Plos One Un rapide aperçu *(adaptation avec réorganisation des images augmentée d'encarts explicatifs supplémentaires ; P Bénit & P Rustin)*

Cette étude scientifique, qui porte sur les **SDHI**, les **I**nhibiteurs de la **S**uccinate **D**és**H**ydrogénase (la **SDH** ou complexe II, une enzyme des mitochondries, impliquée dans la respiration des cellules),

- Confirme, en l'étendant à 8 des SDHI utilisés en France, le caractère général de l'effet des SDHI : quelques soient les espèces où ont été testée les SDHI, la SDH a été inhibée ;
- Dévoile une cible nouvelle des SDHI de dernière génération, le complexe III ;
- Montre la toxicité des SDHI sur des cellules humaines en culture, toxicité masquée par les conditions utilisées dans les tests réglementaires;
- Montre la capacité des SDHI à induire un stress oxydatif dans les cellules humaines ;
- Souligne l'hypersensibilité des cellules de malades dont les mitochondries fonctionnent déjà mal soit du fait d'une maladie causée par un déficit partiel de la SDH, soit d'une maladie neurologique (ataxie de Friedreich) ou encore neurodégénératives (maladie d'Alzheimer)

Dans la conclusion, les auteurs soulignent que l'usage immodéré, préventif, de produits sans aucune spécificité comme les SDHI en font des candidats de premier plan dans la perte de biodiversité désormais constatée.

Ils indiquent également la menace que cet usage fait peser sur l'homme dans 10, 20 ans (délais d'expression des maladies mitochondriales) cela pour un bénéfice/ risque nullement établi.

Sensibilité de la chaîne respiratoire mitochondriale aux pesticides SDHI et conséquence sur les cellules humaines en culture

Paule Bénit[1], Agathe Kahn[1], Dominique Chrétien[1], Sylvie Bortoli[2], Laurence Huc[3], Manuel Schiff[1,4], Anne-Paule Gimenez-Roqueplo[5,6], Judith Favier[6], Pierre Gressens[1,4], Malgorzata Rak[1],

Pierre Rustin[1] *

[1]Université de Paris, NeuroDiderot, INSERM, F-75019 Paris, France.[2]Université de Paris, INSERM, UMR-S 1124, F-75006 Paris, France. [3]INRA UMR 1331 ToxAlim (Centre de recherche en toxicologie alimentaire), Université de Toulouse, ENVT, INP, UPS, 180 Chemin de Tournefeuille, F-31027, France. [4]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Robert Debré, Service de neurologie et maladies métaboliques, F-75019 Paris, France. [5]Université de Paris, PARCC, INSERM, Équipe Labellisée par la Ligue contre le Cancer, F-75015 Paris, France. [6]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Génétique, F-75015 Paris, France

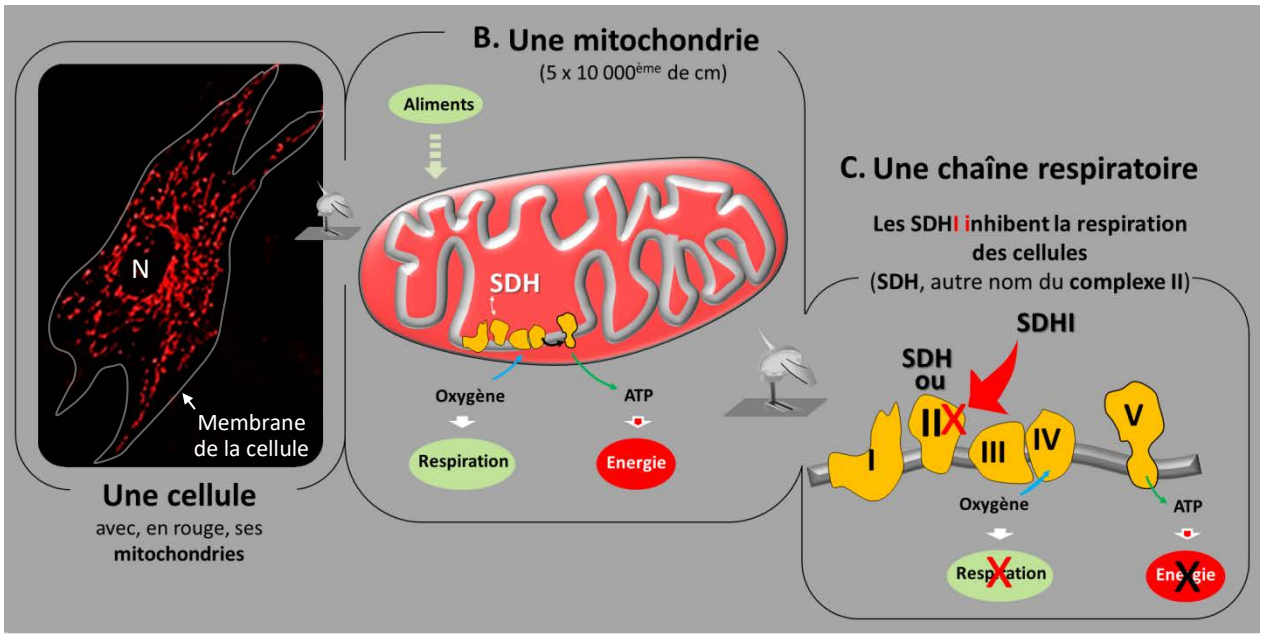
**Correspondance* : Pierre Rustin, Inserm UMR 1141, Bât. Bingen, Hôpital Robert Debré, 48 Boulevard Sérurier, 75019, Paris, France

Résumé

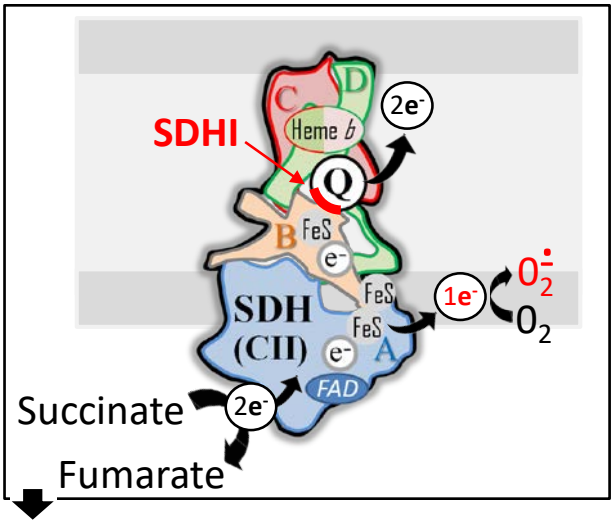
Les **I**nhibiteurs de la **S**uccinate **D**és**H**ydrogénase (**SDH**) (SDH**I**) sont utilisés dans le monde entier pour limiter la prolifération de moisissures sur les plantes et leurs produits. Toutefois, la SDH, également appelé complexe II de la chaîne respiratoire, est un composant universel des mitochondries qui sont présentes dans quasi tous les organismes vivants. La SDH est restée particulièrement conservée au cours de l'évolution, et l'on peut légitimement s'interroger sur la spécificité des SDHI vis-à-vis des seules moisissures. Ici, nous établissons d'abord que la SDH de l'homme, de l'abeille domestique, du ver de terre et des champignons sont toutes sensibles aux huit SDHI testés, avec toutefois des valeurs d'IC_{50} variables, généralement de l'ordre du micro-molaire. Nous avons ensuite observé que cinq des SDHI, principalement de la dernière génération, inhibent, outre la SDH, l'activité du complexe III de la chaîne respiratoire. Puis, nous montrons que le glucose présent dans les milieux de culture cellulaire masque totalement l'effet délétère des SDHI. En effet, le glucose métabolisé par la glycolyse va fournir suffisamment d'ATP et de pouvoir réducteur (NADPH) pour les enzymes antioxydantes et ainsi permettre la croissance de cellules déficientes en chaîne respiratoire. En revanche, lorsque la glutamine est la principale source de carbone au lieu du glucose, la présence de SDHI entraîne une mort cellulaire dépendante du temps. Ce processus est considérablement accéléré pour des fibroblastes provenant de patients atteints de maladies neurologiques ou neurodégénératives dues à une altération de la chaîne respiratoire (encéphalopathie due à un déficit partiel de SDH) et/ou à une hypersensibilité aux stress oxydatifs (ataxie de Friedreich, forme héréditaire de la maladie d'Alzheimer).

Introduction

La succinate déshydrogénase (SDH; EC 1.3.5.1), également appelée complexe II (CII) de la chaîne de transport d'électrons, est un composant universel et clé de la chaîne respiratoire mitochondriale de tous les organismes vivants (encadrés 1) [1]. Cette protéine transfère les électrons issus de l'oxydation du succinate en fumarate à un pool dédié d'ubiquinone, cela sans extrusion concomitante de protons. Le complexe SDH est composé de quatre protéines (SDHA-D) largement conservées au cours de l'évolution (encadré 2) [2]. Dans le cycle de Krebs (Fig 1 et Fig 1 suppl), la SDH est la seule enzyme des mitochondries à ne pas avoir d'équivalent dans aucun autre compartiment cellulaire ni de cofacteur rédox soluble, tel que NAD+/NADH, qui puisse être éventuellement compensée par l'activité d'autres déshydrogénases; ainsi, la SDH est unique



Encadré 1. ***A : Une cellule*** *avec son noyau* ***(N)*** *et ses mitochondries ;* ***B : une mitochondrie*** *et ses deux membranes* ***; C : la chaîne respiratoire*** *et ses 5 complexes dont le complexe II ou succinate déshydrogénase*



Encadré 2. ***La Succinate déshydrogénase*** *(formée de 4 protéines A-D) extrait 2 électrons du succinate qui est transformé en fumarate. Les électrons sont cédés 1 par 1 jusqu'à l'ubiquinone (Q) où ils forment de nouveau une paire (2 e-). Lorsqu'ils sont monovalent (1 e-) les transporteurs - en particuliers les centres Fer-Soufre (FeS) réagissent vite avec l'oxygène (O2) pour donner des superoxydes (O2-*), très dangereux.*

et irremplaçable dans le métabolisme cellulaire et mitochondrial (Fig 1 et Fig 1 suppl). En conséquence, tout blocage, même partiel, de l'activité de la SDH peut entraîner des modifications du métabolome cellulaire (l'ensemble des métabolites) et avoir des conséquences néfastes pour la cellule [3]. Associée à son rôle dans le transfert d'électrons, l'enzyme est également caractérisée dans la chaîne respiratoire par des réactions impliquant un électron dans ses centres fer-soufre (FeS), ce qui peut donner lieu à la génération de superoxydes délétères, en particulier en présence d'inhibiteurs en aval de la SDH (encadré 2) [4, 5,6].

Chez l'homme, des mutations dans les gènes codant pour la SDH conduisent à des déficits plus ou moins prononcés de l'activité de la SDH donnant lieu à un large spectre de maladies avec des atteintes neurologiques fréquentes [3]. L'abolition complète de l'activité SDH entraîne une modification profonde du métabolome, du transcriptome et de l'épigénome, ainsi que le développement de diverses tumeurs et cancers [3,7]. De manière générale, un dysfonctionnement mitochondrial est désormais reconnu comme un facteur pouvant être à l'origine, ou contribuer à, de multiples affections humaines, y compris aux principales maladies neurodégénératives [8]. Ceci correspond au rôle des mitochondries dans la libération d'énergie sous forme de chaleur ou d'ATP [9], dans la régulation du métabolisme cellulaire [10,11], dans l'homéostasie énergétique

[12], dans la réponse au stress [13] et dans le destin des cellules [14].

Ciblant la SDH, les SDHI sont maintenant largement utilisés dans l'agriculture à travers le monde pour lutter contre la prolifération des moisissures [15]. Ces composés sont utilisés sur les cultures de céréales; pour la conservation des fruits, des légumes et des graines, pour l'entretien des pelouses des terrains de sport et des golfs. Toutefois, en raison de la fonction quasi universelle de la SDH dans la respiration cellulaire et le métabolisme mitochondrial, on peut supposer que tout organisme vivant exposé à ces substances pourrait également être affecté. De fait, l'exposition aux SDHI sur les organismes non ciblés pourrait se révéler un problème majeur, et parmi d'autres facteurs, jouer un rôle capital dans la perte de biodiversité déjà constatable dans une grande partie du monde. De tels effets vont dépendre de la sensibilité de la SDH aux SDHI, qui peut varier légèrement en fonction des SDHI et des espèces. Le moment, la fréquence, la durée de l'exposition au SDHI, leur absorption et leur métabolisation ainsi que l'utilisation éventuelle de substances toxiques supplémentaires sont des facteurs évidents à prendre en compte, outre la dose proprement dite, bien souvent seule considérée (dose journalière admise ; DJA).

Le qualificatif de fongicides, associé aux SDHI, sous-entend un certain degré de spécificité vis-à-vis des moisissures. En réalité, cette prétendue spécificité, quasiment jamais évoquée, n'est pas confirmée dans les bases d'informations scientifiques. Seule donnée, l'action du prédécesseur des SDHI (la carboxine) a été montrée extrêmement violente sur les SDH d'autres espèces, y compris des mammifères [16]. Cette lacune nous a incité à étudier les effets de huit différents SDHI, y compris de la dernière génération de molécules, sur l'activité de la SDH. et, plus généralement, sur les activités de la chaîne respiratoire mitochondriale chez quatre espèces différentes: *Botrytis CInerea*, en tant qu'organisme cible, *Homo sapiens*, *Lumbricus terrestris* et *Apis mellifera*, toutes espèces non ciblées. Outre l'effet général, quoique variable, des SDHI testés sur les SDH de différentes espèces, nous avons observé que plusieurs des SDHI de dernière génération inhibaient également le complexe III (CIII) de la chaîne respiratoire en plus de la SDH (CII), indiquant la liaison potentielle de ces SDHI à d'autres sites de liaison des quinones dans la cellule. Nous avons finalement montré que, dans des conditions de culture non permissives pour les cellules déficientes en chaîne respiratoire, ces inhibiteurs altéraient et la croissance et, finalement, la survie des cellules humaines, lorsque celles-ci sont traitées avec des SDHI, probablement à cause du stress oxydatif engendré par ces SDHI.

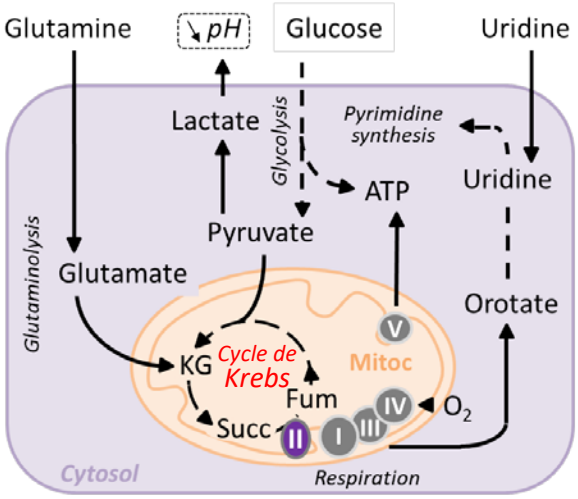


Figure 1. ***Une vue extrêmement synthétique de la place de la SDH (complexe II) dans le fonctionnement de la cellule.*** *I, II, III, IV, V : les différents complexes de la chaîne respiratoire de la mitochondrie (en jaune).*

Matériel et méthodes

Matériel biologique

Quatre types de matériels biologiques, à savoir le champignon *Botrytis cinerea*, l'abeille *Apis mellifera*, le ver de terre *Lumbricus terrestris*, et des cellules humaines en culture ont été utilisés pour tester l'effet des SDHI sur la chaîne respiratoire mitochondriale. Afin d'éviter toute interférence avec d'éventuelles activités contaminantes et de maintenir des conditions expérimentales similaires pour la mesure des activités de la chaîne respiratoire, différentes méthodes de préparation ont dû être utilisées pour les cellules en culture, les organismes entiers et les tissus [17].

Botrytis cinerea

La population mixte de *B. cinerea* utilisée dans cette étude a été gracieusement fournie par Joelle Dupont (Musée National d'Histoire Naturelle, Paris, France). Les conidies de *B. cinerea* ont été obtenues à partir d'une culture sur plaques de gélose additionnée de malt (15 à 30 jours). Des colonies mycéliennes ont été préparées, à partir de 10 colonies, en milieu liquide (10 g glucose, 2 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_47H_2O$, 1 g (NH_4) $2SO_4$, 2 g d'extrait de levure et de l'eau déionisée jusqu'à 1 l, pH 6,2). L'incubation a été réalisée à 23°C jusqu'à ce que les hyphes recouvrent totalement la surface de la bouteille. Les hyphes (disques de 9 cm de diamètre) ont été récoltés, lavés deux fois avec de l'eau distillée réfrigérée et enfin avec un milieu d'extraction des mitochondries contenant du Tris 20 mM (pH 7,2), du saccharose 0,25 M, du KCl 40 mM, de l'EGTA 2 mM, 1 mg/ml BSA, sans cystéine. Les hyphes ont été suspendus dans 150 ml de milieu d'extraction, coupés en petits morceaux (1 cm^2), puis homogénéisés à grande vitesse pour 1x2 sec et à basse vitesse pour 2x3 sec à l'aide d'un mixeur MultiMoulinex (Moulinex, France). L'homogénat a ensuite été filtré à travers deux couches de tissu de nylon (mailles 150 µm). Le tissu a été lavé avec 50 ml de milieu d'extraction. Après centrifugation à basse vitesse (700 *g* x 15 min), les mitochondries ont été recueillies à 10 000 *g* x 20 min. Le culot a été remis en suspension dans 250 µl de milieu d'extraction (aliquotes ±30 µl) et maintenu congelé à -80°C.

Apis mellifera

Les abeilles (*Apis mellifera* ; n=5) ont été amicalement offertes par Jacques Kemp (apiculteur; Saint-Rémy-lès-Chevreuse, Yvelines, France). Les corps entiers, congelés au contact de glace carbonique, à l'exception des têtes, ont été homogénéisés à l'aide d'un Potter-Elvehjem en verre de 1 ml dans un milieu glacé constitué de Tris 20 mM (pH 7,2), saccharose 0,25 M, KCl 40 mM, 2 mM EGTA, 1 mg/ml de BSA. L'homogénat a été centrifugé à 1500 *g* x 5 min. Les mitochondries contenues dans le surnageant ont été centrifugées à 10 000 *g* x 10 min. Le culot de mitochondries brutes a été aliquoté (±20 µl) et maintenus congelées à -80°C.

Lumbricus terrestris

Des lombrics, *Lumbricus terrestris* ont été collectés (n=5) dans un compost domestique à Epernon (France 28230) et identifiés par la lombricultrice (Paule Bénit) chargée de ce compost. Avant utilisation, les vers ont été lavés 5 fois avec une solution 1x de phosphate salin, tamponnée. Un homogénat frais a été préparé à partir des segments situés entre le prostomium et le clitellum des 5 individus. Les tissus ont été placés dans 500 µl d'un milieu glacé constitué de Tris 20 mM (pH 7,2), de saccharose 0,25 M, de KCl 40 mM, d'EGTA 2 mM et de 1 mg/ml de BSA, et homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur Potter-Elvehjem en verre de 1 ml. Une centrifugation à basse vitesse à 1500 *g* x 5 min a permis d'éliminer les débris lourds. Le surnageant a été distribué en aliquotes de 50 µl et maintenu congelé à -80°C.

Cultures de fibroblastes humains et cellules HEK

Les fibroblastes cutanés sont issus de biopsies de l'avant-bras obtenues avec le consentement éclairé de contrôles sains et de trois patients présentant soit une encéphalopathie due à un déficit en SDH, soit une ataxie de Friedreich (FRDA), soit une maladie familiale d'Alzheimer (FAD). Le patient déficitaire en SDH présentait un syndrome de Leigh résultant d'une mutation homozygote de la sous-unité flavoprotéique de la SDH (mutation R554W de la SDHA) (encadré 2) [18]. Les fibroblastes FRDA provenaient d'une patiente présentant une longue expansion bi allélique de triplets GAA (> 2,6 kb) dans le gène de la frataxine (FXN) (patient FRDA4 ; [19]). Cette expansion entraîne l'inactivation des gènes FXN et PIP5K1B [20]. La perte de fonction de pip5k1β entraîne une diminution des niveaux de PI(4,5)P2. Ceci résulte en une déstabilisation du réseau d'actine et une altération de la signalisation de la superoxyde dismutase (SOD) par la voie Keap1-Nrf2 [19,21] et finalement l'incapacité d'éliminer normalement les superoxydes [21,22]. Les fibroblastes FAD proviennent d'un patient de sexe masculin cliniquement affecté par le syndrome FAD (origine Coriell Institute; AG08064). Ces fibroblastes FAD présentent également des anomalies dans la voie Nrf2 contrôlant la signalisation de la SOD [23] et

sont aussi très sensibles aux agressions oxydatives [24,25].

Les cellules ont été cultivées dans des flacons T75 en utilisant 10 ml de milieu DMEM contenant 1 ou 4,5 g/l de glucose, 4 mM de glutamine (Glutamax; Gibco Thermo Fisher Scientific, MA), 2 mM de pyruvate et 200 µM d'uridine (ci-après dénommé milieu permissif GlucoMax) ou sans glucose, pyruvate et uridine, mais contenant 4 mM de glutamine (ci-après dénommé milieu non permissif MitoMax ; tableau 1). Tous les milieux ont été supplémentés avec du sérum de veau fœtal 10% et 100 U/mL de pénicilline et de streptomycine. Les cellules rénales embryonnaires humaines HEK293 ont été cultivées dans du DMEM contenant 4,5 g/l de glucose, 4 mM de glutamine, 10% de sérum de veau fœtal, 200 µM d'uridine, 2 mM de pyruvate et 100 U/mL de pénicilline et de streptomycine [9]. Les culots cellulaires (1500 *g* x 5 min) ont été conservés congelés (-80°C) et, pour les études biochimiques, les cellules ont été perméabilisés par deux cycles de congélation-décongélation avant les dosages enzymatiques (Bénit et al. 2006).

Pour tester l'action des SDHI sur les fibroblastes cutanés en croissance, des cellules ont été ensemencées dans des boites (4 x 75 cm^2; (confluence entre 20 et 25%) contenant du milieu GlucoMax (tableau 1). Après avoir laissé la culture reposer pendant une nuit, le milieu a été remplacé par les conditions souhaitées, à savoir le milieu GlucoMax ou le milieu MitoMax, complété par la quantité choisie de SDHI (conditions contrôles compensées pour le DMSO amené par la solution de SDHI; soit 14 mM au maximum). Le nombre de cellules a été estimé à partir d'images aléatoires (programme de traitement ImageJ) sans changer de milieu pendant 15 à 20 jours (une exposition à une dose unique de SDHI).

Mesures enzymatiques et effets potentiels des SDHI

Les activités des enzymes de la chaîne respiratoire ont été mesurées par spectrophotométrie à l'aide d'un spectrophotomètre à pseudo-double longueur d'onde (Cary 60, Agilent). La succinate quinone dichlorophénolindophénol (DCPIP) réductase (SQDR) sensible au malonate, une mesure de l'activité de l'enzyme SDH isolée (CII isolée) et de la glycérol-3-phosphate quinone DCPIP réductase (GQDR), mesurant l'activité de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase isolée (G3PDH) ont été dosées comme décrit précédemment [17]. Pour étudier l'effet des SDHI sur la chaîne respiratoire, nous avons dû prendre en compte le fait que ces inhibiteurs agissent en se liant aux sites de liaison des quinones sur les complexes de la chaîne respiratoire. En conséquence, nous avons observé que l'amplitude des effets inhibiteurs de ces substances variait avec l'addition de quinones exogènes (Fig 2). Lorsque cela était possible, les effets potentiels des SDHI sur les enzymes ont donc été étudiés dans des conditions expérimentales ne nécessitant pas l'ajout de quinones exogènes. Dans ce but, nous avons mesuré la succinate cytochrome *c* réductase sensible au malonate (SDH + CIII), la glycérol-3-phosphate cytochrome *c* réductase (G3PDH + CIII) et la decylubiquinol cytochrome *c* réductase sensible à l'antimycine (CIII) comme décrit précédemment [26]. Les effets de huit différents SDHI ont été étudiés, à savoir le flutolanil, le fluopyram, le boscalid, le fluxapyroxad, le penflufen, le penthiopyrad, l'isopyrazam et le bixafen (Fig 3), qui sont tous connus pour se lier au site de liaison des quinones de la SDH (S3 Fig). Enfin, comme le DMSO, le solvant utilisé pour les SDHI et les quinones, tend à réduire l'activité de la plupart des enzymes de la chaîne respiratoire, il a été ajouté dans les conditions contrôles pour

Tableau 1. **Milieux de culture permissifs GlucoMax et non permissifs MitoMax** pour les cellules humaines déficientes en chaîne respiratoire mitochondriale.

GlucoMax		**MitoMax**
⇩		⇩
+	Dulbecco modified Eagle's minimum essential medium (DMEM)	+
+	Glucose 4.5 g/l	-
+	Glutamine 4 mM	+
+	Uridine 200 µM	-
+	Pyruvate 2 mM	-
+	Pénicilline 100 U/ml	+
+	Streptomycine 100 U/ml	+
+	Sérum de veau foetal 10%	+

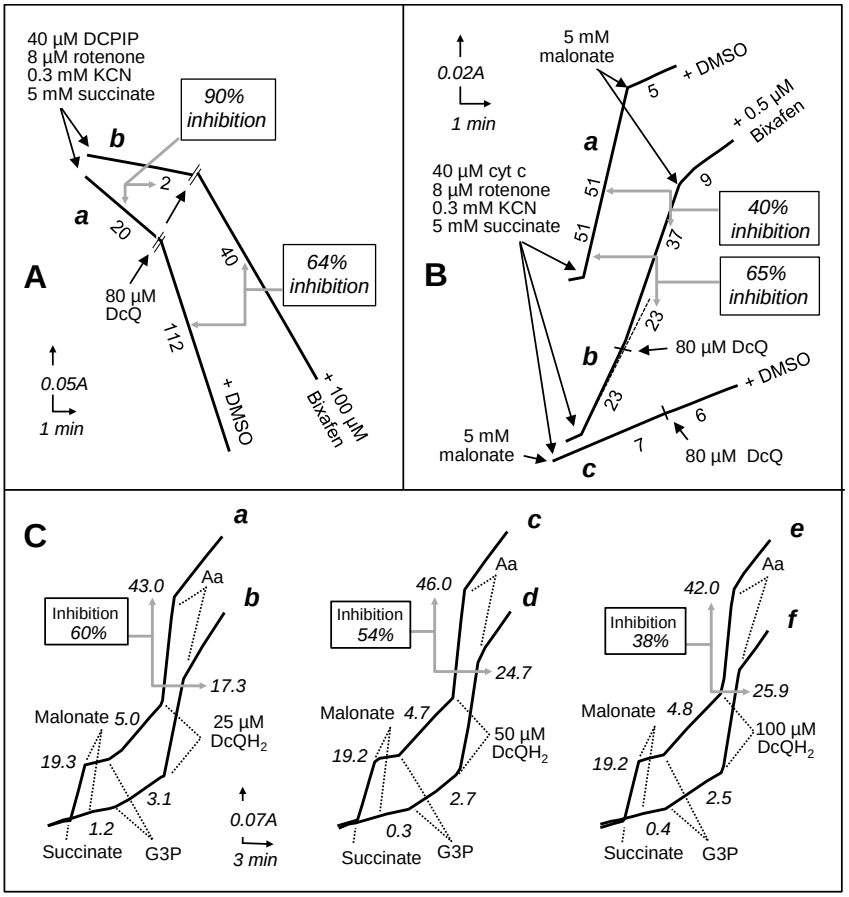


Figure 2. ***Effet d'un SDHI (bixafen) sur la chaîne respiratoire en fonction de la concentration en quinone (décylubiquinone, DcQ) oxydée (A,B) ou réduite (décylubiquinol, DcQH$_2$)***

A*, activité SDH de l'abeille mesurée par spectrophotométrie en suivant la réduction du DCPIP en présence de succinate et de quinones exogènes (SQDR). L'activité est mesurée avant et après l'ajout de décylubiquinone exogène (80 µM) en présence de bixafen (100 µM; trace b) ou de DMSO (trace a: condition témoin). Le pourcentage d'inhibition fait référence à l'effet du bixafen en l'absence ou en présence de décylubiquinone.* ***B****, la succinate cytochrome c réductase (SCCR) de cellules HEK congelées-décongelées mesurée en présence de DMSO (trace a; condition contrôle), de bixafen (trace b) ou de malonate (trace c). Le pourcentage d'inhibition correspond à l'effet du bixafen (0,5 µM) mesuré avant ou après l'addition de décylubiquinone (80 µM) sur la réduction du cytochrome c sensible au malonate.* ***C****, Modulation par le décylubiquinol de l'inhibition du complexe III par le SDHI. La séquence d'additions sélectionnée permet de mesurer la SCCR sensible au malonate, la glycérol-3-phosphate cytochrome c réductase (GCCR) et la décylubiquinol cytochrome c réductase sensible à l'antimycine (QCCR) des cellules HEK. L'effet du bixafen (20 µM; traces b, d, f) sur chacune des trois activités a été observé en comparant les vitesses à celles mesurées dans des conditions de contrôle (DMSO) et en présence de différentes quantités de décylubiquinol: 25 µM (a, b), 50 µM (c, d) et 100 µM (e, f). Le pourcentage d'inhibition fait référence à l'effet du bixafen sur la décylubiquinol cytochrome c réductase (CIII) sensible à l'antimycine. Aa, antimycine; DCPIP (dichlorophénolindophénol); DcQ et DcQH$_2$, les formes oxydée et réduite de la décylubiquinone, respectivement; G3P, glycérol-3-phosphate.*

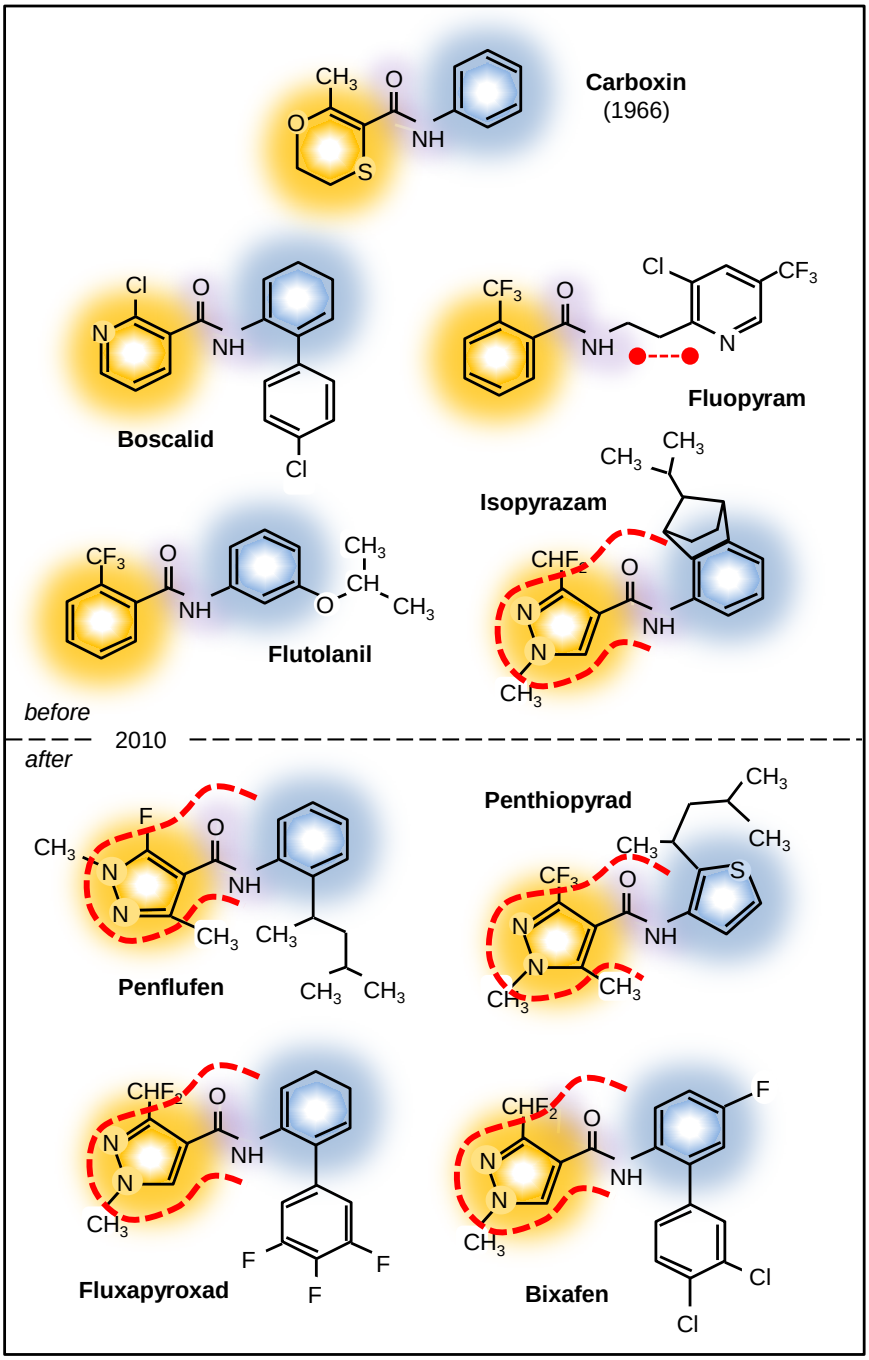


Figure. 3 ***Structure moléculaire des SDHI.*** *Les parties jaunes et bleues de chaque molécule rappellent la structure de la carboxine, premier des SDHI (en haut). Les lignes pointillées rouges soulignent le fragment méthyl-pyrazol présent dans les différents SDHI de génération récente qui inhibent également le complexe III de la chaîne respiratoire. Boscalid (DJA: 0,04 mg/kg/j) introduit en 2003 aux États-Unis par BASF, fluopyram (DJA: 0,012 mg/kg/j) en 2010 aux États-Unis par Bayer, flutolanil (0,09 mg/kg/j) dans 1981 aux États-Unis par Nichino America, penflufen (DJA: 0,04 mg/kg/j) en 2012 aux États-Unis par Bayer, isopyrazam (DJA: 0,03 mg/kg/j) en 2010 en Angleterre par Syngenta, penthiopyrad (DJA: 0.1 mg/kg/j) en 2011 aux États-Unis par Dupont-Fontelis, fluxapyroxad (DJA: 0,02 mg/kg/j) en 2011 en France par BASF, et bixafen (DJA: 0,02 mg/kg/j) en 2011 en Angleterre par Bayer. DJA; Dose Journalière Acceptable, conformément à la réglementation européenne.*

compenser le DMSO apporté avec les SDHI (toujours inférieure à 25 µl/ml, soit un maximum de 352 mM).

L'activité de la SOD totale a été mesurée dans des lysats de cellules congelés-décongelés remis en suspension dans du KH_2PO_4 50 mM (pH 7,8). L'activité a été déterminée en suivant l'autoxydation du pyrogallol à 420 nm et exprimée en UI/mg de protéine [27].

La concentration en protéines a été estimée à l'aide du dosage de Bradford.

Détermination des IC_{50} pour les SDHI

Les effets de huit SDHI différents (0-500 µM; Fig 3) ont été déterminés sur quatre matériels biologiques. Les valeurs d'IC_{50} étant affectées par l'activité absolue réelle de l'enzyme testée, les IC_{50} ont été quantifiées en utilisant des niveaux d'activités SDH approximativement similaires au cours du test. Les valeurs d'IC_{50} ont été déterminées à l'aide de l'outil de calcul AAT Bioquest IC_{50} (https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator).

Statistiques

Les données, moyennes ± écarts types, sont présentées pour toutes les expériences. La signification statistique a été calculée par test *t* standard non apparié ou par ANOVA unidirectionnelle avec correction post-test de Bonferroni pour plus de deux conditions. Un $p<0,05$ a été considéré statistiquement significatif (GraphPad Prism).

.

Résultats

Effets des SDHI sur la chaîne respiratoire mitochondriale

Nous avons déterminé les effets de huit différents SDHI sur les activités de la chaîne respiratoire mitochondriale dans des cellules HEK congelées-décongelées, des vers de terre, des abeilles domestiques et des champignons *B. cinerea* (Fig 4 et Tableau 2). Les valeurs d'IC_{50} des différents SDHI ont d'abord été estimées à partir de l'activité de la succinate cytochrome *c* réductase (SCCR) (Fig 2). Tous les SDHI testés se sont avérés exercer un effet inhibiteur sur la SDH, quelle que soit l'origine biologique de l'enzyme, bien qu'à des degrés divers. À titre de référence, la capacité des SDHI à bloquer l'activité de la SDH a été étudiée sur l'enzyme de *B. cinerea*, l'organisme cible. Elle varie en fonction des SDHI, le flutolanil présentant une inefficacité relative (Fig 4, tableau 2). La SDH montre une sensibilité très prononcée pour les SDHI de dernière génération, avec une IC_{50} inférieure à 0,1 µM pour l'enzyme fongique.

La SDH humaine se révèle relativement moins sensible au fluopyram (IC_{50}> 150 µM) qu'au flutolanil, au boscalid, au penthiopyrad et au fluxapyroxad (valeurs des IC_{50} comprises entre 18,6 et 2,1 µM). L'enzyme du ver de terre semble être particulièrement sensible au boscalid, au flutolanil et au fluxapyroxad, alors que l'enzyme de l'abeille domestique est plus sensible au flutolanil et au fluopyram que les enzymes d'autres organismes non ciblés. Les SDHI de dernière génération (Fig 3) sont particulièrement efficaces pour bloquer l'enzyme humaine. Les valeurs d'IC_{50} calculées pour le penflufen, l'isopyrazam et le bixafen sont toutes de l'ordre de 1 µM ou moins. Une variabilité similaire entre les effets des différents SDHI a été observée pour la SDH des vers de terre et des abeilles domestiques, qui présentaient respectivement une sensibilité similaire et plus élevée aux SDHI de dernière génération. Pour la plupart des SDHI, les valeurs des IC_{50} étaient plus basses pour l'enzyme de *B. cinerea*, à l'exception notable du flutolanil, qui se révèle particulièrement actif contre les enzymes du ver de terre et de l'abeille domestique. Fait troublant, l'étude de la sensibilité aux SDHI des enzymes SDH de seulement 4 espèces a suffi à révéler qu'au minimum une de ces espèces était très sensible à au moins l'une de ces SDHI (Fig 4).

Nous avons ensuite étudié l'effet des SDHI sur d'autres activités de la chaîne respiratoire dépendantes du coenzyme Q, telles que les activités de la glycérol-3-phosphate cytochrome *c* réductase (GCCR) et de l'ubiquinol cytochrome *c* réductase (QCCR), cette dernière reflétant l'activité complexe III (CIII). Il est intéressant de noter que l'isopyrazam et, de manière encore plus efficace, le bixafen inhibent également l'activité de la GCCR humain (IC_{50} 21,1 µM) (Tableau 2).

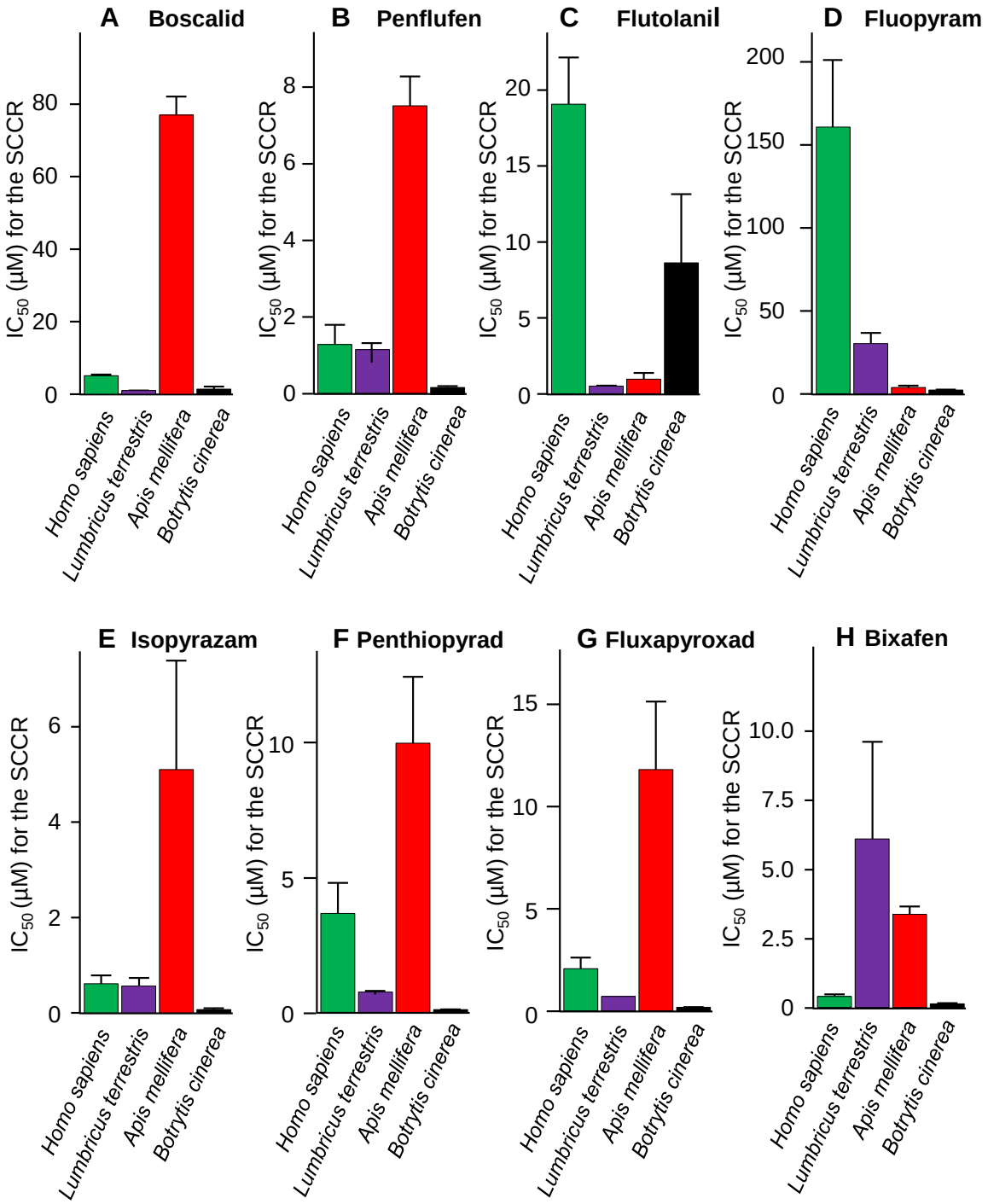


Figure 4. ***Valeurs des IC$_{50}$ des SDHI sur la succinate cytochrome c réductase (SCCR) d'****Homo sapiens****, de*** *Lombricus terrestris****, d'****Apis mellifera* ***et de*** *Botrytis cinerea****.***

A-H*, IC$_{50}$ (n≥3) :* ***boscalid (A)****, penflufen (B),* ***flutolanil (C)****, fluopyram (****D****), isopyrazam (****E****), penthiopyrad (****F****), fluxapyroxad (****G****) et bixafen (****H****) sur la SCCR d'H. sapiens (vert), L. terrestris (violet), A. mellifera (rouge) et B. cinerea (noir). Notez les différences dans les échelles Y. SCCR, succinate cytochrome c réductase.*

Tableau 2. **Effets inhibiteurs (valeurs IC_{50}) de huit SDHI sur les activités de la chaîne respiratoire de quatre espèces différentes**. SCCR, succinate cytochrome *c* réductase; GCCR, glycérol-3-phosphate cytochrome *c* réductase ; QCCR, quinol cytochrome *c* réductase.

	Homo sapiens	*Lumbricus terrestrix*.	*Apis mellifera*	*Botrytis cinerea*
Flutolanil	SCCR: 18.7±3.5 µM GCCR > 500 µM QCCR > 500 µM	SCCR: 0.36±0.02 µM GCCR: 450±70 µM QCCR > 500 µM	SCCR: 0.8±0.5 µM GCCR > 500 µM GCCR > 500 µM	SCCR: 8.6±4.5 µM GCCR > 500 µM QCCR > 500 µM
Fluopyram	SCCR 160±40 µM GCCR > 500 µM QCCR > 500 µM	SCCR 30.6±7.6 µM GCCR > 500 µM QCCR > 500 µM	SCCR 3.8±0.3 µM GCCR > 500 µM QCCR > 500 µM	SCCR 0.2±0.1 µM GCCR > 500 µM QCCR > 500 µM
Boscalid	SCCR 4.8±0.2 µM GCCR > 500 µM QCCR > 500 µM	SCCR 0.5±0.3 µM GCCR > 500 µM QCCR > 500 µM	SCCR 76.7±6.0 µM GCCR > 500 µM QCCR > 500 µM	SCCR 0.8±1.1 µM GCCR > 500 µM QCCR > 500 µM
Fluxapyroxad	SCCR 2.1±0.7 µM GCCR > 500 µM QCCR > 500 µM	SCCR 0.71±0.07 µM GCCR > 500 µM QCCR > 500 µM	SCCR 11.7±3.4 µM GCCR 205±34 µM QCCR 300±5 µM	SCCR 0.095±0.008 µM GCCR 60±56 µM QCCR 67±53 µM
Penflufen	SCCR 1.3±0.3 µM GCCR > 500 µM QCCR > 500 µM	SCCR 1.13±0.16 µM GCCR > 500 µM QCCR > 500 µM	SCCR 7.5±0.7 µM GCCR > 500 µM QCCR > 500 µM	SCCR 0.13±0.06 µM GCCR 80 ±57 µM QCCR 433±58 µM
Penthiopyrad	SCCR 3.7±1.1 µM GCCR 211±15 µM QCCR 349±72 µM	SCCR 0.70±0.01 µM GCCR 254±65 µM QCCR 297±4 µM	SCCR 10±2 µM GCCR 251±75 µM QCCR 268±44 µM	SCCR 0.045±0.023 µM GCCR 93.5±47 µM QCCR 105±7.1 µM
Isopyrazam	SCCR 0.63±0.18 µM GCCR 51.3±5.8 µM QCCR 125±35 µM	SCCR 0.46±0.17 µM GCCR 83±5 µM QCCR 76±21 µM	SCCR 5.1±2.3 µM GCCR 97±9 µM QCCR 87±18 µM	SCCR 0.023±0.004 µM GCCR 27.9±10.6 µM QCCR 14.2±5.6 µM
Bixafen	SCCR 0.34±0.12 µM GCCR 21.1±9.3 µM QCCR 15.5±13.4 µM	SCCR 6.0±3.6 µM GCCR 450±71 µM QCCR ≥ 500 µM	SCCR 3.3±0.33 µM GCCR 24.1±11.4 µM QCCR 5.7±5.3 µM	SCCR 0.07±0.06 µM GCCR 22.5±3.5 µM QCCR 22.2±14.4 µM

Dans nos conditions expérimentales, aucun effet inhibiteur du bixafen (jusqu'à 500 µM) n'a été détecté sur la glycérol 3-phosphate quinone-DCPIP réductase (non montrée), alors que la molécule inhibait fortement l'activité du CIII (IC_{50} 15,5 µM), bien que moins efficacement que la SCCR (IC_{50} 0,34 µM) (Tableau 2). L'effet des SDHI ne se limite pas au CIII humain et est également observé avec le fluxapyroxad, le penflufen, le penthiopyrad, l'isopyrazam et le bixafen sur le CIII de *Botrytis* et par le penthiopyram, l'isopyrazam et le bixafen sur le CIII des 4 espèces. Cet effet inhibiteur non rapporté de plusieurs SDHI sur le CIII est modulé par la quantité de quinones exogènes ($DcQH_2$) utilisée pour mesurer l'activité du CIII, avec une diminution de l'inhibition de 60 à 40% observée lors de l'augmentation du $DcQH_2$ de 25 à 100 µM (Fig 2). Notamment, comme l'ajout de quinones réduites (substrat de la réaction) est nécessaire pour mesurer le CIII, les valeurs des

IC_{50} mesurées pour le CIII ne sont qu'indicatives. Comme prévu, en cas d'inhibition du CIII et de manière similaire à la GCCR (tableau 2), l'activité de la NADH oxydase était également inhibée (non représentée), comme cela aurait été observé après un traitement à la roténone ou au paraquat (Fig 5).

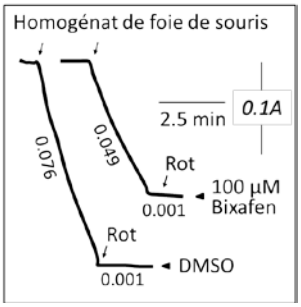


Figure 5. ***Le bixafen diminue l'oxydation du NADH par un homogénat de foie de souris.***

Le site de liaison des SDHI est hautement conservé au cours de l'évolution

Nous avons ensuite examiné les bases moléculaires qui pourraient rendre compte de l'effet non spécifique des SDHI sur la SDH des différentes espèces étudiées. Dans ce but, nous avons aligné

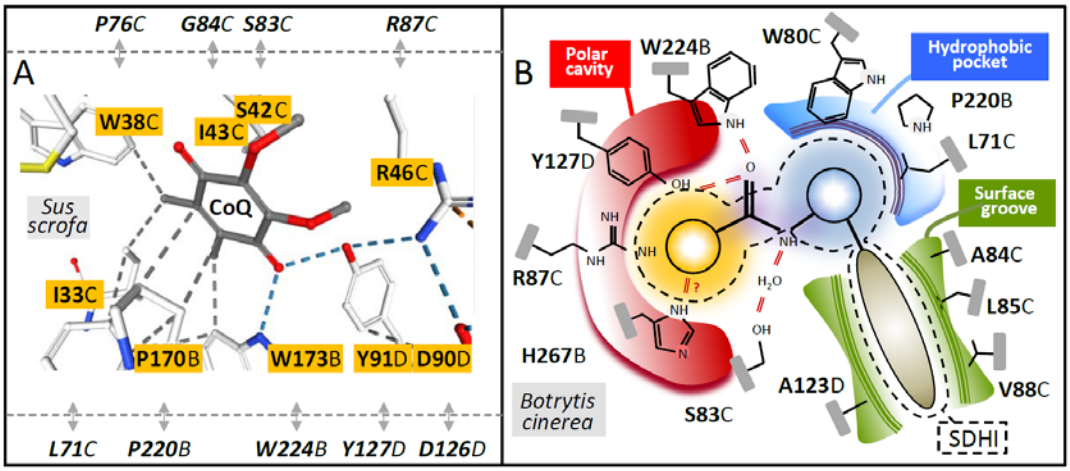


Figure 6. ***Les acides aminés impliqués dans le site de liaison des quinones (CoQ) à la SDH et les mutations conférant une résistance aux SDHI****.*

A*, Structure cristalline du site de liaison de l'ubiquinone (CoQ) à la SDH mitochondrial du cœur de porc (Sus scrofa) (EC 1.3.5.1), établie à partir des informations des archives de la banque de données sur les protéines. Les acides aminés sont numérotés en fonction de la séquence porcine (caractères latins), tandis que les caractères en italique situés en dehors de la figure correspondent à la numérotation de la séquence de Botrytis cinerea.* ***B****, Représentation schématique du site de liaison du CoQ_{10} (l'ubiquinone) de la SDH, comprenant certains des acides aminés censés favoriser la résistance des champignons aux SDHI (Sierotzki et Scalliet 2013). Encerclée par le pointillé, une représentation simplifiée des SDHI montre en jaune la partie des SDHI localisée dans la cavité polaire du site de liaison à l'ubiquinone de la SDH; la partie logée par la poche hydrophobe est représentée en bleu.*

les séquences d'acides aminés des trois sous-unités SDH (B, C, D) impliquées dans le site de liaison aux SDHI ou aux quinones de la SDH (Fig 6) en utilisant les séquences disponibles au NCBI de 22 organismes. En examinant les séquences de ces 22 organismes, sélectionnés pour la couverture qu'ils fournissent en termes d'évolution et/ou de sensibilité à l'exposition aux SDHI dans la nature, une idée assez précise peut être obtenue quant à la probabilité d'interaction des SDHI avec la SDH. Nous avons utilisé l'outil d'alignement Cobalt pour fournir une estimation de l'état de conservation de

chaque acide aminé [28]. Un examen général révèle un degré élevé de conservation d'une grande partie des séquences de la SDH parmi les 22 organismes, quelle que soit la sous-unité considérée (Fig 6 et fig 2 suppl.). Ce résultat est encore plus évident lorsqu'on limite la comparaison aux acides aminés connus pour jouer un rôle important dans l'interaction des quinones avec la SDH ou qui se sont révélés être la source de la résistance aux SDHI en cas de mutation [29] (S3 Fig). . Selon cette analyse (tableau 2), une identité de 100% parmi les 22 organismes a été observée pour plus de la moitié des 15 acides aminés considérés, alors que tous ces résidus sont annotés résidus conservés par l'outil Cobalt [28].

SDHI et viabilité des cellules humaines en culture

Etant donné l'effet spectaculaire des SDHI sur l'activité de la SDH humaine, nous avons ensuite évalué les effets de ces composés sur la viabilité de cellules humaines en culture (fibroblastes primaires de peau) (Figs 7, 8, et 9). Il est à noter que la demi-vie des SDHI, connus pour être extrêmement stables, dépasse des mois, ce qui réduit le nombre et la fréquence nécessaires à leur application sur les cultures (1 ou 2 par an selon les distributeurs). Nous avons précédemment démontré en utilisant des fibroblastes de patients affectés par un déficit de la chaîne respiratoire que la quantité de glucose utilisée dans des conditions de croissance standard (1 à 4,5 g/l) rend les fonctions mitochondriales non essentielles pour de longues durées [30]. De fait, nous avons observé que, malgré la présence de bixafen 1 µM, voire 20 µM, les cellules se développent activement pendant au moins 10 jours dans un milieu de culture contenant 1 g/l (5,5 mM) de glucose (Fig 7A, B, C). Un jaunissement accéléré du milieu GlucoMax a néanmoins été observé après 18 jours en présence de 20 µM bixafen, indiquant une acidification accrue probablement due à une accumulation anormale de lactate [31]. Cette accumulation lactique est l'une des conséquences délétère fréquemment observée chez les patients présentant des anomalies de la chaîne respiratoire mitochondriale et a été incriminée dans les dysfonctionnements cérébraux [32]. Il est à retenir qu'un changement régulier du milieu de culture cellulaire réduit artificiellement l'incidence de l'accumulation de lactate, comme celui résultant de l'effet des SDHI sur les cellules. Dans les cellules cultivées en présence de 20 µM bixafen, l'activité de la SCCR s'est avérée être inhibée à 80%, malgré deux lavages avec 10 ml de PBS, une trypsinisation (2 ml), puis 10 ml supplémentaires pour arrêter l'action de la trypsine le tout suivi d'une centrifugation cellulaire et d'un dernier lavage dans 50 ml de PBS. Simultanément, nous avons observé un doublement significatif de l'activité totale de la SOD après 13 jours de culture en présence de 1 µM bixafen ou 1 µM fluxapyroxad dans un milieu permissif (glucose 1 g/l) (Fig 8C). Une telle induction de l'activité de la SOD est connue pour refléter spécifiquement l'augmentation de la production de superoxydes [33]. Cette augmentation pourrait expliquer l'effet génotoxique du bixafen [34]. Elle peut intervenir en présence d'inhibiteurs de la SDH [6].

Les fibroblastes témoins ont ensuite été cultivés dans un milieu additionné de glutamine (4 mM) comme unique source de carbone (Fig 7 D-F). Dans ce milieu non-permissif (MitoMax), le métabolisme énergétique devient totalement dépendant de l'activité mitochondriale. Ceci permet de détecter un éventuel effet de l'inhibition de la SDH par le bixafen. Dans ces conditions, en utilisant 1 µM bixafen pendant 10 jours, nous avons observé une réduction significative du nombre de cellules, accompagnée de l'apparition de nombreuses cellules mortes (apparaissant en blanc au microscope optique). Une durée similaire (10 jours) d'exposition à 5 µM bixafen entraîne la mort de presque toutes les cellules (Fig 7 F).

Nous avons ensuite encore enrichi le milieu en glucose, pasant de 1 à 5 g/l, le rendant encore plus favorable à la croissance des cellules dont la chaîne respiratoire est déficiente et en ajoutant du

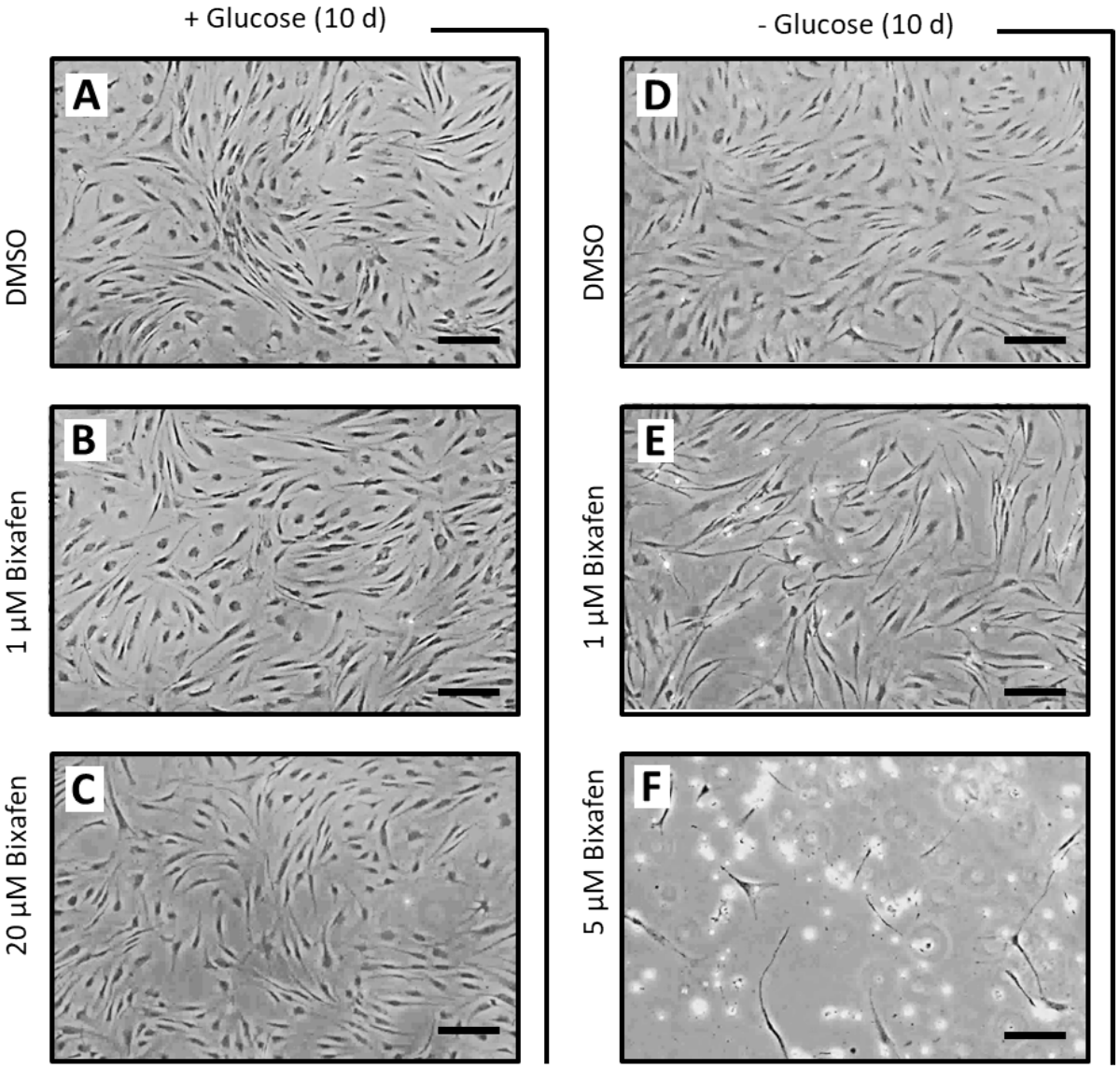


Figure 7. ***Masquées par le*** *glucose, les conséquences de l'inhibition de la SDH par les SDHI dans des cellules humaines en culture.*

A, D*, Fibroblastes témoins cultivés pendant dix jours en présence (****A****) ou en l'absence (****D****) de glucose, la glutamine étant l'unique source de carbone dans cette dernière condition. Le milieu de culture n'a pas été changé pendant la durée de l'expérience.* ***B, E,*** *Les cellules ont été cultivées pendant une durée similaire (dix jours) sans changer de milieu cette fois en présence de bixafen 1 µM. Notez la présence de nombreuses taches blanches en l'absence de glucose (****E****), tâches indicatrices de la présence de cellules mortes dans la culture.* ***C, F,*** *Malgré la présence de bixafen 20 µM, après 10 jours de culture, aucun signe de souffrance cellulaire n'a été observé en présence de glucose (****C****). Une expérience en miroir réalisée en l'absence de glucose (****F****) a entraîné une mort cellulaire massive avec une concentration de bixafen aussi faible que 5 µM. Sur chaque figure, la barre noire représente 200 µm.*

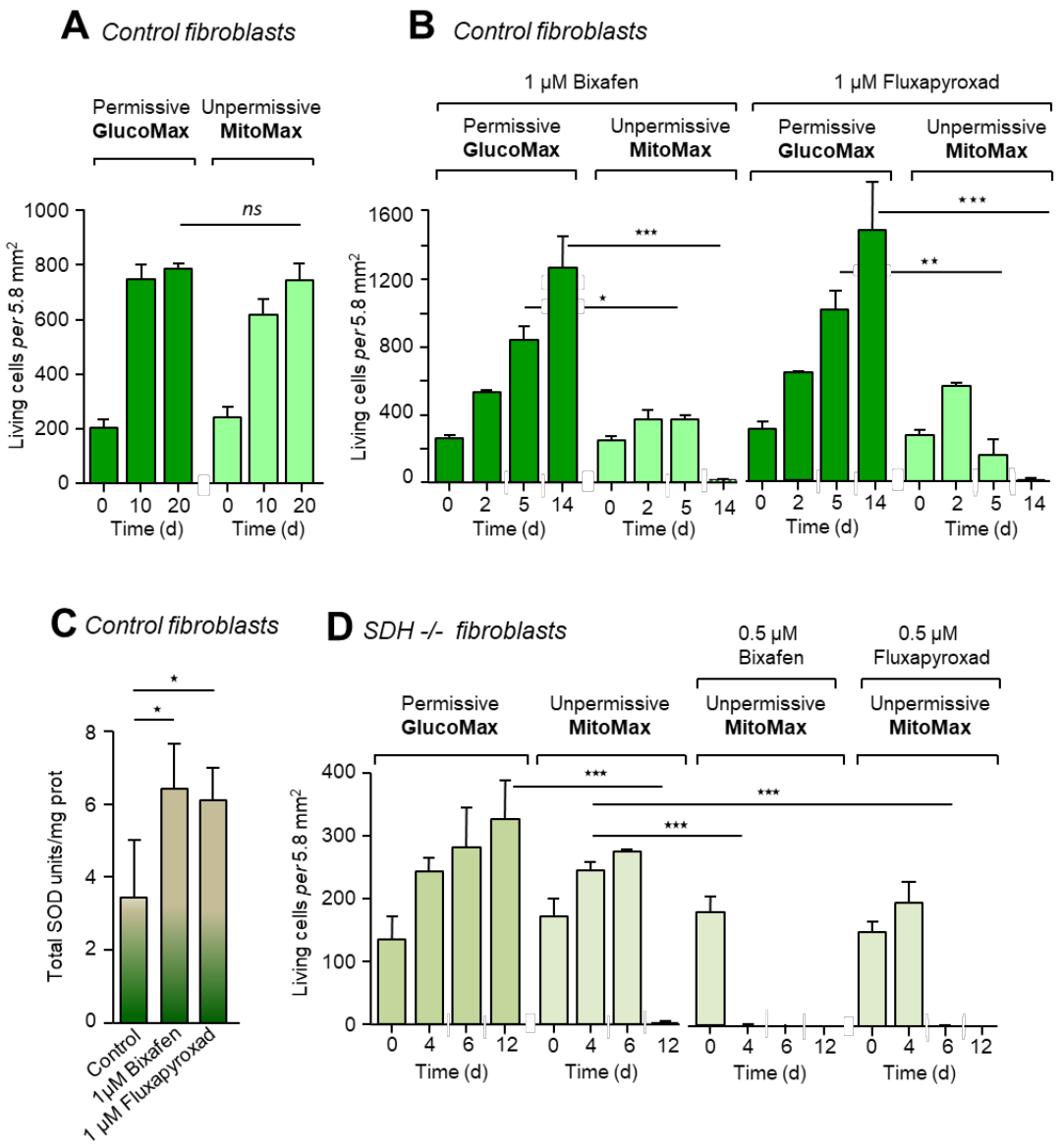


Figure 8. **Mortalité induite par les SDHI de cellules contrôles et de cellules déficientes en SDH dans les milieux permissifs GlucoMax et non permissifs MitoMax.**

A, *Cellules contrôle provenant de trois individus différents cultivées sur milieu GlucoMax ou MitoMax (voir le tableau S2). Outre le glucose (4,5 g/l ; hyperglycémique), le milieu permissif contient de la glutamine 4 mM, du pyruvate 2 mM et de l'uridine 200 µM, un acide aminé éventuellement en quantité insuffisante lorsqu'un défaut profond touche la partie terminale de la chaîne respiratoire (CIII ou CIV; S1 Fig) [35].* ***B****, SDHI (1 µM) ont été testés (n = 3) dans des milieux permissifs et non permissifs. Le bixafen et le fluxapyroxad ont tous deux entraîné une mort cellulaire massive après 14 jours de culture dans des conditions non permissives. Il est à noter que des tentatives similaires pour tester l'effet du boscalid à une concentration efficace (calculée à partir de la détermination de la* IC_{50} *sur la SDH humaine, Fig. 2) ont été vaines en raison de la formation d'un précipité dans le milieu de culture.* ***C****, Activité superoxyde dismutase de fibroblastes contrôles (n = 4) cultivés dans des conditions permissives (glucose 1 g/l) en l'absence (contrôle DMSO) ou en présence de bixafen 1 µM ou de fluxapyroxad 1 µM.* ***D****, effet du bixafen et du fluxapyroxad sur les fibroblastes présentant une activité résiduelle de 60% de la SDH [18]. En milieu non permissif, une mort cellulaire massive a été observée à 4 jours de culture en présence de bixafen à 0,5 µM et à 6 jours à la même concentration de fluxapyroxad. Il est à noter que la concentration en SDHI utilisée (0,5 µM) est inférieure à la DJA pour chacune de ces molécules (0,58 µM) (S2 Fig). Les milieux de culture n'ont pas été modifiés pendant la durée de l'expérience (n = 3).*

pyruvate à 2 mM et de l'uridine à 200 µM (milieu permissif, GlucoMax).) (Tableau 1). Lors de la culture dans ce milieu aussi favorable à la croissance de cellules déficientes en mitochondries, les fibroblastes peuvent faire face à la plupart des types de déficit ou d'inhibition de la chaîne respiratoire, y compris à des effets non spécifiques des SDHI ciblant le CIII. On notera que la croissance des fibroblastes contrôles est similaire dans le milieu GlucoMax et dans le milieu MitoMax, dépourvus de pyruvate et d'uridine mais contenant de la glutamine comme seule source de carbone (milieu exigeant des mitochondries actives) (Fig 8A). Comme attendu, la présence de bixafen n'affecte pas la croissance des cellules dans le milieu permissif GlucoMax. A l'opposé, le bixafen cause la mort de quasi toutes les cellules après 14 jours de culture dans le milieu MitoMax (Fig 8B, 9A). L'effet observé n'est pas limité au bixafen, qui inhibe à la fois la SDH (CII) et le CIII (Tableau 2). Il est également observé avec le fluxapyroxad, un autre SDHI de nouvelle génération (Fig 8B) qui n'inhibe pas le CIII dans les cellules humaines (tableau 2)

Les SDHI affectent particulièrement des cellules humaines dont les mitochondries sont défectueuses

Nous avons ensuite étudié l'effet des SDHI sur des fibroblastes cutanés en culture provenant de patients présentant des anomalies mitochondriales liées à un déficit partiel en SDH [18] ou à une hypersensibilité aux stress oxydatifs en raison d'une signalisation altérée de la superoxyde dismutase (SOD) du fait d'une translocation nucléaire défectueuse du facteur Nrf2 [21,23,36]. Le patient déficitaire en SDH présente un syndrome de Leigh [18] avec 60% d'activité SCCR résiduelle (1,8 ± 0,3 nmol/min/mg prot; contrôle 3,0 ± 0,3 nmol/min/mg prot, n=4) dans les fibroblastes. Nous avons d'abord comparé la croissance de ces cellules déficientes en SDH dans les milieux GlucoMax et MitoMax (Fig 8D). Dans le milieu MitoMax, la faible vitesse de croissance initiale est suivie par la mort cellulaire entraîne la perte des cellules en 12 jours. En présence de 0,5 µM bixafen, une perte cellulaire totale est observée après juste 4 jours de culture (Fig 4D). En présence de 0,5 µM fluxapyroxad, la mort cellulaire totale est observée après 6 jours.

Nous avons ensuite étudié l'effet du bixafen sur des fibroblastes connus pour leur hypersensibilité aux stress oxydatifs, fibroblastes provenant de patients atteints soit de FRDA [33] soit de FDA [24] [37] (Fig 9). Comparativement aux fibroblastes témoins (Fig 9A), les fibroblastes FRDA présentent une mort cellulaire accélérée, particulièrement marquée à la plus forte concentration de bixafen (1 µM) pour les cellules cultivées dans du milieu MitoMax (Fig 9B). Un phénomène identique, bien que moins marqué, a été observé pour les cellules FAD (Fig 9C). Après 4 jours de croissance dans le milieu MitoMax, ces cellules montrent une sensibilité à 1 µM de bixafen (Fig 9C), tandis que les cellules témoins (Fig 9A) sont restées parfaitement viables. Ainsi, une anomalie dans le fonctionnement des mitochondries qui affecte soit directement la chaîne respiratoire (activité SDH défectueuse) soit la capacité à répondre à un stress oxydatif (induction SOD défectueuse) conduit à une hypersensibilité à l'effet inhibiteur des SDHI.

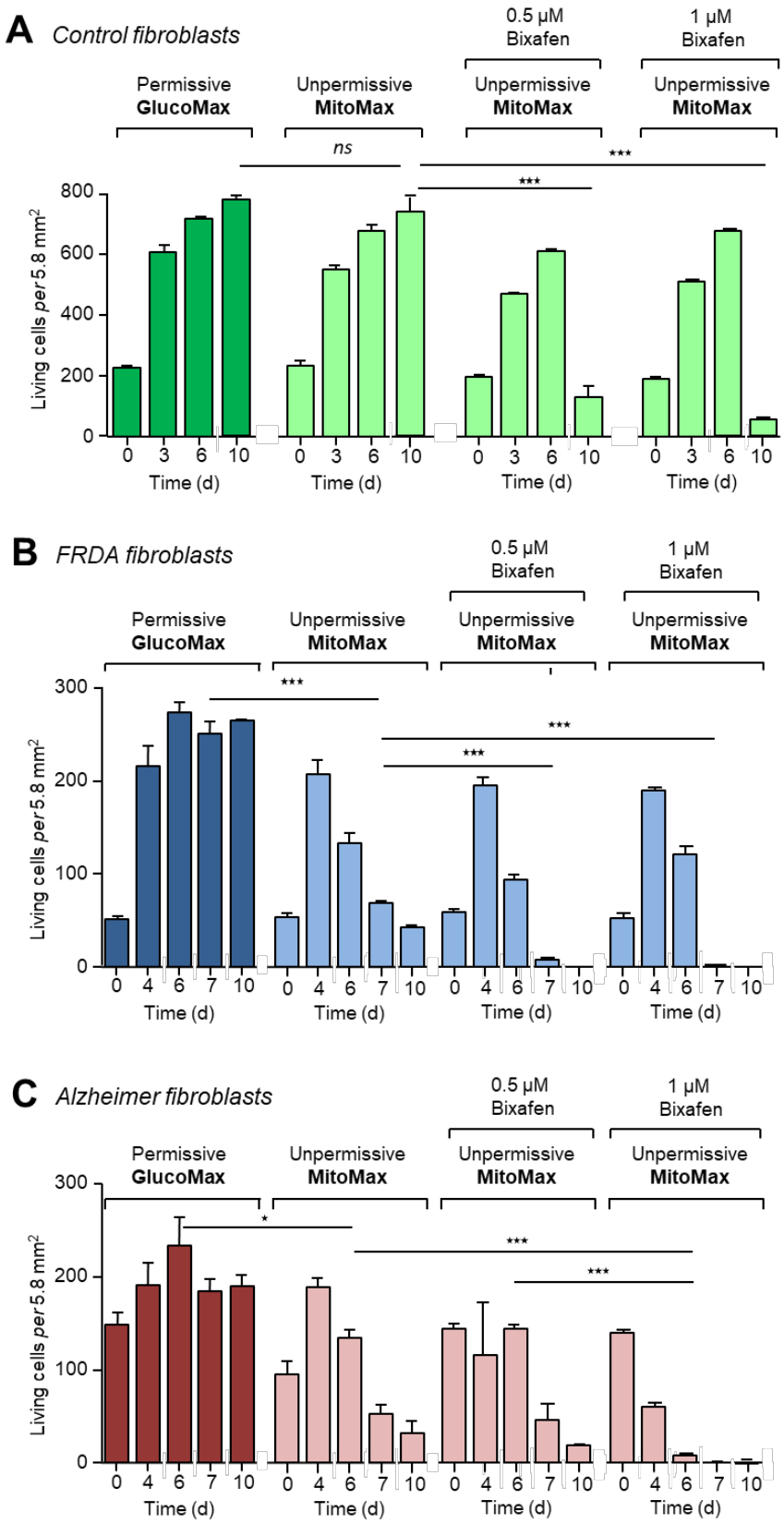


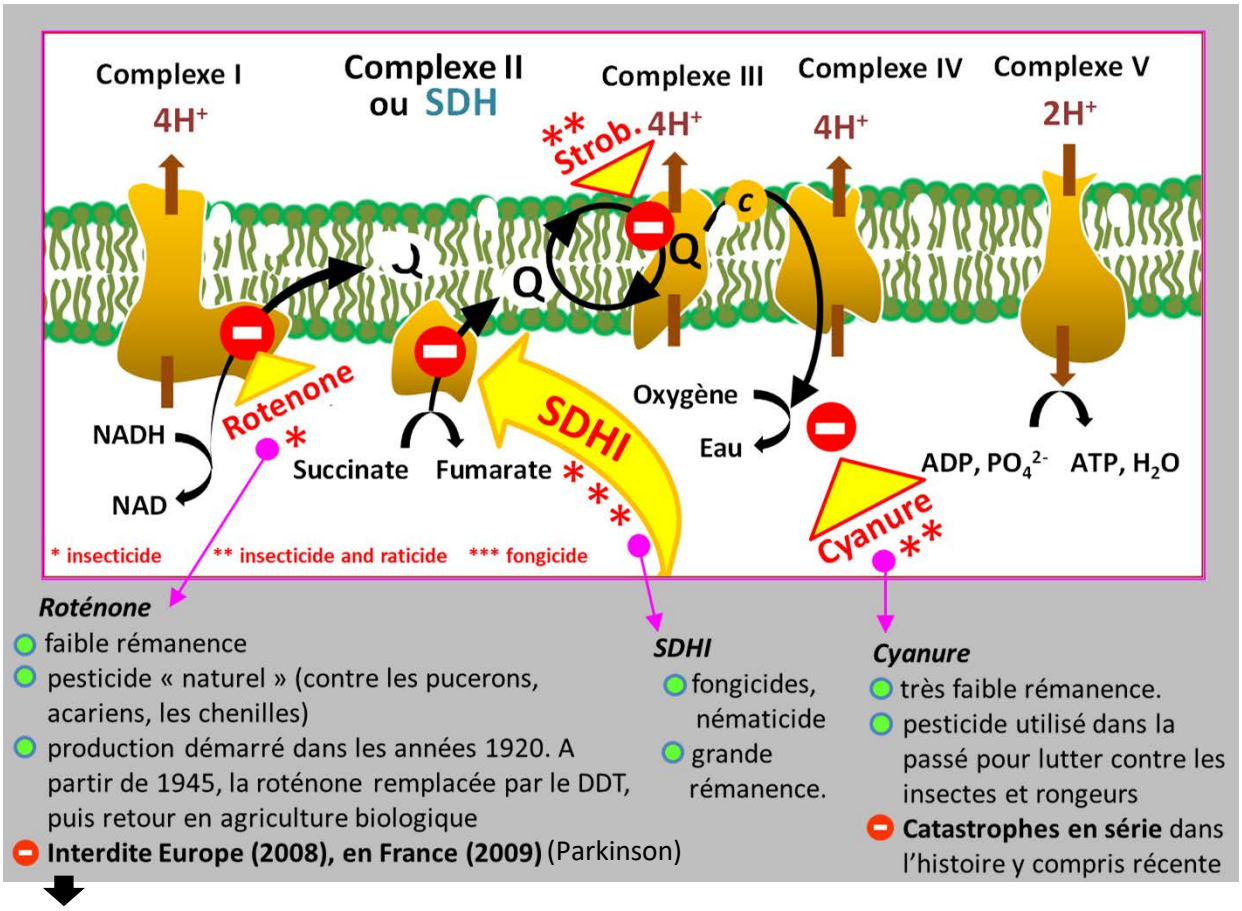
Figure 9. ***Mortalité des cellules contrôle, des cellules FRDA et FAD en présence de 0,5 ou 1 µM bixafen***

***A**, Cellules contrôles (n=3) dans les milieux GlucoMax ou MitoMax, (voir le tableau 2), respectivement en l'absence ou en présence de bixafen 0,5 µM ou 1 µM. Une expérience similaire réalisée sur des fibroblastes provenant d'un patient atteint d'ataxie de Friedreich (fibroblastes FRDA) (**B**) et d'un patient atteint de la maladie familiale d'Alzheimer (FAD) (**C**). Les milieux de culture n'ont pas été changés pendant la durée de l'expérience (n=3).*

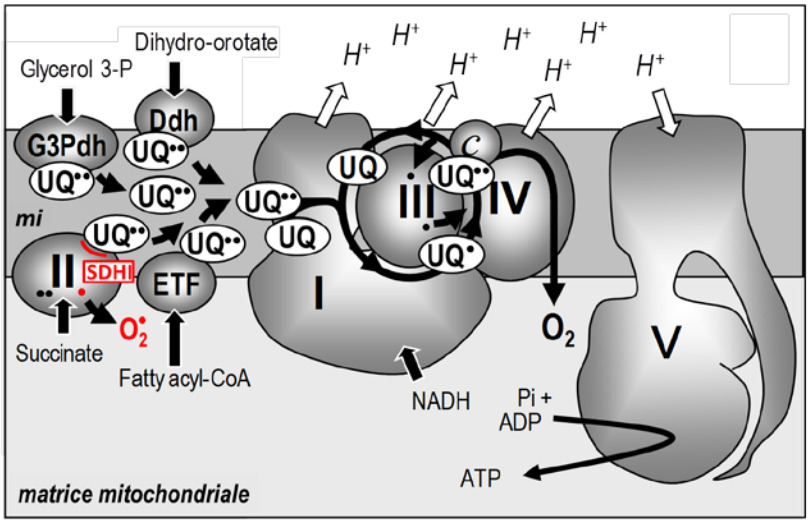
Discussion

Les données réunies établissent les effets inhibiteurs de huit SDHI sur la SDH de quatre espèces biologiques, à savoir le champignon *B. cinerea*, le ver de terre *L. terrestris*, l'abeille domestique *A. mellifera* et les humains (*H. sapiens*), avec des inhibitions variables. Cette observation reflète l'extrême conservation des sous-unités SDH B,C,D constituant le site de réduction et de fixation de l'ubiquinone sur la SDH (Fig 2 suppl). L'absence de spécificité d'espèce de la carboxine, le premier SDHI, a été reconnue dès 1976 [16], lorsque les auteurs ont noté la très grande affinité de la carboxine pour la SDH des mammifères [38]. La carboxine a été un temps largement pulvérisée comme fongicide sur le blé canadien, à des doses similaires à celles utilisées pour les SDHI qui en dérivent, représentant un risque environnemental majeur en raison de cette non spécificité [38]. Dans ce travail, nous avons étendu cette observation à une série de SDHI dérivés de la carboxine, avec laquelle ils partagent un mode d'action commun pour l'inhibition de la SDH. Les fabricants de produits agrochimiques connaissent en réalité cette absence de spécificité d'espèce. Ainsi une partie des SDHI est vendue comme efficace pour tuer les nématodes [39]. De même, le danger représenté par les SDHI pour les organismes aquatiques est reconnu depuis longtemps, comme l'indiquent les fiches techniques, et se trouve amplement confirmé par les données récentes obtenues pour le poisson *Danio rerio* avec le boscalid ou le penthiopyrad [40,41] et pour les embryons du batracien *Xenopus tropicalis* avec l'isopyrazam ou le bixafen [42]. Simultanément, il a été démontré que les effets toxiques du boscalid sur les abeilles sont observables pour peu que la durée d'exposition soit suffisante [43]. L'effet inhibiteur des SDHI s'étend vraisemblablement à la plupart des organismes vivants, modulé par la propension de chaque organisme à absorber, métaboliser et/ou excréter chacun des SDHI. Ainsi, les plantes dont les feuilles présentent une mauvaise absorption des SDHI seront épargnées tant que le pesticide n'entrera pas en contact avec les racines, lesquelles sont susceptibles d'absorber les SDHI. Enfin, les interactions toxicologiques résultant de l'utilisation fréquente d'un mélange de pesticides ont été largement ignorées. En particulier les SDHI sont fréquemment associés à des inhibiteurs du CIII (par exemple, la strobilurine), dans les préparations commerciales de SDHI (encadré 4) [42]. Les effets toxiques d'agents de perméabilisation supplémentaires sur la faune que l'on trouve dans plusieurs mélanges SDHI sont également largement ignorés. Bien sûr, il est extrêmement dangereux de comparer les valeurs de IC_{50} obtenues *in vitro* dans des conditions de laboratoire avec les concentrations de SDHI pouvant résulter de l'application de ces pesticides sur des cultures. On peut cependant déterminer de manière fiable la concentration de SDHI à la sortie des buses de diffusion. Dans le cas du bixafen, elle est d'environ 0,6 à 1,8 mM selon les recommandations distribuées aux agriculteurs, ce qui correspond à un nuage de nébulisation de 75-125 g/ ha de bixafen. L'exposition finale dépend de nombreux facteurs difficiles à maîtriser, notamment les conditions d'épandage, la nature du sol, son couvert végétal, etc. Du point de vue réglementaire, la DJA, par exemple pour le boscalid et le bixafen, est de 0,04 et 0,02 mg / kg / jour, respectivement (voir légende Fig 3). Pour un adulte moyen (60 kg / volume sanguin 5 l), cela correspond à une concentration sanguine d'environ 1,40 et 0,58 µM.

À ce jour, il a été rapporté que les SDHI inhibaient puissamment l'activité de la SDH, mais leurs effets sur d'autres sites de la chaîne respiratoire, n'ont pas été décrits. Nous montrons ici que plusieurs des SDHI de dernière génération inhibent le CIII en plus de la SDH, augmentant ainsi à la fois leur activité fongicide et leur toxicité vis-à-vis d'autres organismes. À ce jour, cet effet supplémentaire n'a pas été pris en compte dans la commercialisation d'aucune de ces molécules. Il est intéressant de noter que l'existence d'un site additionnel autre que la SDH a été récemment décrit, suggérant



Encadré 3. ***Bloquer les mitochondries avec des mitochondriotoxiques une longue histoire de catastrophes environnementales et sanitaires***. *Strob., la strobilurine souvent employée avec les SDHI.*

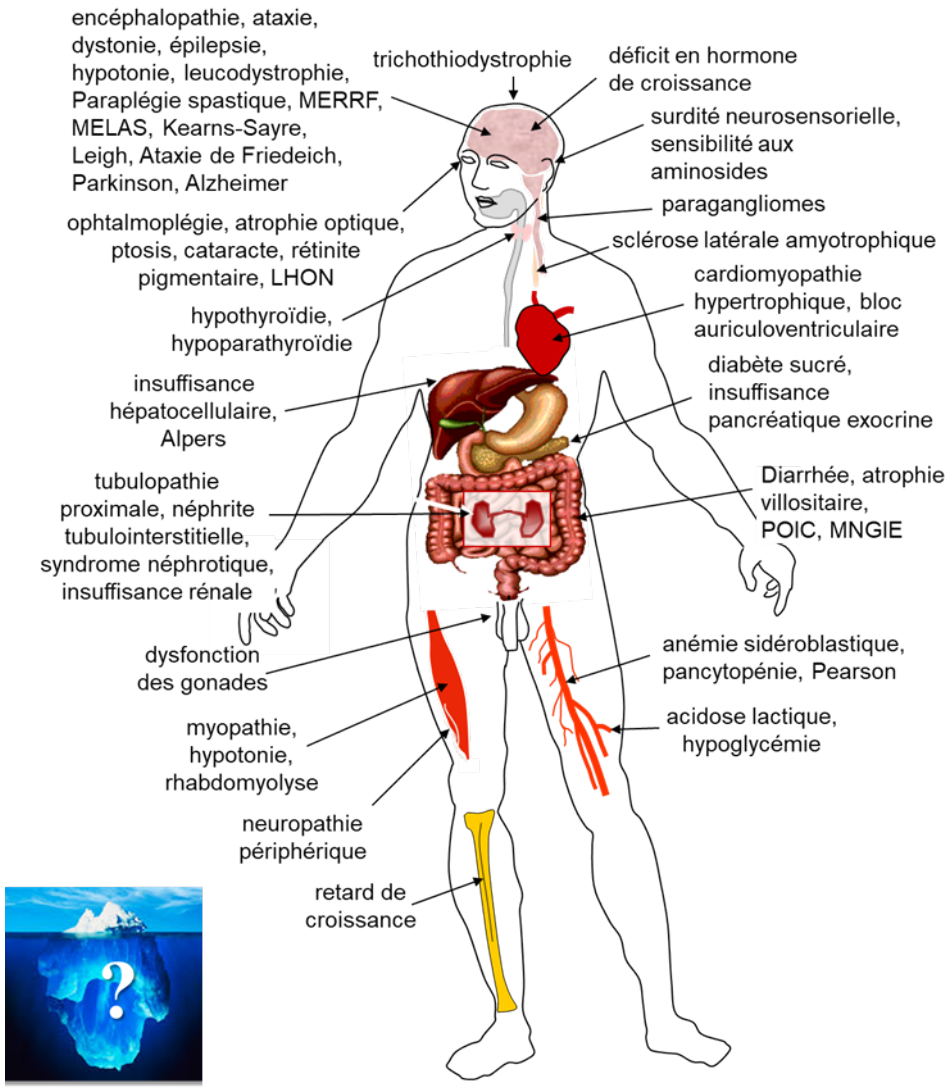


Encadré 4. ***Les interactions compliquées dans la chaîne respiratoire mitochondriale :*** *un ensemble de protéines organisées en structures rigides appelés complexes (notés de I à V). La SDH constitue le complexe II, avec les SDHI une sourde de superoxydes en rouge. Ces complexes sont plus ou moins associés, formant des supercomplexes. S'y ajoute d'autres protéines, des déshydrogénases (G3Pdh ; Glycerol 3 phosphate déshydrogénase ; Ddh, Dihydro orotate déshydrogénase ; ETF, Electron Transfer flavoprotéine). Il en résulte un mélange de compétition et de coopération à travers des pools de composés localisés (UQ, ubiquinone) qui s'échangent les électrons provenant de l'oxydation des substrats.*

L’existence d’au moins un deuxième site d'action des SDHI [44].

Les effets de l'inhibition de la chaîne respiratoire sur la croissance des cellules humaines en culture dépendent grandement de l'équilibre entre la glycolyse et l'activité mitochondriale. Ainsi, les cellules dites rho°, dépourvues d'ADN mitochondrial et donc d'activités de la chaîne respiratoire, sont auxotrophes pour l'uridine mais peuvent générer de l'ATP à partir du glucose disponible par le biais de la glycolyse [45], produisant une grande quantité de lactate (Fig 1 et Fig 1 suppl). L’auxotrophie pour l’uridine a pour origine la rupture complète de la partie terminale de la chaîne respiratoire (CIII, CIV) qui entraîne le blocage de la dihydroorotate déshydrogénase [46]. Cette dernière enzyme produit normalement l’orotate nécessaire à la synthèse des pyrimidines, indispensable à la prolifération cellulaire (Fig 1 suppl), rendant nécessaire une supplémentation en uridine pour la croissance de cellules présentant soit un déficit spécifique de l’activité du CIII ou du CIV [46] soit un déficit généralisé lié à l’absence d’ADN mitochondrial et donc sans chaîne respiratoire fonctionnelle [45]. Ceci est illustré ici par comparaison des croissances cellulaires en milieu permissif GlucoMax et en milieu non permissif MitoMax, ce dernier seul permettant la détection de cellules hébergeant des mitochondries avec des chaînes respiratoires déficientes. L’utilisation de ce milieu MitoMax non permissif n’est pas destinée à représenter une situation physiologique mais à permettre de détecter un éventuel effet délétère d’une substance donnée sur les mitochondries. Ce milieu MitoMax devrait désormais être utilisé pour tester en culture cellulaire toute substance ciblant les mitochondries ceci dans le contexte de l’évaluation des risques liés aux organismes non ciblés.

Dans cette étude, nous avons montré une application efficace de cette stratégie pour les cellules traitées par SDHI. En effet, l'utilisation d'un milieu standard contenant du glucose rend impossible la détection d'un blocage même grave de la SDH dans les cellules humaines. Ces expériences suggèrent la nécessité de réévaluer la toxicité des SDHI dans des cellules humaines en culture en utilisant un milieu type MitoMax stimulant les mitochondries et contenant de la glutamine comme seule source de carbone. Quoi qu’il en soit, étant donné la complexité des phénomènes pouvant résulter d’un stress mitochondrial (surproduction de superoxydes, accumulation de lactate, manque d’ATP, déséquilibre métabolique, etc.), il est essentiel de respecter une durée suffisante (> 15 jours) pour ces évaluations, ceci en fonction de la concentration de l'inhibiteur utilisé Un autre aspect montré par cette étude est l'augmentation de la sensibilité aux SDHI des cellules humaines abritant des mitochondries défectueuses. Cette constatation est valable quelle que soit la nature du défaut mitochondrial, soit qu’il résulte directement d’un déficit partiel de la chaîne respiratoire et/ou d’une hypersensibilité au stress oxydatif due à une mauvaise induction de la SOD (*encadré 4*). Les anomalies de la SDH, partielles et isolées, sont des pathologies humaines rares généralement associées à des phénotypes neurologiques ou cardiaques [3]. Cependant, s’ajoutent aux défauts profonds de la SDH mis en. paragangliomes ou certaines tumeurs gastro-intestinales de patients porteurs de mutations dans les gènes SDH suppresseurs de tumeur [47,48,49,50], les déficits partiels en SDH observé dans des maladies humaines affectant différents organes, telles que FRDA [51], syndrome de Barth [52], leucoencéphalopathies diverses [53] [54] [55], infertilité masculine liée à une asthénozoospermie [56], myopathie [57], de rare évidence dans les phéochromocytomes et les syndromes d’hémolyse urémique et de rhabdomyolyse [58]. Cette hypersensibilité définit une sous-population qui pourrait être particulièrement à risque lorsqu’elle est en contact avec des SDHI. Nos résultats suggèrent que, dans cette sous-population et également dans des populations atteintes de FRDA ou de la maladie d’Alzheimer, connues pour présenter une susceptibilité accrue au stress oxydatif, une caractéristique très courante des maladies humaines, les SDHI pourraient contribuer à une progression accélérée de la maladie.



Encadré 5. ***Chez l'homme, quand les mitochondries ne marchent pas, mal, ou gèrent mal le stress oxydatif,*** *les maladies mitochondriales peuvent apparaitre à tous les âges de la vie, affecter tous les organes, elles présentent une susceptibilité individuelle marquée et une évolution très imprévisible, un nombre important de questions sans réponses, symbolisé au mieux par l'iceberg*

Conclusions

Tout d'abord, ces travaux établissent que, à l'instar de la molécule précédente, la carboxine [16], tout les SDHI testés inhibent la SDH et cela chez toutes les espèces étudiées, mais avec une efficacité variable. De plus, les SDHI de nouvelle génération contenant un fragment méthyl-pyrazol (Fig 3) inhibent également le complexe III de la chaîne respiratoire. Ce manque de spécificité constitue un problème majeur compte tenu de l'utilisation généralisée actuelle de ces SDHI. Bien que ce manque de sélectivité (CII + CIII) puisse être la source de l'efficacité des SDHI de dernière génération, il pourrait également constituer un risque supplémentaire pour les organismes exposés. Notre étude a ensuite établi que les conditions standards utilisées pour tester la toxicité éventuelle des SDHI (ainsi que de tout autre pesticide ciblant les mitochondries, les mitochondriotoxiques) peuvent masquer un effet toxique potentiel. Par conséquent, nous recommandons de modifier d'urgence les tests réglementaires pour la détermination de la toxicité

des molécules et l'utilisation du milieu de croissance MitoMax dans lequel la glutamine est la seule source de carbone.

Enfin, nous montrons qu'un défaut mitochondrial préexistant, tel qu'un dysfonctionnement partiel de la SDH ou une hypersensibilité aux attaques oxydatives (FRDA, FAD), augmente la sensibilité aux SDHI, suggérant un risque particulier pour les individus présentant un tel dysfonctionnement.

Remerciements

Ce travail a été soutenu par des subventions de l'AAJI (Association pour l'Aide aux Jeunes Infirmes et aux Personnes Handicapées), de l'AFAF (Association Française de l'Ataxie de Friedreich), de l'Association OLY (Ouvrir Les Yeux), de l'Association de protection des abeilles POLLINIS et de l'ANR MITOXDRUGS. Les auteurs certifient que leur liberté de concevoir, mener, interpréter et publier cette recherche n'a pas été compromise par aucun sponsor.

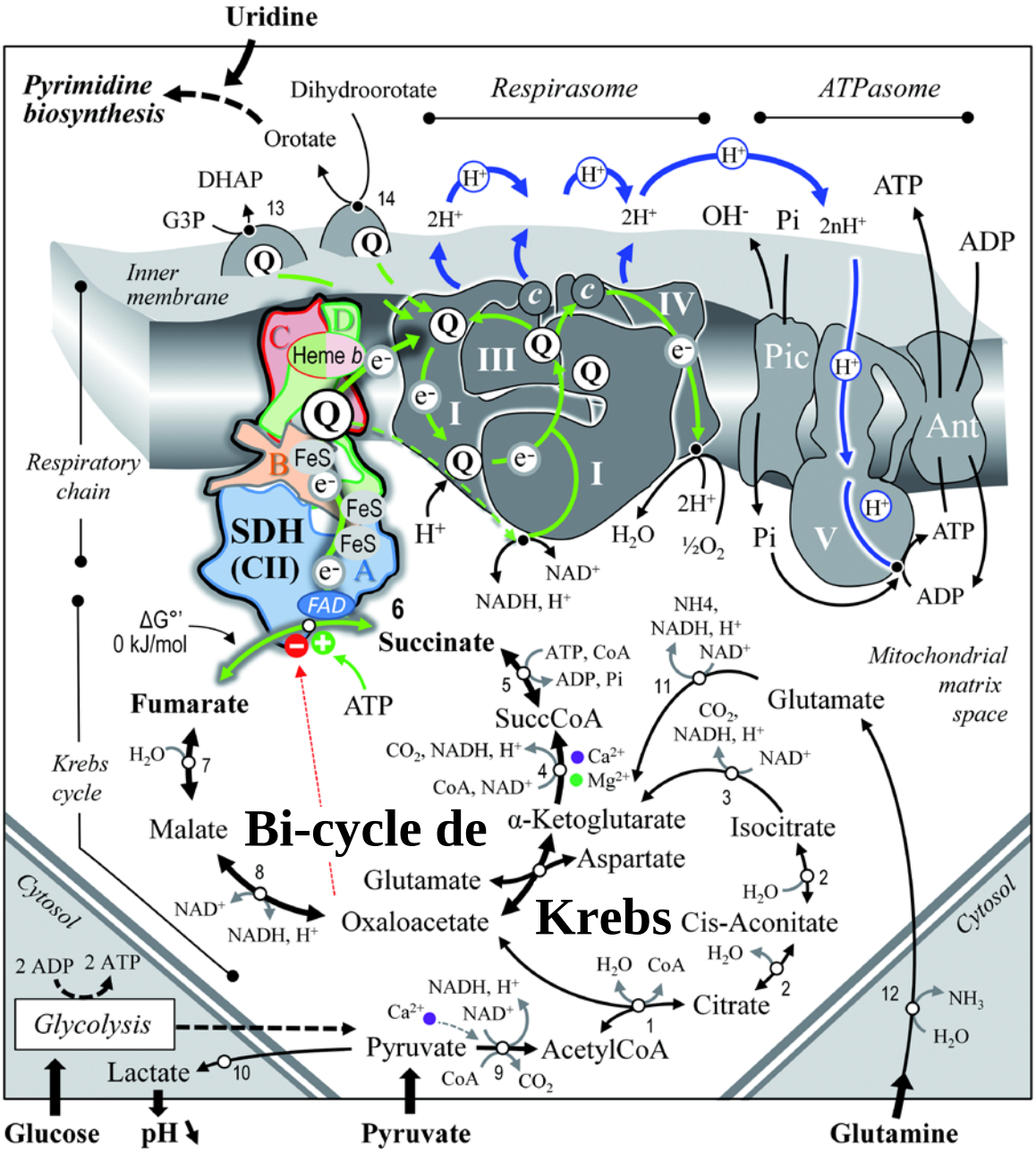
References

1. Ackrell B, Johnson M, Gunsalus R, Cecchini G (1990) Structure and function of succinate dehydrogenase and fumarate reductase; Muller F, editor. Boca Raton, FL CRC Press.
2. Her YF, Maher LJ, 3rd Succinate Dehydrogenase Loss in Familial Paraganglioma: Biochemistry, Genetics, and Epigenetics. Int J Endocrinol 2015;2015:296167.
3. Bénit P, Letouze E, Rak M, Aubry L, Burnichon N, et al. Unsuspected task for an old team: succinate, fumarate and other Krebs cycle acids in metabolic remodeling. Biochim Biophys Acta 2014;1837:1330-7.
4. Francis K, Smitherman C, Nishino SF, Spain JC, Gadda G The biochemistry of the metabolic poison propionate 3-nitronate and its conjugate acid, 3-nitropropionate. IUBMB Life 2013;65:759-68.
5. Teplova VV, Belosludtsev KN, Kruglov AG Mechanism of triclosan toxicity: Mitochondrial dysfunction including complex II inhibition, superoxide release and uncoupling of oxidative phosphorylation. Toxicol Lett 2017;275:108-17.
6. Kruspig B, Valter K, Skender B, Zhivotovsky B, Gogvadze V Targeting succinate:ubiquinone reductase potentiates the efficacy of anticancer therapy. Biochim Biophys Acta 2016;1863:2065-71.
7. Morin A, Letouze E, Gimenez-Roqueplo AP, Favier J Oncometabolites-driven tumorigenesis: From genetics to targeted therapy. Int J Cancer 2014;135:2237-48.
8. Flannery PJ, Trushina E Mitochondrial dynamics and transport in Alzheimer's disease. Mol Cell Neurosci 2019;98:109-20.
9. Chrétien D, Bénit P, Ha HH, Keipert S, El-Khoury R, et al. Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 degrees C. PLoS Biol 2018;16:e2003992.
10. Neagu M, Constantin C, Popescu ID, Zipeto D, Tzanakakis G, et al. Inflammation and Metabolism in Cancer Cell-Mitochondria Key Player. Front Oncol 2019;9:348.
11. Spinelli JB, Haigis MC The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. Nat Cell Biol 2018;20:745-54.
12. Canto C, Menzies KJ, Auwerx J NAD(+) Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. Cell Metab 2015;22:31-53.
13. Manoli I, Alesci S, Blackman MR, Su YA, Rennert OM, et al. Mitochondria as key components of the stress response. Trends Endocrinol Metab 2007;18:190-8.
14. Zhang H, Menzies KJ, Auwerx J The role of mitochondria in stem cell fate and aging. Development 2018;145.
15. Bénit P, Bortoli S, Chrétien D, Rak M, Rustin P Pathologies liés au cycle de Krebs. Rev Francophone Laboratoires 2018;501:49-57.
16. Mowery PC, Ackrell BA, Singer TP Carboxins: powerful selective inhibitors of succinate oxidation in animal tissues. Biochem Biophys Res Commun 1976;71:354-61.
17. Rustin P, Chrétien D, Bourgeron T, Gérard B, Rotig A, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. Clin Chim Acta 1994;228:35-51.
18. Bourgeron T, Rustin P, Chrétien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, et al. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. Nat Genet 1995;11:144-9.
19. Bayot A, Reichman S, Lebon S, Csaba Z, Aubry L, et al. Cis-silencing of PIP5K1B

evidenced in Friedreich's ataxia patient cells results in cytoskeleton anomalies. Hum Mol Genet 2013.
20. Bayot A, Reichman S, Lebon S, Csaba Z, Aubry L, et al. Cis-silencing of PIP5K1B evidenced in Friedreich's ataxia patient cells results in cytoskeleton anomalies. Hum Mol Genet 2013;22:2894-904.
21. Paupe V, Dassa EP, Goncalves S, Auchere F, Lonn M, et al. Impaired nuclear Nrf2 translocation undermines the oxidative stress response in friedreich ataxia. PLoS ONE 2009;4:e4253.
22. Takeda M, Tatebayashi Y, Nishimura T Change in the cytoskeletal system in fibroblasts from patients with familial Alzheimer's disease. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 1992;16:317-28.
23. Strachan GD, Morgan KL, Otis LL, Caltagarone J, Gittis A, et al. Fetal Alz-50 clone 1 interacts with the human orthologue of the Kelch-like Ech-associated protein. Biochemistry 2004;43:12113-22.
24. Tesco G, Latorraca S, Piersanti P, Piacentini S, Amaducci L, et al. Alzheimer skin fibroblasts show increased susceptibility to free radicals. Mech Ageing Dev 1992;66:117-20.
25. Tesco G, Latorraca S, Piersanti P, Sorbi S, Piacentini S, et al. Free radical injury in skin cultured fibroblasts from Alzheimer's disease patients. Ann N Y Acad Sci 1992;673:149-53.
26. Bénit P, Goncalves S, Philippe Dassa E, Brière JJ, Martin G, et al. Three spectrophotometric assays for the measurement of the five respiratory chain complexes in minuscule biological samples. Clin Chim Acta 2006;374:81-86.
27. Marklund S, Marklund G Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem 1974;47:469-74.
28. Papadopoulos JS, Agarwala R COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. Bioinformatics 2007;23:1073-9.
29. Sierotzki H, Scalliet G A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. Phytopathology 2013;103:880-7.
30. Bénit P, Pelhaitre A, Saunier E, Bortoli S, Coulibaly A, et al. Paradoxical Inhibition of Glycolysis by Pioglitazone Opposes the Mitochondriopathy Caused by AIF Deficiency. EBioMedicine 2017;17:75-87.
31. Manel N, Kinet S, Kim FJ, Taylor N, Sitbon M, et al. [GLUT-1 is the receptor of retrovirus HTLV]. Med Sci (Paris) 2004;20:277-9.
32. El-Hattab AW, Adesina AM, Jones J, Scaglia F MELAS syndrome: Clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options. Mol Genet Metab 2015.
33. Chantrel-Groussard K, Geromel V, Puccio H, Koenig M, Munnich A, et al. Disabled early recruitment of antioxidant defenses in Friedreich's ataxia. Hum Mol Genet 2001;10:2061-7.
34. Graillot V, Tomasetig F, Cravedi JP, Audebert M Evidence of the in vitro genotoxicity of methyl-pyrazole pesticides in human cells. Mutat Res 2012;748:8-16.
35. Bourgeron T, Chrétien D, Rotig A, Munnich A, Rustin P Fate and expression of the deleted mitochondrial DNA differ between human heteroplasmic skin fibroblast and Epstein-Barr virus-transformed lymphocyte cultures. J Biol Chem 1993;268:19369-76.
36. Mota SI, Costa RO, Ferreira IL, Santana I, Caldeira GL, et al. Oxidative stress involving changes in Nrf2 and ER stress in early stages of Alzheimer's disease. Biochim Biophys Acta 2015;1852:1428-41.
37. Majd S, Power JHT Oxidative Stress and Decreased Mitochondrial Superoxide Dismutase 2 and Peroxiredoxins 1 and 4 Based Mechanism of Concurrent Activation of AMPK and mTOR in Alzheimer's Disease. Curr Alzheimer Res 2018;15:764-76.
38. Singer TP, Ramsay RR, Ackrell BA Deficiencies of NADH and succinate dehydrogenases in degenerative diseases and myopathies. Biochim Biophys Acta 1995;1271:211-9.
39. Faske TR, Hurd K Sensitivity of Meloidogyne incognita and Rotylenchulus reniformis to Fluopyram. J Nematol 2015;47:316-21.
40. Qian L, Zhang J, Chen X, Qi S, Wu P, et al. Toxic effects of boscalid in adult zebrafish (Danio rerio) on carbohydrate and lipid metabolism. Environ Pollut 2019;247:775-82.
41. Qian L, Qi S, Cao F, Zhang J, Li C, et al. Effects of penthiopyrad on the development and behaviour of zebrafish in early-life stages. Chemosphere 2019;214:184-94.

42. Wu S, Lei L, Liu M, Song Y, Lu S, et al. Single and mixture toxicity of strobilurin and SDHI fungicides to Xenopus tropicalis embryos. Ecotoxicol Environ Saf 2018;153:8-15.
43. Simon-Delso N, San Martin G, Bruneau E, Hautier L Time-to-death approach to reveal chronic and cumulative toxicity of a fungicide for honeybees not revealed with the standard ten-day test. Sci Rep 2018;8:7241.
44. Yamashita M, Fraaije B Non-target site SDHI resistance is present as standing genetic variation in field populations of Zymoseptoria tritici. Pest Manag Sci 2018;74:672-81.
45. Morais R, Gregoire M, Jeannotte L, Gravel D Chick embryo cells rendered respiration-deficient by chloramphenicol and ethidium bromide are auxotrophic for pyrimidines. Biochem Biophys Res Commun 1980;94:71-7.
46. Gérard B, Bourgeron T, Chrétien D, Rotig A, Munnich A, et al. Uridine preserves the expression of respiratory enzyme deficiencies in cultured fibroblasts. Eur J Pediatr 1993;152:270.
47. Favier J, Brière JJ, Strompf L, Amar L, Filali M, et al. Hereditary Paraganglioma/Pheochromocytoma and Inherited Succinate Dehydrogenase Deficiency. Horm Res 2005;63:171-79.
48. Boikos SA, Xekouki P, Fumagalli E, Faucz FR, Raygada M, et al. Carney triad can be (rarely) associated with germline succinate dehydrogenase defects. Eur J Hum Genet 2016;24:569-73.
49. Miettinen M, Lasota J Succinate dehydrogenase deficient gastrointestinal stromal tumors (GISTs) - a review. Int J Biochem Cell Biol 2014;53:514-9.
50. Dubard Gault M, Mandelker D, DeLair D, Stewart CR, Kemel Y, et al. Germline SDHA mutations in children and adults with cancer. Cold Spring Harb Mol Case Stud 2018;4.
51. Rotig A, de Lonlay P, Chrétien D, Foury F, Koenig M, et al. Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. Nat Genet 1997;17:215-7.
52. Dudek J, Cheng IF, Chowdhury A, Wozny K, Balleininger M, et al. Cardiac-specific succinate dehydrogenase deficiency in Barth syndrome. EMBO Mol Med 2016;8:139-54.
53. Ardissone A, Invernizzi F, Nasca A, Moroni I, Farina L, et al. Mitochondrial leukoencephalopathy and complex II deficiency associated with a recessive SDHB mutation with reduced penetrance. Mol Genet Metab Rep 2015;5:51-54.
54. Helman G, Caldovic L, Whitehead MT, Simons C, Brockmann K, et al. Magnetic resonance imaging spectrum of succinate dehydrogenase-related infantile leukoencephalopathy. Ann Neurol 2016;79:379-86.
55. Ishiyama A, Sakai C, Matsushima Y, Noguchi S, Mitsuhashi S, et al. IBA57 mutations abrogate iron-sulfur cluster assembly leading to cavitating leukoencephalopathy. Neurol Genet 2017;3:e184.
56. Tomar R, Mishra AK, Mohanty NK, Jain AK Altered expression of succinic dehydrogenase in asthenozoospermia infertile male. Am J Reprod Immunol 2012;68:486-90.
57. Rodrigues Ade S, Kiyomoto BH, Oliveira AS, Gabbai AA, Schmidt B, et al. Progressive myopathy with a combined respiratory chain defect including Complex II. J Neurol Sci 2008;264:182-6.
58. Micheletti MV, Lavoratti G, Gasperini S, Donati MA, Pela I Hemolytic uremic syndrome and rhabdomyolysis in a patient with succinate coenzyme Q reductase (complex II) deficiency. Clin Nephrol 2011;76:68-73.

Les figures supplémentaires



Supplément Figure 1. ***L'intrication toujours très simplifiée et schématique de la succinate déshydrogénase dans la chaîne respiratoire et le métabolisme mitochondrial*** *(Pour les biochimistes…).*

La <u>*partie supérieure*</u> *présente une vue schématisée d'un fragment de la membrane interne mitochondriale, avec de gauche à droite la succinate déshydrogénase (SDH; CII) avec ses quatre sous-unités (A-D) et le site de liaison à l'ubiquinone (Q). Les électrons libérés au cours de l'oxydation du succinate en fumarate (ligne verte) vont du* FAD^+ *lié à la sous-unité A jusqu'au site de liaison de l'ubiquinone (Q) pour être délivrés au CIII. Au sein du respirasome, constitué de l'association des CI-III-IV dans diverses proportions, le cycle Q permet le transfert simultané d'électrons vers le cytochrome c et l'extrusion de protons. L'oxydation du cytochrome c par la cytochrome c oxydase terminale permet la réduction simultanée de l'oxygène en eau et une*

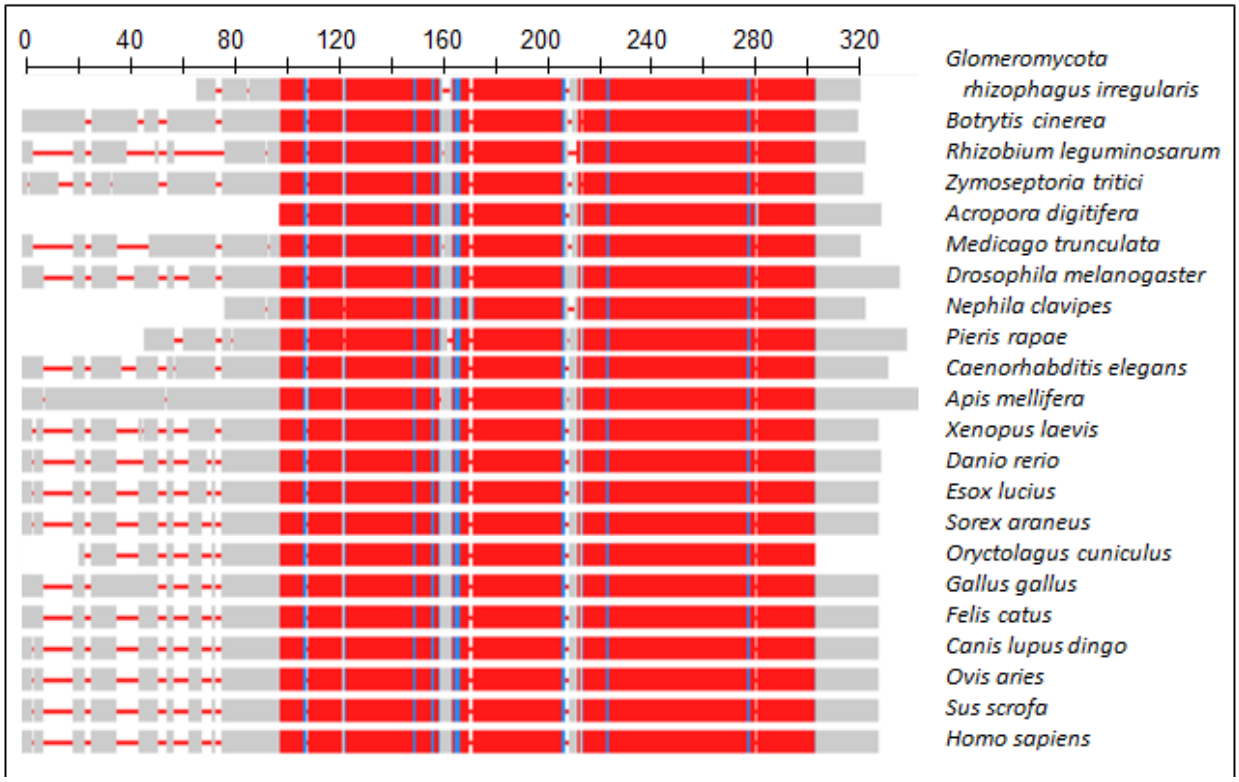
extrusion supplémentaire de protons. Les protons s'écoulent ensuite (ligne bleue) vers l'ATPasome où ils sont renvoyés vers la matrice mitochondriale, ce qui permet à l'ATPase (CV) de générer de l'ATP. Couplée au flux d'électrons dans la chaîne respiratoire, l'oxydation du succinate en fumarate alimente le bicycle de Krebs, à chaque sous-cycle sa vitesse (partie inférieure). De manière notable, le cycle peut être alimenté à la fois par le pyruvate produit par glycolyse et par la glutamine si elle est présente dans le cytosol des cellules. 1. Citrate synthase; 2. Aconitase; 3. Isocitrate déshydrogénase; 4. α-Cétoglutarate déshydrogénase; 5. SuccinylCoA synthase; 6. Succinate déshydrogénase; 7. Fumarase; 8. Malate déshydrogénase; 9. Pyruvate déshydrogénase; 10. Lactate déshydrogénase; 11. Glutamate déshydrogénase; 12. Glutaminase; 13. Glycérol-3-phosphate déshydrogénase; 14. Dihydroorotate déshydrogénase

Supplément Figure 2A ***– Les 22 organismes choisis pour aligner les protéines SDH B, C, D.***

Organism		SDHB	SDHC	SDHD
1. Champignon mycorhizien ayant des relations symbiotiques avec les racines des plantes	*Glomeromycota Rhizophagus irregularis*	EXX77477	PKY26074	EXX77069.1
2. Champignon nécrotrophe affectant de nombreuses espèces de plantes	*Botrytis cinerea*	ALK82288.1	ACT83441.1	ACT83439.1
3. Une bactérie impliquée dans une relation symbiotique mutualiste avec les légumineuses	*Rhizobium leguminosarum*	OBY07352.1	PUB61560.1	AIC29272.1
4. Champignon causant la *septoria tritici*, taches nécrotiques sur le feuillage du blé	*Zymoseptoria tritici*	AER08706.1	AFV73771.1	AFV73750.1
5. Une espèce de corail acroporide	*Acropora digitifera*	XP_015754211.1	XP_015755780.1	XP_015755781.1
6. La luzerne tronquée, une petite légumineuse annuelle	*Medicago trunculata*	KEH43401.1	AES88117.1	AES71543.2
7. La mouche du vinaigre, un outil génétique irremplaçable	*Drosophila melanogaster*	AAF57396	NP_001262472.1	NP_651181.1
8. L'araignée-banane, indigène d'Amérique du Nord et d'Amérique du Sud	*Nephila clavipes*	PRD39438.1	PRD21447.1	PRD34935.1
9. Le petit blanc, une espèce de papillon de petite à moyenne taille	*Pieris rapae*	XP_022120923.1	XP_022127716.1	XP_022126997.1
10. Nématode, transparent, vivant librement, largement utilisé comme organisme modèle	*Caenorhabditis elegans*	BAA23717.1	CAA82572.1	CTQ86584.1
11. L'abeille européenne, la plus répandue parmi les 7-12 espèces d'abeilles domestiques du monde	*Apis mellifera*	XP_026295177.1	XP_006564913.1	XP_001120412.2
12. Grenouille africaine à griffes, dans le sud-est de l'Afrique subsaharienne	*Xenopus laevis*	NP_001080247.1	XP_018089012.1	NP_001087943.1
13. Le poisson zèbre, un poisson d'eau douce originaire de la région himalayenne, un organisme modèle très étudié	*Danio rerio*	AAI42800.1	AAH78306.1	AAH79507.1
14. Le brochet du Nord, un poisson carnivore trouvé dans les eaux douces de l'hémisphère Nord	*Esox lucius*	XP_010879758.1	ACO14487.1	XP_010891978.1
15. La musaraigne, l'un des mammifères les plus communs, dans toute l'Europe du Nord, absente d'Irlande	*Sorex araneus*	XP_004603433.1	XP_004613949	XP_004604749.1
16. Le lapin européen originaire du sud-ouest de l'Europe et du nord-ouest de l'Afrique	*Oryctolagus cuniculus*	ABD77138.1	XP_008262407.1	XP_002708482.1
17. Principal ancêtre du poulet domestique, domestiqué il y a au moins 5000 ans en Asie	*Gallus gallus*	NP_001074344.2	XP_024999418.1	NP_001006321.1
18. Le chat domestique, la seule espèce domestiquée de la famille des félidés	*Felis catus*	XP_003989572.1	XP_003999607.1	XP_003992403.1
19. Le dingo, un chien originaire d'Australie	*Canis lupus*	XP_0253031	XP_02527	XP_0253213

	dingo	86.1	6630.1	30.1
20. Le mouton domestique généralement élevé comme bétail dans la majorité du monde habité	*Ovis aries*	XP_012021666.1	XP_012023495.1	XP_012016940.1
21. Le sanglier, porc sauvage ou cochon sauvage, originaire d'une grande partie de l'Eurasie, de l'Afrique du Nord et des îles Sunda	*Sus scrofa*	ABJ09403.1	XP_003125707.2	NP_001090985.1
22. A l'origine de l'usage suicidaire des SDHI, néanmoins appelé *sapiens*	*Homo sapiens*	NP_002991.2	CAG33383.1	CAG33213.1

Supplément Figure 2B ***- les acides aminés de la sous-unité SDHB***



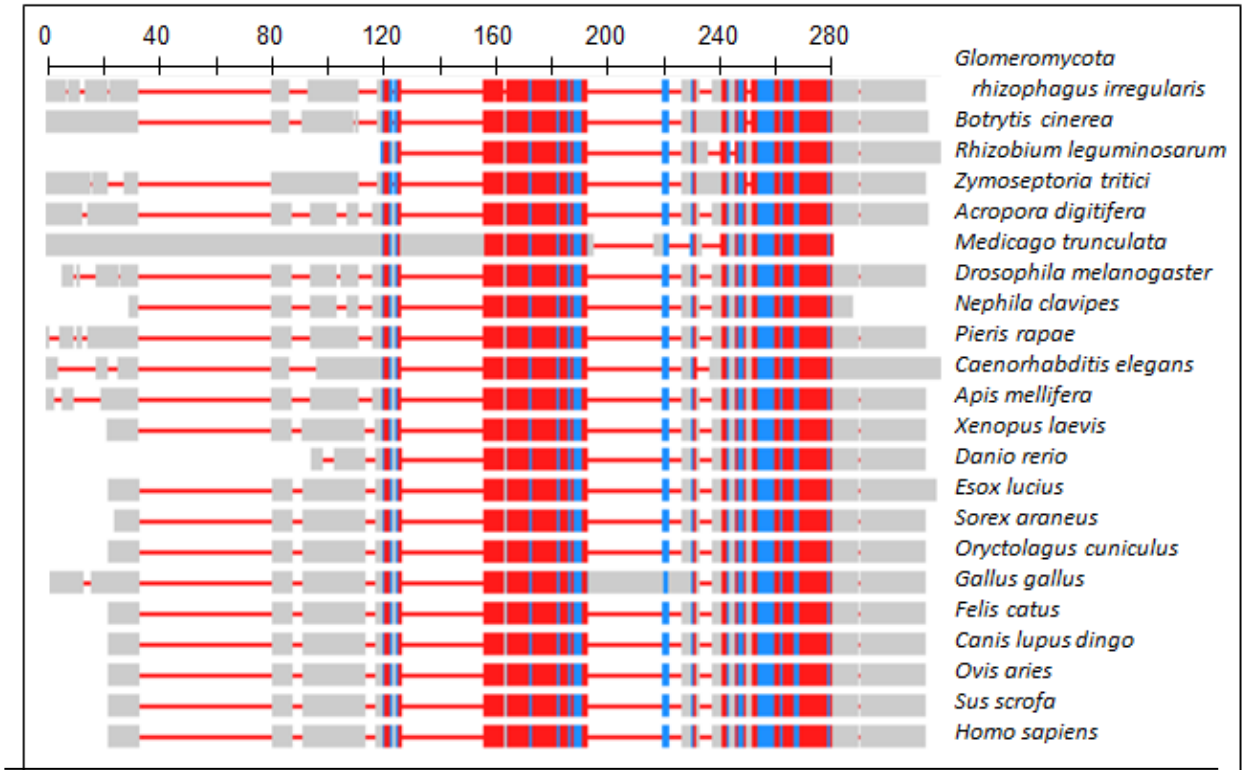

```
1    --------    ---------------   -------   --   ---MNLLsrA---TSRTIKINA-NTDPDKPSTKP
1    MAALrTGA[12]AFRT---QMRTMASVD[8]--VSPSR   PV[6]STVKEPAadS---ESLIKTFNIYRWNPDEPTSKP
1    MVEL----    ALPK---NSQMREGKV[4]------A   GA   --------------KNTREFRVYRWSPDD-GQNP
1    MA-LrLAT[ 6]AFRR---GMATTIE-H[9]EALSASR   PP[6]STVKEPQmdA---DAKTKTFHIYRWNPDQPTDKP
     --------    ---------------   -------   --   ----------------------------------
1    MAST----    MLKR---AIHRISSSP   ----TSR[4]RA[6]AQQASPKarD---TTVLKKFQIYRWNPDTP-SKP
1    MLATeARQ    ILSR---VGSLVARNQ[2]AISNGTA   QL   EQQAQPKeaQ---EPQIKKFEIYRWNPDNAGEKP
1    --------    ---------------   -------   --   --------------MQKLVFSIYRYNPDV-DQAP
1    --------    ---------------   --MNYFR[4]TA[2]YSTAKPKkqV---DPR-RIFKVYRFDGILTKGAP
1    MLAVrLVF    CTRR---SRRQRHSCC[3]ASTAAAA   EA[5]DDVAAKTkkT---GNRIKTFEIYRFNPEAPGAKP
1    MFNFnTIS[11]SLRRykcQNNRFRSHR[9]KPPSEED[3]TT[6]ECKTPPEerKidiKPRLQTIRVYRWNPEKPNVKP
1    MAAV--VF    SLRR---SGPVLRLSG   A-LQVSR   GA   QTAAAPAsqA---AARIKKFAIYRWDPDKPGDKP
1    MAAV-CFS    -LSR---CCSAVHRPA   --VTAVR   FA   QTAAAPA--A---QPRIKKFQIYRWDPDTVGDKP
1    MSVI-CFS    SLGR---CTAMAYRSS   AGIVAVR   YA   QTAAATA--T---QPKIKKFQVYRWDPDTVGDKP
1    MAAV-AAV    SLRR---RFAGAAVGG   ACXQACR   GT   QTAAA----A---APRIKKFAIYRWDPDKTGDKP
1    --------    --RR---RFPATALGG   VCLQACR   EA   QTAAA----T---APRIKKFAIYRWDPDKAGDKP
1    MAAAvVGV    SLRR---GVPARFLRA[9]AVQGICR   GA   QTAAA----A---TSRIKKFSIYRWDPDKPGDKP
1    MAAAaVGV    SLRR---RFPATALGG   ACLQACR   GA   QTVAA----T---APRIKKFAIYRWDPDKTGDKP
```

```
1    MAAV-VGV    SLKR---RFPAAALGG   ACLQACR   GA   QTAAA----T---APRIKKFAIYRWDPDKTGDKP
1    MAAV-VAL    SLRR---RFPAAALGG   ARLQACR   GA   QTAAA----A---APRIKKFAIYRWDPDKTGDKP
1    MAAV-VAV    SLKR---WFPATTLGG   ACLQACR   GA   QTAAA----T---APRIKKFAIYRWDPDKTGDKP
1    MAAV-VAL    SLRR---RLPATTLGG   ACLQASR   GA   QTAAA----T---APRIKKFAIYRWDPDKAGDKP

28   RLQQYKVDLNT-CGPMVLDALIKIKNEQDATLTFRRSCREGICGSCAMNINGTNTLACICKID---RLDTKIY--PLPHM
83   RMQSYTLDLNK-TGPMMLDALIRIKNEVDPTLTFRRSCREGICGSCAMNIDGVNTLACLCRIPRDAKHETKIY--PLPHT
44   SIDTFYIDVDD-CGPMVLDGLLYIKNKIDPTLTLRRSCREGICGSCAMNIDGTNTLACTKGLD-DIKGAVKIY--PLPHL
81   RMQSYTLDLNK-TGPMMLDALIRIKNEVDPTLTFRRSCREGICGSCAMNIDGVNTLACLCRIPTDTAKETRIY--PLPHT
1    -MQTYEVDLNR-CGPMVLDALIKIKNEIDPTLTFRRSCREGICGSCAMNIGGTNTLACISRINPDENKKTKIY--PLPHM
63   ELKEYEINLKE-CGPMVLDALIKIKNDIDPSLTFRRSCREGICGSCAMNIDGCNGLACLTKIP-DAGMDSTIT--PLPHM
64   YMQTYEVDLRE-CGPMVLDALIKIKNEMDPTLTFRRSCREGICGSCAMNIGGTNTLACISKIDINTSKSLKVY--PLPHM
20   RMQDYTLDNPEgRDMMVLDALLKLK-EQDPTLSFRRSCREGVCGSDGLNMNGKNGLACITPLSAVGLKGGKIVlrPLPGL
44   EMKNYDLDVST-CGKMVLDALIKIK-DMDPTLAFRRSCREGICGSCAVNLQGKNCLACITEIPPD--KKITIY--PIPHM
70   TVQKFDVDLDQ-CGTMILDALIKIKNEVDPTLTFRRSCREGICGSCAMNIGGQNTLACICKIDSDTSKSTKIY--PLPHM
97   YMQQFSVDLNKcTGTMVLDVLALIKAEYDPTLSYRKSCREGICGCCAMNINGVNNLACITKA-LESSKPIVIY--PLPHS
59   RMQTYEVDLNT-CGPMVLDALIKIKNEVDPTLTFRRSCREGICGSCAMNINGGNTLACTVRIDTNLSKVSKIY--PLPHM
56   RMQTYEIDLNT-CGPMVLDALIKIKNEMDSTLTFRRSCREGICGSCAMNINGGNTLACLNKIDTNTSKVTKIY--PLPHM
59   RMQTFEIDLNT-CGPMILDALIKIKNEMDGTLTFRRSCREGICGSCAMNINGGNTLACLNKIDTNTSKVTKIY--PLPHM
57   RMQTYEVDLNK-CGPMVLDALIKIKNEIDSTLTFRRSCREGICGSCAMNINGGNTLACTRRIDTNLNKVSKIY--PLPHM
48   RMQTYEVDLNK-CGPMVLDALIKIKNEIDSTLTFRRSCREGICGSCAMNINGGNTLACTRRIDTNLDKVSKIY--PLPHM
67   RMQTYEVDLNK-CGPMVLDALIKIKNELDSTLTFRRSCREGICGSCAMNIAGGNTLACTKKIDPDLSKTTKIY--PLPHM
58   RMQTYEIDLNK-CGPMVLDALIKIKNEIDSTLTFRRSCREGICGSCAMNINGGNTLACTRRIDTNLSKVSKIY--PLPHM
57   HMQTYEIDLNK-CGPMVLDALIKIKNEIDSTLTFRRSCREGICGSCAMNINGGNTLACTRRIDTNLSKVSKIY--PLPHM
57   HMQTYEIDLNN-CGPMVLDALIKIKNEIDSTLTFRRSCREGICGSCAMNINGGNTLACTRRIDTNLSKVSKIY--PLPHM
57   HMQTYEIDLNN-CGPMVLDALIKIKNEIDSTLTFRRSCREGICGSCAMNINGGNTLACTRRIDTNLDKVSKIY--PLPHM
57   HMQTYEVDLNK-CGPMVLDALIKIKNEVDSTLTFRRSCREGICGSCAMNINGGNTLACTRRIDTNLNKVSKIY--PLPHM
                                                                  ▼  ▼▼
102  YVIKDLVPDLTHFYKQYKSIEPYLKKKNVP--KDGDRENLQSIADRKKLDGLYECILCACCSTSCPSYWWNSDEYLGPAV
159  YVVKDIVPDLTQFYKQYKSIKPYLQHTDPAp--EGK-EYLQSKEDRKKLDGLYECILCACCSTSCPSYWWNSEEYLGPAI
120  PVVKDLVPDLTNFYAQHRSIEPWLKTVSPAp----AKEWKQSHEDRQKLDGLYECILCACCSTSCPSYWWNGDRYLGPAV
158  YVVKDLVPDMTQFYKQYKSIKPYLQRDTAPp--DGK-ENRQSVADRKKLDGLYECILCACCSTSCPSYWWNSEEYLGPAV
77   YVVKDLVPDMTNFYEQYRSIEPYLKKKTEV--EYGKEQYLQSIEDRKKLDGLYECILCACCSTSCPSYWWNGDKYLGPAV
139  FVIKDLVVDMTNFYNQYKSIEPWLKRKSPAe--EDGKEIKQSKKDRAKLDGMYECILCACCSTSCPSYWWNPESYLGPAA
141  YVVRDLVPDMNNFYEQYRNIQPWLQRKNEAgeKKGKAQYLQSVEDRSKLDGLYECILCACCSTSCPSYWWNAEKYLGPAV
99   PVIRDLVVDMSQFYTQYEKVKPYLINDSKLp---PAGEFLQSPEERAKLDGLYECILCACCSTSCPSFWWNPDKFIGPAG
118  YVIRDLVVDMTHFFNGYDSIRPYLIRHDRQk-KLGSHQYAQSIEDNNKLVGLYECVLCACCSTSCPSYWWNGRRFLGPAT
147  FVVKDLVPDMNLFYAQYASIQPWIQKKTPL--TLGEKQMHQSVAERDRLDGLYECILCACCSTSCPSYWWNADKYLGPAV
174  YVIRDLVTDLEQYLKQYKNIEPFLKRTGEDn-YVGLRQILQSPRDRDKLNGLYECILCGCCTFACPPYWWLGDKFLGPST
136  YVVKDLVPDLSNFYAQYKSIEPYLKKKDKS--QQGKEQYLQSIEDRDKLDGLYECILCACCSTSCPSYWWNADKYLGPAV
133  YVVKDLVPDMSNFYAQYKSIEPYLKKKDES--QQGKQQYLQSVEDRQKLDGLYECILCACCSTSCPSYWWNADKYLGPAV
136  YVVKDLVPDMSNFYAQYKSIEPYLKKKDET--NEGKEQYHQTVEDRQKLDGLYECILCACCSTSCPSYWWNGDKYLGPAV
134  YVIKDLVPDLNNFYAQYKSIEPYLKKKDES--QEGKKQYLQSIEDREKLDGLYECILCACCSTSCPSYWWNGDKYLGPAV
125  YVIKDLVPDLSNFYAQYKSIEPYLKKKDES--QGGKQQYLQSIEEREKLDGLYECILCACCSTSCPSYWWNGDKYLGPAV
144  YVVKDLVPDLSNFYAQYKSIEPYLKKKDES--KQGKEQYLQSIEDRQKLDGLYECILCACCSTSCPSYWWNGDKYLGPAV
135  YVIKDLVPDLSNFYAQYKSIEPYLKKKDES--QEGKQQYLQSIEDREKLDGLYECILCACCSTSCPSYWWNGDKYLGPAV
134  YVIKDLVPDLSNFYAQYKSIEPYLKKKDES--QEGKQQYLQSIEDREKLDGLYECILCACCSTSCPSYWWNGDKYLGPAV
134  YVIKDLVPDLSNFYAQYKSIEPYLKKKDES--QGGKEQYLQSIEDREKLDGLYECILCACCSTSCPSYWWNGDKYLGPAV
134  YVIKDLVPDLSNFYAQYKSIEPYLKKKDES--QEGKQQYLQSIEEREKLDGLYECILCACCSTSCPSYWWNGDKYLGPAV
134  YVIKDLVPDLSNFYAQYKSIEPYLKKKDES--QEGKQQYLQSIEEREKLDGLYECILCACCSTSCPSYWWNGDKYLGPAV
                                  ▼                                ▲  ▲▲
180  LLQAYRWMIDSRDDYSSERREAL-QNPFSVYRCHTIMNCANTCPKGLNPGHAIAMIKRDMALD-------
235  LLQSYRWLADSRDQKKEERKAAL-DNSMSLYRCHTILNCSRTCPKGLNPGLAIAEIKKEMAF--------
196  LLQAYRWLIDSRDEATGERLDNL-EDPFRLYRCHTIMNCAQTCPKGLNPAKAIAEIKKMMVERRV-----
235  LLQSYRWINDSRDEKTAQRKDAL-NNSMSLYRCHTILNCSRTCPKGLNPALAIAEIKKSMAFTG------
155  LMQAYRWMIDSRDDYTEERLEKLdSDPFKVYRCHTIMNCTKTCPKGLNPGKAIGEIKKMLASYQSKKAAT[ 1]
217  LLHANRWISDSRDEYTKERLEAI-NDEFKLYRCHTILNCARACPKGLNPGKQIAHIKSLQPKA-------
221  LMQAYRWIIDSRDENSAERLNKL-KDPFSVYRCHTIMNCTRTCPKGLNPGRAIAEIKKLLSGLASKPAPK[ 8]
```

```
176  LLHAYRFLADSRDTATEQRLNDL-DDAFSVFRCHGIMNCVNVCPKGLNPTKAIGQIKSMLLNRAL-----
197  LLHAYRWIIDSRDQDSEARLYDL-KDDFAVFRCHTIMNCTLACPKGLAPHDYIARLKHLISRISKKPQPS[11]
225  LMQAYRWVIDSRDDYATERLHRM-HDSFSAFKCHTIMNCTKTCPKHLNPAKAIGEIKSLLTGFTSKPAAE[ 4]
253  LLQAYRWIIDSRDMGHKERLTKL-RDYYSVYRCHTIFNCTKTCPKGLNPGKAVAQIKRLLAGLAKKDRPD[20]
214  LMQAYRWMIDSRDDFTEERLSKL-QDPFSLYRCHTIMNCTRTCPKGLNPGKAIAEIKKMMAMYKERAVSA
211  LMQAYRWMIDSRDDFTEDRLSKL-QDPFSLYRCHTIMNCTRTCPKGLNPGKAIAEIKKMMVTYKQKDAVA[ 1]
214  LMQAYRWMIDSRDEFTEERLSQL-QDPFSLYRCHTIMNCTRTCPKGLNPGLAIAEIKKMMAMYKEKRAAA
212  LMQAYRWMIDSRDDFTEERLAKL-QDPFSLYRCHTIMNCTKTCPKGLNPGKAIAEIKKMMATYKEKKASA
203  LMQAYRWMIDSRDDFTEERLAKL-QDPFSLYRCHTIMNCTRTCPKG------------------------
222  LMQAYRWMIDSRDDYTEERLAQL-QDPFSLYRCHTIMNCTRTCPKGLNPGKAIAEIKKMMATYKEKAAAA
213  LMQAYRWMIDSRDDFTEERLAKL-QDPFSLYRCHTIMNCTRTCPKGLNPGKAIAEIKKMMATYKGKKASV
212  LMQAYRWMIDSRDDFTEERLAKL-QDPFSLYRCHTIMNCTRTCPKGLNPGKAIAEIKKMMATYKGKKASV
212  LMQAYRWMIDSRDDFTEERLAKL-QDPFSLYRCHTIMNCTRTCPKGLNPGKAIAEIKKMMATYKEKQASA
212  LMQAYRWMIDSRDDFTEERLAKL-QDPFSLYRCHTIMNCTGTCPKGLNPGKAIAEIKKMMATYKEKKASA
212  LMQAYRWMIDSRDDFTEERLAKL-QDPFSLYRCHTIMNCTRTCPKGLNPGKAIAEIKKMMATYKEKKASV
```

Supplément Figure 2C ***- les acides aminés de la sous-unité SDHC***



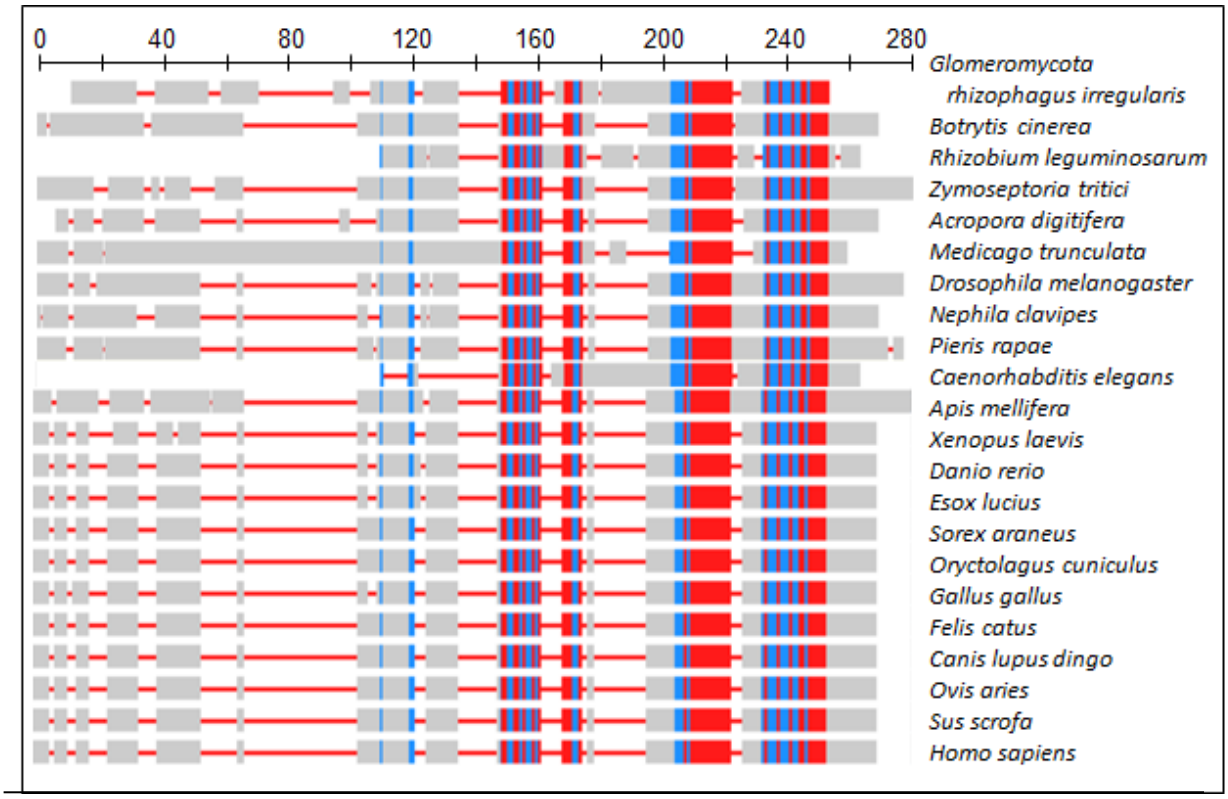

```
1    [19]-RTSMTRNGVF    SILKRN-    --TRQDTTSATSQGTSQEEI--    -LVSQR-AK    RPLSPFM-IYQPQ
1    [22]SQLAMRKLAAP    AAIGAS-    MQTRPVATQKLTPKDSYN-I--    -LVEQR-KL    RPVAPHLTIYQPQ
1        -----------    -------    ----------------------    --MANVTNN    RPLSPHLQIYKPI
1    [21]------RFATP    AAIALGN[4]QQRRQVTAAAVSESHARNEI--    -LAKQR-LN    RPVAPHLAIYKPQ
1    [20]SSVLTRRCLRP    SCLLMRS    ---TTITTSSLV----RSEE--[1]FWSKNSRLK    RPMSPHLTVYKPQ
1    [22]TFSSIPRSTGS[48]NSLRYQA[4]TNVLAGARYGTQVSGTKSPMLL[4]LMARNIERG[30]RPLSPHLPVYQPQ
1    [ 9]RSPA-LRQGLQ    MAAASRP    ---VSMKVVSVA--ETQKDE--[1]FFEKNERLG    RELSPHLTIYQPQ
1        --------MSA    FLILSSH    ---LPVTTSAAR----VATE--[1]FFEKNERLK    RPLSPHLSIYKLQ
1    [15]GSVAKLRPALR    TAQYASS    ---ATVPKISFKPYEPPKDE--[1]FDVKNERLN    RPMSPHLTIYKPQ
1    [ 8]----LCRLGAR    SSISRS-    -----FGTSIVTKSEAKTPIQK[4]YLLKQRSKN    RPIAPHLTVYQPQ
1    [ 9]SRRCIDPCTFR    NFYTCSS    ---RNIAVSKPLFKETTICE--[1]HDEKNLRLK    RPLSPHLTIYQIQ
1        MAALFLRHAGR    QCLRTQL    SPLLGARHVVPMGTTAQQEMER    FWNKNNRLS    RPLSPHMTVYKWS
```

```
1          -----------    -------   ---MLFQ----WGLHLMRKWTS   FGQKNTRLN    RPMSPHMTIYKWS
1          MALFLRSLTRQ    GTCLSRS   QFGVLYRHAVPMGTTAKEEMNK   FWAKNNKLN    RPMSPHVTVYKWS
1          --VLSCRHVGR    HCLRAHV   GPRLCIQNAAAMGTTAKEEMER   FWRKNMGSN    RPMSPHITIYSWS
1          MAALLLRHVGR    HCLRAHL   SPQLCIRNAVPLGTTAKEEMER   FWNKNTSSN    RPLSPHITIYSWS
1      [19]VQRDELRCVAR    RCLLARL   SPGPSVHHVVPMATTAKEEMAR   FWEKNTKSS    RPLSPHISIYKWS
1          MAALLLRQVGH    HCLRAHL   SPQRCIRNAVPLGTTAKEEMER   FWNKNAGLN    RPLSPHITIYSWS
1          MAALLSRHVGR    HCLRAHL   SPQLCIRNAVPLGTTAKEEMER   FWNKNTDLN    RPLSPHITIYSWS
1          MAALLLRHVGR    HCLRAHL   SPQLCIRNAVPLGTTAKEEMER   FWKKNTSSN    RPLSPHISIYSWS
1          MAALLLRHVGR    HCLRAHL   SPQLCIRNAVPLGTTAKEEMER   FWNKNLGSN    RPLSPHITIYRWS
1          MAVLLLRHVGR    HCLRAHF   SPQLCIRNAVPLGTTAKEEMER   FWNKNIGSN    RPLSPHITIYSWS

73   LTWYMSFAHRATGAGLAAGLYGTI    AA   YAFGGP   DSDTLVAAVSTL--PPTLKLAGKFCISYAFTYHTFNGI
78   IPWIMSGLNRITGCILSGGFYVFG    AA   YLASPL[5]DTASMVAAFGAW--PLAAKFLAKFTLAMPFTYHSFNGL
21   PTMVMSIVHRITGGALYVGTVLVA    WW   LIAAAS[3]---SYD--WANWVLGSLLGKLVLLGYTWALLHHMLGGF
78   ITWYLSALNRVTGVAASGAFYAFG    LL   YLAAPS[5]ESAALAASFGAW--PVLLQVLTKTILALPVTFHSLNGV
75   LTSMLSITHRGTGIAMTAVTVSFA    LA   ALALPG   NFEHYLGLVKALEIPAWIIFSGKTVLAWPLSYHSFNGI
171  LSSTLSICNRIAGAFLAAVTLLFY[ 5]VG   ---LVG[1]---TFDPFYQFVFYSSKLHLLAIEISALAMSYHLYSAI
65   LTSMLSICHRGTGLALGVGVWGLG    LG   ALISSH   DISHYVTMVEGLQLSGATLTALKFIIAYPAGYHTANGI
47   ITTLLSVTHRATGIVLSGGLYAFS    IG   MLALPG   HFPYYFEYFQTLHIAAPIIFSLKFALAWTTLYHSANGI
74   LTSLLSVTHRAAGMLLSGYITALG    VG   ALVLPN   DVAHYVTMIEGLNLSPATIFLAKACLAAPLGYHFANGI
65   LTWMLSGFHRISGCVMAGTLLVGG    IG   FAVLP-[1]DFTAFVDFIRSWNLPCAVTAVFKYIIAFPIIFHTLNGI
68   LTAFLSITHRTTGMILSSYAMLFG    IG   TLLIPG   GIPCLIEIISELGLSAPVLFVGKTLLALPATYHTFNGL
63   LPMAMSIIHRGTGVAMSAGVSMFG    LA   ALVLPG   DFASYLELVKSLSLGPALIYSAKFALAFPLAYHTWNGV
38   VPMAMSISHRGTGIALSSGISAFA    LA   ALVLPE   SYPYYLDLIHSLTFGPQFLAFSKFALAFPVVYHTYNGI
63   VPMMMSISHRGTGLGLSAGVSAFA    LL   ALVLPG   SYPYYLDLIHSQSFGPALIGLAKFGIAFPLSYHTFNGI
61   LPMMMSICHRGTGVALSAGVSLFG    LS   ALLVPG   NFESHLELLRSLSLGPALIHSAKFALAFPLMYHTWNGV
63   LPMAMSICHRGTGVALSAGVSLFG    LS   ALLLPG   NFESYLELVKSLSLGPALVHTAKFALVFPLMYHTWNGV
82   LPMAMSITHRGTGVALSLGVCTSG[27]VS[5]ALLLPE   QFPHYVAVVKSLSLSPALIYSAKFALVFPLSYHTWNGI
63   LPMAMSICHRGTGMALSAGVSLFG    LS   ALLVPG   NFESHLELVKSLCLGPSLIYTAKFALVFPLMYHTWNGI
63   LPMAMSICHRGTGVALSAGVSLFG    LS   ALLVPG   NFESHLELVKSLCLGPSLIYTAKFALVFPLMYHTWNGI
63   LPMAMSICHRGTGIALSAGVSLFG    LS   ALLVPG   SFESHLEFVKSLCLGPALIHTAKFALVFPLMYHTWNGI
63   LPMAMSICHRGTGIALSAGVSLFG    LS   ALLLPG   NFESHLELVKSLCLGPTLIYTAKFGIVFPLMYHTWNGI
63   LPMAMSICHRGTGIALSAGVSLFG    MS   ALLLPG   NFESYLELVKSLCLGPALIHTAKFALVFPLMYHTWNGI

141  RHLIWDTGKALTIK-GVYGTGYAVLILSTLSSIVLSVI
151  RHLAWDMGKTFKNA-TVVKTGWTVVGLSVGSALALVAF[ 1]
89   RHFMWDLGYGFGKE-FSTKLAIANIIGSLCLTVLVWVI[ 6]
151  RHLVWDTASMITNK-QVQTTGWTVVGLSVASALGLAFL
145  RHLAWDLGYGFDIG-ILYKSGWFVFFGSILAAASLAYF[ 1]
241  RHLFI--------------------------------
135  RHLLWDTGRFLKIK-EVYSTGYAMVATSFVLSAILALL
117  RHLPTSNCKLFL-------------------------
144  RHLYWDTAKGLTIK-EVYSTGYAMLAGAVAISLFLAAL
135  RFLGFDLAKGVNNVgQIYKSGYLVSGLSAILALAIVFN[10]
138  RHLAWDLGMFLTIK-EVYSTGYAVIALSAISAIALAAL
133  RHLIWDLGKGFKIP-QLYQSGITVLALTLITAVGLAAM
108  RHLAWDAGKGFKIP-EVYRSGYVVLGLTVLTSIGLAAM
133  RHLCWDSGKGFKIP-EVYGSGYTVIVLTVLTTIAAVAY[ 4]
131  RHLMWDLGKGLKIP-QLYQSGVAVLVLTVLTSAGLAAL
133  RHLMWDLGKGLKIP-QLYQSGVAVLVLTVLSSVGLAAM
184  RHLVWDMGKGFKLS-QVEQSGVVVLILTLLSSAAIAAM
133  RHLMWDLGKGLKIP-QLYQSGVAVLVLTVLSSVGLAAM
133  RHLIWDLGKGLKIP-QLYQSGVAVLVLTVLSSVGLAAM
133  RHLMWDLGKGLTIS-QLHQSGVAVLVLTVLSSVGLAAM
133  RHLIWDLGKGLTIP-QLTQSGVVVLILTVLSSVGLAAM
133  RHLMWDLGKGLKIP-QLYQSGVVVLVLTVLSSIGLAAI
```

Supplément Figure 2D ***- les acides aminés de la sous-unité SDHD***




```
1    ---------------mYSTS[6]AAGSSSLLRT   SMTRNGVFSILKRN[ 1]RQ[17]----SQRAKRPLSPFMIYQP
1    --MASF-i-KPSVirqTCLA[6]STKIPSSFPA[3]PAGRSTFVRDALPG[12]QS    ILPPLPQSIDGTSNDAAAVP
1    --------------------   ----------   --------------    --    -------MDMRTPLGKVRGL
1    --MASTAl-RPAAlrqLLTA[2]-TKRASTLPA[3]L--RTQFTQRS---[ 7]RP    ILPPLPQVIRGGVNDPAPVK
1    --MAAVMcaRLGF--rISRP   ------LARS[3]PIFAPSSISSCPRV    QS    VFF---KKTIHSSANHNTEL
1    --MQSVAl-KLGK--rLSNS[5]RISPNFIAHA[6]PSPPSPPISAAENA[12]AP[37]SLEGTGKAAIKVPPHTVAGY
1    msLSLLL--RGAV---RCNA[4]KSARITPLKS[6]NVQRKAVVQPLAVA    KI    VAPV--VREISVSAPRMA-S
1    --MIAVF--NVAR--nNCRG[6]QSKAQSLSNG   NLVAQKEIS-LLKQ    KP    TALFSTSHRLCAAAAAHD--
1    --MAFSMffRAPA----CTG[5]QIMRLATKPV[6]SSIMPLQTS-FRKS    DT    TPILNAVRSFRTSPALLHGE
1    --------------------   ----------   --------------    --    -------M--------LSG-
1    miLKSVAs--PSIfhkVRQL[3]-SKTTLFANS[4]QFTRKSSNFAIFKQ[11]QL    LKFPTNTIILNTEITRKTST
1    --MVTVL--RLSS---LCRA   --NRASAFKS   LLIRP--VPCLSQD    LH    TVQ---TSQIHTSQNHHA--
1    --MAALV--RISS---LCHR   GVSPLLFRPS   SLIRPLAVQQKDHD    CS    YLI---SARIHATPSNYAGS
1    --MAAIV--RISS---LCHR   GVKPLFHRSS   LLLRPLGVQQKDQD    RP    YQL---TARIHGSPSLYSGS
1    --MAVLW--RLGV---LCGA   QGGRALLLRS   QVVRPACVSAFLQD    PS    SVRYCGVQNIHLSPSRHA--
1    --MATLG--RLSV---LCGA   QGSRAVFLRS   LVVRPTHVAAFLQD    RP    SPGWCGVQHIHLSPSRHS--
1    --MAALV--LLRA--gLARP   RGVPTALLRG   TLLRHSAVLTAAAD    RS    APA---RQSHGGAPQGHG--
1    --MANLW--RLGV---LCRA   QGGRALFLRI   PVVRPAYVSAFLQD    QP    APGQCRTQHIHLSPNHHA--
1    --MASLW--RLSV---LCGA   QGGRALFLRI   PVVRPAHVSAFLQD    QP    APGWCRTQHIHLSPNHYS--
1    --MATLW--RLSV---LCGV   REGRALLLRT   PVVRPALVSAFLQG    RP    AQGWCGTQHIHLSPSHRS--
1    --MATLW--RLSV---LCGA   RGGGALVLRT   SVVRPAHVSAFLQD    RH    TPGWCGVQHIHLSPSHQA--
1    --MAVLW--RLSA---VCGA   LGGRALLLRT   PVVRPAHISAFLQD    RP    IPEWCGVQHIHLSPSHHS--
```

```
72   q---LTWYMSFA    -HRATGAGLAAGLY[3]AAYAFGgpDS[16]AGKFCISYAFTYHTFNGIRHLIWDTGK[1]LTI
67   kpSPSHGSYHWT    FERLIAVGLVPLTV   APFVSGslNP    ATDALLCAAILIRSHIGFESCITDYFP[3]VPK
14   g-SAKEGTSHFW    RQRLTAVSNIPLIL[7]AYAGAPy---[13]VVMGLMVISGVIHMKLGMQVIIEDYVH[2]FGK
70   epSPSHGSYHWT    MERLVSAALIPLTI   VPFAAGslNP    VLDGTFIGMIIIHSYIGFQSAITDYFP[3]VPK
57   eiAPSQPSSHWK    FERYVSVAMLTLIP   TGIIYP--SA    AVDWALAVVVPIHNHWGVGQVLTDYIH   GST
122  atAATAGEVDIK[13]TKREQLLKVTAAVP   LLLIYPnaYS[ 7]---------IFWHINAGIEEILADYVH   ---
69   --AGSSHTLLWT    VERIVSAGLLAVIP   AAFIAP--SQ    VLDALMAISVVIHTHWGVEAMVVDYMR[4]GNV
64   ----HSHSRIWT    AERFLSAALIGILP   AAVAFP--NP    VLDYVLALSMTVHVHWGIEAIVVDYVR[4]GAV
71   k--AHDHSKLWV    IEKVTSAALVPLIP   ICLMIP--NK    LFDSVLAILITAHSFWGLEAIAVDYVR[4]GPI
5    ------------    FHRISGCVMAGTLL[4]GFAVLPfdFT[17]VFKYIIAFPIIFHTLNGIRFLGFDLAK[2]NNV
82   t--ASDHVRMWI    LEKIASAALPVIIP   VALTME--NV    ICDGLMSLLIVIHMHWGLEAIITDYAR[4]GPL
51   --ASKAASLHWT    SERALSVALLGLLP   AAYLYP--GA    AVDYSLAAALTLHGHWGLGQVVTDYVH   GDA
57   --GSKAATMHWT    GERILSIALLSLAP   VAYFCP--SP    AVDYSLAAALTLHGHWGLGQVVTDYVH   GDA
57   --GSKAASLHWT    GERVVSVMLLALGP   AAYYIP--GP    AIDYSLAAAITLHSHWGIGQVLTDYIH   GES
58   --GSKAASLHWT    SERVVSVLLLGLLP   AAYLSP--CS    AIDYSLAATLSLHSHWGLGQVVTDYVP   GAT
58   --GSKAASLHWT    GERVVSVLLLGLLP   AAYLNP--CS    AMDYSLAAVLSLHSHWGLGQVVTDYVH   GDA
56   --SSKAASLHWT    SERAVSALLLGLLP   AAYLYP--GP    AVDYSLAAALTLHGHWGLGQVITDYVH   GDT
58   --GSKASSLHWT    GERVVSVLLLGLIP   AAYLNP--SS    AMDYSLAAALTLHSHWGLGQVVTDYVH   GDA
58   --GSKAASLHWT    GERVVSVLLLGLIP   AAYLNP--GS    AMDYSLAAALTLHSHWGLGQVVTDYVR   GDG
58   --GSKAASLHWT    GERVVSVLLLGLIP   AAYLNP--CS    AMDYSLAATLTLHSHWGIGQVVTDYVH   GDA
58   --SSKAASLHWT    GERVVSVLLLGLLP   AAYLNP--CS    AMDYSLAAALTLHGHWGIGQVVTDYVR   GDA
58   --GSKAASLHWT    SERVVSVLLLGLLP   AAYLNP--CS    AMDYSLAAALTLHGHWGLGQVVTDYVH   GDA
```

```
154  KGVYGTGYAVLILSTLSSIVLSVI----------------
136  TKAFLWWGLRGATVLVGVGLYEFETNDVGVTEGIKRIWRA
98   ---IALLMLNTFFAIVIAGLCLFAIL--KIAFVG------
139  TRKLADWANVAAVFLVGWGWYEFETNDIGLTAGIARVWTA[15]
121  MPKLAKGLWLAVSILQFIGLCYFNYTDVGICKAVCMIWHM
196  HEMTREFVLISLRLFLIIAIKDVFLNFVFV----------
135  LPKVAHIALIIISVATLGGLFYFIQNDVGLANGIKRFWAI[ 8]
128  LSKAAVATVYALSVLTLGGLFYFNYTDVGLSQAIRMLWKL
137  IPKIAIALVYLISIATLGGLFYLISNDVGMSNAIRQLWGV[ 6]
82   GQIYKSGYLVSGLSAILALAIVFNSCQNKSNKTA------
148  LPKLLHLSLIFLSAITLCGLFLLINNGPGVSKAIKEAWAI[14]
113  KIKLANTSLFALSALTFAGLCYFNYHDVGICKAVAMLWSL
119  KIKMANAGLFVLSTVTFAGLCYFNYHDVGICKAVALLWSK
119  KIKVANACLFLLSTVTFAGLCYFNHNDVGICKAVALLWSK
120  TQKAAKAGVLALSALTFAGLCYFNYHDVGICKAVAMLWKL
120  PQKAAKAGLLALSALTFAGLCYFNYHDVGICKAVAMLWKL
118  PIKVANTGLYVLSAITFTGLCYFNYYDVGICKAVAMLWSI
120  LQKTAKAGVLALSALTFAGLCYFNYHDVGICKAVAMLWKL
120  LQRAVKAGVLALSALTFAGLCYFNYHDVGICKAVAILWKL
120  VQKAAKTGLLVLSAFTFAGLCYFNYHDVGICKAVAMLWKL
120  LQKAAKAGLLALSAFTFAGLCYFNYHDVGICKAVAMLWKL
120  LQKAAKAGLLALSALTFAGLCYFNYHDVGICKAVAMLWKL
```

Supplément Figure 2. ***Analyse de la composition en acides aminés des sous-unités B, C et D de la succinate déshydrogénase***

A*, Liste des 22 organismes sélectionnés pour l'alignement avec les références de chaque séquence de protéine telle que déposée dans la base de données du NCBI.* ***B, C, D,*** *pour chaque sous-unité, la représentation graphique illustre la conservation (indiquée en rouge) de la sous-unité parmi les 22 espèces sélectionnées, suivie de l'alignement montrant les acides aminés présents aux positions (fond gris / flèches noires) supposés impliqués dans la résistance des champignons aux SDHI et/ou dans la liaison au Conzyme Q (Fig 6) [29]. L'alignement a été effectué à l'aide de l'outil d'alignement de séquences multiples COBALT (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi).*