

Année 2012

Thèse n°2002

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Ecole doctorale

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Biochimie

Présentée et soutenue publiquement

Le 17 décembre 2012

Par Fabien Moretto

Né le 05 mai 1985 à Cenon

**Mise en évidence d'une nouvelle voie impliquée dans
l'homéostasie de la taille cellulaire chez *S. cerevisiae*.**

Membres du Jury

Mr Jean-Paul JAVERZAT, Directeur de Recherche CNRS Bordeaux
Mr Pierre Antoine DEFOSSEZ, Directeur de Recherche CNRS Paris
Mme Micheline FROMONT-RACINE, Directeur de Recherche CNRS Paris
Mr Benoît PINSON, Chargé de Recherche CNRS Bordeaux

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse

A matter of size...



GIANT SKRYMIR AND THOR.

[...] From what has already been demonstrated, you can plainly see the impossibility of increasing the size of structures to vast dimensions either in art or in nature; likewise the impossibility of building ships, palaces, or temples of enormous size in such a way that their oars, yards, beams, iron-bolts, and, in short, all their other parts will hold together; nor can nature produce trees of extraordinary size because the branches would break down under their own weight; so also it would be impossible to build up the bony structures of men, horses, or other animals so as to hold together and perform their normal functions if these animals were to be increased enormously in height; for this increase in height can be accomplished only by employing a material which is harder and stronger than usual, or by enlarging the size of the bones, thus changing their shape until the form and appearance of the animals suggest a monstrosity. This is perhaps what our wise Poet* had in mind, when he says, in describing a huge giant: * Ludovico Ariosto in Orlando Furioso

“Impossible it is to reckon his height,

So beyond measure is his size.”

[...] Please observe, gentlemen, how facts which at first seem improbable will, even on scant explanation, drop the cloak which has hidden them and stand forth in naked and simple beauty. ***Who does not know that a horse falling from a height of three or four cubits will break his bones, while a dog falling from the same height or a cat from a height of eight or ten cubits will suffer no injury? Equally harmless would be the fall of a grasshopper from a tower or the fall of an ant from the distance of the moon. Do not children fall with impunity from heights which would cost their elders a broken leg or perhaps a fractured skull? And just as smaller animals are proportionately stronger and more robust than the larger, so also smaller plants are able to stand up better than larger. I am certain you both know that an oak two hundred cubits [braccia] high would not be able to sustain its own branches if they were distributed as in a tree of ordinary size; and that nature cannot produce a horse as large as twenty ordinary horses or a giant ten times taller than an ordinary man unless by miracle or by greatly altering the proportions of his limbs and especially of his bones, which would have to be considerably enlarged over the ordinary.*** **Gallileo Gallilei 1636 “Discours sur deux nouvelles sciences ».**

REMERCIEMENTS

Que le lecteur sache que les personnes m'ayant accueilli, encadré, encouragé, soutenu et « stimulé » durant ces trois années de thèse ont été (ou le seront) chaleureusement remerciées de vive voix.

Que le lecteur curieux sache lui, que je remercie tout particulièrement :

Benoît Pinson pour la qualité de son encadrement, son enthousiasme et surtout sa disponibilité infaillible...

Bertrand Daignan-Fornier, pour ses conseils, ses commentaires et son enthousiasme (oui, il est possible de trouver au sein d'une même équipe deux personnes positives...).

Je mesure grâce à vous le progrès que j'ai effectué, mais surtout le travail restant...
La joie doit être dans cette marge !

Merci,

fabien Moretto.

SOMMAIRE :

I Avant-propos	11
I Avant propos : Digression sur le sujet de la taille des individus d'une espèce.	12
II Introduction	19
II Homéostasie de la taille des cellules, prolifération versus croissance.	21
II 1) Agents mitogènes et facteurs de croissance, contrôle de la taille chez les métazoaires.	23
a) Facteurs de croissance : stimulation de la biogénèse des ribosomes.	25
b) Incidence de la prolifération cellulaire sur la taille des organismes	28
II 2) Rôle de la ploïdie dans le contrôle de la taille cellulaire.	30
II 3) Apports des modèles unicellulaires dans l'étude de l'homéostasie de la taille des cellules.	36
a) <i>S. pombe</i> , mutants wee et « cell sizer » géométrique.	38
b) Exemple de cell sizer métabolique chez <i>B. subtilis</i> : importance de la disponibilité des nutriments pour le contrôle de la taille.	41
c) Le modèle de la taille critique, exemple chez <i>S. cerevisiae</i> .	45
d) Evidences de l'importance de l'entrée en mitose à la transition G2/M pour l'homéostasie de la taille des cellules.	50
e) <i>S. cerevisiae</i> et le contrôle du start : Cln3p un sizer protéique ?	52
II 4) Apport de l'approche globale dans l'étude du contrôle de la taille des cellules : importance de la biogénèse des ribosomes.	60
II 5) Projet de thèse : Etude de l'homéostasie de la taille des cellules chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	65

Résultats

Chapitre I **69**

III Approche gène candidat dans l'étude de l'homéostasie de la taille des cellules: le gène PRS3. **71**

III 1) Le complexe Prs1p/Prs3p est nécessaire au maintien de la taille des cellules. 72

III 2) L'activité de biosynthèse du PRPP est critique pour l'homéostasie de la taille cellulaire. 76

III 3) Les phénotypes de prolifération et de taille de prs3 sont complémentés par l'ajout des molécules PRPP dépendantes. 81

III 4) Etude transcriptomique des effets d'un traitement au NmR sur une souche sauvage. 86

III 5) Discussion 93

Chapitre II **97**

IV Identification d'une nouvelle voie affectant l'homéostasie de la taille des cellules chez *S. cerevisiae*. **99**

Article de recherche **107**

Introduction 110

Results 114

Cell size homeostasis is affected in a sir2 mutant **114**

Mutants affecting the large ribosomal subunit are whi and epistatic to sir2 **117**

The transcription factors swi4 and swi6 act downstream the Sir2-60S pathway and connect it to the cell cycle **124**

The Sir2/60S pathway is distinct from ploidy and nutritional control of cell size **130**

Cell size and replicative aging **132**

Discussion 136

Cell size, a complex quantitative trait **136**

The Sir2/60S pathway and the cell cycle **137**

<i>Is there a connection between yeast cell size and aging?</i>	138
Materials and Methods	140
Littérature cited	141
V Discussion-Perspectives	157
VI Matériels et Méthodes	159
VII Bibliographie	167
VIII Annexes	171

AVANT-PROPOS

I Avant propos : Digression sur le sujet de la taille des individus d'une espèce.

La taille : Une question d'échelle.

Au sein du vivant la taille des organismes varie énormément : de l'ARMAN un organisme unicellulaire de la lignée des *archae* de $0.006 \mu\text{m}^3$ de volume (Baker science 2006), à la baleine bleue *Balaenoptera musculus* de 30 mètres de long ou bien encore au champignon *Armillaria bulbosa* qui s'étend sur près de 890 hectares (Maheshwari, 2005), les exemples étayant cette diversité ne manquent pas. En revanche à l'opposé de cette variété inter-espèce l'on trouve intra-espèce une étonnante uniformité de taille et n'en déplaise aux fourmis géantes de la fiction, cette taille constitue un paramètre essentiel pour l'individu. Attardons nous quelques instants sur les avantages et les inconvénients de la variation de la taille d'un individu.

Dans son essai « *On being the right size* » datant de 1926, le généticien J. B. S. Haldane s'attarda sur le problème des géants bibliques : en prenant l'exemple d'un homme dont on augmenterait la taille de dix fois, de telle façon qu'il serait ainsi dix fois plus grand, plus large et plus épais. Sa masse serait alors non pas de dix fois

celle d'un homme moyen, mais bien de mille fois, soit près de 80 tonnes (la masse augmentant au cube de la hauteur). Il lui serait alors impossible de se mouvoir sans risque que ses os se brisent sous son poids : la section de ceux-ci n'aurait en effet augmentée que de cent fois ; chaque cm^2 aurait alors à supporter dix fois plus de masse que dans le cas d'un individu de taille normale, ce qui correspond à la limite de résistance des os humains...

Ainsi la gravité est l'ennemi des « *grandes tailles* ». Prenez un individu humain, ou bien un cheval, jetez-le d'une hauteur de 800 mètres : le résultat est sans appel, la chute lui sera fatale. En revanche pour une souris ou un autre petit mammifère, les chances de survies sont bien plus grandes. Prenez un insecte et elles seront de cent pour cent. Diminuer les dimensions d'un animal de dix fois, sa masse diminuera de mille fois mais sa surface seulement de cent fois. La résistance aux mouvements par l'air lui étant proportionnelle, elle sera dix fois plus grande que la force de chute (le poids).

Ainsi il convient d'être petit pour les acrobaties, ce qu'exploitent parfaitement les insectes : grimper sur les murs, bondir etc. Néanmoins cette modification de la surface ne constitue pas qu'un avantage pour ces organismes. Du fait de la tension de surface, plongez un homme dans l'eau et il sera recouvert d'à peu près 450g d'eau, une souris l'équivalent de sa masse et un insecte plusieurs fois sa propre masse... La mouche mouillée ne pourra ainsi voler.

La taille d'un organisme affecte également sa capacité à absorber les éléments essentiels à sa nutrition. Prenez un ver microscopique tel qu'un rotifère (ou bien un ver tel que *C. elegans*), il absorbe son oxygène directement par son épiderme et sa nourriture par un intestin simple. Augmentez ses dimensions de dix fois, sa masse

sera mille fois plus importante mais sa surface d'épiderme seulement cent fois. Pour que ses muscles puissent développer le même effort il lui faudra assimiler mille fois plus de nutriments et d'oxygène ; soit dix fois plus de nutriment par unité de surface d'intestin et dix fois plus d'oxygène par unité de surface d'épiderme. Arriver aux limites d'absorption d'un système il faut le complexifier. Exemple de l'homme : ses poumons et leur surface d'absorption de 90m², ses intestins courbés dont l'épithélium est pourvu de dendrites afin d'augmenter la surface d'échange des nutriments. Même constat chez les végétaux : entre les algues unicellulaires et les plantes vascularisées pourvues de racines et de feuilles. Et Haldane de conclure : « *Les grands organismes ne sont pas grand car complexes ; ils sont complexes parce qu'ils sont grands. [...] L'anatomie comparative n'est finalement que l'histoire du conflit de l'augmentation de la surface en proportion du volume* ».

Mais la surface n'est pas la seule notion limitant la nutrition : le volume de l'organisme en tant que tel a aussi ses conséquences. Les Vertébrés véhiculent l'oxygène par le sang qui irrigue alors l'ensemble de leur carcasse. Les invertébrés tels que les insectes pompent par leurs muscles moteurs, via des orifices de leur cuticule (les stigmates), l'air ambiant. Les gaz vont alors diffuser passivement dans un réseau de boyaux de plus en plus complexe allant jusqu'à alimenter en gaz la moindre cellule. Ce système est efficace à la seule condition que les gaz n'aient pas à parcourir une grande distance. Et de fait les insectes ne dépassent pas les deux centimètres d'épaisseur. Les grands invertébrés tels que les langoustes ou les limules sont eux pourvus d'un système d'irrigation sanguin hautement plus complexe.

Enfin les grandes tailles ne comportent pas que des inconvénients d'adaptation : l'un des principaux avantages d'une grande taille pour un organisme est la conservation

de la chaleur. Les animaux à sang chaud perdent de la chaleur au repos proportionnellement à leur surface d'épiderme et non par rapport à leur masse. De fait une grande part de l'alimentation d'un petit mammifère partira dans le maintien de la température du noyau interne. De telle sorte qu'une souris consomme près du quart de sa masse chaque jour, près de dix-sept fois plus qu'un homme. Ainsi les petits mammifères ne peuvent survivre dans des conditions de grands froids.

Ces quelques exemples (il en subsiste bien d'autres), étayent le fait que pour chaque type d'animal il existe une taille optimale. La taille est ainsi un caractère essentiel des organismes, se révélant ainsi critique pour qui veut comprendre la biologie de ces mêmes organismes. Les exemples cités précédemment caractérisent une forme d'approche scientifique se concentrant sur la relation de paramètres biologiques et de la taille de l'individu. Ainsi que sur les conséquences de la taille sur l'organisme. Ces sont des études « *d'échelles* » (*scaling*), l'allométrie, étude de la relation mathématique qui existe entre la taille d'un organisme et son anatomie (croissance différentielle de certain os...) ou de sa physiologie (activité métabolique basale...) en est un exemple.

Ces études d'échelles se focalisent sur les phénomènes interspécifiques (liés à l'évolution) ou intra-spécifique (dit alors ontogénétiques, lié au développement complet de l'individu). L'idée étant *in fine* de trouver les règles en lien avec l'influence de la sélection naturelle afin de répondre à la question : « *Pourquoi les organismes sont-ils d'une taille donnée ?* ». Cette question n'est pas nouvelle, de nombreux chercheurs s'y sont intéressés et avaient conscience du lien unissant la taille d'un organisme et sa physiologie. Plus récemment et ce depuis la seconde moitié du 20^{ème} siècle, conjointement à l'avènement de la biologie moléculaire, une autre

approche s'est formulée, cherchant elle, à mettre en avant les processus mécanistiques qui ont pu produire ces schémas inter et intra-spécifiques. La question est ici : « *Comment la taille des organismes est-elle contrôlée ?* » La mise en exergue par cette approche des mécanismes contrôlant, régulant et finalement influençant la taille des cellules durant le développement d'un organe ou d'un organisme, peut également apporter des éléments de réponses concernant les contraintes qui ont agi durant l'évolution de ce caractère. De fait ces deux approches ne sont pas exclusives et il est possible de les relier par l'intégration de ces mêmes phénomènes : à titre d'exemple dans leur étude récente, J. Kozłowski et al. (PNAS 2003) démontrèrent l'existence d'un lien entre la taille des cellules, l'ADN non codant et le métabolisme basal. Partant du constat que le métabolisme basal des cellules est inversement proportionnel à la taille de ces celles-ci, ils proposèrent à l'aide d'un modèle mathématique validé par des données publiées, qu'au sein d'un taxon l'accumulation en ADN non codant et par là, la taille du génome, affecte directement la taille des cellules mais indirectement leur métabolisme basal.

Cette seconde approche, que nous appellerons dorénavant « *contrôle de la taille* », est celle que nous avons employée durant notre étude. Nous nous sommes ainsi intéressé aux mécanismes contrôlant, régulant, la taille d'une cellule eucaryote durant sa croissance et au fur et à mesure de sa prolifération et ce, en utilisant pour modèle la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Cette approche est jeune mais demeure néanmoins riche en exemples d'étude. Dans les pages qui suivront nous nous emploierons à décrire l'état des connaissances du contrôle de la taille cellulaire chez différents organismes modèles procaryote et eucaryote. Pour ces derniers nous ferons la distinction entre les mécanismes étudiés

chez des organismes protozoaires et ceux mis en avant chez les organismes métazoaires où la notion de taille cellulaire sera intimement liée à la notion de taille des organes.

INTRODUCTION

Figure 1

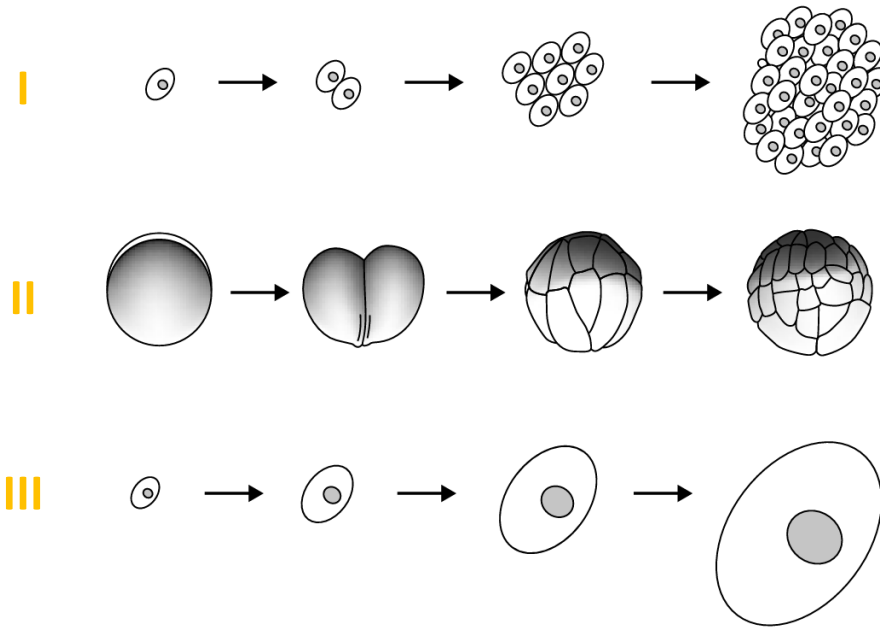


Figure 1:

Exemples de séparation entre la croissance cellulaire et la prolifération. Alors que la plupart des cellules mitotiques (I) couple leur croissance avec leur division, l'embryogénèse précoce (II) implique des événements de divisions sans croissance et l'endoreduplication (III) se produit par un événement de croissance sans division.

Adapté de Saucedo et *al.* 2002

Figure 2

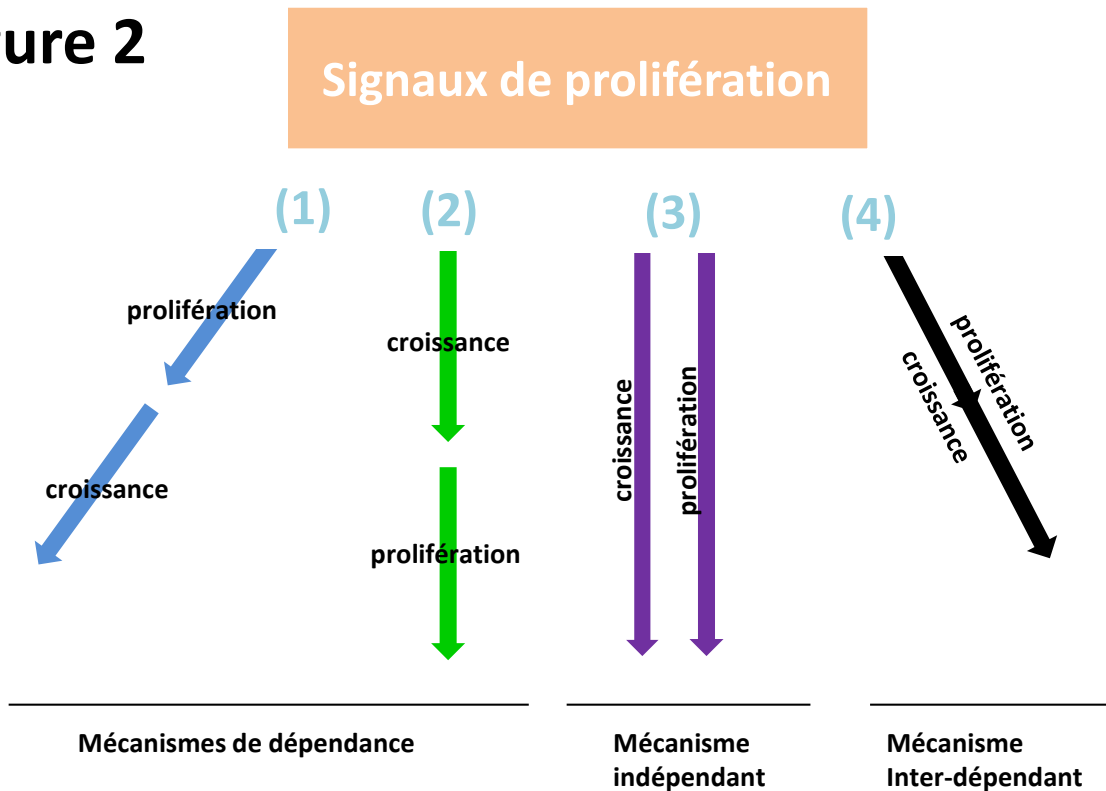


Figure 2:

Mécanismes théoriques illustrant le couplage croissance/prolifération. Le chiffre entre crochets réfère au texte.

Adapté de Neufeld and Edgar, 1998

II Introduction :

Homéostasie de la taille des cellules, prolifération *versus* croissance.

L'homéostasie du volume cellulaire est le fait d'une coordination entre croissance et prolifération. Nous définissons la croissance comme étant le phénomène conduisant à une augmentation du volume cellulaire et la prolifération le phénomène conduisant à l'augmentation du nombre de cellules et faisant appel au mécanisme de la division, dernière étape du cycle cellulaire. Ces deux phénomènes sont, dans les cellules en prolifération, intimement liés. A tel point qu'ils sont rarement *pensés* de façon indépendante, alors qu'il existe des situations où ils peuvent être dissociés. Lors du développement embryonnaire précoce, durant lequel a lieu une succession de divisions sans croissance, ou bien dans le cas de l'endoreduplication, un cycle cellulaire dépourvu de mitose ou s'enchaînent les phases de réplication du génome et constituant un phénomène particulièrement important chez les végétaux au cours duquel les cellules grossissent sans se diviser (Figure 1).

Lorsque la croissance et la prolifération cellulaire sont couplées, ces deux phénomènes peuvent l'être, en théorie, selon différents mécanismes: (1) le cycle cellulaire dépendant de la croissance ; (2) la croissance dépendante du cycle cellulaire ; (3) la croissance et le cycle cellulaire indépendant l'un de l'autre ; (4) un contrôle coordonné de la croissance et du cycle cellulaire (**figure 2**). Chez la plupart des cellules en prolifération, le cycle cellulaire serait dépendant de la croissance. Une carence en nutriment et/ou en facteurs de croissance provoque en effet un arrêt du cycle cellulaire, le plus souvent en phase G1. De plus, cette phase du cycle est prolongée lors de l'inhibition de la traduction ou lors d'une diminution de la disponibilité des nutriments et raccourcie lorsque la croissance est stimulée par des facteurs spécifiques ou en cas de nutriments abondants (Prescott D.M., 1976). A *contrario*, dans un grand nombre de types cellulaires, la croissance ne dépend pas strictement de la prolifération, un arrêt de la division cellulaire (par des agents chimique ou des lésions de l'ADN) n'affecte pas la croissance et la cellule croît alors en taille. De même chez ces cellules, une accélération du cycle cellulaire n'entraîne pas une augmentation de la biomasse mais généralement la formation de petites cellules (Neufeld et *al.*, 1998). Il existe également des exemples de types cellulaires (développement de certains embryons par exemple) où croissance et divisions sont régulées de façon indépendante, chacun par des régulateurs spécifiques. Les agents mitogènes qui stimulent la division, et les facteurs de croissance. Ces agents, sont responsables de la taille finale des organismes pluricellulaires. L'existence de ces agents, dont l'action modèle la forme et la taille finale des organes, complexifie l'étude de la coordination croissance/division des cellules de ces organismes.

En commençant par l'action de ces agents dans le contrôle de la taille des organes et organismes métazoaires, nous allons donner dans les pages qui suivent, un état des lieux de la connaissance des mécanismes de croissance et de division permettant aux cellules de déterminer et de modifier leur volume cellulaire. Les recherches sur ce sujet ont été menées chez de nombreux organismes modèles différents, des bactéries aux souris en passant par les plantes, tous étant soumis au même besoin de contrôler leur taille. Nous passerons donc d'un modèle à l'autre en fonction des questions abordées, et présenterons une vision non exhaustive mais représentative de ce vaste domaine de recherche.

II 1) Agents mitogènes et facteurs de croissance, contrôle de la taille chez les métazoaires.

D'importantes différences existent entre les métazoaires et les protozoaires vis-à-vis de la coordination de la croissance et de la prolifération de leurs cellules. Les organismes unicellulaires sont limités par les nutriments du milieu dans lequel ils se développent et en conséquence se divisent généralement tant qu'il en subsiste. Les cellules des organismes pluricellulaires sont elles en présence d'un excès de nutriments de telle façon que ce sont des signaux extracellulaires qui vont réguler la prolifération et la croissance de ces cellules. Un exemple de la dépendance de ces facteurs a été démontré chez les mammifères avec le cas de lymphocytes ne pouvant importer et métaboliser des nutriments en l'absence du facteur de croissance IL3 (Rathmell et *al.* 2000). Comme résumé en **figure 3**, les nutriments n'ont plus chez les métazoaires la fonction de facteur de croissance qu'ils possèdent

Figure 3

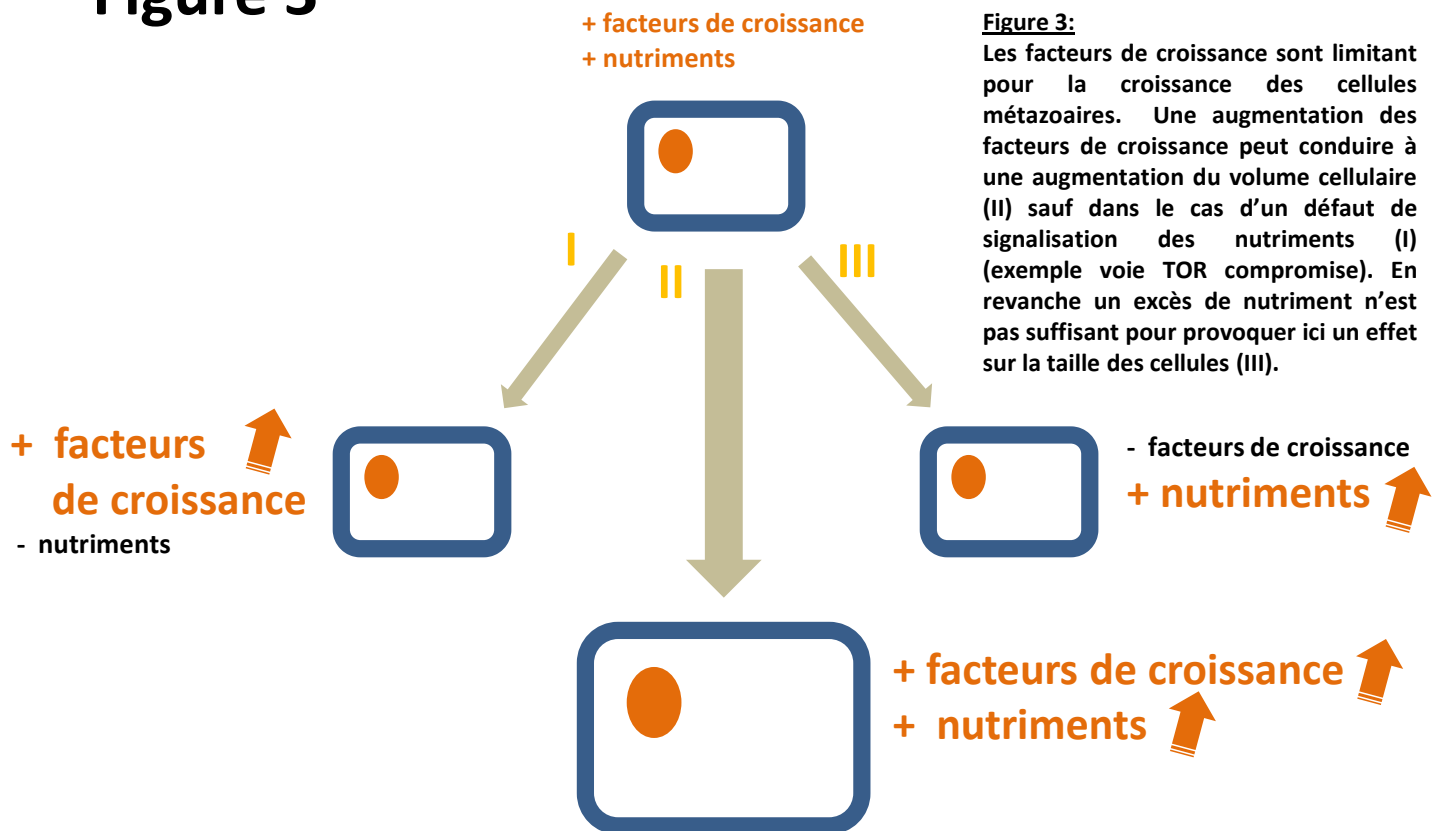


Figure 4

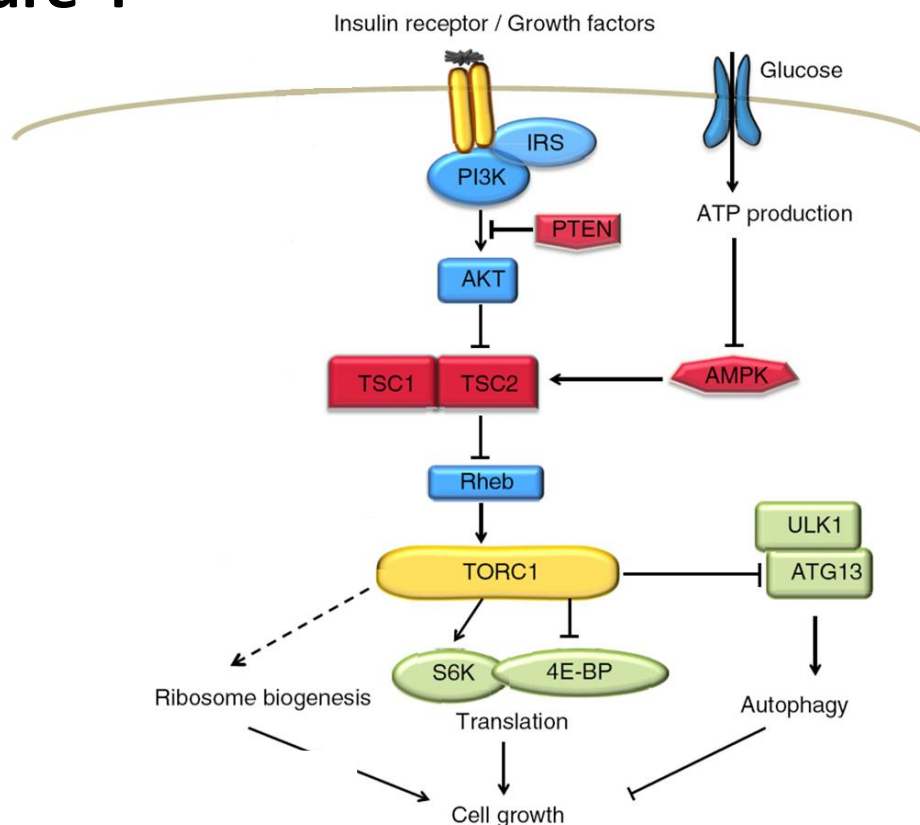


Figure 4: Schéma des voies de signalisation de l'insuline et des nutriments contrôlant la croissance cellulaire. Les interactions génétique ou biochimique sont représentées par des flèches lors de régulations positives et par des barres dans le cadre lors de régulation négatives.

Adapté de Tumaneng et al., et al. 2012

chez les protozoaires et ne sont pas suffisant pour provoquer, seuls, une augmentation de la croissance.

a) Facteurs de croissance : stimulation de la biogénèse des ribosomes.

La croissance des cellules animales dépend ainsi de signaux extracellulaires : les facteurs de croissance. Ceux ci activent *via* des récepteurs membranaires, des voies de signalisation conduisant pour leur grande part à la stimulation de la synthèse protéique ; de telle sorte que la synthèse globale soit supérieure à la dégradation. Chez les mammifères, l'une de ces voies est stimulée par le facteur de croissance IGF1 (*insulin growth factor 1*) et ce, *via* son récepteur couplé à la PI-3K (*phosphoinositol-3 kinase*) (Downward, 1998). Une fois le récepteur activé, le signal intracellulaire est transmis *via* une cascade de kinases (**figure 4**) qui conduit à l'activation des complexes TOR (*target of rapamycin*). Les serine thréonine kinases TOR forment deux complexes : TORC1 et TORC2. En dépit de leur nom commun, la rapamycine n'inhiberait de façon spécifique que TORC1, TORC2 se montrerait en effet résistant à de courts traitements. TORC1 affecte la croissance cellulaire par le biais de la traduction et de la biogénèse des ribosomes. En effet, d'une part il contrôle la traduction par l'activation de la protéine ribosomique p70 S6 kinase et par l'inhibition de la 4E-BP (*eIF4E binding protein*), et d'autre part TORC1 active par phosphorylation les régulateurs transcriptionnels de la biogénèse des ribosomes (Mayer et al. 2004) et de la production des ARNt (Kantidakis et al., 2010). Or des travaux réalisés chez la drosophile (Montagne et al., 1999) ont pu mettre en évidence que ces deux éléments en aval de TORC1 ; p70 S6K et 4E-BP (respectivement

dS6K et d4E-BP chez la drosophile) étaient des régulateurs de la taille des cellules. La mutation du gène *dS6K* conduisait en effet à l'inhibition de la traduction d'un ensemble d'ARNm et à l'altération de la croissance cellulaire (et donc de la taille des cellules) ainsi qu'à la modification de la taille des organes. Cette mutation provoquait la formation de petites drosophiles dont les cellules étaient diminuées en taille. La quantité de cellules n'était, elle, pas affectée. La délétion du gène *4E-BP* conduisait aux mêmes phénotypes que ceux du mutant *ds6k*.

Les cibles de TORC1 sont des régulateurs de la croissance ainsi, il est possible d'affecter la taille des cellules et par conséquent la taille des organes par la perturbation des signaux activateurs de cette voie ou par la modulation de l'activité de TOR. La perturbation de l'activité de dTORC1p entraîne, chez la drosophile, une diminution de la taille des cellules mais également de la prolifération conduisant ainsi à la formation d'organismes aux dimensions réduites. Un autre exemple de remaniement de taille provoqué par une altération de l'activité de TOR est l'effet de la rapamycine qui réduit la taille de cellules mammifères en culture (Fingar et *al.*, 2002), un effet également rapporté chez *Saccharomyces cerevisiae*. Les auteurs d'une étude (Zhang et *al.*, 2000) rapprochèrent cet effet du phénotype observé lors d'une limitation en nutriments. Ce rapprochement entre limitation en nutriments et activité de TOR est également observé dans le cas de la délétion de *slimfast*, un transporteur d'acides aminés présent au niveau des cellules des tissus de réserve en graisse de la drosophile. Ce mutant montre une réduction, dépendante de l'activité de TOR, de la taille de l'ensemble de ces cellules (Radimerski et *al.*, 2002). Ces données font de la voie TOR une plateforme intégrant des signaux hormonaux et nutritionnels les couplant à la croissance cellulaire ou de ses cibles

TORC1 n'est pas le seul régulateur de croissance mis en évidence chez les mammifères. En effet, il a été montré que la surexpression d'un facteur de transcription, Myc, conduisait à l'augmentation de la taille de certains organes par l'augmentation de la taille des cellules les constituant (de la Cova et *al.*, 2004 ; Johnston et *al.*, 1999). Ce facteur de transcription induit l'expression de gènes dont les produits participent à la biogenèse du ribosome ainsi qu'à la synthèse protéique. Parmi ces gènes, on trouve ceux codant les facteurs d'initiation de la transcription eucaryote *eIF4E* et *eIF2 α* nécessaires à la croissance.

Finalement, l'étude de ces deux régulateurs, la voie TOR et le facteur Myc, nous enseigne que la biogénèse des ribosomes serait un régulateur majeur de la croissance des cellules mammifères. D'autre part sans l'action des facteurs de croissance, la cellule mammifère ne peut métaboliser les nutriments et croître. A cet égard il est intéressant de noter qu'il n'est pas connu, en condition non limitée en facteur de croissance et en nutriments, si une taille maximale existe. Il serait ainsi intéressant, ramenée à l'échelle de cellules isolées, d'une part de connaître cette taille maximale et par la suite le déterminisme génétique responsable de cette limite. Dans le même ordre d'idée une taille minimale n'est pas non plus connue. Abordons maintenant les effets de la prolifération cellulaire sur la taille des organismes métazoaires.

b) Incidence de la prolifération cellulaire sur la taille des organismes.

Pour un même type cellulaire la taille des cellules varie peu et ce même entre espèces d'un même ordre (Teissier 1939). Les hépatocytes humain sont ainsi proche en taille des hépatocytes de souris. La différence de taille entre ces deux espèces et en fait du à la quantité de cellules les composant : 3×10^9 cellules pour une souris de 25g contre près de 10^{13} cellules pour un homme de 70kg (Baserga 1985). Le contrôle de la quantité de cellule dépend de l'équilibre entre la capacité de prolifération et la mort cellulaire. La prolifération cellulaire est sous le contrôle de molécules stimulatrices et inhibitrices. Les premières sont nommées molécules mitogènes et activent des voies de signalisations qui conduisent à la stimulation des composants de contrôle du cycle cellulaire. En l'absence de ces agents mitogènes, la cellule est bloquée en phase G1 ou dans une phase particulière « G0 » où les composants de contrôle de l'avancée dans le cycle cellulaire sont dissociés (Sherr Robert 1995). Le cœur de ce système de contrôle est constitué des CDKs pour *cyclin dependent kinase*, qui sont activées de façon cyclique afin de déclencher les différentes étapes du cycle cellulaire. Le passage d'une étape à une autre est également contrôlé lors de point de contrôle (ou « *checkpoint* »). Chez les mammifères, la protéine P27 inhibe, notamment en réponse au facteur de prolifération β , des complexes de CDKs provoquant alors un arrêt des cellules en phase G1 du cycle. Des souris transgéniques dont le gène P27 est K.O présentent de plus gros organes en raison d'une quantité de cellules augmentée. Cet exemple qui pourrait faire passer comme important la régulation des CDKs pour le contrôle de la taille des organes, relève cependant de la rareté. En effet de façon surprenante, à

l'exception du cas précédemment cité, la surexpression ou la perte de fonction de la plupart des régulateurs du cycle cellulaire ne provoquent aucun effet sur la taille des organes ou de l'organisme chez la souris (Kiyokawa et *al.*, 1996). Les raisons d'une telle tolérance pour l'altération du contrôle des CDKs ne sont pas claires, est-ce que la prolifération cellulaire n'est seule, pas déterminante pour la régulation de la taille des organes, ou bien, les défauts de prolifération cellulaire sont-ils compensés par un mécanisme restant à définir ? Nous penchons pour cette seconde possibilité. En effet de nombreuses mutations connues pour affecter la taille de cellules isolées en cultures peuvent, une fois ramené à l'échelle de l'organisme, ne pas avoir d'effet sur la taille finale, suggérant l'existence de ces mécanismes capables d'évaluer la « masse totale » de cellule de l'organisme et d'en ajuster le développement.

Récemment a été identifié, lors de l'étude de cribles génétiques visant à rechercher des gènes suppresseurs de tumeurs, une voie de signalisation, nommée *hippo*, coordonnant la prolifération des cellules avec la mort cellulaire. Cette voie, (Justice et *al.*, 1995), est notamment composée de gènes ayant tous été identifiés chez la drosophile comme suppresseurs de tumeur (Xu et *al.*, 1995) ; leur mutation provoquant un développement important de certains tissus tels que les yeux, les ailes ou les pattes. La mutation de l'un de ces gènes entraîne une augmentation de la prolifération des cellules de ces tissus mais également une diminution de leur l'apoptose. L'ensemble de cette voie élucidée chez la drosophile est conservé chez les mammifères. L'origine du signal activant la voie Hippo reste à ce jour indéfini. La mise en avant de cette voie impliquant à la fois prolifération des cellules et leur apoptose a permis à la communauté scientifique de réaliser que pour comprendre comment l'organe ou l'organisme intégrerait la masse totale de cellules le

constituant, il faudrait s'intéresser tout autant aux mécanismes contrôlant l'arrêt de la croissance des cellules que ceux la promouvant. Et de fait ces mécanismes sont encore inconnus.

La taille des organismes métazoaires est ainsi déterminée par ces facteurs et agents contrôlant la croissance et la division des cellules. Cette dépendance implique que la taille finale d'un organe et par là celle de l'organisme est ainsi en grande partie d'origine non-autonome et non pas autonome comme l'ont montré ces mutants de taille dont les phénotypes ne sont visibles qu'à l'état de cellule isolée. A ce sujet un autre exemple intéressant illustrant bien cette capacité de compensation est retrouvé dans une des plus anciennes expériences ayant trait au contrôle de la taille des cellules : la salamandre tétraploïde de Fankhauser (1952). Cette expérience fait intervenir par ailleurs un autre phénomène dont la découverte est plus ancienne encore : l'effet de la ploïdie sur la taille des cellules.

II 2) Rôle de la ploïdie dans le contrôle de la taille cellulaire.

Dans son expérience Fankhauser démontra qu'en dépit d'un niveau de ploïdie supérieur, une salamandre tétraploïde possédait les mêmes dimensions qu'une salamandre sauvage. Il en allait de même pour l'ensemble des organes de l'animal. Une fois l'observation rendue à l'échelle de la cellule, Fankhauser réalisa que la salamandre tétraploïde était constituée de cellules plus grosses que celles d'une salamandre sauvage, mais en présentait cependant près de deux fois moins. Ce

phénomène de compensation a montré que, plus que la quantité de cellule, c'était bien ici une quantité de masse cellulaire qui était déterminée. L'animal et/ou l'organe, avait donc capacité d'évaluer la masse de cellules qui le composait et surtout qui devrait *in fine* le composer.

Comment expliquer ce phénomène de compensation ? Les espèces telles que les salamandres passent par une étape de *midblastula transition* (MBT) durant laquelle s'amorce la transcription zygotique. Durant les premières étapes de développement de l'embryon néoformé ont lieu de rapides divisions cellulaires en absence de croissance cellulaire jusqu'à déclenchement de la MBT. Cette MBT est ainsi déclenchée lorsqu'au sein du blastomère le ratio ADN nucléaire/cytoplasme atteint un seuil critique (Newport and Kirschner, 1982). L'embryon tétraploïde est ainsi obtenu lors de ces divisions rapides par inhibition du premier événement de cytokinèse. De fait pour la même quantité de cytoplasme l'embryon a deux fois plus d'ADN qu'en temps normal, ainsi cet embryon atteindra la MBT une division plus tôt. Après la MBT lorsque les cellules composant les embryons commenceront à croître en taille, les organismes seront composés de la même masse totale de cellule : les mécanismes de contrôle post-MBT fonctionnent en fonction de la masse de cellule, or à la MBT les deux embryons ont la même masse cellulaire. En effet concernant les régulateurs extracellulaires, une cellule tétraploïde nécessite deux fois la quantité de molécules signal nécessaires à une cellule diploïde, ayant elle deux fois la quantité de récepteurs à stimuler d'une cellule diploïde. Ainsi la quantité de facteurs de croissance, d'agents mitogènes et d'inhibiteurs sera la même pour l'organisme tétraploïde que pour l'organisme diploïde qui lui possède à la MBT deux fois plus de cellules à réguler. Les mammifères ne présentent pas de MBT, il est néanmoins

possible d'imaginer que ce principe de quantité équivalente de régulateurs pour une même masse cellulaire puisse être la cause de semblables phénomènes de développement d'organismes polyploïdes (l'exemple de la salamandre étant reproduit chez la souris ou la drosophile Henery et *al.*, 1992). La relation entre la taille des cellules et la ploïdie que nous avons mis en avant par cette expérience fut en réalité commentée pour la première fois il y a maintenant plus d'un siècle (Gulliver, 1875), et constitue non seulement un phénomène conservé dans l'ensemble des organismes eucaryotes, mais également l'un des plus mystérieux.

Augmentez le niveau de ploïdie d'une cellule, vous augmenterez sa taille. Parmi les premiers chercheurs à s'être intéressé à ce phénomène, au début du siècle dernier, Theodore Boveri proposa que les cellules eucaryotes maintiennent, de façon active, un ratio volume nucléaire/volume cellulaire constant. Ce mécanisme peut être observé chez de nombreux organismes eucaryotes, des levures aux mammifères et intervient dans le développement de nombreux tissus tels que les feuilles et les fruits des végétaux supérieurs, les glandes salivaires des drosophiles ou bien chez les mammifères dans les hépatocytes et les cellules du myocarde. Les plantes semblent avoir retenu ce mécanisme comme moyen d'augmenter la taille finale de certains organes et notamment les fruits tels que les tomates, qui sont constituées du nombre final de cellules tôt dans leur développement et croissent en taille uniquement par endoreduplication. Pour des raisons évidentes ce caractère est déterminant pour les rendements de production en agriculture. D'après Cavalier-smith (Cavalier-smith et *al.*, 2005) l'étonnante corrélation entre le volume cellulaire et le contenu en ADN nucléaire au sein de si vastes étendues évolutives serait le fait d'une sélection naturelle pour une taille cellulaire optimale et en conséquence un ratio volume

nucléaire/volume cellulaire optimum. Ils émirent l'hypothèse que la sélection d'un volume cellulaire optimum s'effectuerait par la sélection du volume nucléaire optimum correspondant et comme dans ce modèle le volume du noyau est fonction de son contenu en ADN, l'élément sélectionné *in fine* serait un contenu plus ou moins important en ADN. Cette sélection du contenu en ADN ne se ferait pas nécessairement sur de l'ADN codant pour des protéines et pourrait ainsi expliquer l'augmentation en contenu non-codant observé dans les grands génomes.

Cependant, malgré cette conservation, la relation de cause à effet entre la taille des cellules et le contenu en ADN n'est toujours pas clairement établi, l'augmentation de la taille des cellules promeut-elle l'augmentation de la ploïdie/du contenu en ADN ou bien est-ce la relation inverse ? L'idée générale est que dans certaines conditions, l'ADN deviendrait limitant pour la production de transcrits et donc de protéines, l'augmentation de la ploïdie permettrait alors de contourner cette limitation. Dans l'étude du phénomène volume nucléaire/volume cellulaire, les organismes unicellulaires et notamment les levures constituent un modèle de choix. Chez *S. cerevisiae* une cellule diploïde est bien plus grosse qu'une cellule haploïde et il en va de même pour une cellule tétraploïde par rapport au diploïde **figure 5** (Wilson, 1925). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ce phénomène, dans ces hypothèses différent essentiellement par le rôle qu'elles attribuent au contenu en ADN nucléaire dans ce phénomène. Le noyau augmente en volume avec l'augmentation du contenu en ADN. Le contenu en ADN est-il directement responsable de l'augmentation de la taille de la cellule ou bien l'est-il indirectement, *via* l'augmentation du volume nucléaire ? Dans son étude Jorgensen (Jorgensen et al., 2007) rapporta que le lien unissant la taille du noyau et la taille de la cellule ne

Figures: Introduction.

Figure 5

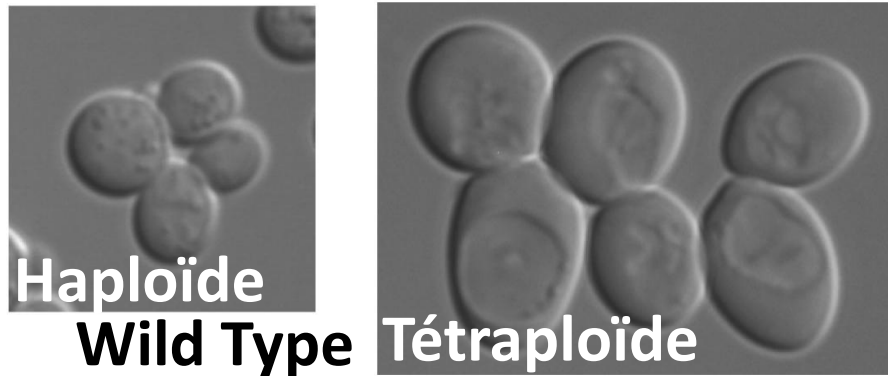


Figure 5: Effet de la ploïdie sur la taille des cellules. Images de cellules vivantes de *Sacharomyces cerevisiae* haploïdes et tétraploïdes . Ces deux images sont à la même échelle.
D'après Wu et al. *PLoS Biology* 2010.

Figure 6

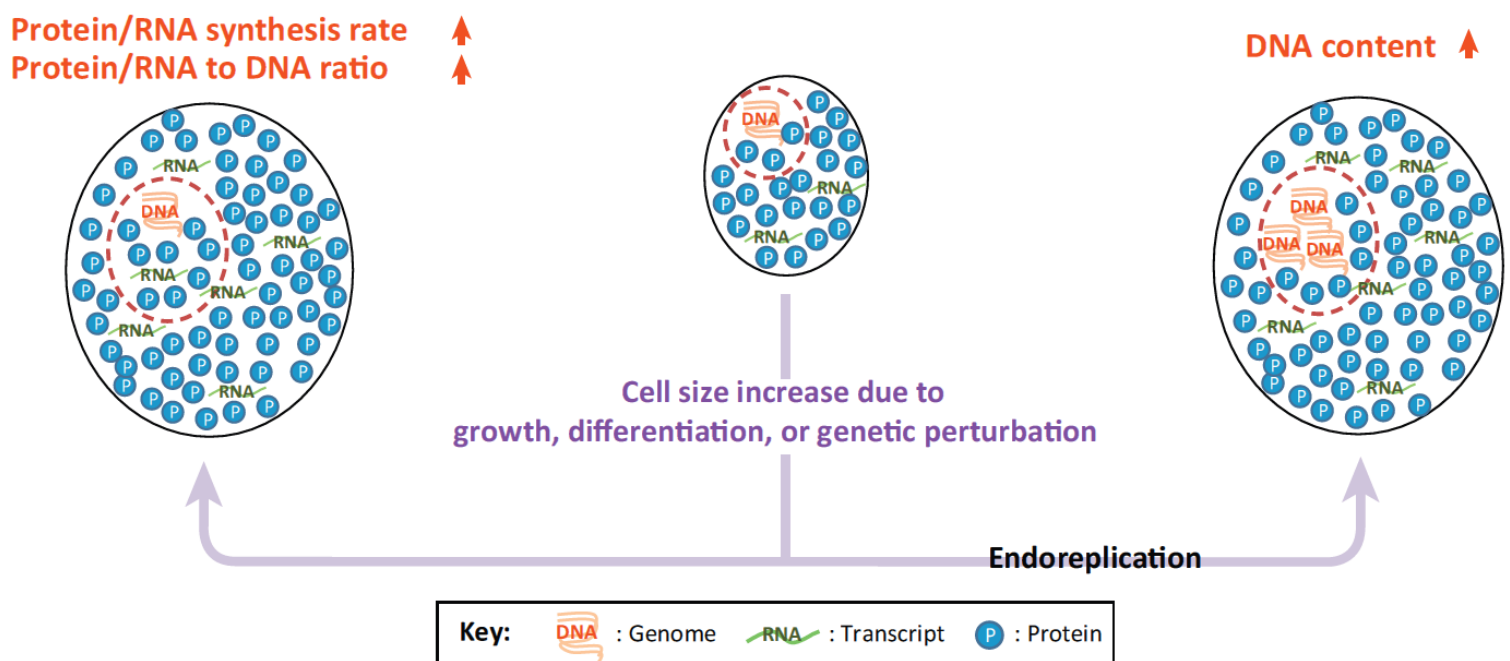


Figure 6: Contenu en ARN et en protéine en fonction de la taille des cellules. La taille d'une cellule peut varier en fonction de facteurs internes et/ou externe tels que la croissance cellulaire, la différenciation ou bien les mutations. Les cellules « *larges* » contiennent un plus gros noyau, plus d'ARN, de protéines et dans le cas des polyploïdes (partie droite) plus d'ADN.

D'après Marguerat et Bähler. *Trends in Gene*. 2012

serait pas causal, au contraire le volume nucléaire serait adapté en conséquence au volume cellulaire par un mécanisme inconnu, comme l'avait décrit Boveri en 1905 (d'après Wilson, 1925).

S'il ne s'agit pas de la taille du noyau alors l'effet de la ploïdie pourrait être le fait de l'augmentation du contenu en ADN, par exemple par l'expression d'un gène ou d'une série de gènes, dont l'augmentation de la ploïdie augmenterait nécessairement l'expression. Derrière cette idée réside le concept du contrôle transcriptionnel de la taille des cellules. La régulation est-elle dans le détail (régulation d'une série de gènes spécifiques) ou bien dans l'expression générale du génome ? Revenons sur la régulation générale de la transcription en rapport avec le volume cellulaire. D'une façon générale, le ratio ARN/ADN varie énormément au sein d'un organisme en fonction du type cellulaire. Il a pu être montré que ces variations corrélées à la taille des cellules, n'étaient pas le fait d'une plus grande stabilité des ARNm mais bien d'une augmentation de la transcription (Schmidt and Schibler, 1995). Le premier point est donc qu'il est possible d'augmenter la quantité d'ARN et de protéines sans changer pour autant de quantité d'ADN comme c'est le cas avec l'augmentation de la ploïdie (**figure 6**). Chez *S. pombe* une étude démontra que l'expression du génome s'adaptait aux changements de taille de cellule, les petites cellules produisant moins d'ARN que les plus grandes (Fraser and Nurse, 1979). Cependant ces études n'ont pu déterminer si ces changements d'abondance en ARN étaient le fait de l'augmentation d'un ensemble discret de gènes ou bien d'une augmentation générale de la transcription du génome. Une récente étude conduite chez *S. cerevisiae* apporta un élément de réponse. Dans ce travail (Wu et al., 2010), ils comparèrent les transcrits d'une cellule tétraploïde par rapport à ceux d'une cellule haploïde, et

révélèrent que peu de gènes étaient spécifiquement régulés en fonction de la taille. La plupart de ces gènes codent pour des protéines de surface, ce qui pourrait constituer une adaptation à l'évolution du ratio surface/volume cellulaire, celui-ci diminuant lorsque le volume de la cellule augmente. Finalement ce résultat fut quel que peu décevant, ces gènes n'étant pas cause du changement de taille mais d'expression altérée en conséquence du changement de taille.

En conclusion, bien que certaines études ont pu montrer que l'ADN pouvait être dans certaines conditions limitant pour l'expression des gènes, et que l'augmentation de la ploïdie par la réplication du génome pouvait pallier cette limite, il semble clair que l'expression du génome peut être ajustée aux changements de taille des cellules sans nécessairement recourir à l'augmentation du contenu en ADN. D'autre part il n'y aurait pas de gènes dont l'expression serait directement cause de la variation de la taille, mais il existerait une signature transcriptomique pouvant être corrélée avec la taille des cellules. Ce phénomène discuté, nous allons maintenant aborder les avancées qui furent permises par les modèles unicellulaires, pour l'étude de l'homéostasie de la taille des cellules.

II 3) Apports des modèles unicellulaires dans l'étude de l'homéostasie de la taille des cellules.

Lorsqu'ils prolifèrent, les organismes unicellulaires tels que *S. pombe* et *S. cerevisiae* augmentent en taille durant une phase de croissance, répliquent leur génome, puis se divisent doublant alors leur population. Pour une condition de

culture donnée, la taille moyenne des cellules d'une même souche est constante. Le mécanisme intracellulaire de contrôle de la taille doit donc, ici, coordonner la croissance, et donc l'augmentation du volume, avec la division cellulaire. De fait, ces modèles de cellules/organismes constituent des systèmes d'étude de la taille plus simples que les modèles métazoaires eucaryotes qui présentent des phénomènes d'autonomie et de dépendance de la croissance et du développement des organes comme nous avons pu en discuter plus tôt.

Cette coordination est d'autant plus importante que les organismes unicellulaires doivent composer avec un environnement changeant : les nutriments ne sont pas toujours présents. Et, lorsqu'ils le sont, leur abondance est variable. Les nutriments ont pour ces organismes un double rôle : nutritionnel et facteur de croissance/prolifération. En tenant compte de ce constat, comment ces organismes coordonnent-ils alors leur croissance et leur division ? Comme nous allons le voir en détails au moment d'aborder l'homéostasie de la taille des cellules chez *S. cerevisiae*, le concept de taille critique serait une manière efficace de coordonner ces deux phénomènes. Son existence a pu être démontrée chez de nombreux organismes, des bactéries aux blastomères de xénope en passant par des algues unicellulaires et bien sûr aux levures dans lesquelles le contrôle de la taille des cellules est actuellement le mieux caractérisé. Néanmoins quel que soit l'organisme étudié un point commun demeure. Il sous-entend en effet que la cellule soit capable de déterminer sa taille. Nous employons ici le terme de taille pour des raisons de simplification mais il n'est absolument pas clair si la cellule évalue son volume, sa masse, le taux de traduction ou bien encore un métabolite... En réalité il ne semble pas exister de système unique permettant à la cellule d'évaluer sa taille, aussi nous

nous intéresserons par la suite aux différents exemples de « sizer » ayant été mis en avant chez des organismes unicellulaires. Dans ce chapitre nous nous intéresserons donc dans un premier temps aux mécanismes influençant l'homéostasie de la taille des cellules chez la levure *S. pombe* puis la bactérie *B. subtilis*, des mécanismes faisant intervenir deux types de sizer différents. Puis dans une dernière partie, nous étudierons en détail les différents mécanismes affectant l'homéostasie de la taille des cellules de *S. cerevisiae*, modèle où le maintien de l'homéostasie de la taille des cellules serait plus complexe et impliquerait un exemple encore différent de *cell sizer*.

a) *S. pombe*, mutants *wee* et « *cell sizer* » géométrique.

La morphologie de *S. pombe* rappelle celle d'un bâton, la cellule croît en taille de façon asymétrique quasi uniquement dans la longueur. Cette particularité confère aux études de taille une simplification : ne mesurer qu'une seule dimension de la cellule pour en obtenir le volume (Mitchison, 1957). Mais cette particularité semble également être exploitée par les cellules qui s'en servent pour créer un gradient de molécules « sizer ». Cette molécule est localisée au niveau des extrémités de la cellule, en grandissant dans la longueur les deux extrémités s'éloignent l'une de l'autre créant alors un gradient de concentration de l'extrémité vers le centre de la cellule. La diminution progressive de cette molécule au centre de la cellule permet l'entrée progressive dans le processus de division. Ce simple schéma résume ce mécanisme qui dans les faits est un peu plus complexe.

En 1975 Paul Nurse identifia la première protéine de contrôle de la taille chez *S. pombe* : Wee1p, une kinase qui inhibe par sa phosphorylation Cdk1p, une protéine dont l'activité, permet l'entrée dans le processus de division d'une façon dose

Figure 7

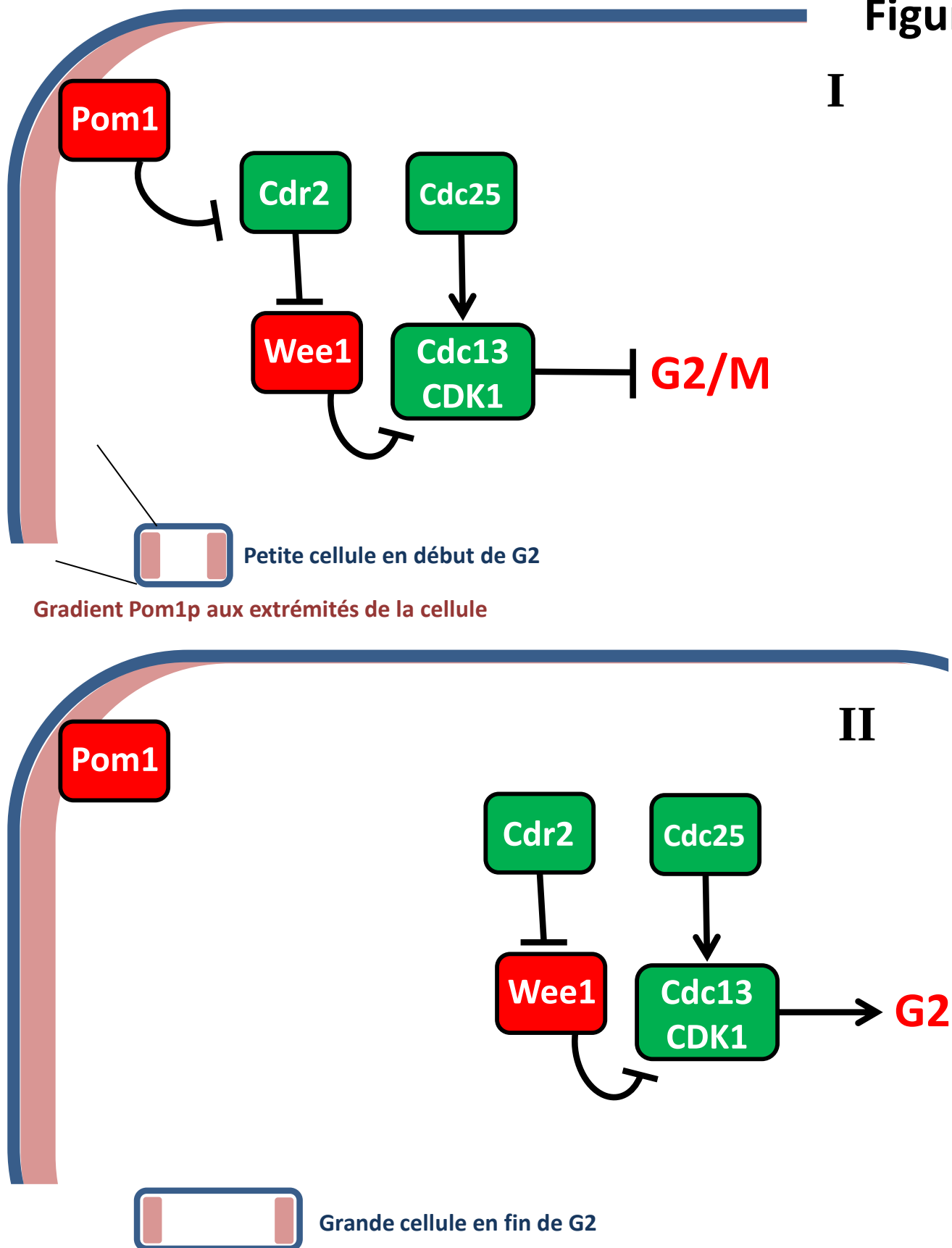


Figure 7: Modèle de la régulation, taille dépendante, du cycle cellulaire chez *S. pombe*. Les acteurs stimulant la prolifération sont en vert, les répresseurs en rouge. Le contrôle de la taille des cellules a lieu durant la transition phase G2/M. L'inhibiteur mitotique POM1p est réparti sous la forme d'un gradient de concentration émanant du pôle de la cellule. POM1p inhibe l'activateur mitotique CDR2p qui lui est situé sous forme de complexes au niveau du centre de la cellule (partie I du schéma). L'inhibition de POM1p est levée au fur et à mesure que la cellule croît en taille (partie II du schéma). CDR2p inhibe alors WEE1p, ce qui conduira au maintien de l'état déphosphorylé du complexe CDC13-CDK1 activateur de l'entrée en mitose.

D'après Turner et al. Curr. Biol. 2012

dépendante. L'action de Wee1p est dans le même temps contrebalancée par la phosphatase Cdc25p. Dans ce modèle du contrôle par le gradient (**figure 7**), l'entrée en phase M est permise par la levée de l'inhibition de Wee1 qui est elle, inhibée par le duo de kinase *CDR1* et *CDR2*. Ces kinases sont elles-mêmes inhibées par la protéine Pom1p, une protéine localisée au niveau des extrémités de la cellule (Bähler and Pringle, 1998). Cdr1p et Cdr2p sont elles, localisées au sein de « ponctuations » au centre de la cellule, ainsi leur inhibition par Pom1p diminue durant la croissance avec l'éloignement progressif des pôles du centre de la cellule. De façon concomitante Wee1p sera alors inhibée par les protéines Cdr1/2p, et Cdk1p ne sera alors plus phosphorylée. Le retrait de ce phosphate par Cdc25p sera alors limitant pour l'entrée dans le processus de division (Moseley et al., 2009).

Cependant, ce mécanisme faisant intervenir Pom1p-Cdr2p-Wee1p ne serait pas le seul système de *cell sizer* chez *S. pombe*, en effet plusieurs éléments laissent entendre que Cdc25p aurait un rôle supplémentaire dans l'homéostasie de la taille des cellules. De fait, avant que le gradient de Pom1p ne soit connu (Bähler and Pringle, 1998), les hypothèses du contrôle de la taille ne prenaient pas en compte d'éléments géométriques. Les mécanismes avancés étaient néanmoins, pour la plupart, basés sur *WEE1* et *CDC25*. D'autres impliquaient une transition G2/M dépendante de l'accumulation de Cdc13p (Sveicz et al., 2001). La régulation de Wee1p par les deux *CDRs* était alors associée à des mécanismes de modulation de la taille en réponse à la disponibilité des nutriments (Belenguer et al., 1997). L'idée de la transition G2/M était basée sur une accumulation de Cdc25p dont l'action de déphosphorylation aurait peu à peu dépassé l'action de la kinase Wee1 (Moreno et al., 1990). Cette hypothèse s'appuyait sur des travaux où Cdc25 avait été montrée

comme s'accumulant lors de blocage du cycle cellulaire (Rupes et al. 2001), d'autre part l'ARNm de *Cdc25* est sujet à une régulation 5'uORF dépendante de la vitesse d'initiation de la traduction. L'ensemble de ces éléments attesterait de l'existence de régulations supplémentaires de la taille agissant *via* un mécanisme de *cell sizer* traductionnel dépendant de Cdc25p. D'autre part le fait que les cellules de *S. pombe* soient également soumises à l'effet de la ploïdie sur la taille tend également à montrer l'existence d'une régulation non-spatiale de la taille cellulaire. Nous allons maintenant aborder un autre modèle de « *sizer* » faisant intervenir une connexion avec le métabolisme cellulaire.

**b) Exemple de *cell sizer* métabolique chez *B. subtilis* :
importance de la disponibilité des nutriments pour le
contrôle de la taille.**

Contrairement au cycle cellulaire eucaryote divisé en étapes claires (**figure 8**) et dont les transitions sont soumises à des points de contrôle, le cycle bactérien est simple et peut être résumé en trois étapes : Phase B : temps écoulé entre la naissance de la cellule et l'initiation de la réplication de l'ADN ; phase C durée de cette réplication ; phase D : temps écoulé entre la fin de la réplication de l'ADN et la division. Cette division symétrique, produisant deux filles de taille identique, doit être coordonnée spatialement, la scission devant être exécutée au centre de la cellule et dans le temps, une fois les chromosomes ségrégués. Tout écart dans ces deux paramètres entraînerait des cellules filles aberrantes en taille et/ou en contenu chromosomique. Chez les bactéries la division cellulaire est dépendante de la formation de l'anneau de FtsZp, une protéine homologue à la tubuline. Cette protéine

Figure 8

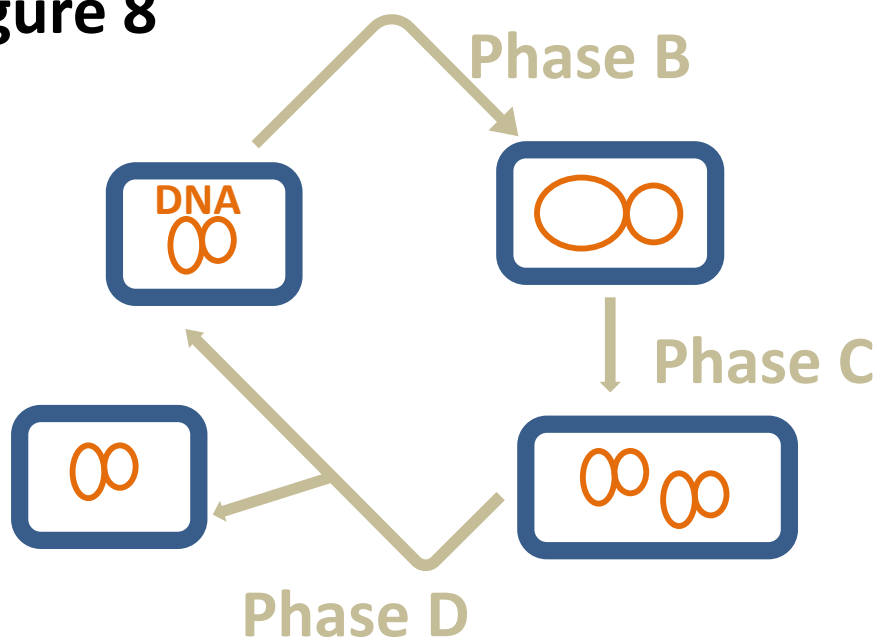
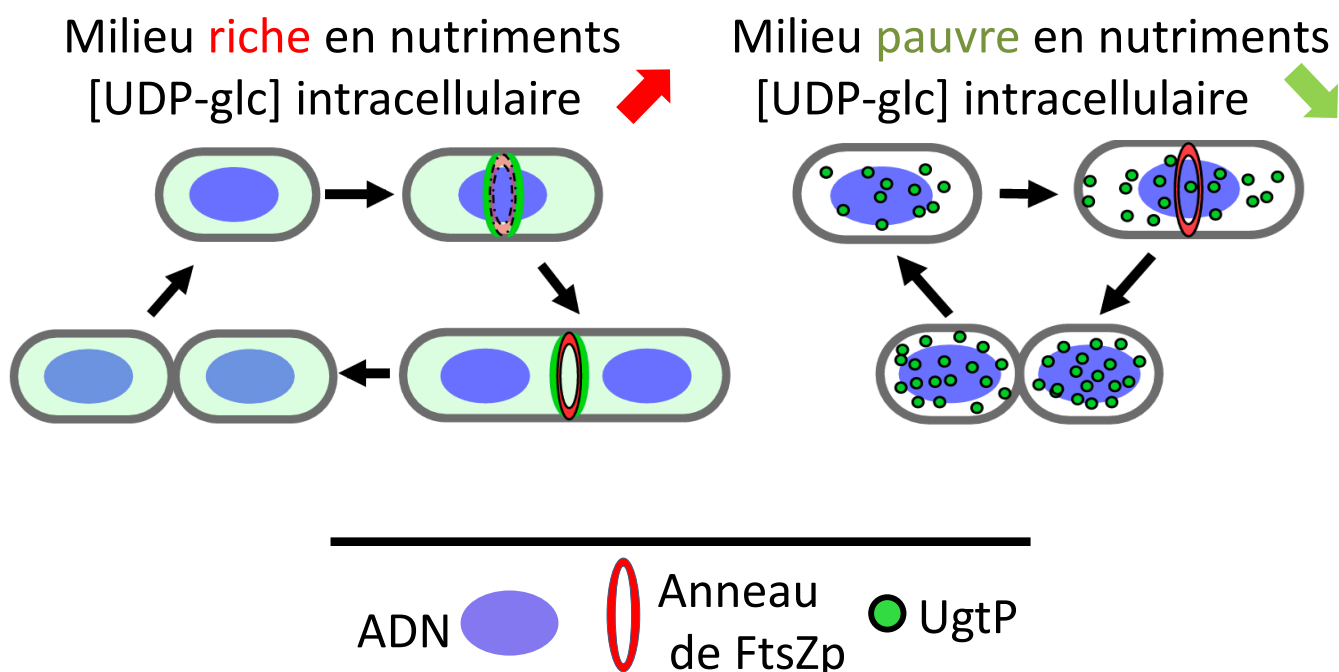


Figure 8: Cycle cellulaire bactérien. Ce cycle est décomposé en trois phases: la phase B correspond au temps écoulé entre la naissance de la cellule et l'initiation de la réplication, la phase C correspond à la durée de la réplication de l'ADN, enfin la phase D d'étend de la fin de la réplication et la division.

Figure 9



Légende 9: En présence d'une quantité abondante de nutriments la concentration intracellulaire UDP-glucose est élevée et stimule la relocalisation de l'UgtP au centre de la cellule (anneau vert) où il peut interagir avec la FtsZp inhibant par la même la formation et la maturation de l'anneau de FtsZp et maintenant la cellule en phase de croissance. Lorsque la cellule se développe dans un milieu pauvre en nutriments (partie droite), la concentration en UDP-glucose est faible et l'UgtP n'est plus localisé au centre de la cellule mais est retrouvé au niveau de foyers ponctuels dans toute la cellule. La FtsZ n'est alors plus inhibée et l'anneau peut se former permettant une division sans délai. Les cellules formées sont alors plus petites.

D'après Chien et al. Curr. Biol. 2012

forme son anneau au niveau du futur site de la division et servira de support à l'assemblage de la machinerie protéique de division ainsi qu'à l'invagination des membranes. Le niveau de FtsZp est constant au cours du cycle cellulaire lorsque les cellules sont dans des conditions de cultures stables. La division cellulaire est ainsi contrôlée par le *timing* de la formation de l'anneau de FtsZp et non par modulation du niveau d'expression de la protéine au cours du cycle cellulaire (Bernhardt and Boer 2005 ; Haeusser et *al.*, 2007). En conséquence toute altération de la formation ou bien de la maturation de cet anneau entraîne une modification de la taille des cellules filles.

Dans leur étude Palacios et *al.* (1996) démontrèrent que ce *timing*, essentiel pour le contrôle de la taille des cellules, était fonction de la croissance des cellules. Or celle-ci est sous influence directe de la disponibilité en nutriments. Dans un milieu riche en nutriments les cellules se divisent vite et sont de taille plus importante qu'en milieu pauvre en nutriments. Ce phénomène, appelé contrôle nutritionnel de la taille des cellules, bien qu'historiquement observé chez *Salmonella typhimurium* (Schaechter et *al.*, 1958) a par la suite été montré comme conservé chez un grand nombre d'espèces de bactérie (*B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*...) mais également de système eucaryote tel que *S. pombe* et *S. cerevisiae*. En revanche et à l'exception d'un élégant travail de Weart et *al.* (2007) effectué sur *B. subtilis* le mécanisme moléculaire contrôlant cette régulation de la taille des cellules par la disponibilité des nutriments reste à ce jour à définir.

Par leurs travaux, Weart et *al.* ont pu mettre en avant l'importance d'un métabolite, l'UDP-glucose, comme signal intracellulaire de la qualité du milieu de culture pour le contrôle nutritionnel de la taille des cellules. Ce métabolite, ainsi « *cell-sizer* », dérivé

de la glycolyse est synthétisé par l'expression de deux gènes : *PgcA* et *GtaB*. La mutation de l'un de ces deux gènes entraîne par ailleurs une diminution du volume de la cellule d'environ 30% en milieu riche, sans que la durée de doublement de la population soit significativement altérée. L'UDP-glucose n'est pas impliqué dans des processus essentiels pour la cellule et il n'est synthétisé qu'en condition d'excédant nutritif, de fait, son abondance intracellulaire reflète la qualité nutritive de la condition de culture. La glycosyltransferase UgtP sert dans ce système (**figure 9**) de senseur d'UDP-glucose liant ainsi la qualité du milieu et le contrôle de la taille cellulaire. Un défaut de ce senseur entraîne une diminution de la taille des cellules d'environ 20% en condition de milieu riche mais reste sans effet en milieu pauvre.

Ainsi, ce mécanisme est nécessaire à la cellule pour qu'elle soit capable d'établir la qualité nutritive du milieu dans lequel elle évolue et qu'elle puisse en fonction y adapter son développement. De même que pour les mutants de synthèse de l'UDP-glucose, le mutant *ugtP* ne présente pas de retard de croissance. L'UgtP agit par interaction directe avec FtsZp dont il empêche la polymérisation, prévenant ainsi la formation en anneau et donc inhibant la division. Lorsque la cellule est cultivée en milieu riche, UDP-glucose est présent en abondance dans toute la cellule et l'UgtP est retrouvé localisé au niveau de l'anneau de FtsZp qu'il lie de façon covalente. Cette liaison inhibe la division et permet ainsi à la cellule de croître en taille. En revanche en milieu pauvre, le niveau d'UDP-glucose est très faible et l'UgtP est retrouvée localisée au niveau de nombreux foyers de séquestrations cytoplasmiques, en dehors de l'anneau de FtsZp. Dans cette condition l'anneau pourra être initié sans délai, ce qui provoquera la formation de cellule de taille inférieure à la condition de milieu riche. Chez *E. coli* le gène *Pgm* (par ailleurs homologue au *PgcA* de *subtilis*) est responsable de la synthèse de l'UDP-glucose, sa délétion conduit à une

diminution de la taille cellulaire en milieu riche de l'ordre de 30% du volume sauvage. Le parallèle avec le système de *B. subtilis* n'est cependant pas total, en effet *E. coli* n'ayant pas d'homologue d'UgtP, l'existence d'un éventuel senseur d'UDP-glucose reste à ce jour à déterminer. Ce modèle repose ainsi sur une régulation négative de la division, l'augmentation du niveau de *FtsZ* d'un facteur deux diminue la taille, chez *E. Coli* et *B. subtilis*, de seulement 10% (Levin et al., 2012). Au-delà de ce niveau d'expression de *FtsZ*, la division est rapidement inhibée. Une des possibilités amenées par ces éléments serait l'existence d'un inhibiteur n'entrant pas en compétition avec les FtsZp excédentaires.

Finalement la coordination entre la division et la croissance, et par là le contrôle de la taille bactérienne, serait en premier lieu le fait de l'assemblage, de la maturation et de la constriction de l'anneau de FtsZp. Le *timing* de l'initiation de la réplication qui fut précédemment proposé pour ce rôle, ne semblerait pas critique pour cette coordination chez l'ensemble des espèces bactériennes, contrairement, tout du moins à ce jour, à l'anneau de FtsZp. Le mécanisme retenu pour le contrôle de la taille cellulaire couplerait ainsi la croissance à la division, dernière étape du cycle cellulaire, plutôt que de coupler la croissance à la réplication du matériel génétique, une étape critique tolérant moins d'écart.

c) Le modèle de la taille critique, exemple chez *S. cerevisiae*.

Pour expliquer la coordination entre croissance et prolifération, Johnston proposa dans une étude de 1977, l'existence d'un seuil de taille (ou « *critical size* ») au niveau duquel la cellule amorcerait sa division. Ce seuil constituerait ainsi pour la cellule un « *checkpoint* » de la taille situé au niveau de la transition phase G1 / phase

S du cycle cellulaire chez *S. cerevisiae* (et G2/M chez *S. pombe*). C'est essentiellement par des travaux de Lee Hartwell (de 1970 à 1978) qu'émergea le concept du *start*, un bref intervalle en fin de phase G1 durant lequel la cellule amorce sa division, et son importance pour la coordination de la division et de la croissance chez *S. cerevisiae* (**figure 10**). Notamment par leur étude du mutant *cdc28*, sous unité catalytique de la principale *Cyclin Dependent Kinase* de *S. cerevisiae*, ils établirent que pour que la cellule amorce la transition G1/S et passe par cette étape de « *start* » plusieurs éléments étaient requis : (1) atteindre une taille critique (Johnson 1977) ; (2) avoir assez de nutriments (Hartwell et *al.*, 1974) ; (3) ne pas être en présence de phéromones de reproduction (dans le cas de cellules haploïdes) (Hartwell et *al.*, 1974) ; (4) atteindre un certain niveau de traduction (Hartwell et *al.*, 1977). La nécessité d'atteindre une taille critique combinée avec le taux de traduction minimal peuvent ainsi expliquer qu'un ralentissement de la croissance augmente la durée de la phase G1 sans affecter les autres phases du cycle (Hartwell et *al.*, 1977). Johnston et son équipe avaient constaté qu'arrivées en carence pour leur source d'azote, des cellules de *S. cerevisiae* s'accumulaient en phase G1 et que d'autre part, la taille moyenne de la population diminuait. Ce phénomène était dynamique : une fois des conditions de culture favorables restaurées, la taille moyenne de la population se rétablissait rapidement (en 2~3 générations) et les cellules bloquées en G1 augmentaient toutes en taille jusqu'à un certain volume avant de se diviser. Ce seuil de taille contrôlerait ainsi le temps que les cellules passeraient en phase G1 du cycle cellulaire (**figure 11**). Ils démontrèrent également que cette taille critique était adaptée aux capacités de croissance qu'offrait le milieu de culture (**figure 12**). En effet pour une même source d'azote, cette taille critique variait selon la source de carbone : dans un milieu contenant une source de carbone facilement assimilable

Figure 10

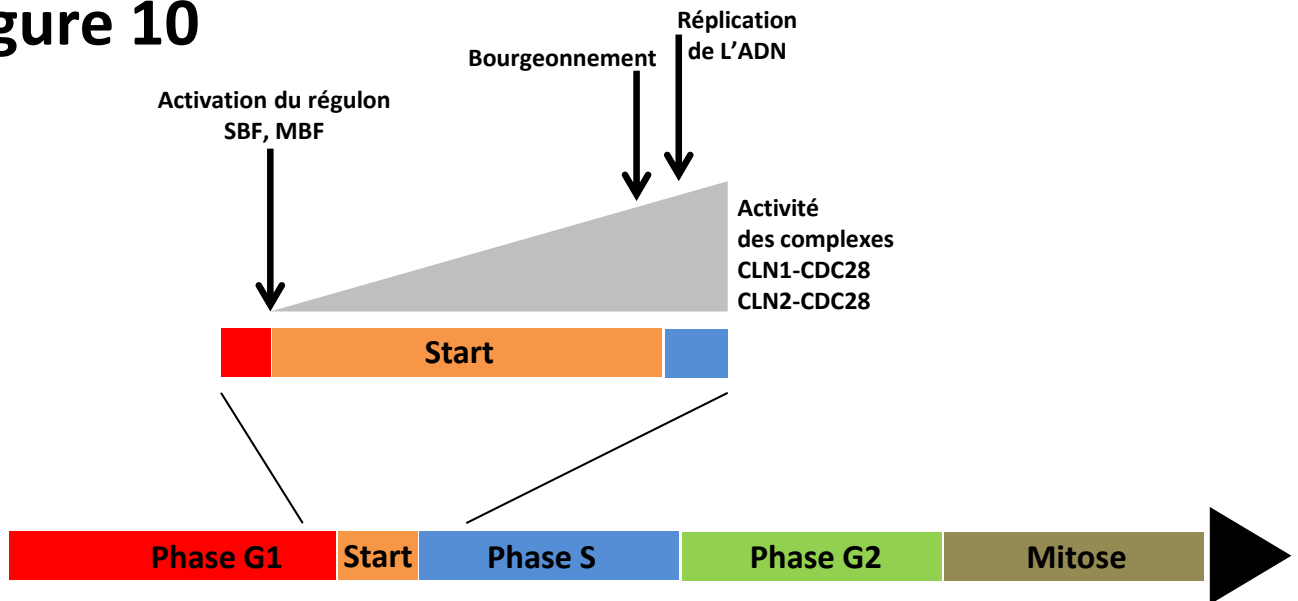


Figure 10: Le start du cycle cellulaire correspond à une courte phase durant laquelle l'activité des complexes CLN1/2-CDC28 est élaborée. Cette activité est permise par l'activation du régulon SBF et MBF par SWI4-SWI6/MBP1. Par phosphorylation le complexe déclenchera les événements essentiels à la prolifération, notamment la réplication de l'ADN et le bourgeonnement de la cellule mère.

D'après Jorgensen and Tyers. Curr. Biol. 2004

Figure 11

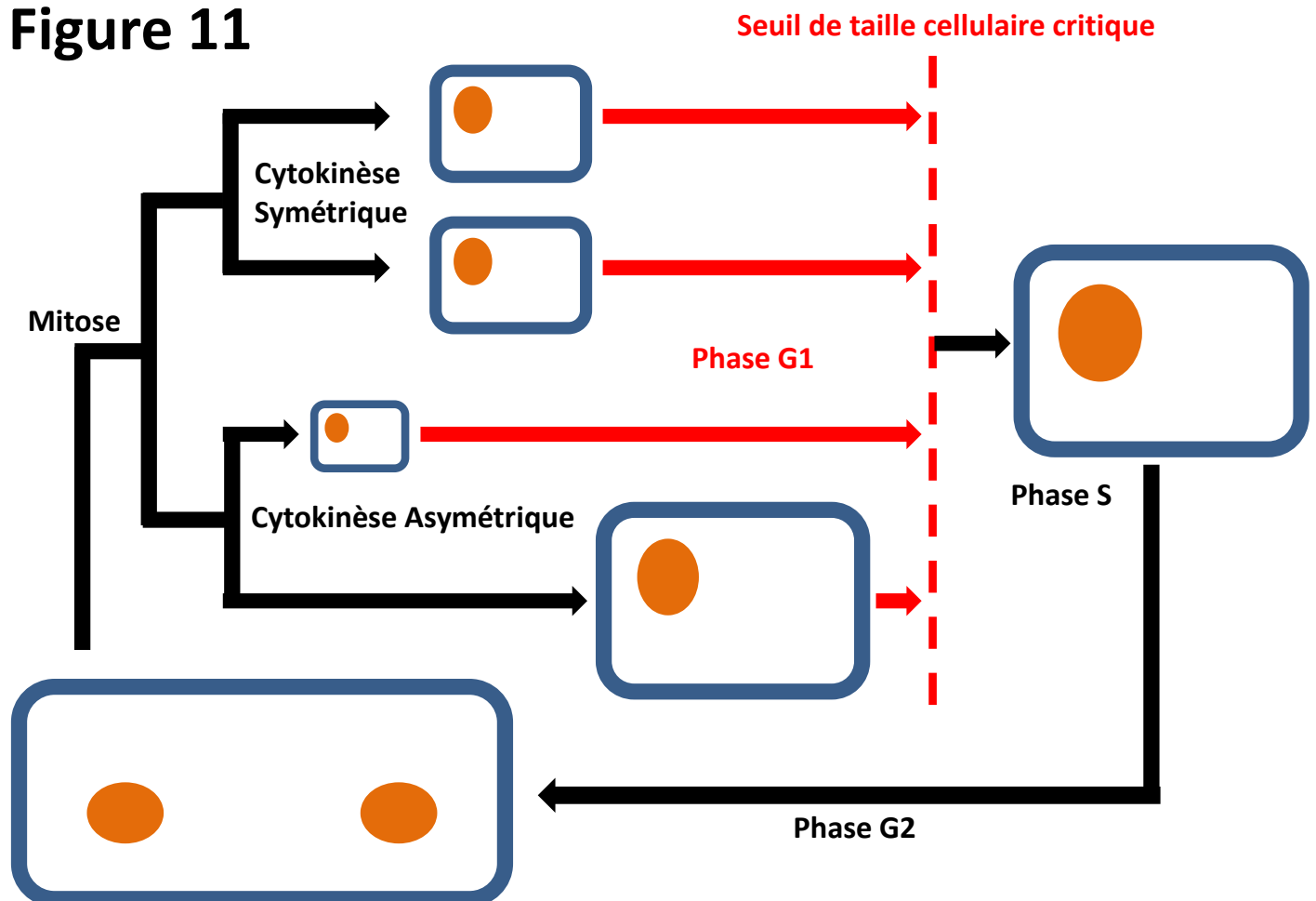


Figure 11: L'existence d'un seuil de taille critique permet de coordonner la croissance et la prolifération des cellules. La durée de la phase de croissance G1 dépend dès lors de la taille de naissance de la cellule. De fait dans le cas d'une division asymétrique (*S. cerevisiae*) la cellule fille passera plus de temps que la mère durant la phase G1 subséquente à la division, a contrario des cellules issues d'une division symétrique (*S. pombe*) qui passeront toutes deux le même temps en phase G1.

D'après Jorgensen and Tyers. Curr. Biol. 2004

Figure 12

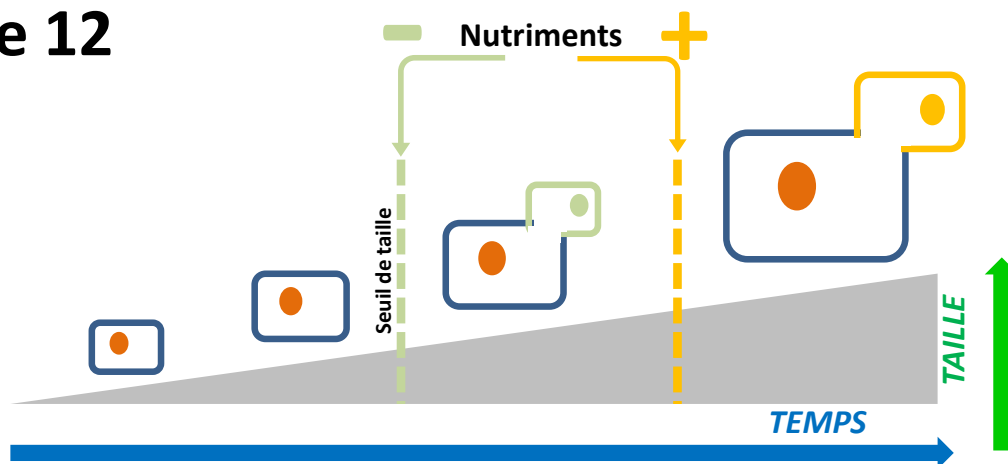


Figure 12: Le mécanisme contrôlant le seuil de taille critique et celui par lequel la cellule évalue sa taille seraient distincts. Chez *S. cerevisiae* Le seuil de taille critique est modulé en fonction de la richesse du milieu, phénomène qui serait d'après M. Tyers fonction de la biogenèse des ribosomes. La détermination de la taille, serait elle notamment d'après B. Futcher, en partie le fait de la traduction d'une protéine « sizer »; en conséquence l'efficacité de la traduction n'affecterait que ce second mécanisme.

D'après Jorgensen and Tyers. Curr. Biol. 2004

Figure 13

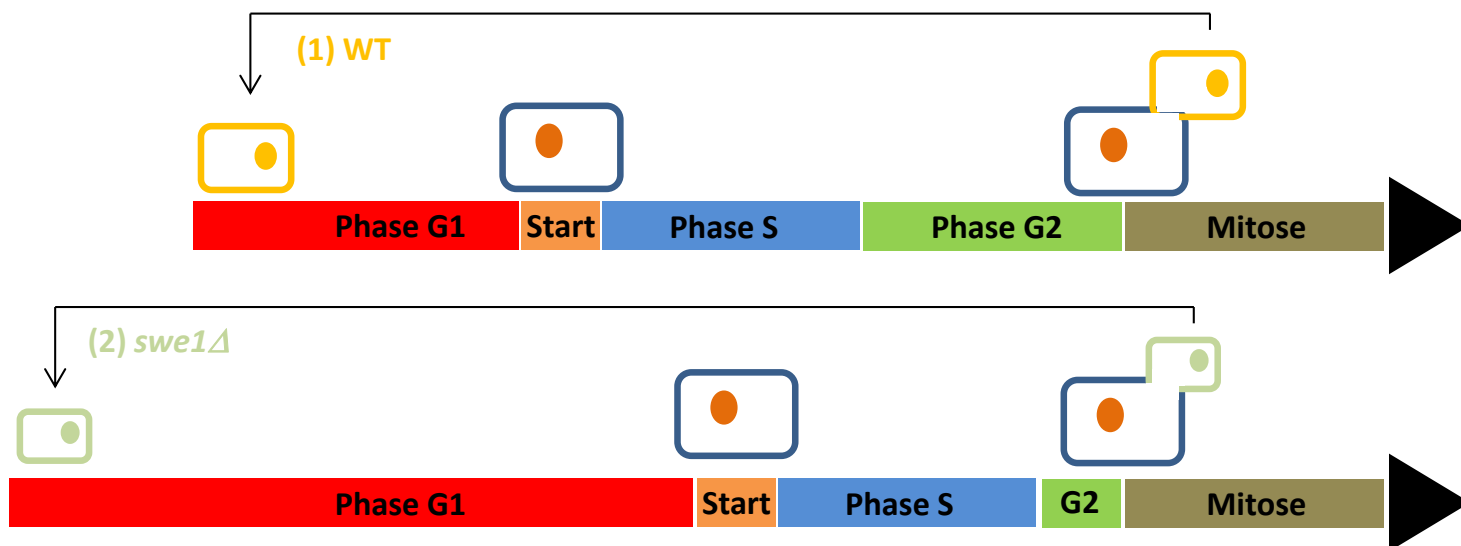


Figure 13: Importance du contrôle de la taille des cellules en phase G2/M du cycle cellulaire chez *S. cerevisiae*. Les cellules d'un mutant *swe1* (2) rentrent en mitose à une taille de bourgeon inférieure à celle d'une cellule sauvage (1). Le contrôle de la taille en phase G1/S n'est cependant pas affecté, ainsi la taille critique est la même pour ces deux souches. En conséquence la cellule fille *swe1* demeurera plus longtemps de phase G1 qu'une cellule fille sauvage.

(glucose) le temps de génération était faible et la taille critique élevée, *a contrario* lorsque la source de carbone était difficilement assimilable (lactate, glycérol, raffinose) le temps de génération était plus important et la taille critique plus faible. En conséquence de ces changements de taille critique, le volume moyen d'une population de *S. cerevisiae* varie en fonction de la qualité du milieu. Si le milieu contient une source de carbone (ou d'azote) difficilement assimilable alors le volume moyen de la population diminue.

Comme nous l'avons vu avec l'exemple de *B. subtilis*, ce phénomène, où les nutriments du milieu jouent le rôle de signaux extracellulaires pour le développement de la population, est appelé « contrôle nutritionnel ». Le mécanisme sous-jacent est dynamique : placées de nouveau en conditions favorables la taille moyenne des cellules augmente rapidement. Deux hypothèses non exclusives, ont été proposées pour expliquer ce phénomène : diminuer la taille des cellules permettrait de diminuer la quantité de biomasse nécessaire pour effectuer une division et permettrait de maintenir en condition défavorable un rendement de prolifération optimale (Jorgensen and Tyers, 2004) ; la seconde hypothèse formulée par Adams et Hansche en 1974 fait appel au ratio surface/volume : changez le volume d'une cellule et vous changez sa surface d'échange avec le milieu, ainsi en diminuant de taille le rapport surface sur volume d'une cellule augmente, ce qui permettrait aux cellules d'améliorer leur capacité d'absorption des nutriments dans une condition de culture où ceux-ci sont rares. En résumé de ces hypothèses : les cellules contrôleraient leur taille pour adapter leur développement aux conditions environnementales.

En 1983, reprenant les travaux de Johnson, Lord (1983) démontra que cette taille critique n'était pas imposée uniformément au sein de la population de cellules. En effet, la division étant asymétrique chez *S. cerevisiae*, la cellule fille naît plus petite que sa mère. Le temps subséquent que ces deux cellules passeront en phase G1 ne sera pas identique (**figure 11**), ce qui constitue une donnée cohérente vis-à-vis du modèle du seuil de taille. Néanmoins Lord et ses collègues observèrent que quand toutes les cellules filles se divisaient une fois rendues à une même taille, les cellules devenues mères, elles, le faisaient rendues à un seuil de taille supérieur, et les cellules mères grossissant au fur et à mesure des divisions la taille à laquelle elles se divisent, irait alors en augmentant. Ce contrôle par la taille critique n'affecterait alors que les cellules filles, une fois rendues mères elles bourgeonneraient à intervalles réguliers, transitant en G1 rapidement (Lord et *al.*, 1983). Cette différence de contrôle mère/fille aurait pour origine la répartition asymétrique lors de la division, des facteurs de transcription Ace2p et Ash1p. Ces facteurs régulent la transcription du gène *CLN3* codant une cycline essentielle pour la transition G1/S (Colman-lerner et *al.*, 2001 ; Laabs et *al.*, 2003).

d) Evidences de l'importance de l'entrée en mitose à la transition G2/M pour l'homéostasie de la taille des cellules.

Depuis la fin des années soixante-dix et la théorie du *start* et de la taille critique, la question du contrôle de l'homéostasie cellulaire a été abordée essentiellement du point de vue de la transition G1/S. Or des évidences attestant d'un second contrôle de la taille existent, de fait l'information de la taille serait également intégrée durant la transition G2/M. La dépolymérisation des filaments d'actine activerait en G2/M un point de contrôle de morphogénèse en inhibant la

formation du bourgeon. Cette dépolymérisation de l'actine entraîne également une inhibition de la croissance du bourgeon, ainsi il pourrait s'agir également d'un point de contrôle de la taille (McMillian et *al.*, 1998). Harvey et Kellogg (2003), démontrèrent que la dépolymérisation de l'actine provoquait bien un délai de l'entrée en mitose mais uniquement lorsque le bourgeon était inférieur à une taille critique. D'autre part, ils établirent que ce contrôle était dépendant de l'expression des gènes *SWE1* et *MIH1* dont les homologues de *S. pombe*, *Wee1* et *Cdc25* respectivement, constituaient la clé de voûte du système de contrôle de la taille chez cet organisme. De fait le mutant *swe1* entre en phase M prématurément à une taille de bourgeon inférieure de celle d'une cellule sauvage. Les cellules filles de *swe1* naissant plus petite demeurent en phase G1 plus longtemps pour compenser cette diminution de la taille à la naissance, le contrôle de la transition G1/S serait ainsi inchangé **figure 13**. En plus de montrer que le mécanisme de contrôle de *S. pombe* pourrait être en partie conservé chez *S. cerevisiae*, cette étude a permis de donner des éléments pour un nouveau point de contrôle de la taille, et donc de démontrer qu'il n'existait pas qu'une seule façon (*via le start*) d'altérer la taille des cellules de *S. cerevisiae*.

Il est également intéressant de noter que les deux points supposés de contrôle de la taille sont également les 2 phases du cycle cellulaire durant lesquelles la croissance est la plus importante (Goranov et *al.*, 2009). De fait, il paraît compréhensible qu'il soit tout aussi important de coordonner la croissance lors de l'entrée en phase de réplication (G1/S taille à laquelle le processus de division doit être amorcé) que lors de l'entrée en mitose (G2/M taille de la future cellule fille). Néanmoins, tout aussi important que soit ce contrôle, les éléments disponibles à ce jour ne permettent pas d'en établir clairement le fonctionnement. Il pourrait alors tout à fait être possible que

ce point de contrôle de la taille soit le fait d'un contrôle temporel (dit de *timer*) et non de *sizer*. Là où un *sizer* implique le passage par un seuil de taille pour avancer dans le cycle cellulaire, un *timer* requiert que la durée de la phase soit contrôlée indépendamment de la taille qui serait alors altérée en conséquence de la croissance (Rupes, 2002). En conditions où la croissance est plus importante l'augmentation de taille par unité de temps est plus importante, si la durée de la phase du cycle demeure la même qu'en condition de faible croissance, alors en fin de phase la cellule (ou le bourgeon) sera plus gros(se).

Maintenant que nous avons abordé les points du cycle cellulaire importants pour l'homéostasie de la taille des cellules chez *S. cerevisiae*, nous allons présenter les éléments connus à propos du mécanisme par lequel *S. cerevisiae* déterminerait sa taille. Un mécanisme qui ferait appel à un « *cell sizer* » traductionnel ou d'origine protéique.

e) *S. cerevisiae* et le contrôle du *start* : *Cln3p* un *sizer* protéique ?

La progression dans le *start* coïncide et dépend de l'expression d'un régulon de près de 120 gènes, parmi lesquels les cyclines de la phase G1, *CLN1* et *CLN2*, les cyclines de la phase S, *CLB5* et *CLB6* ainsi que les gènes contrôlant les événements subséquents au *start* : émergence du bourgeonnement, duplication du *spindle pole body* et déclenchement de la réplication de l'ADN via l'activité Clb5/6p-Cdc28p (Cross, 1995). Cette stimulation transcriptionnelle dépend de deux facteurs de transcription : SBF et MBF pour *Swi4-Swi6 cell cycle box binding factor* et *Mbp1 cell cycle box binding factor* respectivement. Ces facteurs sont constitués d'une

composante activatrice de la transcription, la protéine Swi6p et d'une protéine leur conférant leur spécificité de séquence : Swi4p pour SBF et Mbp1p pour MBF (Koch et *al.*, 1994). Le complexe SBF est retrouvé au niveau des séquences promotrices des gènes encodant les cyclines de la phase G1, *CLN1* et *CLN2*, dès le début de la phase G1 sans pour autant qu'il y ait stimulation de la transcription, une fois la taille critique atteinte, ces gènes font partie des premiers induits par le complexe SBF (Koch et *al.*, 1996). La cycline Cln3p (anciennement *Whi1*), est nécessaire à l'activation de la *cyclin dependant kinase* Cdc28p, elles régulent ensemble le *start*, par leur activation dépendante du volume cellulaire des complexes SBF et MBF **(figure 14)**.

A la suite de plusieurs études, Cln3p s'imposa comme un régulateur clé de la transition G1/S et par là de la taille des cellules. *CLN3-1*, un allèle hyper-morphique du gène *CLN3*, fut avec *whi3*, le premier mutant de petite taille identifié chez *S. cerevisiae* (le phénotype petit sera subséquemment nommé « *whi* »). Isolé en 1980 lors d'un crible de mutants de petite taille chez *S. cerevisiae* par Carter et Sudbery (1980), *CLN3-1* (alors nommé *WHI1-1*), sera par la suite identifié comme étant la première cycline de la phase G1. Whi3p est quant à elle une protéine séquestrant l'ARNm de *CLN3* empêchant ainsi sa traduction (Garí et *al.*, 2001). La délétion et la surexpression de *CLN3* provoquent dans la plupart des fonds génétiques des effets antagonistes sur la taille des cellules. Sa surexpression entraîne une entrée précoce dans le *start* et une diminution de la taille moyenne de la population, sa délétion retarde le *start* et conduit à une augmentation de la taille des cellules (Nash et *al.*, 1988). D'autre part comme le laisse supposer la viabilité du mutant *cln3*, il existe au moins une autre voie activatrice de *CLN1* et *CLN2*, la seule à ce jour connue fait intervenir *BCK2*. Très peu de données sont disponibles sur cette voie,

Figure 14

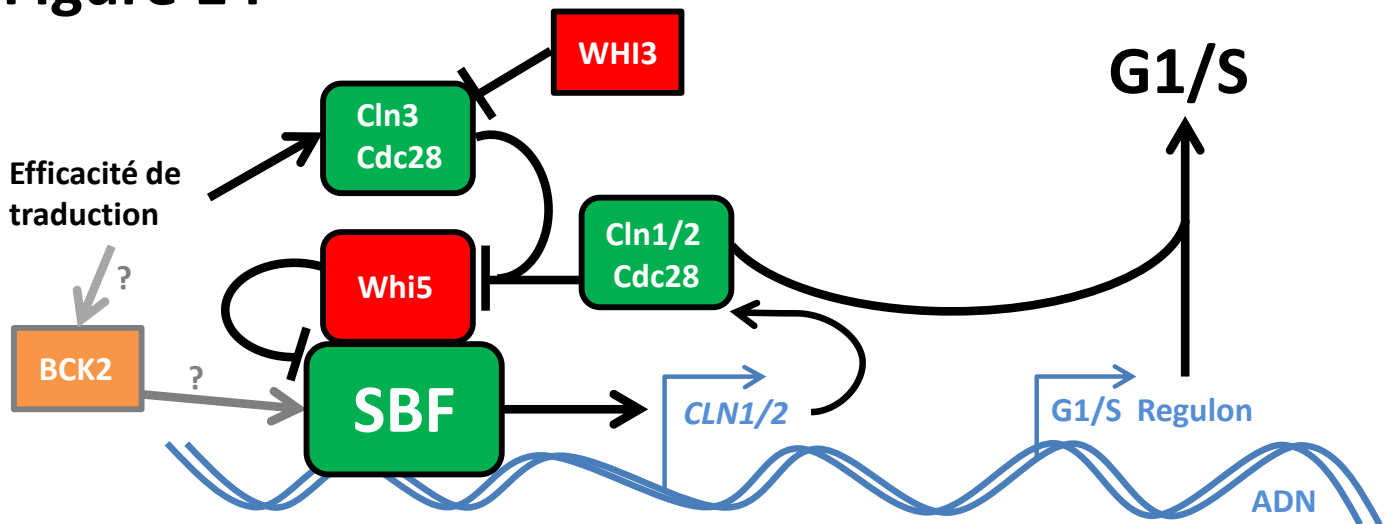


Figure 14: Modèle du passage dans le *Start* chez *S. cerevisiae*. La dissociation de Whi5p au niveau du promoteur des gènes SBF (et MBF non présenté sur ce schéma) conduit à l'activation du régulon. WHI5p est phosphorylé initialement par Cln3p-Cdc28p puis par Cln1/2p-Cdc28p. L'abondance de Cln3p serait l'un des éléments limitant l'entrée dans le *Start*. Bck2p pourrait également jouer un rôle équivalent à celui de Cln3p.

D'après Turner et al. Curr. Biol. 2012

Figure 15

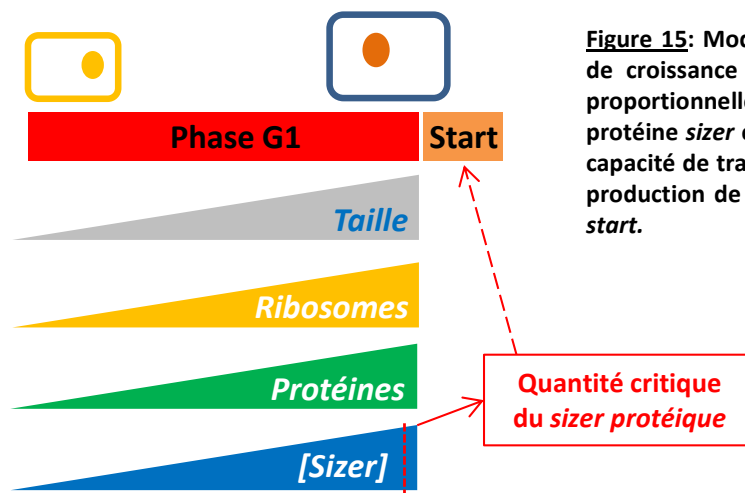


Figure 15: Modèle de la protéine *sizer*. durant la phase de croissance G1 la quantité de ribosome augmente proportionnellement avec la taille de la cellule. la protéine *sizer* est instable, sa quantité est le reflet de la capacité de traduction de la cellule. Une fois un seuil de production de cette protéine franchi la cellule passe le *start*.

néanmoins la délétion conjointe de *CLN3* et de *BCK2* n'étant pas viable en raison de la trop faible expression de *CLN1* et de *CLN2*, il semble clair qu'ils en sont les principaux activateurs (Di como mcb 1995).

L'idée première sur le mécanisme par lequel Cln3p-Cdc28p activerait le SBF fut que celui-ci le ferait par phosphorylation directe, cependant aucun élément n'a pu étayer cette hypothèse (Wijnen et *al.*, 2002). Au contraire plusieurs résultats laissent à penser que Cln3p-Cdc28p agirait indirectement en inhibant un répresseur du SBF, Whi5p a été identifié comme l'un de ces répresseurs. *WHI5p* est retrouvé associé au SBF, l'inhibant par la même, au niveau de la région promotrice de *CLN2*. Sa délétion provoque un passage prématuré au *start*, provoquant une diminution de la taille moyenne de la population, phénocopie de la surexpression de *Cln3*. De plus sa délétion supprime le phénotype létal du mutant *cln3 bck2* en permettant un niveau d'expression du SBF (et non MBF) suffisant (de Bruin et *al.*, 2004). Bien que l'effet répresseur de Whi5p affecte la taille de façon SBF dépendante (de Bruin et *al.*, 2004), l'effet sur la taille de Cln3p, qui est certes également dépendant du SBF, n'est qu'en partie dépendant de Whi5p. Whi5p n'est clairement pas la seule cible de Cln3p, ainsi en cherchant de nouveaux répresseurs du SBF, Wang et *al.* (2009) ont montré que le complexe de histone déacétylase Rpd3p (orthologue au complexe mammifère HDAC1) était impliqué dans une voie de répression du SBF indépendante de Whi5p et en aval de l'effet stimulateur du complexe Cln3p-Cdc28p. Les cellules semblent se diviser une fois une certaine taille atteinte, si la stimulation du SBF constitue l'événement déclenchant le *start*, comment la taille des cellules et l'activation du SBF peuvent elles être liées ? Certains observateurs ont alors proposé que la cellule puisse déterminer sa taille en fonction de la synthèse protéique.

Ces modèles proposent que la synthèse protéique permette aux cellules de déterminer leur taille et par là de coordonner croissance et division (**figure 15**). Originellement ce concept reposait sur l'existence d'une protéine « *sizer* » capable de stimuler la division, dont la synthèse suivrait le taux de traduction de la cellule. Une fois un seuil de production franchi, la cellule se divise (Fantès et *al.*, 1975 ; Unger and Hartwell, 1976 ; proposé chez les mammifères par Rossow et *al.*, 1979 et par Brooks, 1977). De fait cette protéine *sizer* doit être un activateur dose dépendant de la progression du cycle cellulaire, doit être exprimée durant la période de croissance (G1) et doit être instable de telle sorte que son activité reflète la capacité de production actuelle de la cellule et non la synthèse totale (Shilo et *al.*, 1979).

La protéine Cln3p possède ces caractéristiques (Nash et *al.*, 1988 ; Tyers et *al.*, 1992 et 1993 ; Mackay et *al.*, 2001). En effet : (1) elle active la transition G1/S de façon dose dépendante ; (2) contrairement aux autres cyclines son expression n'oscille que très peu durant le cycle cellulaire ; (3) sa durée de vie est brève (moins de cinq minutes de demie-vie). Cependant un argument joue en la défaveur du rôle de protéine *sizer* de Cln3p, un problème en réalité inhérent à ce type d'hypothèse : bien que la quantité totale de Cln3p soit proportionnelle à la capacité de synthèse de la cellule, cette capacité est quand à elle proportionnelle à la taille de la cellule durant la phase exponentielle de croissance. Ainsi la corrélation entre le volume cellulaire et le contenu en ribosomes rendra la concentration de Cln3p constante durant la phase G1. Autrement dit, bien que sa quantité absolue (quantité de protéine Cln3p en masse et par cellule) augmente durant la G1 sa quantité relative au volume (concentration intracellulaire de Cln3p) ne varie pas (Tyers et *al.* 1992). Dès lors comment la cellule pourrait elle « sentir » que le signal a atteint un certain niveau

lorsque la concentration de celui-ci demeure constante ? Une solution serait que la cellule normalise la quantité de ce *sizer* avec un élément non affecté par la croissance de la phase G1, comme le contenu en ADN. Dans leur étude Wang et ses collaborateurs (Wang et *al.*, 2009) proposèrent un modèle dans lequel Cln3p-Cdc28p serait titré par le contenu en site SBF du génome. En effet lorsqu'ils augmentèrent la quantité de sites SBF présents dans la cellule celle-ci se divisait à une taille critique plus importante (et par là même la population était d'un volume moyen plus important). En plus d'être compensé par une copie supplémentaire de *CLN3*, cet effet sur la taille critique était nul chez les mutants *cln3* et *cln3 whi5*. Ainsi au fur et à mesure que la cellule augmenterait en taille, en contenu ribosomique et en capacité de synthèse protéique, la quantité de Cln3p augmenterait ; dans le même temps la quantité de sites SBF déterminé par le contenu en ADN demeurant fixe, le ratio Cln3p/site SBF irait en augmentant. Une fois un certain ratio atteint, le SBF est activé, la cellule passe alors le *start* (**figure 16**).

Bien que particulièrement convainquant ce modèle de *titration* soulève également des questions. Si la quantité de Cln3, élément activateur du SBF, augmente bien avec la croissance il en va de même pour les éléments inhibiteurs Whi5p et le complexe Rpd3p. Comment le système parvient-il alors à supplanter ces effets inhibiteurs ? D'autre part comme nous l'avons vu, le contrôle de la transition G1/S n'est pas seul responsable de l'homéostasie de la taille des cellules chez *S. cerevisiae*, si ce système permettrait de bien coordonner croissance et division il est

Figure 16

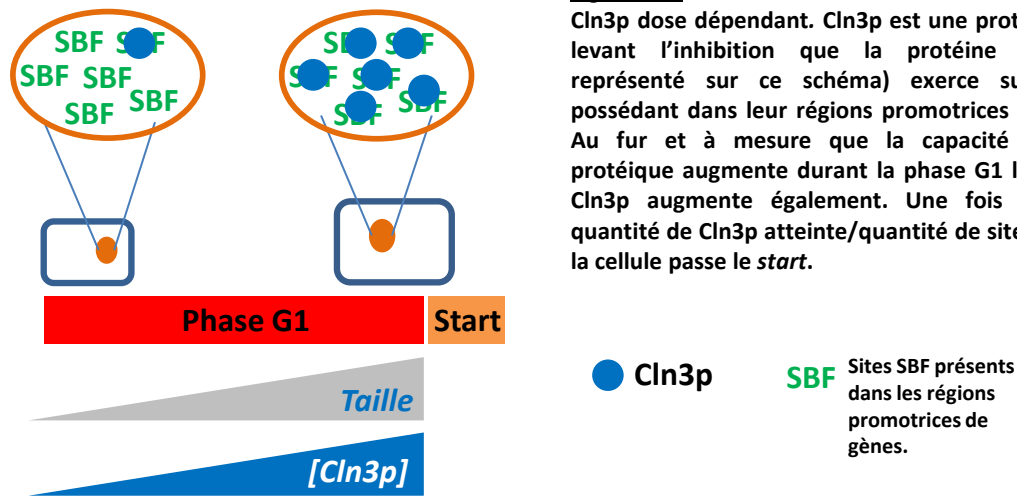


Figure 17

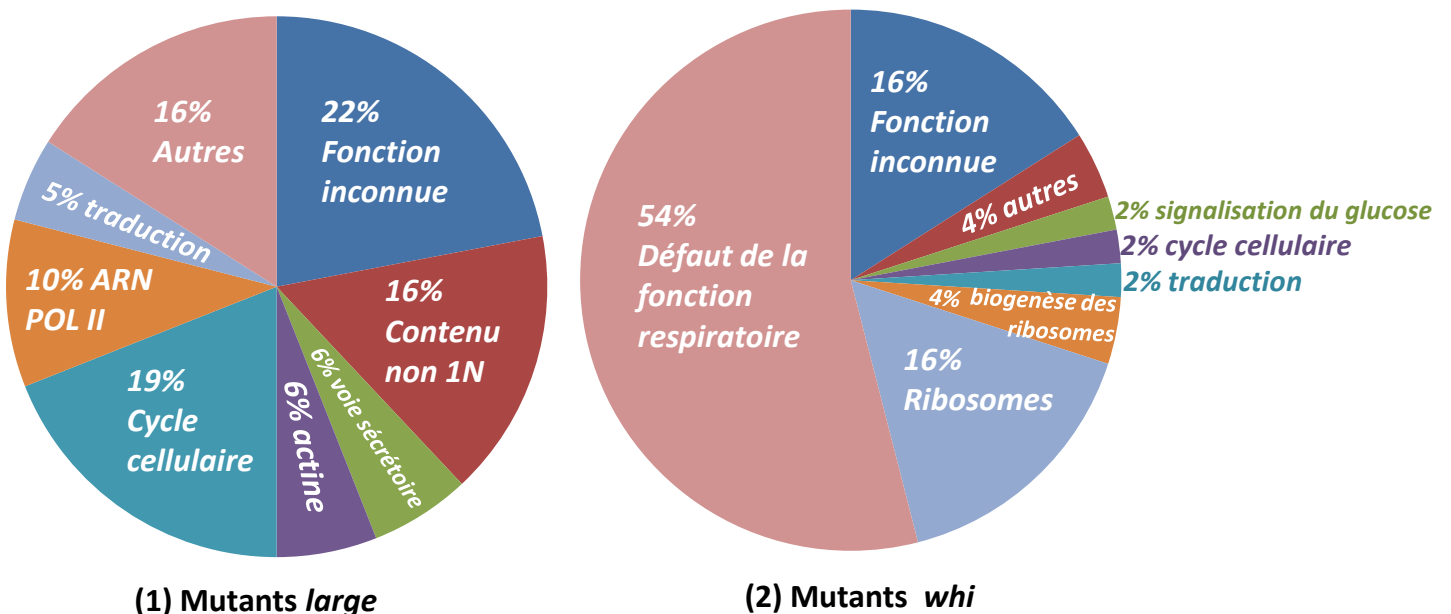


Figure 17: répartition des fonction pouvant être associées avec les mutants de tailles identifiés par Jorgensen et al. en (1) pour les mutants *large* et en (2) pour les mutants *whi*. la catégorie « contenu non 1N » correspond à des souches présentant le phénotype de taille large et qui ne présentent pas un contenu haploïde.

D'après Jorgensen et al. Science. 2002

en revanche incapable d'expliquer le contrôle de la taille de naissance des cellules filles, or la division étant ici asymétrique il s'agirait également d'un point essentiel pour l'homéostasie de taille des cellules. Enfin si nous avons présenté l'exemple de *sizer* protéique déterminé chez *S. cerevisiae*, précisons ici qu'il ne s'agit pas du seul connu à ce jour, en effet un mécanisme similaire à été mis en avant chez les bactéries *E. coli* et *B. subtilis* faisant intervenir la protéine DnaA et contrôlant l'initiation de la réplication. Finalement bien que Cln3p semble clairement être un *sizer* protéique nécessaire à l'homéostasie de la taille des cellules chez *S. cerevisiae*, le mécanisme l'impliquant à la transition G1/S n'est (1) pas suffisant pour expliquer l'homéostasie de la taille des cellules chez *S. cerevisiae*, rapellons que *CLN3* n'est pas essentiel ; et (2) serait en l'état incomplet : comment ce système supplante-t-il l'inhibition croissante de Whi5p ? ou bien quel est l'apport à ce système de Bck2p autre protéine peu étudiée qui pourrait également être un *cell sizer* capable de réguler la transition G1/S?

En conclusion de cette partie, nous pouvons résumer que quel que soit le type de *cell sizer* utilisé, la cellule intègre l'information de sa taille au niveau du cycle cellulaire pour déterminer l'initiation de la division ou bien au moment de libérer la cellule fille (respectivement en G1/S et G2/M chez *S. cerevisiae*). Ces mécanismes de contrôle de la taille ont lieu au moment où la cellule croît le plus en volume, ce qui pourrait constituer une manière d'augmenter la fiabilité de l'homéostasie de la taille cellulaire. Si celle-ci n'était pas contrôlée en ces points les cellules pourraient rapidement présenter des volumes aberrants.

IX 4) Apport de l'approche globale dans l'étude du contrôle de la taille des cellules : importance de la biogenèse des ribosomes.

Avant l'existence des collections de mutants de délétions, l'identification des gènes régulant l'homéostasie de la taille passait par l'isolation et le clonage de mutants. Bien que rendu difficile en raison du faible défaut de prolifération associé au phénotype de taille, ces approches ont permis la découverte des premiers régulateurs de la taille cellulaire tels que *CLN3* chez *S. cerevisiae*. Par la suite, l'avènement de ces banques permis de contourner ces problèmes de clonage par complémentation et l'analyse systématique du volume des mutants des gènes essentiels dévoila d'autres régulateurs de ce mécanisme : Whi5p, l'inhibiteur du SBF régulant la transition G1/S fut l'un d'entre eux. Mais ces mêmes banques permirent également des approches globales, ainsi en 2002, Jorgensen *et al.* entreprirent une approche systématique : ils mesurèrent le volume de l'ensemble des mutants de délétions d'une collection haploïde (Jorgensen *et al.*, 2002). Il est alors possible d'en représenter le résultat sous la forme d'un continuum de taille, de là le constat est saisissant : ~400 mutants de taille (soit près de 7% du génome) furent identifiés et validés, 196 mutants présentant un phénotype de petite taille (mutants *whi*) et 202 mutants de grande taille (mutants *lge*). Les 50 mutants présentant le phénotype de taille le plus marqué de chaque extrême, variaient d'au moins 7% par rapport à la taille sauvage, le mutant le plus petit est diminué de 40%, le mutant le plus gros est augmenté de 70%. Ces indications nous permettent de présenter la difficulté de l'étude du phénotype de taille. Il s'agit d'un phénotype quantitatif qui peut ainsi s'avérer, bien que présent, peu marqué. D'autre part ce phénotype étant sous

l'influence d'un grand nombre de gènes, et des mesures reproductibles requiert des conditions de culture particulièrement standardisées. Les fonctions associées aux gènes affectant la taille mises en avant par l'étude de Jorgensen sont nombreuses (**figure 17**). Les gènes dont la délétion peut être associée à une augmentation de la taille sont pour la plupart connus pour affecter la progression dans le cycle cellulaire, on y trouve également des acteurs des voies sécrétoires, de la traduction, des régulateurs de l'ARN POL II, autant de fonctions affectant également la progression dans le cycle cellulaire. La prédiction de Johnston (Johnston, 1977) selon laquelle toute altération du cycle cellulaire indépendamment de la croissance devrait provoquer une augmentation de la taille des cellules semble confirmée ici.

Concernant les mutants *whi* un grand nombre d'entre eux présentait un défaut de leur chaîne respiratoire mitochondriale provoquant un ralentissement de la prolifération et une accumulation de cellules en phase G1 et pouvant expliquer le phénotype de taille. Mais il apparut également par ce crible que la délétion de nombreux facteurs de biogenèse du ribosome (*Ribi*) conduisait à un sévère phénotype *whi*. Parmi ces mutants, se trouvait en effet les deux plus petites souches ainsi mesurées : *sfp1Δ* et *sch9Δ* qui présentaient un volume inférieur de 40% à celui de la souche sauvage. A eux deux, ces facteurs contrôlent plus de 200 gènes du régulon *Ribi*. *SFP1* code pour un facteur de transcription putatif à doigt de zinc potentiellement impliqué jusqu'alors, lors de dommage lié à l'ADN et durant la transition G2/M (Xu et al., 1998). *SCH9* présente une identité similaire à 49% au gène humain *AKT1* et avait été impliqué, comme cet équivalent mammifère, dans la durée de vie répllicative (nombre de cellules filles qu'une cellule est capable de produire avant d'entrer en sénescence) (Fabrizio et al., 2001). Certaines évidences

telles que l'haplo-insuffisance du caractère *whi* d'un hétérozygote *sch9*, ou bien le phénotype *lge* provoqué par une sur-expression du gène *SFP1*, suggèrent un effet sur la taille dose-dépendant de ces facteurs (Jorgensen et *al.*, 2002 ; Jorgensen et *al.* 2004). Cependant il semblerait, suite aux travaux successifs de l'équipe de Mike Tyers, que l'effet sur la taille de la biogenèse du ribosome ne soit pas dû à une altération en conséquence de la traduction; en réalité ces deux éléments ont des effets antagonistes sur la taille des cellules. Alors que la biogenèse du ribosome corrèle avec la taille, les cellules étant petites lorsque la biogenèse est perturbée, la traduction, elle, agit à l'opposée : un traitement à la cycloheximide provoque un élargissement des cellules (Jorgensen et *al.*, 2004). Cet effet de la traduction est cohérent avec les éléments discutés précédemment : nous l'avons vu, par les travaux de Hartwell a été défini la nécessité d'un niveau de traduction critique pour l'entrée dans le *start* du cycle, conséquence possible d'une *titration* de la protéine Cln3p par les sites SBF. Ainsi en diminuant le taux de traduction, la cellule demeurerait en phase G1 d'avantage de temps pour compenser la perte en ribosomes disponibles pour la traduction, et de fait retarderait la transition G1/S. Bien que la biogenèse des ribosomes et la traduction semblent ainsi avoir des effets distincts sur le contrôle de la taille des cellules il semblerait que le lien de dépendance entre ces deux phénomènes soit relativement complexe : en milieu pauvre en nutriments une diminution de l'efficacité de la traduction est mesurée, mais contrairement au traitement à la cycloheximide les cellules sont ici petites. De fait l'effet des nutriments sur la taille corrèle avec la biogenèse du ribosome, en milieu pauvre la biogenèse du ribosome est faible, en milieu riche celle-ci est élevée ; de plus, tout comme la taille des cellules, la biogenèse des ribosomes s'adapte aux changements de qualité du milieu en s'ajustement de façon dynamique, et ce

contrairement à l'efficacité de traduction (Kief et *al.*, 1981). La cellule pourrait ainsi intégrer l'information de la qualité nutritive au niveau de la biogénèse du ribosome, régulation qui passerait en partie par une relocalisation du facteur Sfp1p. En milieu pauvre Sfp1p est localisé dans le cytoplasme et y demeure jusqu'à sa réassignation au noyau lorsque des conditions favorables (milieu riche) sont restaurées. Par cette relocalisation peut également être opéré un rétro-contrôle de la traduction sur la biogénèse du ribosome, lors d'un défaut de traduction, suite à un traitement à la cycloheximide (Mnaimneh et *al.*, 2004). Nous n'avons actuellement que ces éléments démontrant la complexité et les inter-régulations entre biogénèse du ribosome et les événements subséquents liés à la traduction vis-à-vis du contrôle de la taille, ainsi le mécanisme moléculaire liant la biogénèse des ribosomes et la division cellulaire nous est toujours inconnu. Un schéma récapitulant les interactions directes et indirectes affectant la taille des cellules au niveau du *start* à la suite des travaux de Mike Tyers et de Paul Jorgensen est présenté en **figure 18**.

Cette approche globale a mis en avant, en plus de cette implication du *Ribi*, la complexité et la nature pléiotropique du phénotype de taille. D'autres études globales vont vers le même constat, à titre d'exemple un crible de mutant de taille des feuilles réalisé chez *A. thaliana* identifia pas moins de 200 mutants (Horiguchi et *al.*, 2006). Chez l'organisme unicellulaire eucaryote *S. cerevisiae*, près de 400 gènes (soit près de 7% du génome) seraient impliqués dans le contrôle du caractère de la taille cellulaire, dont la plupart n'affecterait pas le *start* (Tyers, 2004 ; Jorgensen et *al.*, 2002), dès lors par quel mécanisme ces gènes affectent ils la taille des cellules ?

Figure 18

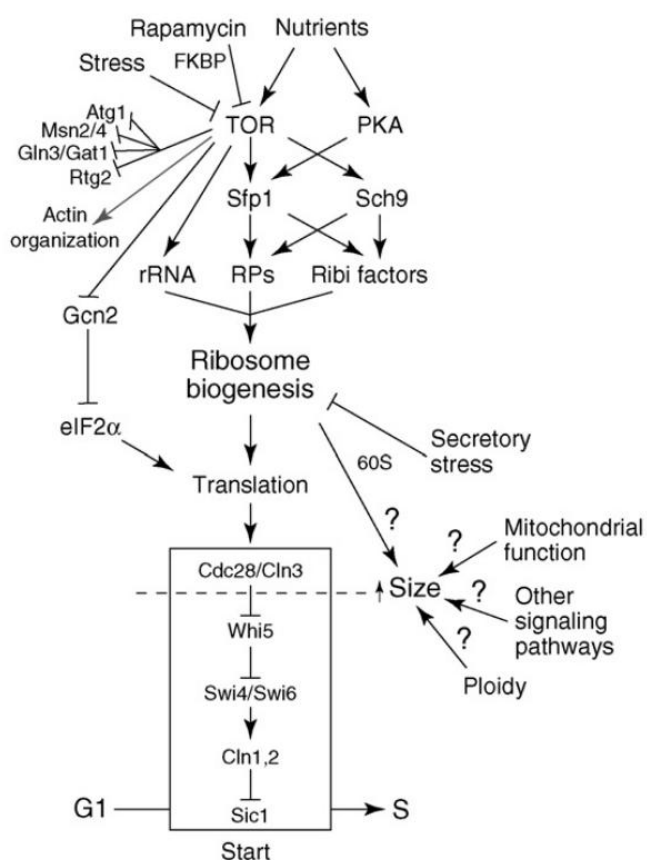


Figure 18: Chez *S. cerevisiae* les signaux nutritionnels sont relayés par TOR, PKA et Sch9p. La biogenèse des ribosomes est déterminée par différents mécanismes, dont le régulateur du Ribi Sfp1p. Lors du *start* le seuil de taille corrèle avec le taux de biogénèse des ribosomes et non la traduction.

Lors du *start* le complexe Cln3p-Cdc28p phosphoryle et inactive l'inhibiteur du SBF Whi5p, permettant par là même l'expression progressive d'un régulon de ~120 gènes *via* Swi4p-Swi6p. Parmi ces gènes se trouvent *CLN1* et *CLN2* qui, sous forme de complexe (Cln1/2p-Cdc28p), entraîneront la dégradation de Sic1p permettant l'entrée en phase S.

De Cook et Tyers Curr. Biol. 2007

II 5) Projet de thèse : Etude de l'homéostasie de la taille des cellules chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Durant mon projet de thèse je me suis intéressé à l'homéostasie de la taille des cellules dont nous venons de vous présenter les principales études de ces cinquante dernières années. Comme nous avons pu le voir, l'homéostasie de la taille cellulaire est un phénomène conservé dans tous les types cellulaires, des bactéries aux cellules mammifères. Nous avons cherché ici à comprendre les bases moléculaires utilisées par la cellule pour d'une part évaluer sa taille, et d'autre part la contrôler, la maintenant constante au fur et à mesure des divisions. L'identification systématique des mutants de taille chez *S. cerevisiae* a mis en avant l'impressionnante complexité du phénotype de taille (Jorgensen *et al.* 2002). Bien qu'identifiés ces gènes dont la délétion affecte l'homéostasie de la taille cellulaire ne sont pas pour la plupart organisés autour de voies de régulation. Nous sommes ainsi en présence d'un phénotype quantitatif d'intérêt, sous l'influence potentielle d'une pléiade de gènes dont la hiérarchie et le niveau d'implication reste à élucider. Bien que distinctes par l'approche employée, les deux parties de notre étude ont reposées sur ce constat.

Comme nous le verrons dans le premier chapitre, nous avons adopté dans un premier temps une approche gène candidat. L'identification des mutants de taille chez *S. cerevisiae* de Jorgensen (Jorgensen *et al.* 2002) a notamment montré l'importance du gène *PRS3*, gène impliqué dans le métabolisme central, pour

l'homéostasie de la taille des cellules, nous amenant à la possibilité de l'existence d'un *cell sizer* métabolique chez *S. cerevisiae*, et donc de potentiellement décrire le ou les mécanisme(s) moléculaire(s) impliqué(s) dans le contrôle nutritionnel de la taille des cellules chez le modèle eucaryote *Saccharomyces cerevisiae*. Dans le second chapitre nous avons tiré parti de la levure en tant que modèle génétique et de la disponibilité des collections de mutants afin de déployer une approche globale. Par cette approche, nous avons cherché à identifier puis caractériser, les voies de signalisation responsables de l'homéostasie de la taille cellulaire.

CHAPITRE I

III Chapitre 1:

Approche gène candidat dans l'étude de l'homéostasie de la taille des cellules : le gène *PRS3*.

Cette partie du projet a débuté avec l'étude de Paul Jorgensen dirigé par Mike Tyers (Jorgensen et *al.*, 2002) et leur observation qu'une souche dans laquelle l'activité de la phosphorybosyl-pyrophosphate (noté PRPP) synthétase était diminuée présentait l'un des phénotypes de petite taille les plus marqués. Ils démontrèrent également que la mutation du gène *PRS3* était épistatique pour le phénotype de taille sur celle de chacun des régulateurs du *start* alors connus (*CLN3*, *SWI4*...), un résultat qui indiquait que le produit du gène *PRS3* agirait en aval des produits de ces gènes dans la voie de régulation de la taille des cellules et donc en aval du régulon SBF/MBF. L'effet de la richesse en nutriments du milieu sur la taille des cellules pro- et eucaryotes est connu de longue date, en revanche en dehors du modèle présenté précédemment chez la bactérie *B. Subtilis* les mécanismes sous-jacents d'un tel phénomène demeurent inconnus et mal définis. Or, *prs3* étant le seul mutant du métabolisme central mis en avant par leur étude, nous nous sommes demandé si le produit de Prs3p, le PRPP, ne pourrait pas être un *cell sizer* métabolique chez *S. cerevisiae* tel que l'est l'UDP-glc chez *B. subtilis* (Chien et *al.*, 2012). Le gène *PRS3* constituait ainsi un excellent candidat pour débiter notre étude du contrôle de l'homéostasie de la taille cellulaire.

1) Le complexe Prs1p/Prs3p est nécessaire au maintien de la taille des cellules.

L'enzyme 5-phosphoribosyl-1(α)-pyrophosphate synthétase (notée *PRS*) catalyse la réaction de biosynthèse du Phosphorybosyl-pyrophosphate par le transfert du groupement pyrophosphate d'une molécule d'ATP sur un ribose-5-phosphate issu de la voie des pentoses phosphates (**figure 1**). Le PRPP est le donneur de ribose phosphate du métabolisme et entre dans les réactions de biosynthèse d'acides aminés (l'histidine et le tryptophane), de l'ensemble des nucléosides purines et pyrimidines et du nicotinamide adénine dinucléotide (noté NAD^+). *Saccharomyces cerevisiae* fait figure de cas particulier, en effet pas moins de cinq gènes *PRS* ont été identifiés jusqu'à présent, situés chacun sur un chromosome différent là où les autres organismes modèles n'en présentent qu'un ou deux. Les cinq polypeptides issus de ces gènes seraient organisés en deux complexes portant l'activité de biosynthèse du PRPP, Prs1p et Prs3p d'une part, et Prs2p, Prs4p et Prs5p d'autre part (Hernando et al., 1999). Aucun des cinq gènes *PRS* de *S. cerevisiae* n'est essentiel et ceux-ci peuvent être interrompus sans provoquer de létalité tant que subsiste, intègre, un de ces deux complexes. D'après les mesures *in vitro* d'activité PRS réalisées sur des extraits protéiques totaux de différentes combinaisons de mutants *prs* (Hernando et al., 1999), le complexe composé des protéines Prs1p et Prs3p serait responsable de l'essentiel (~97%) de l'activité de biosynthèse du PRPP chez *S. cerevisiae*. Comme il est possible de le voir sur le test en goutte en **figure 2A** ci-contre, seules les délétions de *PRS1* ou de *PRS3* entraînent un défaut significatif de la prolifération cellulaire. D'autre part pour compléter ces données, nous avons établi une méthode

Figure 1

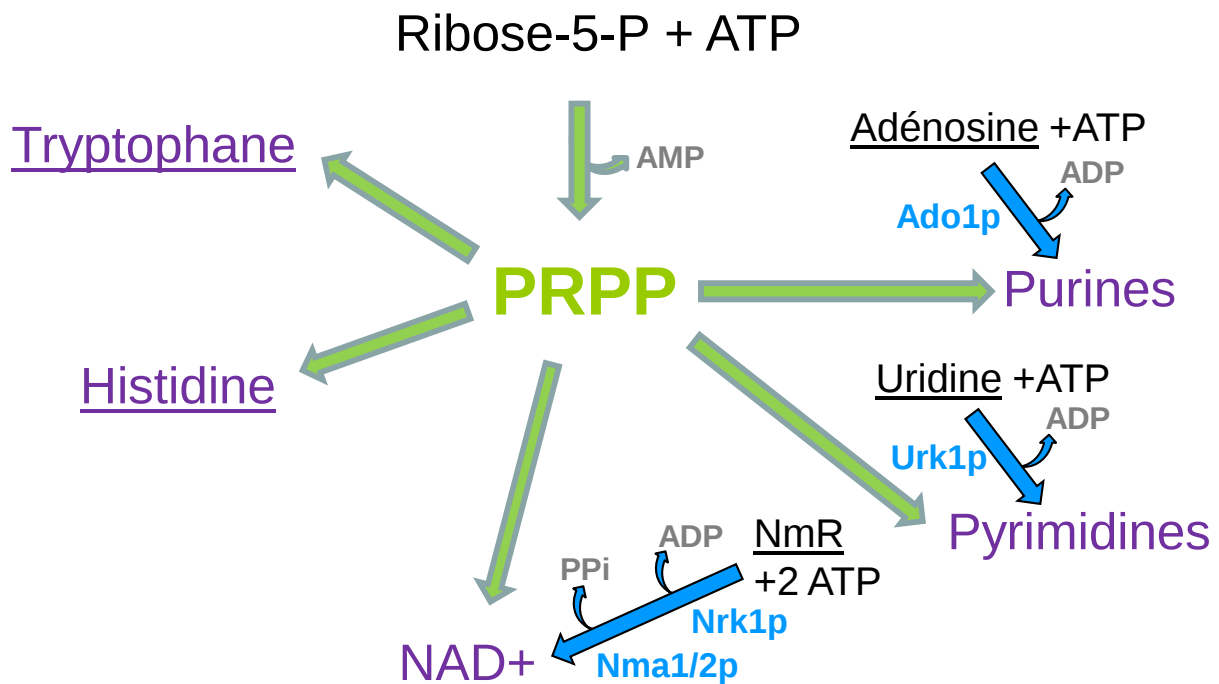


Figure 1:
Voie de synthèse et d'utilisation du Phosphoribosylpyrophosphate (PRPP)
chez *S. cerevisiae*:

Représentation schématique de la contribution du PRPP au métabolisme, les produits finaux sont en violet et les molécules ajoutées pour subvenir aux besoins en PRPP de la cellule sont soulignées. NmR = nicotinamide riboside; NAD⁺ = nicotinamide adénine dinucléotides.

de dosage *in vivo* du PRPP dont les détails sont donnés dans le *matériel et méthodes*. L'analyse de la concentration en PRPP des cinq souches PRS est donnée en **figure 2B**. Les mutants *prs1* et *prs3* présentent un niveau de PRPP fortement diminués par rapport à celui de la souche sauvage. Des trois autres mutants seul *prs5*, et dans une moindre mesure *prs4*, voient leur niveau de PRPP diminuer. L'ensemble de ces résultats est en accord avec les données *in vitro* publiées par Hernando et al. Lorsque le complexe Prs1p/Prs3p, responsable de l'essentiel de l'activité, est altéré par l'absence d'une des deux protéines, le niveau de PRPP est fortement diminué, et la prolifération cellulaire de ces souches s'en retrouve alors réduite là où les mutants du second complexe conserveraient un niveau de PRPP suffisant pour ne pas alors être affectés au niveau de leur prolifération. Nous pouvons en conclure que l'activité de biosynthèse du PRPP est critique pour la prolifération cellulaire.

De manière étonnante seul le mutant *prs3* présentait un phénotype de taille dans l'étude de Jorgensen et al. (Jorgensen et al. 2002). Ce qui suggérerait une fonction spécifique de *Prs3* pour l'homéostasie de la taille cellulaire. Nous avons ainsi voulu vérifier, dans nos conditions, le phénotype de taille de l'ensemble des mutants PRS de *S. cerevisiae*. Pour cela, ont été utilisés les mutants disponibles dans notre collection de mutants (collection haploïde Euroscarf) et leurs volumes cellulaires mesurés après au moins 24 H de phase exponentielle de croissance en milieu riche (YPD 2% glucose), plus de détails relatifs à cette méthode de mesure peuvent être trouvés dans la partie *matériels et méthodes*. En **figure 2C** sont présentés les distributions des volumes des cinq mutants *prs* ainsi que d'une souche sauvage, en **figure 2D** sont présentés les volumes médians de ces mêmes souches. Les

Figure 2

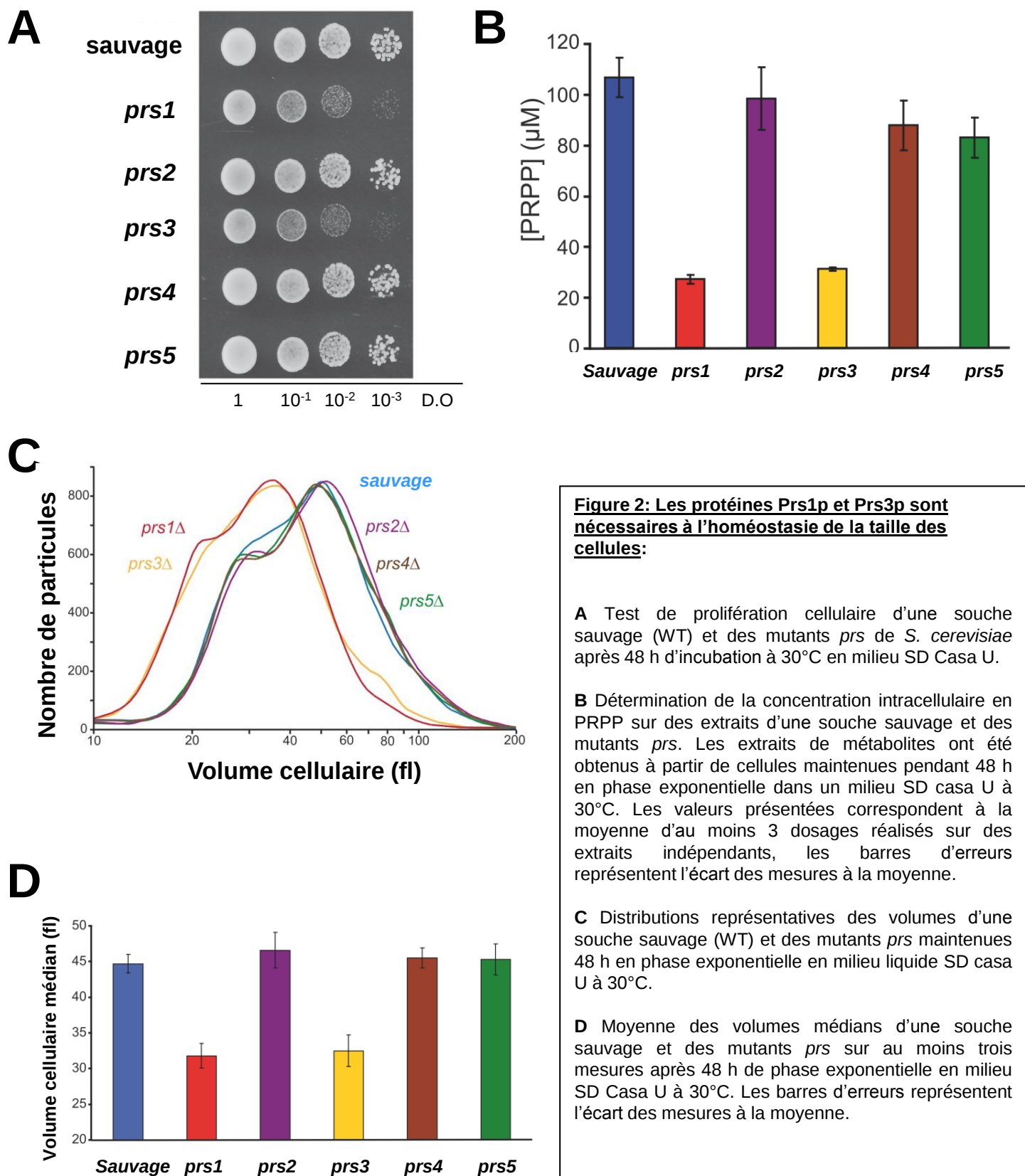


Figure 2: Les protéines Prs1p et Prs3p sont nécessaires à l'homéostasie de la taille des cellules:

A Test de prolifération cellulaire d'une souche sauvage (WT) et des mutants *prs* de *S. cerevisiae* après 48 h d'incubation à 30°C en milieu SD Casa U.

B Détermination de la concentration intracellulaire en PRPP sur des extraits d'une souche sauvage et des mutants *prs*. Les extraits de métabolites ont été obtenus à partir de cellules maintenues pendant 48 h en phase exponentielle dans un milieu SD casa U à 30°C. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne d'au moins 3 dosages réalisés sur des extraits indépendants, les barres d'erreurs représentent l'écart des mesures à la moyenne.

C Distributions représentatives des volumes d'une souche sauvage (WT) et des mutants *prs* maintenues 48 h en phase exponentielle en milieu liquide SD casa U à 30°C.

D Moyenne des volumes médians d'une souche sauvage et des mutants *prs* sur au moins trois mesures après 48 h de phase exponentielle en milieu SD Casa U à 30°C. Les barres d'erreurs représentent l'écart des mesures à la moyenne.

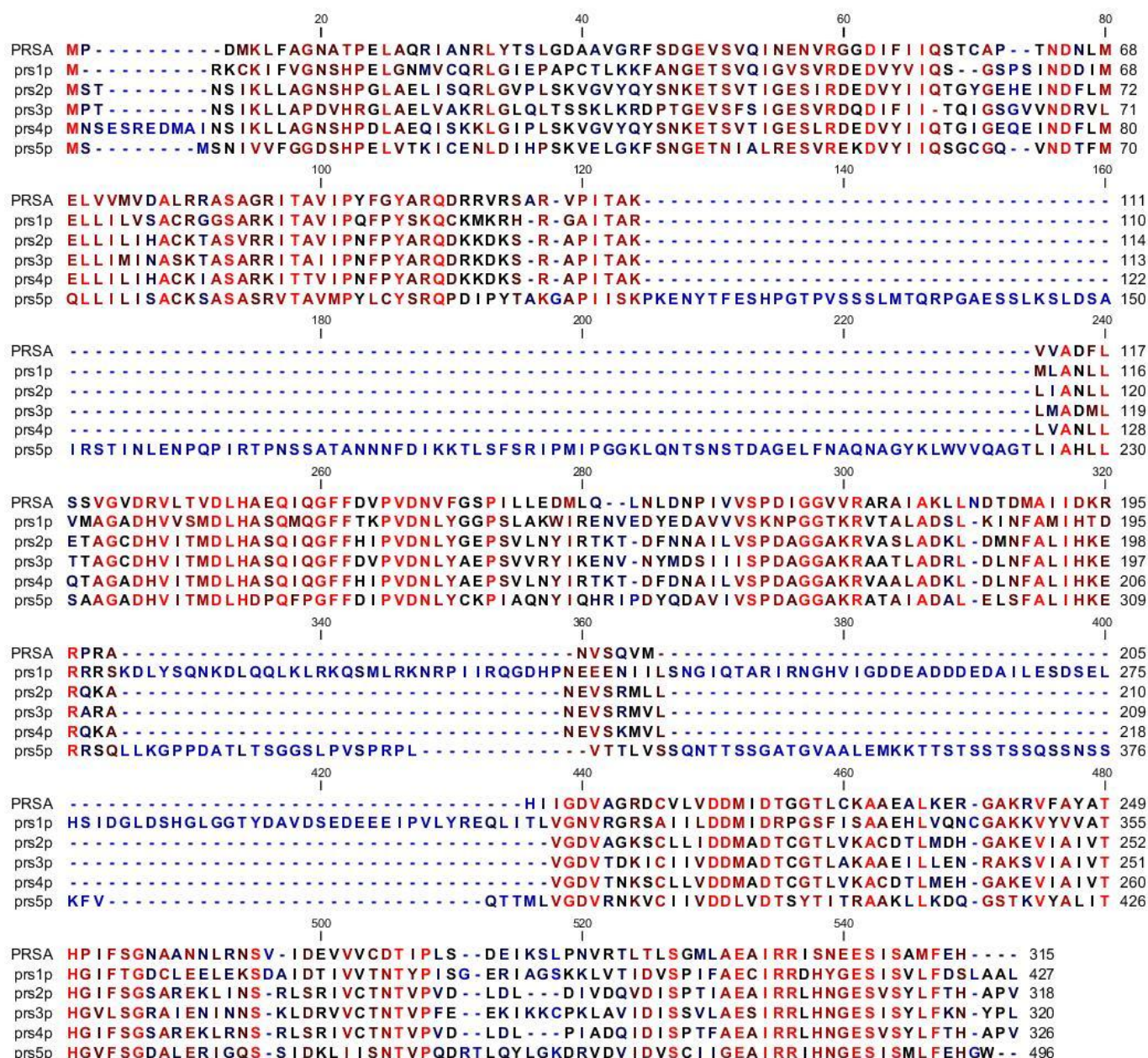
distributions de volume des souches *prs1* et *prs3* sont superposables et décalées vers de plus petits volumes par rapport aux distributions de volume des souches sauvage et *prs2*, *prs4* et *prs5* qui sont elles, également superposables. De plus l'ensemble des distributions de *prs1* et *prs3* est décalé ce qui suggère que l'ensemble de la population et non une partie est plus petite par rapport la population sauvage. Ainsi nos mesures ont permis de révéler que tout comme *prs3*, le mutant *prs1* était de petite taille, *a contrario* les souches mutées pour les gènes *PRS2*, *PRS4* ou *PRS5* présentent un phénotype de taille sauvage.

Les mutants *prs1* et *prs3* présentent une distribution de volume superposable. Le phénomène altéré chez *prs3* conduisant au phénotype de taille ne serait ainsi pas spécifique de *PRS3* et la délétion de *PRS1* affecterait ce mécanisme avec la même efficience. De même que pour le phénotype de prolifération, seule la délétion des gènes codant pour les protéines du complexe responsable de l'essentiel de l'activité de biosynthèse du PRPP provoque un phénotype « petite taille ».

III 2) L'activité de biosynthèse du PRPP est critique pour l'homéostasie de la taille cellulaire.

Dès lors, deux hypothèses peuvent être formulées : la synthèse du PRPP étant particulièrement diminuée dans les mutants *prs1* et *prs3*, le mécanisme d'homéostasie de la taille des cellules pourrait être affecté par le PRPP, produit de l'activité de ce complexe. Cela pourrait expliquer que *prs1* et *prs3* soient les seuls mutants PRS à présenter un phénotype de taille. Une autre hypothèse serait que ce phénotype est la conséquence d'une autre fonction de ce complexe Prs1p/Prs3p, le

Figure 3



% identité PrsAp / Prs1p 30.6%
 PrsAp / Prs3p 47%
 Prs1p / Prs3p 34%

Figure 3:

Alignement des séquences protéiques des cinq polypeptides Prs de *S. cerevisiae* (Prs1p à 5p) ainsi que le polypeptide PRSA de *E. coli* ; les résidus conservés sont colorés en rouge.

plus vraisemblable serait alors une interaction avec une autre protéine qui elle participerait au contrôle de la taille et qui ne pourrait avoir lieu dans un contexte où le complexe Prs1p-Prs3p est déficient. Pour répondre à cette question nous avons cherché à compléter le phénotype de taille des souches *prs1* et *prs3* avec une PRS bactérienne, PRSA, unique enzyme nécessaire à la synthèse du PRPP chez la bactérie *E. coli* et ne présentant que peu d'homologie de séquence avec les PRS de levure (**figure 3**). De fait s'il existe des interactions nécessaires à l'homéostasie de la taille, entre le complexe Prs1p/Prs3p et une ou plusieurs protéines, il serait peu probable qu'elles aient également lieu avec la PRSA bactérienne. Ainsi exprimer cette protéine devrait permettre de rétablir uniquement l'activité de biosynthèse en PRPP dans les souches *prs1* et *prs3*.

En **figure 4A** sont présentées les distributions de volumes des souches sauvage et *prs1* exprimant ou non la PRSA (les résultats obtenus avec la souche *prs3*, sont similaires de ceux de *prs1* et ne sont pas ici présentés par souci de concision). Le phénotype de taille des souches *prs1* et *prs3* est complété par l'expression de la PRSA, la distribution de volume se superposant avec celle de la souche sauvage. Il en va de même pour le phénotype de prolifération (**figure 4B**) de ces souches qui est alors similaire à celui d'une souche sauvage. En revanche, bien que doublé par rapport à la souche n'exprimant pas la PRSA, le niveau de PRPP de la souche *prs1* (ou *prs3*) exprimant PRSA ne revient pas à un niveau sauvage, en fait il demeure à ~36% de celui-ci (**figure 4C**). Que ce soit pour la taille des cellules ou bien la prolifération de celle-ci, l'expression de la PRSA dans une souche sauvage ne provoque aucun phénotype de taille, et leur niveau de PRPP demeure également inaltéré. Ces résultats apportent plusieurs informations sur le mécanisme participant

Figure 4

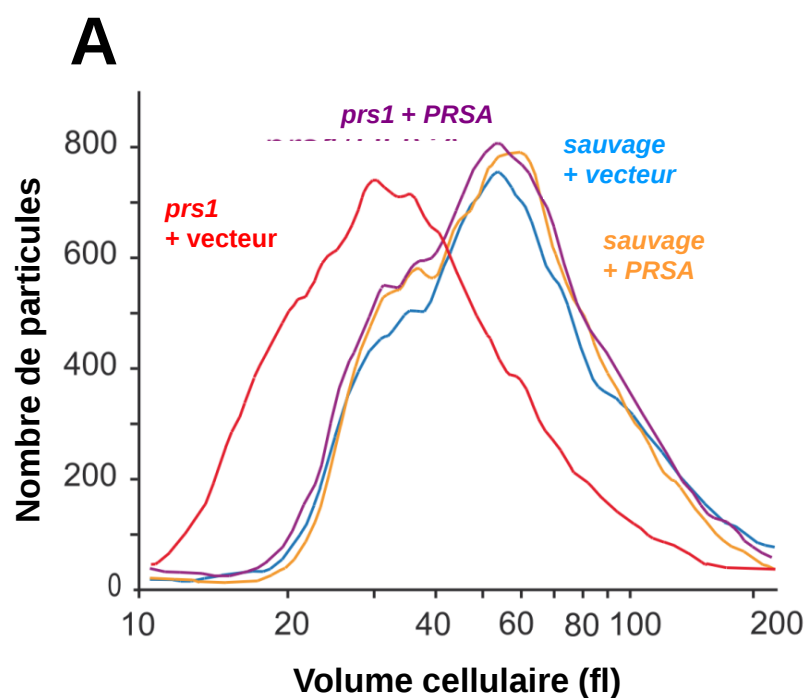
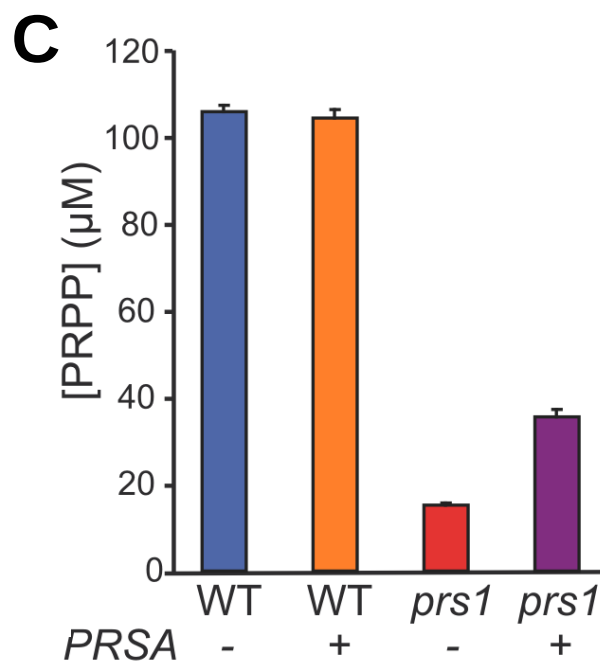
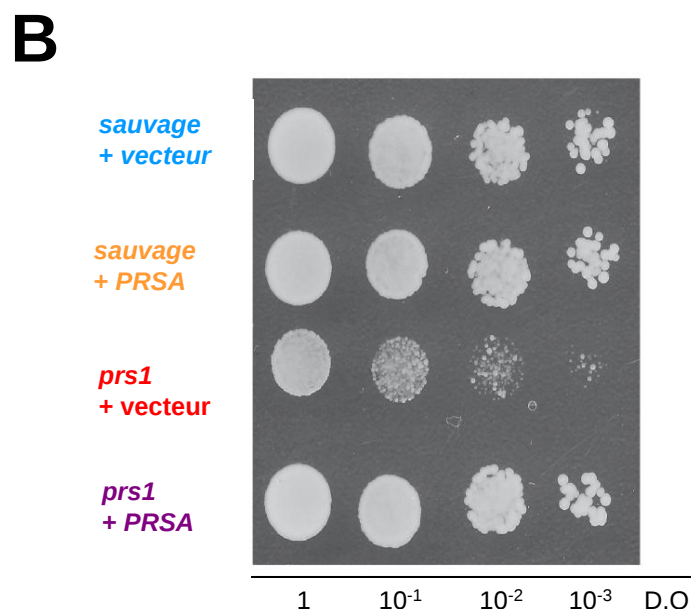


Figure 4: L'activité de biosynthèse du PRPP est critique pour l'homéostasie de la taille des cellules.

A Distributions représentatives des volumes d'une souche sauvage et du mutant *prs1* exprimant ou non la PRSA (*E. coli*), maintenues 48 h en phase exponentielle en milieu liquide SD casa U à 30°C

B Test de prolifération cellulaire d'une souche sauvage et du mutant *prs1* exprimant ou non la PRSA, après 48 h d'incubation à 30°C en milieu SD Casa U.

C Détermination de la concentration intracellulaire en PRPP sur des extraits d'une souche sauvage et du mutant *prs1*. Les extraits de métabolites ont été obtenus à partir de cellules maintenues pendant 48 h en phase exponentielle dans un milieu SD casa U à 30°C. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne d'au moins 3 dosages réalisés sur des extraits indépendants, les barres d'erreurs représentent l'écart des mesures à la moyenne.



à l'homéostasie de la taille affecté chez les mutants *prs1* et *prs3*. En premier lieu l'expression de PRSA est suffisante pour compléter le phénotype de taille des mutants *prs1* et *prs3*. Si cette enzyme n'est pas capable de reproduire les interactions entre protéines qui auraient lieu dans un contexte sauvage, il nous reste la capacité de biosynthèse de la PRSA qui, comme en témoigne notre dosage de PRPP est active chez *S. cerevisiae*. Alors, si le phénotype de taille des souches *prs1* et *prs3* n'est pas dû à une fonction secondaire de Prs1p et Prs3p, il devrait être le fait de la diminution de l'activité PRS.

Ainsi, en plus d'être critique pour la prolifération cellulaire, l'activité de biosynthèse du PRPP l'est donc également pour la taille des cellules. Par quel mécanisme le PRPP agit-il sur le contrôle de la taille cellulaire ? Plusieurs hypothèses sont ici possibles, le PRPP pourrait être « senti » par la cellule et donc être chez *S. cerevisiae* un « cell sizer » : la cellule estimerait la quantité de PRPP dont elle dispose et intégrerait cette information dans son processus de contrôle de la taille. Bien que l'augmentation de la concentration en PRPP des souches *prs1* et *prs3* soit modérée, elle semblerait suffisante à restaurer leur phénotype de taille (**figure 4A et 4C**). *A contrario* nous avons mesuré une diminution tout aussi modérée dans la souche *prs5* (et *prs4* dans une moindre mesure) sans qu'aucun phénotype de taille y soit associé (**figure 2B à 2D**). Si le PRPP est un *cell sizer* alors il pourrait agir sur la taille des cellules par un effet « seuil », une sorte de « switch » métabolique : le phénotype de taille apparaîtrait en deçà d'une concentration minimale en PRPP. Le phénotype de taille pourrait ainsi être le fait d'une limitation en PRPP disponible pour l'une des voies de biosynthèse dans laquelle le PRPP est métabolisé. D'autre part, lors de l'expression de la PRSA dans une souche sauvage, nous ne mesurons aucune modification

significative de la concentration en PRPP ou de la taille des cellules. La souche n'ayant aucun problème de biosynthèse de PRPP, il est alors possible que nous ne détectons pas d'augmentation soit parce que les flux de consommation augmentent, soit en raison d'une diminution de la production de la part des complexes endogènes PRS. Ne pouvant différencier la part de PRPP produite par PRSA nous ne pouvons trancher sur ce point. Néanmoins nous pouvons en l'état conclure que chez les mutants *prs1* et *prs3* le phénotype de taille est le fait d'une diminution de la biosynthèse du PRPP et non de l'absence des protéines en tant que tel.

Une autre hypothèse serait que si la concentration du PRPP n'est pas directement « évaluée » par la cellule alors les effets observés proviendraient des voies métaboliques situées en aval du PRPP. Et ce serait alors la limitation en PRPP en temps que substrat pour la synthèse de molécules le consommant qui provoquerait le phénotype de taille. En d'autres termes, une des molécules dont la biosynthèse nécessite du PRPP provoquerait-elle ce phénotype ?

III 3) Les phénotypes de prolifération et de taille de *prs3* sont complémentés par l'ajout des molécules PRPP dépendantes.

Pour tester cette hypothèse nous avons fourni à une souche *sauvage* et *prs3* des molécules situées en aval du PRPP dans chacune des voies métaboliques consommatrices de PRPP, de telle façon que la cellule n'ait plus besoin du PRPP. Ces molécules, représentées sur la **figure 1** sont l'adénosine et l'uridine pour les

besoins en nucléotides, l'histidine et le tryptophane pour les acides aminés et le nicotinamide-riboside (noté NmR) pour le NAD⁺.

Si l'ajout de ces molécules PRPP dépendantes est suffisant pour rétablir un phénotype de taille sauvage d'une souche *prs3* alors cela ne serait pas le PRPP lui-même qui serait responsable du phénotype de taille mais une ou plusieurs molécules en aval de celui-ci. Comme il est possible de le voir sur le test en goutte en **figure 5A**, l'ajout des molécules consommatrices de PRPP corrige partiellement le défaut de prolifération d'une souche *prs3* (ou *prs1*, données non présentées), par rapport à la croissance de la souche sauvage. Le fait que le phénotype de prolifération ne soit pas absolument rétabli peut provenir des concentrations employées pour les molécules ajoutées et/ou de l'équilibre de celles-ci entre elles. Néanmoins, le phénotype de taille est lui clairement corrigé par l'ajout de ces molécules (**figure 5B**). Ces suppléments entraînent en fait une augmentation du volume de *prs3* au-delà de la taille sauvage, souche sur laquelle les suppléments provoquent également une augmentation de la taille. La concentration en PRPP augmente aussi dans les deux cas, dans la souche *prs3* et sauvage **figure 5C**. La taille des souches testées est augmentée par l'ajout des suppléments, ainsi une ou plusieurs de ces molécules participerait au contrôle de la taille cellulaire directement en étant elle-même sentie ou indirectement par la voie dans laquelle la molécule est métabolisée en aval, et donc par les molécules subséquentes en découlant. Dans le même temps comme le niveau de PRPP augmente, il nous est à ce stade impossible d'écarter de façon certaine un rôle du PRPP dans ce mécanisme sous jacent de contrôle de la taille des cellules. Le fait qu'ici et ce contrairement à l'expression de PRSA, la souche sauvage croisse en taille constitue un élément intrigant : cela suggérerait qu'une ou plusieurs

Figure 5

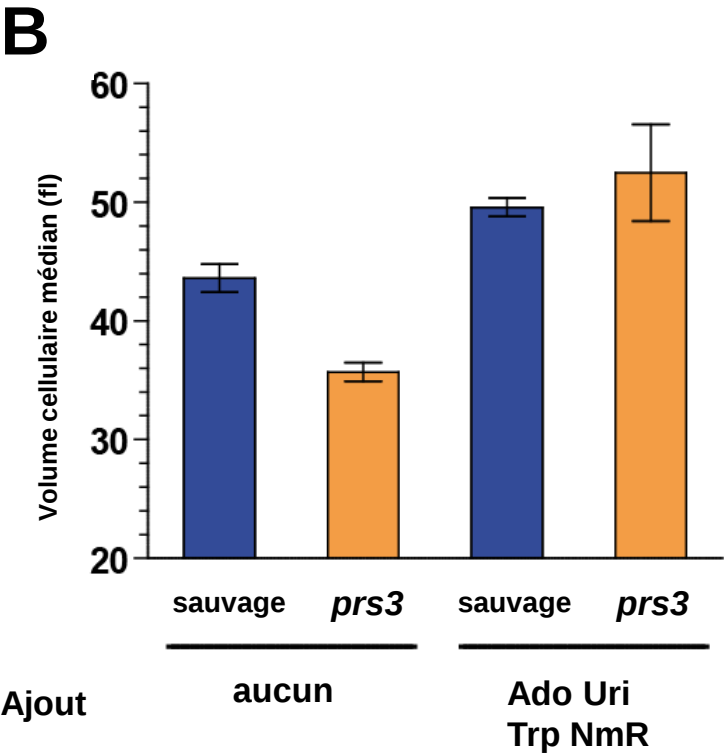
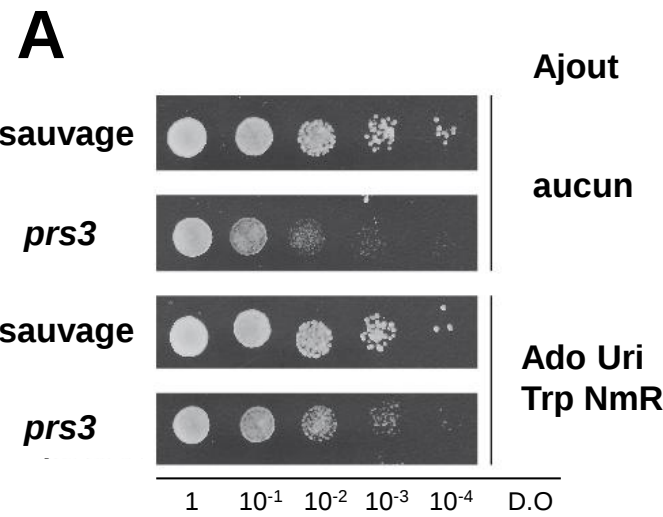
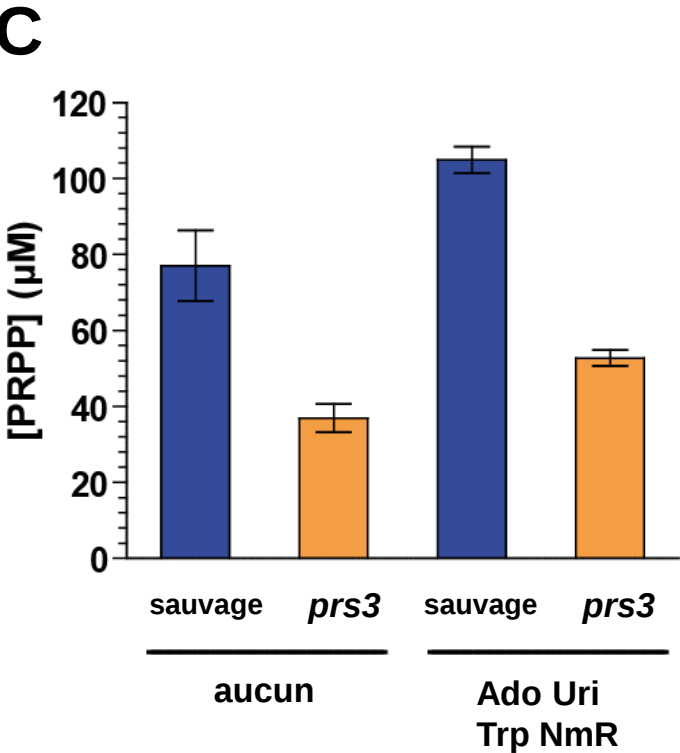


Figure 5:
Effets des molécules PRPP dépendantes sur les
phénotypes de prolifération et de volume de *prs3* :

A Test de prolifération cellulaire d'une souche sauvage et du mutant *prs3* après 48 h d'incubation à 30°C en milieu SD Casa en présence ou en absence des suppléments: adénosine (Ado), uridine (Uri), tryptophane (Trp) et Nicotinamide riboside (NmR).

B Moyenne des volumes médians d'une souche sauvage et du mutant *prs3* maintenues 48 h en phase exponentielle en milieu liquide SD casa à 30°C en présence ou en absence des suppléments: adénosine (Ado), uridine (Uri), tryptophane (Trp) et Nicotinamide riboside (NmR). Les barres d'erreurs représentent l'écart des mesures de trois cultures indépendantes à la moyenne.

C Détermination de la concentration intracellulaire en PRPP sur des extraits d'une souche sauvage et du mutant *prs3*. Les extraits de métabolites ont été obtenus à partir de cellules maintenues pendant 48 h en phase exponentielle dans un milieu SD casa à 30°C en présence ou en absence des suppléments: adénosine (Ado), uridine (Uri), tryptophane (Trp) et Nicotinamide riboside (NmR). Les valeurs présentées correspondent à la moyenne d'au moins 3 dosages réalisés sur des extraits indépendants, les barres d'erreurs représentent l'écart des mesures à la moyenne.



des molécules ajoutées pourraient être impliquées dans l'homéostasie de la taille des cellules, voir même être un *cell sizer*.

L'ajout des molécules supprimant les besoins en PRPP de la cellule provoquent une augmentation du volume cellulaire, nous avons alors voulu déterminer laquelle de ces molécules était responsable de cet effet sur la taille. Pour cela nous avons reproduit l'expérience précédente, tests de prolifération et mesures de volume, en dissociant lors de l'ajout les nucléotides, des acides aminés et du NmR. Aucune des molécules n'est capable, seule, de rétablir une prolifération sauvage dans la souche *prs3*, *a contrario* le NmR seul est capable d'accroître significativement la taille de cellules sauvages et celles de *prs3* **figure 6A**. La combinaison des suppléments exempts du NmR (**figure 6A lignes Ado Uri Trp**) est capable d'améliorer de façon nette le défaut de prolifération comme précédemment lorsque ces molécules étaient associées au NmR (**figure 5A lignes Ado Uri NmR**). En revanche cette même combinaison n'affecte aucunement la taille des cellules (**figure 6A lignes Ado Uri Trp**). Première conclusion, le NmR ne semble ainsi pas nécessaire à l'établissement d'une prolifération sauvage (**figure 6A lignes *prs3* control et NmR**). Chez la bactérie 80% du flux métabolique en provenance du PRPP est dirigé vers les nucléotides contre seulement 2% pour le NAD (B Hove-Jensen et *al.*, 1988), ainsi le défaut de prolifération de *prs3* pourrait être le fait d'une carence en nucléotides. Mesures effectuées (**figure 6B**), le niveau de nucléotide de la souche *prs3*, faible en condition contrôle, augmente nettement lors de l'ajout des suppléments. Aucune augmentation significative n'est visible chez la souche sauvage. L'effet sur le *pool* de nucléotide pourrait paraître modéré mais cela n'est pas le cas : une augmentation de 1 mM des nucléotides correspond à une

Figure 6

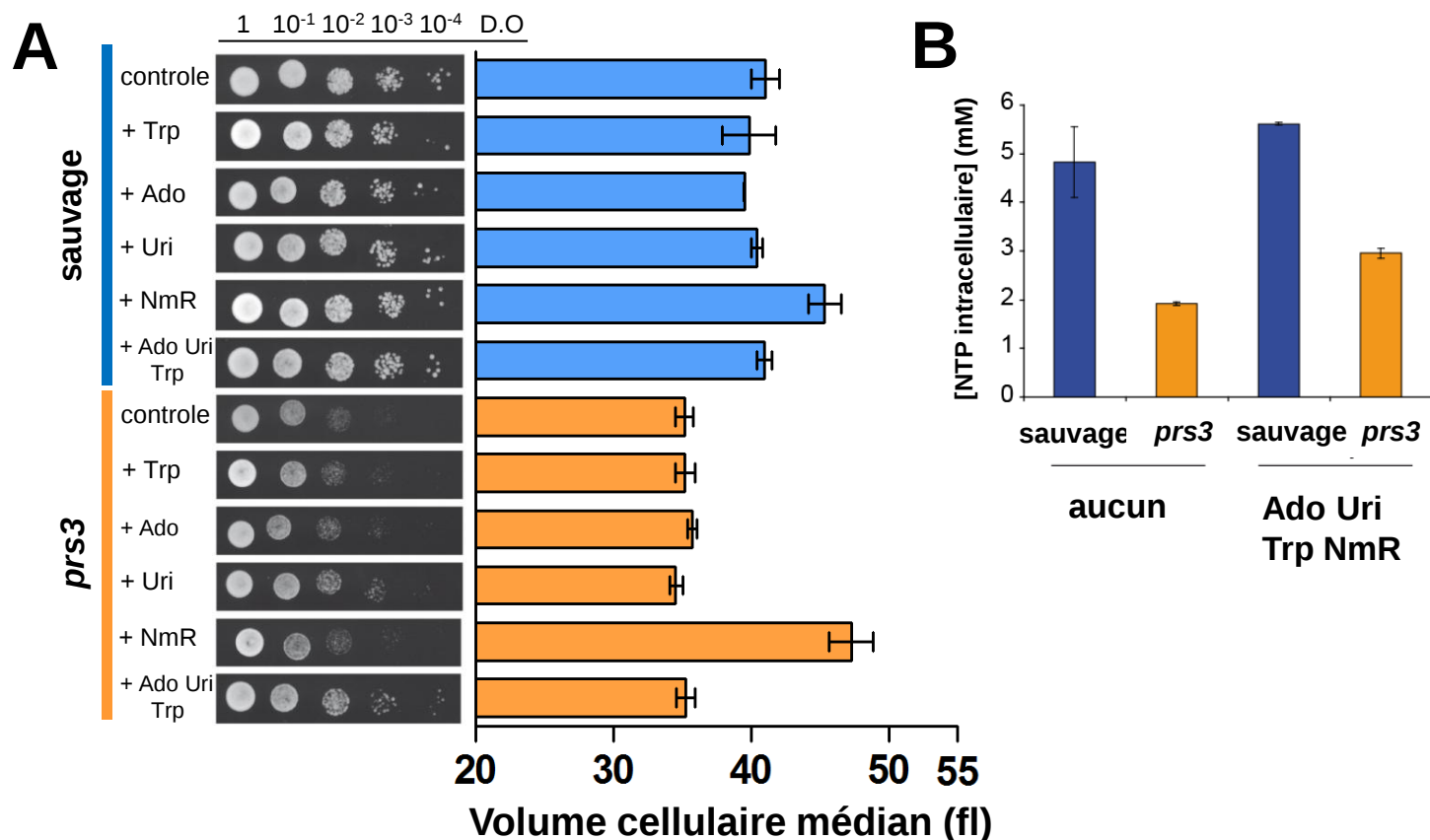
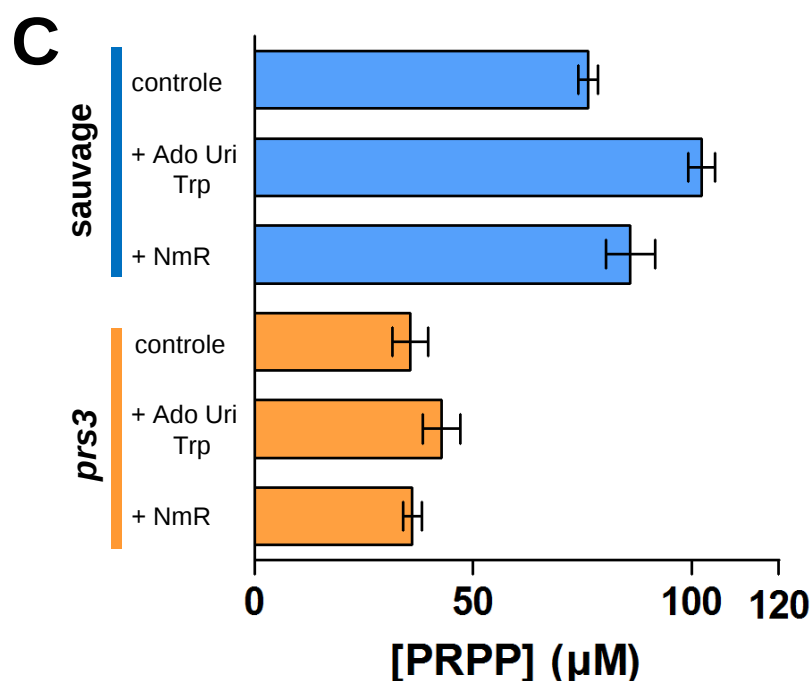


Figure 6: Le NmR est suffisant pour augmenter la taille des cellules par un mécanisme distinct de la prolifération et de façon PRPP indépendante.



A Test de prolifération cellulaire (incubation 48 h à 30°C) et moyenne des volumes médians sur au moins trois mesures (maintenu pendant 48 h en phase exponentielle), d'une souche sauvage et du mutant *prs3* en milieu SD Casa en présence ou en absence des suppléments: adénosine (Ado), uridine (Uri), tryptophane (Trp) et Nicotinamide riboside (NmR). Les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne.

B Détermination de la concentration intracellulaire des nucléotides sur des extraits d'une souche sauvage et du mutant *prs3*. Les extraits de métabolites ont été obtenus à partir de cellules maintenues pendant 48 h en phase exponentielle dans un milieu SD casa à 30°C en présence ou en absence des suppléments: adénosine (Ado), uridine (Uri), tryptophane (Trp) et Nicotinamide riboside (NmR). Les valeurs présentées correspondent à la moyenne d'au moins 2 dosages réalisés sur des extraits indépendants, les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne.

C Détermination de la concentration intracellulaire en PRPP sur des extraits d'une souche sauvage et du mutant *prs3*. Les extraits de métabolites ont été obtenus à partir de cellules placées dans les mêmes conditions que les cultures présentées en **A**. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne d'au moins 2 dosages réalisés sur des extraits indépendants, les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne.

importante augmentation et pourrait tout à fait être responsable de l'amélioration du phénotype de croissance de la souche *prs3*. D'autre part et contrairement à notre résultat lors de l'expression de PRSA, l'effet du NmR sur la taille des cellules est ici indépendant du niveau de PRPP **figure 6A et 6C**. Quant l'ajout de NmR provoque une augmentation du volume cellulaire aucune augmentation significative du PRPP n'est à signaler chez le mutant *prs3*. *A contrario*, l'effet sur la prolifération de l'ajout des autres molécules s'accompagne d'une hausse de la concentration en PRPP. Comme nos résultats l'ont montré, la biosynthèse du PRPP est nécessaire à l'établissement d'une taille cellulaire sauvage, le résultat du traitement au NmR nous laisse supposer lui, que ce besoin du PRPP serait en tant que substrat limitant pour la synthèse du *cell sizer* et non pas en tant que *cell sizer* lui-même. Le NmR étant ici suffisant pour augmenter la taille des cellules sauvages et *prs3*, il pourrait s'agir d'un *cell sizer*.

III 4) Etude transcriptomique des effets d'un traitement au NmR sur une souche sauvage.

Le NmR provoque une augmentation de la taille des cellules, mais par quel mécanisme ? Par une approche gène candidat nous avons cherché à établir le déterminisme génétique de cet effet du NmR sur la taille des cellules. Le NmR étant un métabolite de la voie du NAD^+ , nous avons sélectionné comme candidats les gènes codant pour les enzymes de cette voie. L'étude de ces mutants nous révéla d'une part qu'aucune des étapes non essentielles connues n'était nécessaire à l'effet du NmR sur la taille des cellules (données non présentées). Et d'autre part, des combinaisons de mutants qui auraient dû provoquer une létalité de la souche (la

production du NAD^+ étant essentielle pour la cellule), se révélèrent viables, ce qui nous suggéra que la voie de synthèse du NAD^+ n'était pas à ce jour suffisamment bien décrite. Finalement cette approche s'étant révélée peu fructueuse et n'ayant alors aucune autre piste nous avons décidé de déterminer les voies de signalisation régulées par le NmR via une approche globale du transcriptome. Nous avons alors comparé, en collaboration avec la plateforme d'analyse transcriptionnelle de l'école normale supérieure de Paris, les transcriptomes d'une souche sauvage traitée ou non par une dose de NmR induisant une modification significative de la taille des cellules.

L'analyse de cette comparaison révéla que le traitement au NmR entraînait une modification significative (au moins d'un facteur 2) de l'abondance des transcrits de 132 gènes répartis entre 31 gènes dont les transcrits diminuaient et 101 dont les transcrits augmentaient (la liste des gènes ainsi régulés est présente en annexe n°1). L'étude de ces gènes par *Yeast GO-term* ne nous permis pas de faire ressortir une voie de signalisation particulière, voie qui aurait ainsi pu être régulée au niveau transcriptionnel par le NmR. En revanche en les confrontant avec des données publiées par une autre équipe (Li et al., 2010), il nous est apparu que 24 des 31 gènes dont le nombre de transcrits étaient significativement diminués, l'étaient également dans une souche sauvage traitée au nicotinamide (notée Nam) (**figure 7A**). Le traitement au NmR reproduirait donc une partie des effets transcriptionnels de la Nam. La Nam est un autre composé de la voie du NAD, dont un schéma simplifié est présenté en **figure 7B**, et qui diffère du NmR par l'absence du résidu riboside. Le NmR n'étant pas commercialisé nous le produisons nous même, par déphosphorylation du nicotinamide nucléotide (NMN) :

Figure 7

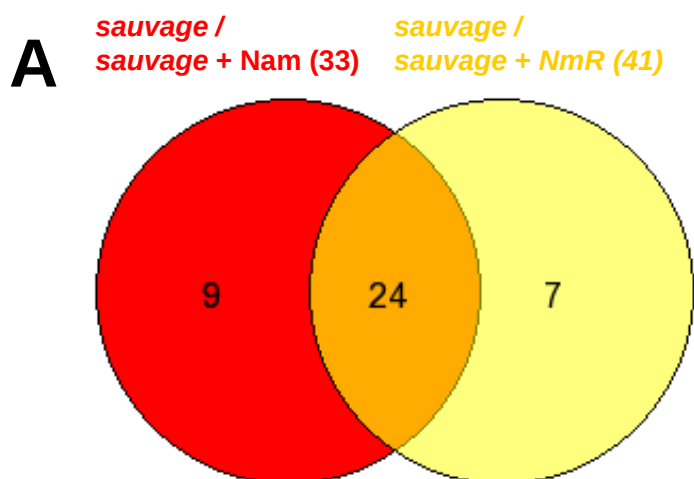
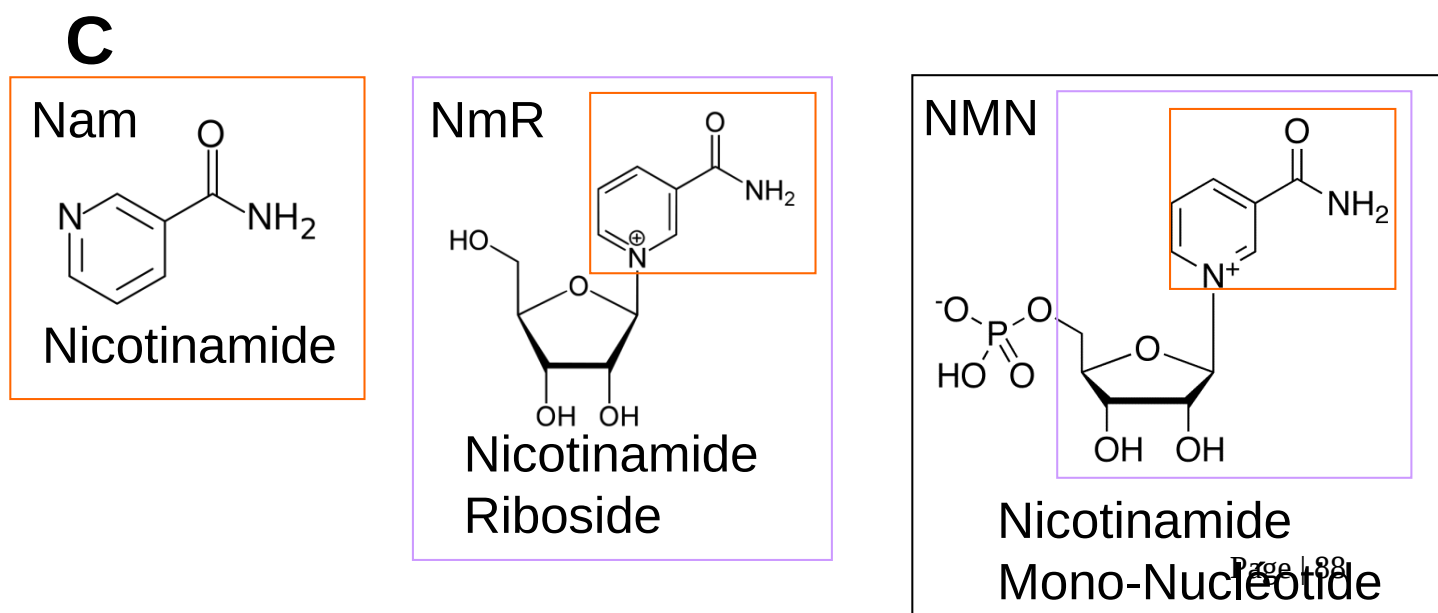
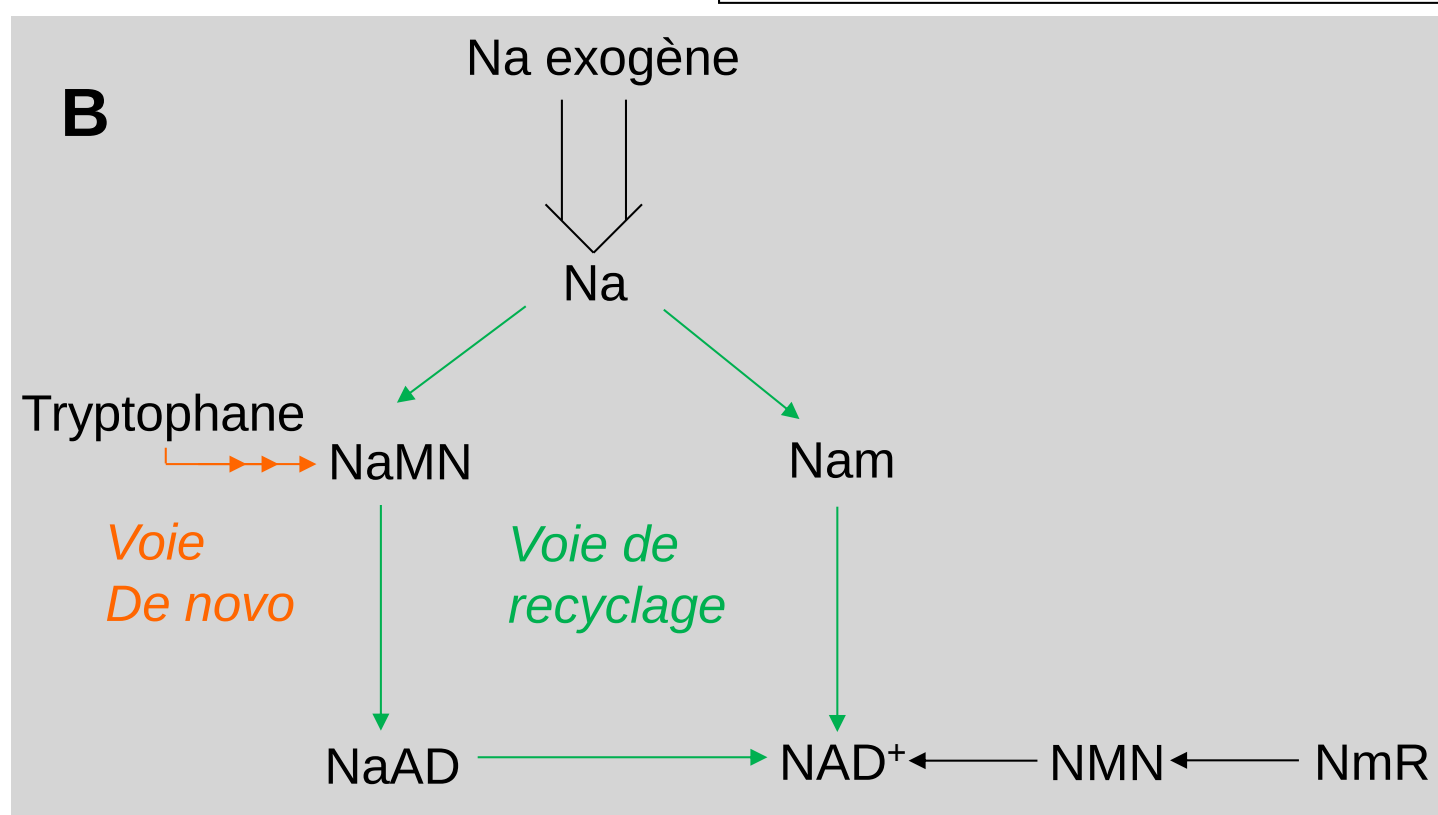


Figure 7: Etude transcriptomique du traitement au NmR.

A Diagramme de Venn comparant les listes de gènes (la quantité de gène de chaque liste est donnée entre parenthèses) dont l'expression est réprimée d'au moins un facteur 2 dans une souche sauvage traitée soit à la Nam (Li et al., 2010) soit au NmR (cette étude) par rapport à une absence de traitement. Les cultures ont été incubées 8 h à 100 μ M de NmR en milieu SD casa U. Liste des gènes est donnée en annexe

B Schéma simplifié de la voie de biosynthèse du NAD⁺ chez *S. cerevisiae*; Na = acide nicotinique; NaMN = acide nicotinique mono nucléotide; NaAD = acide nicotinique adénine dinucléotide; NAD = nicotinamide adénine dinucléotide Na = acide nicotinique. Les formules semi développée de la Nam du NMN et du NmR sont présentées en C.



la forme phosphorylé du NmR. Une autre équipe qui produisait le NmR de la même façon que la notre, faisait contre toute attente, état de la formation de Nam durant la réaction de déphosphorylation du NmN (Belenky et *al.*, 2007). Et de fait, en fin de réaction notre NmR était contaminé à ~40% par de la Nam **figure 8A**. Dès lors notre effet sur la taille était il le fait de cette contamination, du NmR ou d'une combinaison de ces deux molécules ? Comme représenté en **figure 8B**, un traitement de 100 μ M de Nam provoque un effet sur la taille des cellules, supérieur à celui des 100 μ M de NmR. Il semblerait ainsi possible que l'essentiel des effets sur la taille du NmR soient simplement le fait de la Nam contaminante.

Cette situation nous amena vers une donnée intéressante. En effet la Nam est connue comme étant capable d'inhiber, *in vitro*, une histone déacétylase : Sir2p (Bitterman et *al.*, 2002 et Landry et *al.*, 2000) dont elle constitue l'un des produits de réaction. La protéine Sir2p est une histone déacétylase de classe III qui correspond aux histones déacétylase qui requièrent une mole de NAD⁺ par mole de lysine désacétylée. Les données transcriptomique du mutant *sir2* étant disponibles (Bedalov et *al.*, 2003), en les étudiant il apparaît que 20 des 33 gènes les plus réprimés (d'au moins un facteur 2) lors d'un traitement à la Nam sont également réprimés dans un mutant *sir2* **figure 9A**. Le fait que ces deux profils transcriptionnels se recoupent ne constitue pas une donnée nouvelle, cependant en analysant les 20 gènes réprimés dans ces deux conditions nous avons constaté que 17 d'entre eux figuraient parmi la liste de gènes qu'une récente étude, supervisée par G. Fink, avaient associée avec la taille des cellules **figure 9B** (Wu et *al.*, 2010). Lors de cette étude, G. Fink et son équipe se sont intéressés au contrôle de la transcription par la taille des cellules. Ils commencèrent par l'identification des gènes dont l'expression

Figure 8

A

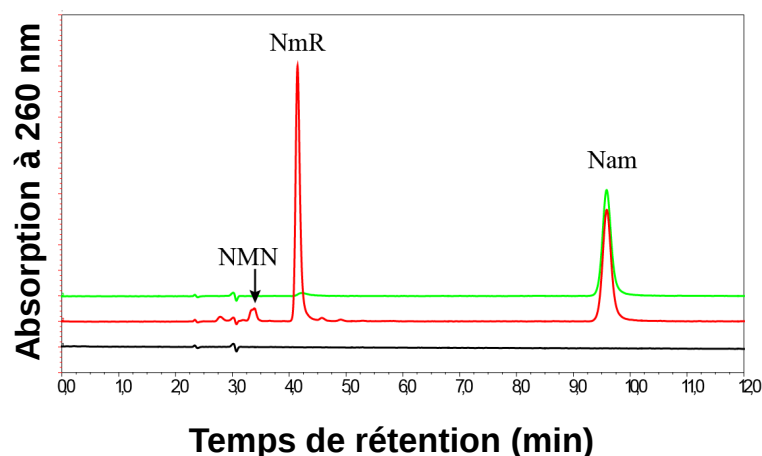
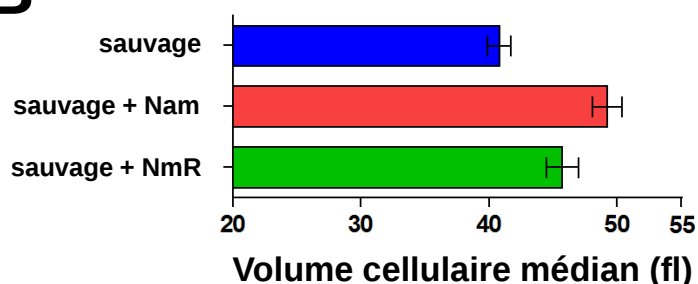


Figure 8: Contamination du NmR.

A Chromatogramme UV d'un échantillon de notre préparation de nicotinamide riboside (NmR ligne rouge), d'un standard de nicotinamide (Nam ligne verte) et d'une injection d'eau (ligne noire), NMN = Nicotinamide mononucléotide

B Moyenne des volumes médians d'une souche sauvage sur au moins trois mesures traitée ou non par 100 μ M de Nam ou bien de NmR après 48 h de phase exponentielle en milieu SD Casa U à 30°C. Les barres d'erreurs représentent l'écart des mesures à la moyenne.

B

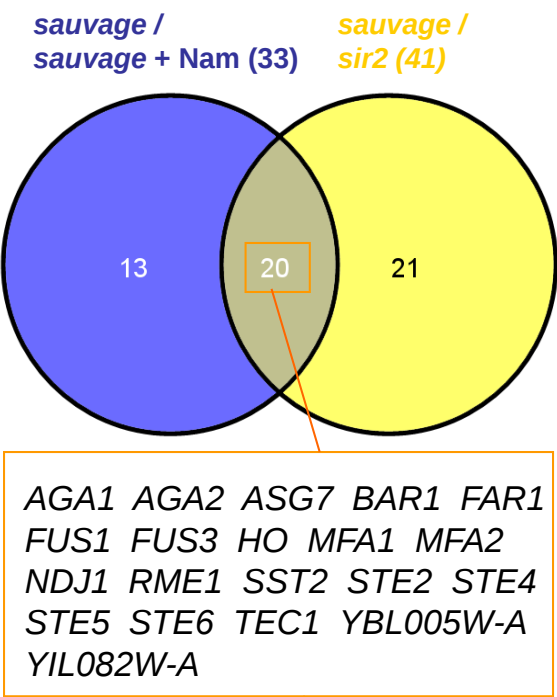


était modifiée en fonction de la ploïdie, la taille des cellules augmentant avec celle-ci tout en demeurant isogénique. Puis afin de savoir si ces gènes pouvaient être régulés par la taille, ils mesurèrent leur expression chez des mutants de taille, dont le mutant *large cln3*. Et effectivement un certain nombre des gènes réprimés chez une souche sauvage tétraploïde l'étaient également chez les mutants de grande taille testés, d'autre part ces gènes étaient d'autant plus réprimés que la cellule était grosse. Ils conclurent alors par l'existence d'un lien entre les variations de l'expression des gènes en fonction de la ploïdie et l'augmentation de taille de ces

cellules. Cependant la nature des gènes régulés, essentiellement des gènes associés à la surface cellulaire laissaient entendre que ces gènes seraient davantage régulés en conséquence du phénotype de taille et non cause de celui-ci. Malgré cela, le fait qu'une grande partie de ces gènes étaient réprimée chez le mutant *sir2* nous amena à vérifier si le mutant *sir2* présentait d'une part un phénotype de taille et d'autre part si la souche augmentait en volume une fois traitée à la Nam tel que le faisait la souche sauvage. Les résultats présentés en **figure 9C** sont cohérents avec les données publiées par G. Fink, le mutant *sir2* est *large*, présente le même volume médian qu'une souche traitée à la Nam, traitement qui ne provoque sur ce mutant aucune augmentation de volume des cellules. Nous en concluons que la Nam provoque une augmentation de la taille cellulaire par un mécanisme dépendant de *Sir2*. Jusque là *Sir2* n'avait jamais été associé à l'homéostasie de la taille cellulaire, il était jusqu'à présent connu pour son implication dans différents mécanismes : le maintien des extrémités des télomères, la durée de vie répllicative, la répression de la transcription de l'ADN ribosomique et du locus *mating type*. Nous avons alors pris la décision d'étudier et de caractériser le mécanisme par lequel *Sir2* agissait sur la taille des cellules. Les résultats inhérents à cette question sont présentés dans la seconde partie de ce projet.

Figure 9

A



B

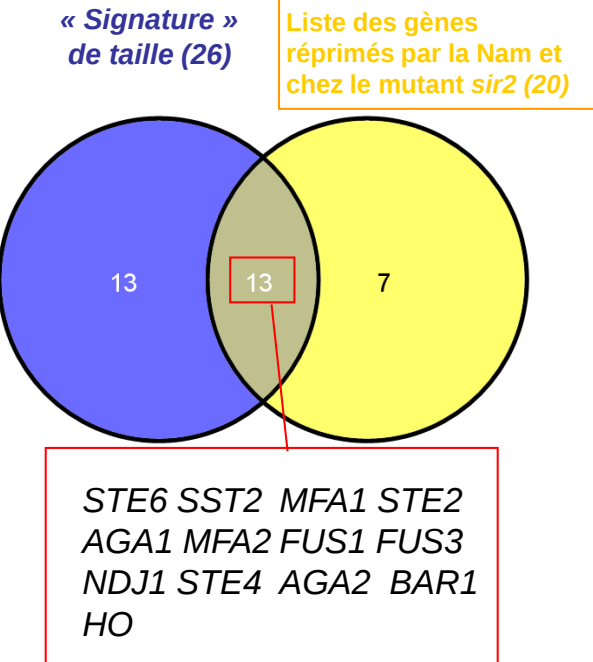


Figure 9: Effets sur de la Nam sur la taille des cellules.

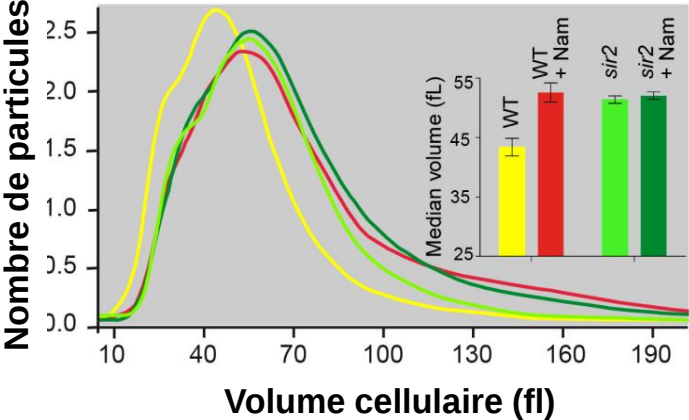
A Diagramme de Venn des gènes dont l'expression est réprimée d'au moins un facteur 2 dans une souche sauvage traitée à la Nam (Li et al., 2010 cercle bleu) par rapport à une absence de traitement et chez un mutant *sir2* (Bedalov et al., 2003 cercle jaune) par rapport à une souche sauvage.

B Diagramme de Venn des gènes dont l'expression est réprimée à la fois chez une souche sauvage traitée à la Nam et chez un mutant *sir2* (cercle jaune) avec les gènes dont l'expression varie lors d'une modification de la taille des cellules tel que l'ont défini Wu et al. dans leur étude (Wu et al., 2010)

C Distributions représentatives des volumes d'une souche sauvage (WT) et du mutant *sir2* maintenues 48 h en phase exponentielle en milieu liquide SD casa U à 30°C avant d'être traitée, ou non, 8 h à 100 µM de Nam.

En insert sont représentés les moyennes des volumes médians des ces mêmes cultures sur au moins trois mesures. Les barres d'erreurs représentent l'écart des mesures à la moyenne.

C



III 5) Discussion

Dans cette partie de nos travaux nous avons étudié l'homéostasie de la taille des cellules par une approche de gène candidat. Portant notre choix sur *PRS3* suite aux travaux de de P. Jorgenen et M. Tyers, nous avons cherché à déterminer si le PRPP ne pourrait pas, chez *S. cerevisiae*, avoir un rôle de *cell sizer*. Comme nous avons pu le voir en introduction, un *cell sizer*, quel que soit sa nature, protéique, métabolique, ou autre, constitue pour la cellule un moyen d'intégrer l'information de sa taille dans la coordination de la croissance et de la prolifération. Le *cell sizer* doit ainsi être un élément essentiel à l'homéostasie de la taille cellulaire et effectivement nous avons déterminé que la biosynthèse du PRPP était non seulement critique pour la prolifération cellulaire mais également pour la croissance, l'augmentation du volume de la cellule. Le PRPP serait-il alors un *cell sizer* chez *S. cerevisiae*? Nos résultats semblent indiquer que ce n'est pas le cas. Il ne semble pas capable d'induire une modification de la taille des cellules dose-dépendant. Nous avons en effet d'une part des conditions où le PRPP n'est pas suffisant pour entraîner une modification du volume des cellules. Nous mesurons en effet des variations significatives de la concentration en PRPP sans pour autant provoquer des variations de volume dans une souche *prs3* ou sauvage supplémentée (**figure 6A et C**) ou bien dans le mutant *prs5* (**figure 2B à 2D**). Et d'autre part une augmentation de la concentration en PRPP n'est pas nécessaire pour entraîner une augmentation de la taille des cellules, dans une souche *prs3* traitée au NmR nous ne mesurons pas de modification significative de la concentration en PRPP.

En fournissant aux cellules les molécules dont la synthèse nécessite du PRPP, nous décrivons une situation où la taille des cellules peut être altérée indépendamment de leur prolifération. Que les phénotypes de taille et de croissance altérés chez *prs3*, et par là les mécanismes sous jacents, soient dissociables constitue pour notre étude, et plus généralement pour le sujet du contrôle de la taille, un résultat crucial. En effet comme nous avons pu le voir, la croissance (accroissement du volume) et la prolifération (augmentation du nombre de cellules) ont depuis les travaux de Hartwell et sa définition du point *start* à la transition G1/S, pris une importance considérable au regard de la question du contrôle de la taille, à tel point qu'un dogme fut tacitement établi. Un exemple simple et récent de ce lien peut être observé dans le travail de Jorgensen (Jorgensen et al. Science 2002), lors duquel ils présentèrent clairement leur crible comme une approche permettant de déterminer de nouveaux régulateurs du *start*. Plus encore que le fait qu'ils ne paraissent pas s'intéresser à une autre possibilité d'interprétation de leurs résultats, c'est dans leur présentation de l'origine du phénotype de taille que réside les conséquences de ce dogme du *start* : il n'y aurait qu'une façon d'être altéré en taille, il n'existerait pas en dehors du contrôle de taille en G1/S d'autre mécanisme qui une fois altéré conduirait à l'apparition d'un phénotype de taille. Il ne s'agit pas ici, bien sur, de condamner leur travail, qui constitue pour nous et pour le domaine une formidable source d'information, mais plutôt de critiquer cette vision, établie semble-t-il, par l'histoire du sujet qui en handicape l'avancement des connaissances.

Nous sommes ensuite arrivés à la conclusion que le NmR, métabolite de la voie du NAD, situé en aval du PRPP, était seul suffisant pour induire une augmentation de la taille des cellules et de façon dose dépendante. De là nous pouvons rapporter la

question du *cell sizer* posée sur le PRPP, le NmR est-il un *cell sizer* et serait-il impliqué dans le mécanisme affectant la taille des cellules chez le mutant *prs3* ? Nous n'avons pas à ce jour purifié le NmR de notre mélange aussi nous ne pouvons ainsi conclure de façon catégorique quant à ses effets sur la taille des cellules, néanmoins en prenant en compte la différence d'effet entre notre mélange NmR et la Nam pure ainsi que la part de contamination révélée par notre analyse HPLC, nous pensons que l'essentiel des effets sur la taille des cellules serait le fait de la Nam, sans pour autant pouvoir infirmer un rôle du NmR dans l'homéostasie de la taille cellulaire. De là nous ne sommes pas certain que le mécanisme que nous affectons ici avec la Nam, soit le même que celui touché chez *prs3*, responsable de la modification de l'homéostasie de la taille cellulaire.

CHAPITRE 2

Résumé des résultats présentés

dans le chapitre 2 :

IV Chapitre 2 :

Identification d'une nouvelle voie affectant

l'homéostasie de la taille des cellules chez *S. cerevisiae*.

Lors de notre première approche nous avons pu déterminer que la délétion du gène *SIR2* ou bien un traitement à la Nam, était suffisant pour provoquer une augmentation de la taille des cellules. Nous avons alors voulu déterminer les effecteurs situés en aval de Sir2p dans la voie de l'homéostasie de la taille des cellules. Pour cela, nous avons tiré parti de la disponibilité des collections de mutants de *S. cerevisiae* et nous avons traité à la Nam les ~200 mutants de petite taille mis en avant par l'étude de Jorgensen (Jorgensen *et al.* 2002). Parmi ces mutants, 22 ne variaient pas significativement de volume après 8h de traitement à la Nam, là où toutes les autres souches variaient en volume cellulaire proportionnellement à leur volume sans traitement (20% d'augmentation pour la souche sauvage). La plupart des mutants dont la taille cellulaire ne varie pas en présence de Nam, sont des mutants de gènes impliqués dans : (1) la biogenèse des ribosomes ; (2) l'expression de l'ARNr ; (3) des protéines ribosomiques et (4) des facteurs d'assemblages des deux sous unités. Ces « épistasies chimiques » confirmées par des constructions de

doubles mutants, nous en concluons que la grande sous unité du ribosome agirait en aval de Sir2p dans l'homéostasie de la taille des cellules chez *S. cerevisiae*.

La mesure des volumes de l'ensemble des mutants de protéines ribosomiques non essentielles nous a permis de révéler un biais important entre les deux sous unités du ribosome vis-à-vis de la taille des cellules : quand la plupart des mutants de protéines de la grosse sous unité (60S) sont de petite taille, ceux de la petite sous unité (40S) sont pour la plupart de grande taille. La délétion conjointe de gènes codant pour des protéines des sous-unités 40S et 60S produit un phénotype intermédiaire à ceux des simples délétions. Ces résultats suggèrent que les effets des sous-unités du ribosome agiraient de façon indépendante sur la taille des cellules. Une différence de comportement entre les mutants des deux sous unités du ribosome fut également rapportée dans le cadre d'études sur la réponse au stress du réticulum endoplasmique (Zhao et *al.*, 2003) ou bien la durée de vie répllicative (Stephen et *al.*, 2008). Dans cette dernière étude les auteurs tirèrent parti d'une drogue (la diazaborine) inhibant spécifiquement la maturation tardive de la grande sous unité du ribosome. Comme attendu, cette drogue provoque une diminution de la taille des cellules sauvages, reproduisant les phénotypes observés chez les mutants de la sous unité 60S.

De la même manière que nous l'avons fait lors de la détermination des acteurs en aval de *SIR2*, nous avons traité à la diazaborine les mutants de grande taille identifiés par Jorgensen (~200) afin d'identifier les gènes potentiellement impliqués dans les effets de la sous unité 60S du ribosome sur la taille des cellules. Quarante mutants furent exclus de la suite de l'étude, ceux ci présentaient un important retard

de prolifération une fois traités à la diazaborine, rendant ininterprétable les distributions de volumes. Des 155 mutants restant, nous en avons identifié 40 dont le volume médian ne diminuait pas lors du traitement à la diazaborine. Afin de confirmer ces résultats par des relations d'épistasie, nous avons réalisé des doubles mutants de ces 40 mutants avec une mutation *rpa49* que nous avons montré épistatique sur la mutation de *SIR2* pour le phénotype de taille. Par là nous avons identifié 31 mutations épistatiques à celle de *RPA49*. En réalisant une étude *Gene Ontology Process* basée sur les processus pouvant être associés aux gènes des 31 gènes interrompus chez ces mutants, nous avons pu constater que des gènes impliqués dans les réponses cellulaires aux stress ainsi que dans le cycle cellulaire étaient sur-représentés. Une modification de la progression dans le cycle cellulaire pouvant conduire à des modifications de la taille, cette dernière catégorie était particulièrement à propos pour d'une connexion entre la voie SIR2/60S et l'homéostasie de la taille des cellules. Et effectivement parmi ces 31 gènes se trouvaient *SWI4* et *SWI6* les deux partenaires du complexe protéique SBF. Le SBF est responsable (de concert avec le MBF composé de Swi6p et Mbp1p) de l'activation de la transcription d'un régulon de ~120 gènes à la transition G1/S. Par des constructions de doubles mutants, nous avons montré que les délétions de *swi4* et de *swi6* étaient clairement épistatiques sur le phénotype de taille provoqué par les délétions de *rpl35b*, de *rpl37a* et de *rpa49*. La délétion du gène *MBP1* ne provoque qu'une légère augmentation de la taille des cellules dans nos conditions et, il ne fut pas mis en avant pour un phénotype de taille lors du crible de Jorgensen. De plus le mutant *mbp1* diminue de taille une fois traité à la diazaborine. Ces résultats, et le fait que les mutants *swi4* et *swi6* se comportent de la même façon, suggèrent donc que

le SBF et non le MBF serait nécessaire en aval de la sous unité 60S dans la voie SIR2/60S affectant l'homéostasie de la taille des cellules.

Comme nous avons pu le discuter lors du chapitre d'introduction de ce travail de thèse, les effets de la ploïdie sur la taille des cellules sont connus de longue date. Il en va de même pour les changements de qualité de source de carbone/azote. Dans le cas du premier phénomène, la taille des cellules augmente avec une augmentation du niveau de ploïdie. Nous montrons ici que quel que soit le niveau de ploïdie testé (de l'haploïde au tétraploïde), les cellules augmentent en taille lorsqu'elles sont traitées à la Nam et diminuent de taille lorsqu'elles le sont à la diazaborine. Ainsi nous montrons que l'homéostasie de la taille des cellules est affectée par la ploïdie et par la voie SIR2/60S de façon indépendante. Dans le cadre de l'étude des effets de la qualité du milieu sur la taille des cellules nous avons opté pour un changement de source de carbone, en l'occurrence par la comparaison entre des cellules cultivées en milieu glucose ou bien raffinose. Le raffinose est une source de carbone difficilement assimilable par la cellule, les cellules sauvages sont dans ce milieu de plus petite taille qu'en milieu glucose. Nous montrons ici que tous les mutants majeurs de la voie SIR2/60S/SWI4 diminuent en taille par rapport à leur volume en milieu riche, lorsqu'ils sont cultivés en raffinose. Nous en concluons que les effets des nutriments sur l'homéostasie de la taille des cellules sont indépendants de ceux provoqués par la voie SIR2/60S/SWI4.

Les effets d'une diminution de la « richesse » du milieu sur le cycle cellulaire sont en partie connus. Il est notamment clair que les cellules passent le *start* à la transition G1/S à une taille inférieure de celle d'une condition riche en nutriment. Les effets des

nutriments sur l'homéostasie de la taille cellulaire étant indépendants de ceux de la voie que nous décrivons, nous avons voulu explorer ces paramètres et avons déterminé la taille critique ainsi que la taille de naissance de cellules sauvages en présence ou en absence de Nam ou de diazaborine. Comme attendu lors d'une diminution de la richesse de la source de carbone, nous trouvons la taille critique d'une souche sauvage cultivée en raffinose diminuée par rapport à la condition de contrôle glucose. De façon surprenante, un traitement à la Nam ou à la diazaborine bien que présentant des effets antagonistes sur l'homéostasie de la taille des cellules provoquent tous deux une augmentation de la taille critique de cellules sauvages. La diazaborine entraîne une diminution de la taille des cellules, alors si la taille critique est augmentée en présence de diazaborine, la taille de naissance des cellules filles devrait être plus faible. Effectivement nous avons mesuré une diminution de la taille de naissance des cellules lors d'un traitement à la diazaborine. Le traitement à la Nam provoque lui une augmentation de la taille des cellules filles à la naissance. De façon logique, une augmentation du nombre de cellules en phase G1 du cycle a été observée dans le cas du traitement à la diazaborine. Le traitement à la Nam provoquait lui une légère augmentation de la proportion des cellules en anaphase. L'ensemble de ces résultats suggère que la voie SIR2/60S et le contrôle nutritionnel agirait *via* des voies distinctes sur l'homéostasie de la taille des cellules.

Durant ce projet nous avons fait le lien entre *SIR2* et la grosse sous unité du ribosome d'une part et l'homéostasie de la taille des cellules d'autre part. Cependant *SIR2* et la sous unité 60S ont également été montrés comme étant des effecteurs d'un autre phénotype : la durée de vie répllicative (Stephen et *al.*, 2008 ; Kaeberlein et *al.*, 1999). La durée de vie répllicative correspond au nombre de cellules filles

qu'une cellule peut produire avant d'entrer en sénescence. La délétion de *SIR2* ou bien un traitement à la Nam sont connus pour diminuer très significativement la durée de vie répllicative. Lors d'une récente étude il a pu être démontré que la plupart des mutants de protéines de la grosse sous unité du ribosome présentaient une durée de vie répllicative augmentée (Stephen et *al.*, 2008). Les effets sur la durée de vie répllicative de *SIR2* sont connus comme dépendant de *FOB1* (Kaeberlein et *al.*, 2004), ceux des mutants du 60S de *GCN4* (Stephen et *al.*, 2008). Par des constructions de double mutants nous avons pu déterminer que l'effet de *SIR2* sur l'homéostasie de la taille des cellules ne serait pas dépendant de *FOB1*. De même, la mutation de *GCN4* ne corrige pas le défaut de taille du mutant *rp131a*, un mutant de protéine ribosomique de la sous unité 60S du ribosome. Autant d'éléments qui nous laissent à penser que *SIR2* et la sous unité 60S du ribosome agiraient sur l'homéostasie de la taille des cellules et sur la durée de vie répllicative d'une manière indépendante. Néanmoins d'une façon troublante une corrélation dans les données bibliographiques semble pouvoir être faite entre la taille des cellules et leur durée de vie répllicative. Quand les petites cellules présenteraient une durée de vie répllicative prolongée, les grosses cellules auraient elles tendance à présenter une durée de vie répllicative écourtée par rapport à celle d'une souche sauvage. Et effectivement nous avons pu mesurer chez les mutants *swi4* et *cln3*, deux mutants de grande taille, des durées de vie répllicative diminuées. De même un traitement à la Nam ou la délétion de *SIR2* provoque comme il avait été publié une forte diminution de la durée de vie répllicative. *A contrario* de cette tendance nous avons mesuré des durées de vie répllicative augmentées dans le cas de polyploïdes, souches présentant également des cellules de grande taille. Le traitement à la Nam ou la culture des cellules en milieu raffinose nous permet finalement d'établir que la taille des cellules semblait être

associée à la durée de vie répllicative seulement à un niveau de ploïdie constant : en effet pour une souche haploïde comme diploïde un traitement au raffinose provoquait bien une augmentation de la durée de vie répllicative accompagnée d'une diminution de la taille des cellules et un traitement à la Nam une diminution de la durée de vie répllicative accompagnée d'une augmentation de la taille des cellules.

La taille des cellules est un caractère hautement influençable, ~7% des mutants haploïdes viables de *S. cerevisiae* présentent un phénotype de taille et l'essentiel de ces gènes ne sont pas associé avec une voie de signalisation ou de contrôle de la taille des cellules. Dans ce contexte et par notre approche de *chimiogénétique*, nous avons pu organiser 13% des 400 mutants de taille de l'étude de Jorgensen (Jorgensen et *al.*, 2002). Cette nouvelle voie, *SIR2/60S/SWI4* est indépendante des effets de la ploïdie et des nutriments sur l'homéostasie de la taille des cellules, phénomènes dont le déterminisme génétique potentiel reste à investiguer. Cette étude a prouvé la faisabilité d'une approche de *chimiogénétique* pour l'étude d'un caractère complexe et ouvre de nouvelles possibilités pour l'étude de l'homéostasie de la taille des cellules. De nouvelles études empruntant la même approche pourraient permettre d'établir rapidement une solide hiérarchie entre les gènes affectant l'homéostasie de la taille des cellules.

Article de recherche

A new pathway involved in cell size homeostasis in yeast

Fabien Moretto^{1,2}, Isabelle Sagot^{1,2}, Bertrand Daignan-Fornier^{1,2} and Benoît Pinson^{1,2}

1 Univ. Bordeaux, IBGC, UMR 5095, F-33000 Bordeaux, France -

2 CNRS, IBGC, UMR 5095, F-33000 Bordeaux, France

Corresponding author:

B. Daignan-Fornier

Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires

CNRS UMR5095

1, rue Camille Saint Saëns

33077 Bordeaux Cedex

France

Tel (33) 556 999 001

B.Daignan-Fornier@ibgc.cnrs.fr

ABSTRACT

Cell size homeostasis is the result of fine-tuned coordination between cell growth and division. Mutations in hundreds of yeast genes affect cell size homeostasis but their organization into defined genetics pathways is still poorly understood. Cell size homeostasis in yeast thus provides a very interesting situation where a myriad of loci contributing to a highly complex quantitative trait have been identified, while their organisation and input in the phenotype remain to be elucidated. Here, using chemo-genetics epistasis, we characterized a genetic pathway regrouping more than fifty mutants affecting yeast median cell volume. This pathway includes the sirtuin Sir2, the large ribosomal subunit and the cell cycle transcriptional regulators Swi4 and Swi6. We establish that this pathway modulates cell size homeostasis mostly by affecting the size of the daughter cells at birth. We also show that this pathway is clearly distinct from nutrient and ploidy control of cell size. Finally, taking advantage of these various pathways, we revisited the complex relationship between cell size and replicative lifespan in yeast. Our results suggest that, although cell size homeostasis is a highly integrated quantitative trait, it could be controlled by a relatively limited number of genetic pathways affecting different steps of the cell cycle.

NB: Afin de faciliter la lecture du manuscrit, les figures supplémentaires (à l'exception des tables) seront présentées conjointement aux figures principales. Les annexes, elles, se trouveront en fin de manuscrit.

INTRODUCTION

Cell size can vary a lot among cell types and organisms. It is influenced by both endogenous factors such as ploidy and environmental conditions. However, for a given cell type in a defined growth condition, cell size distribution is noticeably constant, thus arguing for an homeostatic control of cell size [1]. Cell size homeostasis implies that specific mechanisms are devoted to estimating cell size and coordinating growth (increase in volume) and proliferation (increase in cell number) in order to maintain cell volume constant. In microorganisms such as bacteria or yeast, cell size varies with the richness of the medium [2, 3], implicating another level of cell size regulation referred to herein as “nutrient control”. The consequence of nutrient control is that cells grown in poor media are significantly smaller than those grown in rich medium. Two major non-exclusive hypotheses have been proposed to rationalize nutrient control of cell size. First, decreasing cell size leads to an increase of the cell surface to cell volume ratio and could therefore be advantageous for the uptake of scarce nutrients [4, 5]. Second, diminishing cell size minimizes the amount of additional biomass that is needed at each division step and therefore allows increasing cell number before complete starvation [1]. In both cases, nutrient control of cell size would contribute to an increased fitness of the population under sub-optimal growth conditions.

The first organism for which nutrient control of cell size has been elucidated at the molecular level is *Bacillus subtilis* [6]. In this bacteria, it has been shown that nutrient control of cell size occurs through a mechanism involving a metabolic enzyme (the glucosyltransferase UgtP) which together with its substrate (UDP-glucose) inhibits cell division. This elegant work has provided the first simple mechanism connecting a metabolic activity to the control of cell division.

Cell size homeostasis has been studied in budding yeast for decades providing a bulk of information on how growth and division are coordinated. A key notion is “critical size”

defined as the minimal size required for passing through “start” and entering a new cell division cycle [7, 8]. While “critical size” is constant in a defined culture condition, it varies with the richness of the medium [3]. Nutritional control of cell size has been mostly studied by comparing an abundant and easily utilizable carbon source such as glucose with either limiting amounts of glucose or poorly utilizable carbon sources such as ethanol, glycerol or raffinose. How yeast cells convert a “sufficient biomass signal”, which could reflect volume, mass and/or biosynthetic capacity, into a stimulus for cell cycle progression is not well understood.

In yeast, genetics approaches have been used to identify key players in cell size homeostasis. The first characterized mutants with reduced cell size (named *whi*) affected the cyclin Cln3p. While knock-out of *cln3* leads to increased cell size [9], the dominant *CLN3-1* (*WHI1-1*) allele leads to reduced cell size [10, 11]. These opposite phenotypes indicate a key role for Cln3p in cell size homeostasis. Cln3p interacts with the cyclin-dependent kinase Cdc28p and inhibits Whi5p, an Rb homologue inhibiting the MBF (Swi6/Mbp1) and SBF (Swi6/Swi4) transcription activators. Thereby, Cln3p/Cdc28p stimulates the transcriptional activation of more than 200 genes involved in the transition from G1 to S phase. Among these genes are two late G1 cyclins (Cln1p and Cln2p) which in turn associate with Cdc28p and stimulate progression through the cell cycle. This activation results in a positive feedback loop that is thought to trigger transition from G1 to S phase. However, Cln3 is not essential for cell cycle progression, possibly because of partial functional redundancy with Bck2 [12]. The precise function of Bck2 is poorly understood but this protein contributes to activation of many genes, including most targets of Cln3 [12]. Together, these initial results pointed to the G1/S transition machinery as a major player in cell size regulation but how “cell size” signals are conveyed and integrated to the cell cycle remains obscure.

Systematic identification of yeast cell size mutants, using knock-out mutant collections, revealed the complexity of cell size homeostasis mechanisms [13, 14]. These works allowed identification of hundreds of mutants resulting in a median cell size diverging significantly from the isogenic wild-type. These new mutants, either smaller (*whi*) or larger (*lge*, *uge*) than the isogenic wild-type strain pointed to a central role for ribosome biogenesis in cell size homeostasis and to the role of general nutrient sensing pathways (Ras, Tor) *via* their downstream effectors (Sch9p, Sfp1p) [15]. Importantly, while these studies allowed identification of key regulators, most of the *whi* and *lge* mutants have not yet been placed into genetically defined pathways. Cell size homeostasis in yeast thus provides a very interesting situation where a myriad of loci contributing to a highly complex quantitative trait have been identified, while their organisation and input in the phenotype remain to be elucidated. Understanding the genetic bases of complex traits is a challenging issue in biology, however identification of quantitative trait loci from natural populations is tedious. In this work we take advantage of the vast collection of identified mutants affecting yeast cell size to explore complex genetic interactions that ultimately connect genotype to phenotype.

Here we describe a new cell size modulating pathway involving more than 50 genes known to affect cell size when mutated. This pathway includes the sirtuin Sir2, the ribosome large subunit and the transcription factors Swi4 and Swi6. We establish that the Sir2/60S pathway effect on cell size is clearly distinct to ploidy or nutritional effects.

RESULTS

Cell size homeostasis is affected in a sir2 mutant

A recent work on control of transcription by cell size revealed a transcriptional adjustment to enlarged cell size [16]. A subset of genes was found that shows an expression typically altered in large yeast cells either tetraploid or *cln3* mutant [16]. Several of the genes identified as repressed in large yeast cells had also been found as repressed in a *sir2* mutant or in a wild-type strain treated with nicotinamide (Nam), a Sir2 inhibitor [17] (Fig. 1A). As anticipated from the “transcriptional signature”, we found that a *sir2Δ* mutant is large and that inhibiting Sir2 function by Nam mimics the *sir2Δ* size defect (Fig. 1B-C). Both *sir2* knock-out and Nam treatment resulted in a 20% increase of the median cell volume. The *sir2* mutation was complemented by the *SIR2* gene carried on a plasmid (data not shown). As expected if inhibition by Nam is Sir2-specific, we found no effect of Nam in a *sir2* mutant (Fig. 1B-C), while other large mutants such as *cln3* or *bck2* were enlarged in response to Nam (Supplemental Fig. 1A-B). Nam is one of the two products of the deacetylation reaction catalyzed by Sir2 (Supplemental Fig. 1C), the other reaction product being O-acetyl-ADP-ribose. We found that cell size was not affected in a *ysa1* mutant (supplemental Fig. 1D) previously shown to accumulate O-acetyl-ADP-ribose [18]. Because Nam has no effect on cell size in the absence of Sir2 and since O-acetyl-ADP-ribose, the other product of the reaction, does not seem to be involved, we propose that Sir2 activity and not the products of the reaction are involved in cell size homeostasis. Importantly, overexpression of Sir2 from a multicopy plasmid reduced the volume of a wild-type strain down to 82% of the volume of the same strain carrying the empty vector. Thus, knock-out and overexpression of *SIR2* have opposite effects on cell volume, indicating a pivotal role for Sir2 in cell size homeostasis

Sir2 is a NAD⁺ dependent histone deacetylase that is involved in chromatin silencing at cryptic mating type loci (*HML* and *HMR*), rDNA repeats (*RDN1*) and telomeres [19].

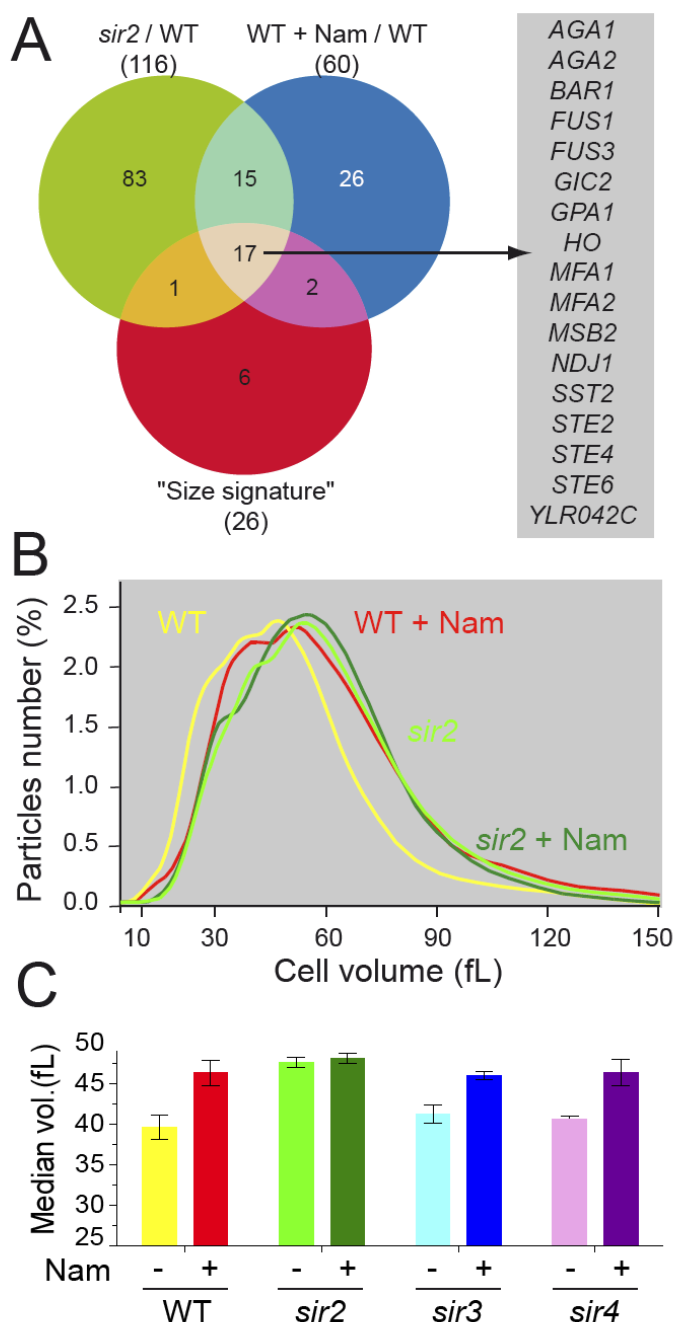
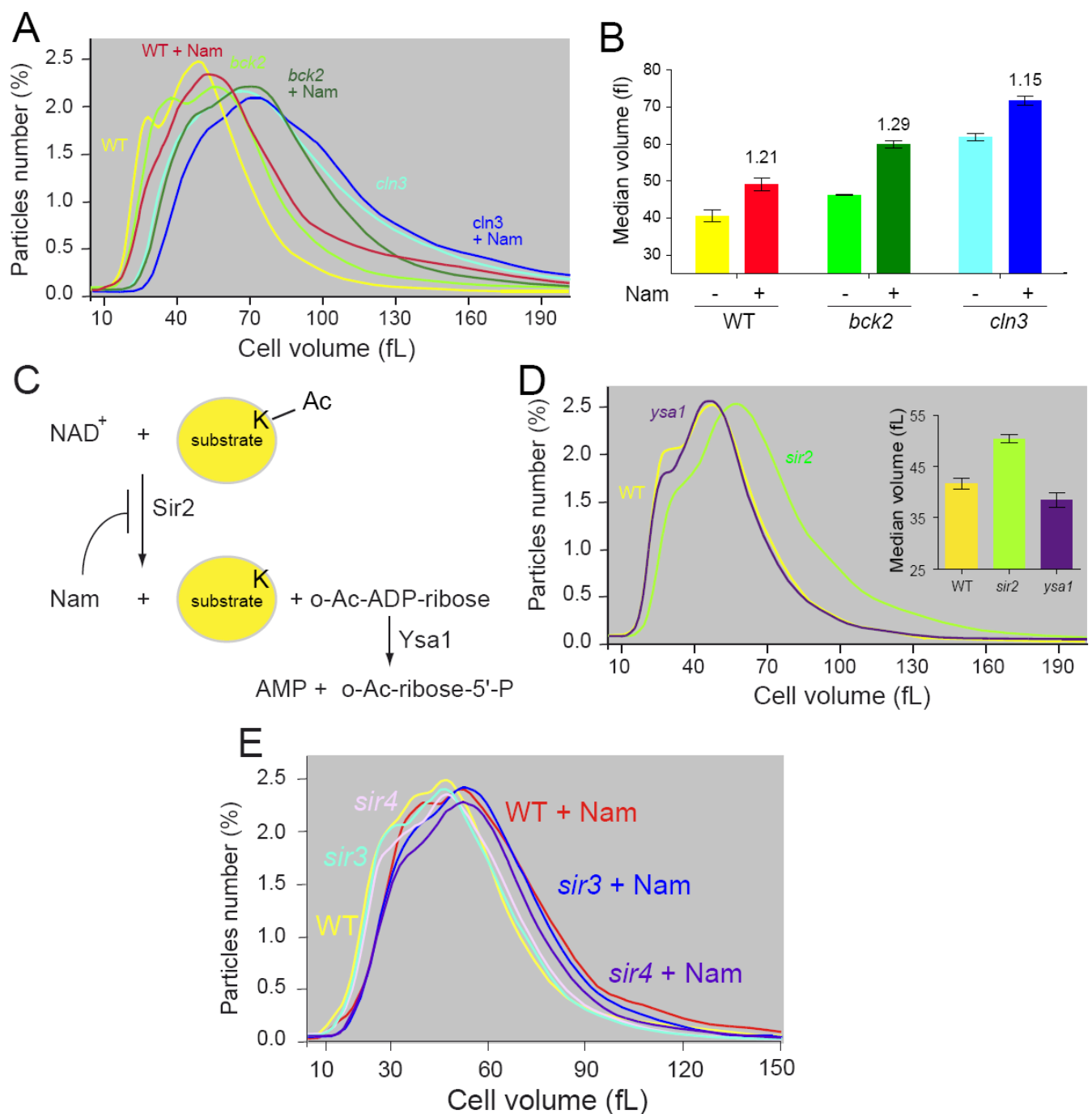


Figure 1. Cell size homeostasis is impaired in a *sir2* mutant. (A) Venn diagram of transcriptionally repressed genes in response (1) to *sir2* mutation (green circle;), (2) to nicotinamide (Nam) treatment (blue circle;) and (3) to enlargement of cell size (red circle;). (B) Representative cell volume distributions obtained for wild-type (BY4742) and *sir2* mutant strains grown in SDcasaU medium for 48 h in exponential phase and then treated (+ Nam; 100 μ M) or not. (C) Mean of median volumes obtained for WT (BY4742), *sir2*, *sir3* and *sir4* strains grown and treated or not with Nam as in (B). Results correspond to the mean of at least three independent cultures for each strain and error bars indicate variation to the mean. Cell volume distributions for *sir3* and *sir4* mutants are presented in supplemental Fig. 1E.

SUPPLEMENTAL FIGURE 1



Supplemental Figure 1. (A-B) Nam treatment leads to an increase of *bck2* and *cln3* mutants size. Representative volume distributions (A) and median volumes (B) were obtained for wild-type (BY4742), *bck2* and *cln3* mutant strains grown in SDcasaU medium for 48 h in exponential phase and then treated (+ Nam) or not with Nam. (C) Schematic representation of Sir2 and Ysa1 enzymatic activities. o-Ac-ADP-ribose and o-Ac-ribose-5'-P stand for and 2'-o-acetyl-adenosine diphosphate-ribose and 2'-O-acetyl ribose 5'-phosphate, respectively. (D) *ysa1* mutant accumulating o-Ac-ADP-ribose has a wild-type cell size. Representative volume distributions obtained for cells maintained in exponential phase for 48 h in SDcasaU medium. Inset shows mean of median volumes determined on three independent cultures for each strain and error bars indicate variations to the mean. (E) Cell volume distributions for *sir3* and *sir4* mutants grown and treated or not with Nam as in (A).

Silencing at mating type loci and telomeres, but not rDNA, involves the additional proteins Sir3 and Sir4. We found that knock-out of *SIR3* or *SIR4* did not affect cell size and that cell size of these mutant strains was fully responsive to inhibition of Sir2 by Nam (Fig. 1C and supplemental Fig.1E). We conclude that the effect of Sir2 on cell size is Sir3 and Sir4-independent.

Mutants affecting the large ribosomal subunit are whi and epistatic to sir2

To identify effectors downstream of Sir2, we searched among the previously identified small size (*whi*) mutants those that were unresponsive to Nam. Of note, in this study we focused on the set of mutants identified by Tyers and coworkers [13] because the size of these mutants was monitored on proliferating cells by opposition to the mutants identified by Schneider and coworkers from saturated cultures [14]. A set of ~200 small size predicted mutants were grown exponentially for 48 hrs in the presence or the absence of Nam and their median volume was determined. Under our growth conditions, most of these mutants were indeed *whi*, although about 30 mutants were larger than wild-type. Among the ~200 mutants, 22 were clearly not affected by Nam treatment while all the others responded to Nam by increasing their cell size as the wild-type control cells did (Fig. 2A and supplemental Table 1). Strikingly, most of the Nam unresponsive mutants are knock-out of genes required at various stages of the complex process leading to ribosome biogenesis. The corresponding proteins, Pih1, Uaf30 and Rpa49 are involved in rRNA synthesis or maturation, Rpl and Rps proteins are constituents of the ribosome and Yvh1, Zuo1 and Jjj1 are required for ribosome assembly (Fig. 2B). The “chemo-epistasis” relationship suggested by the absence of response to Nam was confirmed by construction of double mutants combining *sir2* with three ribosome-biogenesis mutants showing a strong *Whi* phenotype: *rpl35b* (Fig. 2C), *rpa49* and *rpl37a* (Supplemental Fig. 2A-B). Hence, these epistasis data clearly points to yeast ribosome as a

FIGURE 2

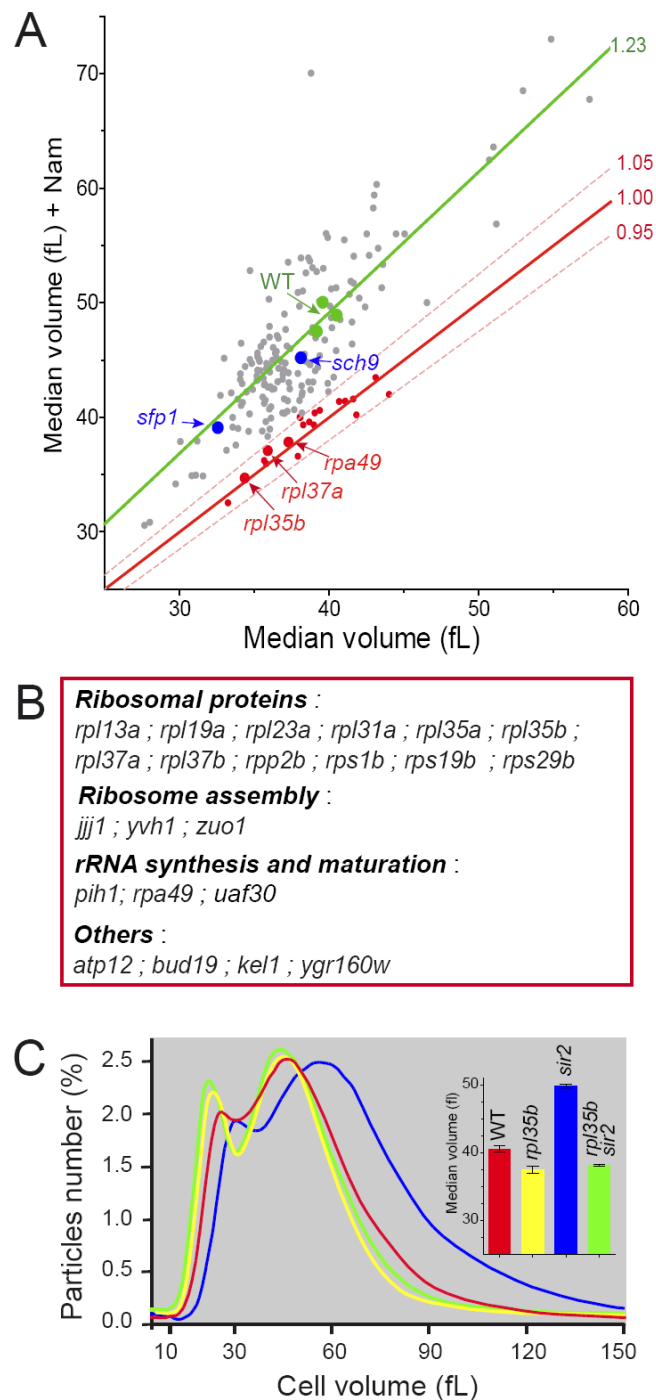
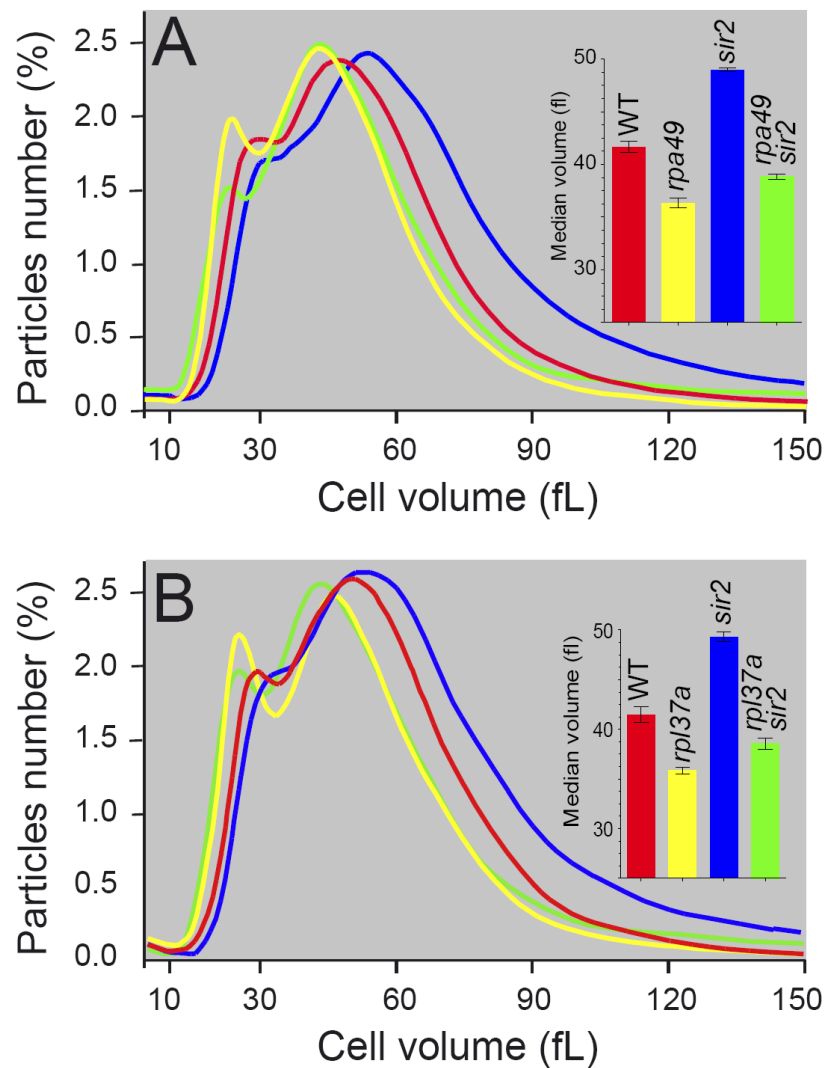


Figure 2. Cell size of mutants affected in the large ribosomal subunit biogenesis is insensitive to Nam treatment. (A) Median volume ratio obtained on *whi* mutants treated (y-axis) or not (x-axis) with Nam (100 μ M). Cells were grown and treated with Nam as in Fig. 1B. Green (WT), grey (*whi* mutants) and blue (*sfp1* and *sch9* mutants) dots correspond to Nam responsive mutants, while red dots correspond to Nam-unresponsive mutants ($0.95 < \text{median volume ratio} + \text{Nam} / - \text{Nam} > 1.05$). The 1.23 ± 0.03 ratio (green line) was calculated from median volumes obtained on three independent wild-type cultures. (B) List of the 22 *whi* mutants unresponsive to Nam treatment. (C) The *rpl35b* mutation is epistatic to *sir2* on cell size homeostasis. Representative volume distributions were obtained on wild-type (BY4742), *sir2*, *rpl35b* and *sir2 rpl35b* mutants grown as in Fig 1B. The inset corresponds to the mean of median volumes measured on at least four independent cultures for each strain and error bars indicate variation to the mean.

SUPPLEMENTAL FIGURE 2



Supplemental Figure 2. Mutation of *rpa49* (A) and *rpl37a* (B) are epistatic to *sir2* mutation on cell size homeostasis phenotype. Representative volume distributions and median volumes were measured on cells grown in SDcasaU medium for 48 h in exponential phase. Insets shows mean of median volumes determined on four independent cultures for each strain and error bars indicate variations to the mean.

downstream effector of Sir2 in cell size homeostasis. It is worth noting that the *sfp1* and *sch9* mutants, lacking two major regulators of ribosome biogenesis and cell size homeostasis [13, 15] were fully responsive to Nam (Fig. 2A, blue dots) indicating that Sfp1 and Sch9 do not play a major role in Sir2 effects on cell size homeostasis.

To get a more complete view of the role of ribosome constituents in cell size homeostasis, we measured the volume of every non-essential ribosomal protein mutants. Most of the yeast genes encoding ribosomal proteins are duplicated and therefore knock-out of one of the two gene copies is usually not lethal. This analysis revealed a strong cell size bias among ribosomal protein mutants, knock-out of the large ribosomal subunit (60S) genes resulting frequently in a Whi phenotype, while small subunit (40S) mutants were generally larger than wild-type cells (Fig. 3A and supplemental Fig. 3). It should be stressed that for each ribosomal protein, the respective contribution of the two copies can be different. Therefore, the absence of major size phenotype for most of the mutants could just reflect a minor contribution of the mutated gene copy. In any case, the cell volume distribution bias between 40S and 60S mutants was statistically significant (Fig. 3B). The opposite effects of small and large subunit mutants on cell size could reflect antagonistic impacts on the same pathway or be due to separate effects involving different pathways. To address this question, we constructed double mutants combining *rpl* and *rps* mutations. These double mutants had additive effects suggesting that the large and small subunits act independently on cell size homeostasis (supplemental Fig. 4). Together our results establish that the 40S and 60S ribosomal subunits do not contribute similarly to cell size homeostasis.

Three mutants affecting 60S assembly factors (Fig. 2B) were identified as *whi* and Nam-unresponsive indicating that the subunit itself rather than specific individual ribosomal protein is involved in the phenotype. A similar differential behavior of small and large ribosomal subunit mutants was previously reported for other phenotypes, such as ER stress

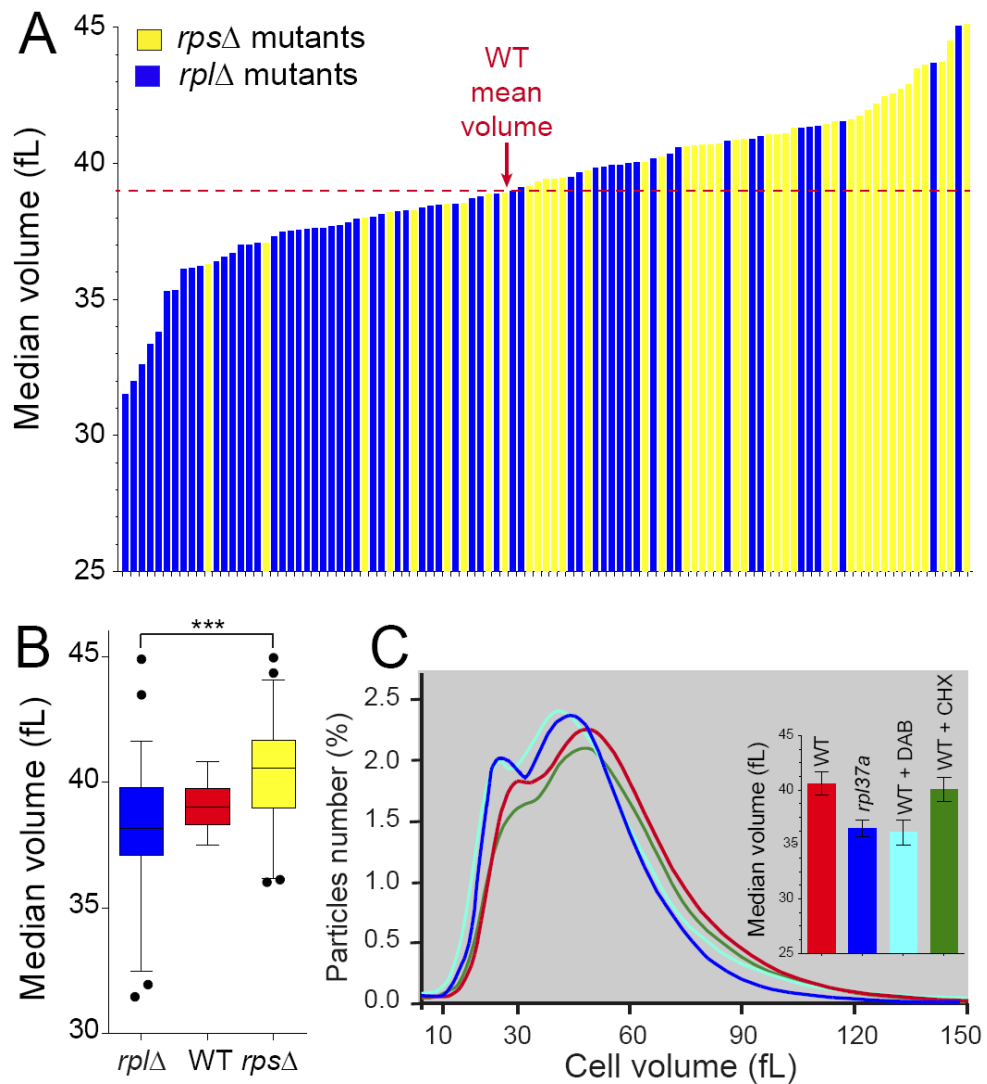
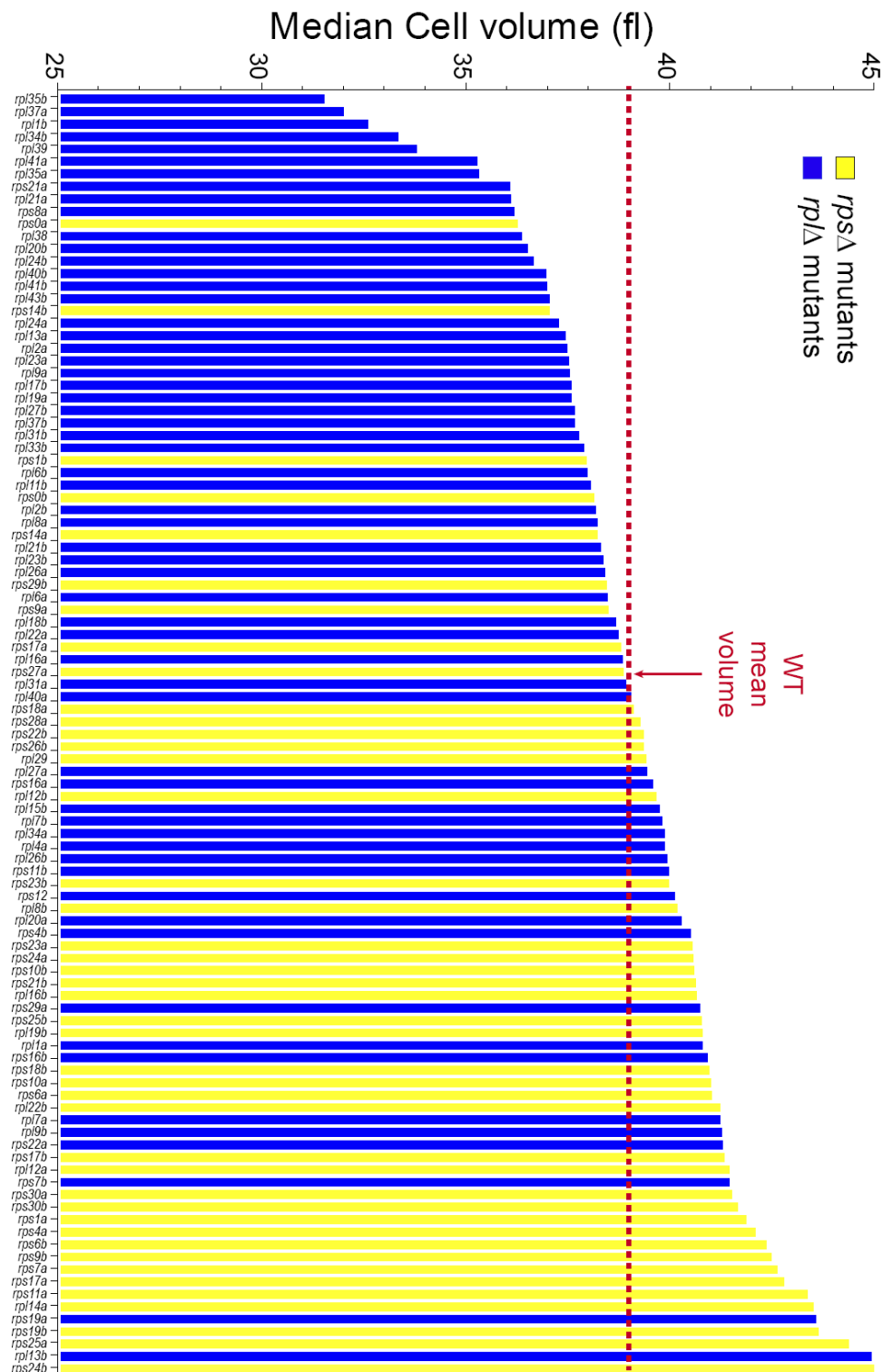
FIGURE 3

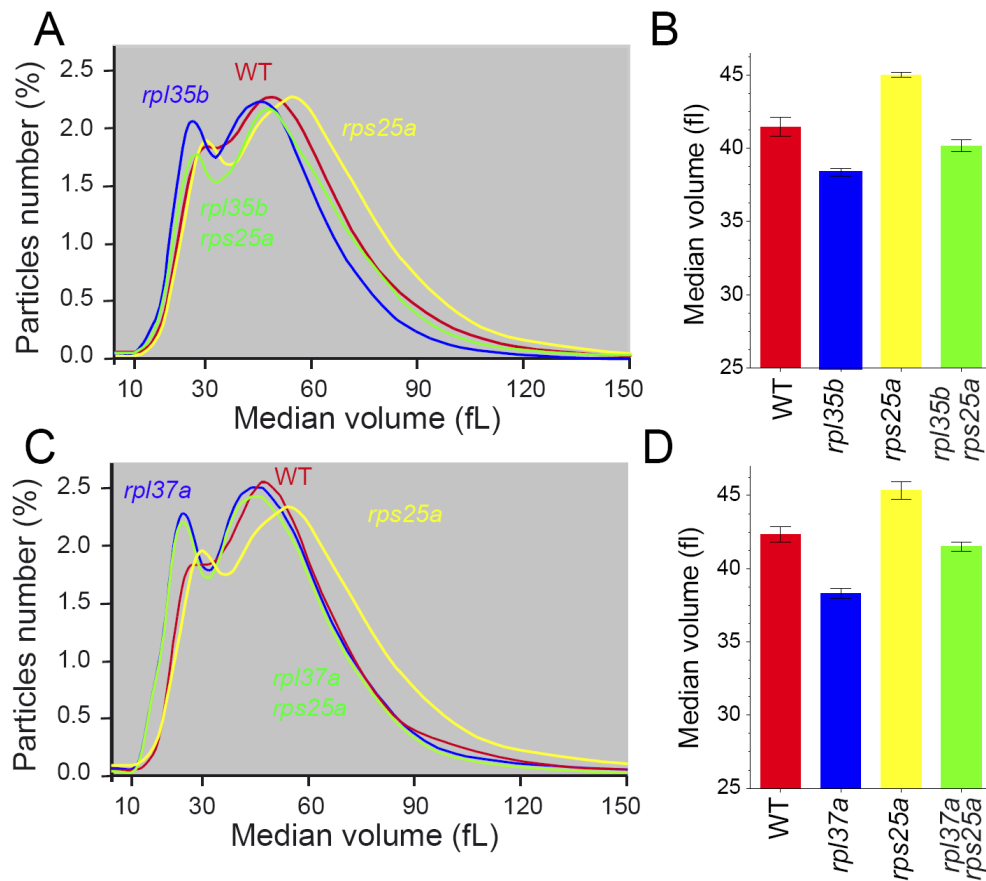
Figure 3. Impairment of small and large ribosomal subunits differentially affects cell size homeostasis. (A) Histogram of median volumes measured on ribosomal proteins mutants for either the small (yellow, *rpsΔ*) or the large (blue, *rplΔ*) ribosomal subunit. Cells were done as in Fig. 1B. An enlarged copy of this histogram harboring knock-out strain names is provided in supplemental Fig. 3. (B) Statistical analysis of median volume ratios obtained for the ribosomal 40S and 60S mutants. The statistical analysis corresponds to a Wilcoxon test with 95% confidence intervals (***) : $p < 10^{-4}$; GraphPad Prism 5.02 software). Wild-type median volumes were determined on 10 independent cultures. (C) Diazaborine treatment affecting the large ribosomal subunit biogenesis leads to a *whi* phenotype. Representative volume distributions obtained on wild-type and *rpl37a* strains grown as in Fig. 1B and treated or not for 16 hours with either diazaborine (+ DAB; 0.5 mg/l) or cycloheximide (+ CHX; 0.01mg/l). The generation time measured for the wild-type cells in these conditions were 105, 113 and 113 min for the control, + DAB and + CHX, respectively. The inset corresponds to the mean of median volumes measured on at least three independent cultures for each strain and error bars indicate variation to the mean.

SUPPLEMENTAL FIGURE 3



Supplemental Figure 3. Impairment of small and large ribosomal subunits differentially affects cell size homeostasis. Histogram with strain names of the median volumes measured on ribosomal proteins mutants from either the small (yellow, *rpsΔ*) or the large (blue, *rplΔ*) ribosomal subunit.

SUPPLEMENTAL FIGURE 4



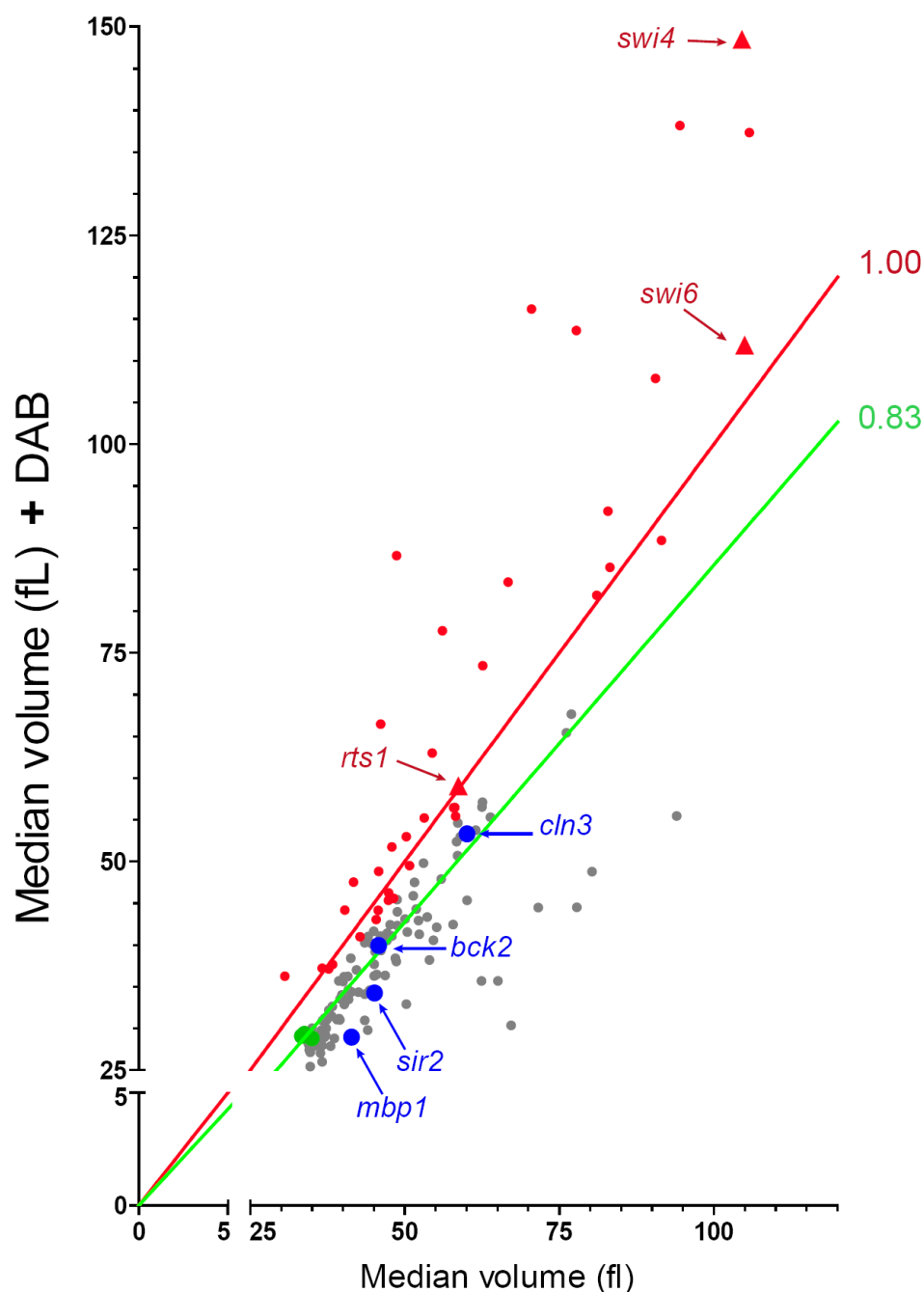
Supplemental Figure 4. Combination of *rps25a* and either *rpl35b* or *rpl37a* mutations leads to an additive effect on cell size homeostasis. (A-C) Representative volume distributions obtained for cells grown in SDcasaU medium for 48 h in exponential phase. (C-D) Mean of median volumes determined on four independent cultures for each strain. Error bars indicate variations to the mean.

response [20, 21] or replicative aging [22]. In the latter study, the authors took advantage of diazaborine (DAB), a drug that disturbs the large ribosomal subunit assembly and therefore mimics 60S mutants. We indeed found that wild-type yeast cells treated with diazaborine were significantly smaller than the untreated cells (Fig. 3C). As expected the *sir2* mutant was fully responsive to diazaborine (supplemental Fig. 5). Of note, cycloheximide, an inhibitor that affects translation elongation, had no major effect on cell size (Fig. 3C). We conclude that the effect of diazaborine on cell size homeostasis is indeed a “60S mutant-like” effect and not merely the result of defective translation.

The transcription factors swi4 and swi6 act downstream the Sir2-60S pathway and connect it to the cell cycle

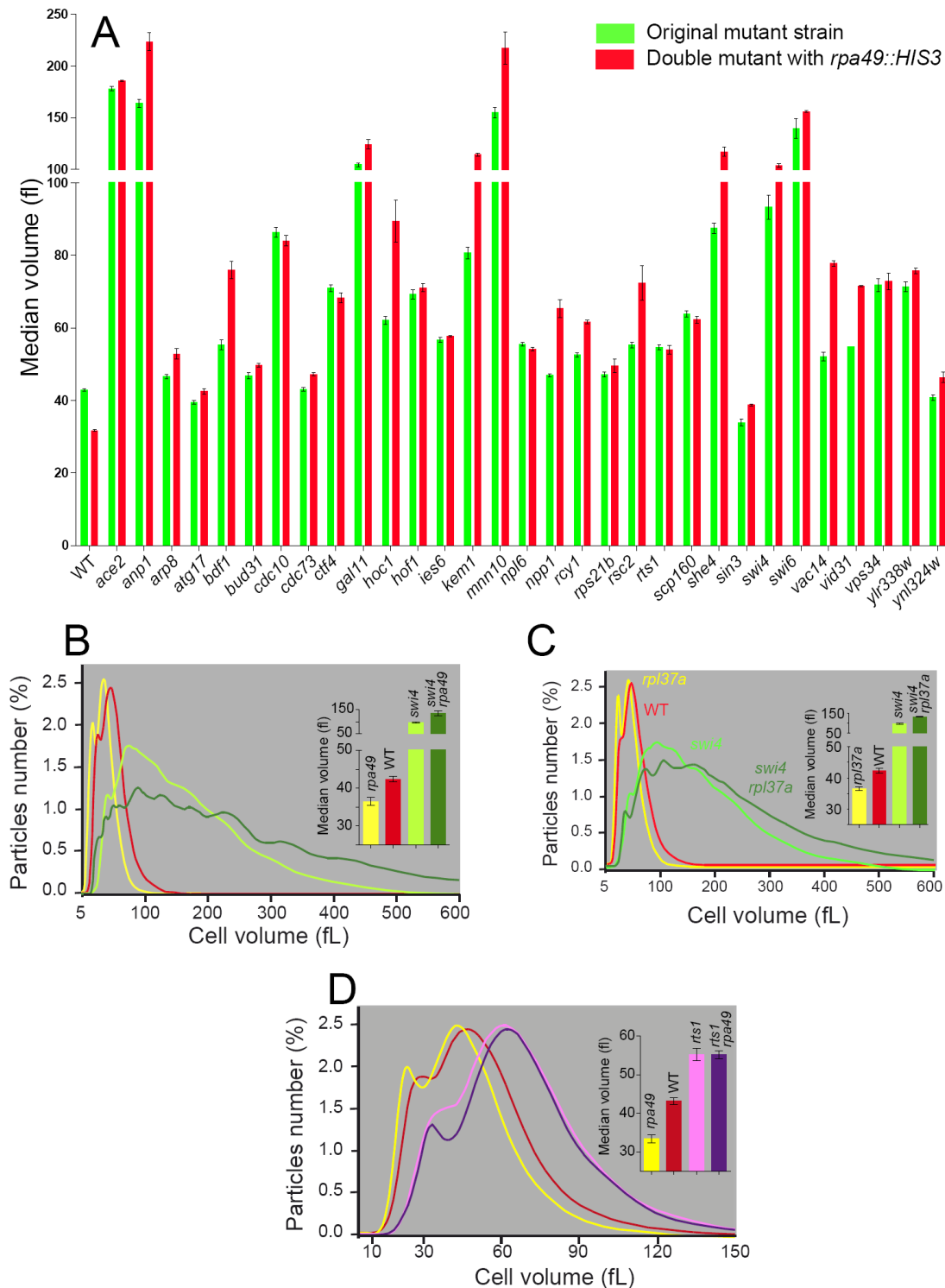
A search for diazaborine non-responsive mutants was then conducted to identify genes possibly affecting steps downstream in the Sir2/60S pathway. A set of 195 large mutants were treated with diazaborine and their cell volume was measured. Among this set, 40 mutants showing a severe growth defect were not further studied. The median volume of the remaining 155 mutants, grown in the presence or absence of the drug, was plotted. The wild-type median volume ratio in the presence of the drug over untreated control was 0.83 ± 0.02 (supplemental Fig. 5). We then considered as unresponsive the 40 mutants showing a ratio treated/untreated >0.95 (supplemental Fig. 5). To confirm the “chemo-epistasis” relationship suggested by diazaborine insensitivity of these mutants, they were combined with the *rpa49* mutation chosen its clear and robust Whi phenotype (supplemental Fig. 2A). Among them, 31 were clearly epistatic to *rpa49* (supplemental Fig. 6A), 4 were hypostatic (false positive) and for the remaining 5 mutants the double mutant with *rpa49* could not be obtained (Supplemental Table 2).

SUPPLEMENTAL FIGURE 5



Supplemental Figure 5. Identification of the diazaborine-insensitive large (*lge*) mutants. Median volume ratio were obtained on *lge* mutants grown exponentially for 36 h in SDcasaU and then treated (y- axis) or not (x-axis) with DAB (0.5 mg/L). Green (WT), grey (*lge* mutants) and blue (*bck2*, *cln3* and , *mbp1* and *sir2* mutants) dots correspond to DAB responsive mutants, while red dots correspond to mutants unresponsive to the drug (median volume ratio + DAB/ - DAB > 0.95). The 0.83 ± 0.02 ratio (green line) was calculated from median volumes obtained on four independent wild-type cultures.

SUPPLEMENTAL FIGURE 6



Supplemental Figure 6. (A) Effect on median volumes of *rpa49* mutation in the diazaborine-unresponsive mutants. Mean of median volumes were determined on cells maintained for 48 h on exponential growing phase in SDcasaU medium. Error bars indicate variations to the mean. (B-D) Representative volume distributions obtained on cells maintained in exponentially growing phase for 48 h in SDcasaU medium. In each panel, insets correspond to the median volume determined on spores from at least four tetratypes. Error bars indicate variation to the mean.

An analysis of GO terms in biological processes for the genes corresponding to these 31 mutants revealed an over-representation of genes involved in cellular response to stress and in cell cycle (supplemental Table 3). The connection of the Sir2/60S pathway with the cell cycle appeared highly relevant to cell size homeostasis. The component ontology search revealed the GO term SBF transcription complex. Indeed, *swi4* and *swi6* affecting the two components of the SBF complex were among the 31 diazaborine non-responsive mutants. SBF (Swi4-Swi6) is a transcriptional activator that in concert with MBF (Mbp1-Swi6) regulates transcription of a set of late G1-specific genes [23]. The *swi4* and *swi6* mutants, when combined with *rpa49*, *rpl35b* or *rpl37a* knock-out, clearly imposed their large size phenotype (Fig. 4A-B and supplemental Fig. 6 B-C). Importantly, the *mbp1* mutant, lacking the other subunit of the MBF complex, showed a wild-type cell size and was highly responsive to diazaborine (Supplemental Fig. 5, blue dot). This result, together with the fact that *swi4* behaves just like *swi6*, strongly suggests that the SBF (Swi4-Swi6) and not the MBF (Mbp1-Swi6) is required downstream of the Sir2-60S pathway for cell size homeostasis.

Interestingly, the *rts1* deletion was among the diazaborine unresponsive mutants. Rts1 is a regulatory subunit of protein phosphatase PP2A required for control of G1 cyclin transcription [24]. The transcriptional effect of Rts1 possibly takes place via Swi6 modification but does not seem fully dependent on known critical upstream regulators of G1 cyclin transcription such as Cln3, Bck2 or Whi5. To clarify the connections of the Sir2/60S pathway with those cells cycle regulators, we first confirmed that *rts1* was fully epistatic on *rpa49* and *rpl35b* mutants (Fig. 5A and supplemental Fig. 6D), as expected from the absence of response to diazaborine (supplemental Fig. 5). By contrast the *cln3* and *bck2* mutants were found responsive to diazaborine (supplemental Fig. 5). Combination of *cln3* and *bck2* with *rpl37a* resulted in an intermediate median cell volume (Fig. 5B-C) indicating that the Sir2/60S effect is not fully dependent on Cln3 or Bck2 functions.

FIGURE 4

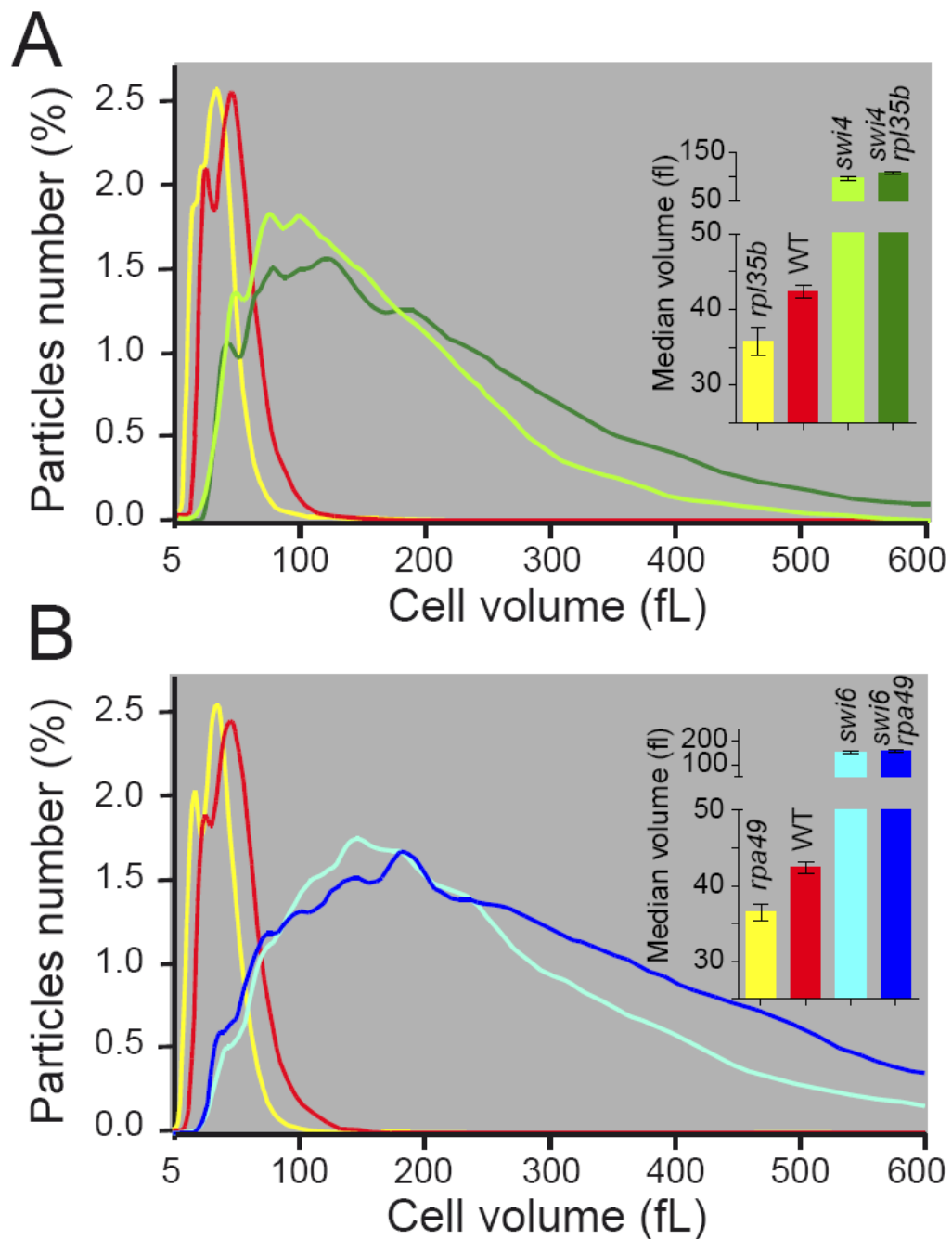


Figure 4. The *swi4* and *swi6* mutants impose their large size phenotype when combined to *rpa49* or *rpl35b* mutations. Representative volume distributions of *swi4* and *rpl35b* (A) or *swi6* and *rpa49* (B) mutations either combined or not. Cells were grown as in Fig. 1B. Insets correspond to the mean of at least four median volumes measured on independent cultures and error bars indicate variation to the mean.

FIGURE 5

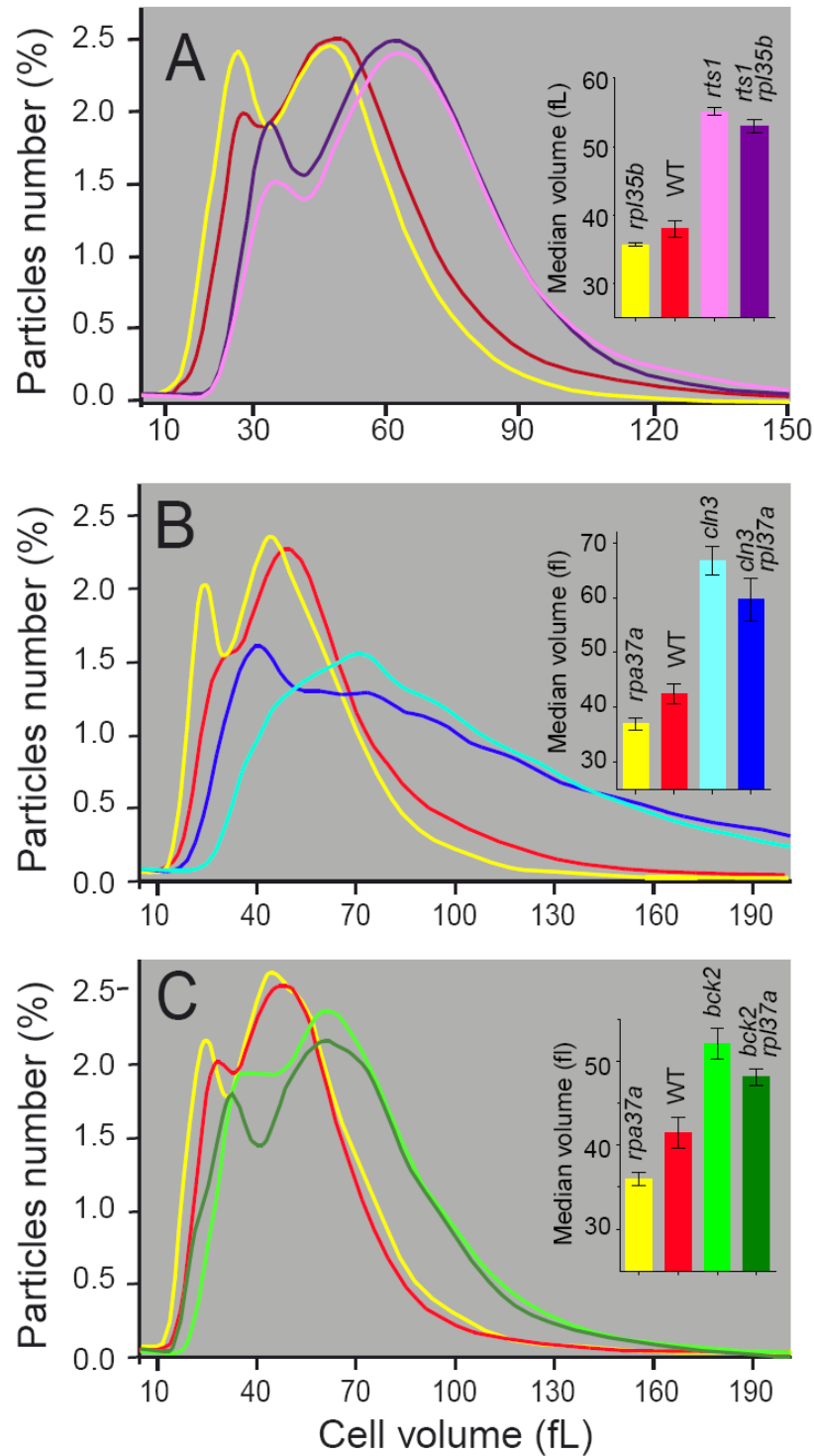


Figure 5. Rts1 is involved in the Sir2/60S pathway while Bck2 Cln3, Whi5 are not. (A) *rts1* mutation is fully epistatic to *rpa49* disruption. (B-D) *cln3* (B), *bck2* (C) and *whi5* (D) mutations lead to an intermediary size phenotype when combined to either *rpl37a* or *sir2* mutations. In all experiments, cells were grown as in Fig. 1B. Insets correspond to the mean of median volumes measured on four to six independent cultures for each strain and error bars indicate variations in the mean.

Consistently, the downstream *whi5* mutant was clearly responsive to Nam (supplemental Table 1). We conclude that the Sir2/60S pathway is not fully dependant on the G1/S effectors Bck2, Cln3 and Whi5.

The Sir2/60S pathway is distinct from ploidy and nutritional control of cell size

It is well known that cell size is affected by ploidy, cells with higher ploidy tending to be larger. As previously reported, we found that the median cell volume increased with higher ploidy (Fig. 6A). When these cells of various ploidy were treated with Nam or diazaborine, their volume changed in a way similar to that observed for the haploid strain (Fig. 6A). Independently of the ploidy, the Nam treatment resulted in a 27 ± 1 % increase of the median cell volume, while diazaborine led to a 19 ± 2 % decrease (Fig. 6A). We conclude that the response to the Sir2/60S pathway is not dependent on ploidy but rather appears to define a distinct pathway involved in the homeostasis of cell size.

As mentioned in the introduction section, cell size is also modulated by nutritional richness. A wild-type strain grown in the presence of raffinose, a carbon source that is less well assimilated than glucose, has indeed a median cell volume reduced by one third compared to the same strain grown in glucose (Fig. 6B). Importantly, all the mutants of the Sir2/60S pathway that have been assayed were still responsive to nutrient control of cell size (Fig. 6B). However, it should be stressed that while the most upstream mutants such as *sir2* or *rpl35b* respond to raffinose similarly to the control strain, the most downstream mutants of the pathway such as *swi4* and *swi6* are less, although still significantly, affected by nutrient (Fig. 6B). It thus appears that the Sir2/60S and nutrient control pathways are distinct. Finally, we found that growth in raffinose resulted in a nearly 50 % decrease of the median cell volume independently of the ploidy of the cells (Fig. 6C). We conclude that ploidy and nutrient control cell size by distinct means.

FIGURE 6

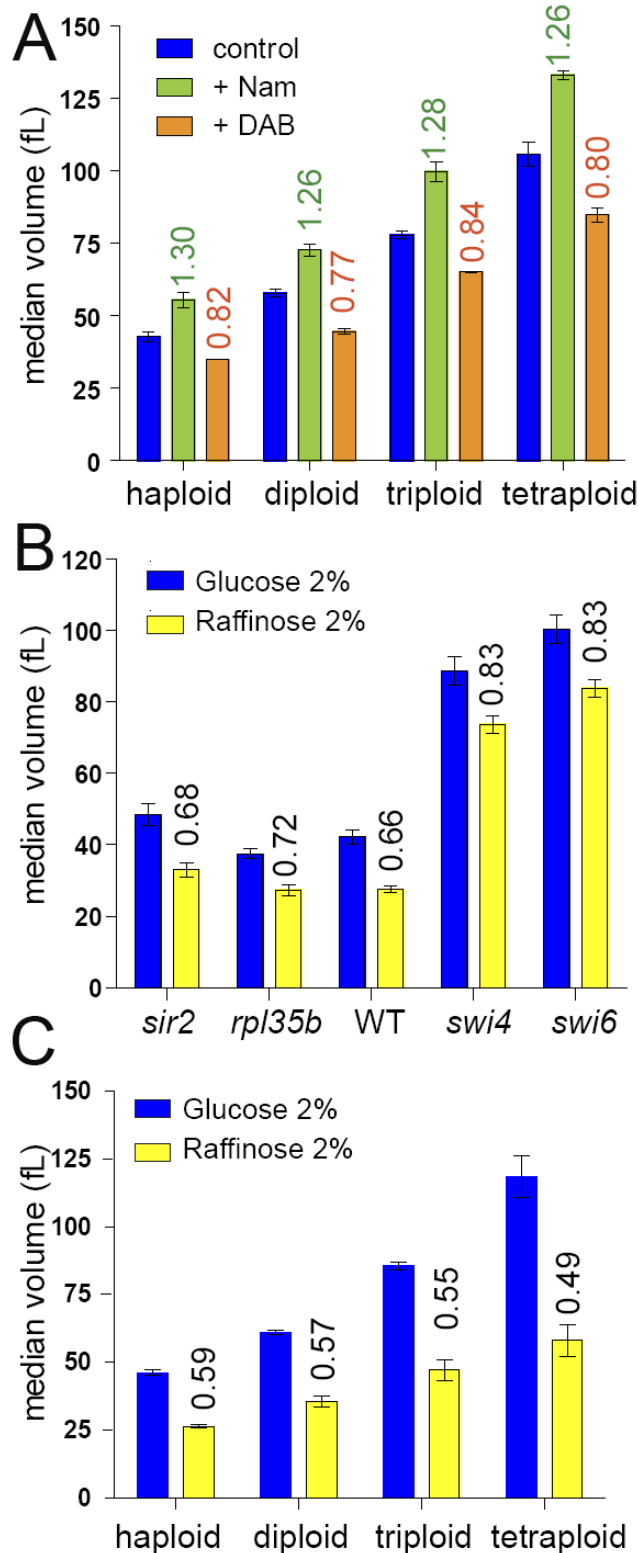


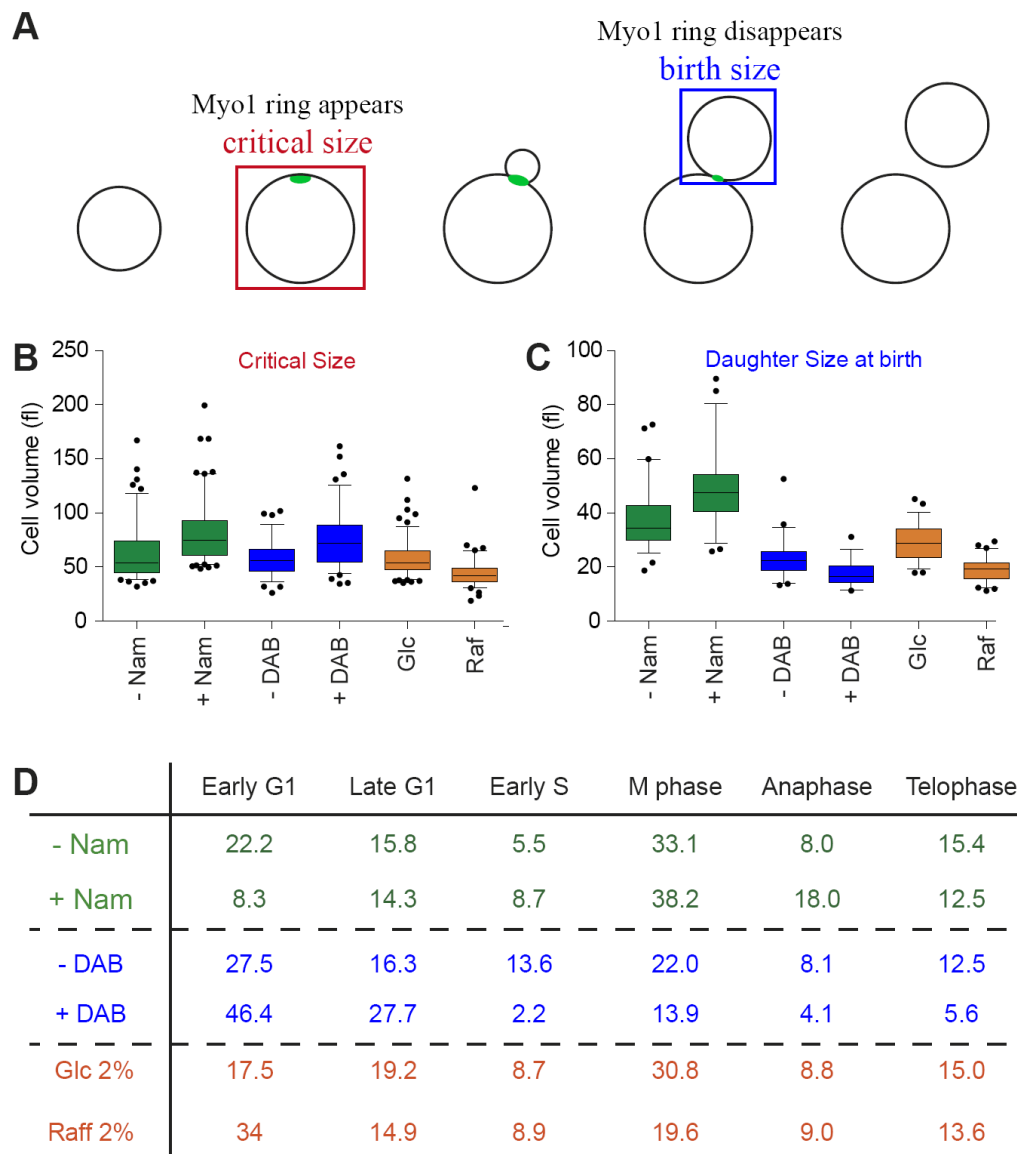
Figure 6. The Sir2/60S pathway acts on cell size independently of ploidy and nutrient control signals. (A) Effects of either nicotinamide or diazaborine treatments on wild-type strains harboring different ploidy levels. Cells were grown as in Fig. 1B and were treated for 8 hours with Nam (100 μ M) or for 16 hours with diazaborine (DAB; 0.5 mg/l) prior to cell size measurements. (B) Mutants in genes involved in the Sir2/60S pathway still respond to nutritional control of cell size. Cells were grown in SDcasaU or SRafcasaU media for 48 h in exponential phase prior to cell size determination. (C) Nutritional and ploidy controls of cell size act independently. Wild-type cells harbouring different ploidy levels were grown as in (B) prior to cell size determination. All results in this figure correspond to the mean of median volumes measured on at least three independent cultures and error bars indicate variation to the mean. Median volumes ratios to the glucose untreated conditions are given as numbers above bars.

Since the Sir2/60S and the nutrient pathways are distinct, we investigated whether critical size was changed in the Sir2/60S pathway mutants, as previously found for the nutrient pathway [3]. We thus measured critical size, defined as the size of the mother cell when the bud appears, for wild-type cells grown in glucose in the presence or absence of Nam or diazaborine. As a control, the cells were also grown in the presence of raffinose. As previously reported, we found that critical size was lower when cells were grown in raffinose medium (Supplemental Fig. 7). On the opposite, critical size was higher when cells were grown in the presence of Nam or diazaborine (Supplemental Fig. 7). If critical size is higher for diazaborine treated cells, which are small, then their daughter cell size at birth, defined as the size of the daughter cell when it separates from the mother, should be lower. This is indeed what was observed for diazaborine treated cells, whereas, on the opposite, birth size was larger for Nam treated cells (Supplemental Fig. 7). Together, these results support our genetics data showing that effects on cell size due to alteration of the Sir2/60S pathway or to nutrient control occur through distinct pathways (Fig. 6B).

Cell size and replicative aging

The Sir2/60S pathway has previously been found to affect yeast lifespan, defined as the number of daughters produced by a yeast cell before becoming senescent [22]. We indeed found that two large mutants of the Sir2/60S pathway, *sir2* and *swi4*, had a much shorter life span than the wild-type isogenic control (Fig. 7A). We then asked whether lifespan could be inversely correlated to cell size in a more general way. Indeed, in a recent work Schneider and coworkers proposed that cell size, together with growth rate, is an important determinant of lifespan [25]. In good agreement with this hypothesis and their data, we found that a *cln3* large mutant has a shorter life span than wild-type (Fig. 7A). However, we also found that the *fob1* mutant which suppresses the lifespan defect of *sir2* [26] does not suppress the enlarged

SUPPLEMENTAL FIGURE 7



Supplemental Figure 7. Effects of diazaborine, Nam and raffinose on both critical size and daughter size at birth. Experiments were carried out in a wild type strain, isogenic to BY4742, expressing the following protein fusions : Myo1-GFP, Spc42-mRFP1 and Htb1-3xCFP.

Myo1-GFP was used to determine critical size and birth size and nuclear and spindle pole body markers were used to follow cell cycle progression. (A) Schematic representation of Myo1-GFP localization during the cell cycle. (B-C) Distribution of cell volumes at critical size and birth size from cells imaged as described by Laporte *et al* (*J Cell Biol.* **192**:949-57) after exponential growth for 24 h (Nam) or 48 h (diazaborine and raffinose) in minimal casaU medium. (D) Distribution of cells (N>200) in the various cell cycle stages (expressed as percent) from the same cultures used in B and C.

phenotype of *sir2* (Fig. 7B). Similarly, a *gcn4* mutation that suppresses the increased lifespan of a *rpl31a* mutant [22] had no effect on the Whi phenotype of the *rpl31a* mutant (Fig. 7C). To further investigate the size/aging relationship, we measured lifespan of isogenic haploid, diploid and triploid strains treated or not with nicotinamide. As previously described, we found that Nam decreased lifespan as expected if it mimics a Sir2 defect (Fig. 7D). This effect was observed on haploid, diploid and triploid strains (Fig. 7D) and was therefore correlated to the concomitant increased cell volume (Fig. 6A). However, lifespan of untreated diploid and triploid cells was longer than that of haploid despite the fact that increased ploidy also results in increased median cell volume (Fig. 6A). Accordingly, higher ploidy and Nam treatment of wild-type strains, both increased median cell volume but had opposite effects on lifespan.

FIGURE 7

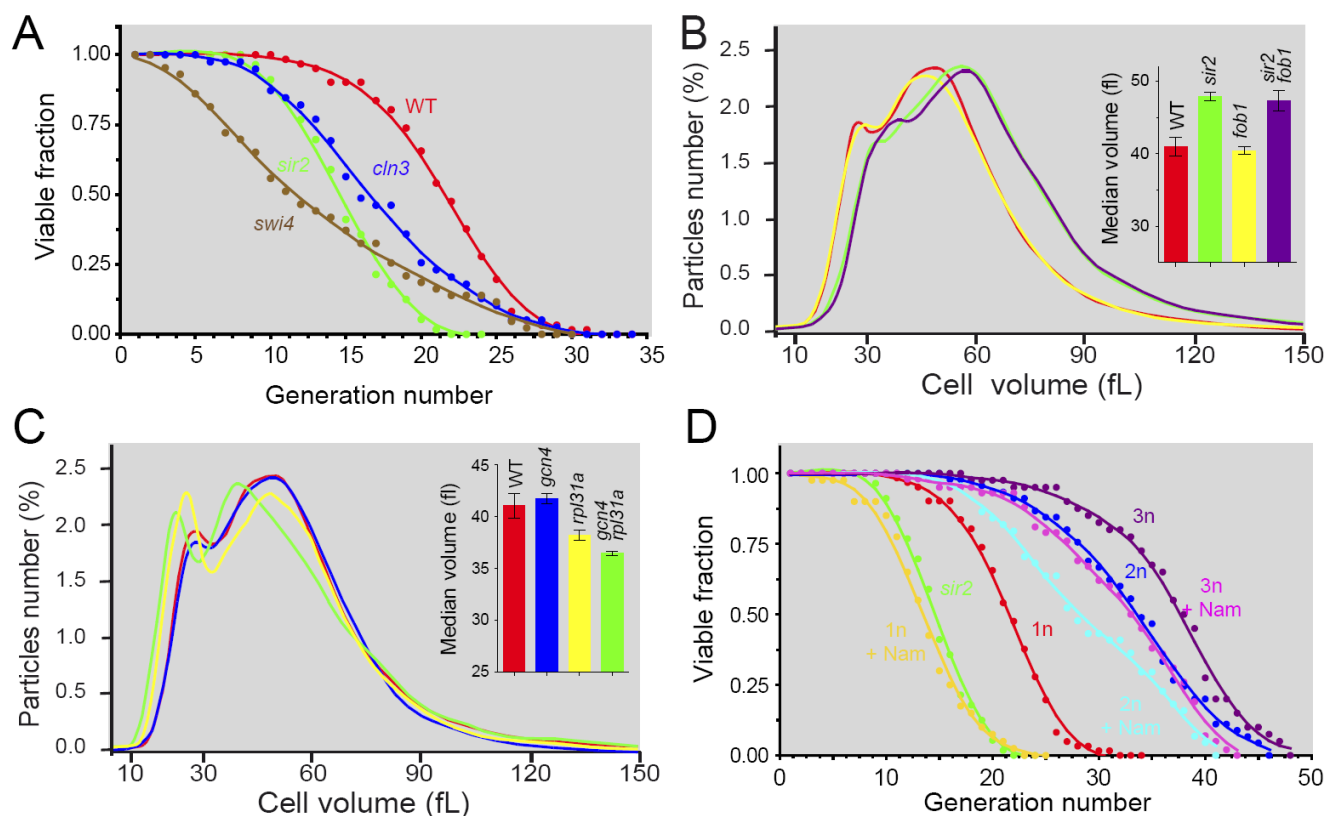


Figure 7. Sir2/60S pathway and connection between cell size and replicative lifespan. (A) Mutation in *sir2*, *cln3* and *swi4* loci lead to a major decrease in replicative lifespan. Survival curves were determined twice on at least 50 daughter cells for each strain. Statistical analyses revealed that the replicative lifespan of the mutants was statistically shorter than that of the wild type control. Average mean lifespans determined were 22, 16, 13 and 11 generations for wild-type, *cln3*, *sir2* and *swi4* strains, respectively. (B) The large size phenotype of *sir2* mutant is not suppressed by *fob1* mutation. (C) Mutation in *gcn4* had no effect on the Whi phenotype of the *rpl31a* mutant. For (B) and (C), representative volume distributions were obtained on cells grown as in Fig. 1B. Insets correspond to the mean of at least four median volumes measured on independent cultures and error bars indicate variation to the mean. (D) Effect of ploidy and Nam treatment on replicative lifespan. Survival curves were determined twice on 50-100 daughter of daughter cells for each strain grown on YPD medium containing or not Nam (500 μ M). Statistical analyses revealed that Nam treatment significantly decreased replicative lifespan whatever the ploidy level.

DISCUSSION

Cell size, a complex quantitative trait

Cell size is a highly complex trait affected by hundreds of mutations and is therefore a very challenging model to study how complex genetics information is integrated in a phenotypic outcome. Thanks to the power of yeast genetics, the genome wide approach performed by Tyers and coworkers has allowed the identification of about 400 genes involved in cell size modulation [13]. However, these genes most probably affect cell size by different means some of which could be shared by several pathways or be totally distinct. To address this issue we used a chemogenetics approach based on the use of inhibitors to mimic specific mutations and thereby perform large scale epistasis. This approach allowed us to identify more than 50 mutants defining a new cell size homeostasis pathway. Importantly, this Sir2/60S pathway is clearly distinct from the nutritional and the ploidy control of cell size. While several mutants abolish nutrient control of cell size, until now, no such mutant has been identified for ploidy control of cell size. This suggests that ploidy could control cell size in a “genomic way”, through global increase of biosynthesis capacity, rather than in a gene specific way. Since there is a tight connection between cell volume and nucleus volume [27], it could be that increased DNA content “inertly” results in a larger nuclear volume which by a yet unidentified mechanism occasions cell volume increase.

In our hands, the *rts1* mutant, just like *swi4* or *swi6*, although less responsive to carbon source than wild-type, is not fully insensitive. This suggests that some of these components are shared by different pathways and do not fully control the pathway response most probably because of some redundancy. Importantly, the G1 cyclin Cln3 which is involved in Start and

cell size homeostasis is not required for ploidy control [28], neither for nutrient control [15], nor the Sir2/60S pathway (this work). Further epistasis analyzes will be required to clarify the position of Cln3 among cell size homeostasis pathways.

The new genetic pathway described here contains several mutant affecting ribosome biogenesis. Because small ribosomal subunit mutants tend to be larger than the wild-type control while large ribosomal subunit mutants are often Whi, we suspect that these mutants affect cell size homeostasis by different mechanisms. Previous work from Tyers and coworkers had established a strong connection between ribosome biogenesis and cell size homeostasis, notably via transcription factors such as Sch9 and Sfp1 [15]. However, the *sch9* and *sfp1* Whi mutants were found fully responsive to Nam and therefore do not belong to the Sir2/60S genetic pathway. It thus appears that the connection between ribosome biogenesis and cell size homeostasis is intricate.

A major remaining question is: how many pathways do contribute to cell size homeostasis? Our study revealed 54 mutants (among 400) genetically defining the Sir2/60S pathway. Hence, though many mutants affect cell size, they could hopefully fall in a relatively limited number of genetic pathways. Systematic identification of these pathways and their components will be required to draw an overview of cell size control in yeast.

The Sir2/60S pathway and the cell cycle

Our data indicate that birth size rather than critical size is mostly affected by mutations in the Sir2/60S pathway. Cells treated with nicotinamide spend less time in G1 and more time in G2/M (supplemental Fig. 7). On the opposite, cells treated with diazaborine tend to stay longer in G1 accordingly to their decreased birth size and increased critical size (supplemental Fig. 7). Since Swi4/Swi6 act in the downstream part of the Sir2/60S pathway, it could have been expected that the control of cell size in the pathway would occur at Start.

The fact that birth size appears critical is thus surprising but should be linked to the proposed role of Swi4 in cytokinesis [29]. Indeed, the *swi4* mutation is synthetic lethal with a *agm1* mutation, impairing chitin biosynthesis and this defect cannot be bypassed by Cln1 or Cln2 overexpression [29]. It thus appears that Swi4/Swi6 could regulate cell size homeostasis by different means.

Interestingly, ribosome 60S subunit mutants were initially found to affect the response that coordinately represses rRNA and ribosomal proteins transcription in secretion-defective cells [20, 21]. This crosstalk between secretion and protein biosynthesis capacity could be important to coordinate biomass increase and cell wall synthesis. It is therefore noteworthy that three of the diazaborine unresponsive mutants, *anp1*, *hoc1* and *mnn10*, affect the alpha-1,6-mannosyltransferase complex which is located in the Golgi and is involved in cell wall mannan biosynthesis. In this regard it is interesting that expression of GSC2, encoding the catalytic subunit of 1,3-beta-glucan synthase responsible for synthesis of the main structural component of the cell wall, is activated by SBF (Swi4p/Swi6p) [30]. In addition, genes induced by cell wall damage showed enrichment in DNA binding motifs for SBF [31]. The connection between Sir2/60S and cytokinesis should be further explored.

Is there a connection between yeast cell size and aging?

The Sir2/60S pathway has been shown to affect both replicative aging [22] and cell size (this work). However, we showed here that Fob1 and Gcn4, which are involved in the aging process, do not affect cell size. It thus seems that the correlation between cell size and replicative aging is not straightforward. However, as noticed by Schneider and coworkers, many cell size mutants are also affected for lifespan [25] and consistently, growth under conditions where carbon is limiting, results in decreased cell size and increased lifespan. We

have shown here that a treatment of cells with Nam or an increased ploidy, both resulted in a larger median cell volume but had opposite effects on lifespan. It hence seems that the connection between the two phenomena is complex. The interesting question of relationships between size and lifespan of living organisms, raised by Aristotle in his essay “On Longevity and Shortness of Life” 23 centuries ago, remains opened.

Materials and Methods

Media, strains and plasmids

SDcasaU is a synthetic minimal medium containing 5% ammonium sulfate, 0.67% yeast nitrogen base (Difco), 2% glucose supplemented with 0.2% casamino acids (Difco) and uracil (0.3 mM). SRafcasaU is a similar medium containing 2% raffinose instead of glucose. The YPD medium used for replicative lifespan experiments contained 1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose. All yeast strains were derived from the parent strains BY4741 and BY4742 of the haploid yeast ORF deletion collections [32]. Polyploid strains isogenic to BY4741 and BY4742 strains were obtained from David Pellman [33]. The *rpa49::HIS3* mutants were obtained by transformation of wild-type or single mutant strains with a PCR fragment obtained on genomic DNA from the SL107-3B strain [34] (generous gift from M. Werner) with oligonucleotides RPA49up (CGACGCCAATTAGCAATACTG) and RPA49Rv (CTATTTGTACATATGTATCTTCTCAG). Histidine-prototrophic transformants were selected and insertion of the *rpa49::HIS3* cassette at *RPA49* locus was verified by PCR with oligonucleotides RPA49prom (TTCTTTAGCTTGTGGCGTTGG) and RPA49Rv. All other multiple mutant strains used in this study were obtained by mating, sporulation and tetrad dissection. Double mutants were identified by PCR using the KanB oligonucleotide (internal to KanMX4; CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT) and an oligonucleotide complementary to the promoter of the disrupted gene. The *sir2* mutation leading to a decreased mating efficiency [35], construction of double mutants was also done by crossing, but with a *sir2* mutant strain covered by a *SIR2* centromeric plasmid (p4099; *URA3*; lab collection). Meiotic *sir2* segregants having lost the plasmid were then chosen as uracil auxotroph spores.

Cell size distribution measurements

All cell size measurements were done on cells grown overnight in SDcasaU or SRaffcasaU media and then diluted several times in order to maintain exponential growth (cell number is always kept under $2 \cdot 10^7$ cells/ml) for 24-48 h before cell size measurement. To obtain each

size distribution, 100 μ L of culture was then diluted into 10 mL of IsotonII and size distribution of the population was analyzed with a multisizer4TM (Beckman-Coulter). Median volume was obtained from the geometric cell volume distribution by using the multi4 software (4.02 version; Beckman-Coulter) with a smoothing of 7. For size determination in presence of Nam (100 μ M), diazaborine (DAB; 0.5 mg/l) and cycloheximide (CHX; 0.01 mg/l), cells were incubated in the presence of the indicated drugs for 8 h (Nam) or 16 h (DAB and CHX) before measurements. For epistasis studies, the volume of the four spores of at least four tetratypes was determined.

Replicative Life Span Analysis

All lifespan experiments were carried out (at least twice) as described [36] on 50-100 daughters of daughter cells grown on standard YPD plates 2% glucose containing or not Nam (500 μ M, a dose resulting in a 20 % median volume increase on plates). Statistical significance of replicative lifespan changes between strains was determined using a Wilcoxon Rank-Sum test (GraphPad Prism software) using a $p = 0.05$ cutoff.

Acknowledgments

We thank Dr H. Bergler for the kind gift of diazaborine, Drs. D. Pellman and M. Werner for sharing biological materials; C. Saint-Marc and J. Ceschin for technical assistance. This work was supported by Conseil Régional d'Aquitaine, Université Bordeaux Segalen, CNRS PEPS program and ANR grant #BLAN12-DeepInSize.

LITTERATURE CITED

1. Jorgensen, P., and Tyers, M. (2004). How cells coordinate growth and division. *Curr Biol* 14, R1014-1027.
2. Wright, D.N., and Lockhart, W.R. (1965). Environmental Control of Cell Composition in *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* 89, 1026-1031.

3. Johnston, G.C., Ehrhardt, C.W., Lorincz, A., and Carter, B.L. (1979). Regulation of cell size in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 137, 1-5.
4. Adams, J., and Hansche, P.E. (1974). Population studies in microorganisms. I. Evolution of diploidy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 76, 327-338.
5. Hennaut, C., Hilger, F., and Grenson, M. (1970). Space limitation for permease insertion in the cytoplasmic membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 39, 666-671.
6. Weart, R.B., Lee, A.H., Chien, A.C., Haeusser, D.P., Hill, N.S., and Levin, P.A. (2007). A metabolic sensor governing cell size in bacteria. *Cell* 130, 335-347.
7. Hartwell, L.H., Culotti, J., Pringle, J.R., and Reid, B.J. (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183, 46-51.
8. Johnston, G.C., Pringle, J.R., and Hartwell, L.H. (1977). Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp Cell Res* 105, 79-98.
9. Lew, D.J., Marini, N.J., and Reed, S.I. (1992). Different G1 cyclins control the timing of cell cycle commitment in mother and daughter cells of the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell* 69, 317-327.
10. Sudbery, P.E., Goodey, A.R., and Carter, B.L. (1980). Genes which control cell proliferation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 288, 401-404.
11. Carter, B.L., and Sudbery, P.E. (1980). Small-sized mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 96, 561-566.
12. Ferrezuelo, F., Aldea, M., and Futcher, B. (2009). Bck2 is a phase-independent activator of cell cycle-regulated genes in yeast. *Cell Cycle* 8, 239-252.
13. Jorgensen, P., Nishikawa, J.L., Breikreutz, B.J., and Tyers, M. (2002). Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* 297, 395-400.

14. Zhang, J., Schneider, C., Ottmers, L., Rodriguez, R., Day, A., Markwardt, J., and Schneider, B.L. (2002). Genomic scale mutant hunt identifies cell size homeostasis genes in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* 12, 1992-2001.
15. Jorgensen, P., Rupes, I., Sharom, J.R., Schneper, L., Broach, J.R., and Tyers, M. (2004). A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev* 18, 2491-2505.
16. Wu, C.Y., Rolfe, P.A., Gifford, D.K., and Fink, G.R. (2010). Control of transcription by cell size. *PLoS Biol* 8, e1000523.
17. Bitterman, K.J., Anderson, R.M., Cohen, H.Y., Latorre-Esteves, M., and Sinclair, D.A. (2002). Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem* 277, 45099-45107.
18. Lee, S., Tong, L., and Denu, J.M. (2008). Quantification of endogenous sirtuin metabolite O-acetyl-ADP-ribose. *Anal Biochem* 383, 174-179.
19. Guarente, L. (1999). Diverse and dynamic functions of the Sir silencing complex. *Nat Genet* 23, 281-285.
20. Zhao, Y., Sohn, J.H., and Warner, J.R. (2003). Autoregulation in the biosynthesis of ribosomes. *Mol Cell Biol* 23, 699-707.
21. Miyoshi, K., Tsujii, R., Yoshida, H., Maki, Y., Wada, A., Matsui, Y., Toh, E.A., and Mizuta, K. (2002). Normal assembly of 60 S ribosomal subunits is required for the signaling in response to a secretory defect in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277, 18334-18339.
22. Steffen, K.K., MacKay, V.L., Kerr, E.O., Tsuchiya, M., Hu, D., Fox, L.A., Dang, N., Johnston, E.D., Oakes, J.A., Tchao, B.N., et al. (2008). Yeast life span extension by depletion of 60s ribosomal subunits is mediated by Gcn4. *Cell* 133, 292-302.

23. Dirick, L., Moll, T., Auer, H., and Nasmyth, K. (1992). A central role for SWI6 in modulating cell cycle Start-specific transcription in yeast. *Nature* 357, 508-513.
24. Artiles, K., Anastasia, S., McCusker, D., and Kellogg, D.R. (2009). The Rts1 regulatory subunit of protein phosphatase 2A is required for control of G1 cyclin transcription and nutrient modulation of cell size. *PLoS genetics* 5, e1000727.
25. Yang, J., Dungrawala, H., Hua, H., Manukyan, A., Abraham, L., Lane, W., Mead, H., Wright, J., and Schneider, B.L. (2011). Cell size and growth rate are major determinants of replicative lifespan. *Cell Cycle* 10, 144-155.
26. Kaeberlein, M., McVey, M., and Guarente, L. (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* 13, 2570-2580.
27. Jorgensen, P., Edgington, N.P., Schneider, B.L., Rupes, I., Tyers, M., and Futcher, B. (2007). The size of the nucleus increases as yeast cells grow. *Mol Biol Cell* 18, 3523-3532.
28. Andalis, A.A., Storchova, Z., Styles, C., Galitski, T., Pellman, D., and Fink, G.R. (2004). Defects arising from whole-genome duplications in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 167, 1109-1121.
29. Igual, J.C., Toone, W.M., and Johnston, L.H. (1997). A genetic screen reveals a role for the late G1-specific transcription factor Swi4p in diverse cellular functions including cytokinesis. *Journal of cell science* 110 (Pt 14), 1647-1654.
30. Kim, K.Y., Truman, A.W., and Levin, D.E. (2008). Yeast Mpk1 mitogen-activated protein kinase activates transcription through Swi4/Swi6 by a noncatalytic mechanism that requires upstream signal. *Mol Cell Biol* 28, 2579-2589.
31. Garcia, R., Bermejo, C., Grau, C., Perez, R., Rodriguez-Pena, J.M., Francois, J., Nombela, C., and Arroyo, J. (2004). The global transcriptional response to transient

- cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem* 279, 15183-15195.
32. Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., et al. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285, 901-906.
 33. Storchova, Z., Breneman, A., Cande, J., Dunn, J., Burbank, K., O'Toole, E., and Pellman, D. (2006). Genome-wide genetic analysis of polyploidy in yeast. *Nature* 443, 541-547.
 34. Beckouet, F., Labarre-Mariotte, S., Albert, B., Imazawa, Y., Werner, M., Gadai, O., Nogi, Y., and Thuriaux, P. (2008). Two RNA polymerase I subunits control the binding and release of Rrn3 during transcription. *Mol Cell Biol* 28, 1596-1605.
 35. Shore, D., Squire, M., and Nasmyth, K.A. (1984). Characterization of two genes required for the position-effect control of yeast mating-type genes. *EMBO J* 3, 2817-2823.
 36. Kaeberlein, M., Powers, R.W., 3rd, Steffen, K.K., Westman, E.A., Hu, D., Dang, N., Kerr, E.O., Kirkland, K.T., Fields, S., and Kennedy, B.K. (2005). Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science* 310, 1193-1196.
 37. Bedalov, A., Hirao, M., Posakony, J., Nelson, M., and Simon, J.A. (2003). NAD⁺-dependent deacetylase Hst1p controls biosynthesis and cellular NAD⁺ levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 23, 7044-7054.
 38. Li, M., Petteys, B.J., McClure, J.M., Valsakumar, V., Bekiranov, S., Frank, E.L., and Smith, J.S. (2010). Thiamine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by the NAD⁺-dependent histone deacetylase Hst1. *Mol Cell Biol* 30, 3329-3341.

SUPPLEMENTAL TABLE 1

mutated gene	Corresponding ORF	Median Volume control (fl)	Median Volume + Nam (fl)	Median volume ratio
Control strain				
None		39,6	48,7	1,23

Nam unresponsives Strains

<i>BUD19</i>	<i>YJL188c</i>	44,0	42,0	0,95
<i>UAF30</i>	<i>YOR295w</i>	41,8	40,2	0,96
<i>ATP12</i>	<i>YJL180c</i>	37,9	36,6	0,97
<i>ZUO1</i>	<i>YGR285c</i>	33,2	32,5	0,98
<i>RPS19B</i>	<i>YNL302c</i>	41,6	41,6	1,00
<i>RPS1B</i>	<i>YML063w</i>	35,8	35,9	1,00
<i>RPS29B</i>	<i>YDL061c</i>	41,1	41,4	1,01
<i>YGR160W</i>	<i>YGR160W</i>	43,1	43,5	1,01
<i>RPL35B</i>	<i>YDL136w</i>	34,3	34,8	1,01
<i>RPL31A</i>	<i>YDL075w</i>	39,0	39,3	1,01
<i>RPA49</i>	<i>YNL248c</i>	37,3	37,8	1,02
<i>RPP2B</i>	<i>YDR382w</i>	35,7	36,2	1,02
<i>YVH1</i>	<i>YIR026c</i>	40,7	41,4	1,02
<i>PIH1</i>	<i>YHR034c</i>	38,7	39,6	1,02
<i>JJJ1</i>	<i>YNL227c</i>	38,3	39,3	1,03
<i>RPL35A</i>	<i>YDL191w</i>	39,4	40,6	1,03
<i>RPL37A</i>	<i>YLR185w</i>	35,9	37,1	1,03
<i>RPL19A</i>	<i>YBR084c-a</i>	39,0	40,4	1,03
<i>KEL1</i>	<i>YHR158c</i>	38,1	40,0	1,05
<i>RPL13A</i>	<i>YDL082w</i>	38,0	40,0	1,05
<i>RPL37B</i>	<i>YDR500c</i>	40,3	42,2	1,05
<i>RPL23A</i>	<i>YBL087c</i>	38,5	40,4	1,05

Nam responsives Strains

<i>ARX1</i>	<i>YDR101c</i>	35,9	38,3	1,07
<i>FYV7</i>	<i>YLR068w</i>	46,5	50,0	1,07
<i>RPS6B</i>	<i>YBR181c</i>	39,9	43,0	1,08
<i>RPS18A</i>	<i>YDR450w</i>	40,3	43,5	1,08
<i>YLR184W</i>	<i>YLR184w</i>	37,7	40,7	1,08
<i>SAM37</i>	<i>YMR060c</i>	36,0	39,0	1,08
<i>ATP11</i>	<i>YNL315c</i>	37,2	40,5	1,09
<i>MRPL9</i>	<i>YGR220c</i>	37,0	40,3	1,09
<i>RPL1B</i>	<i>YGL135w</i>	37,0	40,3	1,09
<i>BUD20</i>	<i>YLR074c</i>	38,0	41,5	1,09
<i>YBR266C</i>	<i>YBR266c</i>	35,5	38,8	1,09
<i>YNL228W</i>	<i>YNL228w</i>	38,7	42,4	1,09
<i>SKY1</i>	<i>YMR216c</i>	36,9	40,4	1,10
<i>RPL21B</i>	<i>YPL079w</i>	38,2	41,9	1,10
<i>ATP1</i>	<i>YBL099w</i>	28,0	30,8	1,10
<i>GPA2</i>	<i>YER020w</i>	38,2	42,2	1,10
<i>YLR402W</i>	<i>YLR402w</i>	31,6	34,9	1,11
<i>UGO1</i>	<i>YDR470c</i>	27,6	30,6	1,11

MRT4	YKL009w	38,9	43,1	1,11
YDL062W	YDL062w	35,8	39,6	1,11
QRI5	YLR204w	51,2	56,9	1,11
PTK2	YJR059w	33,7	37,6	1,11
RPL16A	YIL133c	37,2	41,4	1,11
RRP8	YDR083w	38,6	43,1	1,12
RPS0A	YGR214w	41,5	46,4	1,12
SSF1	YHR066w	34,6	38,8	1,12
RRG9	YNL213c	33,1	37,1	1,12
FOB1	YDR110w	38,1	42,8	1,12
HXK2	YGL253w	31,1	34,9	1,12
RPL7A	YGL076c	37,0	41,6	1,13
YOR309C	YOR309c	39,1	44,1	1,13
YDL063C	YDL063c	39,2	44,4	1,13
MNI1	YIL110w	36,0	40,7	1,13
RPS0B	YLR048w	40,5	45,8	1,13
TPS1	YBR126c	30,8	34,9	1,13
RPL8B	YLL045c	36,1	40,9	1,13
MTQ2	YDR140w	37,4	42,5	1,14
IFM1	YOL023w	29,7	34,2	1,15
HAP4	YKL109w	33,9	39,0	1,15
CYT1	YOR065w	38,7	44,6	1,15
RPA14	YDR156w	39,4	45,4	1,15
ATP14	YLR295c	37,3	43,0	1,15
YDR417C	YDR417c	35,7	41,2	1,16
SSA4	YER103w	37,9	43,8	1,16
RSM23	YGL129c	38,6	44,7	1,16
SSZ1	YHR064c	35,7	41,5	1,16
TOM1	YDR457w	34,7	40,3	1,16
RPS21A	YKR057w	41,5	48,3	1,16
SCO1	YBR037c	33,5	39,1	1,17
TMA23	YMR269w	38,4	44,9	1,17
DBP3	YGL078c	36,3	42,5	1,17
RSA1	YPL193w	42,4	49,6	1,17
UFO1	YML088W	36,2	42,5	1,17
MAP1	YLR244c	36,9	43,3	1,17
MAC1	YMR021c	37,3	43,9	1,18
YNL226W	YNL226w	39,7	46,8	1,18
RPS10A	YOR293w	43,5	51,3	1,18
RPL15B	YMR121c	36,5	43,1	1,18
MDM12	YOL009c	57,4	67,8	1,18
RRG1	YDR065w	36,1	42,7	1,18
YML122C	YML122c	36,9	43,7	1,19
SCH9	YHR205w	38,1	45,2	1,19
POR1	YNL055c	38,3	45,5	1,19
PHO5	YBR093c	35,9	42,6	1,19
YOR200W	YOR200w	37,9	45,1	1,19
AGP2	YBR132c	40,2	47,8	1,19
YLL044W	YLL044W	40,7	48,5	1,19
YDR115W	YDR115w	33,5	40,0	1,19
KNH1	YDL049c	37,9	45,2	1,19
MEC3	YLR288c	37,0	44,1	1,19

MRPL9	YGR220c	36,9	44,2	1,20
YCP4	YCR004c	42,0	50,4	1,20
YCR062W	YCR061W	39,1	46,9	1,20
SFP1	YLR403w	32,5	39,1	1,20
RPS28B	YLR264w	35,7	42,8	1,20
MRPS5	YBR251w	35,7	42,9	1,20
OXA1	YER154w	34,1	41,0	1,20
YGR219W	YGR219w	37,1	44,7	1,21
YGR102C	YGR102c	34,2	41,3	1,21
TUF1	YOR187w	36,6	44,3	1,21
BUD21	YOR078w	40,1	48,7	1,21
MRP7	YNL005c	34,9	42,4	1,22
WHI5	YOR083w	31,2	37,9	1,22
MRPL31	YKL138c	36,8	44,9	1,22
RPS16B	YDL083c	35,6	43,4	1,22
MSM1	YGR171c	36,0	43,9	1,22
ISA2	YPR067w	38,8	47,4	1,22
RIM1	YCR028c-a	43,6	53,3	1,22
RML2	YEL050c	34,5	42,2	1,22
RPI1	YIL119c	41,4	50,7	1,23
MRPL23	YOR150w	33,9	41,6	1,23
MSE1	YOL033w	35,2	43,3	1,23
MRPL13	YKR006c	35,2	43,2	1,23
ATP4	YPL078c	38,9	47,8	1,23
GLO3	YER122c	37,4	46,0	1,23
PEP3	YLR148w	50,7	62,5	1,23
MTG1	YMR097c	36,0	44,4	1,23
EUG1	YDR518w	35,8	44,2	1,24
MRPL17	YNL252c	36,5	45,2	1,24
MSD1	YPL104w	35,2	43,6	1,24
YGR111W	YGR111w	40,1	49,7	1,24
YDL057W	YDL057w	41,6	51,7	1,24
RMD9	YGL107c	36,2	45,0	1,24
MGM101	YJR144w	37,2	46,2	1,24
SNF12	YNR023w	45,0	56,0	1,24
MRF1	YGL143c	35,4	44,1	1,25
ATP17	YDR377w	51,0	63,6	1,25
MRP1	YDR347w	35,8	44,7	1,25
RCS1	YGL071W	41,4	51,9	1,25
RPL1B	YGL135w	35,2	44,1	1,25
MRPL38	YKL170w	36,4	45,6	1,25
ISM1	YPL040c	36,5	45,7	1,25
MRPL10	YNL284c	34,2	42,9	1,26
YGR064W	YGR064w	44,5	56,0	1,26
AIM10	YER087w	33,4	42,1	1,26
MMM1	YLL006w	30,0	37,9	1,26
YPS51	YLR120C	43,3	54,8	1,27
LUV1	YDR027C	40,5	51,3	1,27
MIP1	YOR330c	42,7	54,1	1,27
RSM7	YJR113c	35,3	44,9	1,27
MNN9	YPL050c	36,3	46,1	1,27
COX7	YMR256c	34,1	43,3	1,27

<i>PPT2</i>	<i>YPL148c</i>	39,3	50,1	1,27
<i>YPL080C</i>	<i>YPL080c</i>	40,1	51,2	1,28
<i>MSK1</i>	<i>YNL073w</i>	35,3	45,1	1,28
<i>AIM22</i>	<i>YJL046w</i>	32,7	41,9	1,28
<i>PET111</i>	<i>YMR257c</i>	36,6	46,9	1,28
<i>DIA4</i>	<i>YHR011w</i>	34,8	44,7	1,28
<i>SWE1</i>	<i>YJL187c</i>	37,1	47,7	1,29
<i>CCM1</i>	<i>YGR150c</i>	34,1	43,8	1,29
<i>SLM6</i>	<i>YPR164W</i>	35,2	45,3	1,29
<i>LTV1</i>	<i>YKL143w</i>	36,5	47,1	1,29
<i>KAP122</i>	<i>YGL016w</i>	34,4	44,4	1,29
<i>YPL005W</i>	<i>YPL005w</i>	53,0	68,5	1,29
<i>RPS19B</i>	<i>YNL302c</i>	35,2	45,6	1,30
<i>AVL9</i>	<i>YLR114c</i>	41,6	54,1	1,30
<i>MRPS28</i>	<i>YDR337w</i>	34,7	45,0	1,30
<i>SUV3</i>	<i>YPL029w</i>	35,4	46,2	1,30
<i>CBP1</i>	<i>YJL209w</i>	36,0	47,0	1,31
<i>MSF1</i>	<i>YPR047w</i>	35,6	46,6	1,31
<i>YKL169C</i>	<i>YKL169c</i>	38,0	49,7	1,31
<i>RPL2B</i>	<i>YIL018w</i>	61,6	80,9	1,31
<i>EXO1</i>	<i>YOR033c</i>	42,5	56,0	1,32
<i>COX10</i>	<i>YPL172c</i>	37,0	49,0	1,32
<i>WHI3</i>	<i>YNL197c</i>	54,8	73,0	1,33
<i>AEP2</i>	<i>YMR282c</i>	36,0	47,9	1,33
<i>LCB5</i>	<i>YLR260w</i>	38,2	51,0	1,33
<i>QCR10</i>	<i>YHR001w-a</i>	39,6	53,0	1,34
<i>FRA2</i>	<i>YGL220w</i>	37,9	50,9	1,34
<i>MRPL15</i>	<i>YLR312w-a</i>	39,2	52,7	1,35
<i>MRPL8</i>	<i>YJL063c</i>	41,0	55,5	1,35
<i>PHO85</i>	<i>YPL031c</i>	42,9	58,3	1,36
<i>RPS8A</i>	<i>YBL072c</i>	34,1	46,5	1,36
<i>MRPL6</i>	<i>YHR147c</i>	38,9	53,1	1,36
<i>YPR099C</i>	<i>YPR099c</i>	38,4	52,6	1,37
<i>YMR158W</i>	<i>YMR158w</i>	33,0	45,2	1,37
<i>CDH1</i>	<i>YGL003c</i>	43,0	59,4	1,38
<i>NAM2</i>	<i>YLR382c</i>	38,7	53,6	1,39
<i>MEF1</i>	<i>YLR069c</i>	39,9	55,7	1,40
<i>MSR1</i>	<i>YHR091c</i>	38,6	53,9	1,40
<i>RPL20A</i>	<i>YMR242c</i>	43,2	60,3	1,40
<i>FZO1</i>	<i>YBR179c</i>	36,0	50,3	1,40
<i>MRPL51</i>	<i>YPR100w</i>	39,8	56,0	1,41
<i>MRPS35</i>	<i>YGR165w</i>	38,1	53,9	1,41
<i>MRPL37</i>	<i>YBR268w</i>	37,3	53,5	1,44
<i>MRP20</i>	<i>YDR405w</i>	34,7	52,8	1,52
<i>PIF1</i>	<i>YML061c</i>	38,8	70,0	1,81

SUPPLEMENTAL TABLE 2

mutated gene	Corresponding ORF	Median Volume control (fl)	Median Volume + Nam (fl)	Median volume ratio
Control strain				
None		34,9	28,9	0,83
Diazaborine unresponsives Strains				
<i>RPS21B</i>	<i>YJL136c</i>	45,3	43,0	0,95
<i>RPL43A</i>	<i>YPR043w</i>	58,2	55,4	0,95
<i>RSC1</i>	<i>YGR056w</i>	47,3	45,3	0,96
<i>YNL324W</i>	<i>YNL324w</i>	42,8	41,0	0,96
<i>ADH1</i>	<i>YOL086c</i>	45,7	44,1	0,97
<i>REF2</i>	<i>YDR195w</i>	91,5	88,4	0,97
<i>BDF1</i>	<i>YLR399c</i>	58,1	56,5	0,97
<i>YJR018W</i>	<i>YJR018w</i>	57,9	56,4	0,98
<i>RCY1</i>	<i>YJL204c</i>	50,7	49,5	0,98
<i>IES6</i>	<i>YEL044w</i>	47,4	46,2	0,98
<i>EST2</i>	<i>YLR318w</i>	38,3	37,7	0,98
<i>SIN3</i>	<i>YOL004w</i>	37,7	37,1	0,99
<i>RTS1</i>	<i>YOR014w</i>	58,6	59,0	1,01
<i>CTF4</i>	<i>YPR135w</i>	81,0	81,9	1,01
<i>CDC73</i>	<i>YLR418c</i>	36,6	37,2	1,02
<i>SCP160</i>	<i>YJL080c</i>	83,2	85,2	1,02
<i>RSC2</i>	<i>YLR357w</i>	53,1	55,2	1,04
<i>ACE2</i>	<i>YLR131c</i>	174,4	183,6	1,05
<i>HOC1</i>	<i>YJR075w</i>	50,2	53,0	1,05
<i>SWI6</i>	<i>YLR182w</i>	105,0	111,8	1,07
<i>BUD31</i>	<i>YCR063w</i>	45,7	48,8	1,07
<i>NPL6</i>	<i>YMR091c</i>	47,9	51,7	1,08
<i>NPP1</i>	<i>YCR026c</i>	40,3	44,2	1,10
<i>XRN1</i>	<i>YGL173c</i>	82,9	91,9	1,11
<i>ARP8</i>	<i>YOR141c</i>	41,7	47,5	1,14
<i>DEF1</i>	<i>YKL054C</i>	54,4	63,0	1,16
<i>VPS34</i>	<i>YLR240w</i>	62,6	73,5	1,17
<i>ATG17</i>	<i>YLR423c</i>	30,6	36,3	1,19
<i>BEM2</i>	<i>YER155c</i>	90,5	107,9	1,19
<i>YLR338W</i>	<i>YLR338w</i>	66,7	83,5	1,25
<i>GAL11</i>	<i>YOL051w</i>	105,7	137,3	1,30
<i>BUR2</i>	<i>YLR226w</i>	56,1	77,6	1,38
<i>SWI4</i>	<i>YER111c</i>	104,5	148,5	1,42
<i>VAC14</i>	<i>YLR386w</i>	46,1	66,4	1,44
<i>SHE4</i>	<i>YOR035c</i>	77,7	113,6	1,46
<i>CDC10</i>	<i>YCR002c</i>	94,5	138,1	1,46
<i>MNN10</i>	<i>YDR245w</i>	147,6	241,5	1,64
<i>VRP1</i>	<i>YLR337c</i>	70,5	116,2	1,65
<i>ANP1</i>	<i>YEL036c</i>	149,9	254,0	1,69
<i>HOF1</i>	<i>YMR032w</i>	48,7	86,6	1,78
XXX Double mutants not obtained in combination with <i>rpa49::HIS3</i>				

Diazaborine responsives Strains

SGO1	YOR073w	53,0	49,8	0,94
CLA4	YNL298w	58,6	54,6	0,93
YCR087W	YCR087w	48,7	45,4	0,93
FIG4	YNL325c	41,2	38,4	0,93
PRO1	YDR300c	44,1	41,0	0,93
YCR061W	YCR061w	44,9	41,6	0,93
CIK1	YMR198w	43,5	40,3	0,93
ARP5	YNL059c	51,6	47,5	0,92
RTT109	YLL002w	62,6	57,1	0,91
FAA3	YIL009w	39,3	35,7	0,91
HTL1	YCR020w-b	62,5	56,5	0,90
BUD22	YMR014w	40,1	36,2	0,90
HSL1	YKL101w	48,8	44,0	0,90
CLN3	YAL040c	59,7	53,8	0,90
BUL1	YMR275c	44,7	40,1	0,90
YKE2	YLR200w	59,0	53,0	0,90
SAC3	YDR159w	58,4	52,4	0,90
IMP2	YMR035w	51,3	45,9	0,89
RVS161	YCR009c	46,0	41,1	0,89
FAB1	YFR019w	47,6	42,4	0,89
HIT1	YJR055w	40,0	35,6	0,89
YPR044C	YPR044c	40,7	36,2	0,89
RAD54	YGL163c	45,0	39,9	0,89
RAD50	YNL250w	60,3	53,5	0,89
KRE28	YDR532C	76,9	67,7	0,88
CAP2	YIL034c	47,1	41,4	0,88
CLB2	YPR119w	42,2	37,0	0,88
VTA1	YLR181c	46,7	40,9	0,88
TRF4	YOL115W	61,5	53,7	0,87
YCR050C	YCR050c	45,6	39,9	0,87
BCK2	YER167w	46,0	40,2	0,87
MET7	YOR241w	48,8	42,3	0,87
RRT12	YCR045c	45,2	39,2	0,87
HNT3	YOR258w	58,5	50,7	0,87
SPT4	YGR063c	63,9	55,3	0,87
VPS53	YJL029c	50,0	43,1	0,86
YCR087C-A	YCR087c-a	47,1	40,5	0,86
MMS22	YLR320w	76,1	65,4	0,86
YCR025C	YCR025c	47,9	41,1	0,86
URA7	YBL039c	35,0	30,0	0,86
TRM9	YML014w	55,9	47,9	0,86
GIM5	YML094w	39,8	34,0	0,85
BRE1	YDL074c	51,8	44,3	0,85
SYG1	YIL047c	38,3	32,7	0,85
YHR009C	YHR009c	37,7	32,2	0,85
YKU70	YMR284w	46,1	39,3	0,85
PAC10	YGR078c	39,5	33,5	0,85
TCO89	YPL180w	40,8	34,6	0,85
QDR2	YIL121w	36,7	30,9	0,84

EST1	YLR233c	37,0	31,2	0,84
NPT1	YOR209c	45,0	37,7	0,84
SST2	YLR452c	37,0	31,0	0,84
ALF1	YNL148c	41,4	34,4	0,83
RPL43B	YJR094w-a	37,4	31,0	0,83
HST1	YOL068c	38,1	31,5	0,83
MDM20	YOL076w	50,4	41,6	0,82
YKL053W	YKL053w	52,2	42,9	0,82
EAF1	YDR359c	40,9	33,5	0,82
NCL1	YBL024w	34,4	28,1	0,82
RHB1	YCR027c	40,2	32,9	0,82
DBF20	YPR111w	36,5	29,8	0,82
LDB16	YCL005W	36,7	29,8	0,81
LDB7	YBL006C	53,6	43,3	0,81
CDC50	YCR094w	42,5	34,3	0,81
GPM2	YDL021w	36,3	29,3	0,81
MOT2	YER068w	37,2	30,0	0,81
TNA1	YGR260w	45,0	36,3	0,81
RPL15B	YMR121c	35,1	28,2	0,81
AAC3	YBR085w	36,5	29,3	0,80
DEG1	YFL001w	45,4	36,5	0,80
YJR054W	YJR054w	35,5	28,5	0,80
KGD1	YIL125w	39,0	31,0	0,80
WT	Unknown	34,9	27,8	0,80
RHO4	YKR055w	36,9	29,3	0,79
CLC1	YGR167w	34,5	27,4	0,79
RPB9	YGL070c	36,0	28,6	0,79
DCC1	YCL016c	35,7	28,3	0,79
RAD5	YLR032w	48,5	38,4	0,79
CDC26-1	YFR036w	39,4	31,2	0,79
YIL054W	YIL054w	35,2	27,9	0,79
SEC22	YLR268w	52,3	41,3	0,79
AKR1	YDR264c	36,2	28,5	0,79
YBL094C	YBL094c	35,8	28,2	0,79
HCM1	YCR065w	39,5	31,0	0,79
PMP1	YCR024c-a	37,2	29,2	0,79
PPH3	YDR075w	43,5	34,1	0,78
TIR3	YIL011w	36,5	28,6	0,78
POA1	YBR022w	34,7	27,1	0,78
YPR045C	YPR045c	37,0	29,0	0,78
CTK2	YJL006c	48,6	38,0	0,78
HST3	YOR025w	44,3	34,6	0,78
SIR2	YDL042c	44,3	34,5	0,78
DPB3	YBR278w	46,8	36,4	0,78
SLX8	YER116c	55,1	42,1	0,76
HOP2	YGL033w	36,6	27,9	0,76
MOG1	YJR074w	60,1	45,3	0,75
BFR1	YOR198c	38,6	28,8	0,75
YKL023W	YKL023w	36,3	27,1	0,74
IRA2	YOL081w	54,6	40,6	0,74
BEM1	YBR200w	57,8	42,5	0,73
GIS2	YNL255c	38,0	27,9	0,73

<i>PHM8</i>	<i>YER037w</i>	34,7	25,4	0,73
<i>MBP1</i>	<i>YDL056W</i>	42,0	30,4	0,72
<i>VPS69</i>	<i>YPR087w</i>	43,5	31,0	0,71
<i>YLR422W</i>	<i>YLR422w</i>	36,6	26,0	0,71
<i>MRC1</i>	<i>YCL061c</i>	54,0	38,2	0,71
<i>APQ12</i>	<i>YIL040w</i>	44,0	29,8	0,68
<i>BEM4</i>	<i>YPL161c</i>	50,2	32,9	0,66
<i>UBP3</i>	<i>YER151c</i>	71,6	44,5	0,62
<i>SSN3</i>	<i>YPL042c</i>	80,3	48,8	0,61
<i>EAP1</i>	<i>YKL204w</i>	94,0	55,5	0,59
<i>CIN8</i>	<i>YEL061c</i>	77,8	44,5	0,57
<i>SEC66</i>	<i>YBR171w</i>	62,4	35,7	0,57
<i>CCR4</i>	<i>YAL021c</i>	65,1	35,7	0,55
<i>SNF5</i>	<i>YBR289w</i>	67,2	30,4	0,45
<i>CWH8</i>	<i>YGR036C</i>	182,2	65,7	0,36

SUPPLEMENTAL Table 3 :Process ontology

Gene Ontology term	Cluster frequency	Background frequency	P-value	Genes annotated to the term
cellular response to stress	13 out of 31 genes 41.9 %	546 out of 7168 genes 7.6%	4.1e-05	<i>NPP1, SWI4, DEF1, SWI6, RSC2, BDF1, CDC73, ATG17, HOF1, NPL6, SIN3, ARP8, CTF4</i>
cell cycle process	12 out of 31 genes 38.7%	511 out of 7168 7.1%	1.7e-04	<i>CDC10, BUD31, SWI4, XRN1, SCP160, ACE2, SWI6, RSC2, HOF1, SIN3, RTS1, CTF4</i>

DISCUSSION PERSPECTIVES

V Discussion générale

et perspectives.

V 1) Approche *chimiogénétique* pour l'étude d'un caractère complexe : l'homéostasie de la taille des cellules.

Durant ce travail de thèse, je me suis intéressé à l'homéostasie de la taille des cellules, un phénomène retrouvé dans l'ensemble du monde vivant, connu de longue date par la communauté scientifique qui l'étudie depuis près de 60 ans. Suite au travail de Paul Jorgensen (2002), et comme j'ai pu le détailler jusqu'ici, la taille des cellules est apparu comme un caractère quantitatif complexe, sous la dépendance potentielle de centaines de gènes. Ce caractère résulterait ainsi de l'intégration d'un important ensemble d'effecteurs. De façon particulièrement stimulante, nous sommes donc en présence d'un caractère dont les régulateurs potentiels sont connus, mais pas le réseau les unissant. Dans ce contexte et grâce aux ressources génétiques de la levure, j'ai pu facilement mettre en place, à deux reprises, une étude à large échelle reposant sur de « l'épistasie chimique » : le fait d'utiliser une molécule chimique dont les effets sur les cellules miment ceux d'une mutation. Les résultats de cette étude ont été par la suite validés sans ambiguïté par des expériences d'épistasie classique, démontrant alors la robustesse de nos résultats et par là celle

de l'approche de chimiogénétique. J'ai pu ainsi organiser 13% (53/400) des mutants de taille de l'étude de Jorgensen au sein d'une même voie. Bien sûr le restant des mutants de tailles connus demeure orphelin de voie de signalisation. Une question cruciale maintenant est de déterminer combien de voies de signalisation contribuent à l'homéostasie de la taille des cellules. Et comment interagissent-elles les unes avec les autres ? Sont-elles associées aux phénomènes connus de longue date comme affectant l'homéostasie de la taille des cellules tels que les effets de la richesse en nutriment ou de la ploïdie ?

Cette étude doit ainsi servir de tremplin à d'autres qui auront alors pour tâches d'identifier de nouvelles voies impliquées dans la régulation de ce caractère, d'en évaluer leurs nombres et finalement de mettre en évidence les communications existantes au sein de ce réseau complexe. Récemment, faisant suite à la preuve de faisabilité de mon projet, une nouvelle étude a été initiée par Jeremy Tissot-Dupont. Il a pu, dans le cadre de son stage de Master, mettre en avant une série de gènes potentiellement impliqués dans le contrôle nutritionnel de la taille des cellules. La poursuite de son travail constituera une suite directe à mon projet. En effet, une fois différentes voies affectant l'homéostasie de la taille des cellules identifiées à partir des 400 mutants de taille, le *challenge* sera de comprendre à quel point ces voies sont interconnectées. Ces relations pourraient être établies par des expériences d'épistasie classique entre des mutants issus de ces différentes voies.

L'étude d'un caractère complexe est certes stimulante mais n'est cependant pas sans contraintes. Comme l'implique le concept d'homéostasie, pour une condition donnée la taille des cellules est stable. Changez un paramètre, température de

l'incubateur, qualité du milieu, temps passé en phase exponentielle... et la taille peut varier. Cette extrême sensibilité laisse supposer qu'un grand nombre de signaux serait intégré en amont des voies de régulations de l'homéostasie de la taille des cellules. La taille des cellules serait ainsi facilement influençable. La seule façon de contrôler précisément l'ensemble des paramètres d'une culture de cellule, passe par l'utilisation de chemostat. Il est alors possible de maintenir les cellules en culture dans un état stationnaire donné. Ne pouvant pas réaliser une étude à grande échelle en chémostat, il m'a fallu être particulièrement prudent lors des mesures de volumes en batch, afin que les variations de mesure de taille reflètent bien les effets des mutations/drogues utilisées et non un artefact résultant des conditions de culture.

La caractérisation des voies affectant la taille des cellules et la connaissance des connections existantes entre elles, permettront la mise au point de modèles mathématiques. Cette modélisation mathématique permettrait d'intégrer un ensemble de paramètres affectant la taille des cellules tels que, la vitesse de prolifération, l'assimilation de nutriments, la synthèse de protéines, de ribosomes etc. Il serait alors possible d'émettre de nouvelles hypothèses de travail et de les mettre à l'épreuve. Cette approche pourrait par exemple questionner la fiabilité et la précision des mécanismes conduisant à l'homéostasie de la taille des cellules. Ces expériences devraient alors être parfaitement contrôlées et nécessiteraient cette fois l'emploi de chemostats.

V 2) De la validité physiologique de la voie *SIR2/60S/SWI4*.

Dans le cadre de mon étude, je n'ai pas identifié de signal physiologique *stimulant* la voie *SIR2/60S/SWI4*. L'ensemble de notre approche reposant sur des mutants et sur l'emploi de drogues, il est possible de se demander si nous avons ici étudié une

réalité physiologique, un mécanisme mis en place dans la cellule afin de maintenir et/ou de réguler l'homéostasie de sa taille, ou bien si nous n'avons fait qu'étudier des « effets mutants ».

Durant la première partie de mon étude je me suis intéressé à la fonction potentielle de *cell sizer* d'une molécule de la voie des pentoses phosphates, le PRPP. Ce métabolite aurait pu être utilisé, par un mécanisme d'homéostasie de la taille, pour intégrer dans la progression du cycle cellulaire une information du métabolisme central. Comme je l'ai discuté plus tôt, je ne pense pas que le PRPP puisse être un *cell sizer* et le mécanisme impliqué chez les mutants *prs1* et *prs3* conduisant à une modification de l'homéostasie de la taille des cellules reste à ce jour indéterminé. D'autre part les mutants *prs1* et *prs3* augmentent de volume une fois traités à la Nam, la voie *SIR2/60S/SWI4* serait ainsi distincte de celle impliquée chez les mutants *prs*.

Mon approche *d'épistasie chimique* est partie de l'effet inhibiteur de la Nam sur Sir2p. Contrairement à la diazaborine cette molécule n'est pas une drogue à proprement parler, il s'agit en effet d'un intermédiaire de la voie de recyclage du NAD⁺. La Nam pourrait alors être une molécule signal inhibant Sir2p dans certaines situations particulières. L'inhibition de Sir2p provoque une des diminutions de durée de vie répllicative les plus marquées chez *S. cerevisiae*. Quel pourrait alors être le gain pour la cellule d'une régulation physiologique de sa taille par l'inhibition de Sir2p, si celle-ci conduit à diminuer la longévité? Intuitivement il est possible de penser que la cellule ne favoriserait pas une telle condition. Par la mise en compétition pour la prolifération dans le milieu de culture, de mutants présentant une

durée de vie répllicative augmentée par rapport à une souche sauvage, une récente étude (Delaney et *al.*, 2011) a montré qu'une diminution du *fitness* (correspondant ici à cette capacité de la souche à proliférer dans le milieu) pouvait être associée avec une augmentation de la longévité. Une amélioration de la longévité se ferait ainsi au détriment du *fitness*. Cette étude excluait des mutants présentant une durée de vie répllicative diminuée, et donc *sir2*. Cependant ils ne mesurèrent aucun effet délétère sur le *fitness* d'une souche sur-exprimant *SIR2*, une condition également connue pour stimuler la durée de vie répllicative (Kaerberlein et *al.*, 1999) et que j'ai montré capable de diminuer la taille des cellules. Si la modification de l'activité de Sir2p est sans effet négatif sur le *fitness*, il est alors permis de penser qu'une régulation physiologique de Sir2p est possible. Mesurer la concentration intracellulaire en Nam dans des conditions de culture, ou bien souches, connues pour présenter un phénotype de taille fournirait un début de conclusion quant au rôle potentiel de de la Nam en tant que molécule signal pour la régulation de la taille des cellules.

Un signal activateur de Sir2p pourrait également stimuler la voie *SIR2/60S/SWI4*. Le NAD^+ est connu pour activer *in vitro* l'activité de Sir2p (Tanny et *al.*, 2004) et pourrait jouer ce rôle de molécule signal activatrice. Lors d'une étude préliminaire réalisée sur des mutants de la voie du NAD^+ j'ai pu mesurer une corrélation inverse entre le niveau de NAD^+ et la taille des cellules, suggérant un rôle activateur potentiel du NAD^+ sur la taille des cellules. Néanmoins pour être conclusives ces expériences seraient à répéter. Bien que la voie de biosynthèse du NAD^+ soit particulièrement complexe et demeure partiellement décrite la question du NAD^+ doit être, à mon avis, sérieusement étudiée.

Si je n'ai pas élucidé le signal en amont de Sir2p, je n'ai pas non plus déterminé clairement par quel mécanisme la voie *SIR2/60S/SWI4* pouvait aboutir à une modification de la taille des cellules, néanmoins des pistes se dessinent. Mes données font état d'un lien entre la sous unité 60S du ribosome et la synthèse de la paroi cellulaire. D'autres études ont pu mettre en avant un lien entre la sous unité 60S et la voie sécrétoire. En effet, Zhao et *al.*, (2003) ont montré que la répression, par la PKC, de l'expression des gènes qui codent pour des protéines ribosomiques et pour l'ARNr consécutivement à un stress de la voie sécrétoire étaient spécifiquement dépendante de la grande sous unité du ribosome. Dans leur cas cet effet spécifique de la sous unité 60S était indépendant de la production de protéine, ce qui suggère l'existence d'une fonction de la sous unité 60S, distincte de la synthèse protéique. Par la différence d'effet sur la taille des cellules d'un traitement à la diazaborine et d'un traitement à la cycloheximide mes données vont également dans ce sens. La voie sécrétoire étant nécessaire à la formation de la membrane plasmique et de la paroi, cet ensemble de données suggère que la cellule pourrait utiliser un élément de production de biomasse, la sous unité 60S, pour coordonner l'augmentation de la biomasse avec la production de membranes, deux éléments pouvant se révéler déterminants pour l'établissement d'une homéostasie de la taille des cellules.

Il serait particulièrement intéressant de confirmer ce lien entre la synthèse des membranes et l'homéostasie de la taille des cellules. Ce lien pourrait constituer un début d'explication sur la capacité de la cellule à coordonner son augmentation de volume et donnerait du sens à la voie *SIR2/60S/SWI4*. Dans un premier temps la détermination de la taille des cellules de mutants spécifiques de la voie sécrétoire tel que *sly1-1*, un allèle thermosensible du gène *SLY1* dans le produit est nécessaire au transport des protéines du réticulum endoplasmique au Golgi ainsi que l'utilisation

d'une drogue induisant un stress de la voie sécrétoire (la tunicamycine) pourrait confirmer l'intérêt de cette hypothèse. Ces deux exemples sont en effet connus pour induire la réponse transcriptionnelle au stress de la voie sécrétoire dépendante de la sous unité 60S.

V 3) Des effets du ribosome sur la taille des cellules.

Les travaux de Jorgensen et de Tyers ont établi un lien entre biogenèse du ribosome et l'homéostasie de la taille des cellules, essentiellement par les facteurs de transcription Sfp1p et Sch9p. Le knock-out des gènes correspondants provoque un phénotype de petite taille très marqué. Ces mutants augmentent en taille lorsqu'ils sont traités à la Nam, indiquant qu'ils agiraient indépendamment de la voie *SIR2/60S/SWI4* sur la taille des cellules.

D'autre part, J'ai pu montrer que les mutants de gènes codant pour des protéines de la sous unité 40S avaient tendance à présenter un phénotype de « grande taille », ceux de la sous unité 60S la tendance opposée. Ces deux phénomènes sont additifs. Cet exemple et le phénomène de la réponse au stress de la voie sécrétoire décrit par Zhao et *al.*, (2003) impliquent l'existence d'effets spécifiques des sous unités du ribosome. Le ribosome serait donc impliqué dans l'homéostasie de la taille de plusieurs manières distinctes, avec d'une part des effets sur le contrôle de sa biogénèse, et d'autre part des effets spécifiques de chacune de ses sous unités. D'autre part, bien qu'une partie de ces effets serait dépendant d'un signal nutritionnel comme a pu le montrer Tyers avec Sch9p et Sfp1p, j'ai pu montrer que la sous unité 60S du ribosome agirait sur la taille des cellules indépendamment de ce contrôle nutritionnel. Il existerait ainsi des liens complexes entre le ribosome et la régulation

de la taille des cellules. Le ribosome est à la fois un investissement et une source de biomasse. Ces liens complexes pourraient ainsi exister afin de permettre la coordination entre la croissance *future* (la biogenèse du ribosome) et la croissance actuelle (l'efficacité de synthèse protéique).

V 4) De l'existence d'un lien entre la longévité et la taille des cellules.

Plusieurs des acteurs de la voie *SIR2/60S/SWI4* sont impliqués dans le processus de durée de vie répllicative et d'une façon plus générale, de nombreux mutants de taille présentent un phénotype de durée de vie répllicative. Quand les mutants de petite taille auraient ainsi tendance à être de durée de vie répllicative augmentée, ceux de la petite sous unité seraient de durée de vie répllicative diminuée. Si la taille des cellules et la durée de vie répllicative peuvent être corrélées, pourrait on à partir de la connaissance de la taille moyenne d'une population de cellule, en déterminer sa durée de vie potentielle ? J'ai pu montrer que Gcn4p et Fob1p, respectivement liés aux effets sur la durée de vie répllicative de la sous unité 60S du ribosome et de Sir2p, ne sont pas impliqués dans l'homéostasie de la taille des cellules. J'ai pu également montrer que deux conditions conduisant à une augmentation de la taille des cellules, une augmentation de la ploïdie ou bien un traitement à la Nam, provoquaient deux résultats de durée de vie répllicative opposés. Quand la nicotinamide provoque une diminution de la durée de vie répllicative, l'augmentation du niveau de ploïdie entraîne une importante augmentation de la durée de vie répllicative. Si cette corrélation entre longévité et taille existe, alors elle devrait être le fait, là encore, de relations bien plus complexes que ne le suggérait le premier

constat. La question serait ici de déterminer en quoi la taille des cellules pourrait, dans certaines conditions, être un bénéfice pour la durée de vie répliquative de la cellule ?

Chez les mammifères une corrélation peut être également faite entre taille de l'organisme et longévité. Speakman (2005) rapporte que la durée de vie des mammifères et la taille de l'organisme sont tous deux régulés par le métabolisme énergétique. Une augmentation du métabolisme énergétique résultant en une diminution de la durée de vie. De manière intéressante la taille des cellules et la durée de vie répliquative sont également connues chez *S. cerevisiae* pour réagir à la richesse du milieu en nutriment. Des cellules en milieu pauvre seront de durée de vie répliquative réduite et de plus petite taille qu'en milieu riche. L'aspect métabolique n'est ainsi pas à négliger et il serait ainsi intéressant de déterminer comment ces différents éléments, métabolisme, durée de vie répliquative et taille des cellules pourraient être connectés.

MATERIELS ET METHODES

VI Matériels et méthodes.

Milieux.

Milieux de cultures bactériens : Les bactéries ont été cultivées en LB composé de 10 g/l de peptone, 5 g/l d'extrait de levure et 10 g/l de NaCl. Les composés suivant sont ajoutés si nécessaire : ampicilline à 100 µg/ml final, kanamycine à 10 µg/ml final, X-Gal (5-bromo-4chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) à 100 µM final.

Milieux de cultures pour levures : Les cultures liquides ont été réalisées en YP (*yeast extract* 10 g/l, *bacto peptone* 20 g/l) ou en milieu synthétique minimum YNB (*yeast nitrogen base* 1.7 g/l (DIFCO), sulfate d'ammonium 5 g/l). Le milieu synthétique a été supplémenté en acides aminés, par ajout d'hydrolysate de caséine 0,2% (CASA DIFCO) apportant au milieu l'ensemble des acides aminés à l'exception du tryptophane de l'asparagine et de la glutamine, ou bien par ajout individuel (L-lysine 10 mg/l, L-leucine 60 mg/l, L-tryptophane 40 mg/l ou L-histidine 10 mg/l). Les bases azotées ont pu également être ajoutées : uracile 20 mg/l et adénine 40 mg/l. Les sources de carbone employées (glucose, raffinose) ont été utilisées à 2% final, lorsque le milieu contient du raffinose il est stérilisé par filtration afin de prévenir son clivage qui libérerait du glucose, du galactose et du fructose. Le milieu SD correspond à du milieu synthétique YNB contenant 2% de glucose. Le milieu SRaff correspond à du milieu YNB auquel est ajouté 2% de raffinose. Le milieu SC correspond à du milieu SD supplémenté par un mélange d'acides aminés : arginine (20µg/ml), acide aspartique (100 µg/ml), d'acide glutamique (100 µg/ml), de méthionine (20 µg/ml), de phénylalanine (50 µg/ml), de sérine (375 µg/ml), de thréonine (200 µg/ml), tyrosine (30 µg/ml) et de valine (150 µg/ml). Les milieux solides ont été obtenus par ajout au milieu liquide de 22.5 g/l d'agar. Le milieu utilisé pour induire la sporulation des diploïdes est composé d'acétate de potassium 1 g/l final ajouté extemporanément à de l'agar 22.5 g/l. Le milieu de sporulation doit également supplémenter les auxotrophies des diploïdes, les suppléments ont été ajoutés à la moitié des concentrations habituelles. N.B: Les données présentées dans l'ensemble des figures ont été réalisées en milieu SD casa (sauf précisions).

Ajout des molécules PRPP dépendantes. L'adénosine et l'uridine ont été ajoutées au milieu chacune à 300 µM final ; le NmR à 100 µM final ; l'histidine et le tryptophane dans leurs concentrations habituelles soit : 200 µM.

Souches.

Souches bactériennes : Les clonages plasmidiques ont été réalisés dans la souche d'*Escherichia coli* DH5α [*endA1*, *hsdR17* (*r⁻m⁺*), *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA*, *re1A1*, *deoR*, *ΔlacU169* [*Φ80dlacΔ* (*lacZ*)M15]]

Souches de levures : Les souches utilisées dans cette étude sont issues d'une collection de 4787 souches isogéniques à BY4741 (*MATa*, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *met15Δ0*, *ura3Δ0*) ou BY4742 (*MATα*, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *lys2Δ0*, *ura3Δ0*), fournies par Euroscarf.

Obtention de mutants multiples : Les combinaisons de mutants sont obtenues par croisement des souches de signe sexuel opposé. Les diploïdes sont sélectionnés sur milieu sélectif, puis un mélange de 2 à 3 clones diploïde est passé sur milieu de pré sporulation (YP 20% glucose) à 25°C sur la journée ou à 30°C sur la nuit. La sporulation est ensuite induite en plaçant les cellules ~5 jours sur milieu de sporulation (ACK + suppléments d'auxotrophie) à 25°C. La méiose aboutit à la formation d'un asque contenant 4 spores haploïdes. Après vérification de la présence d'asques au microscope, celles-ci sont incubées dans 20 µl Glucanex (10 mg/ml Novo Nordisk Ferment Ltd) durant 5 à 10 min à 30°C. La réaction est stoppée par ajout de 100 µl d'eau stérile. Des gouttes de la préparation ont été déposées sur du milieu YPD solide coulé dans des boîtes de Pétri (Falcon). Les spores ont ensuite été séparées et ordonnées à l'aide d'un micro-manipulateur Singer instrument MSM. La boîte est placée à 30°C. Une fois les spores poussées elles ont été vérifiées par PCR en utilisant un oligonucléotide situé dans la cassette KanMX4 et un oligonucléotide complémentaire au promoteur du gène interrompu. Il est à noter que le mutant *sir2* est stérile. Afin de réaliser des combinaisons de mutants avec *sir2*, nous avons transformé au préalable la souche *sir2* avec un plasmide à l'origine de réplication 2µ contenant le gène *SIR2*.

Les combinaisons de mutants obtenus par intégration de la cassette *HIS3* au locus du gène *RPA49*, ont été obtenus par transformation des souches avec un amplicon issu de l'amplification par les oligonucléotides N°3108 (cgacgccaattagcaatactg) et N°3109 (ctattgtacatatgtatcttctcag) sur de l'ADN génomique extrait de la souche SL107-3B nous ayant été gracieusement donnée par Mr. Werner. Les clones prototrophes pour l'histidine sont ensuite vérifiés par PCR à l'aide des oligonucléotides N°3109 et N°3107 (ttcttagcttggtggcgttg).

Test de prolifération sur milieu solide, dit « test en gouttes ».

Ce test permet de comparer la prolifération de différentes souches. Les cultures en phase exponentielle de croissance ont été suspendues dans de l'eau stérile à DO = 1 à 600 nm, une densité optique de DO = 1 correspond à $\sim 2 \times 10^7$ cellules/ml. A partir de cette suspension des dilutions en série d'un facteur 10 ont été réalisées de telle façon qu'*in fine* des gouttes (10 µl) de ces dilutions ont été déposées sur milieu solide allant d'une DO = 1 à DO = 0.001 à 600 nm. Les boîtes sont ensuite placées à 30°C.

Plasmides.

Le gène de levure *S. cerevisiae* *SIR2* a été cloné dans un plasmide de réplication autonome contenant l'élément centromérique CEN (pCM189) et dans un plasmide « copie multiple » contenant l'origine de réplication 2µ (pCM190) (plasmides fournis par Euroscarf). Ces plasmides contiennent tous deux le gène *URA3* comme marqueur de sélection. Le gène *SIR2* a été amplifié par PCR à l'aide d'un couple d'oligonucléotide (N° 2536 ACTGAAGCTTCGCGATGATGTTCCGATCGG et N° 2537 CGGGGTACCGATTCTGAGGCTATACCACC) sur ADN génomique de levure. L'amplicon a été purifié à l'aide d'un kit d'extraction Fermentas *genejet* et digéré par HINDIII et KPNI puis cloné dans les plasmides eux-mêmes digérés par les mêmes enzymes.

Le gène de *E. coli* *PRSA* a été amplifié par PCR à l'aide du couple d'oligonucléotide suivant : N°2278 CGCGGATCCAAGATGCCTGATATGAAGCTTTTTGC et N°2279 CGCGGATCCAAGATGCCTGATATGAAGCTTTTTGC. L'amplicon a par la suite été digéré par BamHI et NotI avant d'être cloné dans un plasmide de levure contenant une origine de réplication 2µ (pCM190) ouvert par les mêmes enzymes de digestion.

Extraction de métabolites et séparation par chromatographie ionique haute performance.

Les métabolites ont été extraits par de l'éthanol bouillant (Canelas AB et *al.* 2009). L'équivalent de 25 unité D.O (à 600 nm) sont passés rapidement par aspiration sur filtre polyamide (pores de 0.45 μm *sartorius stedim*), le filtre est rincé immédiatement avec 20 ml d'eau à 5°C. Une fois rincé le filtre est immédiatement plongé dans un tube Pyrex contenant 5 ml d'un mélange 75 % éthanol / 25 % HEPES 10 mM PH 7.2, tube qui est alors plongé dans un bain marie chauffé à 80°C durant 2 min avant d'être plongé dans de la glace durant au moins 5 min. Le filtre est alors retiré du tube qui est alors placé sur un évaporateur équipé d'un bain marie chauffé à 65°C afin d'accélérer l'évaporation. Une fois l'échantillon séché, le tube peut être placé à -20°C plusieurs jours si nécessaire. Les métabolites sont séparés sur ICS3000 *chromatography station* (Dionex, Sunnyvale, CA) et détectés par un détecteur UV à barrettes de diode (*Ultimate 3000 RS*, Dionex). Les métabolites sont séparés sur colonne carbopacPA1 (250 $\times$ 2 mm; Dionex) via un gradient d'acétate de sodium (de 300 à 800 mM) dans 50 mM NaOH à 0.25 ml/min comme décrit par Laporte et *al.*, 2011. Les pics ont été identifiés par leur temps de rétention d'une part et par co-injection de standards ou par leur spectre UV fonction de leurs propriétés chimiques. La détermination du volume médian de la population de cellule au moment de l'extraction de métabolites permet la détermination de la concentration intracellulaire.

Détermination de la distribution des volumes d'une population de cellules.

Détermination de « routine » du profil de volume d'une population de cellules : La distribution des volumes des cellules se fait par dilution de 100 μl de culture dans 10ml d'ISOTON II fournit par Beckman Coulter. Les cellules analysées sont maintenues en phase exponentielle de croissance durant 24 à 48 h. 100 μl de cette dilution sont analysés par un compteur de cellule (Counter Multisizer 4 de Beckman Coulter). Par ce mode de mesure il est possible d'obtenir rapidement ($\sim 1\text{min}$ par échantillon) une évaluation fiable de la distribution des volumes d'une population d'au moins 20000 particules. Cette méthode ne peut en revanche donner des informations sur d'éventuelles sous populations inhérentes à une condition particulière et n'ai ainsi en aucun cas un substitut aux approches de microscopie mais bien un outil complémentaire. La détermination du volume médian d'une population de cellules se fait à l'aide du logiciel « Multi4 » fournit par Beckman Coulter. Nous intégrons pour cela l'ensemble des particules comprises entre 10 et 300 μm^3 de volume. L'utilisation de médiane permet de pondérer la reproductibilité d'un phénotype, pour cela nous indiquons une variation à la moyenne de plusieurs mesures.

Traitement à la nicotinamide : la nicotinamide est utilisée en condition standard à 100 μM pour des cultures liquides en phase exponentielle de croissance, mais provoque un effet sur des cellules sauvages dès 20 μM . Nous l'utilisons sur des cultures restées en phase exponentielles de croissance durant 48H, cultures que nous diluons à DO $\sim 0,13$ à 600 nm avec ou sans Nam 100 μM à 30°C. Les mesures de volume sont ensuite réalisées 8h plus tard.

Traitement à la diazaborine : Le traitement à la diazaborine s'effectue par un traitement sur la nuit sur des cultures maintenues en phase exponentielles de croissance ~ 36 h et qui sontensemencées avec ou sans 0,5 mg/ml de diazaborine de façon à obtenir 15 h plus tard une D.O de 1.

Extraction et dosage du PRPP

Extraction : la méthode pour extraire le PRPP est dérivée de celle utilisée pour extraire les métabolites par éthanol bouillant à la seule différence qu'ici les cellules ont été immédiatement rincées avec 20 ml d'un mélange 60 % méthanol / 40 % HEPES 10mM pH

7.2 maintenu au froid à -80°C (la solution doit être alors à ~ -50°C ; ce mélange peut être placé dans un bain d'éthanol refroidi par de la carboglace).

Dosage de la teneur des échantillons en PRPP : les tubes contenant les culots des échantillons sont sortis sur glace et les culots sont repris dans 400 µl d'eau pure milliQ. Une fois repris, l'échantillon est centrifugé 2 min à 21000 g, le surnageant est alors délicatement prélevé et centrifugé de nouveau 4 min à 21000 g. le surnageant est prélevé réparti en deux tubes : un stocké à -20°C et un contenant 50 µl d'échantillon en vue de l'essai enzymatique. Le PRPP est en effet dosé par réaction enzymatique faisant intervenir l'HGPRT (l'Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase), qui réalise le transfert du groupement 5-phosphoribosyl du PRPP sur une base purique, telle que l'hypoxanthine ou la 6-mercaptopurine que nous utilisons ici. Le produit de la réaction est en effet, en raison de ses propriétés chimiques, résolues à 316 nm dans une zone dénuée de molécules, une meilleure quantification est alors possible. L'HGPRT est produite et purifiée par le laboratoire d'après *Lecoq et al., 2000*. Le mélange réactionnel comprend l'échantillon dilué 2 fois par du tampon de réaction et 2 µl d'HGPRT purifiée. Le tampon de réaction comprend (concentration finale de la réaction): TRIS 0.1 M ; DTT 4 mM ; MgCl₂ 10 mM ; 6-mercaptopurine 100 µM. Durant l'essai enzymatique le tube est placé 1H30 à 30°C. Une fraction de la réaction est alors analysée par HPLC comme décrit dans *Lecoq et al., 2001*. La concentration du PRPP contenu dans l'échantillon est déterminée à partir de l'aire du pic du produit formé 6-mercaptopurinemonophosphate et d'une gamme de PRPP.

Préparation du NmR.

Le NmR est préparé comme décrit par *Bieganski and Brenner, 2004*, par déphosphorylation enzymatique du NMN avec une phosphatase alcaline.

Durée de vie répllicative.

La durée de vie répllicative correspond au nombre de cellules filles qu'est capable de produire une cellule avant d'entrer en sénescence. Cette durée de vie est déterminée sur boîte par la séparation et le dénombrement des cellules filles de leur mère à l'aide d'un micro manipulateur Singer Instrument MSM (d'après Stephen et *al.*, 2009). La souche à tester est sortie du stock -80°C et étalée immédiatement sur boîte YPD de manière à obtenir des colonies isolées, ce qui nécessite ~48 h à 30°C. Un mélange de colonies isolées est alors étalé 24 h sur le milieu correspondant à la condition finale, YPrff ou YPD + Nam par exemple. A la fin de ces 24H de « pré-incubation » des levures ont été prélevées et étalées sur la boîte finale laissée ensuite à 25°C sur la nuit. Le lendemain des cellules ont été isolées de ce dépôt et l'expérience peut débuter. Cette expérience nécessite l'obtention de cellules vierges, d'autre part Kennedy et *al.*, 1994 ont mis en avant que les cellules filles de *S. cerevisiae* présentaient une durée de vie répllicative différente qu'elles soient issues des premières divisions de leur mère ou de ses dernières divisions. Pour nous en départir, nous avons sélectionné les premières cellules filles d'une cellule vierge. Pour cela nous isolons des cellules du dépôt, nous plaçons la boîte à 30°C, une fois ces cellules ayant données des cellules filles nous conservons ces cellules filles et nous remplaçons la boîte à 30°C. Une fois encore nous prélevons les cellules filles (~50/boîte) qui correspondront alors à la population de départ, N = 100%. La boîte est alors remplacée à 30°C et est régulièrement contrôlée afin d'éviter des situations où la cellule mère aurait bourgeonné et produit plus de 2 cellules filles. Les premiers événements de divisions sont plus court (~45 min) que les derniers (~120 à 240 min) et nécessite une surveillance accrue. Les boîtes ont été placées à 4°C durant la nuit. Pour les expériences de durée de vie réplactives en présence de Nam nous avons utilisé 500 µM de la molécule, cette concentration provoque sur boîte une augmentation de la taille des cellules

d'une souche sauvage de l'ordre de ~20%, un effet comparable à celui obtenu en milieu liquide sur une souche sauvage.

Analyses transcriptomiques.

Les données de microarray d'ADN ont été réalisées comme décrit dans Breton et *al.*, 2008. Les ARNs ont été extraits à partir de cultures maintenues 48 h en phase exponentielle puis traitées ou non par 100 μ M de NmR.

Analyses par microscopie

Les analyses de microscopie ont été réalisées sur une souche isogénique à BY4742 exprimant les marqueurs suivant : *MYO1-GFP-HIS3* ; *SPC42-mRFP1-KANMX4* ; *HTB1-3xCFP-LEU2* ; répertoriée au numéro N°7048. Cette souche a été obtenue par croisement de la souche N°3569 et de la souche N°3045 portant respectivement les marqueurs *SPC42-mRFP1-KANMX4* et *MYO1-GFP-HIS3*, puis par le croisement d'un descendant de ce croisement portant les deux marqueurs de fluorescence avec la souche N°6810 exprimant le marqueur *HTB1-3xCFP-LEU2*. L'expression des marqueurs de fluorescence est contrôlée par microscopie dans les descendants issus de la sporulation du diploïde ainsi formé.

BIBLIOGRAPHIE

YII BIBLIOGRAPHIE.

A

Adams J, Hansche PE. **Population studies in microorganisms. I. Evolution of diploidy in *Saccharomyces cerevisiae*.** Genetics. 1974 Feb;76(2):327-38.

B

Bähler J, Pringle JR. **Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis.** Genes Dev. 1998 May 1;12(9):1356-70.

Baker BJ, Tyson GW, Webb RI, Flanagan J, Hugenholtz P, Allen EE, Banfield JF. **Lineages of acidophilic archaea revealed by community genomic analysis.** Science. 2006

Baserga R. **The Biology of Cell Reproduction.** Harvard University Press, Cambridge, MA, 1985 p. 251.

Bedalov A, Hirao M, Posakony J, Nelson M, Simon JA. **NAD⁺-dependent deacetylase Hst1p controls biosynthesis and cellular NAD⁺ levels in *Saccharomyces cerevisiae*.** Mol Cell Biol. 2003 Oct;23(19):7044-54.

Belenguer P, Pelloquin L, Oustrin ML, Ducommun B. **Role of the fission yeast nim 1 protein kinase in the cell cycle response to nutritional signals.** Biochem Biophys Res Commun. 1997 Mar 6;232(1):204-8.

Belenky P, Racette FG, Bogan KL, McClure JM, Smith JS, Brenner C. **Nicotinamide riboside promotes Sir2 silencing and extends lifespan via Nrk and Urh1/Pnp1/Meu1 pathways to NAD⁺.** Cell. 2007 May 4;129(3):473-84:

Bernhardt TG, de Boer PA. **SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*.** Mol Cell. 2005 May 27;18(5):555-64.

Bitterman KJ, Anderson RM, Cohen HY, Latorre-Esteves M, Sinclair DA. **Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1.** J Biol Chem. 2002 Nov 22;277(47):45099-107.

Brooks RF. **Continuous protein synthesis is required to maintain the probability of entry into S phase.** Cell. 1977 Sep;12(1):311-7

de Bruin RA, McDonald WH, Kalashnikova TI, Yates J 3rd, Wittenberg C. **Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5.** Cell. 2004 Jun 25;117(7):887-98.

C

Carter BL, Sudbery PE. **Small-sized mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.** Genetics. 1980 Nov;96(3):561-6.

Cavalier-Smith T. **Economy, speed and size matter: evolutionary forces driving nuclear genome miniaturization and expansion.** Ann Bot. 2005 Jan;95(1):147-75.

Chien AC, Hill NS, Levin PA. **Cell size control in bacteria.** Curr Biol. 2012 May 8;22(9):R340-9.

Colman-Lerner A, Chin TE, Brent R. **Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates.** Cell. 2001 Dec 14;107(6):739-50.

Cross FR. **Starting the cell cycle: what's the point?** Curr Opin Cell Biol. 1995 Dec;7(6):790-7.

de la Cova C, Abril M, Bellosta P, Gallant P, Johnston LA. **Drosophila myc regulates organ size by inducing cell competition.** Cell. 2004 Apr 2;117(1):107-16.

Di Como CJ, Chang H, Arndt KT. **Activation of CLN1 and CLN2 G1 cyclin gene expression by BCK2.** Mol Cell Biol. 1995 Apr;15(4):1835-46.

D

Delaney JR, Murakami CJ, Olsen B, Kennedy BK, Kaerberlein M. **Quantitative evidence for early life fitness defects from 32 longevity-associated alleles in yeast.** Cell Cycle. 2011 Jan 1;10(1):156-65.

Downward J. **Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt.** Curr Opin Cell Biol. 1998 Apr;10(2):262-7.

F

Fabrizio P, Pozza F, Pletcher SD, Gendron CM, Longo VD. **Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast.** Science. 2001 Apr 13;292(5515):288-90.

Fankhauser G. **Maintenance of normal structure in heteroploid salamander larvae, through compensation of changes in cell size by adjustment of cell number and cell shape.** J Exp Zool. 1945 Dec;100:445-55.

Fantes PA, Grant WD, Pritchard RH, Sudbery PE, Wheals AE. **The regulation**

of cell size and the control of mitosis. J Theor Biol. 1975 Mar;50(1):213-44.

Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. **Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E.** Genes Dev. 2002 Jun 15;16(12):1472-87.

Fraser RS, Nurse P. **Altered patterns of ribonucleic acid synthesis during the cell cycle: a mechanism compensating for variation in gene concentration.** J Cell Sci. 1979 Feb;35:25-40.

G

Garí E, Volpe T, Wang H, Gallego C, Fitcher B, Aldea M. **Whi3 binds the mRNA of the G1 cyclin CLN3 to modulate cell fate in budding yeast.** Genes Dev. 2001 Nov 1;15(21):2803-8.

Goranov AI, Cook M, Ricicova M, Ben-Ari G, Gonzalez C, Hansen C, Tyers M, Amon A. **The rate of cell growth is governed by cell cycle stage.** Genes Dev. 2009 Jun 15;23(12):1408-22.

Gulliver G. **Observations on the sizes and shapes of the red corpuscles of the blood of vertebrates, with drawings of them to a uniform scale, and extended and revised tables of measurements.** Proc. Zool. Soc. Lond 1875:474-495.

H

Haeusser DP, Garza AC, Buscher AZ, Levin PA. **The division inhibitor EzrA contains a seven-residue patch required for maintaining the dynamic nature of the medial FtsZ ring.** J Bacteriol. 2007 Dec;189(24):9001-10.

Harvey SL, Kellogg DR. **Conservation of mechanisms controlling entry into mitosis: budding yeast wee1 delays entry into mitosis and is required for cell size control.** Curr Biol. 2003 Feb 18;13(4):264-75.

Hartwell LH, Unger MW. **Unequal division in *Saccharomyces cerevisiae* and its implications for the control of cell division.** J Cell Biol. 1977 Nov;75(2 Pt 1):422-35.

Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR, Reid BJ. **Genetic control of the cell division cycle in yeast.** Science. 1974 Jan 11;183(4120):46-51.

Henery CC, Bard JB, Kaufman MH. **Tetraploidy in mice, embryonic cell number, and the grain of the developmental map.** Dev Biol. 1992 Aug;152(2):233-41.

Hernando Y, Carter AT, Parr A, Hove-Jensen B, Schweizer M. **Genetic analysis and enzyme activity suggest the existence of more than one minimal functional unit capable of synthesizing phosphoribosyl pyrophosphate in *Saccharomyces cerevisiae*.** J Biol Chem. 1999 Apr 30;274(18):12480-7.

Horiguchi G, Fujikura U, Ferjani A, Ishikawa N, Tsukaya H. **Large-scale histological analysis of leaf mutants using two simple leaf observation methods: identification of novel genetic pathways governing the size and shape of leaves.** Plant J. 2006 Nov;48(4):638-44.

J

Johnston LA, Prober DA, Edgar BA, Eisenman RN, Gallant P. ***Drosophila* myc regulates cellular growth during development.** Cell. 1999 Sep 17;98(6):779-90.

Johnston GC, Pringle JR, Hartwell LH. **Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** Exp Cell Res. 1977 Mar 1;105(1):79-98.

Johnston GC. **Cell size and budding during starvation of the yeast**

***Saccharomyces cerevisiae*.** J Bacteriol. 1977 Nov;132(2):738-9.

Jorgensen P, Edgington NP, Schneider BL, Rupes I, Tyers M, Fitcher B. **The size of the nucleus increases as yeast cells grow.** Mol Biol Cell. 2007 Sep;18(9):3523-32.

Jorgensen P, Rupes I, Sharom JR, Schneper L, Broach JR, Tyers M. **A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size.** Genes Dev. 2004 Oct 15;18(20):2491-505.

Jorgensen P, Tyers M. **How cells coordinate growth and division.** Curr Biol. 2004 Dec 14;14(23):R1014-27.

Jorgensen P, Nishikawa JL, Breitkreutz BJ, Tyers M. **Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast.** Science. 2002 Jul 19;297(5580):395-400.

Justice RW, Zilian O, Woods DF, Noll M, Bryant PJ. **The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation.** Genes Dev. 1995 Mar 1;9(5):534-46.

K

Kantidakis T, Ramsbottom BA, Birch JL, Dowding SN, White RJ. **mTOR associates with TFIIC, is found at tRNA and 5S rRNA genes, and targets their repressor Maf1.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jun 29;107(26):11823-8.

Kief DR, Warner JR. **Coordinate control of syntheses of ribosomal ribonucleic acid and ribosomal proteins during nutritional shift-up in *Saccharomyces cerevisiae*.** Mol Cell Biol. 1981 Nov;1(11):1007-15.

Kiyokawa H, Kineman RD, Manova-Todorova KO, Soares VC, Hoffman ES,

Ono M, Khanam D, Hayday AC, Frohman LA, Koff A. **Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1).** Cell. 1996 May 31;85(5):721-32.

Koch C, Schleiffer A, Ammerer G, Nasmyth K. **Switching transcription on and off during the yeast cell cycle: Cln/Cdc28 kinases activate bound transcription factor SBF (Swi4/Swi6) at start, whereas Clb/Cdc28 kinases displace it from the promoter in G2.** Genes Dev. 1996 Jan 15;10(2):129-41.

Koch C, Nasmyth K. **Cell cycle regulated transcription in yeast.** Curr Opin Cell Biol. 1994 Jun;6(3):451-9.

Kozłowski J, Konarzewski M, Gawelczyk AT. **Cell size as a link between noncoding DNA and metabolic rate scaling.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Nov 25;100(24):14080-5.

L

Laabs TL, Markwardt DD, Slaterry MG, Newcomb LL, Stillman DJ, Heideman W. **ACE2 is required for daughter cell-specific G1 delay in Saccharomyces cerevisiae.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Sep 2;100(18):10275-80.

Landry J, Slama JT, Sternglanz R. **Role of NAD(+) in the deacetylase activity of the SIR2-like proteins.** Biochem Biophys Res Commun. 2000 Nov 30;278(3):685-90.

Li M, Petteys BJ, McClure JM, Valsakumar V, Bekiranov S, Frank EL, Smith JS. **Thiamine biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae is regulated by the NAD⁺-dependent histone deacetylase Hst1.** Mol Cell Biol. 2010 Jul;30(13):3329-41.

Lord PG, Wheals AE. **Rate of cell cycle initiation of yeast cells when cell size is not a rate-determining factor.** J Cell Sci. 1983 Jan;59:183-201.

M

MacKay VL, Mai B, Waters L, Breeden LL. **Early cell cycle box-mediated transcription of CLN3 and SWI4 contributes to the proper timing of the G(1)-to-S transition in budding yeast.** Mol Cell Biol. 2001 Jul;21(13):4140-8.

Maheshwari **The Largest and Oldest Living Organism.** Resonance. 2005

Mayer C, Zhao J, Yuan X, Grummt I. **mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability.** Genes Dev. 2004 Feb 15;18(4):423-34.

McMillan JN, Sia RA, Lew DJ. **A morphogenesis checkpoint monitors the actin cytoskeleton in yeast.** J Cell Biol. 1998 Sep 21;142(6):1487-99.

Mitchison JM. **The growth of single cells. I. Schizosaccharomyces pombe.** Exp Cell Res. 1957 Oct;13(2):244-62.

Mnaimneh S, Davierwala AP, Haynes J, Moffat J, Peng WT, Zhang W, Yang X, Pootoolal J, Chua G, Lopez A, Trocheset M, Morse D, Krogan NJ, Hiley SL, Li Z, Morris Q, Grigull J, Mitsakakis N, Roberts CJ, Greenblatt JF, Boone C, Kaiser CA, Andrews BJ, Hughes TR. **Exploration of essential gene functions via titratable promoter alleles.** Cell. 2004 Jul 9;118(1):31-44.

Montagne J, Stewart MJ, Stocker H, Hafen E, Kozma SC, Thomas G. **Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size.** Science. 1999 Sep 24;285(5436):2126-9.

Moreno S, Nurse P, Russell P. **Regulation of mitosis by cyclic accumulation of p80cdc25 mitotic inducer in fission yeast.** Nature. 1990 Apr 5;344(6266):549-52.

Morris Q, Grigull J, Mitsakakis N, Roberts CJ, Greenblatt JF, Boone C, Kaiser CA,

Andrews BJ, Hughes TR. **Exploration of essential gene functions via titratable promoter alleles.** Cell. 2004 Jul 9;118(1):31-44.

Moseley JB, Mayeux A, Paoletti A, Nurse P. **A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast.** Nature. 2009 Jun 11;459(7248):857-60.

N

Nash R, Tokiwa G, Anand S, Erickson K, Futcher AB. **The WHI1+ gene of Saccharomyces cerevisiae tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog.** EMBO J. 1988 Dec 20;7(13):4335-46.

Neufeld TP, Edgar BA. **Connections between growth and the cell cycle.** Curr Opin Cell Biol. 1998 Dec;10(6):784-90.

Newport J, Kirschner M. **A major developmental transition in early Xenopus embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage.** Cell. 1982 Oct;30(3):675-86.

Nurse P. **Genetic control of cell size at cell division in yeast.** Nature. 1975 Aug 14;256(5518):547-51.

P

Palacios P, Vicente M, Sánchez M. **Dependency of Escherichia coli cell-division size, and independency of nucleoid segregation on the mode and level of ftsZ expression.** Mol Microbiol. 1996 Jun;20(5):1093-8.

Prescott DM. **The cell cycle and the control of cellular reproduction.** Adv Genet. 1976;18:99-177.

R

Radimerski T, Montagne J, Hemmings-Mieszczak M, Thomas G. **Lethality of**

Drosophila lacking TSC tumor suppressor function rescued by reducing dS6K signaling. Genes Dev. 2002 Oct 15;16(20):2627-32.

Rathmell JC, Vander Heiden MG, Harris MH, Frauwirth KA, Thompson CB. **In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability.** Mol Cell. 2000 Sep;6(3):683-92.

Rossow PW, Riddle VG, Pardee AB. **Synthesis of labile, serum-dependent protein in early G1 controls animal cell growth.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Sep;76(9):4446-50.

Rupes I. **Checking cell size in yeast.** Trends Genet. 2002 Sep;18(9):479-85.

Rupes I, Webb BA, Mak A, Young PG. **G2/M arrest caused by actin disruption is a manifestation of the cell size checkpoint in fission yeast.** Mol Biol Cell. 2001 Dec;12(12):3892-903.

S

Schaechter M, Maaloe O, Kjeldgaard NO. **Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of Salmonella typhimurium.** J Gen Microbiol. 1958 Dec;19(3):592-606.

Schmidt EE, Schibler U. **Cell size regulation, a mechanism that controls cellular RNA accumulation: consequences on regulation of the ubiquitous transcription factors Oct1 and NF-Y and the liver-enriched transcription factor DBP.** J Cell Biol. 1995 Feb;128(4):467-83.

Sherr CJ, Roberts JM. **Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases.** Genes Dev. 1995 May 15;9(10):1149-63.

Shilo B, Riddle VG, Pardee AB. **Protein turnover and cell-cycle initiation in yeast.** Exp Cell Res. 1979 Oct 15;123(2):221-7.

Speakman JR. **Body size, energy metabolism and lifespan.** J Exp Biol. 2005 May;208(Pt 9):1717-30.

Sveiczzer A, Tyson JJ, Novak B. **A stochastic, molecular model of the fission yeast cell cycle: role of the nucleocytoplasmic ratio in cycle time regulation.** Biophys Chem. 2001 Aug 30;92(1-2):1-15.

T

Tanny JC, Kirkpatrick DS, Gerber SA, Gygi SP, Moazed D. **Budding yeast silencing complexes and regulation of Sir2 activity by protein-protein interactions.** Mol Cell Biol. 2004 Aug;24(16):6931-46.

Tessier, G. **Biometrie de la cellule.** Tabulae Biologicae 1939 19, 1–64.

Tyers M. **Cell cycle goes global.** Curr Opin Cell Biol. 2004 Dec;16(6):602-13.

Tyers M, Tokiwa G, Futcher B. **Comparison of the Saccharomyces cerevisiae G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins.** EMBO J. 1993 May;12(5):1955-68.

Tyers M, Tokiwa G, Nash R, Futcher B. **The Cln3-Cdc28 kinase complex of S. cerevisiae is regulated by proteolysis and phosphorylation.** EMBO J. 1992 May;11(5):1773-84.

U

Unger MW, Hartwell LH. **Control of cell division in Saccharomyces cerevisiae by methionyl-tRNA.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1976 May;73(5):1664-8.

W

Wang H, Carey LB, Cai Y, Wijnen H, Futcher B. **Recruitment of Cln3 cyclin to promoters controls cell cycle entry via histone deacetylase and other targets.** PLoS Biol. 2009 Sep;7(9):e1000189.

Weart RB, Lee AH, Chien AC, Haeusser DP, Hill NS, Levin PA. **A metabolic sensor governing cell size in bacteria.** Cell. 2007 Jul 27;130(2):335-47.

Wilson E. B. **The Cell in Development and Heredity** 1925 (Macmillan, New York).

Wijnen H, Landman A, Futcher B. **The G(1) cyclin Cln3 promotes cell cycle entry via the transcription factor Swi6.** Mol Cell Biol. 2002 Jun;22(12):4402-18.

Wu CY, Rolfe PA, Gifford DK, Fink GR. **Control of transcription by cell size.** PLoS Biol. 2010 Nov 2;8(11):e1000523.

X

Xu Z, Norris D. **The SFP1 gene product of Saccharomyces cerevisiae regulates G2/M transitions during the mitotic cell cycle and DNA-damage response.** Genetics. 1998 Dec;150(4):1419-28.

Xu T, Wang W, Zhang S, Stewart RA, Yu W. **Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the Drosophila lats gene encodes a putative protein kinase.** Development. 1995 Apr;121(4):1053-63.

Z

Zhang H, Stallock JP, Ng JC, Reinhard C, Neufeld TP. **Regulation of cellular growth by the Drosophila target of rapamycin dTOR.** Genes Dev. 2000 Nov 1;14(21):2712-24.

Zhao Y, Sohn JH, Warner JR. **Autoregulation in the biosynthesis of ribosomes.** Mol Cell Biol. 2003 Jan;23(2):699-707.

ANNEXES

ANNEXE :

Listes des gènes comparées au chapitre 1.

Cf. figures 7A et 9AB

<i>this study</i>	<i>from Li et al. 2010</i>
Gènes réprimés par le NmR cf figure 7A <i>at least 2 fold repressed</i>	Gènes réprimés par la Nam cf figure 7A et 9 <i>at least 2 fold repressed</i>
AGA1	AGA1
AGA2	AGA2
ASG7	ASG7
AXL1	AXL1
BAR1	BAR1
DDR2	FAR1
FAR1	FUS1
FUS3	FUS3
GPA1	GPA1
HO	HO
ICS2	ICS2
MFA1	MFA1
MFA2	MFA2
NDJ1	NDJ1
NEJ1	NEJ1
RDH54	PRM1
RME1	PRM6
SST2	RDH54
STE14	RME1
STE18	SRD1
STE2	SST2
STE4	STE18
STE5	STE2
STE6	STE4
TEC1	STE5
YDR102C	STE6
YGL193C	TEC1
YJR087W	YBL005W-A
YLR042C	YDR261C-D
ZRT1	YGR109W-B
ZRT2	YIL082W-A
	YLR042C
	YNL146C-A

ANNEXE (suite)

from Wu et al 2010	from Bedalov et al. 2003
signature de taille cf figure 9B <i>at least 2 fold repressed</i>	Gènes réprimés dans un mutant <i>sir2</i> cf figure 9 <i>at least 2 fold repressed</i>
AGA1 AGA2 BAR1 CWP2 DDR48 FLO11 FRE4 FUS1 FUS3 GIC2 GPA1 GYP8 HO MFA1 MFA2 MSB2 NDJ1 RPY2 RSN1 SST2 STE2 STE4 STE6 SVS1 YLR040C YLR042C	AGA1 AGA2 ASG7 BAR1 FAR1 FUS1 FUS3 HO HSP30 INO1 MFA1 MFA2 NDJ1 RME1 SIR2 SST2 STE14 STE2 STE4 STE5 STE6 TEC1 YAR009C YAR010C YBL005W-A YBL101W-B YBR012W-A YCL019W YDR170W-A YER138C YFL002W-A YGL193C YIL082W-A YJR026W YJR027W YJR028W YLR035C-A YML039W YML040W YMR046C YMR051C

