 2013. Viral modulation of programmed necrosis. *Current Opinion in Virology* **3**:296–306. doi:10.1016/j.coviro.2013.05.019
- Kajava AV, Klopffleisch K, Chen S, Hofmann K. 2015. Evolutionary link between metazoan RHIM motif and prion-forming domain of fungal heterokaryon incompatibility factor HET-s/HET-s. *Scientific Reports* **4**. doi:10.1038/srep07436
- Kambara H, Liu F, Zhang X, Liu P, Bajrami B, Teng Y, Zhao L, Zhou S, Yu H, Zhou W, Silberstein LE, Cheng T, Han M, Xu Y, Luo HR. 2018. Gasdermin D Exerts Anti-inflammatory Effects by Promoting Neutrophil Death. *Cell Reports* 22:2924– 2936. doi:10.1016/j.celrep.2018.02.067
- Kaneko T, Yano T, Aggarwal K, Lim J-H, Ueda K, Oshima Y, Peach C, Erturk-Hasdemir D, Goldman WE, Oh B-H, Kurata S, Silverman N. 2006. PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the drosophila immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan. *Nature Immunology* 7:715–723. doi:10.1038/ni1356
- Kaparakis M, Philpott DJ, Ferrero RL. 2007. Mammalian NLR proteins; discriminating foe from friend. *Immunology & Cell Biology* **85**:495–502. doi:10.1038/sj.icb.7100105
- Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, Hiiragi A, Dermody TS, Fujita T, Akira S. 2008. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid–inducible gene-I and melanoma differentiation–associated gene 5. *Journal of Experimental Medicine* 205:1601–1610. doi:10.1084/jem.20080091
- Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh C-S, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T, Akira S. 2006. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**:101–105. doi:10.1038/nature04734
- Kato M, Han TW, Xie S, Shi K, Du X, Wu LC, Mirzaei H, Goldsmith EJ, Longgood J, Pei J, Grishin NV, Frantz DE, Schneider JW, Chen S, Li L, Sawaya MR, Eisenberg D, Tycko R, McKnight SL. 2012. Cell-free Formation of RNA Granules: Low Complexity Sequence Domains Form Dynamic Fibers within Hydrogels. *Cell* 149:753–767. doi:10.1016/j.cell.2012.04.017
- Kawai T, Akira S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* **11**:373–384. doi:10.1038/ni.1863
- Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O, Akira S. 2005. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nature Immunology* **6**:981–988. doi:10.1038/ni1243
- Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, O'Rourke K, Anderson K, Warming S, Cuellar T, Haley B, Roose-Girma M, Phung QT, Liu PS, Lill JR, Li H, Wu J, Kummerfeld S, Zhang J, Lee WP, Snipas SJ, Salvesen GS, Morris LX, Fitzgerald L, Zhang Y, Bertram EM, Goodnow CC, Dixit VM. 2015. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* 526:666–671. doi:10.1038/nature15541
- Kazan K, Gardiner DM, Manners JM. 2012. On the trail of a cereal killer: recent advances in Fusarium graminearum pathogenomics and host resistance. *Mol Plant Pathol* **13**:399–413. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00762.x
- Khan N, Lawlor KE, Murphy JM, Vince JE. 2014. More to life than death: molecular determinants of necroptotic and non-necroptotic RIP3 kinase signaling. *Current Opinion in Immunology* **26**:76–89. doi:10.1016/j.coi.2013.10.017
- Khan T, Kandola TS, Wu J, Venkatesan S, Ketter E, Lange JJ, Rodríguez Gama A, Box A, Unruh JR, Cook M, Halfmann R. 2018. Quantifying Nucleation In Vivo Reveals the Physical Basis of Prion-like Phase Behavior. *Molecular Cell* **71**:155-168.e7. doi:10.1016/j.molcel.2018.06.016
- Kim DS, Jeun Y, Hwang BK. 2014. The pepper patatin-like phospholipase CaPLP1 functions in plant cell death and defense signaling. *Plant Molecular Biology* **84**:329–344. doi:10.1007/s11103-013-0137-x
- Kim HJ, Kim NC, Wang Y-D, Scarborough EA, Moore J, Diaz Z, MacLea KS, Freibaum B, Li S, Molliex A, Kanagaraj AP, Carter R, Boylan KB, Wojtas AM, Rademakers R, Pinkus JL, Greenberg SA, Trojanowski JQ, Traynor BJ, Smith BN, Topp S, Gkazi A-S, Miller J, Shaw CE, Kottlors M, Kirschner J, Pestronk A, Li YR, Ford AF, Gitler AD, Benatar M, King OD, Kimonis VE, Ross ED, Weihl CC, Shorter J, Taylor JP. 2013. Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature* **495**:467–473. doi:10.1038/nature11922

- Kim YK, Shin J-S, Nahm MH. 2016. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. Yonsei Medical Journal 57:5. doi:10.3349/ymj.2016.57.1.5
- King C-Y, Tittmann P, Gross H, Gebert R, Aebi M, Wuthrich K. 1997. Prion-inducing domain 2-114 of yeast Sup35 protein transforms in vitro into amyloid-like filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:6618–6622. doi:10.1073/pnas.94.13.6618
- King OD, Gitler AD, Shorter J. 2012. The tip of the iceberg: RNA-binding proteins with prion-like domains in neurodegenerative disease. *Brain Research* **1462**:61–80. doi:10.1016/j.brainres.2012.01.016

Klatzo I, Gajdusek DC, Zigas V. 1959. Pathology of Kuru. Lab Invest 8:799-847.

- Kleino A, Ramia NF, Bozkurt G, Shen Y, Nailwal H, Huang J, Napetschnig J, Gangloff M, Chan FK-M, Wu H, Li J, Silverman N. 2017. Peptidoglycan-Sensing Receptors Trigger the Formation of Functional Amyloids of the Adaptor Protein Imd to Initiate Drosophila NF-κB Signaling. *Immunity* 47:635-647.e6. doi:10.1016/j.immuni.2017.09.011
- Knowles TPJ, Vendruscolo M, Dobson CM. 2014. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**:384–396. doi:10.1038/nrm3810
- Kochneva-Pervukhova NV, Poznyakovski AI, Smirnov VN, Ter-Avanesyan MD. 1998. C-terminal truncation of the Sup35 protein increases the frequency of de novo generation of a prion-based [PSI +] determinant in Saccharomyces cerevisiae. *Current Genetics* **34**:146–151. doi:10.1007/s002940050379
- Kofoed EM, Vance RE. 2011. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. *Nature* **477**:592–595. doi:10.1038/nature10394
- Koonin EV, Aravind L. 2002. Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. *Cell Death Differ* **9**:394–404. doi:10.1038/sj.cdd.4400991
- Koonin EV, Aravind L. 2000. The NACHT family a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *Trends Biochem Sci* **25**:223–224. doi:10.1016/s0968-0004(00)01577-2
- Koonin EV, Krupovic M. 2019. Origin of programmed cell death from antiviral defense? *Proc Natl Acad Sci USA* **116**:16167–16169. doi:10.1073/pnas.1910303116
- Koonin EV, Makarova KS, Wolf YI. 2017. Evolutionary Genomics of Defense Systems in Archaea and Bacteria. *Annu Rev Microbiol* **71**:233–261. doi:10.1146/annurev-micro-090816-093830
- Kortmann J, Brubaker SW, Monack DM. 2015. Cutting Edge: Inflammasome Activation in Primary Human Macrophages Is Dependent on Flagellin. *The Journal of Immunology* **195**:815–819. doi:10.4049/jimmunol.1403100
- Kounatidis I, Ligoxygakis P. 2012. *Drosophila* as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection. *Open Biology* **2**:120075. doi:10.1098/rsob.120075
- Kowalinski E, Lunardi T, McCarthy AA, Louber J, Brunel J, Grigorov B, Gerlier D, Cusack S. 2011. Structural Basis for the Activation of Innate Immune Pattern-Recognition Receptor RIG-I by Viral RNA. *Cell* **147**:423–435. doi:10.1016/j.cell.2011.09.039
- Kumar H, Kawai T, Akira S. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* **30**:16–34. doi:10.3109/08830185.2010.529976
- Labarere J, Bernet J. 1979. Protoplasmic Incompatibility in PODOSPORA ANSERINA: A Possible Role for Its Associated Proteolytic Activity. *Genetics* **93**:525–537.
- Lacroute F. 1971. Non-Mendelian Mutation Allowing Ureidosuccinic Acid Uptake in Yeast. *Journal of Bacteriology* **106**:519–522. doi:10.1128/JB.106.2.519-522.1971
- Lamacchia M, Dyrka W, Breton A, Saupe SJ, Paoletti M. 2016. Overlapping Podospora anserina Transcriptional Responses to Bacterial and Fungal Non Self Indicate a Multilayered Innate Immune Response. *Front Microbiol* 7:471. doi:10.3389/fmicb.2016.00471
- Lamkanfi M, Dixit VM. 2014. Mechanisms and Functions of Inflammasomes. *Cell* **157**:1013–1022. doi:10.1016/j.cell.2014.04.007
- Larsen P, Nielsen JL, Dueholm MS, Wetzel R, Otzen D, Nielsen PH. 2007. Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms. *Environ Microbiol* **9**:3077–3090. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01418.x
- Larsen P, Nielsen JL, Otzen D, Nielsen PH. 2008. Amyloid-like adhesins produced by floc-forming and filamentous bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* **74**:1517–1526. doi:10.1128/AEM.02274-07
- Last NB, Miranker AD. 2013. Common mechanism unites membrane poration by amyloid and antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**:6382–6387. doi:10.1073/pnas.1219059110
- Le NTT, Narkiewicz J, Aulić S, Salzano G, Tran HT, Scaini D, Moda F, Giachin G, Legname G. 2015. Synthetic prions and other human neurodegenerative proteinopathies. *Virus Res* **207**:25–37. doi:10.1016/j.virusres.2014.10.020

- Leipe DD, Koonin EV, Aravind L. 2004. STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer. *J Mol Biol* **343**:1–28. doi:10.1016/j.jmb.2004.08.023
- Li J, McQuade T, Siemer AB, Napetschnig J, Moriwaki K, Hsiao Y-S, Damko E, Moquin D, Walz T, McDermott A, Ka-Ming Chan F, Wu H. 2012. The RIP1/RIP3 Necrosome Forms a Functional Amyloid Signaling Complex Required for Programmed Necrosis. *Cell* **150**:339–350. doi:10.1016/j.cell.2012.06.019
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell* **91**:479–489. doi:10.1016/S0092-8674(00)80434-1
- Li YR, King OD, Shorter J, Gitler AD. 2013. Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *The Journal of Cell Biology* **201**:361–372. doi:10.1083/jcb.201302044
- Liebman SW, Chernoff YO. 2012. Prions in yeast. Genetics 191:1041–1072. doi:10.1534/genetics.111.137760
- Lin S-C, Lo Y-C, Wu H. 2010. Helical assembly in the MyD88–IRAK4–IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* **465**:885–890. doi:10.1038/nature09121
- Linden R, Martins VR, Prado MAM, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR. 2008. Physiology of the Prion Protein. *Physiological Reviews* **88**:673–728. doi:10.1152/physrev.00007.2007
- Ling S-C, Polymenidou M, Cleveland DW. 2013. Converging Mechanisms in ALS and FTD: Disrupted RNA and Protein Homeostasis. *Neuron* **79**:416–438. doi:10.1016/j.neuron.2013.07.033
- Linkermann A, Hackl MJ, Kunzendorf U, Walczak H, Krautwald S, Jevnikar AM. 2013. Necroptosis in immunity and ischemia-reperfusion injury. *Am J Transplant* **13**:2797–2804. doi:10.1111/ajt.12448
- Liu S, Chen J, Cai X, Wu J, Chen X, Wu Y-T, Sun L, Chen ZJ. 2013. MAVS recruits multiple ubiquitin E3 ligases to activate antiviral signaling cascades. *eLife* 2. doi:10.7554/eLife.00785
- Liu Y, Schiff M, Czymmek K, Tallóczy Z, Levine B, Dinesh-Kumar SP. 2005. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* **121**:567–577. doi:10.1016/j.cell.2005.03.007
- Loo Y-M, Fornek J, Crochet N, Bajwa G, Perwitasari O, Martinez-Sobrido L, Akira S, Gill MA, García-Sastre A, Katze MG, Gale M. 2008. Distinct RIG-I and MDA5 Signaling by RNA Viruses in Innate Immunity. *Journal of Virology* 82:335– 345. doi:10.1128/JVI.01080-07
- Loo Y-M, Gale M. 2011. Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. *Immunity* **34**:680–692. doi:10.1016/j.immuni.2011.05.003
- Loquet A, El Mammeri N, Stanek J, Berbon M, Bardiaux B, Pintacuda G, Habenstein B. 2018. 3D structure determination of amyloid fibrils using solid-state NMR spectroscopy. *Methods*, New Methods in Biomolecular Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy **138–139**:26–38. doi:10.1016/j.ymeth.2018.03.014
- Loquet A, Saupe SJ. 2017. Diversity of Amyloid Motifs in NLR Signaling in Fungi. *Biomolecules* **7**. doi:10.3390/biom7020038
- Lu A, Li Y, Schmidt FI, Yin Q, Chen S, Fu T-M, Tong AB, Ploegh HL, Mao Y, Wu H. 2016. Molecular basis of caspase-1 polymerization and its inhibition by a new capping mechanism. *Nature Structural & Molecular Biology* 23:416–425. doi:10.1038/nsmb.3199
- Lu A, Magupalli VG, Ruan J, Yin Q, Atianand MK, Vos MR, Schröder GF, Fitzgerald KA, Wu H, Egelman EH. 2014b. Unified Polymerization Mechanism for the Assembly of ASC-Dependent Inflammasomes. *Cell* **156**:1193–1206. doi:10.1016/j.cell.2014.02.008
- Lu A, Wu H. 2015. Structural mechanisms of inflammasome assembly. *FEBS Journal* **282**:435–444. doi:10.1111/febs.13133
- Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. 2012a. Pathological -Synuclein Transmission Initiates Parkinson-like Neurodegeneration in Nontransgenic Mice. Science 338:949–953. doi:10.1126/science.1227157
- Luk KC, Kehm VM, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, Lee VMY. 2012b. Intracerebral inoculation of pathological αsynuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative α-synucleinopathy in mice. *The Journal of Experimental Medicine* **209**:975–986. doi:10.1084/jem.20112457
- Luk KC, Song C, O'Brien P, Stieber A, Branch JR, Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. 2009. Exogenous -synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**:20051–20056. doi:10.1073/pnas.0908005106
- Luo D, Ding SC, Vela A, Kohlway A, Lindenbach BD, Pyle AM. 2011. Structural Insights into RNA Recognition by RIG-I. *Cell* **147**:409–422. doi:10.1016/j.cell.2011.09.023
- Lysek G. 1976. Formation of perithecia in colonies of Podospora anserina. Planta 133:81–83. doi:10.1007/BF00386009

- Macho AP, Zipfel C. 2014. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Mol Cell* 54:263–272. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.028
- Maddelein M-L, Dos Reis S, Duvezin-Caubet S, Coulary-Salin B, Saupe SJ. 2002. Amyloid aggregates of the HET-s prion protein are infectious. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:7402–7407. doi:10.1073/pnas.072199199
- Maekawa T, Kufer TA, Schulze-Lefert P. 2011. NLR functions in plant and animal immune systems: so far and yet so close. *Nature Immunology* **12**:817–826. doi:10.1038/ni.2083
- Magasanik B, Kaiser CA. 2002. Nitrogen regulation in Saccharomyces cerevisiae. *Gene* **290**:1–18. doi:10.1016/S0378-1119(02)00558-9
- Maji SK, Perrin MH, Sawaya MR, Jessberger S, Vadodaria K, Rissman RA, Singru PS, Nilsson KPR, Simon R, Schubert D, Eisenberg D, Rivier J, Sawchenko P, Vale W, Riek R. 2009. Functional Amyloids as Natural Storage of Peptide Hormones in Pituitary Secretory Granules. *Science* **325**:328–332. doi:10.1126/science.1173155
- Marcou D. 1961. Notion de longévité et nature cytoplasmique du déterminant de la sénescence chez quelques champignons. *Ann Sci Natur Bot* **12**:653–764.
- Marcou D, Picard-Bennoun M, Simonet JM. 1982. Genetic Map of Podospora anserina. O'Brien S (ed) Genetic Maps Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Martin SJ, Green DR. 1995. Protease activation during apoptosis: Death by a thousand cuts? *Cell* **82**:349–352. doi:10.1016/0092-8674(95)90422-0
- Masison DC, Maddelein M-L, Wickner RB. 1997. The prion model for [URE3] of yeast: Spontaneous generation and requirements for propagation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**:12503–12508. doi:10.1073/pnas.94.23.12503
- Masison DC, Wickner RB. 1995. Prion-Inducing Domain of Yeast Ure2p and Protease Resistance of Ure2p in Prion-Containing Cells. *Science* **270**:93–95. doi:10.1126/science.270.5233.93
- Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann DMA, Hasegawa M. 2013. Prion-like spreading of pathological α-synuclein in brain. *Brain* **136**:1128–1138. doi:10.1093/brain/awt037
- Mathur V, Seuring C, Riek R, Saupe SJ, Liebman SW. 2012. Localization of HET-S to the cell periphery, not to [Het-s] aggregates, is associated with [Het-s]-HET-S toxicity. *Mol Cell Biol* **32**:139–153. doi:10.1128/MCB.06125-11
- Mattjus P, Turcq B, Pike HM, Molotkovsky JG, Brown RE. 2003. Glycolipid intermembrane transfer is accelerated by HET-C2, a filamentous fungus gene product involved in the cell-cell incompatibility response. *Biochemistry* **42**:535–542. doi:10.1021/bi026896x
- McCrate OA, Zhou X, Reichhardt C, Cegelski L. 2013. Sum of the parts: composition and architecture of the bacterial extracellular matrix. *J Mol Biol* **425**:4286–4294. doi:10.1016/j.jmb.2013.06.022
- McGlinchey RP, Kryndushkin D, Wickner RB. 2011. Suicidal [PSI+] is a lethal yeast prion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**:5337–5341. doi:10.1073/pnas.1102762108
- McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB. 1983. A protease-resistant protein is a structural component of the Scrapie prion. *Cell* **35**:57–62. doi:10.1016/0092-8674(83)90207-6
- Medzhitov R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**:819–826. doi:10.1038/nature06246
- Merlini G, Bellotti V. 2003. Molecular mechanisms of amyloidosis. *N Engl J Med* **349**:583–596. doi:10.1056/NEJMra023144
- Mermigka G, Amprazi M, Mentzelopoulou A, Amartolou A, Sarris PF. 2020. Plant and Animal Innate Immunity Complexes: Fighting Different Enemies with Similar Weapons. *Trends in Plant Science* **25**:80–91. doi:10.1016/j.tplants.2019.09.008
- Meunier E, Broz P. 2017. Evolutionary Convergence and Divergence in NLR Function and Structure. *Trends in Immunology* **38**:744–757. doi:10.1016/j.it.2017.04.005
- Meyer V, Basenko EY, Benz JP, Braus GH, Caddick MX, Csukai M, de Vries RP, Endy D, Frisvad JC, Gunde-Cimerman N, Haarmann T, Hadar Y, Hansen K, Johnson RI, Keller NP, Kraševec N, Mortensen UH, Perez R, Ram AFJ, Record E, Ross P, Shapaval V, Steiniger C, van den Brink H, van Munster J, Yarden O, Wösten HAB. 2020. Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. *Fungal Biol Biotechnol* **7**:5. doi:10.1186/s40694-020-00095-z
- Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J. 2005. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**:1167–1172. doi:10.1038/nature04193
- Micali OC, Smith ML. 2005. Biological concepts of vegetative self and nonself recognition in fungi. *Evolutionary Genetics* of Fungi, edited by J Xu Horizon Bioscience, Norfolk, UK 63–86.
- Mizielinska S, Gronke S, Niccoli T, Ridler CE, Clayton EL, Devoy A, Moens T, Norona FE, Woollacott IOC, Pietrzyk J, Cleverley K, Nicoll AJ, Pickering-Brown S, Dols J, Cabecinha M, Hendrich O, Fratta P, Fisher EMC, Partridge L, Isaacs

AM. 2014. C9orf72 repeat expansions cause neurodegeneration in Drosophila through arginine-rich proteins. *Science* **345**:1192–1194. doi:10.1126/science.1256800

- Mizuno N, Baxa U, Steven AC. 2011. Structural dependence of HET-s amyloid fibril infectivity assessed by cryoelectron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**:3252–3257. doi:10.1073/pnas.1011342108
- Mompeán M, Li W, Li J, Laage S, Siemer AB, Bozkurt G, Wu H, McDermott AE. 2018. The Structure of the Necrosome RIPK1-RIPK3 Core, a Human Hetero-Amyloid Signaling Complex. *Cell* **173**:1244-1253.e10. doi:10.1016/j.cell.2018.03.032
- Mougenot A-L, Nicot S, Bencsik A, Morignat E, Verchère J, Lakhdar L, Legastelois S, Baron T. 2012. Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiology of Aging* **33**:2225–2228. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.06.022
- Münch C, O'Brien J, Bertolotti A. 2011. Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**:3548–3553. doi:10.1073/pnas.1017275108
- Münch J, Rücker E, Ständker L, Adermann K, Goffinet C, Schindler M, Wildum S, Chinnadurai R, Rajan D, Specht A, Giménez-Gallego G, Sánchez PC, Fowler DM, Koulov A, Kelly JW, Mothes W, Grivel J-C, Margolis L, Keppler OT, Forssmann W-G, Kirchhoff F. 2007. Semen-Derived Amyloid Fibrils Drastically Enhance HIV Infection. *Cell* 131:1059– 1071. doi:10.1016/j.cell.2007.10.014
- Muñoz-Wolf N, Lavelle EC. 2016. Innate Immune Receptors In: Di Virgilio F, Pelegrín P, editors. NLR Proteins. New York, NY: Springer New York. pp. 1–43. doi:10.1007/978-1-4939-3566-6_1
- Murphy JM, Czabotar PE, Hildebrand JM, Lucet IS, Zhang J-G, Alvarez-Diaz S, Lewis R, Lalaoui N, Metcalf D, Webb AI, Young SN, Varghese LN, Tannahill GM, Hatchell EC, Majewski IJ, Okamoto T, Dobson RCJ, Hilton DJ, Babon JJ, Nicola NA, Strasser A, Silke J, Alexander WS. 2013. The Pseudokinase MLKL Mediates Necroptosis via a Molecular Switch Mechanism. *Immunity* **39**:443–453. doi:10.1016/j.immuni.2013.06.018
- Murphy JM, Silke J. 2014. Ars Moriendi; the art of dying well new insights into the molecular pathways of necroptotic cell death. *EMBO reports* **15**:155–164. doi:10.1002/embr.201337970
- Nagata S. 2018. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annual Review of Immunology* **36**:489–517. doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053010
- Nagata S, Tanaka M. 2017. Programmed cell death and the immune system. *Nature Reviews Immunology* **17**:333–340. doi:10.1038/nri.2016.153
- Nanson JD, Kobe B, Ve T. 2019. Death, TIR, and RHIM: Self-assembling domains involved in innate immunity and celldeath signaling. *J Leukoc Biol* **105**:363–375. doi:10.1002/JLB.MR0318-123R
- Nazabal A, Dos Reis S, Bonneu M, Saupe SJ, Schmitter J-M. 2003. Conformational transition occurring upon amyloid aggregation of the HET-s prion protein of Podospora anserina analyzed by hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry. *Biochemistry* **42**:8852–8861. doi:10.1021/bi0344275
- Nedelcu AM, Driscoll WW, Durand PM, Herron MD, Rashidi A. 2011. On the paradigm of altruistic suicide in the unicellular world. *Evolution* **65**:3–20. doi:10.1111/j.1558-5646.2010.01103.x
- Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, Castellani RJ, Crain BJ, Davies P, Tredici KD, Duyckaerts C, Frosch MP, Haroutunian V, Hof PR, Hulette CM, Hyman BT, Iwatsubo T, Jellinger KA, Jicha GA, Kövari E, Kukull WA, Leverenz JB, Love S, Mackenzie IR, Mann DM, Masliah E, McKee AC, Montine TJ, Morris JC, Schneider JA, Sonnen JA, Thal DR, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Wisniewski T, Woltjer RL, Beach TG. 2012. Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **71**:362–381. doi:10.1097/NEN.0b013e31825018f7
- Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M, Murayama S, Mann DMA, Akiyama H, Hasegawa M. 2013. Prion-like Properties of Pathological TDP-43 Aggregates from Diseased Brains. *Cell Reports* **4**:124–134. doi:10.1016/j.celrep.2013.06.007
- Olsén A, Jonsson A, Normark S. 1989. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on Escherichia coll. *Nature* **338**:652–655. doi:10.1038/338652a0
- Orning P, Weng D, Starheim K, Ratner D, Best Z, Lee B, Brooks A, Xia S, Wu H, Kelliher MA, Berger SB, Gough PJ, Bertin J, Proulx MM, Goguen JD, Kayagaki N, Fitzgerald KA, Lien E. 2018. Pathogen blockade of TAK1 triggers caspase-8– dependent cleavage of gasdermin D and cell death. *Science* **362**:1064–1069. doi:10.1126/science.aau2818
- Orozco S, Yatim N, Werner MR, Tran H, Gunja SY, Tait SW, Albert ML, Green DR, Oberst A. 2014. RIPK1 both positively and negatively regulates RIPK3 oligomerization and necroptosis. *Cell Death & Differentiation* **21**:1511–1521. doi:10.1038/cdd.2014.76
- Otzen D. 2010. Functional amyloid: Turning swords into plowshares. Prion 4:256–264. doi:10.4161/pri.4.4.13676
- Padieu E, Bernet J. 1967. [Mode of action of the genes responsible for abortion of certain products of meiosis in the Ascomycete, Podospora anserina]. *CR Hebd Seances Acad Sci, Ser D, Sci Nat* **264**:2300–2303.

- Paoletti M, Clavé C. 2007. The Fungus-Specific HET Domain Mediates Programmed Cell Death in Podospora anserina. *Eukaryotic Cell* 6:2001–2008. doi:10.1128/EC.00129-07
- Paoletti M, Saupe SJ. 2009. Fungal incompatibility: evolutionary origin in pathogen defense? *Bioessays* **31**:1201–1210. doi:10.1002/bies.200900085
- Paoletti M, Saupe SJ, Clavé C. 2007. Genesis of a fungal non-self recognition repertoire. *PLoS ONE* **2**:e283. doi:10.1371/journal.pone.0000283
- Parent AD, Cornwall GA, Liu LY, Smith CE, Hermo L. 2011. Alterations in the testis and epididymis associated with loss of function of the cystatin-related epididymal spermatogenic (CRES) protein. *J Androl* **32**:444–463. doi:10.2164/jandrol.110.010694
- Parveen N, Cornell KA. 2011. Methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase, a critical enzyme for bacterial metabolism: Involvement of MTA/SAH nucleosidase in bacterial metabolism. *Molecular Microbiology* 79:7–20. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07455.x
- Patel JR, Jain A, Chou Y, Baum A, Ha T, García-Sastre A. 2013. ATPase-driven oligomerization of RIG-I on RNA allows optimal activation of type-I interferon. *EMBO reports* **14**:780–787. doi:10.1038/embor.2013.102
- Patino MM, Liu J-J, Glover JR, Lindquist S. 1996. Support for the Prion Hypothesis for Inheritance of a Phenotypic Trait in Yeast. *Science* **273**:622–626. doi:10.1126/science.273.5275.622
- Paushkin SV. 1997. In Vitro Propagation of the Prion-Like State of Yeast Sup35 Protein. *Science* 277:381–383. doi:10.1126/science.277.5324.381
- Paushkin SV, Kushnirov VV, Smirnov VN, Ter-Avanesyan MD. 1996. Propagation of the yeast prion-like [psi+] determinant is mediated by oligomerization of the SUP35-encoded polypeptide chain release factor. *EMBO J* **15**:3127–3134.
- Pearson JS, Giogha C, Mühlen S, Nachbur U, Pham CLL, Zhang Y, Hildebrand JM, Oates CV, Lung TWF, Ingle D, Dagley LF, Bankovacki A, Petrie EJ, Schroeder GN, Crepin VF, Frankel G, Masters SL, Vince J, Murphy JM, Sunde M, Webb AI, Silke J, Hartland EL. 2017. EspL is a bacterial cysteine protease effector that cleaves RHIM proteins to block necroptosis and inflammation. *Nat Microbiol* 2:16258. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.258
- Pecho-Vrieseling E, Rieker C, Fuchs S, Bleckmann D, Esposito MS, Botta P, Goldstein C, Bernhard M, Galimberti I, Müller M, Lüthi A, Arber S, Bouwmeester T, van der Putten H, Di Giorgio FP. 2014. Transneuronal propagation of mutant huntingtin contributes to non–cell autonomous pathology in neurons. *Nature Neuroscience* 17:1064–1072. doi:10.1038/nn.3761
- Peisley A, Lin C, Wu B, Orme-Johnson M, Liu M, Walz T, Hur S. 2011. Cooperative assembly and dynamic disassembly of MDA5 filaments for viral dsRNA recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**:21010–21015. doi:10.1073/pnas.1113651108
- Peisley A, Wu B, Xu H, Chen ZJ, Hur S. 2014. Structural basis for ubiquitin-mediated antiviral signal activation by RIG-I. *Nature* **509**:110–114. doi:10.1038/nature13140
- Peisley A, Wu B, Yao H, Walz T, Hur S. 2013. RIG-I Forms Signaling-Competent Filaments in an ATP-Dependent, Ubiquitin-Independent Manner. *Molecular Cell* **51**:573–583. doi:10.1016/j.molcel.2013.07.024
- Perkins DD. 1992. Neurospora: the organism behind the molecular revolution. Genetics 130:687–701.
- Petrie EJ, Czabotar PE, Murphy JM. 2019. The Structural Basis of Necroptotic Cell Death Signaling. *Trends in Biochemical Sciences* 44:53–63. doi:10.1016/j.tibs.2018.11.002
- Pham CL, Shanmugam N, Strange M, O'Carroll A, Brown JW, Sierecki E, Gambin Y, Steain M, Sunde M. 2019. Viral M45 and necroptosis-associated proteins form heteromeric amyloid assemblies. *EMBO reports* **20**. doi:10.15252/embr.201846518
- Picard M. 1973. Genetic evidence for a polycistronic unit of transcription in the complex locus "14" in Podospora anserina. II. Genetic analysis of informational suppressors. *Genet Res (Camb)* **21**:1–15.
- Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, Reis e Sousa C. 2006. RIG-I-Mediated Antiviral Responses to Single-Stranded RNA Bearing 5'-Phosphates. *Science* **314**:997–1001. doi:10.1126/science.1132998
- Pinan-Lucarré B, Balguerie A, Clavé C. 2005. Accelerated cell death in Podospora autophagy mutants. *Eukaryotic Cell* 4:1765–1774. doi:10.1128/EC.4.11.1765-1774.2005
- Pinan-Lucarré B, Iraqui I, Clavé C. 2006. Podospora anserina target of rapamycin. *Curr Genet* **50**:23–31. doi:10.1007/s00294-006-0064-3
- Pinan-Lucarré B, Paoletti M, Clavé C. 2007. Cell death by incompatibility in the fungus Podospora. *Seminars in Cancer Biology* **17**:101–111. doi:10.1016/j.semcancer.2006.11.009

- Pinan-Lucarré B, Paoletti M, Dementhon K, Coulary-Salin B, Clavé C. 2003. Autophagy is induced during cell death by incompatibility and is essential for differentiation in the filamentous fungus Podospora anserina. *Mol Microbiol* 47:321–333. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03208.x
- Plumley JA, Dannenberg JJ. 2010. The importance of hydrogen bonding between the glutamine side chains to the formation of amyloid VQIVYK parallel beta-sheets: an ONIOM DFT/AM1 study. *J Am Chem Soc* **132**:1758–1759. doi:10.1021/ja909690a
- Prusiner S. 1991. Molecular biology of prion diseases. Science 252:1515–1522. doi:10.1126/science.1675487
- Prusiner SB. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**:136. doi:10.1126/science.6801762
- Prusiner SB. 1998. Nobel Lecture: Prions. Proceedings of the National Academy of Sciences 95:13363–13383. doi:10.1073/pnas.95.23.13363
- Qiao Q, Wu H. 2015. Supramolecular organizing centers (SMOCs) as signaling machines in innate immune activation. *Science China Life Sciences* **58**:1067–1072. doi:10.1007/s11427-015-4951-z
- Rademakers R, Neumann M, Mackenzie IR. 2012. Advances in understanding the molecular basis of frontotemporal dementia. *Nature Reviews Neurology* **8**:423–434. doi:10.1038/nrneurol.2012.117
- Rast JP, Smith LC, Loza-Coll M, Hibino T, Litman GW. 2006. Genomic Insights into the Immune System of the Sea Urchin. Science **314**:952–956. doi:10.1126/science.1134301
- Rathinam VAK, Vanaja SK, Fitzgerald KA. 2012. Regulation of inflammasome signaling. *Nature Immunology* **13**:333–342. doi:10.1038/ni.2237
- Ravits JM, La Spada AR. 2009. ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: Deconstructing motor neuron degeneration. *Neurology* **73**:805–811. doi:10.1212/WNL.0b013e3181b6bbbd
- Rebsamen M, Heinz LX, Meylan E, Michallet M, Schroder K, Hofmann K, Vazquez J, Benedict CA, Tschopp J. 2009. DAI/ZBP1 recruits RIP1 and RIP3 through RIP homotypic interaction motifs to activate NF-κB. *EMBO reports* 10:916–922. doi:10.1038/embor.2009.109
- Recasens A, Dehay B, Bové J, Carballo-Carbajal I, Dovero S, Pérez-Villalba A, Fernagut P-O, Blesa J, Parent A, Perier C, Fariñas I, Obeso JA, Bezard E, Vila M. 2014. Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger α-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys: LB-Induced Pathology. *Annals of Neurology* **75**:351–362. doi:10.1002/ana.24066
- Ren P-H, Lauckner JE, Kachirskaia I, Heuser JE, Melki R, Kopito RR. 2009. Cytoplasmic penetration and persistent infection of mammalian cells by polyglutamine aggregates. *Nature Cell Biology* **11**:219–225. doi:10.1038/ncb1830
- Rice KC, Bayles KW. 2008. Molecular control of bacterial death and lysis. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**:85–109, table of contents. doi:10.1128/MMBR.00030-07
- Riedl SJ, Li W, Chao Y, Schwarzenbacher R, Shi Y. 2005. Structure of the apoptotic protease-activating factor 1 bound to ADP. *Nature* **434**:926–933. doi:10.1038/nature03465
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wüthrich K. 1996. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121–231). *Nature* **382**:180–182. doi:10.1038/382180a0
- Riek R, Saupe SJ. 2016. The HET-S/s Prion Motif in the Control of Programmed Cell Death. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**. doi:10.1101/cshperspect.a023515
- Ritter C, Maddelein M-L, Siemer AB, Lührs T, Ernst M, Meier BH, Saupe SJ, Riek R. 2005. Correlation of structural elements and infectivity of the HET-s prion. *Nature* **435**:844–848. doi:10.1038/nature03793
- Rizet G. 1953. Sur l'impossibilité d'obtenir la multiplication végétative ininterrompue et illimitée de l'Ascomycète Podospora anserina. *C R Acad Sci Paris* 237–838.
- Rizet G. 1952. Les phénomènes de barrage chez Podospora anserina. I. Analyse génétique des barrages entre souches S and s. *Rev Cytol Biol Veg* 13–51.
- Rizet G. 1941. Sur l'analyse génétique des asques du Podospora anserina. C R Acad Sci Paris 212–59.
- Rizet G. 1939. De l'hérédité du caractère absence de pigment dans le mycélium d'un ascomycète du genre Podospora. *C R Acad Sci Paris* 209–771.
- Rizet G, Delannoy G. 1950. Sur la production par des hétérozygotes monofactoriels de Podospora anserina de gamétophytes phénotypiquement différents des gamétophytes parentaux. *C R Acad Sci Paris* **231**:588–90.
- Rizet G, Esser K. 1953. [Phenomena of incompatibility between strains of different origins in Podospora anserina]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 237:760–761.
- Roan NR, Müller JA, Liu H, Chu S, Arnold F, Stürzel CM, Walther P, Dong M, Witkowska HE, Kirchhoff F, Münch J, Greene WC. 2011. Peptides Released by Physiological Cleavage of Semen Coagulum Proteins Form Amyloids that Enhance HIV Infection. *Cell Host & Microbe* 10:541–550. doi:10.1016/j.chom.2011.10.010

- Roan NR, Sandi-Monroy N, Kohgadai N, Usmani SM, Hamil KG, Neidleman J, Montano M, Ständker L, Röcker A, Cavrois M, Rosen J, Marson K, Smith JF, Pilcher CD, Gagsteiger F, Sakk O, O'Rand M, Lishko PV, Kirchhoff F, Münch J, Greene WC. 2017. Semen amyloids participate in spermatozoa selection and clearance. *Elife* 6. doi:10.7554/eLife.24888
- Roh JS, Sohn DH. 2018. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Network* 18. doi:10.4110/in.2018.18.e27
- Romero D, Aguilar C, Losick R, Kolter R. 2010. Amyloid fibers provide structural integrity to Bacillus subtilis biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**:2230–2234. doi:10.1073/pnas.0910560107
- Ronald PC, Beutler B. 2010. Plant and Animal Sensors of Conserved Microbial Signatures. *Science* **330**:1061–1064. doi:10.1126/science.1189468
- Ruan J, Xia S, Liu X, Lieberman J, Wu H. 2018. Cryo-EM structure of the gasdermin A3 membrane pore. *Nature* 557:62–67. doi:10.1038/s41586-018-0058-6
- Sabaté R, Ventura S. 2013. Cross-β-sheet supersecondary structure in amyloid folds: techniques for detection and characterization. *Methods Mol Biol* **932**:237–257. doi:10.1007/978-1-62703-065-6_15
- Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB. 1998. Eight prion strains have PrPSc molecules with different conformations. *Nature Medicine* **4**:1157–1165. doi:10.1038/2654
- Sarhan J, Liu BC, Muendlein HI, Li P, Nilson R, Tang AY, Rongvaux A, Bunnell SC, Shao F, Green DR, Poltorak A. 2018. Caspase-8 induces cleavage of gasdermin D to elicit pyroptosis during *Yersinia* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115:E10888–E10897. doi:10.1073/pnas.1809548115
- Sarkar S, Iyer G, Wu J, Glass NL. 2002. Nonself recognition is mediated by HET-C heterocomplex formation during vegetative incompatibility. *EMBO J* **21**:4841–4850. doi:10.1093/emboj/cdf479
- Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, Tsujimura T, Fujita T, Akira S, Takeuchi O. 2010. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**:1512–1517. doi:10.1073/pnas.0912986107
- Saupe S, Descamps C, Turcq B, Bégueret J. 1994. Inactivation of the Podospora anserina vegetative incompatibility locus het-c, whose product resembles a glycolipid transfer protein, drastically impairs ascospore production. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:5927–5931. doi:10.1073/pnas.91.13.5927
- Saupe S, Turcq B, Bégueret J. 1995. Sequence diversity and unusual variability at the het-c locus involved in vegetative incompatibility in the fungus Podospora anserina. *Curr Genet* **27**:466–471. doi:10.1007/BF00311217
- Saupe SJ. 2020. Amyloid Signaling in Filamentous Fungi and Bacteria. *Annual Review of Microbiology* **74**:673–691. doi:10.1146/annurev-micro-011320-013555
- Saupe SJ. 2011. The [Het-s] prion of Podospora anserina and its role in heterokaryon incompatibility. *Semin Cell Dev Biol* **22**:460–468. doi:10.1016/j.semcdb.2011.02.019
- Saupe SJ. 2000. Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:489–502.
- Saupe SJ, Jarosz DF, True HL. 2016. Amyloid Prions in Fungi. *Microbiol Spectr* **4**. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0029-2016
- Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A. 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat Ecol Evol* **3**:430–439. doi:10.1038/s41559-018-0793-y
- Schaefer L. 2014. Complexity of Danger: The Diverse Nature of Damage-associated Molecular Patterns. *Journal of Biological Chemistry* 289:35237–35245. doi:10.1074/jbc.R114.619304
- Schonhoff AM, Williams GP, Wallen ZD, Standaert DG, Harms AS. 2020. Innate and adaptive immune responses in Parkinson's diseaseProgress in Brain Research. Elsevier. pp. 169–216. doi:10.1016/bs.pbr.2019.10.006
- Schwartz K, Syed AK, Stephenson RE, Rickard AH, Boles BR. 2012. Functional amyloids composed of phenol soluble modulins stabilize Staphylococcus aureus biofilms. *PLoS Pathog* **8**:e1002744. doi:10.1371/journal.ppat.1002744
- Selkoe DJ. 2012. Preventing Alzheimer's Disease. Science 337:1488–1492. doi:10.1126/science.1228541
- Sen A, Baxa U, Simon MN, Wall JS, Sabate R, Saupe SJ, Steven AC. 2007. Mass analysis by scanning transmission electron microscopy and electron diffraction validate predictions of stacked beta-solenoid model of HET-s prion fibrils. J Biol Chem 282:5545–5550. doi:10.1074/jbc.M611464200
- Serra DO, Richter AM, Hengge R. 2013. Cellulose as an architectural element in spatially structured Escherichia coli biofilms. *J Bacteriol* **195**:5540–5554. doi:10.1128/JB.00946-13
- Seth RB, Sun L, Ea C-K, Chen ZJ. 2005. Identification and Characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein that Activates NF-κB and IRF3. *Cell* **122**:669–682. doi:10.1016/j.cell.2005.08.012
- Seuring C, Greenwald J, Wasmer C, Wepf R, Saupe SJ, Meier BH, Riek R. 2012. The mechanism of toxicity in HET-S/HETs prion incompatibility. *PLoS Biol* **10**:e1001451. doi:10.1371/journal.pbio.1001451

- Shanmugam N, Baker MODG, Ball SR, Steain M, Pham CLL, Sunde M. 2019. Microbial functional amyloids serve diverse purposes for structure, adhesion and defence. *Biophys Rev* **11**:287–302. doi:10.1007/s12551-019-00526-1
- Shewmaker F, Mull L, Nakayashiki T, Masison DC, Wickner RB. 2007. Ure2p Function Is Enhanced by Its Prion Domain in Saccharomyces cerevisiae. Genetics **176**:1557–1565. doi:10.1534/genetics.107.074153
- Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, Zhuang Y, Cai T, Wang F, Shao F. 2015. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* **526**:660–665. doi:10.1038/nature15514
- Shirey CM, Scott JL, Stahelin RV. 2017. Notes and tips for improving quality of lipid-protein overlay assays. *Anal Biochem* **516**:9–12. doi:10.1016/j.ab.2016.10.009
- Siemer AB, Ritter C, Ernst M, Riek R, Meier BH. 2005. High-resolution solid-state NMR spectroscopy of the prion protein HET-s in its amyloid conformation. *Angew Chem Int Ed Engl* **44**:2441–2444. doi:10.1002/anie.200462952
- Silar P. 2013. [Mycology in the 21st century: crisis and revitalization]. *Biol Aujourdhui* **207**:269–275. doi:10.1051/jbio/2013024
- Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, Ikeda S, Merlini G, Saraiva MJM, Westermark P, Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. 2012. Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. Amyloid 19:167–170. doi:10.3109/13506129.2012.734345
- Sipe JD, Cohen AS. 2000. Review: History of the Amyloid Fibril. *Journal of Structural Biology* **130**:88–98. doi:10.1006/jsbi.2000.4221
- Smith ML, Micali OC, Hubbard SP, Mir-Rashed N, Jacobson DJ, Glass NL. 2000. Vegetative incompatibility in the het-6 region of Neurospora crassa is mediated by two linked genes. *Genetics* **155**:1095–1104.
- Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, Neer EJ. 1999. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci* 24:181–185. doi:10.1016/s0968-0004(99)01384-5
- Sood R, Domanov Y, Pietiäinen M, Kontinen VP, Kinnunen PKJ. 2008. Binding of LL-37 to model biomembranes: insight into target vs host cell recognition. *Biochim Biophys Acta* **1778**:983–996. doi:10.1016/j.bbamem.2007.11.016
- Sparkes RS, Simon M, Cohn VH, Fournier RE, Lem J, Klisak I, Heinzmann C, Blatt C, Lucero M, Mohandas T. 1986. Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83:7358–7362. doi:10.1073/pnas.83.19.7358
- Stahl N. 1987. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* **51**:229–240. doi:10.1016/0092-8674(87)90150-4
- Stöckel J, Safar J, Wallace AC, Cohen FE, Prusiner SB. 1998. Prion Protein Selectively Binds Copper(II) Ions[†]. *Biochemistry* **37**:7185–7193. doi:10.1021/bi972827k
- Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. 2012. Inflammasomes in health and disease. *Nature* **481**:278–286. doi:10.1038/nature10759
- Sun X, Yin J, Starovasnik MA, Fairbrother WJ, Dixit VM. 2002. Identification of a Novel Homotypic Interaction Motif Required for the Phosphorylation of Receptor-interacting Protein (RIP) by RIP3. *Journal of Biological Chemistry* 277:9505–9511. doi:10.1074/jbc.M109488200
- Suzuki G, Shimazu N, Tanaka M. 2012. A Yeast Prion, Mod5, Promotes Acquired Drug Resistance and Cell Survival Under Environmental Stress. *Science* **336**:355–359. doi:10.1126/science.1219491
- Taglialegna A, Navarro S, Ventura S, Garnett JA, Matthews S, Penades JR, Lasa I, Valle J. 2016. Staphylococcal Bap Proteins Build Amyloid Scaffold Biofilm Matrices in Response to Environmental Signals. *PLoS Pathog* 12:e1005711. doi:10.1371/journal.ppat.1005711
- Takeuchi O, Akira S. 2010. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* **140**:805–820. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022
- Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G. 2019. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research* 29:347–364. doi:10.1038/s41422-019-0164-5
- Tatum EL, Beadle GW. 1942. Genetic Control of Biochemical Reactions in Neurospora: An "Aminobenzoicless" Mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 28:234–243. doi:10.1073/pnas.28.6.234
- Taylor KL. 1999. Prion Domain Initiation of Amyloid Formation in Vitro from Native Ure2p. *Science* **283**:1339–1343. doi:10.1126/science.283.5406.1339
- Telling GC. 2013. The Importance of Prions. PLoS Pathog 9. doi:10.1371/journal.ppat.1003090
- Tenthorey JL, Haloupek N, López-Blanco JR, Grob P, Adamson E, Hartenian E, Lind NA, Bourgeois NM, Chacón P, Nogales E, Vance RE. 2017. The structural basis of flagellin detection by NAIP5: A strategy to limit pathogen immune evasion. *Science* **358**:888–893. doi:10.1126/science.aao1140

- Ter-Avanesyan MD, Dagkesamanskaya AR, Kushnirov VV, Smirnov VN. 1994. The SUP35 omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-Mendelian determinant [psi+] in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* **137**:671–676.
- Triantafilou K, Vakakis E, Kar S, Richer E, Evans GL, Triantafilou M. 2012. Visualisation of direct interaction of MDA5 and the dsRNA replicative intermediate form of positive strand RNA viruses. *Journal of Cell Science* **125**:4761–4769. doi:10.1242/jcs.103887
- Tudzynski P, Esser K. 1977. Inhibitors of mitochondrial function prevent the senescence in the ascomycete Podospora anserina. *Mol Gen Genet* **153**:111–13.
- Turcq B, Deleu C, Denayrolles M, Bégueret J. 1991. Two allelic genes responsible for vegetative incompatibility in the fungus Podospora anserina are not essential for cell viability. *Molecular and General Genetics MGG* 228:265–269. doi:10.1007/BF00282475
- Turk E, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB. 1988. Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *European Journal of Biochemistry* **176**:21–30. doi:10.1111/j.1432-1033.1988.tb14246.x
- Tuttle MD, Comellas G, Nieuwkoop AJ, Covell DJ, Berthold DA, Kloepper KD, Courtney JM, Kim JK, Barclay AM, Kendall A, Wan W, Stubbs G, Schwieters CD, Lee VMY, George JM, Rienstra CM. 2016. Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α-synuclein. *Nat Struct Mol Biol* **23**:409–415. doi:10.1038/nsmb.3194
- Twohig D, Nielsen HM. 2019. α-synuclein in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration* **14**. doi:10.1186/s13024-019-0320-x
- Tycko R. 2011. Solid-state NMR studies of amyloid fibril structure. *Annu Rev Phys Chem* **62**:279–299. doi:10.1146/annurev-physchem-032210-103539
- Udan M, Baloh RH. 2011. Implications of the prion-related Q/N domains in TDP-43 and FUS. *Prion* **5**:1–5. doi:10.4161/pri.5.1.14265
- Uehling J, Deveau A, Paoletti M. 2017. Do fungi have an innate immune response? An NLR-based comparison to plant and animal immune systems. *PLoS Pathog* **13**. doi:10.1371/journal.ppat.1006578
- Uhlich GA, Cooke PH, Solomon EB. 2006. Analyses of the Red-Dry-Rough Phenotype of an Escherichia coli O157:H7 Strain and Its Role in Biofilm Formation and Resistance to Antibacterial Agents. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:2564–2572. doi:10.1128/AEM.72.4.2564-2572.2006
- Upton JW, Kaiser WJ, Mocarski ES. 2012. DAI/ZBP1/DLM-1 Complexes with RIP3 to Mediate Virus-Induced Programmed Necrosis that Is Targeted by Murine Cytomegalovirus vIRA. *Cell Host & Microbe* **11**:290–297. doi:10.1016/j.chom.2012.01.016
- Upton JW, Kaiser WJ, Mocarski ES. 2010. Virus Inhibition of RIP3-Dependent Necrosis. *Cell Host & Microbe* **7**:302–313. doi:10.1016/j.chom.2010.03.006
- Urbach JM, Ausubel FM. 2017. The NBS-LRR architectures of plant R-proteins and metazoan NLRs evolved in independent events. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**:1063–1068. doi:10.1073/pnas.1619730114
- Vajjhala PR, Ve T, Bentham A, Stacey KJ, Kobe B. 2017. The molecular mechanisms of signaling by cooperative assembly formation in innate immunity pathways. *Molecular Immunology* **86**:23–37. doi:10.1016/j.molimm.2017.02.012
- van der Gaag M, Debets AJM, Hoekstra RF. 2003. Spore killing in the fungus Podospora anserina: a connection between meiotic drive and vegetative incompatibility? *Genetica* **117**:59–65. doi:10.1023/a:1022364632611
- van der Gaag M, Debets AJ, Osiewacz HD, Hoekstra RF. 1998. The dynamics of pAL2-1 homologous linear plasmids in Podospora anserina. *Mol Gen Genet* **258**:521–529. doi:10.1007/s004380050763
- Van Gerven N, Van der Verren SE, Reiter DM, Remaut H. 2018. The Role of Functional Amyloids in Bacterial Virulence. *Journal of Molecular Biology* **430**:3657–3684. doi:10.1016/j.jmb.2018.07.010
- van Langenhove T, van der Zee J, van Broeckhoven C. 2012. The molecular basis of the frontotemporal lobar degeneration–amyotrophic lateral sclerosis spectrum. *Annals of Medicine* **44**:817–828. doi:10.3109/07853890.2012.665471
- Van Melckebeke H, Wasmer C, Lange A, Ab E, Loquet A, Böckmann A, Meier BH. 2010. Atomic-Resolution Three-Dimensional Structure of HET-s(218–289) Amyloid Fibrils by Solid-State NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* 132:13765–13775. doi:10.1021/ja104213j
- Vanden Berghe T, Hassannia B, Vandenabeele P. 2016. An outline of necrosome triggers. *Cellular and Molecular Life Sciences* **73**:2137–2152. doi:10.1007/s00018-016-2189-y
- Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**:700–714. doi:10.1038/nrm2970

- Ve T, Williams SJ, Kobe B. 2015. Structure and function of Toll/interleukin-1 receptor/resistance protein (TIR) domains. *Apoptosis* **20**:250–261. doi:10.1007/s10495-014-1064-2
- Venkataraman T, Valdes M, Elsby R, Kakuta S, Caceres G, Saijo S, Iwakura Y, Barber GN. 2007. Loss of DExD/H Box RNA Helicase LGP2 Manifests Disparate Antiviral Responses. *The Journal of Immunology* **178**:6444–6455. doi:10.4049/jimmunol.178.10.6444
- Viles JH, Cohen FE, Prusiner SB, Goodin DB, Wright PE, Dyson HJ. 1999. Copper binding to the prion protein: Structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:2042– 2047. doi:10.1073/pnas.96.5.2042
- Vogan AA, Ament-Velásquez SL, Granger-Farbos A, Svedberg J, Bastiaans E, Debets AJ, Coustou V, Yvanne H, Clavé C, Saupe SJ, Johannesson H. 2019. Combinations of Spok genes create multiple meiotic drivers in Podospora. *Elife* 8. doi:10.7554/eLife.46454
- Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Patel TP, Tanik SA, Riddle DM, Stieber A, Meaney DF, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. 2011. Exogenous α-Synuclein Fibrils Induce Lewy Body Pathology Leading to Synaptic Dysfunction and Neuron Death. *Neuron* **72**:57–71. doi:10.1016/j.neuron.2011.08.033
- Walker LC, Jucker M. 2015. Neurodegenerative Diseases: Expanding the Prion Concept. *Annual Review of Neuroscience* **38**:87–103. doi:10.1146/annurev-neuro-071714-033828
- Wang H, Sun L, Su L, Rizo J, Liu L, Wang L-F, Wang F-S, Wang X. 2014. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Mol Cell* 54:133–146. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.003
- Wang J, Chai J. 2020. Structural Insights into the Plant Immune Receptors PRRs and NLRs. *Plant Physiol* **182**:1566–1581. doi:10.1104/pp.19.01252
- Wang Jizong, Hu M, Wang Jia, Qi J, Han Z, Wang G, Qi Y, Wang H-W, Zhou J-M, Chai J. 2019. Reconstitution and structure of a plant NLR resistosome conferring immunity. *Science* **364**:eaav5870. doi:10.1126/science.aav5870
- Wasmer C, Lange A, Van Melckebeke H, Siemer AB, Riek R, Meier BH. 2008. Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core. *Science* **319**:1523–1526. doi:10.1126/science.1151839
- Wasmer C, Zimmer A, Sabaté R, Soragni A, Saupe SJ, Ritter C, Meier BH. 2010. Structural similarity between the prion domain of HET-s and a homologue can explain amyloid cross-seeding in spite of limited sequence identity. J Mol Biol 402:311–325. doi:10.1016/j.jmb.2010.06.053
- Watt B, van Niel G, Raposo G, Marks MS. 2013. PMEL: a pigment cell-specific model for functional amyloid formation. *Pigment Cell & Melanoma Research* **26**:300–315. doi:10.1111/pcmr.12067
- Whelly S, Johnson S, Powell J, Borchardt C, Hastert MC, Cornwall GA. 2012. Nonpathological extracellular amyloid is present during normal epididymal sperm maturation. *PLoS ONE* **7**:e36394. doi:10.1371/journal.pone.0036394
- Whelly S, Muthusubramanian A, Powell J, Johnson S, Hastert MC, Cornwall GA. 2016. Cystatin-related epididymal spermatogenic subgroup members are part of an amyloid matrix and associated with extracellular vesicles in the mouse epididymal lumen. *Mol Hum Reprod* **22**:729–744. doi:10.1093/molehr/gaw049
- Wickner R. 1994. [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in Saccharomyces cerevisiae. *Science* **264**:566–569. doi:10.1126/science.7909170
- Wickner RB. 2016. Yeast and Fungal Prions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **8**:a023531. doi:10.1101/cshperspect.a023531
- Wickner RB, Edskes HK, Bateman DA, Kelly AC, Gorkovskiy A, Dayani Y, Zhou A. 2013. Amyloids and Yeast Prion Biology. *Biochemistry* **52**:1514–1527. doi:10.1021/bi301686a
- Wickner RB, Edskes HK, Gorkovskiy A, Bezsonov EE, Stroobant EE. 2016. Chapter Four Yeast and Fungal Prions: Amyloid-Handling Systems, Amyloid Structure, and Prion Biology In: Friedmann T, Dunlap JC, Goodwin SF, editors. Advances in Genetics. Academic Press. pp. 191–236. doi:10.1016/bs.adgen.2015.12.003
- Wickner RB, Edskes HK, Son M, Bezsonov EE, DeWilde M, Ducatez M. 2018. Yeast Prions Compared to Functional Prions and Amyloids. *Journal of Molecular Biology* **430**:3707–3719. doi:10.1016/j.jmb.2018.04.022
- Wickner RB, Shewmaker FP, Bateman DA, Edskes HK, Gorkovskiy A, Dayani Y, Bezsonov EE. 2015. Yeast Prions: Structure, Biology, and Prion-Handling Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **79**:1–17. doi:10.1128/MMBR.00041-14
- Wickner RB, Taylor KL, Edskes HK, Maddelein ML, Moriyama H, Roberts BT. 1999. Prions in Saccharomyces and Podospora spp.: protein-based inheritance. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:844–861, table of contents.
- Will R., Ironside J., Zeidler M, Estibeiro K, Cousens S., Smith P., Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A. 1996. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *The Lancet* **347**:921–925. doi:10.1016/S0140-6736(96)91412-9
- Wolf FA. 1912. Spore formation in Podospora anserina (Rahb.) Winter. Ann Myc 10–60.

- Wortmann SB, Vaz FM, Gardeitchik T, Vissers LELM, Renkema GH, Schuurs-Hoeijmakers JHM, Kulik W, Lammens M, Christin C, Kluijtmans LAJ, Rodenburg RJ, Nijtmans LGJ, Grünewald A, Klein C, Gerhold JM, Kozicz T, van Hasselt PM, Harakalova M, Kloosterman W, Barić I, Pronicka E, Ucar SK, Naess K, Singhal KK, Krumina Z, Gilissen C, van Bokhoven H, Veltman JA, Smeitink JAM, Lefeber DJ, Spelbrink JN, Wevers RA, Morava E, de Brouwer APM. 2012. Mutations in the phospholipid remodeling gene SERAC1 impair mitochondrial function and intracellular cholesterol trafficking and cause dystonia and deafness. *Nature Genetics* 44:797–802. doi:10.1038/ng.2325
- Wu B, Peisley A, Richards C, Yao H, Zeng X, Lin C, Chu F, Walz T, Hur S. 2013. Structural Basis for dsRNA Recognition, Filament Formation, and Antiviral Signal Activation by MDA5. *Cell* **152**:276–289. doi:10.1016/j.cell.2012.11.048
- Wu B, Peisley A, Tetrault D, Li Z, Egelman EH, Magor KE, Walz T, Penczek PA, Hur S. 2014. Molecular Imprinting as a Signal-Activation Mechanism of the Viral RNA Sensor RIG-I. *Molecular Cell* 55:511–523. doi:10.1016/j.molcel.2014.06.010
- Wu H. 2013. Higher-order assemblies in a new paradigm of signal transduction. *Cell* **153**:287–292. doi:10.1016/j.cell.2013.03.013
- Wu J, Saupe SJ, Glass NL. 1998. Evidence for balancing selection operating at the het-c heterokaryon incompatibility locus in a group of filamentous fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:12398–12403. doi:10.1073/pnas.95.21.12398
- Xia S, Hollingsworth LR, Wu H. 2020. Mechanism and Regulation of Gasdermin-Mediated Cell Death. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **12**:a036400. doi:10.1101/cshperspect.a036400
- Xu H, He X, Zheng H, Huang LJ, Hou F, Yu Z, de la Cruz MJ, Borkowski B, Zhang X, Chen ZJ, Jiang Q-X. 2014. Structural basis for the prion-like MAVS filaments in antiviral innate immunity. *eLife* **3**. doi:10.7554/eLife.01489
- Xu L-G, Wang Y-Y, Han K-J, Li L-Y, Zhai Z, Shu H-B. 2005. VISA Is an Adapter Protein Required for Virus-Triggered IFN-β Signaling. *Molecular Cell* **19**:727–740. doi:10.1016/j.molcel.2005.08.014
- Yagüe P, Manteca A, Simon A, Diaz-Garcia ME, Sanchez J. 2010. New method for monitoring programmed cell death and differentiation in submerged Streptomyces cultures. *Appl Environ Microbiol* **76**:3401–3404. doi:10.1128/AEM.00120-10
- Yang J, Zhao Y, Shi J, Shao F. 2013. Human NAIP and mouse NAIP1 recognize bacterial type III secretion needle protein for inflammasome activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**:14408–14413. doi:10.1073/pnas.1306376110
- Yang X, Lin G, Han Z, Chai J. 2019. Structural Biology of NOD-Like Receptors In: Jin T, Yin Q, editors. Structural Immunology. Singapore: Springer Singapore. pp. 119–141. doi:10.1007/978-981-13-9367-9_6
- Yin Q, Fu T-M, Li J, Wu H. 2015. Structural biology of innate immunity. *Annu Rev Immunol* **33**:393–416. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112258
- Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunology* 5:730–737. doi:10.1038/ni1087
- Yuan S, Akey CW. 2013. Apoptosome structure, assembly and procaspase activation. *Structure* **21**:501–515. doi:10.1016/j.str.2013.02.024
- Zeng W, Sun L, Jiang X, Chen X, Hou F, Adhikari A, Xu M, Chen ZJ. 2010. Reconstitution of the RIG-I Pathway Reveals a Signaling Role of Unanchored Polyubiquitin Chains in Innate Immunity. *Cell* **141**:315–330. doi:10.1016/j.cell.2010.03.029
- Zhang L, Chen S, Ruan J, Wu J, Tong AB, Yin Q, Li Y, David L, Lu A, Wang WL, Marks C, Ouyang Q, Zhang X, Mao Y, Wu H. 2015. Cryo-EM structure of the activated NAIP2-NLRC4 inflammasome reveals nucleated polymerization. *Science* **350**:404–409. doi:10.1126/science.aac5789
- Zhao Y, Yang J, Shi J, Gong Y-N, Lu Q, Xu H, Liu L, Shao F. 2011. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* **477**:596–600. doi:10.1038/nature10510
- Zhong Y, Cheng Z-M. 2016. A unique RPW8-encoding class of genes that originated in early land plants and evolved through domain fission, fusion, and duplication. *Scientific Reports* **6**. doi:10.1038/srep32923
- Zhou M, Li Y, Hu Q, Bai X, Huang W, Yan C, Scheres SHW, Shi Y. 2015. Atomic structure of the apoptosome: mechanism of cytochrome *c* and dATP-mediated activation of Apaf-1. *Genes & Development* **29**:2349–2361. doi:10.1101/gad.272278.115
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. 1997. Apaf-1, a Human Protein Homologous to C. elegans CED-4, Participates in Cytochrome c–Dependent Activation of Caspase-3. *Cell* **90**:405–413. doi:10.1016/S0092-8674(00)80501-2

Études de motifs de signalisation amyloïde des bactéries aux champignons filamenteux

Résumé :

Une grande variété de voies de signalisation impliquées dans les défenses de l'hôte sont basées sur des mécanismes de transduction du signal de type prion et mettent en jeu des complexes oligomériques appelés signalosomes. Certaines voies utilisant la transmission d'un repliement amyloïde à partir d'un récepteur de type Nod-like (NLR) vers un ou plusieurs effecteurs contrôlant des processus de mort cellulaire programmée ont été décrites chez les champignons filamenteux. Chez *Podospora anserina*, deux voies de ce type basées sur des motifs amyloïdes appelés HRAM étaient déjà connues. Dans ce travail nous avons caractérisé une troisième voie de signalisation amyloïde induisant la mort impliquant un NLR, PNT1, et un effecteur, HELLP, basé sur le motif amyloïde PP précédemment identifié chez *Chaetomium globosum*. Nous avons montré que le motif PP forme un prion nommé [π] capable de déclencher l'activité toxique de la protéine HELLP. Il n'y a aucune interaction croisée avec les deux autres voies de transduction du signal amyloïde de *P*. anserina, toutes sont indépendantes.

Il avait été suggéré sur la base d'homologie de séquences que les motifs PP seraient apparentés aux motifs RHIM trouvés dans les kinases RIPK1 et RIPK3 contrôlant la nécroptose chez les mammifères. Nous avons montré ici que les motifs RHIM humains se propagent sous forme de prions, appelés [Rhim], *in vivo* chez *P. anserina* et sont capables d'interagir partiellement avec les prions [π] démontrant ainsi une homologie fonctionnelle et probablement structurale au moins partielle entre ces motifs. Enfin, une recherche bioinformatique de motifs amyloïdes RHIM-like dans le règne du vivant a révélé la présence de tels motifs uniquement dans des bactéries filamenteuses dans des configurations géniques similaires à celles des systèmes de signalisation amyloïde fongiques (gènes adjacents NLR putative/effecteur). Ces motifs ont été regroupés en dix familles. Tous les motifs testés ont formé des prions *in vivo* chez *P. anserina*, certains interagissent partiellement avec les prions [π] et [Rhim], et les motifs des tandems NLR/effecteur cross-seed renforçant l'hypothèse de l'existence d'une signalisation amyloïde chez les procaryotes multicellulaires.

Tous ces résultats suggèrent une conservation évolutive de mécanismes de transduction du signal basé sur une transmission amyloïde associés à des processus de mort cellulaire programmée sur de très longues périodes allant des bactéries, aux champignons et jusqu'aux animaux.

Mots clés : prion, mort cellulaire programmée, signalisation amyloïde

Characterization of signaling amyloid motifs from bacteria to filamentous fungi

Abstract :

A large variety of signaling pathways with roles in host defense are based on prion-like signal transduction mechanisms involving oligomeric complexes termed signalosomes. Some of them using amyloid fold transmission from a Nod-like receptor (NLR) to one or several effectors controlling programmed cell death have been described in filamentous fungi. In *Podospora anserina*, two such pathways based on motifs termed HRAM were already known. In the present work, we characterized a third death inducing amyloid signaling pathway involving a NLR, PNT1, and an effector, HELLP, based on the PP amyloid motif previously identified in *Chaetomium globosum*. We showed that the PP motif forms a prion termed [π], which can trigger HELLP toxic activity. There is no cross-interaction with the two other *P. anserina* amyloid signaling pathways, they are all independent.

Based on sequence homologies, it was formerly outlined that PP-motif could be related to RHIM motifs found in RIPK1 and RIPK3 kinases controlling necroptosis in mammals. In this work, we showed that human RHIM motifs propagate as prions, termed [Rhim], *in vivo* in *P. anserina* and can partially cross-interact with $[\pi]$ prions therefore demonstrating at least a partial functional and probably structural homology between these motifs. Finally, bioinformatic studies aiming to find RHIM-like amyloid motifs in living organisms revealed the presence of such motifs uniquely in filamentous bacteria in genes layout similar to fungal amyloid signaling systems (adjacent genes encoding putative NLR/effector). These motifs were grouped in ten families. All the tested motifs formed prions *in vivo* in *P. anserina*, some of them partially interact with $[\pi]$ and [Rhim] prions, and the motifs of NLR/effector tandems cross seed reinforcing the hypothesis of amyloid signaling in Prokaryotes.

Altogether, these results suggest conservative evolution of amyloid based signal transduction associated to programmed cell death over very long period from bacteria to fungi and to mammals.

Keywords : prion, programmed cell death, amyloid signaling