

Université de Montréal

**Le vieillissement chronologique
de *Schizosaccharomyces pombe*
Implication des voies de détection du glucose**

par

Antoine, Emile Roux

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en biochimie

Avril 2009

© Antoine, Emile Roux 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Le vieillissement chronologique de *Schizosaccharomyces pombe*
Implication des voies de détection du glucose

présentée par :
Antoine, Emile Roux

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Christian Baron, président-rapporteur
Dr. Luis Rokeach, directeur de recherche
Dr. Pascal Chartrand, co-directeur
Dr. Gerardo Ferbeyre, co-directeur
Dr. Pierrette Gaudreau, membre du jury
Dr. Matt Kaeberlein, examinateur externe
Dr. Nathalie Grandvaux, Représentant du doyen de la FES

Résumé

La première augmentation de la longévité en laboratoire fût observée à la suite d'une intervention nutritionnelle consistant en une réduction de l'apport alimentaire chez le rat. Plus tard, ce phénomène a été reproduit dans de très nombreuses espèces et référé en tant que restriction calorique. Le développement des techniques de biologie moléculaire moderne a permis de montrer dans des organismes modèles simples que cette flexibilité du processus de vieillissement était régulée par des facteurs génétiques. De fait, plusieurs mécanismes cellulaires ont alors pu être identifiés comme responsables de ce contrôle du vieillissement. Ces voies de régulation ont révélées être conservées entre les espèces, depuis les levures jusqu'aux organismes multicellulaires tels que le nématode, la mouche ou la souris, suggérant l'existence d'un programme universel de vieillissement dans le vivant.

La levure s'est avéré à plusieurs reprises être un modèle puissant et fiable pour la découverte de gènes impliqués dans ce phénomène. Mon étude a consisté au développement d'un nouveau modèle unicellulaire d'étude du vieillissement à travers l'espèce *Schizosaccharomyces pombe* appelée aussi levure à fission. La première étape de mon travail a montré que les voies de détection des nutriments gouvernées par la sérine/thréonine protéine kinase A (Pka1) et la sérine/thréonine kinase Sck2 contrôlent le vieillissement chronologique de ces cellules comme il était connu dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ceci permit de valider l'utilisation de la levure à fission pour l'étude du vieillissement. Ensuite, nous avons analysé plus en détail l'effet pro-voillissement du glucose en étudiant le rôle de sa détection par le récepteur membranaire Git3 couplé à la protéine G (Gpa2) en amont de la kinase Pka1. La perte du signal du

glucose par la délétion de *Git3* imite partiellement l'effet d'augmentation de longévité obtenu par baisse de la concentration en glucose dans le milieu. De plus, l'effet néfaste du signal du glucose est maintenu en absence de tout métabolisme du glucose suite à la mutation des hexokinases, premières enzymes de la glycolyse. L'ensemble de ces résultats suggèrent que la signalisation du glucose est prédominante sur son métabolisme pour son effet pro-vieillessement. D'autre part, à la fois la suppression de cette signalisation et la baisse de niveau de glucose disponible allongent la durée de vie en corrélation avec une augmentation de la résistance au stress, une hausse d'activité mitochondriale et une baisse de production de radicaux libres. Finalement, le criblage d'une banque de surexpression d'ADNc a permis d'identifier plusieurs gènes candidats responsables de ces effets en aval de la voie de signalisation *Git3/PKA*.

La recherche sur les mécanismes moléculaires du vieillissement propose une nouvelle approche, un nouvel angle de vue, pour la compréhension des fonctions cellulaires et promet d'apporter de précieuses clefs pour mieux comprendre certaines maladies. En effet, le vieillissement est la première cause d'apparition de nombreuses affections comme les cancers, les maladies cardiovasculaires et métaboliques ou les maladies neurodégénératives tels que les syndromes d'Alzheimer et de Parkinson.

Mots-clés : vieillissement, longévité, levure, schizosaccharomyces pombe, phase stationnaire, pka, sck2

Abstract

The first increase in life span due to man's intervention was obtained with rats subjected to a diet reduced in calorie intake. Later, this phenomenon was repeated with many other species and referred as diet restriction or calorie restriction. The development of modern Molecular Biology approaches and the use of simple model organisms demonstrated that the rate of aging was regulated by genetic traits. Indeed, several cellular mechanisms were identified as responsible for the control of aging. These regulatory pathways appear to be conserved throughout species, from yeast to multicellular organisms like nematode, fly and mice, thus suggesting the existence of a universal program of aging.

Yeast proved several times to be a powerful and reliable model for discovering genes involved in the regulation of aging. My study consisted in developing *Schizosaccharomyces pombe* (also called fission yeast) as a new unicellular model to study aging. The first step of my work was to show that pathways of nutrient detection through kinases involving Pka1 and Sck2 control chronological aging in *S. pombe*, as it was previously demonstrated in *Saccharomyces cerevisiae*. This first work validated the use of fission yeast for the study of aging. Subsequently, we analysed in more detail the pro-aging effect of glucose focusing on the role of its signalling through the G-protein Gpa2-coupled membrane receptor Git3, which acts upstream of Pka1. The loss of the glucose signal due to deletion of Git3 mimics partially the effect of increasing longevity by reducing glucose in the medium. Moreover, detrimental effects of glucose signal are maintained in absence of sugar metabolism following loss of hexokinases, the first enzymes of glycolysis. Together, these results suggest that the pro-aging effects of glucose signalling are predominant over those due to metabolism of this sugar. Moreover, both obliteration of this

signalling pathway and decrease of glucose availability extend life span, and correlate with an increase in stress resistance, in mitochondrial activity and a lower production of free radicals. Finally, screening a cDNA-overexpression library allowed us to identify several genes candidates responsible for the effects on longevity downstream of Git3/Pka1.

Research in the molecular mechanisms of aging propose holds the promise to bring precious clues as to this mysterious processes affecting all living creatures, and paves the way to unravel the underlying causes of many human diseases. Indeed, aging is the first cause of numerous late-onset pathologies including cancers, cardiovascular diseases or neurodegenerative diseases like Alzheimer and Parkinson syndromes.

Keywords : aging, longevity, life span, yeast, schizosaccharomyces pombe, stationary phase, pka, sck2

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures.....	xv
Abréviations et Sigles.....	xix
Remerciements	xxii
Avant-Propos	1
Introduction	5
I. La recherche sur le vieillissement	5
1. Définition et généralités	5
2. La restriction calorique, première intervention de ralentissement du vieillissement.....	6
3. Les grandes théories du vieillissement.....	15

a)	Le vieillissement aléatoire contre le vieillissement programmé	15
b)	La théorie des radicaux libres.....	17
c)	La théorie du soma disponible.....	19
d)	L'antagonisme pléiotropique.....	19
e)	L'hormèse.....	20
4.	Finalité des études sur le vieillissement et extrapolation chez l'humain ...	21
II.	Le vieillissement des champignons unicellulaires.....	24
1.	Modèles et définitions.....	24
2.	Le vieillissement répliatif.....	28
a)	La voie de répression du glucose.....	34
b)	Les voies de signalisation des nutriments par des sérines-thréonines kinases.....	35
c)	La traduction.....	36
d)	Le contrôle de la respiration.....	36
e)	La réponse rétrograde.....	37
3.	Le vieillissement chronologique.....	38
a)	La phase stationnaire.....	38
b)	La signalisation des nutriments.....	42
c)	La résistance au stress et la maintenance.....	49
d)	La mitochondrie et la respiration.....	56
e)	L'apoptose.....	59
III.	Pertinence de l'utilisation d'un modèle fongique pour comprendre le vieillissement eucaryote.....	64
1.	Comparaison des vieillissements répliatif et chronologique.....	64
a)	Les fonctions communes.....	64
b)	Les fonctions spécifiques.....	65
2.	Comment peut-on concilier DVR et DVC ?.....	66

3.	Extrapolation aux eucaryotes multicellulaires	67
IV.	Le vieillissement chez <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	70
1.	La levure <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , modèle d'étude des cellules eucaryotes	70
2.	Récapitulatif des connaissances sur les fonctions de <i>S. pombe</i> influençant potentiellement sa longévité chronologique	71
a)	Source de carbone et entrée en phase stationnaire	71
b)	La signalisation des nutriments	76
c)	La respiration et la mitochondrie.....	79
d)	La résistance au stress.....	82
e)	L'apoptose	88
3.	L'étude du vieillissement chez <i>S. pombe</i>	90
a)	Le vieillissement réplcatif	90
b)	Le vieillissement chronologique.....	91
c)	Justification de l'utilisation de <i>S. pombe</i> pour l'étude du vieillissement.....	93
	Hypothèses de recherche et objectifs	95
	Résultats	98
	Article 1 : Regulation of chronological ageing in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> by the protein kinases Pka1 and Sck2	98
	Mise en contexte :	98
	Contributions des auteurs :	99
	Summary	101
	Introduction.....	102

Results.....	106
Chronological ageing of <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	106
The cAMP/Pka1 pathway controls longevity in stationary phase.....	108
Deletion of <i>sck2</i> increases longevity in stationary phase	108
Cell-cycle arrest of wild-type and mutant strains during stationary phase.....	109
Lower accumulation of ROS and decreased apoptosis in $\Delta pka1$, $\Delta sck2$, $\Delta pka1\Delta sck2$ long lived mutants.....	110
Longevity correlates with resistance to heat-shock and oxidative stress with $\Delta pka1$ mutant but not with $\Delta sck2$ mutant in <i>S. pombe</i>	111
Discussion	113
Experimental Procedures	118
Strains and Media	118
Disruption of <i>sck1</i> ⁺	118
Survival in stationary phase.....	119
<i>In vivo</i> staining of caspase activity	120
Flow cytometry analysis.....	120
<i>In vivo</i> staining of ROS accumulation	121
Stress Resistance in stationary phase.....	121
Acknowledgments.....	122
Figures and legends.....	123
Supplemental data	140
References.....	146

Article 2 : Pro-ageing effects of glucose signalling through a G protein-coupled glucose receptor in fission yeast..... 151

Mise en contexte :	151
Contributions des auteurs :	151
Abstract	154

Author summary	156
Introduction.....	157
Results.....	160
Growth on glucose decreases chronological life span in fission yeast.....	160
A GPCR-initiated signalling pathway mediates pro-aging effects of glucose in <i>S. pombe</i>	161
Calorie restriction and disabled glucose signalling increase respiration.....	163
Calorie restriction and disabled glucose signalling increase stress resistance. .	165
Loss of hexokinase 2 activity decreases glucose metabolism, increases glucose signalling and promotes aging.....	167
Glucose GPCR Git3p promotes aging in absence of glucose metabolism.....	168
Discussion	171
Materials and Methods.....	177
Ethics Statement	177
Media and Yeast strains.....	177
Reversion of the growth defect in glucose of $\Delta h x k 1 \Delta h x k 2$ mutants.	179
Chronological life span assays and survival.....	179
<i>In vivo</i> staining of ROS by DHR 123 and DHE	180
Oxygen and glucose consumption assays.....	181
β -Galactosidase assays	182
Oxidative stress survival and re-growth on glycerol plate	182
Mitochondrial membrane potential analysis by flow cytometry	183
Real time quantitative PCR	183
RNA extraction.....	184
Accession numbers	185
Acknowledgments.....	185
Figures.....	186
Supporting informations	200
References.....	213

Discussion	222
Les voies Git3/PKA et Sck2 régulent le vieillissement.....	222
Les métabolites du pyruvate.....	225
a. Le métabolisme mitochondrial.....	226
b. Le métabolisme cytosolique.....	227
Le métabolisme des glucides.....	228
a. Le glycérol.....	228
b. Le glucose.....	230
Rôle de la signalisation par Git3/PKA dans la restriction en glucose.....	231
Le signal du glucose par Git3/PKA et Sck2 influencerait la longévité à travers une régulation mitochondriale impliquant la chaîne de respiration	232
La résistance au stress oxydatif.....	241
Apoptose, ROS et vieillissement.....	243
Implication de la voie SAPK et de la cascade MAP Kinase Wis4/Wis1/Sty1 dans la longévité chronologique.....	244
Les effecteurs en aval de la voie Git3/PKA	247
a. Psp1	249
b. Adh1	250
c. Rpb10.....	250
d. Cka1	251
Les programmes pro-vieillessement des eucaryotes unicellulaires, un avantage évolutif ?.....	254
Conclusions et extrapolation aux eucaryotes multicellulaires.....	257
 Bibliographie	 260
 Annexes	 285

Résultats.....	285
Effet des mutants constitutifs de la voie Wis1/Sty1 sur la longévité chronologique.....	285
Criblage de surexpression pour isoler des effecteurs en aval de la voie Git3/PKA agissant sur la régulation de la respiration et de la longévité.....	287
Caractérisation de la longévité des mutants du gène <i>psp1</i> ⁺	293
Etude de profil d'expression du mutant Δ <i>sck2</i>	296
Mesure de la quantité de ROS pendant la phase logarithmique.....	297
Matériels et méthodes supplémentaires.....	298
Criblage génétique.....	298
Clonage des gènes isolées dans le criblage et mesure de la DVC.....	299
Mesure de l'accumulation des ROS en phase exponentielle.....	300
Puces à ADN de la souche Δ <i>sck2</i>	300
Références supplémentaires.....	302
Liste des contributions de l'auteur à d'autres articles que ceux inclus dans cette thèse	304
Annexe: Accord des coauteurs (Article 1).....	305
Annexe: Accord des coauteurs (Article 2).....	307

Liste des tableaux

Introduction

Tableau 1 : Liste des effets de la restriction de diète sur la longévité des espèces étudiées.	13
Tableau 2 : Enzymes de résistance au stress oxydatif de la levure à fission fonctionnant en phase stationnaire.	83

Résultats

Article 1

Table 1 : Genotypes of strains used in this study.....	137
Table 2. Maximum optical density (OD) reached by different strains in this study.....	138
Table 3. Survival at day 10 estimated by CFU counting or phloxin B staining.	139

Article 2

Supplementary Table 1. Strains used in this study presented with their genotypes and the laboratory where they were created.	212
---	-----

Discussion

Tableau 3 : Résultat du profil d'expression des gènes de résistance au stress et des gènes codés par l'ADN mitochondrial dans la souche Δ sck2 par rapport à la souche sauvage.
..... 239

Liste des figures

Introduction

Figure 1 : « La fontaine de Jouvence ».	2
Figure 2 : Fonctions impliquées dans l'augmentation de longévité par restriction calorique.	10
Figure 3 : Méthodes de mesure de la durée de vie chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
Figure 4 : Devenir d'une cellule mère dans une culture de levure vieillissante	29
Figure 5 : Durée de vie répliquative d'une cellule fille en fonction de l'âge répliquatif de sa mère.....	31
Figure 6 : Courbe de croissance de la levure à bourgeonnement.....	40
Figure 7 : Les voies de régulation de la longévité par les nutriments.....	44
Figure 8 : La voie de répression du glucose de la levure.....	47
Figure 9 : La respiration et la production de ROS dans la mitochondrie.....	51
Figure 10 : Métabolisme des ROS dans la levure.....	53
Figure 11 : Les facteurs endogènes et exogènes déclenchant l'apoptose de levure.....	60
Figure 12 : Principales voies métaboliques de la levure.....	73
Figure 13 : La voie SAPK de réponse au stress de <i>S. pombe</i>	86

Résultats

Article 1

Figure 1: Chronological life span of wild-type <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	123
--	-----

Figure 2: Differences in the estimation of cell survival followed by CFU counting or Phloxin B staining.....	125
Figure 3: Deletions of <i>sck2</i> ⁺ and <i>pka1</i> ⁺ increase survival in stationary phase.	127
Figure 4: Wild-type, $\Delta sck2$, $\Delta pka1$ and $\Delta pka1\Delta sck2$ strains in log phase and stationary phase show no major differences in their cell cycle arrest.....	129
Figure 5: Strains $\Delta pka1$, $\Delta sck2$, $\Delta pka1\Delta sck2$ show slower accumulation of ROS during stationary phase as compared to wild type.....	131
Figure 6: Caspase induction during ageing of $\Delta sck2$, $\Delta pka1$ and $\Delta pka1\Delta sck2$ strains is delayed compared to wild type.	133
Figure 7: Stress resistance of long-lived mutants in stationary phase	135
Supplemental Figure 1: Chronological life span of wild-type <i>Schizosaccharomyces pombe</i> and control in different background strains.	140
Supplemental Figure 2: Longevity curves expressed in non logarithmic scale.....	142
Supplemental Figure 3 : Phloxin B staining and fluorescence microscopy analysis of yeast cells killed by heat or sodium azide.	144

Article 2

Figure 1. Pro-ageing effects of glucose in <i>S. pombe</i>	186
Figure 2. Reduction of CLS due to glucose requires signalling via the glucose receptor and G protein.	188
Figure 3. Respiration rate is increased in both CR and in strains with defects in glucose signalling.	190
Figure 4. Correlation between longevity and stress resistance of WT <i>S. pombe</i> in CR or in mutants of the glucose-signalling pathway.	192
Figure 5. Hexokinase 2 mutant has a decreased survival and an increased glucose signalling in stationary phase.....	194
Figure 6. Git3p-dependent glucose signalling promotes aging in the absence of glucose metabolism.	196

Figure 7. A glucose-signalling pathway involved in fission yeast longevity.	198
Figure S1. Growth curves of wild type in different concentration of glucose.....	200
Figure S2. Dihydrorhodamine 123 (DHR 123) and dihydroethidium (DHE) <i>in vivo</i> staining of reactive oxygen species.	202
Figure S3. Glucose consumption according to growth of <i>gpa2^{R176H}</i> and Δ <i>git3</i> yeasts grown in 2% and 0.2% glucose.....	204
Figure S4. Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$ m) analysis by Flow cytometry on cells stained with DiOC ₆	206
Figure S5. Chronological life span of WT and Δ <i>git3</i> grown in 2% and 0.2% glucose with 20 μ g.mL ⁻¹ antimycine A (AA).....	208
Figure S6. β -Galactosidase activity of Δ <i>git3</i> and <i>gpa2R176H</i> with <i>fbp1-lacZ</i> reporter both grown in 2% and 0.2% glucose.....	210

Discussion

Figure 14 : Modèle récapitulatif de l'effet des voies de signalisation des nutriments et du glucose sur le vieillissement de <i>S. pombe</i>	223
Figure 15 : Modèle proposant que le gain de longévité associé à la faible teneur en glucose passe par une régulation des fonctions mitochondriales.	234
Figure 16 : La voie SAPK en amont d'Atf1 n'agit pas sur la durée de vie	246
Figure 17 : Fonctions possibles agissant en aval de la voie Git3/PKA et Sck2.....	252

Annexe Résultats

Annexe Figure 1 : Essai de longévité des mutants <i>wis1DD</i> et Δ <i>pyp1</i> de la voie <i>Wis4/Wis1/Sty1</i>	286
Annexe Figure 2 : modèle pour le criblage de banque de surexpression dans le mutant <i>gpa2^{R176H}</i>	289
Annexe Figure 3 : Etapes du protocole de criblage de banque.....	290

(gpa2* réfère à <i>gpa2</i> ^{R176H}).....	290
Annexe Figure 4 : Tests de longévité appliqués pendant le criblage.....	292
Annexe Figure 5 : Caractérisation de la fonction du gène <i>pspI</i> ⁺	295
Annexe Figure 6 : Comptage des cellules en fonction de leur intensité de fluorescence du DHE en phase logarithmique.	297

Abréviations et Sigles

μ : micro-, millionième d'unité (10^{-6})

adh1 : *alcohol dehydrogenase 1* (nom de gène)

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ADNr : acide désoxyribonucléique ribosomal

AMP/ADP/ATP : adénosinine mono / di / triphosphate

AMPC : adénosinine monophosphate cyclique

APC : complexe promoteur de l'anaphase (ou cyclosome)

BER : réparation de base par excision (*excision base repair*)

CFU : unités formant des colonies

ckal : *casein kinase alpha 1* (nom de gène)

CO₂ : dioxyde de carbone

coA : coenzyme A

DHE : dihydroethidium

DNP : 2,4-dinitrophénol

DO : densité optique

DVC : durée de vie chronologique

DVR : durée de vie répliquative

EMM : milieu minimum d'Edinburgh (*Edinburgh minimum medium*)

ERC : cercles extrachromosomiques d'ADN ribosomique (*extrachromosomal rDNA circles*)

FADH₂ : forme réduite de la flavine adénine dinucléotide

g : gramme(s)

GDP / GTP : guanosine di / triphosphate

gitN : Glucose insensitive transcription + Numéro associé (nom de gène)

IGF : Insulin Growth Factor

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène (formule)

IIS : signalisation de l'insuline et des homologues à l'insuline (insulin and insulin-like signaling)

L ou l : litre(s)

m : milli-, millième d'unité (10⁻³)

M : mole

MAP : protéine activée en mitose (mitogen-activated protein)

MMC : milieu minimum complété aussi nommé SDC

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide, NADH : forme réduite

OH[·] radical hydroxyle (formule)

PCR : réaction en chaîne par polymérase (polymerase chain reaction)

PEG : polyéthylène glycol

PhosOx : phosphorylation oxydative (chaîne)

PKA : protéine kinase A. Lorsqu'associée à aucun numéro, PKA réfère au complexe catalytique. Par exemple chez *S. cerevisiae*, il peut être composé de Tpk1, 2 et/ou 3 et Bcy1
psp1 : phosphorylated in stationary phase 1 appelé aussi *moc1* ou *sds23* (nom de gène)

RC : restriction calorique

RD : restriction de dîète

RE : réticulum endoplasmique

rho⁰ : cellules de levure dites *petite* dépourvue d'ADN mitochondriale, déficiente en respiration

ROS : espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species)

rpb10 : RNA polymerase binding protein 10 (nom de gène)

SAPK : protéine kinase activée par le stress (stress activated protein kinase)

sck2 : suppressor of cAMP kinase 2 (nom de gène)

SD : synthétique dextrose

SDC : milieu synthétique complété à base de dextrose (*synthetic dextrose completed*)

sty1 : *suppressor of tyrosine phosphatase 1* (nom de gène)

TCA : (cycle des) acides tricarboxyliques (*tricarboxylic acid*) ou cycle de Krebs

UV : ultraviolet

wis*N* : *win suppressing* + Numéro associé (nom de gène)

WT : souche sauvage (*wild type*)

YE : milieu à base d'extrait de levure (*yeast extract*)

Remerciements

Mes débuts à l'université étaient pour le moins mitigés, avec quelques hésitations et des résultats pas toujours au rendez-vous. J'étais capable du meilleur comme du pire. Le chemin vers le laboratoire et la « vraie » science, celle de la paillasse, était un peu trop long pour le jeune homme impatient que j'étais. Toutefois, je me suis toujours faufilé jusqu'à l'année scolaire suivante avec les notes que l'on me demandait pour avancer. Si la formation académique est loin d'être suffisante pour apporter toutes les clefs de la réussite, disons que j'ai bien travaillé le reste. Une fois mon DEA (Master) en poche, mon objectif était de m'inscrire au doctorat. J'avais aussi besoin d'un grand bol de renouveau, une grande bouffée d'air frais.

Mon saut par dessus l'Atlantique me fit atterrir entre les mains d'un trio de chercheurs, à deux tiers hispaniques et un tiers québécois. Mon entrevue avec eux en octobre 2003 n'a pas laissé l'ombre d'un doute dans mon esprit. Je serai ici entre d'excellentes mains. Par ailleurs, la ville de Montréal regorgeait aussi de charmes divers pour me séduire. Quelle bonne idée avait eu un certains Dr. Jean-Jacques Bessoul de me conseiller de regarder vers le Canada. Mon nez ne m'avait pas trompé sur le choix de mon laboratoire d'accueil car après quelques mois à Montréal, mes premières courbes de vieillissement dessinaient la vérification de nos hypothèses. *Pombe* livrait ses promesses, celles d'être un excellent modèle d'étude du vieillissement. Dans mon rêve de même, je devenais ornithologue pour étudier les oiseaux ou astrophysicien pour comprendre l'univers. Mes oiseaux se sont transformés en levure, et mes étoiles en gènes. La suite de l'histoire est écrite dans cette thèse, après comptage de milliers de colonies.

En premier lieu, je tiens à adresser un grand MERCI à Luis, Pascal et Gerardo. Luis, tu as été le premier de mes formateurs à me laisser les mains libres et à me donner l'opportunité de réaliser mes propres initiatives. Chose qu'ils ont du mal à faire dans mon pays natal. Sans ton œil de maître pour scruter la levure qui fissionne et sans ton laboratoire, rien de tout ça ne m'aurait été permis. Pascal, tu as apporté le calme indispensable dans un groupe de *sangre caliente*, avec trois autres membres du SENIL (Science ENgineering In Longevity) au tempérament latin et parfois explosif. Tes connaissances de l'autre levure furent toujours une source pour alimenter nos discussions. Ton début de carrière est un vrai modèle pour moi. Enfin Gerardo, le spécialiste du vieillissement, tu m'as enseigné à peu près tout ce que je sais sur le sujet. En vrai coach pour remonter le moral, tu m'as appris, et plus que ça, tu m'as montré la philosophie nord américaine du positivisme. Qualité indispensable en recherche, car, dit-on, le succès en laboratoire, c'est l'art de savoir gérer les échecs ! Sans aucun doute, les impulsions que tu m'as donné au long de mon doctorat ont été primordiales et par la même m'ont rendu un peu plus grand. A vous trois, je vous dis un merci venant du plus profond de mon cœur car je vous dois un doctorat en or.

Je voudrais remercier ceux qui ont supporté mon quotidien, les membres du laboratoire. Merci pour avoir ri (ou pas) à mes boutades, merci pour avoir enduré mes bourrasques, merci pour m'avoir épaulé dans mes débuts où je partais de si loin. Un grand merci aux anciens, Fadi, Cynthia, Fred et Patrick ; puis à Aurélie et Max les stagiaires qui m'ont aidé. Je veux particulièrement transmettre mes vœux d'amitié à ceux qui sont restés jusqu'au bout. Pascal qui m'a fait découvrir The Arcade Fire (je les ai rencontré !). Tu as eu notamment une idée géniale pour me permettre d'obtenir mon mutant d'hexokinases : le plasmide loss ! Et aussi pour tes jeux de mots et tes récits de GN. Je te souhaite le bonheur avec Alex et Laurence et la réussite où que tu seras. Ensuite Geneviève, la douceur incarnée, ma compagne de paillasse, toujours de bonne humeur, et la reine du clonage, je lui en dois quelques uns. Merci de m'avoir raconté le New-Brunswick avec ton langage

half-french, mi-anglais, « quo'se tu parles about ? ». Alexandre, pour les discussions enflammées sur tout et n'importe quoi : de l'origine de l'univers au dernier James Bond, merci pour les conseils aux échecs, je ne t'égalerais jamais ! Merci pour ta constance, ta bonne humeur, merci petit scarabée ! J'ajoute une attention particulière à Renée, ma sœur jumelle née le même jour et la même année que moi. Plus qu'une collègue, tu es le genre de personne avec qui je peux risquer de m'engueuler en sachant que ce serait oublié dans l'heure. Toujours là pour les bons conseils, scientifiques et surtout sentimentaux, ton soutien fût primordial quand les miens étaient trop loin. Tu es un oracle, je t'écouterai toujours. Et merci à son chum, Fred, si drôle (et poli) au téléphone. Je remercie Franck pour tous les moments passés à refaire le monde pendant l'heure du lunch, les longues soirées chez vous avec Perrine, Lot-et-garonnais, il y a que ça de vrai ! Si seulement tu jouais aussi bien au poker que tu racontes les blagues... Enfin j'aimerais adresser ma gratitude vers Sylvie Beauchemin qui nous aide si efficacement pour la partie administrative de la rédaction, ainsi qu'aux autres membres du département pour leurs aides diverses.

Je veux remercier tous mes amis : Isabelle, Benoit, Mathieu, Fanny, Mélanie, Alexandre, Martin, Laurent, Thierry, Titou et Vincent. Je ne peux pas m'étendre car j'en aurais trop à dire pour vous encenser. Je pense aussi à tous les autres qui m'ont permis de décompresser, de sortir un peu la tête de l'éprouvette quand je voyais trop de « champignons ».

Et évidemment, ma famille, c'est ce qui compte le plus pour moi. Qu'il est difficile d'être loin des siens, surtout dans les premiers temps. Sachez combien vous comptez pour moi. Ma douce et chérie mère Hélène, ma brillante sœur Perrine et mon génial frère Emile et mon père adoré. Je vous remercie pour votre soutien, vos appels hebdomadaires et vos messages électroniques. Je veux aussi témoigner mon amour pour mes grand-mères Marguerite et Janine et mon grand-père Maurice. Une famille à laquelle je suis si

reconnaissant et si fier d'appartenir ; c'est avec vous, à travers vous et aussi pour vous que je vis et que je réalise mes rêves. Aujourd'hui, j'inclus parmi eux ma tendre Annie. Tu m'as porté pendant ces mois si longs, ceux de la finition de mon dernier article et de ma rédaction. Tu formes mon inspiration, tu animes ma gaité et tu guides ma force, tu combles mes faiblesses et tu enrichies ma vie. Tu as été ma plus belle découverte de cette thèse.

à la mémoire de mon grand-père André

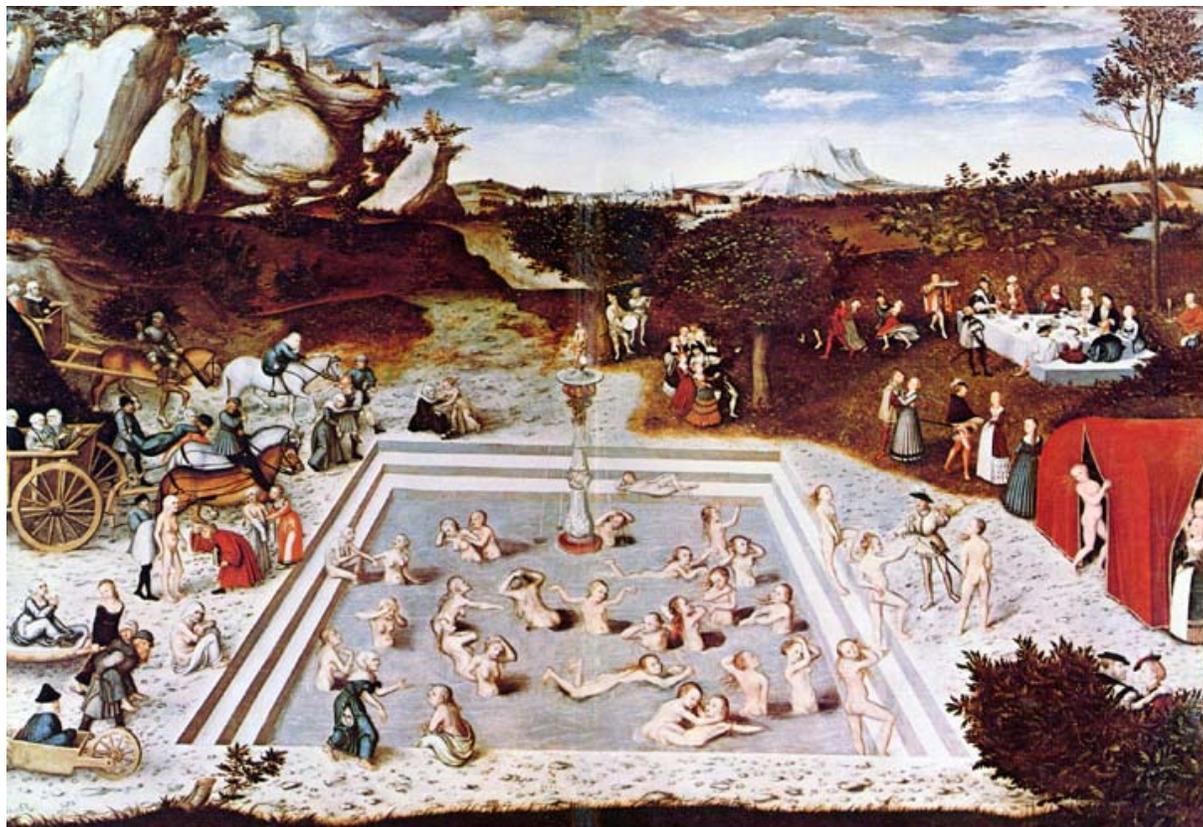
Avant-Propos

Le vieillissement a toujours fasciné et fascinera encore. Le déclin irréversible associé à la perte progressive de nos fonctions reste un sujet de préoccupation première de chaque individu. D'un point de vue culturel et religieux, dans l'Antiquité, au moyen-âge jusqu'à nos jours, de nombreux mythes ont entretenu l'espoir de l'immortalité. Le récit du mythe de Gilgamesh en Babylonie du XVIII^{ème} siècle avant Jésus-Christ retrace l'épopée de cet homme qui trouva puis perdit la plante de jouvence conférant la vie éternelle. L'Ancien Testament de la Bible raconte l'histoire de Mathusalem, ayant vécu 969 ans avant de se faire emporter par le Déluge (La Génèse (5)24-27). Au Moyen Age circulaient les légendes du Saint Graal et de la Fontaine de Jouvence attribuant immortalité à qui les trouvera. La Figure 1 représente l'œuvre d'un artiste de la Renaissance, Lucas Cranach, figurant le mythe de la Fontaine de Jouvence. Aujourd'hui encore, l'idée que l'on pourrait arrêter les effets du temps est tenace.

Malgré un manque de résultats crédibles sur leur efficacité, l'engouement pour les cures anti-âges est une réalité (Binstock, 2004). Le rêve d'une jeunesse éternelle est palpable au travers de l'utilisation des artifices de la cosmétique et de la chirurgie esthétique. De plus en plus, ce fantasme commence à être entretenu par les nouveaux progrès scientifiques, ceux de la génétique. En effet, la recherche a remplacée les mythes et légendes et peut-être même les religions pour démystifier la mort, tromper la peur et faire rêver d'immortalité.

Figure 1 : « La fontaine de Jouvence ». (« Der Jungbrunnen »), 1546, oeuvre peinte par Lucas Cranach (1472-1553) à Berlin. La fontaine de jouvence est un symbole d'immortalité par perpétuel rajeunissement. Quarante ans plus tôt, l'explorateur Juan Ponce de León partit à la découverte de cette fontaine alors qu'il découvrait le nouveau monde. Durant l'antiquité, cette légende existait déjà au travers des textes du grec Herodotus (environ 500 ans avant JC).

Figure 1



Source: www.artlurker.com/.../lucas_cranach_d_a_0071.jpg

Le philosophe contemporain français Michel Serres, dans sa réflexion sur l'*Hominescence*, un néologisme définissant le devenir et l'évolution de l'homme, écrit (Serres, 2001) :

En y accédant (à la profondeur des cellules germinales, ndlr) et manipulant les gènes, nous intervenons dans la mutation, minimisons le hasard, accélérons le temps et inventons des OGM, et peut-être des espèces ; voici revenue l' « immortalité ». (...) Nouveau temps pour d'autres vies ?

Un certain spécialiste non-conformiste appelé Aubrey de Grey prend parti des dernières avancées pour proposer des théories improbables sur une immortalité prochaine (de Grey, 2008). Il trouve une large audience à son discours parmi les néophytes. D'autres, malgré le manque évident de connaissances, commencent déjà à tester des molécules antiviellissements. Le reste des scientifiques, constituant une majorité plus sage, plus réaliste, assure que ce genre de recherche est fondamental pour comprendre les raisons de l'apparition des maladies liées à l'âge : cancers, maladies cardiovasculaire, maladie neurodégénératives, etc. C'est une nouvelle approche pour comprendre le cycle de vie d'une cellule. Mes travaux sur les mécanismes moléculaires fondamentaux du vieillissement cellulaire s'intègrent dans la mouvance d'un domaine de recherche jeune, en pleine expansion (Editorial *Cell journal*, 2005). Son compte-rendu présenté dans cette thèse propose d'en détailler les objectifs, les aboutissements et de l'intégrer dans les courants de pensées actuels au sein de cette discipline.

Introduction

I. La recherche sur le vieillissement

1. Définition et généralités

Le vieillissement est un phénomène biologique singulier. Selon Thomas Kirkwood, il s'agit du plus familier des aspects les moins connus de la biologie humaine (Kirkwood, 2005). En effet, il est difficilement comparable aux autres fonctions vitales, quelles soient à l'échelle subcellulaire ou à celle d'un organisme multicellulaire. Pensons à la transcription, la traduction, la division cellulaire, le métabolisme énergétique mais aussi aux fonctions impliquant des échanges inter-organes et inter-cellulaires comme la reproduction, la communication endocrinienne, l'immunité et le développement. En réalité, le vieillissement influence ou est influencé par tous ces processus à la fois. Et plus singulier encore, son aboutissement, la mort, est *a priori* néfaste, contraire à la plupart des fonctions cellulaires. Il semble donc légitime de se poser la question de la manière de l'appréhender : est-ce un phénomène biologique unique, sans comparaison ou une fonction comme une autre ?

A l'heure actuelle, de par la difficulté à comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents mais aussi la nature même du vieillissement et de la mort cellulaire, la

communauté scientifique s'accorde avec difficulté sur une définition. Le consensus le décrit de manière évasive comme un déclin progressif des fonctions vitales dû à une accumulation de dommages qui mènent à une plus grande vulnérabilité aux méfaits de l'environnement et aux maladies, aboutissant à la mort. D'ailleurs, probablement par cette singularité et son caractère aléatoire, la biologie du vieillissement fût longtemps jugée sans importance et reléguée en concept secondaire peu étudié (Couzin, 2004). Or, il y a une quinzaine d'années, suite à la découverte chez le nématode *Caenorhabditis elegans* et chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* de gènes et de voies de signalisation entières contrôlant la longévité (Kennedy et al., 1995; Kenyon et al., 1993), un intérêt nouveau pour l'étude du vieillissement se dessina. Depuis, les données sur le sujet se sont accumulées permettant l'émergence de nouvelles théories (Kirkwood, 2005). Pourtant, longtemps avant ces découvertes et cette popularité, certains avaient pressenti l'existence des mécanismes biologiques capables de contrôler le vieillissement en observant qu'en agissant sur l'alimentation, ils pouvaient allonger la durée de vie de plusieurs animaux.

2. La restriction calorique, première intervention de ralentissement du vieillissement

Au début du vingtième siècle, rien de ce que l'on sait de la génétique n'existait encore si ce n'est le principe fondateur de l'hérédité mendélienne. Dans ce contexte, seuls quelques érudits se hasardaient sur un terrain vierge de toutes données moléculaires pour discuter du rôle du vieillissement. Ce sera en 1934 que Mary Crowell et Clive McCay observeront l'effet de la restriction calorique sur la longévité des rats du genre *Rattus norvegicus* (McCay et al., 1935). Pour la première fois dans l'histoire, ils réussiront à

augmenter de presque deux fois la durée de vie d'un organisme par une manipulation en laboratoire.

La restriction calorique consiste en une diminution à long terme de l'apport énergétique sans atteindre la malnutrition (Kennedy et al., 2007). Cette découverte sera majeure dans le sens où elle apportait un résultat concret pour développer de nouvelles hypothèses par rapport aux idées très spéculatives de l'époque.

L'étude de McCay et collaborateur établit un lien entre la durée de vie et la rapidité de croissance des rats puisque les individus sous-alimentés étaient plus petits et arrivaient à maturité plus tard. Ce résultat confirma la thèse selon laquelle plus un organisme a un métabolisme lent, plus il vit longtemps. Le principe liant métabolisme, développement et longévité existait déjà suite aux observations que les espèces à basse température corporelle ou à métabolisme lent étaient généralement les espèces vivant le plus longtemps (Walker et al., 2005). Cette théorie circulait sous le nom de *rate-of-living* (vitesse de vie). Par la suite, les effets de la restriction calorique sur le rallongement de la durée de vie ont été vérifiés dans une autre espèce murine, la souris *Mus musculus*; des résultats récents laissent supposer une extrapolation possible aux primates (Piper et Bartke, 2008).

La restriction calorique est une intervention à effet universel puisque quasiment toutes les espèces étudiées ont eu cette même réponse d'extension de la longévité, depuis les champignons unicellulaires jusqu'aux mammifères, en passant par les invertébrés (Kennedy et al., 2007; Mair et Dillin, 2008). Les études chez des espèces plus petites et aussi différentes que la levure, le nématode et la mouche ont aussi permis d'accélérer les analyses génétiques de ce phénomène et la récolte de données (Kennedy et al., 2007). Ceci

fut aidé par la facilité de leur manipulation génétique mais aussi grâce à leur cycle de vie court, un atout majeur pour faire des recherches sur la longévité.

Il a été montré chez la levure, la drosophile et la souris qu'une baisse de la disponibilité en nutriments, comme certains acides aminés, sans modifier la valeur calorique du régime, augmentait aussi la longévité (Mair et al., 2005; Orentreich et al., 1993; Piper et Bartke, 2008; Powers et al., 2006). Dans ce genre de manipulation, on ne parle plus de restriction calorique (RC) mais on utilise le terme plus général de restriction de diète (RD), ce terme incluant tous les types d'intervention de réduction de macro- ou de micro-nutriments. Pour cette raison, je parlerai dans cette thèse de RC quand il s'agira de baisse seulement d'apport en macro-nutriments énergétiques comme le glucose. J'emploierai l'expression RD pour les autres manipulations dans l'apport nutritif touchant à des nutriments non caloriques et agissant sur la longévité. Ainsi, les effets d'allongement de la vie par restriction alimentaire sont possibles avec plusieurs types de diètes (Piper et Bartke, 2008), par exemple, on en compte jusqu'à huit chez le nématode (Greer et al., 2007).

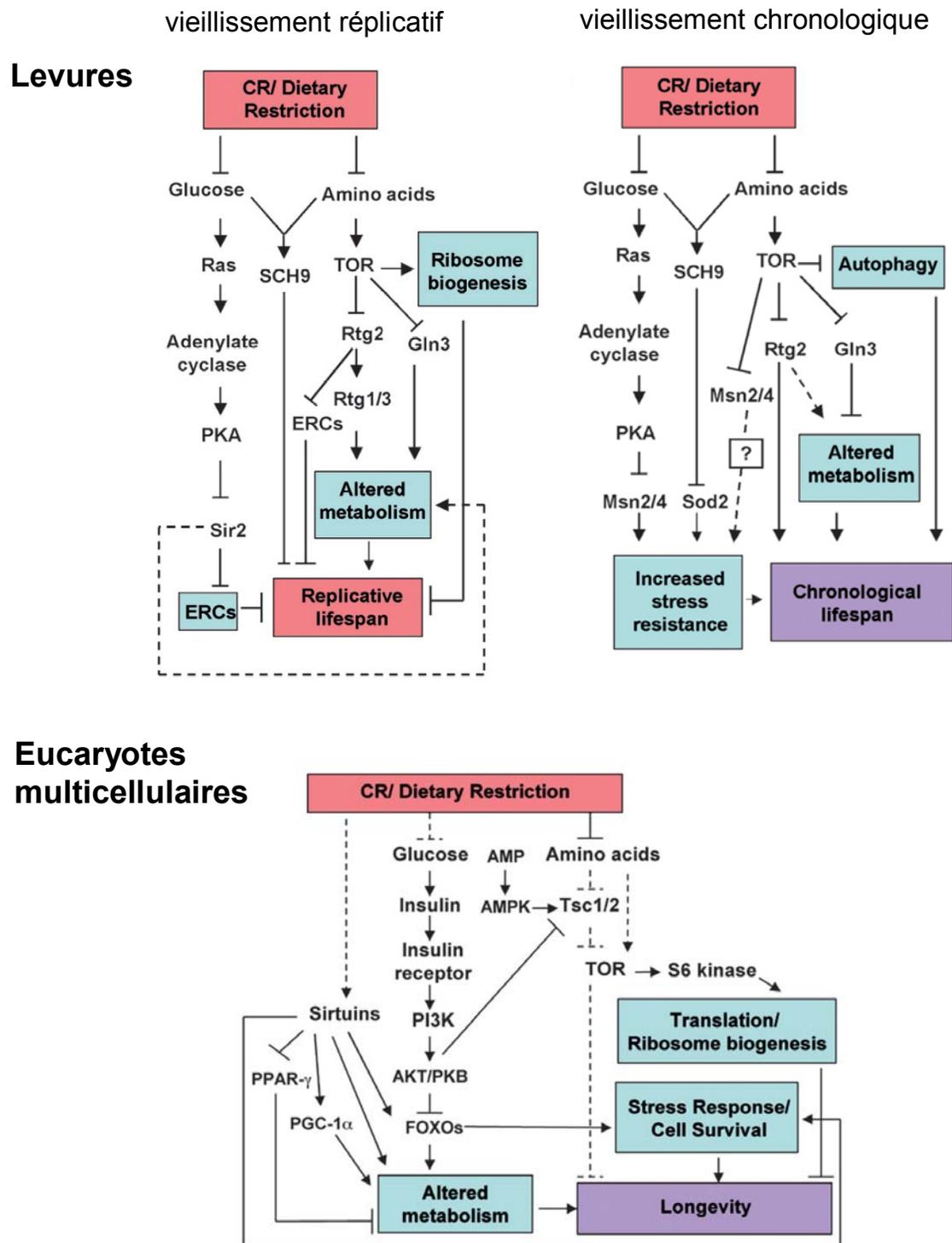
De nombreux essais effectués dans les organismes modèles ont tenté de relier la RD et plus particulièrement la RC avec des mécanismes cellulaires connus avec plus ou moins de succès. Plusieurs fonctions ont pu être isolées comme agissant partiellement sur la RD, ceci principalement par deux méthodes. La première consiste en la recherche d'une perte de l'effet de la RD sur la longévité après mutation d'un gène cible, à condition de contrôler que cette même mutation ne baisse pas la durée de vie en condition normale. La seconde s'appuie sur la découverte de mutations qui allongent la vie et dont l'effet est non additif avec celui de la RD. Deux organismes ont particulièrement été exploités dans ce domaine, le nématode et la levure. Par exemple, les levures sont cultivées dans un milieu dans lequel la concentration de glucose est diminuée par rapport à une valeur standard. On peut aussi obtenir un ralentissement du vieillissement avec des milieux pauvres en d'autres nutriments comme des acides aminés ou des composés azotés (Fabrizio et Longo, 2003; Kennedy et al., 2007).

Les fonctions reliées à ces gènes sont multiples (références dans (Piper et Bartke, 2008) et (Greer et al., 2007)). Les principales pour les levures et les eucaryotes multicellulaires sont résumées dans la Figure 2 (repris de (Dilova et al., 2007)). On distingue :

- La voie de signalisation du glucose par l'insuline et les homologues de l'insuline (appelée IIS) chez les eucaryotes multicellulaires et par la voie de signalisation du glucose PKA/AMPc dépendante chez les levures (Dilova et al., 2007).
- La voie de signalisation des nutriments azotés et des acides aminés par la kinase Tor qui régule le taux global de traduction cytoplasmique et mitochondriale (Powers et al., 2006) (Bonawitz et al., 2007).
- La kinase AMP-dépendante (AMPK), elle régule le métabolisme énergétique et est sensible à l'énergie disponible (Greer et al., 2007; Schulz et al., 2007).
- SIR2 et les sirtuins, mais seulement indirectement dans la drosophile et avec des résultats controversés dans le nématode et la souris (Greer et al., 2007) (Li et al., 2008). Sir2 a des effets contraires sur la durée de vie répllicative et chronologique chez *Saccharomyces cerevisiae* (Fabrizio et al., 2005; Lin et al., 2002).
- La synthèse et le recyclage du dinucléotide nicotinamide adénine (NAD⁺) (Anderson et al., 2003b; Lin et Guarente, 2003).
- CLK1, un intermédiaire de la biosynthèse de l'ubiquinone (Stepanyan et al., 2006).

Figure 2 : Fonctions impliquées dans l'augmentation de longévité par restriction calorique. Figure tirée de (Dilova et al., 2007) . Panneau du haut à gauche, récapitulatif des voies de signalisation et fonctions agissant sur le contrôle de la durée de vie répllicative des levures. Panneau de haut à droite, comme précédemment mais pour la durée de vie chronologique. Panneau du bas, voies et fonctions attribuées à la régulation de la durée de vie des eucaryotes multicellulaires par la restriction de calorique. Ces mécanismes seront détaillés dans de l'introduction.

Figure 2



La RC demeure l'intervention la plus efficace connue à ce jour pour augmenter la longévité. Par exemple des augmentations de 65% de la durée de vie chez la souris et de 85% chez le rat mâle ont été atteintes (Tableau 1 tiré de (Mair et Dillin, 2008)).

Aucune manipulation génétique n'a encore permis de ralentir le vieillissement aussi efficacement. Ceci s'expliquerait par le fait que l'allongement de la vie par RC est le résultat d'une addition de plusieurs régulations cellulaires et systémiques. Ainsi pour obtenir cet effet par manipulation génétique il faudra sans doute cibler plusieurs voies. En effet, il est important de noter qu'aucun des gènes trouvés n'a pu empêcher seul les effets de tous les types de RD. Il semble donc évident que le terme RD englobe plusieurs types de régulations distinctes impliquant des mécanismes distincts ; cette hypothèse est appuyée par le caractère pléiotropique du vieillissement. La durée de vie peut être modifiée par manipulation de diverses fonctions nucléaires, mitochondriales ou cytoplasmiques. En résumé, les mécanismes de régulation de la longévité par les nutriments ne sont pas encore bien compris, certainement par le fait même que le vieillissement en soit ne l'est pas. Il apparaît acceptable de penser que comprendre la restriction calorique signifiera comprendre le vieillissement.

Tableau 1 : Liste des effets de la restriction de diète sur la longévité des espèces étudiées. Le tableau est adapté de (Mair et Dillin, 2008). Cette liste résume l’allongement de durée de vie maximal obtenue par des restrictions dans l’apport alimentaire selon les protocoles décrits dans le tableau.

Tableau 1

Species	DR regime	Life span measure	Increase
<i>S. cerevisiae</i>	Glucose dilution	RLS	75%
	SDC versus water	Mean CLS	300%
	Asparagine/glutamate restriction	CLS	Not reported
<i>Tokopbrya infusionum</i>	Fed reduced number of <i>Tetrahymena</i>	Maximum life span	Not reported
<i>C. elegans</i>	<i>eat-2 (ad1113)</i> mutation	Mean life span	46%
	Axenic media	Mean life span	85%
	Bacterial dilution in liquid	Mean life span	52%
	Reduction of bactopectone in plates	Mean life span	30%
	Dietary deprivation during adulthood	Mean life span	50%
<i>D. melanogaster</i>	Reduction in yeast paste availability	Mean life span	28%
	Dilution of media	Median life span	66%
Medflies	Dilution of nutrients	Median life span	22%
Grasshoppers	Reduction by 40% of ad libitum	Median life span	62%
Spiders	Reduction in number of <i>D. melanogaster</i> fed	Median life span	212%
Water striders	Reduction in number of <i>D. melanogaster</i> fed	Increase in life span on low food	20 days
Water fleas	Dilution of manure infusion media with pond water	Mean life span	69%
Rotifers	Algae deprivation	Mean life span	60%
Guppies	Reduced sludge worm intake	Maximum life span	Not reported
Trout	Dried skim milk with liver supplement versus without	Survival	Not reported
Hamsters	Reduction of food by 50%	Median	30%
Mice	Ad libitum versus 40 kcal/week from weaning	Mean	65%
	From 1 year, 160 kcal versus 90 kcal/week	Mean	20%
	Every other day feeding	Mean	27%
	Methionine restriction	Maximal life span ^b	10%
Rats	Reduced food intake to growth-restricting levels interspersed with periodic growth-promoting diets	Mean (males)	85%
	Reduction of ad libitum by 60%	Median	47%
	Methionine restriction	Mean life span	42%
	Every other day feeding	Mean life span	83%
Dogs	Reduced to 75% of control food intake	Median life span	16%
Rhesus monkeys	Restricted chow to maintain lean target weight of 10–11 kg	Median life span	28%

^aAbbreviations: CLS, chronological life span; RLS, replicative life span; SDC, standard yeast growth medium.

^bMaximal represents the mean life span of the longest lived 10% within a cohort.

3. Les grandes théories du vieillissement

a) Le vieillissement aléatoire contre le vieillissement programmé

L'idée d'un vieillissement programmé et bénéfique à l'espèce a été proposée en premier par August Weismann en 1889 (Weismann, 1889) (dans (Kirkwood, 2005)). Il argumentait que le rôle d'un tel programme serait de nettoyer les individus âgés et non fertiles qui sont en compétition avec les individus jeunes ayant encore leur potentiel reproductif. Ceci se base sur le postulat que la reproduction est le principe premier permettant à une espèce de se maintenir. La thèse de Weismann a pourtant été largement rejetée selon l'observation que dans une grande majorité d'espèces, les individus meurent de diverses raisons qualifiables d'accidentelles (prédation, adversité environnementale, etc.) avant que les premiers signes de vieillissement ne soient perceptibles (Medawar, 1952). En d'autres mots, le vieillissement n'est pas la première cause de mort dans la nature.

Le prolongement de cette pensée s'est traduit par la formulation d'une théorie qui reléguait le vieillissement à un phénomène aléatoire, échappant à la sélection lors de l'évolution. Elle est nommée théorie de l'accumulation de mutations (Longo et al., 2005; Medawar, 1952). En résumé, elle stipule que les mutations qui réguleraient la longévité agissent après la reproduction. Elles échappent donc à la sélection lors de l'évolution. Par la suite cette idée n'a pas été vérifiée dans les faits puisque de nombreux gènes pro-vieillescence ont des fonctions qui ne sont pas seulement responsables de la durée de vie

mais aussi de fonctions utiles avant la reproduction. Par exemple, il y a les gènes reliés à la signalisation des facteurs de croissances de type insulinique (IGF pour *insulin-like growth factor*) et à la signalisation de l'insuline qui agissent sur l'assimilation du glucose et sur le développement de la souris puisqu'ils provoquent le nanisme (Longo et Finch, 2003). L'inhibition de l'expression des gènes de la chaîne de respiration mitochondriale par ARN interférence ou la délétion de *clk-1* chez le nématode augmente la durée de vie en ralentissant le métabolisme, le développement et en diminuant la reproduction (Dillin et al., 2002; Felkai et al., 1999). La découverte de ces « voies de longévité » (Vanfleteren et Braeckman, 1999) fit accepter l'idée d'une évolution possible des fonctions du vieillissement et de l'existence de programmes de longévité.

b) La théorie des radicaux libres

En 1956, Denham Herman énonça les prémices d'une des plus importantes théories du vieillissement. Il proposa le premier que les radicaux libres (ou espèces réactives de l'oxygène, ROS) pourrait être une cause majeure du vieillissement (Harman, 1956). Il écrivit :

The phenomenon of growth, decline and death-aging has been the source of considerable speculation. (...). The universality of this phenomenon suggests that the reactions which cause it are basically the same in all living things.

En premier lieu, son idée était visionnaire car elle expliquait le caractère endogène du vieillissement. De plus, la théorie des radicaux libres apportait la première hypothèse mécanistique appuyant l'idée d'un phénomène contrôlé et universel. Elle avait aussi l'avantage de faire le lien avec les résultats de la restriction calorique et de l'idée d'une longévité dépendante de la vitesse du métabolisme (théorie du *rate-of-living*). La croyance du lien entre ces deux théories expliquant que la quantité de radicaux libres produite dépendait de la rapidité du métabolisme a perduré longtemps dans la communauté scientifique (Sohal et Orr, 1992). Toutefois des études récentes plus poussées ont montré que vieillissement et vitesse de métabolisme ne marchaient pas toujours de concert (Brys et al., 2007; Muller et al., 2007).

Par la suite, la découverte de nombreuses espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'existence des enzymes responsables de leur détoxification imposa définitivement la théorie de Harman (Muller et al., 2007). En 1972, il apporta une modification à sa théorie

en donnant à la mitochondrie le rôle central puisqu'elle produit la majeure partie des ROS (Muller et al., 2007).

Aujourd'hui, soit cinquante ans et plusieurs milliers d'études publiées sur le sujet plus tard, la théorie de Harman est encore défendue par beaucoup, mais elle se butte à quelques contradictions, notamment chez le nématode et la souris (Doonan et al., 2008; Muller et al., 2007). L'une d'elles a une influence notoire ; une équipe a créé une souris appelée « mitochondriale mutatrice ». Chez cet animal, le domaine vérificateur (*proof-reading*) de l'ADN polymérase gamma mitochondriale est absent (Trifunovic et al., 2004). Par conséquent, cette souris accumule cinq fois plus de mutations dans l'ADN mitochondrial et meurt prématurément avec des caractéristiques associés au vieillissement : perte de poids et de graisse sous-cutanée, perte de poils, cyphose, ostéoporose, perte de fertilité, etc. De manière inattendue, cette mutation dans des cultures de fibroblastes immortalisés de souris n'augmente pas la synthèse d'ions superoxyde ni de peroxyde d'hydrogène et *in vivo*, elle n'influence pas la réponse anti-oxydante (Trifunovic et al., 2005). Toutefois une plus grande accumulation de protéines carbonylées, un produit de la réduction des ROS (Soskic et al., 2008), a été mesurée *in vivo* dans la souris mitochondriale mutatrice (Trifunovic et al., 2005). Cet exemple est révélateur à la fois de l'importance de la mitochondrie dans le vieillissement mais aussi du manque de cohésion entre la théorie sur les ROS et les données. Deux possibilités prévalent pour expliquer le manque de lien entre ROS et longévité : (i) les outils pour mesurer les ROS et leurs effets ne sont pas assez puissants ; (ii) les ROS ne sont pas la cause du vieillissement provoqué par la mitochondrie et cette souris mitochondriale mutatrice a un phénotype ressemblant à ceux du vieillissement mais provoqué différemment.

c) La théorie du soma disponible

Cette théorie se base sur le postulat que les mécanismes de maintenance requis pour la longévité ont une efficacité limitée. Selon cette théorie, il existe une compétition pour l'utilisation de l'énergie disponible entre la réparation des dommages aléatoires et les demandes métaboliques de la cellule (Kirkwood, 2005; Longo et al., 2005). L'évolution aurait favorisé la sélection des fonctions telles que la croissance et la reproduction au dépend des fonctions de maintenance pro-longévité. Cependant, la restriction calorique augmente la durée de vie alors que selon cette théorie elle devrait la diminuer. Dans ce cas l'énergie totale disponible est plus basse. On peut réconcilier cette observation avec cette théorie en imaginant l'existence d'une redirection de la quantité d'énergie fournie aux fonctions de maintenance (Shanley et Kirkwood 2000).

d) L'antagonisme pléiotropique

Cette idée est une amélioration de la théorie de l'accumulation de mutation de Medawar - décrite plus tôt - dans le but d'intégrer les résultats montrant que les gènes de longévité influencent aussi des fonctions avant la reproduction. Elle propose que les allèles ayant un effet néfaste tard dans la vie aient été sélectionnés puisqu'ils ont un effet avantageux plus tôt en agissant sur les fonctions reproductives ou développementales (Longo et al., 2005). Ces gènes ont donc des actions antagonistes selon le moment où ils s'expriment chez l'individu. Par exemple, le gène p53 chez la souris aurait une fonction bénéfique de suppression de tumeur mais favoriserait le vieillissement à long terme (Ferbeyre et Lowe, 2002; Tyner et al., 2002). Toutefois, cette théorie ne s'applique pas dans plusieurs cas comme ceux des mutations rallongeant la vie sans affecter les fonctions reproductrices (Kenyon et al., 1993; Longo et Finch, 2003). Une meilleure analyse des

mutants à durée de vie rallongée permettra de trancher si la longévité s'accompagne nécessairement d'une contrepartie sous la forme d'une perte de certaines fonctions.

e) L'hormèse

L'hormèse est un vieux principe biologique décrivant une réponse à un stress modéré entraînant une défense disproportionnée. *In fine*, le stress modéré a un effet bénéfique sur l'organisme du fait de la réponse. Ce principe a trouvé plusieurs implications dans l'étude du vieillissement, notamment pour expliquer qu'une augmentation de la respiration mitochondriale provoque l'extension de la durée de vie (Gems et Partridge, 2008). Chez le nématode et la levure, une redirection du métabolisme énergétique de la glycolyse vers la mitochondrie s'accompagne d'une augmentation de la respiration et d'un ralentissement du vieillissement (Schulz et al., 2007) (Lin et al., 2002). Ce changement serait accompagné d'une activation des mécanismes de défense contre les ROS pour contrer la possibilité de leur suraccumulation néfaste. Ceci correspond à un phénomène d'hormèse qui pourrait expliquer l'augmentation de longévité subséquente. Cette théorie se butte toutefois à des résultats récents montrant que la réponse contre le stress oxydant par les enzymes de détoxications des ROS n'est pas nécessaire dans les cas d'allongement de la vie par augmentation de la respiration; ceci chez la levure (Bonawitz et al., 2007) et chez le nématode (Brys et al., 2007). Néanmoins, un autre mécanisme de défense contre les ROS pourrait confirmer ici un effet de type hormèse avec par exemple un meilleur contrôle de leur synthèse.

Plus de 300 théories différentes sur le vieillissement ont été répertoriées sans qu'aujourd'hui une seule n'ait pu faire l'unanimité (Kirkwood, 2005). Au vu de la

complexité associée à ce phénomène, il convient de se demander pourquoi de tels moyens et de si grands efforts sont déployés pour comprendre ses mécanismes.

4. Finalité des études sur le vieillissement et extrapolation chez l'humain

L'objectif des études sur le vieillissement à l'aide de modèles animaux et champignons est ambitieux mais justifiable. Selon les spécialistes, la compréhension de ce phénomène fera avancer les recherches sur les cancers, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives dont la prévalence est liée à l'âge (Kenyon, 2005). Néanmoins, l'extrapolation des résultats des recherches sur le vieillissement des organismes simples à l'homme doit être faite avec grande prudence. La durée de vie des vers a pu être rallongée artificiellement de 7 fois (Arantes-Oliveira et al., 2003) alors qu'il paraît évident qu'une extension de longévité humaine jusqu'à 500 ans est impossible. Tout d'abord, les mammifères vivent beaucoup plus longtemps que les organismes modèles invertébrés, on peut donc spéculer que leur longévité est moins flexible. De plus, l'homme a une génétique beaucoup plus complexe avec de nombreuses voies de signalisation n'existant pas chez les invertébrés (Maris Kuningas, 2008). Toutefois, la durée de vie humaine reste dans une certaine mesure plastique, allant d'environ 75 ans jusqu'à 120 ans dans les meilleures conditions (Vijg et Campisi, 2008).

Les recherches sur les rongeurs ont apporté aussi des résultats en faveur de l'existence d'un contrôle du taux de vieillissement chez les mammifères. L'inactivation des gènes *Pou1f1*, *Prop1*, ou des récepteurs aux hormones de croissances qui réduisent le signal d'IGF-1 augmente la durée de vie des souris de 40%. Les mutations ciblant directement la

voie de signalisation de l'insuline la rallonge de 20% ou moins (Vijg et Campisi, 2008). Les mutations dans d'autres gènes, impliqués dans la synthèse (Clk1) (Dell'Agnello et al., 2007) ou l'assemblage (Surf1) (Liu et al., 2005) des protéines de la chaîne respiratoire ou encore dans la signalisation cellulaire du stress oxydant (P66shc) (Migliaccio et al., 1999) ont le même effet.

Chez l'homme, plusieurs gènes ont été trouvés comme étant surexprimés chez des personnes centenaires. Il s'agit de gènes des voies du métabolisme des lipoprotéines, de gènes réduisant la signalisation de IGF-1/insuline et des variants de FOXO1 et FOXO3 (Vijg et Campisi, 2008). Finalement, des études de restriction calorique sont en cours chez les singes rhésus et chez l'homme; elles tendent vers une conservation de l'effet de rallongement de la vie chez les primates (Anderson et al., 2008) et montrent un effet protecteur du système cardiovasculaire chez les humains (Everitt et Le Couteur, 2007) ainsi qu'une sensibilité accrue à l'insuline dans les deux cas.

A la vue des résultats chez les rongeurs et les études chez les primates et les humains, on peut imaginer qu'une augmentation substantielle de la durée de vie humaine moyenne et même de la durée de vie maximale serait possible suite à des traitements ciblant les voies régulant la longévité. On peut aussi avancer que de tels traitements seraient protecteurs contre les cancers et les maladies liées à l'âge en général. Cette idée est appuyée par les résultats des effets protecteurs de la restriction calorique (Grifantini, 2008).

Les données obtenues chez les mammifères modèles ajoutées aux premières observations faites chez les humains semblent pointer vers une conservation du contrôle de la durée de vie chez l'homme. Cependant aucune preuve directe, non corrélative n'existe encore. Certaines personnes ont décidé de se soumettre à un régime de RC ; l'analyse du

vieillessement de ces patients apportera un élément de réponse plus solide (CRON site internet, (Voss, 2004)). Les découvertes qui ont été faites sur les invertébrés (nématode et drosophile) et la levure ont largement permis d'avancer dans la compréhension du programme biologique aux commandes de la vitesse du vieillissement chez les humains. Toutefois, le vieillissement garde beaucoup de mystères. Quel est le marqueur réel de la longévité, le facteur limitant de la vie d'une cellule ? En existe-t-il plusieurs ? Est-ce l'accumulation de dommages due au stress oxydant, la production d'ATP, l'accumulation de mutations de l'ADN dans le noyau ou dans la mitochondrie ? Le programme de vieillissement est-il le même dans toutes les espèces, tous les tissus et organes ? Pour répondre à ces questions, les organismes plus simples, comme la levure, représentent un outil unique qui permettra un gain de temps important dans l'avancement des connaissances.

II. Le vieillissement des champignons unicellulaires

1. Modèles et définitions

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un champignon unicellulaire du domaine des eucaryotes, du règne *Fungus* et de la division des ascomycètes ; elle est aussi appelée levure à bourgeonnement ou levure de bière. Elle fût le premier modèle fongique du vieillissement et de loin le champignon le plus utilisé dans ce domaine (Kaeberlein et al., 2007). Plus tard seront employés d'autres genres de champignons, des filamenteux : *Rhizoctonia solani* (basidiomycètes) (Obrig et Gottlieb, 1970), *Podospora anserina* (Munkres et Minssen, 1976; Scheckhuber et Osiewacz, 2008) et *Neurospora crassa* (ascomycètes) (Stevenson et al., 2000), et des levures ascomycètes non filamenteuses, *Schizosaccharomyces pombe* (Barker et Walmsley, 1999), *Candida albicans* (Fu et al., 2008) et *Kluyveromyces lactis* (Oliveira et al., 2008). La toute première étude a été publiée il y a plus de 50 ans; elle montrait qu'une cellule de *S. cerevisiae* avait un nombre de divisions fini (Mortimer et Johnston, 1959). Ceci fût la preuve qu'une levure est mortelle, une chose qui n'était pas nécessairement évidente à l'époque puisqu'une population est potentiellement immortelle tant qu'elle dispose de nutriments. Dans cette étude, le type de vieillissement a été analysé selon la durée de vie réplivative.

Il existe deux méthodes de mesure la longévité des levures. On distingue la durée de vie réplivative (DVR) qui correspond à la capacité mitotique ; elle se compte en nombre de divisions (ou générations) réalisées par une cellule avant sa mort (Figure 3A) (Jazwinski,

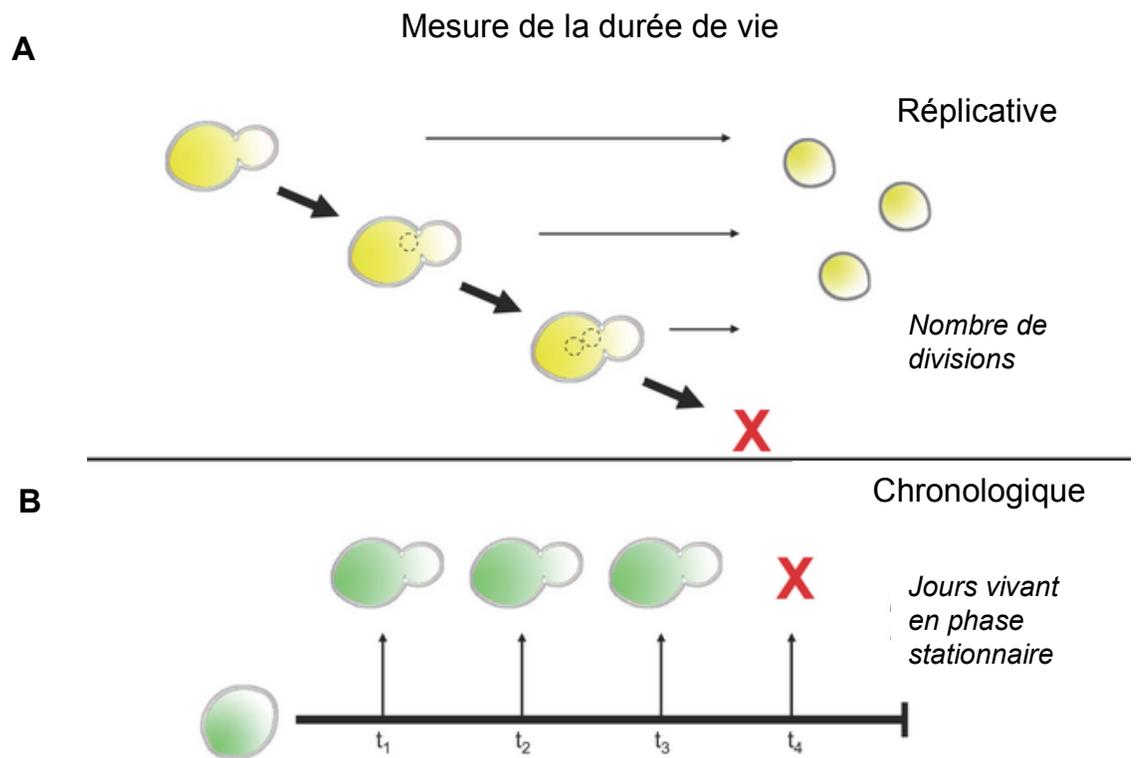
1990). La longévité peut aussi être mesurée par la durée de vie chronologique (DVC) (Figure 3B). Il s'agit du temps qu'une population survit dans son état post-mitotique correspondant à la phase stationnaire de croissance; elle s'exprime en unité de temps (Figure 3B) (Fabrizio et Longo, 2003).

On peut noter que d'un point de vue méthodologique, la mesure de la DVC s'applique beaucoup plus facilement à la réalisation de criblages génétiques que la DVR puisqu'elle est faite sur une population de cellules alors que cette seconde doit être faite par micromanipulation de cellules individuelles (Fabrizio et al., 2001; Smith et al., 2007). Néanmoins un criblage de mutants à longue DVR a pu être appliqué sur environ 500 clones grâce à un protocole de mesure sur plusieurs cellules simultanément et un laborieux travail de comptage (Kaeberlein et Kennedy, 2005).

Comme dans la présente thèse, la durée de vie chronologique a été étudiée, je ferai dans ce chapitre un survol des fonctions cellulaires connues pour réguler la DVR et analyserai de façon plus exhaustive celles agissant sur la DVC.

Figure 3 : Méthodes de mesure de la durée de vie chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. La figure est adaptée de (Kaeberlein et al., 2007). A, schéma du vieillissement répliatif d'une levure, il correspond au nombre de cellules filles formées au cours du temps par une cellule mère qui est compté par micromanipulation sur milieu solide. B, schéma du vieillissement chronologique qui est mesuré selon le temps que survit une population en phase stationnaire. On l'exprime en unité de temps, le plus souvent en jours.

Figure 3



2. Le vieillissement répliatif

La particularité de la levure *S. cerevisiae* de se diviser asymétriquement en a fait un modèle de choix pour l'étude de la durée de vie répliatif grâce à sa micromanipulation (Figure 3A) (Steinkraus et al., 2008). Chaque cellule (mère) donne un nombre fini de cellules filles (Mortimer et Johnston, 1959). Un premier mutant de longévité capable de se diviser un plus grand nombre de fois fût obtenu par transformation de la levure avec une protéine RAS du virus de sarcome murin Harvey (Chen et al., 1990; Jazwinski et al., 1993). Lors de la division, la cellule fille gagne en capacité répliatif par rapport à la cellule mère dont elle est issue ; en d'autre terme elle est plus jeune que la cellule mère (Figure 4A) (Kennedy et al., 1994). Toutefois, elle ne récupère pas la totalité du potentiel répliatif maximal. Une fille issue d'une mère jeune vit plus longtemps qu'une fille issue d'une mère vieille (Figure 5). Suite à ces découvertes, le vieillissement répliatif de la levure à bourgeonnement a suscité un intérêt croissant chez les chercheurs notamment après 1996, date à laquelle le séquençage de son génome a été complété (Consortium international, 1997). Plusieurs mécanismes, génétiques et épigénétiques, régulant la longévité répliatif ont été élucidés avec ce modèle d'étude et certains d'entre eux se sont avérés conservés dans les espèces métazoaires.

Figure 4 : Devenir d'une cellule mère dans une culture de levure vieillissante. Les schémas sont adaptés de (Allen et al., 2006). A, Une cellule vierge devient cellule mère après sa première division et forme des cellules vierges qui à leur tour se divisent. Une population est ainsi formée en grande majorité de cellules vierges ou jeunes mères. B, Lorsque le mélange cellules mères, cellules vierges entrent en phase stationnaire, les cellules vierges ont une densité plus faible et survivent mieux que les mères. C, Lorsque les levures manquent de nutriment, elles sortent du cycle cellulaire pour un état végétatif appelé G_0 , il correspond à la phase stationnaire.

Figure 4

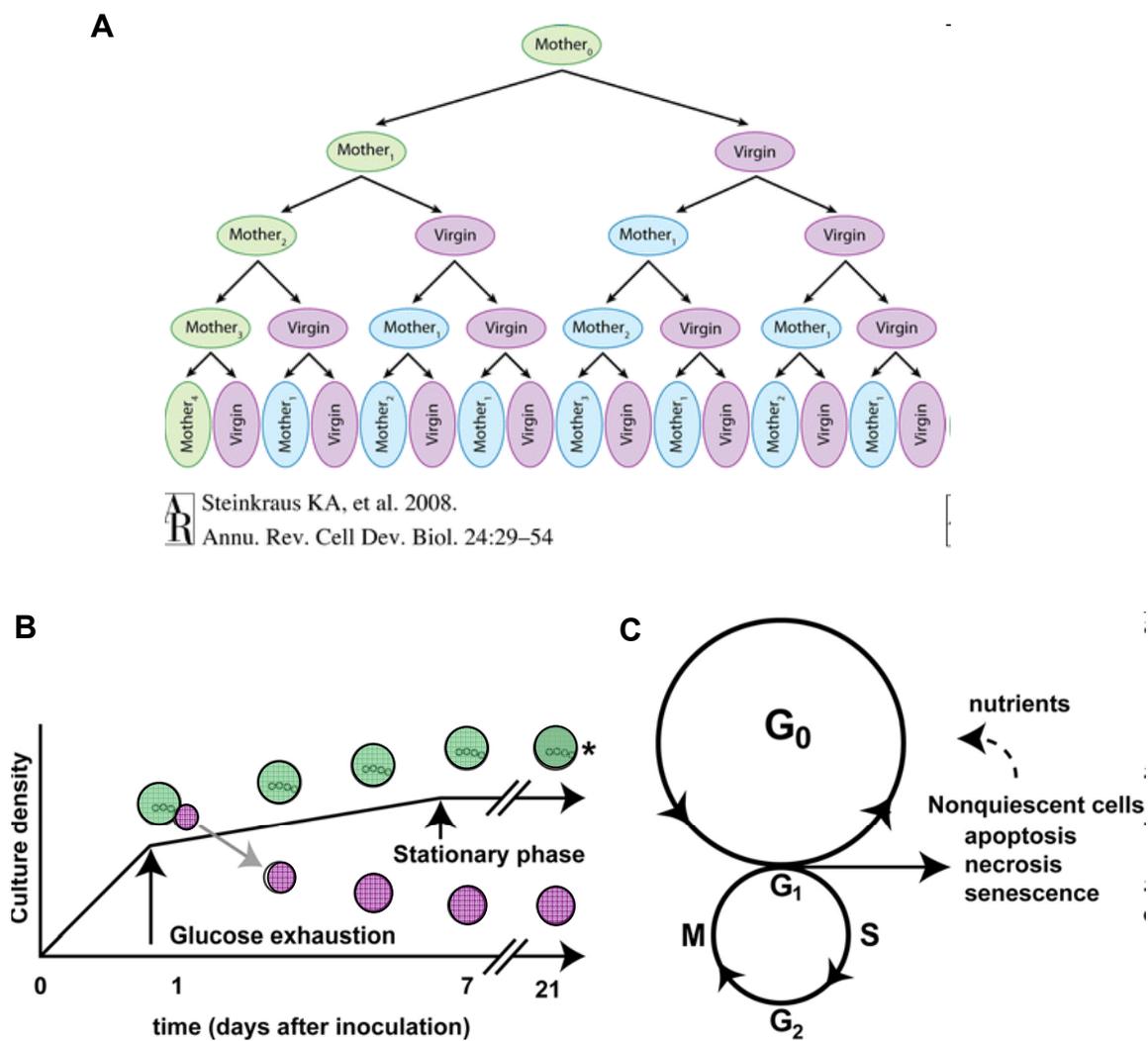
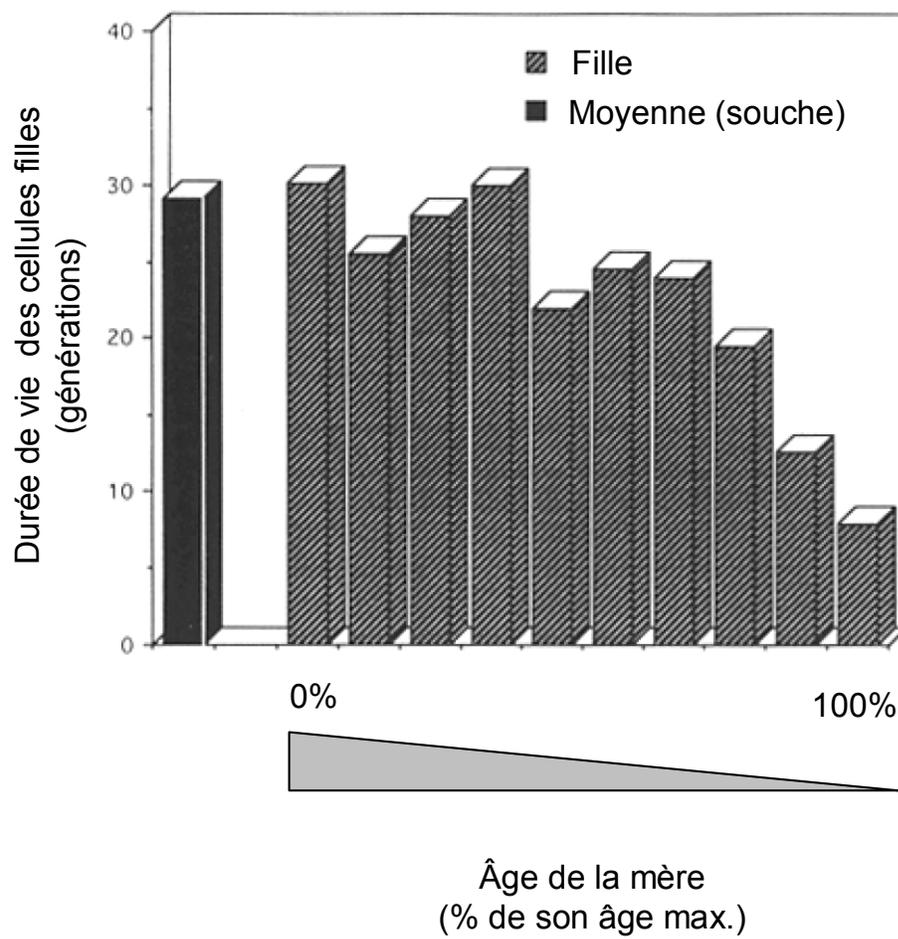


Figure 5 : Durée de vie réplivative d'une cellule fille en fonction de l'âge réplivatif de sa mère. cette figure est adaptée de (Kennedy et al., 1994). Une cellule fille est par définition plus jeune que sa mère. Toutefois, ce résultat montre qu'une cellule fille issue d'une mère vieille ne récupère que partiellement la capacité réplivative maximale de la souche.

Figure 5



a) Les histones déacétylases de la famille des sirtuins

Sir2p est une histone déacétylase dépendante du NAD^+ , de la famille des sirtuins ; elle catalyse la formation d'hétérochromatine au locus de l'ADN ribosomique (ADNr). Il a été découvert chez la levure *S. cerevisiae* que des copies additionnelles du gène *SIR2* accroissent la DVR alors que sa délétion la diminue (Lamming et al., 2005). Plusieurs fonctions ont été attribuées à ce gène pour expliquer son effet pro-longévité. Il a été montré que Sir2p empêchait la formation de cercles extrachromosomiques d'ADN ribosomique (ERC). Ils sont formés par recombinaison ectopique de l'ADNr sur lui-même suite à la perte du *silencing* des histones à ce locus. L'accumulation des ERC a été suggéré comme étant préjudiciable pour la DVR en détournant la machinerie répliquative de l'ADN (Sinclair et Guarente, 1997). Leur nombre est proportionnel au dosage de Sir2p mais aussi de Sgs1p, une ADN hélicase qui agit sur la longévité. Cependant le rôle des ERC dans la longévité répliquative semble être spécifique à la levure à bourgeonnement puisque une étude dans la levure *Candida albicans* rapporta que le rôle de *SIR2* sur sa DVR est conservé sans toutefois modifier l'accumulation des cercles d'ADNr (Fu et al., 2008). Selon des résultats obtenus avec *SIR2* et son orthologue SIRT1 dans la souris, Sir2p relocaliserait sur la chromatine suite à des dommages à l'ADN, par exemple après un stress oxydatif ; le résultat serait une régulation transcriptionnelle à ce locus (Oberdoerffer et al., 2008). Cependant, cette régulation possible n'a été vérifiée que sur quelques gènes dont aucun lien avec le vieillissement n'est connu.

Il a été proposé que Sir2p et Hst2p, une autre histone déacétylase de la famille des sirtuins, auraient une fonction redondante dans la régulation de la RC (Lamming et al., 2005). Leur activité est régulée par la disponibilité en NAD^+ fourni par une voie de recyclage dû à l'activité nicotinamidase de *PNC1*, un autre gène de longévité (Anderson et al., 2003a). La production de cette enzyme serait sous le contrôle des facteurs de

transcription Msn2/4p, eux-mêmes régulés par la kinase Tor1p en fonction de la disponibilité en nutriments (Medvedik et al., 2007). Néanmoins, l'implication des sirtuins dans l'allongement de la durée de vie par RC reste sujet à débat suite à l'observation que la délétion combinée de tous les sirtuins n'inhibe pas les effets de la RC sur la longévité (Steinkraus et al., 2008; Tsuchiya et al., 2006).

Finalement, la délétion de *SIR2* prévient la ségrégation des protéines carbonylées dans la cellule mère lors de la division asymétrique ; en temps normal ce mécanisme aboutit à une cellule fille ayant moins de marqueurs de vieillissement que sa mère (Aguilaniu et al., 2003; Erjavec et al., 2007). En résumé, les sirtuins et plus particulièrement *SIR2* en étant responsable d'une régulation du *silencing* de l'ADNr dépendante du métabolite NAD^+ , ont été liés à différents phénotypes comme l'accumulation des ERC et la ségrégation des protéines endommagées dans la cellule mère. Au vu des données disponibles, il est encore difficile de comprendre le mécanisme responsable de l'effet pro-longévité des sirtuins.

a) La voie de répression du glucose

Cette voie détecte la présence du glucose et envoie un signal aux répresseurs de transcription Mig1/2p via le complexe de la kinase Snf1p pour réprimer certains gènes (métabolisme des sources de carbones auxiliaires, respiration, néoglucogenèse, etc.) (Rollanda et al., 2002). Le mécanisme de déclenchement de Snf1p par le glucose est encore mal compris mais nécessite la présence de l'enzyme glycolytique hexokinase 2 (*HXK2*) (Dilova et al., 2007). La délétion de l'hexokinase 2 entraîne une extension de la DVR (Lin et al., 2002). De plus une étude montre que la délétion des régulateurs Mig1/2p a la même

effet (Harkness et al., 2004). Les auteurs ont montré que cette voie contrôle la longévité suite à son action sur le complexe promoteur de l'anaphase (APC).

b) Les voies de signalisation des nutriments par des sérines-thréonines kinases

Les mutations qui aboutissent à une baisse d'activité des voies partiellement redondantes de signalisation des nutriments Tor et protéine kinase A (PKA) induisent un rallongement de la DVR (Fabrizio et al., 2004b; Kaeberlein et al., 2005c; Lin et al., 2002). La longévité de ces mutants de délétion n'est pas prolongée plus par la RC obtenue par réduction de la quantité de glucose dans le milieu. Ceci démontre l'importance de ces voies dans la médiation des effets de la RC sur la longévité répliquative de la levure. Notons que la voie PKA peut être activée par plusieurs signaux : le récepteur membranaire du glucose Gpr1p et les protéines Ras1p et Ras2p via leur activation par Cdc25p (Santangelo, 2006). L'inactivation de *GPR1*, *RAS1* ou de *CDC25* retarde le vieillissement répliquatif alors qu'il faut une surexpression de *RAS2* pour obtenir le même phénotype (Kaeberlein et al., 2005b; Lin et al., 2000; Sun et al., 1994). La raison de cette différence n'est pas connue.

La sérine thréonine-kinase Sch9p est un homologue des kinases S6K1 et AKT/PKB des mammifères ; elle est activée par le complexe TorC1 dans *S. cerevisiae* et a une fonction partiellement redondante avec PKA (Powers, 2007; Roosen et al., 2005a). Sa délétion rallonge la DVR (Kaeberlein et al., 2005c). Une des raisons qui a été avancée pour expliquer les effets de Tor1 et Sch9 est que leur délétion baisserait la synthèse des protéines ribosomales et la traduction globale.

c) La traduction

Des travaux ont montré que la réduction d'activité ribosomale par délétion de certains composants de la sous-unité 60S augmentait la DVR (Kaeberlein et Kennedy, 2007; Steffen et al., 2008). Le ciblage des protéines des sous-unités ribosomales par ARNi augmente la durée de vie dans *C. elegans* aussi (Kaeberlein et Kennedy, 2008). Il a aussi été proposé dans la levure que la diminution d'activité de la sous-unité 60S par ciblage de ces gènes (famille RPL) induirait l'activation du facteur de transcription Gcn4p impliqué dans la synthèse des enzymes des voies de biosynthèse des acides aminés (Steffen et al., 2008). Les auteurs ont mise en évidence une implication partielle de Gcn4p dans l'augmentation de DVR par mutation des sous unités ribosomales. De la même manière, les délétions de *TOR1*, *SCH9* et la RD nécessitent en partie la présence de Gcn4p pour allonger la durée de vie. Un modèle choisi pour mettre au clair le rôle de la traduction dans la longévité est celui de l'homéostasie protéique et la protéotoxicité (Kaeberlein et Kennedy, 2008). Une forte traduction couplée au vieillissement induirait une surcharge en protéines endommagées et une perte de certaines fonctions essentielles. Dans cet ordre d'idée, l'activation de l'autophagie a été montrée pour ralentir le vieillissement de *C. elegans* (Hansen et al., 2008).

d) Le contrôle de la respiration

Il a été proposé que l'allongement de la DVR par Sir2p passe par une augmentation du niveau de NAD⁺ suite à l'élévation de la respiration pendant la RC. Ceci est appuyé par l'observation du même effet après surexpression du facteur de transcription Hap4p qui

active la respiration (Lin et al., 2002). Cependant une étude postérieure réfute ce modèle. En effet, des levures ρ^0 dépourvues d'ADN mitochondrial et qui ne peuvent plus respirer restent sensibles à l'induction de l'extension de la DVR par RC (Kaeberlein et al., 2005a). Néanmoins, la mitochondrie pourrait avoir une importance dans la DVR de la levure. La délétion de *LATI*, un composant de la pyruvate déshydrogénase mitochondriale, empêche le gain de DVR par RC ; de plus sa surexpression imite les effets de la RC sur la longévité (Easlon et al., 2007). Plus de travaux sur les fonctions mitochondriales seront nécessaires pour comprendre le rôle de la respiration dans la DVR des levures.

e) La réponse rétrograde

Les dysfonctionnements de la mitochondrie entraînent l'expression d'une multitude de gènes codés dans le noyau, ce phénomène est appelé réponse rétrograde (Jazwinski, 2005). Ces gènes agissent dans le métabolisme et dans la réponse à divers stress pour adapter la cellule à la perte des fonctions mitochondriales (Epstein et al., 2001). Elle peut être activée dans des cellules ρ^0 ou lors de mutations de certains gènes de la chaîne de PhosOx comme *COX4*. Une conséquence de l'activation de cette voie est le prolongement de la DVR (Kirchman et al., 1999). Ce gain de longévité nécessite la présence des gènes *RTG2* et *GCN5*, suggérant l'implication des facteurs de transcription Rtg1p et Rtg3p (Jazwinski, 2005).

3. Le vieillissement chronologique

Les premiers travaux s'intéressant à la durée de vie chronologique sont ceux sur les champignons filamenteux *Neurospora crassa* et *Podospora anserina*. De nombreuses conditions modifiant la durée de vie de ces champignons multicellulaires ont été étudiés dans les années 70 (Esser et Keller, 1976; Munkres et Minssen, 1976) ; des mutants de DVC rallongés ont ainsi été isolés sans toutefois trouver les gènes responsables (Osiewacz, 1997). En utilisant *Neurospora crassa*, Munkres et collaborateurs ont identifié des loci dominants liés à un phénotype de durée de vie raccourcis (Munkres et Furtek, 1984). La publication des premiers articles de mesure de longévité chronologique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, à la fin des années 90, marquera le début d'une nouvelle popularité pour cette approche dans ce modèle (Longo et al., 1996).

a) La phase stationnaire

La DVC mesure le temps que survit une population de levures une fois qu'elle est entrée en phase stationnaire (Figure 3B) (Fabrizio et Longo, 2003). Cette période succède à la phase qui suit le changement diauxique (post-diauxique) (Figure 6A). Le changement diauxique correspond à un passage du métabolisme énergétique par fermentation glycolytique majoritaire vers la respiration mitochondriale, il est aussi marqué par un ralentissement du cycle cellulaire (Fabrizio et Longo, 2003). La phase stationnaire est déterminée par l'absence de source de carbone et l'arrêt de multiplication des cellules (Figure 4B et 6A) (Werner-Washburne et al., 1993). Les cellules sont alors dans un état

végétatif non-prolifératif qui succède à la phase mitotique de croissance (phase exponentielle et post-diauxique). Elles peuvent être considérées dans un état de différenciation qui permet la maintenance de la viabilité (Werner-Washburne et al., 1993). Elles sont alors hors du cycle cellulaire dans un état appelé G_0 (Figure 4C) (Piper, 2006; Werner-Washburne et al., 1993). La quantité d'ATP disponible baisse considérablement et le taux de synthèse protéique chute d'environ 300 fois ; cet état hypo-actif est indispensable à la survie en phase stationnaire (Allen et al., 2006; Osório et al., 2005; Paz et Choder, 2001).

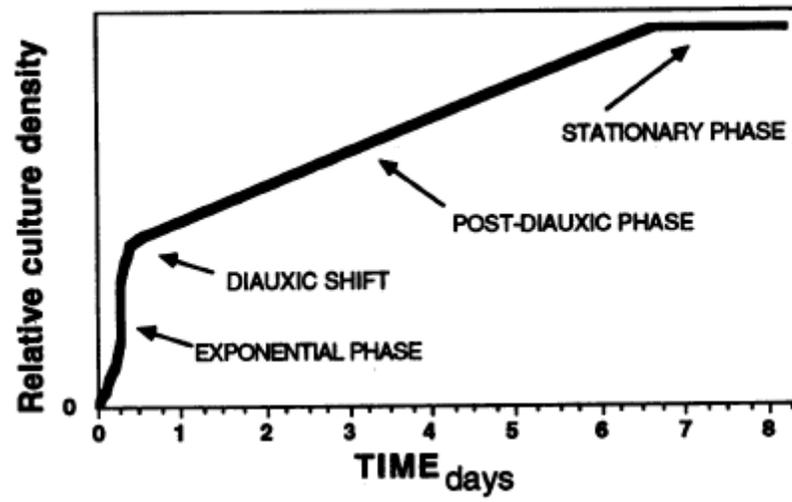
Dans la nature, les levures restent la majorité du temps en phase stationnaire (en G_0); elles ne reviennent dans le cycle mitotique seulement lorsque des nutriments carbonés sont disponibles (Fabrizio et Longo, 2003). Notons que parmi les cellules qui entrent en phase stationnaire, une minorité des diploïdes forment des spores par méiose (Fabrizio et Longo, 2003). Les spores représentent un autre état végétatif haploïde des cellules qui leur permet de résister à environnement hostile et à une longue période de jeûne (Fabrizio et Longo, 2003; Neiman, 2005).

La durée de vie chronologique est mesurée à partir du début de la phase stationnaire. Selon les protocoles, elles sont laissées dans leur milieu ou transférées dans l'eau (Bonawitz et al., 2007; Fabrizio et Longo, 2003). Ensuite la survie est estimée par comptage des cellules capables de former une colonie (réentrée dans le cycle cellulaire) après dilution et repiquage sur milieu solide riche (Fabrizio et Longo, 2003). Le nombre de cellules vivantes au cours du temps est rapporté sur le nombre de cellules vivantes au temps initial. On peut aussi mesurer la viabilité en regardant la repousse en milieu liquide (Powers et al., 2006). Plus il y a de cellules vivantes, plus la repousse est rapide. Une autre méthode est l'utilisation de marqueurs fluorescents de l'activité métabolique comme la phloxine B (Peck et al., 1997) ou le FUN-1 (Fabrizio et Longo, 2003). Ils ont permis de vérifier que le protocole de comptage des colonies donnait des mesures de survie rationnelles (Fabrizio et Longo, 2003). Plusieurs fonctions ont été liées à la régulation de la DVC.

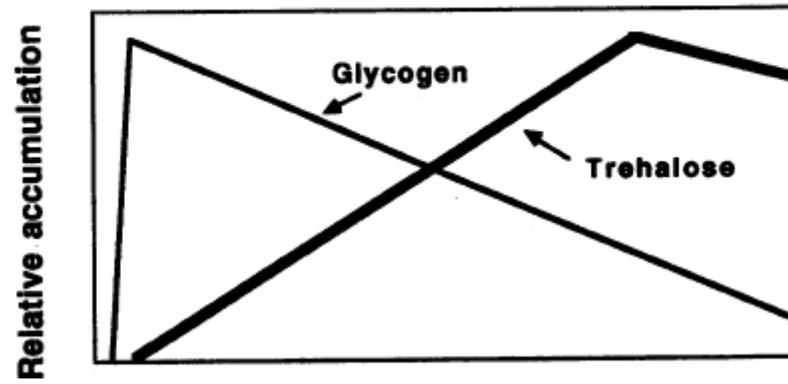
Figure 6 : Courbe de croissance de la levure à bourgeonnement. Figure tirée de (Werner-Washburne et al., 1993). A, cette courbe est tracée selon la densité cellulaire en fonction du temps. Elle met en valeur les différentes étapes de la croissance d'une culture : phase exponentielle (ou logarithmique), changement diauxique, phase post-diauxique, phase stationnaire. Les mêmes phases existent dans la levure *S. pombe*. B, Synthèse et utilisation des sources de carbone secondaire, glycogène et tréhalose, au cours de la croissance de la culture.

Figure 6

A



B



b) La signalisation des nutriments

L'absence de nutriments essentiels déclenche un remaniement du métabolisme énergétique des levures, c'est le changement diauxique (Figure 6A) (Herman, 2002). Cette étape correspond au début de l'utilisation du glycogène accumulé pendant la phase exponentielle, à l'accumulation de tréhalose qui sera ensuite consommé en phase stationnaire (Figure 6B), à l'augmentation de l'activité mitochondriale et à l'arrêt progressif du cycle cellulaire en G₁ (Herman, 2002; Werner-Washburne et al., 1993). Ce passage est inhibé par les voies de signalisation des nutriments (Boy-Marcotte et al., 1998; Herman, 2002). L'une d'elles est la voie Cyr1/PKA qui est activée par le récepteur de glucose Gpr1p et par Ras2p (Santangelo, 2006; Xue et al., 1998). L'activité de cette voie contrôle notamment l'accumulation et l'utilisation du glycogène et du tréhalose lors du changement diauxique (Boy-Marcotte et al., 1998). La suppression d'une enzyme catalysant l'utilisation du glycogène, la glycogène phosphorylase, entrave la survie en phase stationnaire (Favre et al., 2008). La présence de nutriments est un facteur connu pour être activateur de TOR et Sch9p, toutefois le mécanisme de détection des nutriments par ces kinases est inconnu (Rohde et al., 2008). Finalement la voie de répression du glucose activée en absence de glucose intervient aussi dans le remaniement métabolique précédent l'entrée en phase stationnaire (Santangelo, 2006).

Les voies de signalisation des nutriments impliquant les sérine-thréonine kinases Sch9p et PKA ont été découvertes comme des régulateurs phares de la longévité chronologique de la levure en agissant sur plusieurs fonctions dont sa capacité de défense contre le stress (oxydatif et thermique) (Fabrizio et al., 2001). Cet effet a été atteint par la perte d'activation de PKA après délétion de l'adénylate cyclase *CYR1* et par la suppression

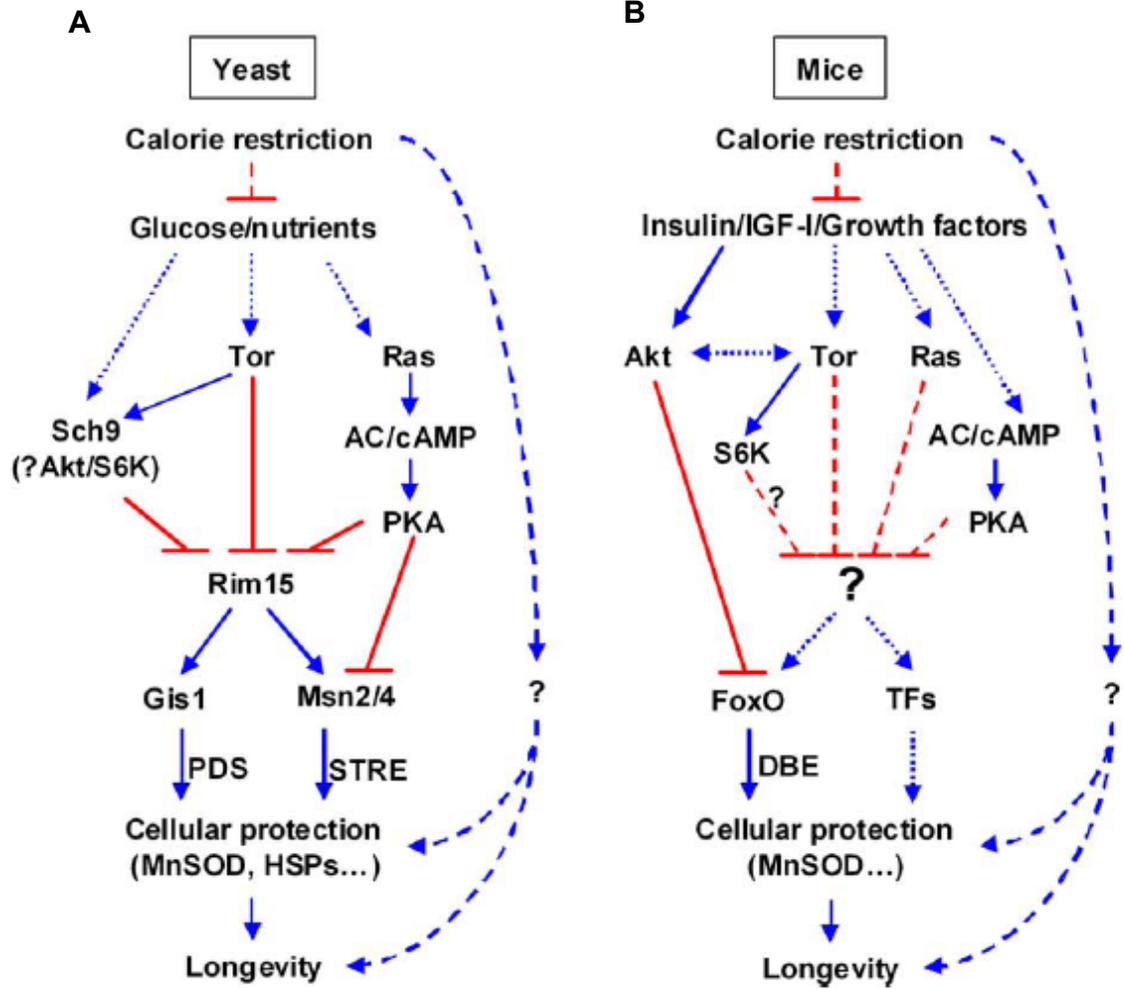
de *SCH9* (Fabrizio et al., 2001). Les activités des voies de signalisation régulées par les kinases PKA, Tor1p et Sch9p agissent de manière redondante sur plusieurs facteurs de transcription impliqués entre autres dans la résistance au stress : Msn2p, Msn4p et Gis1p (Figure 7A) (Cheng et al., 2007; Roosen et al., 2005a).

La sérine-thréonine protéine kinase Rim15p serait un intermédiaire entre le signal des kinases PKA, Tor1p et Sch9p et les facteurs de transcription Gis1p et Msn2/4p. En effet *RIM15* est requis pour l'extension de DVC par délétion de chacune de ces voies (Wei et al., 2008). Les facteurs de transcription Gis1p et Msn2/4p activent l'expression des protéines de réponse au stress, notamment pendant le changement diauxique (Cameroni et al., 2004) (Boy-Marcotte et al., 1998; Gorner et al., 1998; Smith et al., 1998). Par exemple, les motifs reconnus par ces facteurs de transcription sont présents dans le promoteur de la superoxide dismutase mitochondriale (*SOD2*) (Wei et al., 2008), un gène requis pour l'allongement de la DVC par délétion de *SCH9* ou *CYRI* (Fabrizio et al., 2003). Certaines fonctions en aval des kinases PKA et Sch9p sont régulées par ces deux enzymes de manière redondante (croissance, traduction et transcription) comme l'est la durée de vie. Cependant il existe d'autres fonctions contrôlées par PKA et Sch9p de manière antagonistes, une kinase les active alors que l'autre les inhibe (métabolisme du carbone et de l'azote, la réparation de l'ADN, le développement sexuel) (Roosen et al., 2005b).

L'effet pro-longévité de la perte de la kinase Sch9p peut être amplifié par la suppression simultanée de l'histone déacétylase Sir2p ; de manière remarquable cette action est synergique puisque seule, la délétion de *SIR2* n'allonge pas significativement la DVC (Fabrizio et al., 2005). Les auteurs proposent que dans ce double mutant, la stimulation de la synthèse de l'alcool déshydrogénase Adh2p est en partie responsable du gain de longévité par catabolisme accéléré de l'éthanol, une molécule toxique en phase stationnaire.

Figure 7 : Les voies de régulation de la longévité par les nutriments. A, Dans la levure, la signalisation des nutriments contrôlée par les kinases Sch9, Tor et Ras convergent sur l'inhibition de Rim15. Cette kinase active les facteurs de transcription Msn2, Msn4 et Gis1 qui trans-activent à leur tour la réponse au stress et la protection cellulaire, ce qui aboutit à l'allongement de la DVC (Wei et al., 2008). Une partie des effets de la RD sont attribuables à ces voies. B, dans la souris, les voies partiellement conservées de l'insuline et des homologues à l'insuline régulent négativement les facteurs de transcription de la famille FoxO à travers Akt, un homologue de Sch9. Ras et Tor fonctionnent aussi en amont de IGF-1 sans que toutefois leur rôle dans le vieillissement ne soient bien compris.

Figure 7

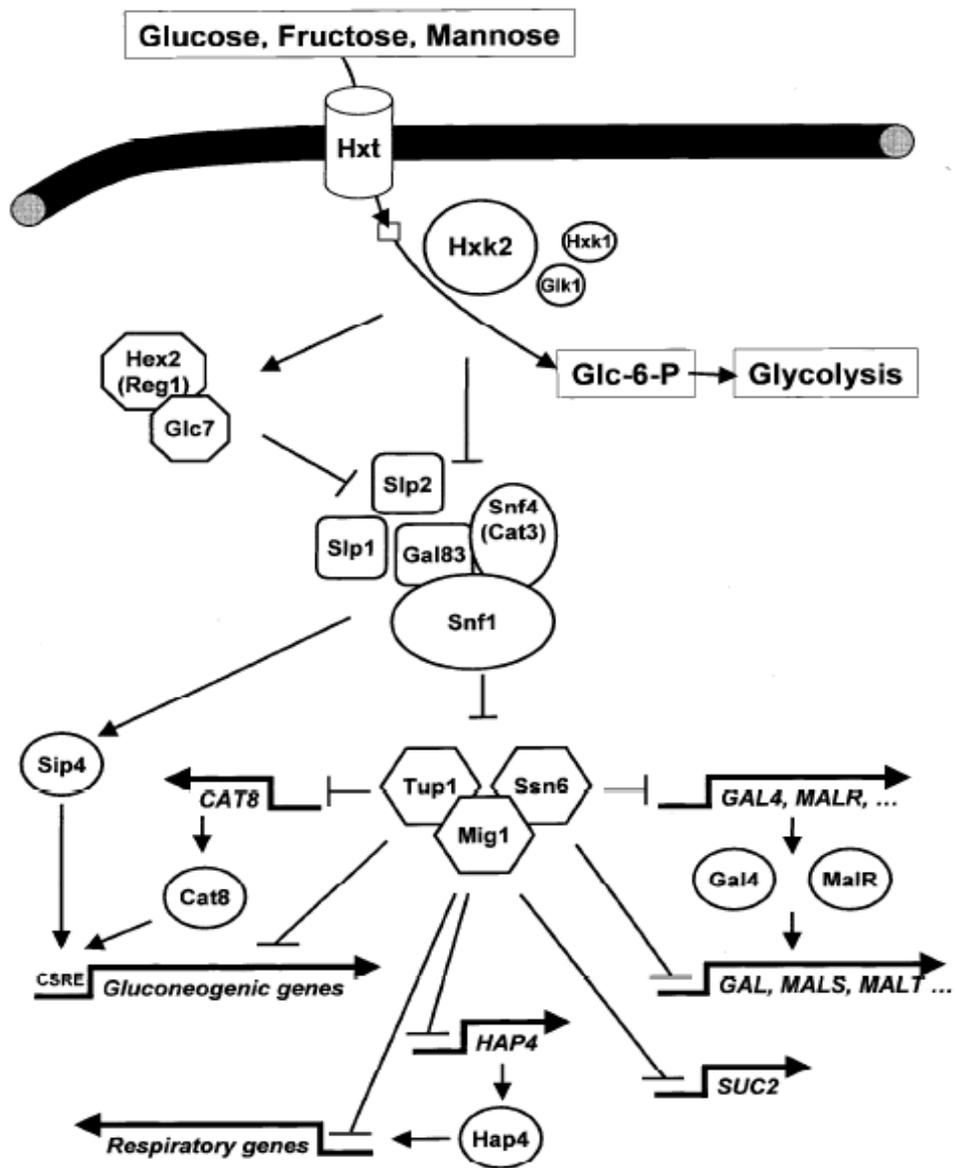


Similairement à *SCH9*, la délétion de la kinase *TOR1* étend la DVC (Bonawitz et al., 2007; Powers et al., 2006; Powers, 2007). D'autre part, la perte de plusieurs gènes de l'acquisition des dérivés azotés dont la transcription est sous le contrôle des complexes TORC1 et 2 rallongent aussi la DVC (Powers et al., 2006). Les similitudes de phénotype entre les délétions de *TOR1* et *SCH9* ont été expliquées suite à la découverte que le complexe TORC1 phosphoryle Sch9p (Urban et al., 2007). L'inhibition pharmacologique de l'activité de Tor1/2p par la rapamycine suffit pour augmenter la durée de vie (Powers et al., 2006). Il a été suggéré que Tor1p agirait sur la DVC à travers son activation du facteur de transcription Gln3p responsable de la synthèse et du transport des acides aminés puisque la délétion de *GLN3* allonge aussi la DVC (Powers et al., 2006). De plus il est connu que Tor1p contrôle en partie l'activité de ce facteur de transcription (Bertram et al., 2002). La réduction en acides aminés asparagine et glutamate ou de certains composés d'auxotrophie dans le milieu a la même conséquence sur la DVC que la limitation de l'apport en glucose, il s'agit d'une autre méthode de restriction de diète (Powers et al., 2006) (Gomes et al., 2007). Ensemble, ces données montrent que la signalisation des nutriments par Tor1p et Sch9p agissent sur la longévité en agissant sur diverses fonctions développées ci-après.

La dernière voie de signalisation des nutriments connue est la voie de répression du glucose. Elle repose sur le complexe de la kinase Snf1p (Figure 8). Son induction dépend de l'absence de glucose-6-P mais n'a pas pu être directement reliée à l'hexokinase 2 (Rollanda et al., 2002; Santangelo, 2006). Aucune étude ne montre directement son rôle dans le contrôle de la longévité chronologique de levure toutefois, il a été suggéré une fois. La délétion de l'un des trois composants du complexe promoteur de l'anaphase, *APC5*, *APC9* ou *APC10* diminue très significativement la survie en phase stationnaire (Harkness et al., 2004). Leur expression est contrôlée par les régulateurs transcriptionnels Mig1p et Mig2p, eux-mêmes activés par le complexe de Snf1p de la voie de répression du glucose (Figure 8).

Figure 8 : La voie de répression du glucose de la levure. Schéma tiré de (Santangelo, 2006). Cette voie représente un mécanisme activé en présence de glucose qui *in fine* éteint la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'utilisation de sources de carbone secondaire (galactose, maltose, glycérol, etc.), la gluconéogenèse et la respiration. La répression du glucose repose sur l'activité du complexe de Snf1 de la famille AMPK, et des inhibiteurs de transcription Mig1 et Mig2.

Figure 8



La nature de la source de carbone fournie à la levure à bourgeonnement a un effet sur sa DVC. Lorsque les levures ont été cultivées dans des concentrations similaires de glucose, fructose, galactose ou saccharose, la DVC est sensiblement la même (Smith Jr et al., 2007). Lorsqu'elles ont été multipliées en maltose, tréhalose, raffinose, glycérol ou éthanol, la DVC est environ doublée. Glycérol et éthanol sont deux sources de carbone non fermentables qui sont catabolisées uniquement par la respiration mitochondriale (Schüller, 2003) ; ceci est reconnu pour favoriser la survie en phase stationnaire (Barros et al., 2004). La raison des différences de longévité dues aux autres sources de carbone n'a pas été encore étudiée, mais on peut supposer que les voies de signalisation décrites ci-dessus sont mises en jeu.

c) La résistance au stress et la maintenance

Parmi les fonctions sous le contrôle des voies de signalisation qui agissent sur la durée de vie, on trouve la résistance au stress (Fabrizio et Longo, 2003; Fabrizio et al., 2001). Trois types de réponses ont été associés à la longévité des levures : la réponse au stress thermique, la maintenance de l'ADN et la réponse au stress oxydant.

La première et la plus anecdotique est la réponse au choc thermique. Dans un mutant d'un homologue de HSP90 de levure (*HSP82*), l'activité du facteur de transcription des gènes des chocs thermiques (*HFS*) est anormalement haute. La conséquence est une plus grande expression des chaperones *HSP35* et *HSP70*, une meilleure résistance au choc thermique et une augmentation sensible de la DVC (Harris et al., 2001). Cependant aucun lien de causalité entre l'expression des chaperones et la longévité n'a été montré.

Deux études ont suggéré que la maintenance de l'intégrité de l'ADN est requise dans la survie des levures en phase stationnaire. L'absence de kinase Sch9p a été impliquée dans la protection contre l'accumulation de mutations liées à l'âge dans le mutant de l'hélicase *SGSI*, un modèle du syndrome Werner-Bloom qui accumule un grand nombre de mutations pendant le vieillissement (Madia et al., 2008) (Madia et al., 2007). D'autre part, la délétion des enzymes avec une fonction redondante dans le système de réparation de base par excision (BER) réduit de moitié la DVC (MacLean et al., 2003).

La réponse au stress oxydatif a été plus largement reliée à la longévité. La majeure partie du stress oxydatif de la cellule provient de la fuite d'électrons vers la matrice mitochondriale lors de leur transfert dans la chaîne de respiration. Ces électrons « perdus » réagissent avec une molécule d'eau pour former des ions superoxide $O_2^{\bullet-}$ (Figure 9 et 10). L'élimination des superoxides est catalysée par les superoxides dismutases qui forment de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Perrone et al., 2008). Le peroxyde d'hydrogène est transformé en eau par la catalase. Cependant, il arrive que H_2O_2 soit dissocié en radical hydroxyle (OH^{\bullet}) par le rayonnement UV ou les réactions de Fenton et Haber-Weiss induite par les ions fers (Figure 10). L'ensemble des superoxides et des molécules réactives provenant de sa transformation s'appelle les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou radicaux libres. Les radicaux hydroxyles sont les plus toxiques car ils initient plusieurs réactions de modification des protéines qui nécessitent aussi la présence de superoxide et de dioxygène.

Figure 9 : La respiration et la production de ROS dans la mitochondrie. Représentation adaptée de (Wallace, 2005). Le pyruvate issu de la glycolyse entre dans la mitochondrie puis fournit le cycle de Krebs (ou TCA) en carbone pour la synthèse des coenzymes énergétiques de la respiration, NADH et FADH₂. Le transfert d'électrons des complexes de la chaîne de phosphorylation oxydative peut produire des ions superoxydes. Ils sont réduits en peroxyde d'hydrogène puis en eau par les Mn-superoxyde dismutases (MnSOD) et la glutathion peroxydase (GPx).

Figure 9

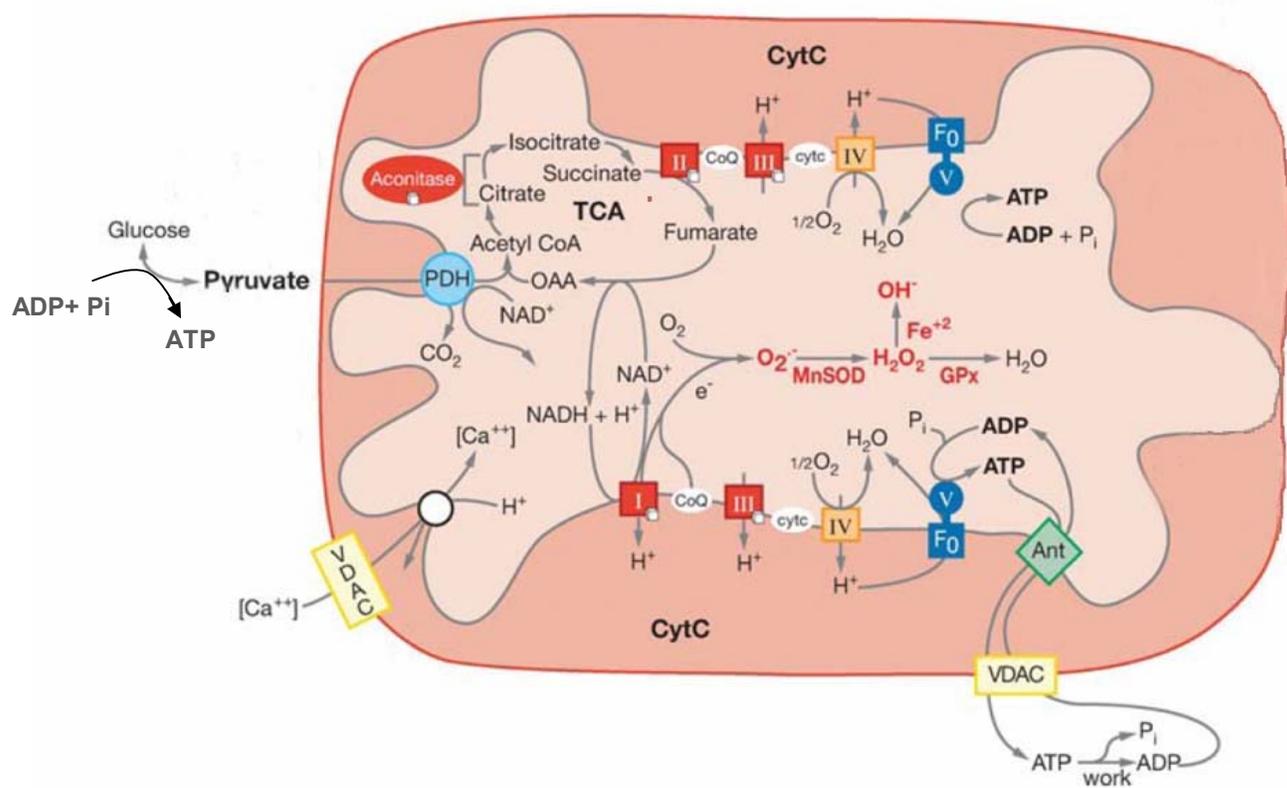
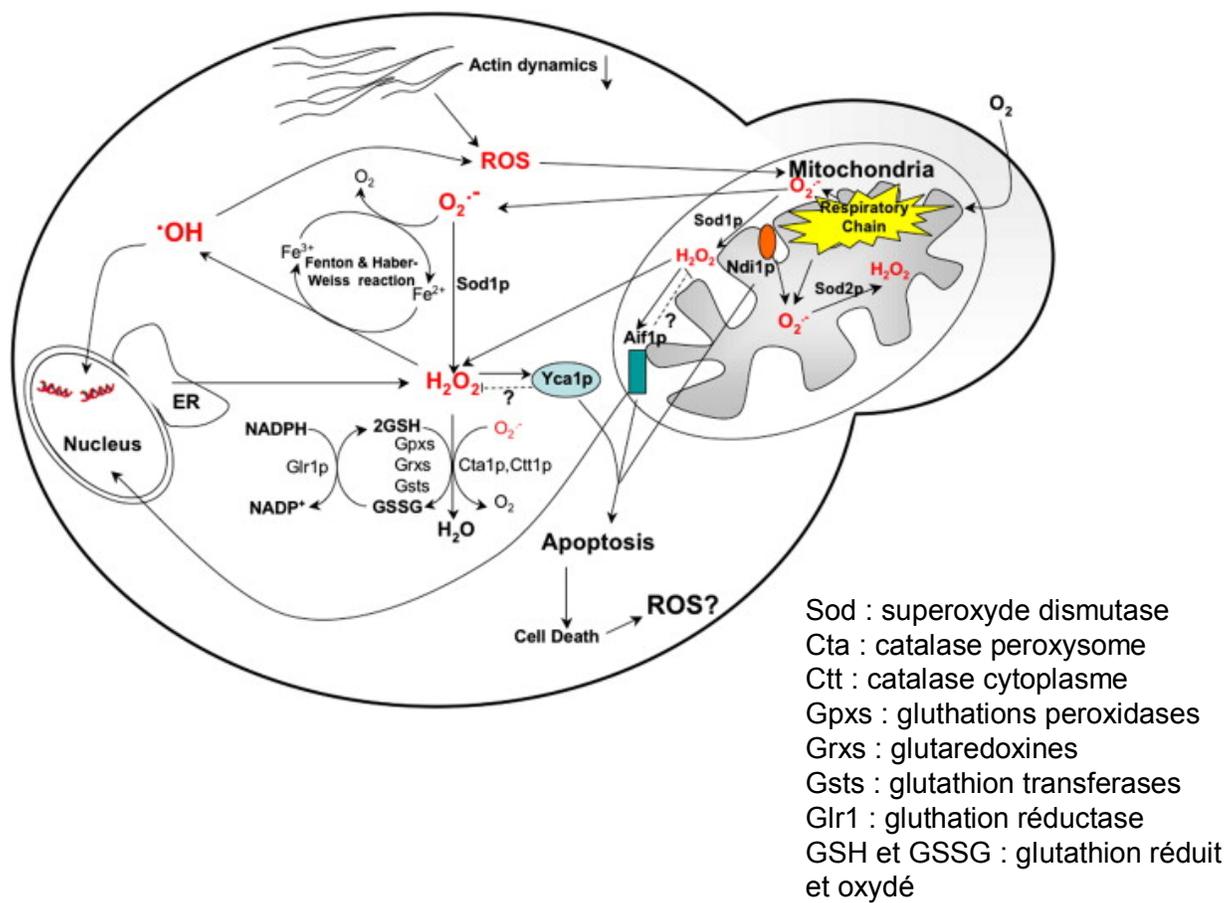


Figure 10 : Métabolisme des ROS dans la levure. Figure tirée de l'article de Perrone et collaborateur (Perrone et al., 2008). Les ROS mitochondriaux peuvent quitter la mitochondrie pour le cytoplasme. Ils sont alors éliminés via les SOD et les catalases ou sont transformés en ions hydroxyles par la réaction de Fenton et Haber-Weiss. Avec le peroxyde d'hydrogène, cette molécule est extrêmement réactive et produit de nombreuses modifications covalentes qui dénaturent les protéines et les lipides, et créent des mutations dans l'ADN. Dans les levures, les ROS déclenchent l'apoptose.

Figure 10



Ces réactions peuvent aboutir à l'oxydation des acides aminés, au clivage de la liaison peptidique ou à la carbonylation (Berlett et Stadtman, 1997). La carbonylation est un ajout sur une lysine, une cystéine ou une histidine d'un dérivé carbonyle de diverses natures : sucre réduit ou oxydé et différents aldéhydes issus de la peroxydation des lipides. Les ROS réagissent aussi avec les acides nucléiques et les lipides (Perrone et al., 2008). D'autres enzymes que les SOD et la catalase contrôlent l'accumulation des ROS ; glutathione et thioredoxine peroxydase ; glutathione synthase ; glutathione reductase, etc. (Perrone et al., 2008). L'activité de plusieurs de ces enzymes a été liée à la longévité chronologique.

Pendant la phase stationnaire, les ROS et les protéines carbonylées s'accumulent dans la levure *S. cerevisiae* (Jakubowski et al., 2000; Reverter-Branchat et al., 2004). La culture en restriction de glucose, une condition d'allongement de la vie, limite l'accumulation de peroxyde d'hydrogène et de protéines carbonylées (Tahara et al., 2007). L'entrée en phase stationnaire est caractérisée par l'utilisation du glycogène préalablement mis en réserve. L'inhibition de son utilisation par la mutation de la glycogène phosphorylase *GPH1* prévient la survie en phase stationnaire et ce phénotype est partiellement corrigé en surexprimant les *SOD1* et *2* (Favre et al., 2008). Ces résultats suggèrent l'importance de l'augmentation de la réponse au stress oxydatif lors du changement métabolique associé à la fin de la phase logarithmique de croissance. Il a été montré que la superoxyde dismutase Sod1p protégeait les enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides aminés (Wallace et al., 2004). D'autre part, l'abolition de l'activité SOD cytosolique et mitochondriale par délétions de la $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -SOD (*SOD1*) et de la Mn^{2+} -SOD (*SOD2*) entraîne une mort prématurée en phase stationnaire (Longo et al., 1996). La mutation de *SOD1* seule a un effet plus fort que celle de *SOD2*. Leur croissance en milieu respiratoire est fortement ralentie et la survie de ces mutants est partiellement retrouvée en culture anaérobie. Ceci montre une mobilisation de ces enzymes lorsque la respiration mitochondriale est sollicitée. De la même manière, la mort prématurée par

mutation de *COQ3*, un gène responsable de synthèse de l'ubiquinone, est accélérée en absence de *SOD1* (Longo et al., 1996).

d) La mitochondrie et la respiration

Chez les levures comme dans tous les eucaryotes, la mitochondrie est le siège du catabolisme du pyruvate par le cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative créatrice d'ATP (Brauer et al., 2005). Le bilan du cycle des acides tricarboxyliques est la production de CO₂ et des coenzymes NADH et FADH₂. Ces derniers seront donneurs d'électrons lors de leur oxydation par les complexes I et II de la chaîne de respiration. Le transfert d'électron par la chaîne de PhosOx produit un gradient de protons entre la matrice mitochondriale et l'espace inter-membranaire. Le complexe membranaire ATPase de type F rétablit l'équilibre du potentiel électrochimique membranaire en catalysant la synthèse d'ATP (Figure 9).

L'activité mitochondriale de certaines levures comme *S. cerevisiae* et *S. pombe* augmente quand la quantité de glucose décroît (Van Urk et al., 1990), elles sont alors dites Crabtree-positives. Lorsque les cellules ne modifient pas leur respiration en fonction du glucose, elles sont appelées Crabtree-négatives. Ensuite, pendant la phase stationnaire, la respiration diminue progressivement en même temps que la baisse d'expression des protéines mitochondriales (Samokhvalov et al., 2004) (Cheng et al., 2007). La régulation de ce changement métabolique est une étape critique pour préparer les cellules à leur survie en phase stationnaire. Tout d'abord, lors de la restriction calorique par limitation du glucose, une condition très pro-longévité, on observe une hausse de respiration concomitante (Lin et al., 2002) (Smith Jr et al., 2007) (Wei et al., 2008). Par ailleurs, la culture dans un milieu pro-respiratoire où le glucose est remplacé par le glycérol et l'éthanol augmente la durée de

vie même si les levures sont lavées et incubées dans l'eau lors de la phase stationnaire (Piper et al., 2006). Enfin plusieurs travaux soulignent l'importance des voies de signalisation des nutriments dans la régulation des fonctions mitochondriales (Bonawitz et al., 2007; Chen et Powers, 2006; Lavoie et Whiteway, 2008; Wang et al., 2004). Ces voies inhibent la respiration, et la longévité. En résumé, l'activité mitochondriale est concomitante avec l'augmentation de la longévité dans la levure.

Le transfert de cellules en prolifération d'un milieu solide avec glucose vers un milieu solide respiratoire avec du glycérol ou du galactose comme source de carbone tue 99,5 % des cellules avec une augmentation concomitante de la quantité de ROS (Ruckenstuhl et al., 2009). L'administration simultanée d'un cofacteur antioxydant, le glutathion, sauve la moitié des cellules lors de ce transfert. D'autres résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle les ROS sont une cause de la mort cellulaire. La dynamique de l'actine agit sur la polarisation des membranes mitochondriales et sur la synthèse de ROS ; inhiber cette dynamique par mutation de l'allèle de l'actine *ACT1* entraîne la mort prématurée et inversement son activation par délétion de *SCPI*, une protéine organisant les fibres d'actine, allonge la DVC (Gourlay et al., 2004). Une autre étude suggère l'importance du contrôle des ROS. Une mutation dans l'ARN polymérase mitochondriale induit une perte de traduction de plusieurs protéines de la chaîne de PhosOx (Bonawitz et al., 2006). Ceci est corrélé avec une réduction de la respiration, une augmentation de synthèse de ROS au premier jour en phase stationnaire, et une perte de viabilité chronologique. De manière remarquable, le niveau de ROS, le taux de respiration et la survie peuvent être recouverts dans ce mutant par la surexpression de *SOD2* mettant en cause le stress oxydatif. Finalement, un emballement de la production de H₂O₂ peut être obtenu par délétion de la synthèse du NAD⁺ dans les mutants du recyclage du nicotinamide (*pnc1Δ*, *npt1Δ*, and *bnaf6Δ*); ceci prévient l'augmentation de DVC par restriction de glucose (Tahara et al., 2007).

Toutefois il existerait une régulation de la durée de vie liée à la respiration et indépendante de la réponse au stress oxydatif et de l'accumulation des protéines carbonylées. Tout d'abord, la perte de la kinase Tor1p induit une augmentation de la respiration et une activation de la traduction des protéines codées par l'ADN mitochondrial ; ceci est suivi d'un gain de longévité (Bonawitz et al., 2007). Cet allongement de DVC n'est pas dépendant de la présence de superoxide dismutase mitochondriale (*SOD2*) mais est concomitant avec une baisse de la synthèse de ROS. Les auteurs proposent que, dans ce cas, le contrôle du renouvellement des composants de la chaîne de PhosOx soit responsable de l'allongement de la DVC. Le fait que la suppression de gènes de la chaîne de respiration, comme *ATP1*, *ATP3* (ATPase), *CAT5* ou *COQ3* (biosynthèse de l'ubiquinone), *QCR7*, *RIP1*, *SDH4*, *COR1* (chaîne de transport d'électrons), ou du cycle de Krebs avec *KGD1*, abolisse la survie en phase stationnaire appuie l'hypothèse de Bonawitz et collaborateurs dans le sens où l'intégrité de ce complexe serait primordial pour maintenir la survie (Allen et al., 2006; Francis et al., 2007; Longo et al., 1996).

A l'inverse, d'autres résultats suggèrent que l'allongement de la DVC n'est pas nécessairement lié à une faible quantité de ROS. L'addition d'une deuxième copie de l'alcool déshydrogénase *ADHI* accroît la DVR et la DVC (Reverter-Branchat et al., 2007). Ceci succède à l'induction de la respiration et de la synthèse des enzymes anti-oxydantes catalase, Sod1p et Sod2p. Cependant les auteurs ont aussi observé une plus grande synthèse de ROS dans ce mutant. Dans une autre étude, la surexpression de Pep4p, une protéase vacuolaire améliore le renouvellement des protéines carbonylées mais n'augmentent pas la DVC. Par contre sa mutation baisse considérablement la DVC et accélère l'accumulation de protéines carbonylées (Marques et al., 2006).

Au regard des données actuelles, la corrélation entre respiration et longévité chronologique chez la levure semble claire. Une étude dans la levure Crabtree-négative, *Kluiveromyces lactis* renforce cette association. Étonnamment, la restriction calorique par limitation du glucose n'a pas d'effet sur la durée de vie de cette espèce (Oliveira et al.,

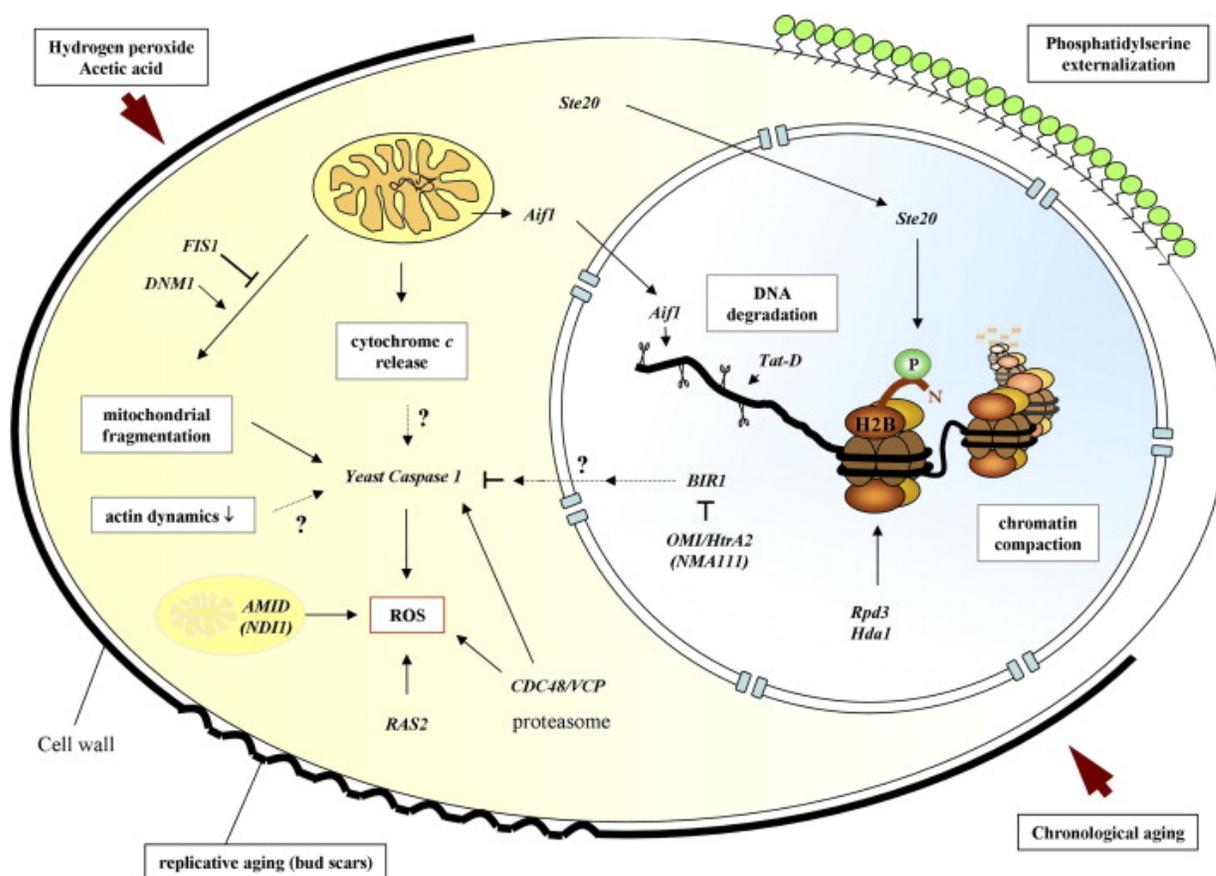
2008). Ceci suggère que l'augmentation de la durée de vie passe par une régulation de la mitochondrie. Toutefois, si l'activité mitochondriale est toujours concomitante avec la longévité dans la levure Crabtree-positive, ce n'est pas toujours le cas de l'accumulation des ROS ou de l'intensification de la réponse au stress oxydatif.

e) L'apoptose

L'apoptose a été découverte chez le nématode, puis très étudiée chez les mammifères et ce n'est que plus tard qu'on a étudié ce phénomène chez les levures. Les marqueurs typiques de ce type de mort cellulaire ont été trouvés chez la levure *S. cerevisiae* : clivage de l'ADN, condensation typique de la chromatine, externalisation de la phosphatidylsérine sur le feuillet externe de la membrane plasmique et libération du cytochrome c de la mitochondrie (Madeo et al., 2004). Malgré cela, nombreux doutaient de l'existence d'une mort programmée dans un organisme unicellulaire. Plusieurs facteurs externes induisent le phénotype d'apoptose chez la levure *S. cerevisiae* : expression hétérologue de protéines pro-apoptotiques de mammifères comme Bax ; traitement au H₂O₂ ou à l'acide acétique en faible dose ; traitement au chlorure de sodium ou à l'aspirine. La découverte d'un homologue de caspase chez les levures termina de faire accepter l'existence de ce mécanisme dans la levure. Cette protéine a été nommée métacaspase Yca1p (Madeo et al., 2002). Les facteurs endogènes pro-apoptotiques connus sont la métacaspase Yca1p; Nma111p (homologue de la sérine protéase HtrA2/Omi de mammifères), Bir1p (Survivin), cytochrome c, Aif1p (AIF), Nuc1p (EndoG), histone 2B et Ndi1p (AMID) (Figure 11) (Carmona-Gutierrez et Madeo, 2006; Madeo et al., 2004; Perrone et al., 2008). Les phéromones de type sexuel facteur- α induisent l'apoptose (Eisenberg et al., 2007), de même que l'arrêt provoqué de réplication de l'ADN ou l'accumulation de dommages dans l'ADN (Madeo et al., 2004).

Figure 11 : Les facteurs endogènes et exogènes déclenchant l'apoptose de levure. Schéma repris de (Carmona-Gutierrez et Madeo, 2006). Certains facteurs exogènes enclenchent le programme apoptotique fongique comme l'acide acétique et le peroxyde d'hydrogène. D'autres sont endogènes : vieillissement chronologique et réplicatif, ROS, baisse de dynamique de l'actine et libération du cytochrome c, etc. La mort programmée de levure emprunte selon les cas différentes voies, certaines sont dépendentes de la métacaspase Yca1, d'autres non.

Figure 11



La mitochondrie est un organe central dans le déclenchement de l'apoptose chez les mammifères et chez les levures (Eisenberg et al., 2007). La perte de la respiration par mutation du cytochrome c ou par suppression de l'ADN mitochondrial (cellule ρ^0) prévient partiellement à totalement l'apoptose induite par l'acide acétique ou par le facteur- α (Eisenberg et al., 2007). La production de ROS a été proposée pour être une étape de la succession d'évènements qui aboutissent à la mort cellulaire par apoptose (Madeo et al., 2004; Perrone et al., 2008). Cette production précéderait la baisse d'activité du cytochrome c oxydase et succéderait à la libération du cytochrome c dans le cytoplasme. De plus les ROS sont à la fois nécessaires et suffisant au déclenchement de l'apoptose (Madeo et al., 1999). L'amplification du stress oxydatif consécutive entraîne une activation de l'apoptose et la mort prématurée en phase stationnaire.

De nombreuses études soulignent le lien entre régulation de l'apoptose et durée de vie chronologique chez *Saccharomyces cerevisiae*. Un taux d'apoptose élevé est souvent corrélé à une DVC raccourcie. A l'inverse, provoquer la perte de protéines pro-apoptotiques peut augmenter la longévité. Par exemple, la suppression de la métacaspase Yca1p améliore sensiblement la survie chronologique de la population à court terme et inhibe l'apparition des marqueurs apoptotiques ce qui confirme que les cellules vieillissantes meurent au moins en partie d'apoptose (Herker et al., 2004). On peut spéculer qu'une surproduction de ROS par détérioration de la chaîne PhosOx active l'apoptose qui accélère la mort cellulaire. De manière intéressante, laissée en phase stationnaire à long terme, une souche sans $\Delta yca1$ repousse moins bien que le sauvage, suggérant un avantage sélectif de l'apoptose. Dans un autre travail, la suppression de *YCA1* empêche la mort prématurée en phase stationnaire par délétion de l'enzyme de décoiffage des ARN messagers (Mazzoni et al., 2005). La levure possède deux homologues d'AMID de mammifères (inducteur de mort homologue d'AIF associé à la mitochondrie) nommés *NDH1* et *NDE1*. La délétion de chacun de ces gènes pro-apoptotiques augmente la DVC à l'instar de *YCA1* (Li et al., 2006). Des cellules dont on inhibe la N-glycosylation par un

traitement à la tunicamycine ou par la mutation d'une oligosaccharyltransférase (*wbp1-1*) présentent les phénotypes d'apoptose (Hauptmann et Lehle, 2008). La délétion de la protéase *KEX1* dont l'activité est dans le lumen du Golgi protège de la toxicité par inhibition de la N-glycosylation ; ceci coïncide avec une baisse des phénotypes apoptotiques. D'autre part la perte de cette protéine pro-apoptotique allonge sensiblement la durée de vie chronologique.

De la même manière, l'expression ectopique d'une protéine anti-apoptotique de mammifère BCL-x_L dans la levure non seulement baisse l'accumulation de ROS mais prolonge la vie. Cet effet est encore plus marqué après délétion des trois transporteurs d'ATP (*AAC1/2/3*) qui meurt prématurément en phase stationnaire (Trancíková et al., 2004).

La finalité de la fonction apoptotique dans un organisme unicellulaire est sujette à débat puisqu'elle apporterait un avantage à la population et non à l'individu, idée peu acceptée par les spécialistes de l'évolution. Une hypothèse proposée par différentes équipes est que les cellules vieilles se « suicideraient » pour (i) ne pas entrer en compétition pour les nutriments alors que leur potentiel réplcatif est faible voir nul, (ii) fournir des nutriments aux cellules jeunes avec leurs propres composants (Allen et al., 2006; Fabrizio et al., 2004a). Cette idée est appuyée par le fait que dans une colonie de levures, les cellules plus vieilles du centre peuvent entrer en apoptose alors que celles en développement à la périphérie n'en font pas (Palková et Váchová, 2006; Vachova et Palkova, 2005).

III. Pertinence de l'utilisation d'un modèle fongique pour comprendre le vieillissement eucaryote

Le but premier des systèmes modèles est de simplifier les études biologiques pour comprendre des mécanismes universels qui seraient conservés entre les espèces incluant l'homme. Le vieillissement est l'une de ces fonctions et la communauté scientifique est encore loin d'avoir déchiffré ses causes moléculaires chez les mammifères. La principale barrière est la lenteur des recherches de par la grande longévité des modèles murins ou primates. Dans ce contexte, la levure s'est imposée comme un outil de choix pour donner des directions aux études sur les modèles multicellulaires.

1. Comparaison des vieillissements répliatif et chronologique

L'existence de deux méthodes de mesure du vieillissement chez la levure pose d'emblée les interrogations sur leur différence et sur les avantages que chacune apporte. Existe-t-il des différences entre les mécanismes permettant de réguler la longévité répliatif et chronologique ?

a) Les fonctions communes

Chez *S. cerevisiae*, certaines manipulations agissent à la fois sur la DVR et la DVC suggérant que des mécanismes similaires régulent ces deux fonctions. Le premier exemple

vient de la restriction calorique qui augmente à la fois la DVR et la DVC (Fabrizio et al., 2005; Jiang et al., 2000; Wei et al., 2008). De plus, l'inhibition des voies de signalisation des nutriments régies par les sérine-thréonines kinases *PKA*, *TOR* et *SCH9* augmentent la DVR (Kaeberlein et al., 2005c; Lin et al., 2000; Medvedik et al., 2007) et la DVC (Bonawitz et al., 2007; Fabrizio et al., 2001). Les délétions des superoxydes dismutases cytosolique (*SOD1*) et mitochondriale (*SOD2*) réduisent la DVR et la DVC (Barker et al., 1999; Longo et al., 1996).

b) Les fonctions spécifiques

Toutefois de nombreux autres résultats soulignent aussi des divergences. Les souches de levures *S. cerevisiae* isolées dans la nature ont des longévités répllicative et chronologique variables (19 à 36 divisions et 3 à 17 jours) (Qin et Lu, 2006). Aucune corrélation n'a été trouvée entre ces deux mesures. De plus, dans les souches de laboratoire, certains mutants augmentent la capacité répllicative sans influencer la survie en phase stationnaire.

L'activation de la respiration est primordiale dans l'allongement de la DVC (Barros et al., 2004; Bonawitz et al., 2007; Bonawitz et al., 2006) mais n'est pas requise pour l'extension de la DVR (Kaeberlein et al., 2005a; Lavoie et Whiteway, 2008). Plus étonnant encore, des cellules ρ^0 ont une DVR allongée lorsque la réponse rétrograde est mise en route (Jazwinski, 2005; Kim et al., 2004). De plus, la surexpression de la superoxyde dismutase mitochondriale *Sod2p* ou de la catalase *Ctt1p* augmente la DVC de levures cultivées glycérol ; toutefois respectivement elles baissent la DVR ou ne la modifient pas (Harris et al., 2005; Harris et al., 2003). L'intégrité des fonctions mitochondriales et de l'accumulation des ROS apparaît critique pour la DVC sans l'être pour la DVR.

L'histone déacétylase Sir2p a un effet inverse sur la DVR et la DVC. Son activation par surexpression augmente la DVR (Lin et al., 2002) alors qu'il faut la supprimer par délétion pour rallonger la DVC (Fabrizio et al., 2005).

2. Comment peut-on concilier DVR et DVC ?

Les résultats énumérés ci-dessus montrent que même si certaines fonctions régulent à la fois le nombre de divisions d'une levure et sa maintenance en phase stationnaire, bien d'autres mécanismes sont spécifiques à la régulation de la durée de vie répllicative ou chronologique. Une comparaison de la DVR et de la DVC a été réalisée sur 579 délétions chez *S. cerevisiae* (Laun et al., 2006). La conclusion de l'étude a confirmé que la plupart des gènes, quand ils ont un effet pro-longévitité, agissent spécifiquement sur l'une ou l'autre de la DVR ou DVC. Ainsi, 44 mutants avaient une DVR plus longue, 73 une DVC plus longue et parmi eux seulement 5 avaient à la fois une DVR et une DVC rallongée. Une hypothèse pourrait être que les causes du vieillissement chronologique sont différentes de celles du vieillissement réplcatif, mais qu'une même voie (par exemples celles des détections des nutriments) peut réguler ces deux mécanismes.

Cette idée est mise en doute par trois études indépendantes. La première montra que la DVR diminuait progressivement en fonction du temps passé par les cellules en phase stationnaire (Ashrafi et al., 1999). Ceci a été confirmé par la démonstration que l'allongement de la DVC par induction de la respiration augmente aussi la DVR des cellules prises en phase stationnaire (Piper et al., 2006). Ce résultat soutient l'hypothèse d'une cause commune au vieillissement chronologique et réplcatif.

Enfin une étude originale a montré qu'en phase stationnaire, les cellules vierges, n'ayant jamais donné de cellule fille (Figure 4A), sont plus quiescentes et ont une plus longue durée de vie chronologique par rapport aux cellules mères (Allen et al., 2006). Elles sont moins sujettes à l'apoptose et accumulent moins de ROS. Les auteurs ont utilisé la propriété qu'ont les cellules vierges d'être plus dense que les cellules mères pour les isoler. En comparaison les cellules mères ayant déjà produites une ou plusieurs cellules filles sont moins denses, non quiescentes et meurent plus vite en DVC. Les auteurs proposent que les cellules filles seraient programmées pour survivre et les cellules mères pour mourir et servir de nutriments aux cellules filles (Figure 4 B et C). Ce modèle suggère que la DVR serait déterminante pour la DVC.

3. Extrapolation aux eucaryotes multicellulaires

Il a été postulé que la DVC de levure représentait un modèle d'étude du vieillissement des cellules somatiques post-mitotiques et que la DVR permettrait de comprendre la durée de vie des cellules mitotiques telles que les cellules souches (Laun et al., 2006). *A posteriori*, ces deux méthodes de mesure de la longévité sont fiables. D'abord la restriction calorique a des effets sur la DVR et la DVC des levures et augmentent aussi la longévité des métazoaires (Kaeberlein et al., 2005c). De plus, les études des vieillissements réplicatif et chronologique ont permis chacune d'isoler la voie de signalisation des nutriments par la kinase Tor. Or, c'est un mécanisme conservé qui régule aussi la durée de vie dans la drosophile et le nématode (Blagosklonny, 2008) et elle semble impliquée dans l'allongement de la vie de la souris naine Ames (Sharp et Bartke, 2005). La kinase Sch9p sous le contrôle du complexe Tor dans la levure a été proposée pour être l'orthologue de la kinase mammifère S6K1 (Urban et al., 2007) ; il serait intéressant de voir si cette kinase est

impliquée dans la durée de vie des mammifères. Enfin la souris déficiente en adénylate cyclase de type 5 vit plus longtemps et est plus résistante au stress (Yan et al., 2007). Ce phénotype avait été observé dans la levure $\Delta cyr1$ sans adénylate cyclase régulant PKA (Figure 7 A et B) (Fabrizio et al., 2001).

Toutefois, devant un manque incontestable de données, il est encore difficile d'évaluer entre la maintenance des cellules somatiques (chronologique) et le renouvellement de tissus (réplicatif) lequel est le plus important pour réguler le taux vieillissement chez les mammifères.

Des travaux récents chez la souris suggèrent l'importance du renouvellement des tissus dans la régulation de la durée de vie moyenne des murins. L'équipe du Dr. Blasco a montré qu'une expression constitutive de la télomérase transcriptase-inverse (TERT) augmente la longévité moyenne des souris de 40 % à condition qu'elles soient protégées du cancer par surexpression de suppresseurs de tumeurs (Tomás-Loba et al., 2008). Les auteurs montrent aussi que les mêmes mutations augmentent la capacité répliquative de cellules souches embryonnaires vieillissantes *in vitro*. Cependant, ces manipulations n'ont pas pu augmenter la durée de vie maximum. D'autres recherches sur la longévité répliquative des cellules souches sont en cours dans les laboratoires des Dr. Guarente et Brunet (données non publiées), le premier étudiant l'implication du gène SirT1 et l'autre celle des facteurs de transcription de la famille FOXO.

De plus, plusieurs mutants de souris avec une modification de la régulation de protéines de la chaîne PhosOx de la mitochondrie ou du stress oxydatif ont une durée de vie allongée. Les gènes en cause sont mCLK1, (Liu et al., 2005), mSURF1 (Dell'Agnello et al., 2007) et mP66^{shc} (Migliaccio et al., 1999). Or comme décrit précédemment, les fonctions

mitochondriales régulent spécifiquement la DVC de la levure. D'autre part, ces mêmes fonctions sont limitantes pour la longévité du nématode, une espèce qui n'a pas de renouvellement de tissu (Muller et al., 2007).

En résumé, les études du vieillissement de levure par la mesure de leur longévité chronologique et réplivative semblent toutes deux pertinentes puisque, dans une certaine mesure, conservées aux animaux multicellulaires. D'autre part, les analyses de ces deux aspects du vieillissement sont différentes mais complémentaires.

IV. Le vieillissement chez *Schizosaccharomyces pombe*

1. La levure *Schizosaccharomyces pombe*, modèle d'étude des cellules eucaryotes

La levure *Schizosaccharomyces pombe* ou levure à fission fut isolée la première fois dans une bière en Afrique par P. Lindner en 1893 (Forsburg, 1995). La souche sauvage de référence (appelée h⁻972), séquencée depuis 2002 et utilisée en laboratoire a pourtant une autre origine. Elle a été diffusée dans les années 40 par Urs Leupold depuis une collection suisse. Cette souche aurait été isolée d'un vin français par A. Osterwalder en 1924 qui l'appela *S. pombe var liquefaciens* (Forsburg, 1995). Elle doit donc génétiquement différer de la souche originellement observée en Afrique qui lui a donné son nom. « pombe » signifie *bière* en Swahili, une tribu d'Afrique de l'est. « schizo » du grec « σχίζειν » veut dire *fractionner - fendre*. *Saccharomyces* est un genre de levure ne donnant pas de mycélium. *Schizosaccharomyces pombe* est ainsi la levure de bière africaine qui se fractionne et qui ne fait pas de mycélium.

Une étude phylogénétique basée sur la séquence d'une HMG-CoA reductase montra que le groupe taxonomique *archiascomycotina* dont elle fait parti a divergé au cours de l'évolution du groupe *hemiascomycotina* dont provient *S. cerevisiae* 330 à 420 millions d'années auparavant (Lum et al., 1996; Sipiczki, 2000). Elles ont donc eu autant de temps pour évoluer indépendamment. Cette distance évolutive les séparent l'une de l'autre autant qu'elles le sont chacune de leur ancêtre commun avec les animaux. Le modèle *S. pombe* apporte donc un outil complémentaire de la levure à bourgeonnement. Le Pr. Paul Nurse a notamment tiré avantage de cette espèce pour comprendre les mécanismes des kinases

dépendantes des cyclines régissant la division cellulaire qui ont par la suite été extrapolés à tous les eucaryotes ; il fut honoré du Prix Nobel en 2001 pour ses découvertes.

En 2004, *S. pombe* n'avait jamais été utilisée pour étudier le vieillissement chronologique. Certes, quelques gènes nécessaires à la survie en phase stationnaire avaient été décrits, néanmoins aucun mutant ayant l'effet inverse d'allonger la durée de vie n'était connu. En se basant sur les études menées chez *S. cerevisiae* et sur les mutants raccourcissant la durée de vie en phase stationnaire, on peut faire émerger plusieurs fonctions de *S. pombe* qui pourraient influencer la longévité chronologique. Une revue des connaissances disponibles sur ces fonctions suit.

2. Récapitulatif des connaissances sur les fonctions de *S. pombe* influençant potentiellement sa longévité chronologique

a) Source de carbone et entrée en phase stationnaire

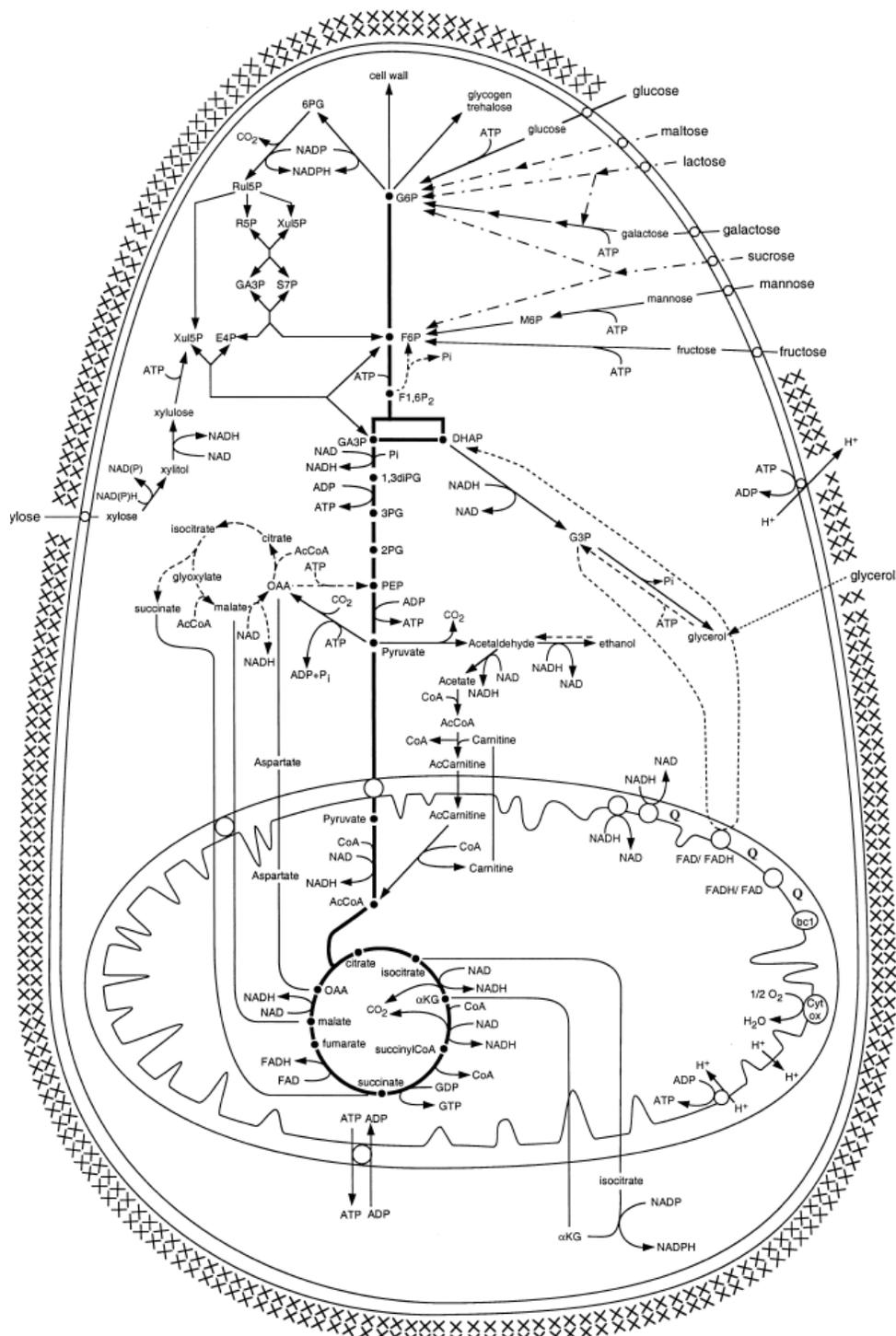
Le métabolisme de la levure *Schizosaccharomyces pombe* a été moins étudié en comparaison avec sa cousine *Saccharomyces cerevisiae* (Flores et al., 2000). On peut quand même sortir de la littérature quelques indices qui nous donnent une idée des voies enzymatiques qui permettent à cette levure d'assimiler énergie et carbone.

Six transporteurs de glucose ont été clonés chez *S. pombe* (*ght1-6⁺*), ils reconnaissent le fructose mais avec une affinité moindre ; le glucose étant la source de

carbone préférée (Flores et al., 2000). Ces transporteurs peuvent aussi permettre l'entrée d'autres carbohydrates comme le gluconate et le δ -gluconolactone qui tous deux sont métabolisables. Également, elle possède un gène codant une invertase membranaire permettant le catabolisme des disaccharides comme le saccharose. Il est hydrolysé en un glucose et un fructose qui seront internalisés via les transporteurs Ght (Flores et al., 2000; Heiland et al., 2000). Une fois dans le cytoplasme, le glucose est phosphorylé par les hexokinases. Deux hexokinases ont été identifiées et caractérisées (Petit et al., 1996), ceci est développé dans la partie « Loss of hexokinase 2 activity decreases glucose metabolism, increases glucose signalling and promotes aging » du deuxième article de cette thèse. La régulation de ces enzymes se distingue de celles de la levure à bourgeonnement parce qu'elles ne sont pas inhibées par le tréhalose-6-phosphate (Petit et al., 1996). La glycolyse a été liée à la progression du cycle cellulaire par la surexpression d'un mutant tronqué de la phosphofructokinase qui arrête la levure en G2/M (Flores et al., 2000). Les glyceraldéhyde 3-phosphate, fructose-1,6-bisphosphate aldolase, triose phosphate isomérase, phosphoglycérate mutase, émolase et pyruvate kinase ont toutes été clonées chez *S. pombe* (Flores et al., 2000). Elles correspondent à autant de preuves que la glycolyse de cette levure est relativement conservée, sinon pour quelques détails, à celle des autres levures ; le schéma général des réactions de cette voie métabolique est disponible en Figure 12.

Figure 12 : Principales voies métaboliques de la levure. Représentation tirée de (Flores et al., 2000). Sur ce schéma sont présentés les métabolites des principales voies métaboliques énergétiques des levures. On distingue : au centre la glycolyse, au milieu à gauche le cycle du glyoxylate, à droite l'entrée du glycérol dans la glycolyse, au milieu la synthèse d'éthanol et d'acétaldéhyde et dans la du glyoxylate.

Figure 12



La levure à fission peut pousser sur milieu pro-respiratoire avec du glycérol en source de carbone (Heslot et al., 1970). Elle est cependant incapable d'utiliser de nombreux substrats comme source de carbone qui sont pourtant métabolisables par d'autres espèces. C'est le cas du lactate, de l'éthanol, du malate et du pyruvate même s'ils sont plus ou moins oxydés et dégradés (tous sauf L-lactate et pyruvate qui sont ne sont pas du tout transformés) (Heslot et al., 1970). L'éthanol est utilisable comme substrat par la mitochondrie grâce à deux alcool déshydrogénases (*adh1p* et *adh4p*) (Crichton et al., 2007) mais avec une faible efficacité ; ceci pourrait être expliqué par l'absence de cycle glyoxylate dans cette espèce (Figure 12) (Flores et al., 2000).

Les enzymes de synthèse du tréhalose et du glycogène ont été clonées (Paredes et al., 2003; Plyte et al., 1996). Aussi, l'expression de ces enzymes est dépendante de la voie des protéines kinases activées par le stress (SAPK) dont l'activité est obligatoire à une bonne entrée en phase stationnaire (Vivancos et al., 2006). Ceci laisse penser que le même remaniement métabolique que *S. cerevisiae* semble avoir lieu au changement diauxique, soit l'utilisation des sources de carbones stockées pendant la phase exponentielle de croissance. En conclusion, le métabolisme global est proche de celui de *S. cerevisiae*, mais plusieurs points les différencient comme la régulation de l'interdépendance fermentation-activité mitochondriale, le cycle glyoxylate ou l'utilisation de sources de carbones secondaires.

Une autre différence de taille entre ces deux espèces est que la levure à bourgeonnement arrête son cycle cellulaire en G_1 (1n copies de l'ADN) pour l'entrée en phase stationnaire (G_0) alors que la levure à fission s'arrête en G_2 (2n) (Weisman et Choder, 2001; Werner-Washburne et al., 1993). Cet arrêt en G_2 semble important puisque un arrêt forcé en G_1 par expression hétérologue d'une poly (ADP-ribose) polymérase humaine empêche la survie en phase stationnaire (Avila et al., 1994).

L'inhibition de la synthèse des acides gras, les triacylglycérols, qui représentent une forme de stockage de l'énergie, enclenche l'apoptose dès la phase logarithmique et entrave la bonne entrée en phase stationnaire se traduisant par une mortalité prématurée (Zhang et al., 2003). De la même manière, l'inhibition de l'utilisation des produits du triacylglycérols par suppression de l'acyl gras-coA synthétase (*icf1⁺*) raccourcie dramatiquement la DVC, son expression constitutive augmente sensiblement la DVC (Oshiro et al., 2003). Son paralogue, *icf2⁺*, codant pour une acyl gras-coA synthétase spécifique des acides myristiques a l'effet inverse. Sa délétion prolonge la survie en phase stationnaire (Fujita et al., 2007).

b) La signalisation des nutriments

Les voies de signalisation des nutriments similaires à celles décrites chez *S. cerevisiae* ont été trouvées en parallèle dans notre modèle. Il s'agit des voies PKA, TOR, SCH9 et de la répression du glucose.

La première, la voie dépendante de PKA est bien documentée (Hoffman, 2005b). Elle est représentée dans la Figure 7 de l'article 2. Cette voie est initiée par un signal venant du récepteur du glucose couplé à une protéine G (GPCR) Git3p suite à son association avec les protéines G : Gpa2p ($G\alpha$), Git5p ($G\beta$) and the Git11p ($G\gamma$). Gpa2p interagit avec l'adénylate cyclase Git2/Cyr1 indépendamment de Ras qui intervient pourtant chez *S. cerevisiae* (Ivey et Hoffman, 2005; Landry et Hoffman, 2001). Un autre récepteur putatif à sept domaines transmembranaires interagit avec Gpa2p et régule partiellement l'arrêt du cycle cellulaire par carence en nutriments azotés (Chung et al., 2001). Cette protéine

transmembranaire, appelée *Stm1p*, ne semble toutefois pas agir sur la voie AMPc-dépendante malgré son interaction avec *Gpa2p* mais sur celle de la MAP kinase *Sty1p* de la voie de réponse au stress (SAPK). La nature de son activation, par ligand ou interaction est inconnue.

Subséquentement à la liaison du glucose, on observe la phosphorylation du GDP lié à *Gpa2p* en GTP puis sa libération du complexe des protéines $G\beta/G\gamma$ pour activer l'adénylate cyclase qui produit de l'AMP cyclique (Hoffman, 2005a). Ce dernier est capté par *Cgs1p*, la sous-unité régulatrice de *Pka1p* (Matsuo et al., 2008). L'AMPc ne s'accumule pas mais est dégradée par la phosphodiesterase *Cgs2p* (Hoffman, 2005b). *Cgs1p* séquestre dans le cytoplasme et inhibe *Pka1p*. En présence d'AMPc, la sous unité active *Pka1p* est libérée de *Cgs1p* et entre dans le noyau (Matsuo et al., 2008). L'activité de *Pka1p* ne serait pas régulée uniquement de façon AMPc dépendante puisqu'une équipe a montré que l'activité de la kinase *Kgs1p* agissait sur l'état de phosphorylation de *Pka1p* et qu'elle était requise à son activation (Tang et McLeod, 2004). La présence de *Pka1p* dans le noyau résulte en l'inhibition de transcription de *fbp1⁺* codant pour la fructose-1,6-bisphosphatase, enzyme de la gluconéogenèse. La suppression de cette kinase dé-réprime aussi le développement sexuel en permettant la conjugaison et la sporulation en présence de nutriments azotés et de glucose (Maeda et al., 1994). L'activité de *Pka1* réprime donc la transcription de gènes impliqués dans ces fonctions comme *mei2⁺*, requis pour la méiose, ou le facteur de transcription du développement sexuel *Ste11p* (Stettler et al., 1996; Sugimoto et al., 1991). Le facteur de transcription *Rst2p* est responsable de l'expression de *Ste11p*. *Pka1p* pourrait inhiber *Rst2p* par phosphorylation car la perte de *Rst2p* restaure le phénotype sexuel sauvage en glucose dans $\Delta pka1$, mais aucune preuve biochimique n'existe de cette régulation (Kunitomo et al., 2000).

L'activation de la voie PKA/AMPC de *S. pombe* entrave la réponse au choc thermique (Caspari, 1997; Fernández et al., 1997). Toutefois, aucune étude n'a été entreprise pour relier cette voie avec la résistance au stress oxydatif. Cette réponse est sous le contrôle de la voie SAPK qui est développée plus bas en (d) (Vivancos et al., 2006). Chez *S. cerevisiae*, la réponse au stress oxydatif est contrôlée par PKA/Msn2-4/Gis1. Ceci laisse penser que la voie PKA/AMPC chez *S. pombe* pourrait aussi avoir un rôle dans la réponse au stress oxydatif. Cette idée est appuyée par l'existence d'échanges de signaux entre les voies PKA/AMPC et SAPK. La MAP kinase kinase Wis1p est requise pour la dérépression de l'expression des gènes *mei2*⁺ et *fbp1*⁺ qui sont inhibés par la forme active de PKA (Stettler et al., 1996). D'autre part, il est important de noter que le développement sexuel de *S. pombe* contrôlable par PKA l'est aussi par la voie des MAP-kinases SAPK incluant Wis1p (Shieh et al., 1997). Une étude du promoteur du gène cible *fbp1*⁺ a permis d'identifier des séquences régulatrices de sa transcription cibles des voies PKA/AMPC et SAPK (Neely et Hoffman, 2000). Dans cet exemple, ces deux voies agiraient de manière antagoniste sur des éléments de réponse distincts. Il serait intéressant d'étendre le mécanisme de ce cas à d'autres gènes.

La kinase Sch9p de la levure à bourgeonnement commande la transcription de nombreux programmes liés à plusieurs fonctions comme il a été mentionné plus tôt. Sa mutation est la plus efficace pour allonger la DVC de cette espèce. La levure à fission possède deux homologues de ce gène : *sck1*⁺ et *sck2*⁺ (Jin et al., 1995) (Fujita et Yamamoto, 1998). La surexpression de *sck1*⁺ supprime les défauts de sporulation et restaure la répression de *fbp1*⁺ dans les mutants $\Delta pka1$ et $\Delta git3$ (Jin et al., 1995). Les surexpressions de *sck1*⁺ et *sck2*⁺ ont le même effet sur la hausse de la reproduction sexuée et la baisse de la croissance de $\Delta pka1$ (Fujita et Yamamoto, 1998). Sck1p et Pka1p régulent l'activation de la tréhalase (*ntp1*⁺) dont l'activité permet de catalyser l'utilisation du tréhalose dans le métabolisme énergétique (Fernández et al., 1998; Soto et al., 1997). Les cibles de la kinase Sck2p ne sont pas connues.

Les homologues de TOR chez la levure à fission sont *tor1*⁺ et *tor2*⁺ ; ces sérines thréonines kinases ont été assez bien caractérisées mais leur rôle dans la DVC n'a jamais été testé (Otsubo et Yamamoto, 2008). Elles existent dans deux complexes multi protéiques distincts appelés TORC1 et TORC2. La délétion de *tor1*⁺ n'est pas létale. Par contre ce gène est requis en absence de nutriments et notamment pour la survie en phase stationnaire (Weisman et Choder, 2001). Tor1p a été impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire en G₁ en absence de nutriments azotés, dans la régulation de la reproduction sexuée et dans la résistance à divers stress (pH, osmotique, oxydatif et thermique) (Otsubo et Yamamoto, 2008). Le second homologue, *tor2*⁺, est essentiel à la croissance et sa fonction a été étudiée grâce à sa mutation thermosensible. L'activité du complexe TORC2 influence aussi l'arrêt en G₁ suite au manque de nutriments azotés. La protéine Tor2p régule aussi le développement sexuel avec des cibles communes aux voies PKA/AMPC et SAPK : *mei2*⁺ et *ste11*⁺ (Otsubo et Yamamoto, 2008).

La voie de répression du glucose n'a quasiment pas été étudiée dans *S. pombe*. Son existence a toutefois été suggérée par la purification et la cristallisation de la kinase de la famille AMPK homologue de *SNF1* de *S. cerevisiae* (Amodeo et al., 2007).

c) La respiration et la mitochondrie

Les connaissances sur le métabolisme énergétique mitochondrial de la levure à fission font cruellement défaut. Quelques études toutefois donnent des indications sur l'existence d'un métabolisme mitochondrial classique. L'activité de son cycle des acides

tricarboxyliques a été mesurée (Dragan et al., 2006) et le gène du transporteur ADP/ATP a été cloné (*anc1*⁺) (Flores et al., 2000).

S. pombe est une levure Crabtree positive puisqu'elle réprime sa respiration en abondance de glucose (Van Urk et al., 1990). Cependant cet effet est moins prononcé que chez *S. cerevisiae* puisque la respiration reste plus haute dans une concentration de glucose similaire. D'autre part, il a été beaucoup plus difficile d'isoler des mutants sans ADN mitochondrial (*rho*⁰ ou *petite*) dans cette espèce ; ce qui semble coïncider avec l'observation d'une dépendance plus forte de cet organisme à ses mitochondries même en période de fermentation (Haffter et Fox, 1992; Schäfer et Wolf, 2003). Un traitement au bromure d'éthidium n'a pas permis à lui seul d'induire l'apparition de *petite* par mutation de l'ADN mitochondrial, comme c'est le cas dans *S. cerevisiae* (Haffter et Fox, 1992). Une mutation dans les gènes non identifiés *ptp1*⁺ ou *ptp2*⁺ est nécessaire au préalable. Sinon, une mutation de l'ADN polymérase gamma de mitochondrie permet d'obtenir des souches *rho*⁰ chez *S. pombe* (Chu et al., 2007). Ce genre de souche qui ne pousse qu'en milieu de fermentation, soit en glucose, présente un défaut de croissance beaucoup plus évident dans la levure de fission que dans la levure à bourgeonnement (Chu et al., 2007; Du et al., 2007; Kaeberlein et al., 2005a). En résumé, le métabolisme énergétique de *S. pombe* serait plus dépendant de la mitochondrie que celui de *S. cerevisiae*.

Enfin la transmission des mitochondries aux cellules filles ne se fait pas de la même manière chez *S. cerevisiae* que chez *S. pombe*, dans cette dernière elle utilise le réseau de microtubules comme chez les mammifères, ce qui n'est pas le cas de la levure à bourgeonnement (Chiron et al., 2007).

La mitochondrie semble jouer un rôle prépondérant dans la survie en phase stationnaire de *S. pombe*. La délétion d'une enzyme de la synthèse de l'ubiquinone (*coq7*⁺)

induit la mort en phase stationnaire. Or ces souches sont déficientes pour leur respiration, hypersensibles au H_2O_2 ; de plus elles ont la catalase *ctl1*⁺, protéine anti-oxydante de réponse au stress, surexprimée (Risa et al., 2008). De façon remarquable, une mutation homozygote de *mCLK1* dans la souris, l'orthologue de *coq7*⁺, est embryogénique létale (Liu et al., 2005).

Une analyse plus large de plusieurs mutants de la chaîne de respiration a abouti exactement aux mêmes conclusions. Les auteurs ont réalisé un criblage par délétion pour les gènes provoquant la double sensibilité simultanée au stress oxydatif exogène (H_2O_2) et au stress oxydatif endogène par incubation dans un milieu défini qui augmente la respiration et les ROS. Ils ont identifié principalement des composants de la chaîne PhosOx (19 sur 51 gènes), et particulièrement ceux reliés à l'ubiquinone (coenzyme Q10) et au cytochrome C, les deux « navettes » diffusibles qui transfèrent les électrons du complexe I et II vers le complexe III (Zuin et al., 2008). Non seulement, les souches perdent leur capacité respiratoire mais elles perdent leur viabilité en phase stationnaire. Elles ont aussi une production accélérée de ROS. Un traitement à l'antimycine A, inhibiteur du complexe III (Campo et al., 1992), induit exactement les mêmes effets sur la respiration, les ROS et la viabilité. De manière notoire, l'application du découplant 2,4-dinitrophénol (DNP) n'a pas d'effet ni sur la respiration ni sur la viabilité. Enfin l'ajout d'antioxydants comme la cystéine, d'un précurseur du glutathion, ou du N-acétylcystéine ont pour effet de permettre à ces mutants la pousse en milieu défini pro-respiratoire. Ceci suggère que la perte de viabilité de ces souches est directement reliée à leur niveau de stress oxydatif endogène.

d) La résistance au stress

La résistance au stress oxydatif a été largement étudiée dans ce modèle. La perte de nombreuses protéines anti-oxydantes raccourcissent la DVC très significativement.

L'importance de la réponse oxydative a d'abord été suggérée par la glutathion réductase et la peroxyrédoxine. *pgrI*⁺ est le gène codant pour la glutathion réductase, il est essentiel pour la croissance cellulaire et la viabilité des spores (Lee et al., 1997). *tpxI*⁺ code pour la peroxyrédoxine, ce gène est essentiel aussi mais il a été montré qu'il devient accessoire en anaérobie (Jara et al., 2007). Ces résultats suggèrent que ces gènes sont requis pour maintenir un niveau viable de stress oxydant endogène venant de la respiration. Il existe de nombreuses autres protéines antioxydantes ou formant des composés antioxydants. Elles ne sont pas essentielles mais pour certaines d'entre elles, le deviennent spécifiquement pendant la phase stationnaire. Elles sont résumées au Tableau 2.

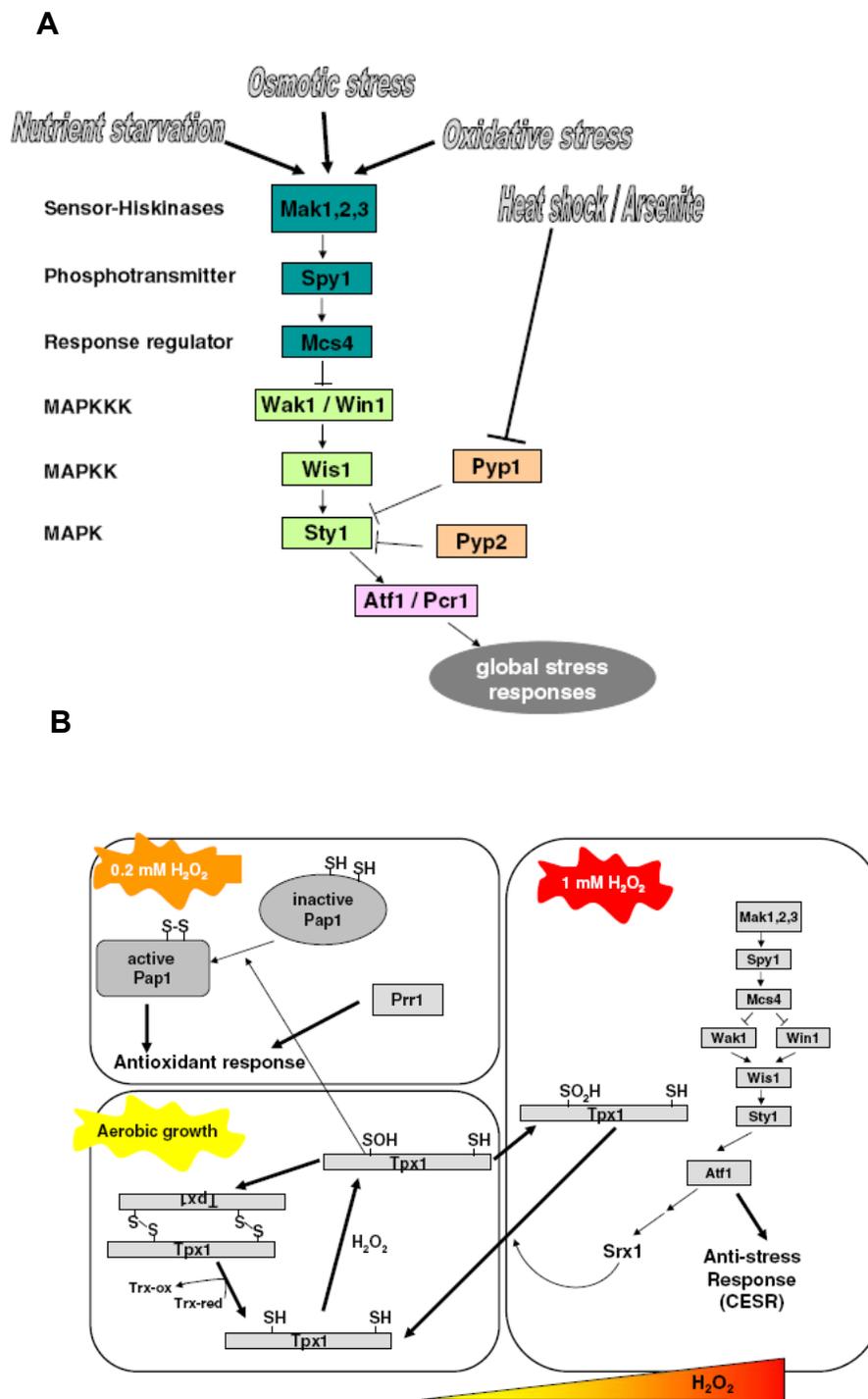
Tableau 2 : Enzymes de résistance au stress oxydatif de la levure à fission fonctionnant en phase stationnaire. Ce tableau résume les connaissances relatives aux protéines antioxydantes dont l'activité, la régulation de l'expression ou le rôle dans la survie ont été analysé pendant la phase stationnaire.

Nombre de gènes de défense contre le stress oxydant sont sous le contrôle de la voie MAP kinase dépendante : *ctl1*⁺, *trx2*⁺, *pgr1*⁺, *gpx1*⁺, *cta1*⁺ et *srx1*⁺. Cette voie est activée en absence de nutriments donc en fin de phase exponentielle ou bien en réponse à divers stress cellulaire : osmotique, oxydatif et UV (Vivancos et al., 2006), il s'agit de la voie nommée SAPK décrite en Figure 13. Sty1p (ou Spc1p) est la dernière kinase (MAPK) de cette voie. Comme il a été montré pour divers protéines à activité antioxydante, une souche sans Sty1p ne survit pas en phase stationnaire (Oshiro et al., 2003) (Toone et al., 1998) (Degols et al., 1996). De la même manière $\Delta wis1$ est létal en phase stationnaire, ce gène exprime la MAPKK (Warbrick et Fantes, 1991). En amont, les facteurs de transcription Pap1p et Atf1p sont activés par Sty1p et contrôlent l'expression de nombreuses protéines de réponse au stress et du métabolisme (Vivancos et al., 2006). En fonction du niveau du stress oxydant, l'un ou l'autre des facteurs de transcription est activé, Pap1p pour les faibles stress, Atf1p pour les forts. La délétion de *pap1*⁺, comme celle de *sty1*⁺, aboutit à une hypersensibilité au stress oxydatif (Vivancos et al., 2006).

L'absence de Atf1p baisse la DVC, ce phénotype est plus fort en milieu riche (Takeda et al., 1995). De manière intéressante, l'ajout d'AMPc (qui active Pka1) dans ce mutant raccourci sa DVC en milieu minimal mais pas dans le sauvage. Ceci pourrait s'expliquer par une régulation redondante d'une fonction commune inhibée par Pka1p et activée d'Atf1p.

Figure 13 : La voie SAPK de réponse au stress de *S. pombe*. Figures reproduites à partir de l'article de Vivancos *et al.* (Vivancos et al., 2006). A, la voie des protéines kinases activées par le stress est de type MAP kinase. Elle est activée à la suite de divers stress (osmotique, oxydatif, thermique ou nutritif). En aval de la dernière kinase, la MAP kinase Sty1 phosphoryle et agit sur l'activation du facteur de transcription Atf1. Ceci aboutit sur la synthèse de protéines de réponse au stress comme les protéines antioxydantes ou des chaperones de type Hsp. B, un autre facteur de transcription Pap1 est activé en condition de concentration plus faible en peroxyde d'hydrogène via la thiorédoxine peroxydase Tpx1.

Figure 13



L'initiation du signal dans la voie SAPK a lieu en amont par les histidine-kinases Mak2/3p. Elles sont sensibles au stress oxydatif et osmotique, et seraient aussi sensibles à la disponibilité en nutriments, pour phosphoryler Spy1p qui avec Mcs4p vont par la suite activer la MAPKKK Wak1p (Vivancos et al., 2006) (Figure 13). D'autres mécanismes de détection du stress oxydatif très pointus ont été mis à jour grâce à ce modèle. La thiorédoxine est connue pour détoxifier le H₂O₂. Ce ROS catalyse aussi une liaison disulphide entre cette protéine et Sty1p, la kinase responsable de la transcription d'autres protéines de réponse au stress. Cette liaison favorise la phosphorylation de Sty1p qui l'active (Veal et al., 2004). Une étude indépendante a montré que l'oxydation de la GAPDH favorise l'interaction Spy1-Mcs4 pour activer la MAPKKK du SAPK (Morigasaki et al., 2008).

Malgré le lien connu entre réponse au stress oxydatif et vieillissement chez *S. cerevisiae*, aucun phénotype d'allongement de la DVC n'a encore été relié à une régulation de la voie SAPK chez *S. pombe*.

e) L'apoptose

L'apoptose est très peu documenté chez *S. pombe* mais son existence est connue. Quelques travaux suggèrent que les mêmes mécanismes agissant chez la levure à bourgeonnement sont conservés dans la levure à fission. La métacaspase *pca1*⁺ été identifiée comme homologue de *YCA1* (Lim et al., 2007; Low et al., 2008). Les phénotypes connus pour être associés à la mort cellulaire programmée ont tous été observés dans cette levure : fragmentation nucléaire, condensation de la chromatine, altération de l'activité

mitochondriale, libération de ROS et externalisation de phosphatidylsérine (Guerin et al., 2008; Low et al., 2008; Low et Yang, 2008). De manière notoire, la surexpression de spRad9p dans une cellule humaine la fait entrer en apoptose (Low et Yang, 2008). La séquence de spRad9p comprend un domaine BH3 qui est le domaine d'homologie 3 avec Bcl2 de mammifères.

L'apoptose déclenchée par les lipides est particulièrement étudiée dans ce modèle (Low et al., 2005; Low et Yang, 2008). La première observation a montré que la déficience en synthèse de triacylglycérols provoquait une mort par apoptose lors de l'entrée en phase stationnaire (Zhang et al., 2003). L'accumulation de diacylglycérols suivant la perte des gènes de leur transformation en triacylglycérols provoque la mort programmée indépendante la métacaspase *pca1*⁺ (Low et al., 2008). Les enzymes responsables de la signalisation de l'accumulation des lipides sont en cours d'études (Low et Yang, 2008). D'autre part, la phosphatidylsérine est un phospholipide membranaire impliqué dans l'apoptose ; il est produit dans le RE par la phosphatidylsérine synthase. Cette enzyme est requise pour la survie en phase stationnaire de *S. pombe* (Matsuo et al., 2007). Comme chez la levure à bourgeonnement, la régulation de la mort programmée apparaît comme un passage obligé pour qu'une cellule survive en phase stationnaire.

3. L'étude du vieillissement chez *S. pombe*

a) Le vieillissement répliatif

La mesure de la DVR consiste au comptage du nombre de cellules filles qu'une cellule mère peut former avant sa mort. Il faut donc être capable de distinguer sous microscope une cellule fille d'une cellule mère. La micromanipulation pour séparer les cellules filles des cellules mères est plus délicate dans *S. pombe* que dans la levure à bourgeonnement puisque elle se divise par fission. Les deux cellules issues de la division sont semblables et non distinguables, ce qui correspond à une division morphologiquement symétrique. Ceci n'est pas le cas lors d'un bourgeonnement où la cellule fille est facilement identifiable. Cependant, la durée de vie répliatif de la levure de fission a pu être malgré tout mesurée grâce à l'observation qu'après trois divisions successives, la division devient asymétrique. La cellule mère prend une forme différente de sa propre descendance ; elle est plus ronde et avec un plus gros diamètre (Barker et Walmsley, 1999). Cette différence persiste lors des divisions ultérieures. En utilisant cette caractéristique, Barker et Walmsley ont pu suivre la cellule mère et dénombrer le nombre de divisions qu'elle peut accomplir. Ils ont compté que la levure à fission se divise en moyenne 9 fois avant de mourir ; la durée de vie répliatif maximum étant de 14 générations. Cette étude montra que la levure de fission a un nombre de divisions finie et qu'elle était asymétrique.

Une des raisons moléculaires de la différence entre levure mère et fille a été précisée par le laboratoire du Dr Nyström (Erjavec et al., 2008). Ils montrèrent que la

cellule mère retient une plus grande partie de protéines endommagées par carbonylation que la cellule fille dans un mécanisme *sir2*⁺ dépendant (Erjavec et al., 2008). Ce marqueur de rajeunissement de la cellule fille était déjà connu pour *S. cerevisiae* et *C. albicans* (Aguilaniu et al., 2003; Fu et al., 2008). Dans *S. pombe*, la protéine Tea1p agissant sur la polarité cellulaire est aussi requise pour un bon partitionnement des protéines carbonylées (Erjavec et al., 2008).

b) Le vieillissement chronologique

Les premières études s'intéressant au vieillissement de *S. pombe* sont récentes. Elles montrent en premier que la DVC de cette espèce dépend de son environnement alimentaire. L'effet de la restriction calorique sur la DVC a été testé avec succès comme pour les autres levures Crabtree positives. Il a pu être obtenu premièrement par l'utilisation d'un milieu minimum d'Edinburgh (EMM) par rapport à l'utilisation d'un milieu synthétique dextrose (SD) à base de YNB (*yeast nitrogen base*). L'utilisation du milieu minimum défini augmente considérablement la survie en phase stationnaire (Ohtsuka et al., 2008). La quantité de glucose utilisée était la même (2%) dans les deux cas, donc l'effet provient d'un autre nutriment non identifié. D'autre part, l'effet de la restriction calorique est aussi rapporté par diminution de la quantité de glucose pendant la phase de croissance. Il a été présenté dans cette étude avec un milieu SD seulement (Ohtsuka et al., 2008).

Par ailleurs, quelques manipulations génétiques allongeant la durée de vie de *S. pombe* ont été réalisées après le début de notre étude :

Une protéine nucléaire de fonction inconnue, appelée *ec11*⁺, allonge très significativement la DVC quand elle est surexprimée (Ohtsuka et al., 2008). Elle est produite spécifiquement pendant le changement diauxique et la phase stationnaire et agirait dans la même voie que la kinase Pka1p, mais pas dans celle de Sck2p. De plus son expression est concomitante à une meilleure résistance au stress oxydatif.

Comme décrit précédemment, la synthèse des acides gras à longue chaîne à partir du triacylglycérol est catalysée par les acyl-gras synthétases. Cette étape semble critique dans la survie lors du changement diauxique et l'entrée en phase stationnaire. Deux gènes codent pour des enzymes ayant cette activité, elles diffèrent par la spécificité des acides gras qu'elles hydrolysent et libèrent. Leur fonction est antagoniste sur la longévité : la surexpression d'*icf1*⁺ augmente sensiblement la durée de vie alors qu'il faut supprimer *icf2*⁺ pour avoir le même résultat (Fujita et al., 2007; Oshiro et al., 2003).

Le gène *rsv1*⁺ est un facteur de transcription de type C2H2 doigt de Zinc partiellement homologue à *MIG1*, un répresseur transcriptionnel de la voie de répression du glucose de *S. cerevisiae* (Hao et al., 1997). Son expression est essentielle pour la viabilité en phase stationnaire, et plus intéressant encore, son expression ectopique restaure la courte durée de vie obtenue par délétion de la phosphodiesterase *pde1*⁺ qui induit une accumulation d'AMPc (Wang et al., 2005). Ceci suggère qu'il pourrait être régulé par la voie Pka/AMPc.

c) Justification de l'utilisation de *S. pombe* pour l'étude du vieillissement

La revue de littérature proposée dans ce manuscrit souligne à quel point la levure à bourgeonnement est majoritaire comme modèle fongique pour l'étude du vieillissement. Cependant, plusieurs données permettent de présager que le modèle de levure à fission permettrait d'apporter des connaissances différentes et peut-être plus ressemblantes aux mécanismes des eucaryotes multicellulaires.

Tout d'abord, ces deux espèces de levure sont très lointaines sur le plan phylogénétique car elles ont évoluées indépendamment pendant une longue période (Sipiczki, 2000). Par ailleurs, des études de leurs génomes ont soulignées que dans plusieurs mécanismes cellulaires, on retrouve des orthologues de métazoaires chez *S. pombe* qui ont été perdus chez *S. cerevisiae*. Par exemple plusieurs protéines reliées au complexe d'épissage (*spliceosome*) ont divergées ou ont été perdues chez *S. cerevisiae* et sont conservées entre métazoaires et *S. pombe* (Aravind et al., 2000). D'ailleurs 40 % des gènes de la levure à fission ont des introns contre seulement 5% chez la levure à bourgeonnement. De la même manière, à la différence de *S. cerevisiae*, *S. pombe* a conservé comme les animaux nombreuses protéines de stabilité et de modification des ARNm (RNase PH, SFI hélicase, domaines NIC, etc.) et les protéines Argonaute et Dicer (Aravind et al., 2000; Forsburg, 2005). Ceci est aussi vrai pour des protéines de structures nucléaires et de la chromatine (SKI/SNW, SWI 6, JOR, domaines NASP, TRF2, etc.), pour les histones méthyl-transférases (Clr4/Su,Var3-9) et pour les protéines associées au centromère de type CENP-B (Aravind et al., 2000; Forsburg, 2005). La voie de réponse au stress SAPK est de type MAP kinase à l'instar de celle médiée par p38 et JNK chez les mammifères (Morigasaki et al., 2008; Vivancos et al., 2006). Enfin, les acteurs du repliement des glyco-protéines dans le réticulum endoplasmique suit la même règle (Parodi, 1999).

En outre, la transmission des mitochondries aux cellules filles ne se fait pas de la même manière chez *S. cerevisiae* que chez *S. pombe*. Dans cette dernière le réseau de microtubules est utilisé comme chez les mammifères, ce qui n'est pas le cas de la levure à bourgeonnement (Chiron et al., 2007).

Le cycle du glyoxylate sert à fournir en substrat (oxaloacétate) la néoglucogénèse notamment, à partir des carbohydrates à 2 carbones comme l'éthanol et l'acétate dans la levure (Lorenz et Fink, 2002). *S. pombe* n'a pas les enzymes du cycle du glyoxylate et n'utilise pas ce cycle, ce qui est identique au métabolisme des métazoaires (Flores et al., 2000; Lorenz et Fink, 2002). De plus, comme il est décrit dans l'introduction du deuxième article, la survie de la levure à fission est très difficile sans ADN mitochondrial et son activité basale est moins dérégulée en présence de sucre que dans la levure à bourgeonnement (Chu et al., 2007; Schäfer et Wolf, 2003). Cette dépendance plus importante à son métabolisme mitochondrial la rapproche du métabolisme des cellules mammifères.

Hypothèses de recherche et objectifs

Après plus de quinze années de recherche poussée sur les différents modèles génétiques, personne n'a encore été capable d'identifier avec certitude le principal facteur moléculaire qui provoque le vieillissement cellulaire. Malgré la masse de données accumulées, les nombreuses hypothèses avancées, la nature de ce facteur n'a pu être encore identifiée. Toutefois, les résultats suggèrent une universalité de la régulation du vieillissement. Dans ce contexte, la recherche sur des modèles simples s'avère particulièrement pertinente pour comprendre la mécanique moléculaire fondamentale régissant le vieillissement des cellules eucaryotes.

A mon entrée au laboratoire en janvier 2004, personne n'avait encore utilisé le modèle *Schizosaccharomyces pombe* pour tenter de comprendre les mécanismes régissant le vieillissement cellulaire, à l'exception d'une courte étude sur la longévité répllicative (Barker et Walmsley, 1999). Pourtant plusieurs pistes ouvraient la voie à cette recherche. La première était représentée par les données recueillies sur le modèle *Saccharomyces cerevisiae* démontrant l'existence de plusieurs gènes et fonctions contrôlant la durée de vie de cette espèce. L'utilisation de ce modèle a fait plusieurs fois ses preuves par la découverte de nombreuses fonctions régulant la longévité et étant conservées dans les eucaryotes multicellulaires. D'autres pistes venaient des résultats observés chez *S. pombe*. Sans

vraiment cibler la compréhension de la longévité, quelques travaux identifiaient des gènes indispensables à la survie en phase stationnaire. Ainsi, nous décidâmes d'établir cette levure comme nouveau modèle de vieillissement chronologique, complémentaire à celui de la levure à bourgeonnement de par les différences qui existent entre ces celles-ci.

Notre choix s'arrêta sur le vieillissement chronologique au dépend du vieillissement répliatif car nous voulions pratiquer des criblages génétiques, chose qui est impossible sur une mesure de longévité répliatif réalisée par micromanipulation de cellules individuelles. **Notre hypothèse** de départ était que :

(i) la régulation de la longévité dans ce modèle serait en partie conservée à travers les grandes voies de signalisation découvertes chez *Saccharomyces cerevisiae*.

(ii) que des mécanismes de régulation de la longévité seraient différents et peut-être plus proches d'autres espèces comme les mammifères dans ce modèle (voir partie IV-3-c et introduction du deuxième article).

La **première phase** de l'étude visait deux objectifs. D'abord nous voulions établir un protocole de mesure fiable et reproductible du vieillissement chronologique de la levure de fission par la survie en phase stationnaire incluant la recherche de marqueurs typiques. Le second objectif était de valider ce protocole par la découverte de mutant de durée de vie prolongée en se basant sur les homologues de *S. cerevisiae* connus pour avoir un effet sur la longévité. Nous avons choisi pour cela un gène de la voie PKA/AMPc : *pkal*⁺ en tirant avantage du fait que la délétion de ce gène est viable dans notre modèle alors qu'elle ne l'est pas dans la levure de bourgeonnement après triple délétion des trois paralogues

TPK1/2/3. Ensuite nous voulions étudier les gènes *sck1*⁺ et *sck2*⁺ homologues de la kinase *SCH9* connue pour être la protéine ayant l'effet pro-vieillessement le plus fort dans la levure à bourgeonnement. Enfin, nous voulions pousser les recherches plus loin que celles faites avec *S. cerevisiae* sur ces voies en utilisant les particularités de notre modèle avec l'étude de son métabolisme mitochondrial.

La **deuxième phase** était la réalisation d'un criblage génétique d'une banque de surexpression pour un phénotype de DVC allongé. Le but était de trouver des nouveaux gènes régulés en aval des voies de signalisation et impliqués dans la régulation du vieillissement de *S. pombe*.

Résultats

Article 1 : Regulation of chronological ageing in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2

Mise en contexte :

L'étude du vieillissement avec la levure *S. cerevisiae* est de plus en plus courante car cette approche s'est déjà révélée fructueuse par le passé. En effet, certains gènes contrôlant le vieillissement sont conservés depuis les levures jusqu'aux mammifères suggérant un mécanisme universel conservé au cours de l'évolution.

Dans la levure *S. pombe*, plus proche des eucaryotes multicellulaires pour plusieurs mécanismes cellulaires, personne n'a encore cherché à isoler de mutants à durée de vie prolongée. La première question que nous posons est donc de savoir si dans la levure à fission, comme dans celle à bourgeonnement, les voies de détection des nutriments régulent la longévité.

Cet article a été publié dans le journal *Aging Cell* en juillet 2006 aux pages 345 à 357.

Contributions des auteurs :

AER : culture cellulaire ; essai de longévité ; cytométrie de flux ; microscopie avec marquage phloxine B, FITC et DHR123 ; tests de résistance en goutte et écriture du manuscript

AQ : mise au point du marquage DH123 par microscopie

PC, GF et LAR : supervision générale, fond de recherches et écriture du manuscript

**Regulation of chronological ageing
in *Schizosaccharomyces pombe*
by the protein kinases Pka1 and Sck2**

Antoine Roux, Aurélie Quissac, Pascal Chartrand²,
Gerardo Ferbeyre³ and Luis A. Rokeach¹

Department of Biochemistry, Université de Montréal
Montréal, Québec HC3 3J7 Canada

¹Corresponding author: Tel: (514) 343-6324

²Corresponding author: Tel: (514) 343-5684

³Corresponding author: Tel: (514) 343-7571

Running title: Pka1 and Sck2 control longevity in *S. pombe*

Keywords: cAMP/PKA-pathway, fission yeast, lifespan, ROS, Sch9, yeast genetics

Summary

Budding yeast shows a progressive decline in viability after entering stationary phase, a phenomenon known as chronological ageing. We show here that the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* also undergoes chronological ageing and that the process is regulated by genes controlling two related nutrient signalling pathways. The first pathway includes the serine/threonine cAMP-activated protein kinase Pka1 and the second pathway comprises the serine/threonine kinase Sck2, a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Sch9. A double mutant for *pka1* and *sck2* displayed an additive effect on prolonging the fission yeast lifespan, suggesting that these genes regulate related but independent pathways. These long-lived mutants also accumulated less reactive oxygen species and had a delayed initiation of apoptosis compared with wild-type cells. We also found that strains carrying *pka1* deletion but not those with *sck2* deletion gained resistance to oxidative stress due to exposure to H₂O₂ or menadione. On the other hand, the additional increase in lifespan shown by the $\Delta pka1\Delta sck2$ double-mutant strain correlated with an increased resistance to both oxidative stress and heat-shock. These results underscore the importance of nutrient signalling pathways and reactive oxygen species on organismal lifespan and establish *S. pombe* as a new model organism to study the molecular mechanisms underlying ageing.

Introduction

The viability of individual yeast cells decreases with the number of cell generations (replicative ageing) or with the time they spend in stationary phase (chronological ageing). Replicative ageing is linked to exponential growth and measures the number of daughters a single mother cell is able to generate before its death. Replicative ageing in yeast has been associated with the accumulation of rDNA circles in the nucleolus of old cells (Sinclair, 1997). Overexpression of the NAD⁺-dependent deacetylases Sir2 and Hst2 extends the replicative potential of yeast cells and reduces the accumulation of rDNA circles (Kaeberlein *et al.*, 1999; Lamming *et al.*, 2005). In addition, caloric restriction, a condition that extends lifespan in a variety of species including flies, worms and mice also extends replicative lifespan (Lin *et al.*, 2000). Chronological ageing relates to the time a yeast population can survive in stationary phase (Fabrizio *et al.*, 2001). Most chronological lifespan studies in yeast were performed in post-diauxic stage, which is characterised by a high degree of cell metabolism and respiration. It has been proposed that the loss of viability observed in this stage is mainly due to ethanol production (Fabrizio *et al.*, 2005), reactive oxygen species (ROS) induced toxicity, and loss of mitochondrial function (Longo & Fabrizio, 2002). More importantly, it has been established that death in post-diauxic cultures is not the result of simple starvation. First, individual yeast cells die at high rate

when their glycogen content is still high (Longo *et al.*, 1997). Second, yeast cells survive better in water than in synthetic complete medium (SCM), and switching from SCM to water diminishes cell death (Longo *et al.*, 1997). Third, cell cycle mutants that arrest growth in the presence of nutrients also lose viability (Motizuki & Tsurugi, 1995). Finally some genetic mutations extend lifespan without changing metabolic rates (Fabrizio & Longo, 2003).

Although the processes that limit lifespan during replicative and chronological ageing may differ, it is known that passage through the stationary phase accelerates replicative ageing (Ashrafi *et al.*, 1999). Moreover, disabling mutations in the gene coding for the protein kinase Sch9 increase both replicative and chronological lifespan in yeast, suggesting a common link between the two processes (Kaeberlein *et al.*, 2005).

Previous studies have found that deletion of the genes *SCH9*, *CYR1* and *RAS2* enhances chronological lifespan of the budding yeast (Fabrizio 2001; Fabrizio & Longo, 2003). The encoded proteins mediate glucose signalling stimulating cell proliferation, glycolysis but decreasing stress resistance (Longo, 2003). Cyr1 is an adenylate cyclase (Matsumoto, 1983) and Ras2 a small GTPase (Powers, 1984), and both belong to the cAMP/PKA signal transduction pathway. Increased chronological lifespan due to deletion of these genes requires the stress response transcription factors Msn2 and Msn4, and the ROS-detoxifying enzyme Sod2 (Fabrizio *et al.*, 2003). *SCH9* encodes a serine/threonine protein kinase and is a high-copy suppressor of the growth defect caused by deletion of PKA signalling pathway (Toda, 1988), suggesting that it controls a redundant or parallel signalling pathway to PKA. Sch9 pro-ageing functions seems to be conserved since its *C. elegans* homologue, AKT, also decreases longevity acting downstream of the insulin-like receptor DAF2 (Kenyon *et al.*, 1993; Hekimi & Guarente 2003).

In the past years, *S. cerevisiae* has been shown to be a successful model to study ageing. However, ageing in budding yeast is influenced by the formation of ribosomal DNA circles, a process controlled by the histone deacetylase Sir2. These studies have generated a considerable interest in the possibility that *SIR2* also increase longevity in mammals. Intriguingly, the increase in chronological lifespan in budding yeast due to mutations in *pka* and *sch9*, or caloric restriction can be largely extended in a strain deleted for *SIR2* (Fabrizio *et al.*, 2005). Hence, Sir2 mediates paradoxical pro-ageing and anti-ageing effects. We reasoned that studying ageing in another species of yeast might help in identifying universal ageing pathways. To develop such a model we have chosen the fission yeast *S. pombe*. Several cellular processes like cell division, cell cycle regulation and signalling pathways in *S. pombe* are closer to mammalian cells than the same pathways in *S. cerevisiae* (Sipiczki, 2004). This striking similarity to mammalian cells constitutes a compelling reason to develop *S. pombe* as a model system to study ageing. Like the budding yeast, the fission yeast also offers a convenient genetic system that makes it relatively straightforward to isolate mutants for a given phenotype. Replicative ageing of *S. pombe* has already been measured by Barker and Walmsley (Barker & Walmsley, 1999), but no long-lived mutant of this sort has been isolated as yet.

In budding yeast, mutations extending longevity commonly affect the glucose-sensing signalling pathway. In *S. pombe*, this pathway regulates growth through the activation of the cAMP-dependent protein kinase A (Hoffman & Winston, 1991; Maeda *et al.*, 1994). Most of the genes of this pathway have been dubbed *git* (glucose insensitive transcription). The *git2⁺* gene, also called *cyr1⁺*, codes for the adenylate cyclase (Hoffman & Winston, 1991); *git6⁺/pka1⁺* encodes the catalytic subunit of PKA (Byrne & Hoffman, 1993); *git8⁺/gpa2⁺* encodes a G α subunit (Isshiki *et al.*, 1992; Nocero *et al.*, 1994) and *git5⁺* encodes a G β subunit (Landry *et al.*, 2000). The G proteins Git8 and Git5 transduce glucose

signalling from a GPCR named *git3*⁺ (Welton & Hoffman, 2000). There are two *S. pombe* homologues of the budding yeast *SCH9* gene: *sck1*⁺ and *sck2*⁺ (Fujita & Yamamoto, 1998). Overexpression of *sck1*⁺ or *sck2*⁺ suppresses the defects associated with *git* mutants in the cAMP/PKA pathway of *S. pombe* (Jin *et al.*, 1995; Fujita & Yamamoto, 1998). The deletion of both *sck1*⁺ and *sck2*⁺ has no obvious phenotype, but results in less efficient spore germination (Fujita & Yamamoto, 1998).

To establish *S. pombe* as a model organism to study ageing, we studied the lifespan in stationary phase of wild-type *S. pombe* and mutant strains for *pkal*, *sck1* and *sck2*. As in the budding yeast, we found that the cAMP/PKA pathway controls chronological ageing in fission yeast. Of the two homologues of *SCH9*, we found that only *sck2*⁺ regulates ageing, and the pathway in which it belongs seems to be independent of the cAMP/PKA pathway. Long-lived *S. pombe* mutants maintained their viability for longer times and accumulated less ROS and caspase activity compared to wild-type cells. Surprisingly, of Δ *pkal* and Δ *sck2*, only *pkal* deletion mutants were more resistant to oxidative stress compared to the wild-type, while only the double mutant Δ *pkal* Δ *sck2* displayed a significant increased resistance to heat stress. Hence, by reporting the first long-lived mutants of *Schizosaccharomyces pombe*, we introduce here this organism as a model for the study of ageing.

Results

Chronological ageing of *Schizosaccharomyces pombe*

As an initial step, we wished to characterise the chronological ageing of *S. pombe* by analyzing the survival of a wild-type strain in stationary phase. As shown previously in *S. cerevisiae*, the content of the growth medium greatly affects chronological lifespan (Fabrizio & Longo, 2003). We chose to carry out the experiment in synthetic complete medium (SCM) containing 2% glucose because in budding yeast this condition is not associated with growth during the stationary phase (Fabrizio & Longo, 2003). Chronological ageing in this medium is not simply starvation because growth of a wild-type strain in minimum medium (MM) resulted in approximately three-fold longer survival than in SCM (data not shown). We measured cell survival from the early stationary phase, 10 hours after the cultures ceased to grow, until the time when 99.9% of the cells were dead. Survival was scored by counting colony forming units (CFU) from aliquots taken at different time points that were then diluted and plated on yeast extract completed medium (YEC; Moreno *et al.*, 1991). We established that after 4 ± 1 days, 50% of the wild-type *S. pombe* population grown in SCM was able to give rise to colonies on plates (Fig. 1). After

15±2 days, 99.9% of this population was replicatively dead. To verify that mutations in the genetic markers present in the wild-type reference strain (*leu1-32*, *ura4-D18* and *ade6-M210*) would not influence survival, a prototrophic strain without these markers was tested in this assay. It was found that the latter had the same lifespan as the auxotrophic population (Supplemental data Fig. 1A and 1B), suggesting that these mutations have no effect on longevity. Furthermore, we occasionally noticed re-growth during stationary phase when using MM medium (data not shown) as it was described in low caloric conditions with baker yeast, possibly due to a better adapted subpopulation (Fabrizio & Longo 2003). The use of SCM medium prevents the cells from entering in such a state of regrowth.

While CFU counting provides information on the number of cells that can resume growth, such measurement does not reflect the viability of the cells in culture. To follow the viability of the yeast population, we used the fluorescent dye Phloxin B. This marker is passively taken up by cells and is actively excreted only by "metabolically active", i.e. living cells (Supplemental data Fig. 3). Thus, Phloxin B stains dead cells, which can be readily counted under the fluorescence microscope or by using flow cytometry (Fig. 2A and 2B). By using Phloxin B in wild-type yeast cultures, it was found that the proportion of metabolically dead cells was lower than the number of dead cells estimated from the CFU counting (Fig. 2C). Therefore, the lifespan measured using Phloxin B was considerably longer than the one measured by CFU (Table 3). For example, after 6 days in stationary phase, around 60% of the population was metabolically alive but only 2.3% of these cells were able to form colonies. Considering metabolic activity, 46 days were necessary to attain the threshold of 99.9% mortality, against 15 days for CFU counting (data not shown). These results show that CFU counting informs about the proportion of replicatively active cells in a population and underestimates the number of metabolically active cells, i.e. living cells estimated by Phloxin B staining.

The cAMP/Pka1 pathway controls longevity in stationary phase

The cAMP/Pka1 pathway controls chronological lifespan in *S. cerevisiae* (Longo, 1999; Fabrizio *et al.*, 2001). We advanced that mutations in genes regulating the cAMP/PKA pathway will increase longevity in *S. pombe* as well. The cAMP/Pka1 pathway of *S. pombe* is required for growth and exit from stationary phase (Jin *et al.*, 1995; Fujita & Yamamoto, 1998). The unique PKA catalytic subunit known to date in *S. pombe* is coded by *pka1*⁺, and cells deleted for this gene are viable (Maeda *et al.*, 1994). The $\Delta pka1$ cells were analysed for their ability to survive in stationary phase. The survival of $\Delta pka1$ estimated by CFU counting was found to be three-fold longer than wild-type (Fig. 3A). The $\Delta pka1$ mutant also stayed metabolically active for longer compared to wild-type. For example, after 6 days, 89% of the population of this mutant was still alive compared to 59% for wild-type culture (Fig. 3C and Table 3). Therefore, there seems to be a good correlation between the ability of yeast cells to stay metabolically active (Phloxin B positive) in stationary phase and their ability to resume cell proliferation after replated on rich medium.

Deletion of *sck2* increases longevity in stationary phase

To investigate in more detail chronological ageing in *S. pombe*, we focused on the two homologues of the budding yeast *SCH9* gene, *sck1*⁺ and *sck2*⁺. The $\Delta sck1$ and $\Delta sck2$ deletion mutants were grown until stationary phase and their chronological longevity was analysed. The *sck1* knockout had the same survival as the wild-type reference strain SP14000 (Fig. 3A). However, the *sck2* knockout exhibited a lifespan three fold longer than the wild-type strain while the double mutant $\Delta sck1\Delta sck2$ displayed the same survival as the $\Delta sck2$ strain (Fig. 3A), indicating that *sck1*⁺ has no pro-ageing effect. Phloxin B staining of

$\Delta sck2$ was followed during stationary phase and showed that dead cells appeared later in this mutant (Fig. 3C). Neither $\Delta sck2$ nor $\Delta sck1\Delta sck2$ exhibit a significant delay in their generation doubling time (Fujita & Yamamoto, 1998) as observed in long-lived *sch9* mutant strains of *S. cerevisiae* (Toda *et al.*, 1988). Therefore, the increased longevity of *sck2* mutants in *S. pombe* is not a consequence of slow growth. Altogether, these results suggest that *sck2*⁺ is the functional homologue of *SCH9* since they both have a similar effect in the control of ageing.

We found that both *pka1*⁺ and *sck2*⁺ control longevity. Next we wanted to investigate whether they act in the same pathway. In *S. cerevisiae*, the Pka1 and Sch9 kinases control separate but partially redundant signal transduction pathways (Roosen *et al.*, 2005). Indeed, overexpression of one of these kinases compensates for the loss of function of the other (Toda *et al.*, 1988). A recent study has shown that they have common target genes, which explains the redundancy of their function (Roosen *et al.*, 2005). Interestingly, the double deletion $\Delta pka1\Delta sck2$ showed an increase in lifespan compared with the single mutants $\Delta pka1$ and $\Delta sck2$ (Fig. 3B). This result suggests that the deletion of both cAMP/Pka1 and Sck2 pathways has an additive effect on longevity.

Cell-cycle arrest of wild-type and mutant strains during stationary phase

The longer the cells spend time in stationary phase, the lower chance they have to reverse their cell cycle arrest and resume cell division when the nutritive environment becomes favourable. We observed that deletion of *sck2* or *pka1* extends chronological lifespan enabling these mutants to prolong the period where re-entrance in the cell cycle is possible. Therefore, we investigated if these mutants may have a different cell cycle arrest.

Most *S. pombe* cells in logarithmic phase show a typical G₂ (2N) DNA content. Furthermore, it has been previously reported that at stationary phase, fission yeast stops its cell cycle either in G₁ (N) or in G₂ (2N) and that the survival of cells arrested in G₁ is the same as that of cells arrested in G₂ (Costello *et al.*, 1986). Using flow cytometry, we found that wild-type and mutants displayed no difference in their cell cycle profile, neither in exponential phase nor in stationary phase (Fig. 4). Interestingly, the $\Delta pka1$ mutant after 6 days displayed an increased number of polyploid cells (4N) like wild-type cells during log phase, whereas $\Delta sck2$ showed a much lower peak. This probably represents binuclear cells that have completed S phase in each nucleus but have not finished cytokinesis. Together, our data suggest that long term survival in stationary phase does not depend on the kind of cell cycle arrest (G₁ or G₂ arrest) since long-lived mutants have cell cycle profiles identical to the wild-type.

Lower accumulation of ROS and decreased apoptosis in $\Delta pka1$, $\Delta sck2$, $\Delta pka1\Delta sck2$ long lived mutants.

One of the main causes of cellular damage are the reactive oxygen species (ROS) produced by cellular metabolism. ROS accumulate proportionally with age and mutations. Therefore, increasing the anti-oxidant capacity of the cells lengthens the mean lifespan in several species (Finkel & Holbrook, 2000). In order to better understand the cause for the longer lifespan of *pka1* and *sck2* deletions mutants, the accumulation of ROS was investigated in these strains during stationary phase using dihydrorhodamine 123 (DHR123), a free-radical fluorescent probe (Fig. 5A). The results confirmed a low concentration of ROS in long-lived $\Delta pka1$ and $\Delta sck2$ mutants compared with wild-type cells (Fig. 5B), while the double deletion of *pka1* and *sck2* displayed an even lower accumulation of ROS during stationary phase.

Recent studies have reported that unicellular organisms like the budding and fission yeasts can undergo an apoptosis-like phenomenon triggered in response to stresses such as low concentrations of acetic acid, hydrogen peroxide, high concentration of mating pheromone, nutrients and DNA-damage conditions (Burhans *et al.*, 2003; Zhang, 2003). In higher eukaryotes, apoptosis is mediated by a family of proteases known as caspases and *S. pombe* possesses a similar enzyme, the metacaspase Pca1p (Low *et al.*, 2005). Moreover, typical apoptotic markers such as activated caspase are observed in old yeast cells accumulating ROS (Madeo *et al.*, 2002). Therefore, long-lived mutants that display lower intracellular levels of ROS are expected to enter later in apoptosis. We tested this hypothesis with the *pkal* and *sck2* mutants and measured the number of cells with induced caspase activity by using a fluorescent probe. With this assay, we found that the percentage of cells exhibiting caspase activation increased much more rapidly for the wild-type strain than for the long-lived mutants $\Delta sck2$, $\Delta pkal$ and $\Delta pkal\Delta sck2$ (Fig. 6A and 6B). Furthermore, the less these strains accumulated ROS (Fig. 5B), the less they triggered the apoptosis-like program. Curiously, the number of wild-type and $\Delta sck2$ cells displaying caspase activity decreased after 20 days. Since viability is low by this time, a caspase-independent mechanism of cell death may be acting late in stationary phase. Alternatively, cells well advanced in the execution of apoptosis may not display caspase activity anymore, and hence will be counted as a negative.

Longevity correlates with resistance to heat-shock and oxidative stress with $\Delta pkal$ mutant but not with $\Delta sck2$ mutant in *S. pombe*.

Previous studies showed that most chronological long-lived mutants of *S. cerevisiae* show high oxidative stress or heat resistance (Fabrizio & Longo, 2003). In agreement, long

living *pka1* and *sck2* mutants of *S. pombe*, but not *sck1* mutants, showed low levels of ROS. In order to find out whether *pka1* and *sck2* mutants control lifespan in *S. pombe* by increasing stress resistance, we performed several stress resistance assays. To carry out these tests, wild-type or mutant yeasts were grown to stationary phase and three days later the cells were submitted to hydrogen peroxide, menadione or heat-shock. The survival of these stationary phase cells after treatment was measured by drop tests on solid rich medium. We noticed that wild-type *S. pombe* is resistant to high concentrations of hydrogen peroxide and menadione (Fig. 7). In fact, a 45 minute treatment in 1 M H₂O₂ was necessary to kill a significant proportion of cells, whereas only 30 minutes in 100 mM H₂O₂ was sufficient to kill wild-type *S. cerevisiae* (Fabrizio *et al.*, 2001). Likewise, a 0.75 M menadione treatment for 3 hours had to be applied to our strains, while only 20 μM for 1 hour of the same superoxide/H₂O₂ generating agent was enough to reduce *S. cerevisiae* viability (Fabrizio *et al.*, 2001). For $\Delta sck1$, $\Delta sck2$, $\Delta sck1\Delta sck2$ and $\Delta pka1\Delta sck2$ mutant strains we did not score any difference in the sensitivity to H₂O₂ during stationary phase when compared to wild-type (Fig. 7A). We did observe a moderate increase in resistance to H₂O₂ in the *pka1* mutant strain as compared to the reference strain. This trend was clearly enhanced when we tested the sensitivity to another pro-oxidant, menadione. Figure 7A shows that $\Delta pka1$ and $\Delta pka1\Delta sck2$ mutant strains grew better after treatment in menadione compared with wild-type.

The relationship between resistance to heat-shock and longevity seems to be more complex. After three days in stationary phase, $\Delta pka1$, $\Delta sck2$, $\Delta sck1\Delta sck2$ and $\Delta pka1\Delta sck2$ mutants displayed a moderate resistance compared to WT and the $\Delta sck1$ mutant strain (Fig. 7B). Surprisingly, the double mutant $\Delta pka1\Delta sck2$ showed a much higher resistance to heat-shock in comparison to WT.

Discussion

We have shown that *S. pombe* cells progressively lose their viability after entering the stationary phase, a phenomenon known as chronological ageing in *S. cerevisiae* (Fabrizio & Longo, 2003). We found that chronological ageing in *S. pombe* was accelerated by glucose signalling because cells bearing mutations in genes controlling this pathway such as *pkal* and *sck2* lived longer. Since glucose also accelerates ageing in *S. cerevisiae*, our results indicate a conserved mechanism of lifespan reduction operating in yeast during the stationary phase.

Studying chronological ageing in *S. pombe* is not simply an extension of similar efforts in *S. cerevisiae*. The physiology of *S. pombe* is considered closer to higher eukaryotes and our results started to reveal differences in chronological ageing between fission and budding yeast. For example, although the cAMP/PKA pathway controls longevity in both species, no mutants of the PKA holoenzyme (composed of the subunits Tpk1, Tpk2 and Tpk3, and the regulatory subunit Bcy1p) have been identified to increase lifespan in budding yeast. We show here, for the first time, that a deletion of *pkal*, coding for the PKA catalytic subunit in *S. pombe*, increases longevity. Furthermore, although

mutations in a single gene coding for the protein kinase Sch9 extends lifespan in the budding yeast, *S. pombe* possesses two *SCH9* homologues, *sck1*⁺ and *sck2*⁺ (Fujita & Yamamoto, 1998). We discovered that of the two, *sck2*⁺ is the longevity regulator in *S. pombe*. Since Sck1p and Sck2p have similar structures, studying the differences in activators and effectors of these two proteins should shed considerable light on the pathways controlling ageing in yeast.

Global expression studies have shown that *sck1*⁺ and *sck2*⁺ are expressed in *S. pombe* (Chen *et al.*, 2003). Surprisingly, their expressions are regulated in opposite ways under different stress conditions such as oxidative stress, heat, osmolarity stress or cadmium treatment. In these conditions *sck1*⁺ is upregulated whereas *sck2*⁺ is downregulated (Chen *et al.*, 2003). Taken together, this expression data and our results suggest, that under certain stress conditions, *S. pombe* has evolved pathways to reduce Sck2 expression but in stationary phase there is still sufficient Sck2 activity to reduce viability.

Since the cAMP/Pka1 pathway controls chronological lifespan in *S. pombe*, what could be the downstream targets of this pathway? One possible target is Rst2p, which is known to be controlled by Pka1p and inhibited by the presence of glucose (Higuchi *et al.*, 2002). This transcription factor has been shown to bind the stress response element STREP that resembles the *S. cerevisiae* stress response element STRE (Marchler *et al.*, 1993). The expression of genes with a STREP motif in their promoter region is enhanced after glucose starvation (Hoffman & Winston, 1991). Our study showed that mutants without active cAMP/Pka1 pathway accumulated less ROS, suggesting that enzymes involved in ROS generation and/or degradation may be under the control of the cAMP/Pka1 pathway. Since this mutant is more resistant to hydrogen peroxide and menadione, we currently favour the idea that they act by suppressing ROS accumulation. Yet, no anti-oxidant protein gene is known to have a STREP motif and to be regulated by Rst2/Pka1. In *S. pombe* anti-oxidant

genes are under the control of the Atf1 transcription factor (Shiozaki & Russell, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996) and the Pap1 transcription factor (Toone *et al.*, 1998). While a direct connection between Pka1p and Pap1p is not clear, a link between the cAMP/Pka1 and Wis1/Spc1/Aft1 pathways has already been suggested (Stettler *et al.*, 1996). Moreover, nutritional limitation is known to activate the kinase Spc1, an element of the Wis1 MAP kinase cascade that is upstream of Atf1 (Shiozaki *et al.*, 1997). Our results support the possibility of a crossed regulation between these two pathways.

While both *pkal*⁺ and *sck2*⁺ affected *S. pombe* longevity separately, the double deletion mutant $\Delta pkal\Delta sck2$ showed an additive effect promoting a better survival than the two single deletion mutants $\Delta pkal$ and $\Delta sck2$. This additive effect was not only visible at the level of cell viability, but also on ROS accumulation, caspase activation and surprisingly on resistance to heat-shock. These results suggest that either both factors act on the same gene targets and have an additive effect, or they act on different genes with complementary function. Indeed, Roosen and collaborators have shown in *S. cerevisiae* that PKA and Sch9p act through separate signalling cascades, and affect synergistically or oppositely common target genes (Roosen *et al.*, 2005). A similar pattern can be envisaged in *S. pombe* since *sck2*⁺ is a high-copy suppressor of *pkal* and both affect longevity, suggesting partially overlapping functions.

While the increased lifespan of $\Delta pkal$ and $\Delta sck2$ mutant strains correlated with low accumulation of ROS in stationary phase, strains carrying *pkal* deletion but not those with *sck2* deletion gained resistance to oxidative stress such as H₂O₂ and menadione (Fig. 7). On the other hand, the additional increase in lifespan shown by the $\Delta pkal\Delta sck2$ double mutant strain correlated with an increased resistance to both oxidative stress and heat-shock. Although several models may explain these correlations, the results are consistent with the idea that Sck2 controls a pathway of ROS production but not resistance to ROS. In contrast,

Pka1p may control the pathways of ROS resistance or elimination as described in *S. cerevisiae* (Fabrizio *et al.*, 2003). Combined, the effects of these two deletions may increase lifespan by both decreasing ROS production and increasing ROS resistance. Of note, Barja and colleagues have reported that longevity among different species negatively correlates with the amount of ROS produced by the mitochondria (Perez-Campo *et al.*, 1998). Our results are consistent with that possibility and suggest that studying chronological ageing in *S. pombe* may help to identify genes controlling ROS production.

We also observed that a large proportion of metabolically active (Phloxin B positive) cells in stationary phase were unable to resume growth when plated on complete solid medium. It is possible that these cells may have accumulated too many oxidative damages on their DNA and proteins and will ultimately undergo apoptosis. Alternatively, these cells are already dead but cannot take up or retain Phloxin B. We exclude the latter possibility, because when we killed the cells using heat or sodium azide, all of them were stained by Phloxin B (Supplemental Fig. 3).

It has been proposed that yeast cells commit suicidal apoptosis in stationary phase to keep a small fraction of cells alive and able to resume growth when nutrients become available (Fabrizio *et al.*, 2004; Herker *et al.*, 2004). According to this interpretation, the pro-ageing functions of Pka1 and Sch9/Sck2 were selected for the sake of the population. Alternatively, these proteins have important functions for logarithmic growth and their effects reducing fitness in stationary phase were never neutralized by natural selection. The latter argument is valid if yeasts living in stationary phase do not significantly contribute to the next generations. Although *S. pombe* and *S. cerevisiae* diverged several million years ago, *pka1*⁺ and *SCH9/sck2*⁺ have a pro-ageing effect in both species. This conservation is consistent with the idea of a selective value for ageing and death in stationary phase. It is intriguing that there are mechanisms in *S. pombe* to downregulate *sck2*⁺ expression during

certain stresses but these mechanisms do not seem to fully operate during the stationary phase. Again, this supports the idea that ageing in stationary phase has a selectable value in yeast. Decoding the molecular components of the conserved ageing pathway in *S. pombe* may bring some light into the ageing process of higher eukaryotes, including humans. Proof that this is indeed the case is well illustrated by our results showing that mutations in *pkal*⁺ and *sck2*⁺ extend lifespan in *S. pombe*, and reduce the accumulation of ROS and the activation of caspase in these cells. Both ROS and caspase-mediated cell death have been implicated in the functional declines associated with ageing in mammals (Balaban *et al.*, 2005) and ROS production negatively correlates with species lifespan (Perez-Campo *et al.*, 1998). Hence, we propose to add *S. pombe* to the list of model organisms for the study of ageing.

Experimental Procedures

Strains and Media

S. pombe strains used in this study are listed in Table 1. All disruption strains were obtained by mating JX770 with a wild-type strain and different combinations of disruptions were isolated on selective media, except for *sck1* disruption in SP14073 which is detailed below. Cultures were grown in synthetic complete medium (SCM), a MM (Edinburgh minimal medium; Moreno *et al.*, 1991) with 2% glucose and supplemented with all amino acids 111 mg/l and with a four-fold excess of the supplements that strains do not synthesize (Ade, Ura, Leu and His). Solid rich medium (YEC), was made of YE 5 g/l supplemented with 111 mg/l of adenine, uracil, leucine, histidine. Liquid cultures were grown at 30°C with shaking at 250 rotations per minute.

Disruption of *sck1*⁺

The two flanking regions of *sck1*⁺ were cloned into the pDRIVE vector (Qiagen) after their amplification by PCR from plasmid pBC1 (Jin *et al.*, 1995) and using the pair of primers: 5'FLSCK1for (5'-CGGGTACCCTCTGTTTCGATACTCC-3'), 5'FLS CK1rev (5'-GTAACACCAGACGAGGA-3'); and 3'FLSCK1-sense (5'-GCGCTC GAG

TAAGCTTGCTCCAATC-3'), 3'FLSCK1-antisense (5'-TGCTCTAGATCATGCAAAC AACAGG-3'). Then pDRIVE-5'FLsck1 (bearing the 5' flanking region) was digested with *KpnI* and *SphI*, and pDRIVE-3'FLsck1 (bearing the 3' flanking region) with *XhoI* and *XbaI*. First, 5'FLsck1 was ligated to pDRIVE-Neo^R linearised by *KpnI* and *SphI* digestion. Subsequently, 3'FLsck1 was ligated to pDRIVE-5'FLsck1-*neo*^R cut with *XhoI* and *XbaI* to obtain pDRIVE-*sck1::neo*^R. The deletion cassette was removed from pDRIVE-*sck1::neo*^R by *KpnI* and *XbaI* double digestion, and used to transform SP14000 strain using a PEG/Li protocol (Elble, 1992). Transformants were selected on MM supplemented with adenine, uracil, leucine and G418. The knock-out of *sck1*⁺ was validated by PCR and Southern blot analysis.

Survival in stationary phase

Yeast strains were streaked on MM and grown for 5 days at 30°C. From these plates we inoculated a pre-culture on SMC and grew it until it reached OD₅₉₅ 3-4. Then, this pre-culture served to start a second pre-culture that was cultured until OD₅₉₅ 5-6. This pre-culture served to inoculate a 200 ml culture at initial OD₅₉₅ 0.2-0.4. This culture was grown until the end of exponential phase when OD₅₉₅ stopped increasing and reached the maximum density (Table 2). Ten hours after this point, the culture was separated into three independent 50 ml cultures in 250 ml flasks (keeping a medium/volume ratio of 1:5 as described in Fabrizio & Longo, 2003). Next, a first aliquot was diluted and plated on complete yeast extract solid medium. After 10 days, the total number of colonies was counted, with this number representing 100% survival and day 0 of the curve (see Supplemental Tables 1 and 2). The following measurements were done every 3-5 days. The two mutant strains, CHP453 and SP14089, have a slightly slower growth rate than the wild-type as described by Fujita and Yamamoto (Fujita & Yamamoto, 1998). To compensate for these differences, we adjusted the initial quantity of cells used to start every culture when using these strains.

Cell survival was also followed using the Phloxin B fluorescent dye. Around 1.4×10^7 cells were collected and 5 mg/l of Phloxin B were added to the medium. After 2 hours incubation at 30°C with shaking, the cells were washed twice in 1xPBS pH 7.4 and used for fluorescence microscopy or flow cytometry analyses. Controls with exponentially growing cells, and cells killed by heat (65°C for 1 hour) or NaN_3 (0.1% for 2 hours) showed that Phloxin B stains only dead cells (Supplemental Data Fig. 3). For all microscopic analysis, we used a fluorescence inverted microscope Nikon TE2000U. Images were acquired using a motion-picture camera CCD CoolSnapFX 12 bit and treated with UIC Metamorph software.

***In vivo* staining of caspase activity**

Cultures were harvested in exponential phase or stationary phase. Samples of 10^7 cells were washed once in 1 ml 1xPBS pH 7.4 and resuspended in 150 μl of 1xPBS containing 10 μM FITC-VAD-fmk (CaspACE, Promega). After incubation for 20 minutes at 30°C, cells were washed in 1 ml 1xPBS, resuspended in 100 μl 1xPBS and analysed by FACS or under the fluorescence microscope. The percentage of apoptotic cells was determined using flow cytometry.

Flow cytometry analysis

Cells were stained with Phloxin B or FITC-VAD-fmk as described above. Flow cytometry analysis was performed using FACS Calibur (Becton Dickinson Biosciences) on 10,000 cells. Emission from the argon LASER was at 488 nm; emission settings were 515-545 nm (filter FL1) or 560-600 nm (filter FL2) respectively for FITC-VAD-fmk and Phloxin B staining. The percentage of positive stained cells was determined as the

population of fluorescent cells with a higher fluorescent intensity than an unstained negative control. Two independent cultures were analysed.

Cultures were treated with propidium iodide in order to stain DNA and determine the quantity of DNA in cells. Cells were fixed and stained following the protocol of Sazer and Sherwood (1990), with 2 hours incubation at 37°C with RNase A. Samples containing 10,000 cells were analysed by flow cytometry using FL2-A detection line.

***In vivo* staining of ROS accumulation**

Samples of 100 μ l ($1-2 \times 10^7$ cells) of culture were collected and incubated with 30 μ M Dihydrorhodamine123 for 30 min at 30°C. Cells were applied on a poly-lysine pre-treated slide, washed by 1xPBS pH 7.4 and observed under fluorescence microscopy. Background fluorescence was manually removed using the UIC Metamorph software and at least 400 cells of two independent cultures were counted to determine the percentage of positively stained cells.

Stress Resistance in stationary phase

Cells were cultured for three days in stationary phase as described above. After washing with water, the cell concentration was adjusted to OD₅₉₅ of 0.5. Next, we added H₂O₂ (1 M final concentration) and incubated for 1 hour at 30°C, or menadione (0.75 M final concentration) and incubated for 3 hours at 30°C. Cells were pelleted and washed two times with 1 ml of water. Serial dilutions were spotted onto YE rich medium and incubated for 4 days at 30°C. For heat treatment, equal amounts of cells (OD₅₉₅ of 0.5) were heat-shocked for 45 min at 51°C. Serial dilutions were dropped onto YE rich medium and incubated 5 days at 30°C.

Acknowledgments

We thank Drs Charlie Hoffman and Masayuki Yamamoto for providing plasmids and strains. We also wish to thank Dr Charlie Hoffman and the members of the Rokeach lab for helpful discussions. We thank Serge Sénéchal for his assistance with the flow cytometry analyses. This work was funded by the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). G. F is supported by a fellowship from CIHR, and P.C by a fellowship from the Fond de Recherche sur la Nature et les Technologies du Québec (NATEQ).

Figures and legends

Figure 1: Chronological life span of wild-type *Schizosaccharomyces pombe*. Survival of auxotrophic strain cultured in SCM 2% glucose as a carbon source and estimated by CFU counting. Y-axis is shown in logarithmic scale (see Supplemental Data Fig. 1B for non-logarithmic scale).

Figure 1

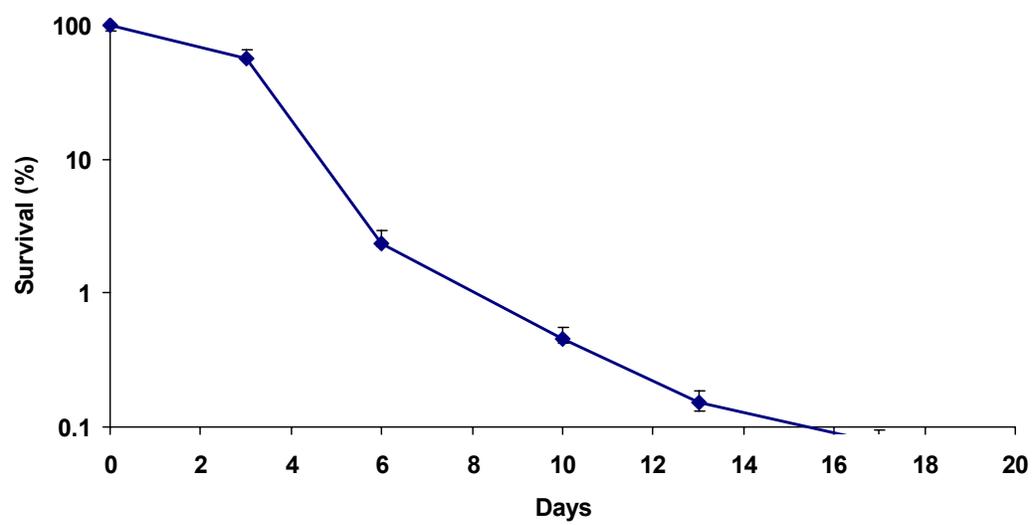


Figure 2: Differences in the estimation of cell survival followed by CFU counting or Phloxin B staining. (A) Cells from exponentially growing cultures, 6 days and 14 days old cultures were stained with the fluorescent vital dye Phloxin B, and analysed by fluorescence microscopy. Non-stained cells under fluorescence microscope were considered as alive. (B) Percentage of wild-type living cells measured as the number of Phloxin B unstained cells (left peak) versus stained cells (right peak) during stationary phase and quantified by flow cytometry. (C) Survival curves of an auxotrophic culture in 2% glucose measured by CFU counting or by vital staining with Phloxin B. The percent of unstained cells was estimated by flow cytometry analysis.

Figure 2

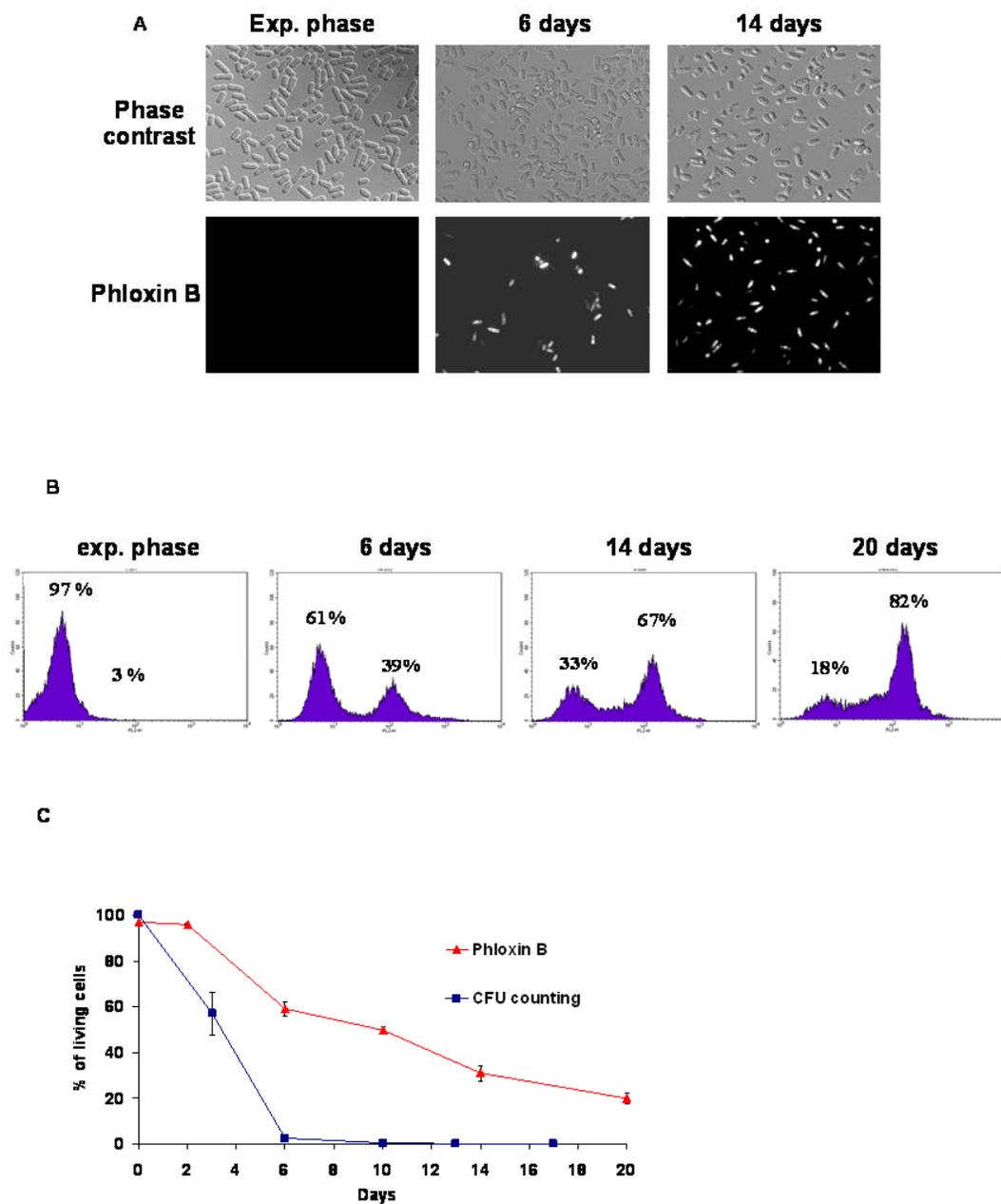


Figure 3: Deletions of *sck2*⁺ and *pkal*⁺ increase survival in stationary phase. (A) Survival of WT, $\Delta pkal$, $\Delta sck1$, $\Delta sck2$ and $\Delta sck1\Delta sck2$ strains was evaluated by CFU counting. Y-axis is shown in logarithmic scale (see Supplemental Data Fig. 2A for non-logarithmic scale). (B) Survival of WT, $\Delta pkal$, $\Delta sck2$ and $\Delta pkal\Delta sck2$ strains evaluated by CFU counting. Y-axis is shown in logarithmic scale (see Supplemental Fig. 2B for non-logarithmic scale). (C) Percentage of dead cells measured by Phloxin B staining of WT, $\Delta sck2$, $\Delta pkal$ and $\Delta pkal\Delta sck2$ strains. Stained cells were considered as dead and were quantified by flow cytometry.

Figure 3

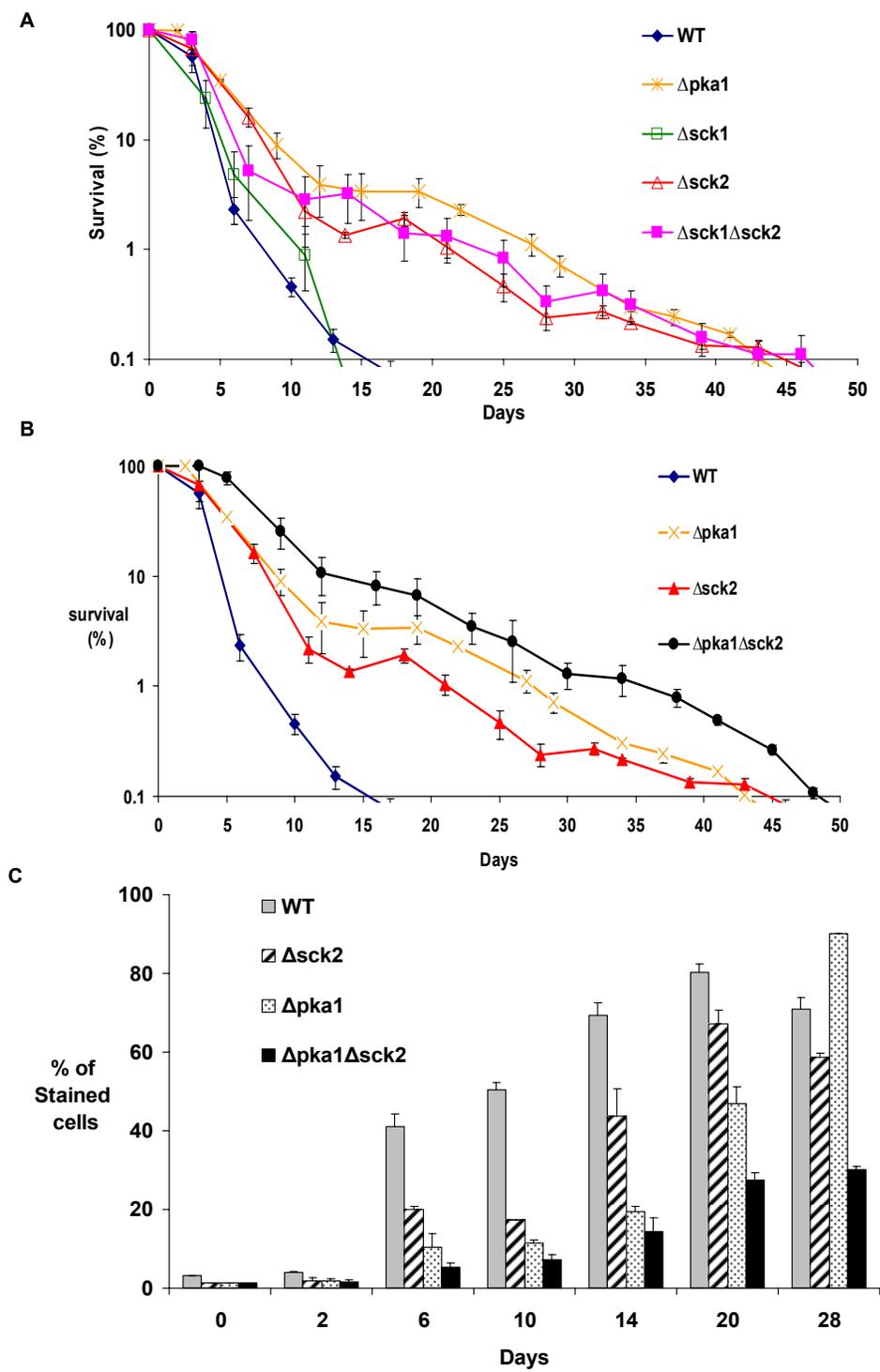


Figure 4: Wild-type, $\Delta sck2$, $\Delta pka1$ and $\Delta pka1\Delta sck2$ strains in log phase and stationary phase show no major differences in their cell cycle arrest. Wild-type and mutants strains were fixed with ethanol, and stained with propidium iodide and quantified by flow cytometry. The n, 2n, and 4n peaks are indicated.

Figure 4

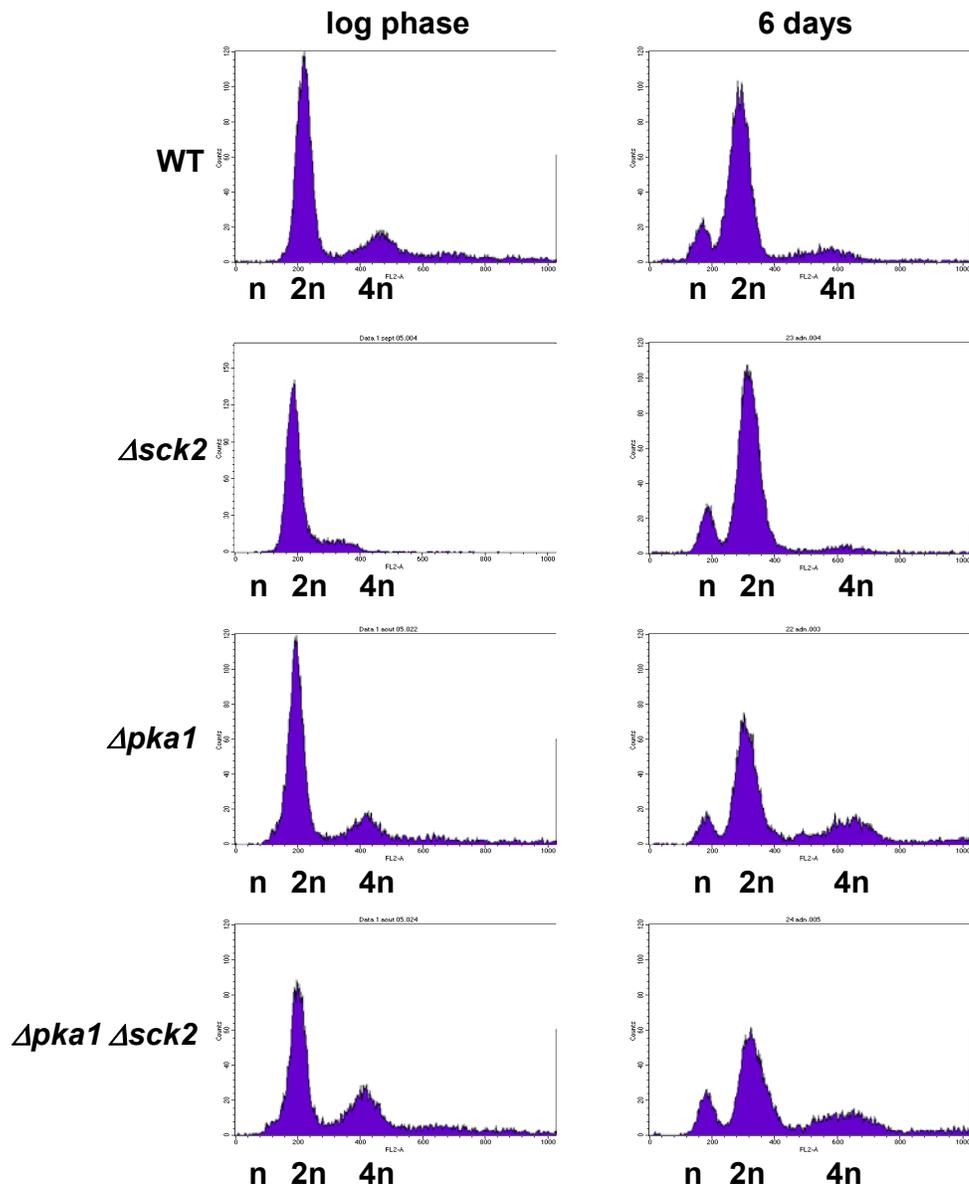


Figure 5: Strains $\Delta pka1$, $\Delta sck2$, $\Delta pka1\Delta sck2$ show slower accumulation of ROS during stationary phase as compared to wild type. (A) Wild-type and $\Delta pka1\Delta sck2$ strains were incubated with the ROS probe DHR123 and cells were observed under fluorescence microscopy. (B) Percentages of ROS accumulating cells are displayed for wild-type, $\Delta sck2$, $\Delta pka1$ and $\Delta pka1\Delta sck2$ strains. At least 400 cells per count were examined and the average of DHR123-positive cells from two cultures was calculated.

Figure 5

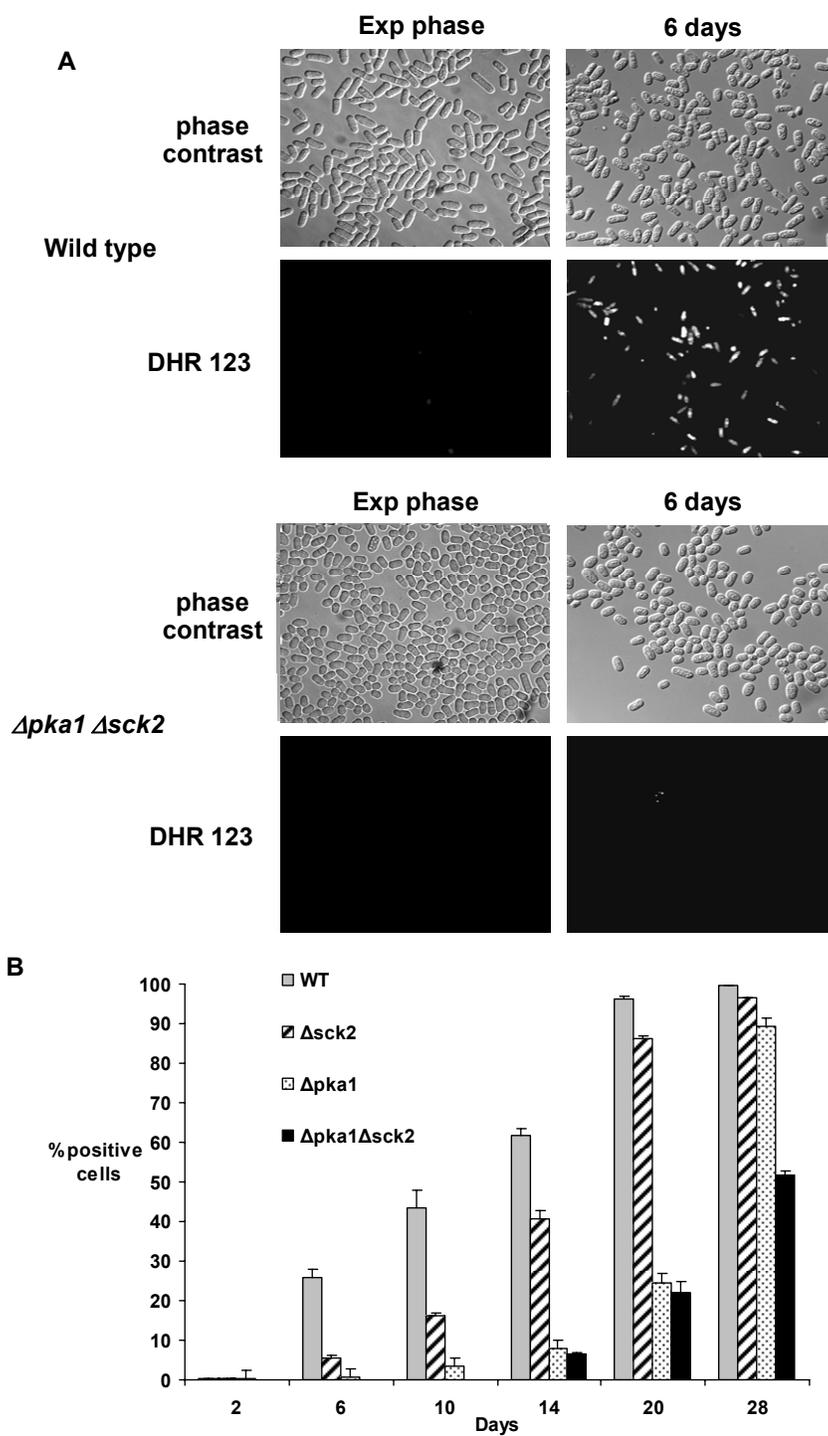


Figure 6: Caspase induction during ageing of $\Delta sck2$, $\Delta pka1$ and $\Delta pka1\Delta sck2$ strains is delayed compared to wild type. (A) Wild-type and $\Delta pka1\Delta sck2$ strains were stained with an apoptotic marker (FITC-VAD-fmk) during exponential and stationary phase, and observed by fluorescence microscopy. (B) Quantification of caspase-positive cells was done by flow cytometry as described in Experimental Procedures. The average of measurements on two independent cultures is presented.

Figure 6

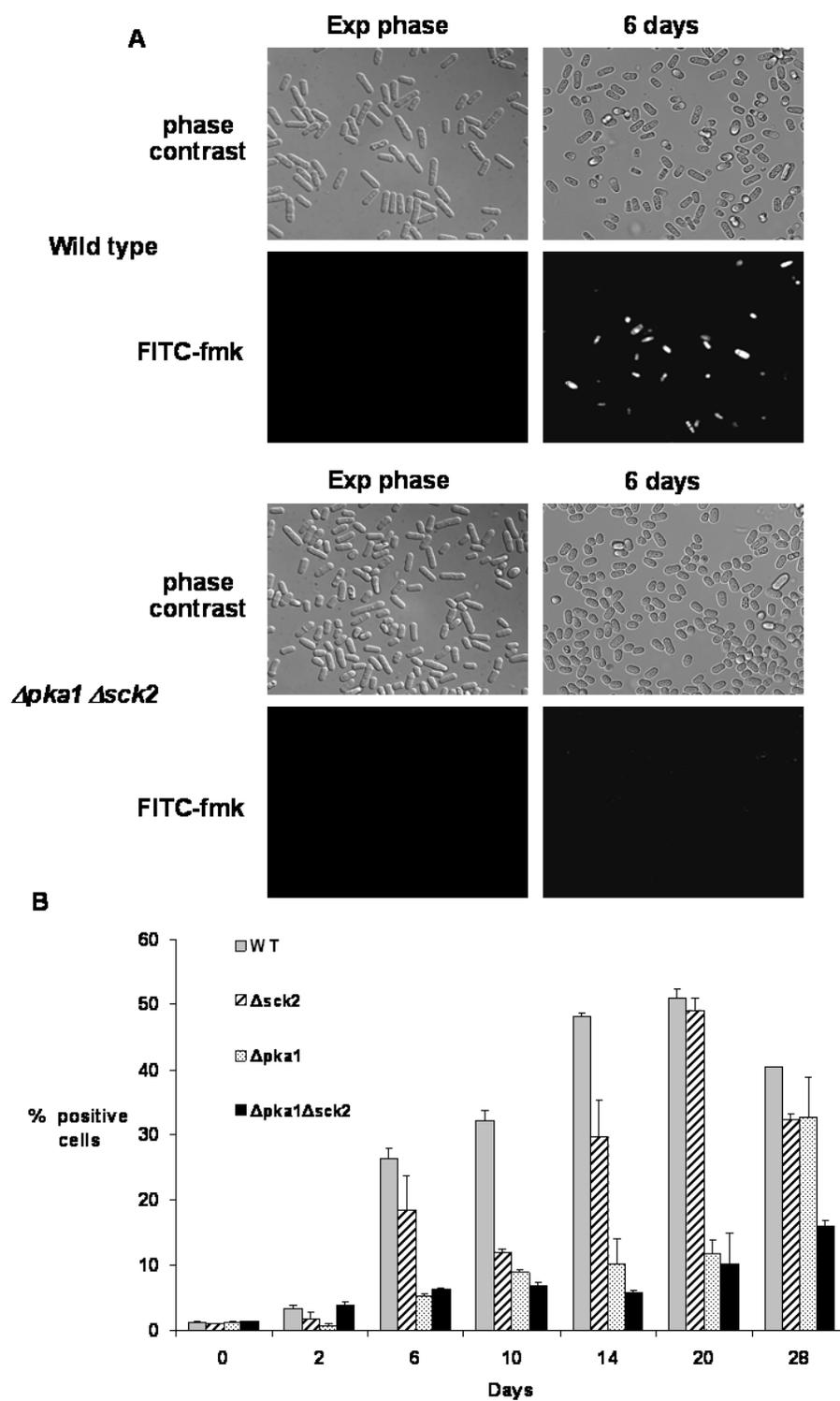


Figure 7: Stress resistance of long-lived mutants in stationary phase. All strains were treated by short exposure to high concentration of oxidative stress: H₂O₂ (1 M) and menadione (0.75 M) (A) or heat-shock (B). Dilutions were then spotted onto rich media to measure survival.

Figure 7

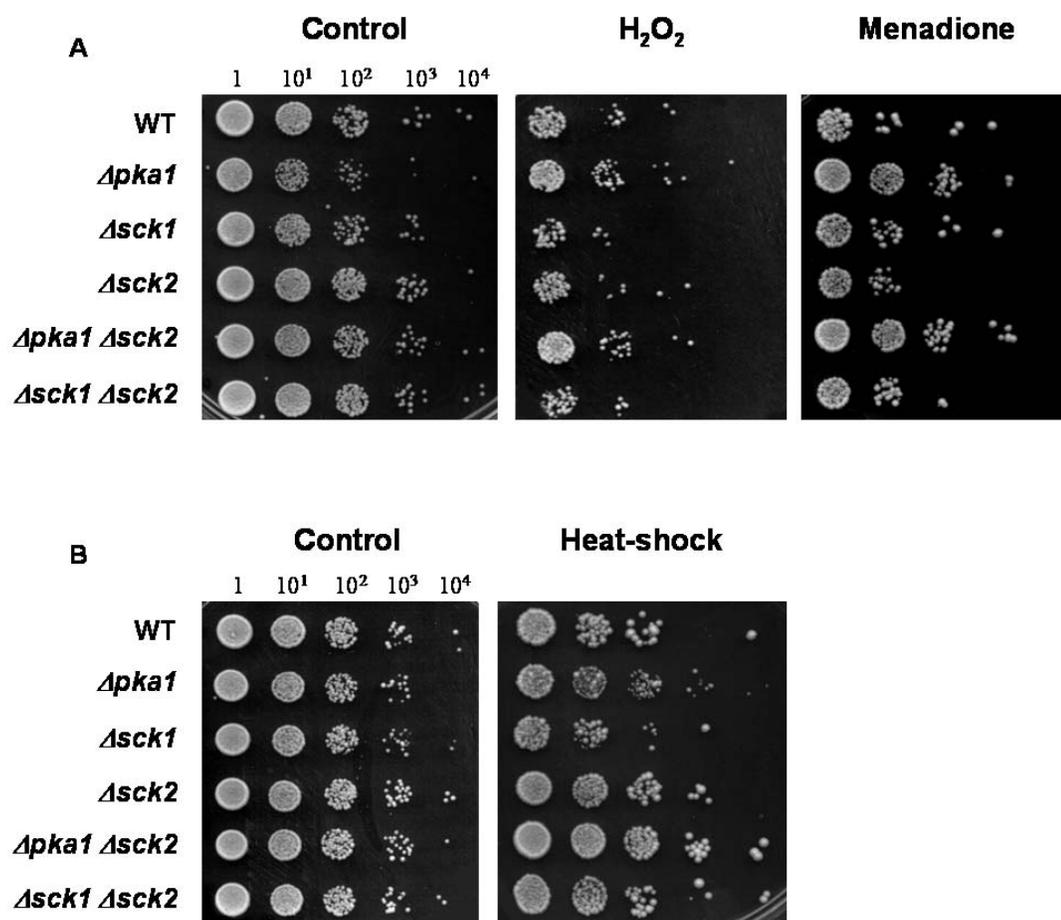


Table 1 : Genotypes of strains used in this study

Strain	Genotype	Origin
SP14078 (prototrophic WT)	<i>h⁻</i>	Hoffman C.
SP14000 (auxotrophic WT)	<i>h⁻ ade6-M210 ura4-D18 leu1-32</i>	This study
SP14073	<i>h⁻ ade6-M210 leu1-32 ura4- D18 sck1::Neo^R</i>	This study
SP14086	<i>h⁻ ade6-M210 leu1-32 ura4 -D18 his7-366 sck2::LEU2</i>	This study
SP14094	<i>h⁻ ade6-M210 leu1-32 ura4 -D18 his7-366 sck1::Neo^R sck2::LEU2</i>	This study
CHP453	<i>h⁻ leu1-32 ura4 -D18 his7-366 pka1::ura4⁺</i>	Hoffman C.
SP14089	<i>h⁻ ade6-M216 leu1-32 ura4 -D18 his7-366 pka1::ura4⁺ sck2::LEU2</i>	This study
JX770	<i>h⁻ ade6-M216 leu1-32 ura4 -D18 his7-366 pka1::ura4⁺ sck1::his7⁺ sck2::LEU2</i>	Yamamoto M.

Table 2. Maximum optical density (OD) reached by different strains in this study. The measurement has been done at the first point of survival curve representing 100% in the conditions described in Experimental procedures.

Strain	Name	Maximum OD*
SP14000	WT	10.0 ± 0.3
SP14073	<i>Δsck1</i>	9.6 ± 0.7
SP14086	<i>Δsck2</i>	10.7 ± 0.5
SP14094	<i>Δsck1 Δsck2</i>	9.9 ± 0.3
CHP453	<i>Δpkal</i>	10.6 ± 0.6
SP14089	<i>Δpkal Δsck2</i>	11.7 ± 0.6

* (n=3)

Table 3. Survival at day 10 estimated by CFU counting or phloxin B staining. Survival is given as the percent of total living cells at day 0. (fold factor of survival of a given mutant compared to wild type)

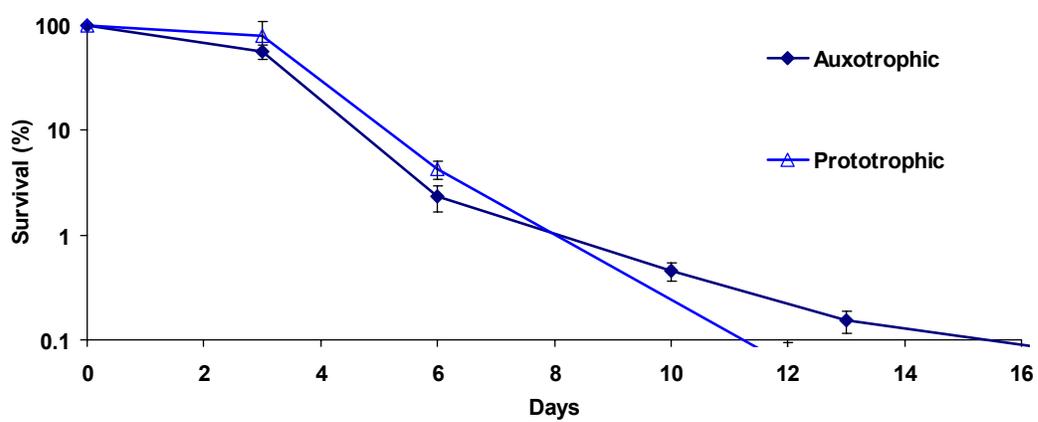
Strain	CFU (%)		Phloxin B (%)	
WT	2.3	-	59	-
Δ sck2	32	(13.9)	80	(1.35)
Δ pka1	31.5	(13.7)	89.5	(1.5)
Δ pka1 Δ sck2	67	(29)	94.7	(1.6)

Supplemental data

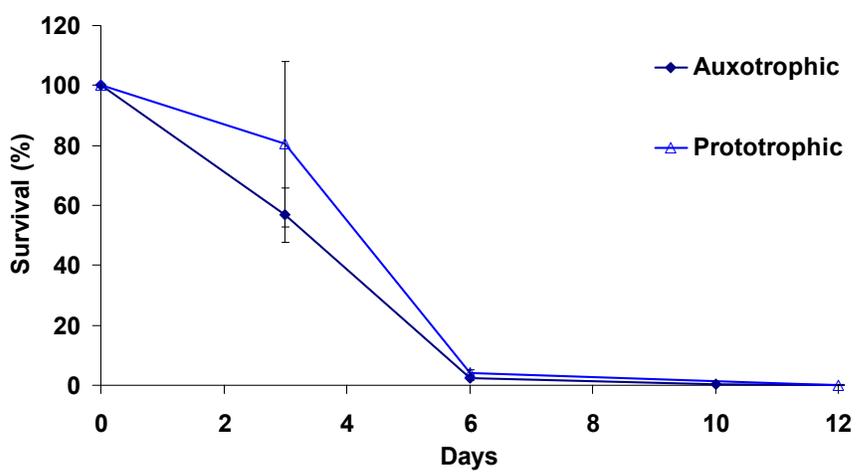
Supplemental Figure 1: Chronological life span of wild-type *Schizosaccharomyces pombe* and control in different background strains. (A) Survival of reference strains containing genetic markers (auxotrophic SP14000) or not (prototrophic SP14078). Cells were cultured in SCM with 2% glucose. (B) Same curves as in (A) but presented with linear Y-axis.

Supplemental Figure 1

A

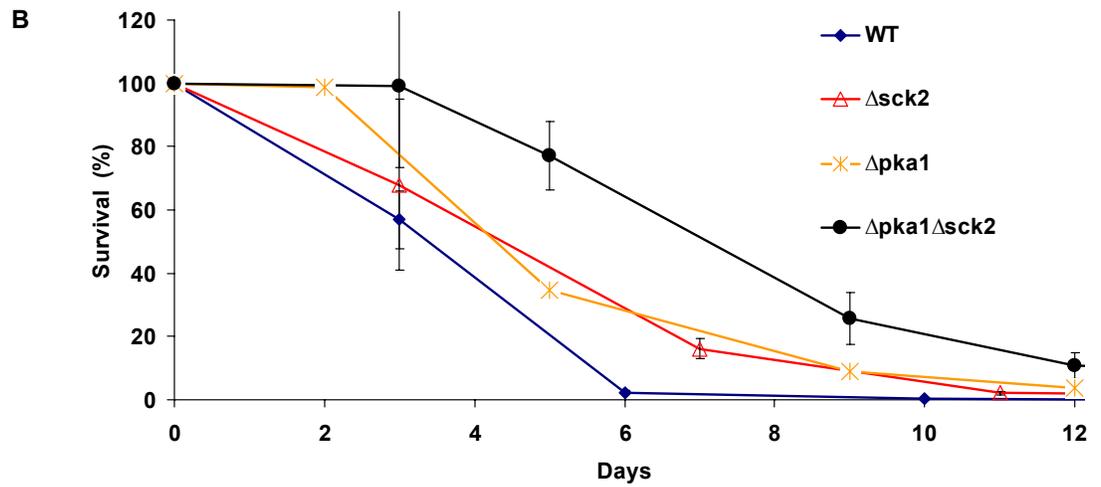
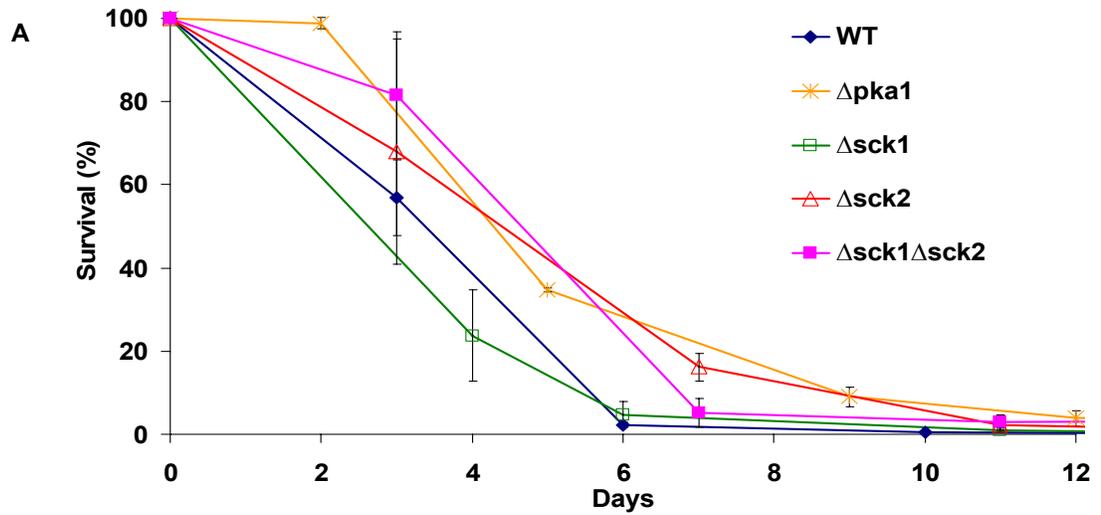


B

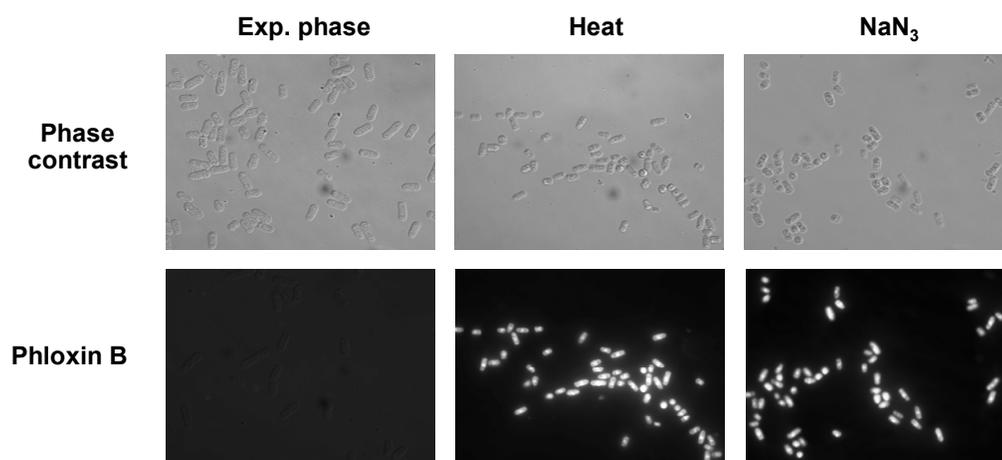


Supplemental Figure 2: Longevity curves expressed in non logarithmic scale. (A) Survival of WT, $\Delta pka1$, $\Delta sck1$, $\Delta sck2$ and $\Delta sck1\Delta sck2$ strains was evaluated by CFU counting. **(B)** Survival of WT, $\Delta pka1$, $\Delta sck2$ and $\Delta pka1\Delta sck2$ strains evaluated by CFU counting.

Supplemental Figure2



Supplemental Figure 3 : Phloxin B staining and fluorescence microscopy analysis of yeast cells killed by heat or sodium azide. Dead cells were all (100%) stained by Phloxin B, whereas less than 0.5% of exponential phase cells were stained.

Supplemental Figure 3

References

- Ashrafi K, Sinclair D, Gordon JI, Guarente L (1999) Passage through stationary phase advances replicative aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* **96**, 9100-9105.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005) Mitochondria, Oxidants, and aging. *Cell* **120**, 483-495.
- Barker MG, Walmsley RM (1999) Replicative ageing in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **15**, 1511-1518.
- Burhans WC, Weinberger M, Marchetti MA, Tamachadran L, D'Urso G, Huberman JA (2003) Apoptosis-like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects. *Mutat Res.* **532**, 227-243.
- Byrne SM, Hoffman CS (1993) Six *git* genes encode a glucose-induced adenylate cyclase activation pathway in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **105**, 1095-1100.
- Chen D, Toone WM, Mata J, Lyne R, Burns G, Kivinen K, Brazma A, Jones N, Bähler J (2003) Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol. Biol. Cell* **14**, 214-229.
- Costello G, Rodgers L, Beach D (1986) Fission yeast enters the stationary phase G0 state from either mitotic G1 or G2. *Curr Genet.* **11**, 119-125.
- Elble R (1992) A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* **13**, 18-22.
- Fabrizio P, Longo VD (2003) The chronological lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* **2**, 73-81.

- Fabrizio P, Liou L-L, Moy VN, Diaspro A, SelverstoneValentine J, Gralla EB, Longo VD (2003) SOD2 Functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast. *Genetics* **163**, 35-46.
- Fabrizio P, Gattazzo C, Battistella L, Wei M, Cheng C, McGrew K, Longo VD (2005) Sir2 Blocks Extreme Life-Span Extension. *Cell* **123**, 655-667.
- Fabrizio P, Battistella L, Vardavas R, Gattazzo C, Liou L-L, Diaspro A, Dossen JW, Gralla EB, Longo VD (2004) Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **166**, 1055-1067.
- Fabrizio P, Pozza F, Pletcher SD, Gendron CM, Longo VD (2001) Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* **292**, 288-290.
- Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239-247.
- Fujita M, Yamamoto M (1998) *S. pombe sck2⁺*, a second homologue of *S. cerevisiae SCH9* in fission yeast, encodes a putative protein kinase closely related to PKA in function. *Current Genetics* **33**, 248-254.
- Hekimi S, Guarente L (2003) Genetics and the specificity of the aging process. *Science* **299**, 1351-1354.
- Herker E, Jungwirth H, Lehmann KA, Maldener C, Frohlich K-U, Wissing S, Buttner S, Fehr M, Sigrist S and Madeo F (2004) Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* **164**, 501-507.
- Higuchi T, Watanabe Y and Yamamoto M (2002) Protein kinase A regulates sexual development and gluconeogenesis through phosphorylation of the Zn finger transcriptional activator Rst2p in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1-11.
- Hoffman CS, Winston F (1991) Glucose repression of transcription of the *Schizosaccharomyces pombe fbp1* gene occurs by a cAMP signaling pathway. *Genes Dev.* **5**, 561-571.
- Isshiki T, Mochizuki N, Maeda T, Yamamoto M (1992) Characterization of a fission yeast gene, *gpa2*, that encodes a G alpha subunit involved in the monitoring of nutrition. *Genes Dev.* **6**, 2455-2462.

- Jin M, Fujita M, Culley BM, Apolinario E, Yamamoto M, Maundrell K, Hoffman CS (1995) *स्क1*, a high copy number suppressor of defects in the cAMP-dependent protein kinase pathway in fission yeast, encodes a protein homologous to the *saccharomyces cerevisiae* SCH9 kinase. *Genetics* **140**, 457-467.
- Kaeberlein M, McVey M, 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.
- Kaeberlein M, Powers RW III, Steffen KK, Westman EA, Hu D, Dang N, Kerr EO, Kirkland KT, Fields S and Kennedy B K (2005) Regulation of yeast replicative lifespan by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science* **310**, 1193-1196.
- Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R (1993) A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild-type. *Nature* **366**, 461-464.
- Lamming DW, Latorre-Esteves M, Medvedik O, Wong SN, Tsang FA, Wang C, Lin S-J, Sinclair DA (2005) HST2 Mediates SIR2-independent life-span extension by calorie restriction. *Science* **309**, 1861-1864.
- Landry S, Pettit MT, Apolinario E, Hoffman CS (2000) The Fission yeast *git5* gene encodes a Gbeta subunit required for glucose-triggered adenylate cyclase activation. *Genetics* **154**, 1463-1471.
- Lin S-J, Defossez P-A, Guarente L (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *saccharomyces cerevisiae*. *Science* **289**, 2126-2128.
- Longo VD (1999) Mutations in signal transduction proteins increase stress resistance and longevity in yeast, nematodes, fruit flies, and mammalian neuronal cells. *Neurobiol Aging* **20**, 479-486.
- Longo VD (2003) The Ras and Sch9 pathways regulate stress resistance and longevity. *Exp Gerontol* **38**, 807-811.
- Longo VD, Ellerby LM, Bredesen DE, Valentine JS, Gralla EB (1997) Human Bcl-2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide dismutase and delays death of wild-type yeast. *J. Cell Biol.* **137**, 1581-1588.

- Longo VD, Fabrizio P (2002) Regulation of longevity and stress resistance: a molecular strategy conserved from yeast to humans? *Cell Mol Life Sci.* **59**, 903-908.
- Low CP, Liew L, Pervaiz S, Yang H (2005) Apoptosis and lipoapoptosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res.* **5**, 1199-206
- Madeo F, Herker E, Maldener C, Wissing S, Lachelt S, Herlan M, Fehr M, Lauber K, Sigrist SJ, Wesselborg S, Frohlich K-U (2002) A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Molecular Cell* **9**, 911-917.
- Maeda T, Watanabe Y, Kunitomo H, Yamamoto M (1994) Cloning of the *pkal* gene encoding the catalytic subunit of the cAMP- dependent protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **269**, 9632-9637.
- Marchler G, Schuller C, Adam G, Ruis H (1993) A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* **12**, 1997-2003.
- Matsumoto K, Uno I, Ishikawa T (1983) Initiation of meiosis in yeast mutants defective in adenylate cyclase and cyclic AMP-dependent protein kinase. *Cell* **32**, 417-423.
- Moreno S, Klar A, Nurse P (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* **194**, 795–823.
- Motizuki M, Yokata S, Tsurugi K (1995) Autophagic death after cell cycle arrest at the restrictive temperature in temperature-sensitive cell division cycle and secretory mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Cell Biol.* **68**, 275-287.
- Nocero M, Isshiki T, Yamamoto M, Hoffman CS (1994) Glucose repression of *fbp1* transcription in *Schizosaccharomyces pombe* is partially regulated by adenylate cyclase activation by a G Protein alpha Subunit Encoded by *gpa2 (git8)*. *Genetics* **138**, 39-45.
- Perez-Campo R, Lopez-Torres M, Cadenas S, Rojas C, Barja G (1998) The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J Comp Physiol [B]*. **168**, 149-158.
- Powers S, Kataoka T, Fasano O, Goldfarb M, Strathern J, Broach J, Wigler M (1984) Genes in *S. cerevisiae* encoding proteins with domains homologous to the

- mammalian ras proteins. *Cell* **36**, 607-612.
- Roosen J, Engelen K, Marchal K, Mathys J, Griffioen G, Cameroni E, Thevelein JM, De Virgilio C, De Moor B, Winderickx J (2005) PKA and Sch9 control a molecular switch important for the proper adaptation to nutrient availability. *Mol Microbiol.* **55**, 862-880.
- Sazer S, Sherwood, SW (1990) Mitochondrial growth and DNA synthesis occur in the absence of nuclear DNA replication in fission yeast. *J. Cell Science* **97**, 509-516.
- Sinclair DA, Guarente L (1997) Extrachromosomal rDNA circles--a cause of aging in yeast. *Cell*, 1033-1042.
- Shiozaki K, Russel P (1996) Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev* **10**, 2276-2288.
- Shiozaki K, Shiozaki M, Russell P (1997) Mcs4 mitotic catastrophe suppressor regulates the fission yeast cell cycle through the Wik1-Wis1-Spc1 kinase cascade. *Mol Biol Cell* **8**, 409-19.
- Sipiczki M (2004) Fission yeast phylogenesis and evolution. In *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe* (Richard Egel, Ed). Berlin : Springer, pp. 431-443.
- Toda T Cameron S, Sass P, Wigler M (1988) SCH9, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein distinct from, but functionally and structurally related to, cAMP-dependent protein kinase catalytic subunits. *Genes Dev.* **2**, 517-527.
- Welton RM, Hoffman CS (2000) Glucose monitoring in fission yeast via the *gpa2* G alpha, the *git5* G beta and the *git3* Putative Glucose Receptor. *Genetics* **156**, 513-521.
- Wilkinson MG, SM, Takeda T, Toone WM, Shieh JC, Toda T, Millar JB, Jones N (1996) The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes Dev.* **10**, 2289-2301.
- Zhang Q (2003) *Schizosaccharomyces pombe* cells deficient in triacylglycerols synthesis undergo apoptosis upon entry into the stationary phase. *J.Biol. Chem.* **278**, 47145-47155.

Article 2 : Pro-aging effects of glucose signalling through a G protein-coupled glucose receptor in fission yeast

Mise en contexte :

Notre première étude a montré que comme dans les autres levures, les kinases sensibles à la disponibilité en nutriments avaient une activité corrélée avec une baisse de la durée de vie.

Plusieurs études ont déjà proposé que ces voies enclenchent une réponse pro-vieillesse notamment à travers l'activité mitochondriale. Ici, nous voulons étudier plus précisément le rôle du glucose dans cette réponse. Quelle est l'implication de son métabolisme et celle de sa signalisation ? Pour répondre à cette question nous avons étudié en particulier son récepteur membranaire Git3 dans différents contextes métaboliques.

Cet article a été publié dans le journal *Plos genetics* en mars 2009 à la page e1000408.

Contributions des auteurs :

AER : culture cellulaire ; essai de longévité; microscopie avec marquage DHR123 ; mesure de respiration ; tests en goutte pour la croissance et la résistance ; dosage du glucose ; cytométrie de flux ; création des souches hxks et écriture du manuscrit.

AL : figure S2 entière, écriture de la partie correspondante.

MAA: tests activité β -gal.

CSH : don de certaines souches, écriture du manuscript

PC, GF et LAR : supervision générale, fond de recherches et écriture du manuscript

**Pro-aging effects of glucose signalling
through a G protein-coupled glucose receptor
in fission yeast**

Antoine E. Roux¹, Alexandre Leroux¹, Manal A. Alaamery², Charles S. Hoffman², Pascal Chartrand¹, Gerardo Ferbeyre¹, and Luis A. Rokeach¹

¹Department of Biochemistry, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

²Biology Department, Boston College, MA 02467, USA

Corresponding author: Luis A. Rokeach

Tel: (514) 343-6324

Fax: (514) 343-2210

Corresponding author: Pascal Chartrand

Tel: (514) 343-5684

Corresponding author: Gerardo Ferbeyre

Tel: (514) 343-7571

Keywords: aging, metabolism, Git3, cAMP, PKA, hexokinase, *Schizosaccharomyces pombe*, life span, ageing, respiration, ROS, calorie restriction.

Abstract

Glucose is the preferred carbon and energy source in prokaryotes, unicellular eukaryotes and metazoans. However, excess of glucose has been associated with several diseases, including diabetes and the less understood process of aging. On the contrary, limiting glucose (i.e. calorie restriction) slows aging and age related diseases in most species. Understanding the mechanism by which glucose limits life span is therefore important for any attempt to control aging and age-related diseases.

Here we use the yeast *Schizosaccharomyces pombe* as a model to study the regulation of chronological life span by glucose. Growth of *S. pombe* at a reduced concentration of glucose increased life span and oxidative stress resistance as reported before for many other organisms. Surprisingly, loss of the Git3 glucose receptor, a G protein-coupled receptor, also increased life span in conditions where glucose consumption was not affected. These results suggest a role for glucose-signalling pathways in life span regulation. In agreement, constitutive activation of the G α subunit acting downstream of Git3 accelerated aging in *S. pombe* and inhibited the effects of calorie restriction. A similar pro-aging effect of glucose was documented in mutants of hexokinase which cannot metabolize glucose and therefore are exposed to constitutive glucose signalling.

The pro-aging effect of glucose signalling on life span correlated with an increase in reactive oxygen species and a decrease in oxidative stress resistance and respiration rate. Likewise the anti-aging effect of both calorie restriction and the $\Delta git3$ mutation was accompanied by increased respiration and lower reactive oxygen species production. Altogether, our data suggest an important role for glucose signalling through the Git3/PKA pathway to regulate *S. pombe* life span.

Author summary

Lowering caloric intake by limiting glucose (the preferred carbon and energy source), increases life span in various species. Excess glucose can have deleterious effects, but it is not clear whether this is due to the caloric contribution of glucose or to some other effect. Glucose sensed by the cells activates signalling pathways that in yeast favor the metabolic machinery that makes energy (glycolysis) and cell growth. The sensing of glucose also reduces stress resistance and the ability to live long. Does glucose provoke a pro-aging effect as a result of its metabolic activity or by activating signalling pathways? Here we addressed this question by studying the role of a glucose-signalling pathway in the life span of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Genetic inactivation of the glucose-signalling pathway prolonged life span in this yeast while its constitutive activation shortened it and blocked the longevity effects of calorie restriction. The pro-aging effects of glucose signalling correlated with a decrease in mitochondrial respiration and an increase in reactive oxygen species production. Moreover a strain without glucose metabolism is still sensitive to detrimental effects of glucose due to signalling. Our work shows that glucose signalling through the glucose receptor *GIT3* constitutes the main cause responsible for the pro-aging effects of glucose in fission yeast.

Introduction

Glucose is the major carbon source entering the metabolic pathways. Glucose ultimately generates ATP to supply the energy necessary for the cell biosynthetic and functional demands. Substantial evidences support the idea that excess glucose acts as a pro-aging and pathogenic factor [1,2]. Consistently, lowering glucose intake in a calorie restriction diet increases life span in many species, from yeasts to mammals [3,4].

Research carried out in *Saccharomyces cerevisiae* has been fruitful to unravel the role of nutrient sensing in longevity. Mutations blocking the action of genes controlling nutrient- signalling pathways increase replicative life span (RLS), defined as the number of times a mother yeast cell produces a daughter cell [5-10]. For instance, genetic deletion of PKA signalling via Gpr1 or Gpa2 genes resulted in the extension of RLS [11]. Likewise, nutrient-signalling shortens chronological life span (CLS), the time a yeast population remains viable in stationary phase [12-15]. In other words, nutrient-signalling pathways have a pro-aging effect in budding yeast. So far, mutations found to increase life span in *S. cerevisiae* map to genes that respond to multiple nutrients, such as the PKA, Sch9 and Tor pathways [16]. Glucose is the major source of calories for yeast. Experimentally, calorie

restriction (CR) is achieved by reducing the concentration of glucose in *S. cerevisiae* cultures. Under these conditions, yeast cells exhibit an increase in both their replicative life span, and their CLS. It is therefore possible that nutrients, and more particularly the glucose-signalling pathway, are major regulators of the effects of calorie restriction on aging.

In yeast, the connection between nutrient sensing and mitochondrial activity has been depicted in different contexts. This regulation of mitochondria allows yeast to adapt its energy metabolism to the available nutrients, and is crucial for the control of longevity [16]. Several genetic studies demonstrate that forcing *S. cerevisiae* to use respiration instead of fermentation induces a gain in both chronological and replicative life span [17-20]. To summarize, the activity of nutrient-signalling pathways seem to promote aging by inhibiting both stress resistance and respiration. However, the predominance and the interdependence of each of these two functions, metabolic changes and signalling in the control of longevity are still nebulous.

Our laboratory introduced *Schizosaccharomyces pombe* as a model organism for the study of chronological aging [21]. The use of this particular yeast is justified by the differences existing with budding yeast in traits that can potentially affect longevity. Both have been referred as Crabtree-positive yeast because of their capability to repress mitochondrial respiration in favour of glycolysis when glucose is abundantly available [22]. Nevertheless in fission yeast, the Crabtree effect is less pronounced than in *S. cerevisiae* since the inhibition of oxygen consumption by glucose is smaller; in other words *S. pombe* maintains a higher respiration rate in the presence of glucose [22]. Consistently, it is hard to isolate respiratory-deficient cells (*petite*) in *S. pombe* [23,24], while these mutants occur spontaneously in *S. cerevisiae*. Furthermore, *S. pombe* differs from *S. cerevisiae* because of its lack of glyoxylate cycle that makes it inefficient in ethanol consumption as carbon

source [25,26]. Finally, fission yeast is also distinguishable in its mitochondrial inheritance which is mediated by microtubules like in higher eukaryotes [27].

In the present study, we wished to determine whether glucose metabolism or extracellular glucose signalling is responsible for the regulation of life span. We found that environmental glucose decreases CLS in *S. pombe* in a dose-dependent manner, and this effect is mimicked in cells lacking the glucose receptor Git3p, a G protein-coupled receptor (GPCR) which signals the presence of glucose in the medium through a cAMP/PKA pathway [28,29]. Consistently, the constitutive activation of the G α subunit of the G protein-coupled to the glucose receptor significantly decreases CLS. Deletion in the Git3/PKA signalling is characterized by higher oxidative stress defense, respiration and mitochondrial membrane potential; the same features observed in CR. Interestingly, CR has no effect either on stress defense or longevity in the strain constitutively activated for Git3/PKA (by mutational activation of the G α subunit), although it still enhances respiration. Knockout of *S. pombe* hexokinase genes (*hvk1* and *hvk2*), which are required to channel extracellular glucose into glycolysis, does not extend CLS in *S. pombe*. On the contrary, these mutant yeast strains accumulated glucose in the medium, exhibited increased glucose signalling and accelerated aging. Reduction of extracellular glucose or mutation of the glucose receptor Git3p rescued their aging phenotype. Altogether, our data suggest that glucose signalling constitutes the main pathway in the pro-aging effect of glucose in fission yeast.

Results

Growth on glucose decreases chronological life span in fission yeast.

To study the effects of glucose concentration on CLS, wild-type *S. pombe* cells were cultured in rich medium with different concentrations of glucose. Survival was assessed by counting colony forming units (CFU) as a function of time, after cells entered stationary phase [21]. Decreasing the concentration of glucose from 2% to 0.05% resulted in a dose-dependent extension of chronological life span (Figure 1A). Cultures with higher glucose concentration exhibited a premature appearance of aged-cell phenotype upon entering the stationary phase. This phenotype is characterized by a shrunken shape and oversized vacuoles (Figure 1B). DNA content analysis by flow cytometry revealed that cells cultured in glucose 2% and 0.2% displayed a typical G2 cell-cycle arrest in stationary phase (*data not shown*). Moreover, the cells had similar doubling times at different glucose concentrations during the exponential growth phase of the culture (Figure S1).

Aging in yeast results in part from cellular damage due to the accumulation of reactive oxygen species (ROS) [30]. In agreement, cells cultured in higher glucose concentrations accumulated more ROS than cells grown at lower glucose concentrations, as shown by staining with dihydrorhodamine 123 and dihydroethidium (Figure 1C and 1D and Figure S2). On the other hand, culturing cells in SMC medium lacking glucose and containing glycerol as carbon source increased chronological longevity up to tenfold longer than in 2% glucose (Figure 1E). Glycerol as sole carbon source forces the cell metabolism toward mitochondrial respiration, as evidenced by the diminished growth rate and the rise in oxygen consumption [31]. Altogether, these results confirm that the relationship between nutrition and longevity in *S. pombe* is similar to that observed in other model organisms.

A GPCR-initiated signalling pathway mediates pro-aging effects of glucose in *S. pombe*.

A number of mechanisms could account for the pro-aging effects of glucose in *S. pombe*. For instance, the effect of glucose on aging could be due to extracellular glucose sensing (signalling pathway) or through intracellular glucose effects including glucose metabolism and cytoplasmic glucose sensing. To distinguish between them, we studied a strain deleted for the *git3*⁺ cytoplasmic membrane glucose receptor gene. *S. pombe* cells lacking this receptor (Δ *git3*) exhibited extension of their CLS (Figure 2A), suggesting that the pro-aging effects of glucose depends, at least in part, on the activation of a signalling pathway initiated by this receptor. To further confirm this idea, we used a constitutively active G α subunit (Gpa2^{R176H}p) that acts downstream of Git3p in the glucose-signalling pathway. Gpa2^{R176H}p constitutively activates the PKA kinase independently of the presence

of glucose by promoting the synthesis of a high level of cAMP [28,32]. As expected, cells expressing this activated G α protein displayed a significantly reduced CLS (Figure 2A).

To confirm that $\Delta git3$ and $gpa2^{R176H}$ cells have decreased and increased glucose signalling, respectively, we took advantage of the fact that in *S. pombe*, glucose represses the transcription of the fructose-1,6-bisphosphatase $fbp1^+$ gene via PKA activation [33,34]. We used an $fbp1$ -driven $lacZ$ reporter integrated in the *S. pombe* genome to measure $fbp1$ transcription [35,36]. Thus, the β -galactosidase activity inversely reflects the level of PKA activation in this glucose-sensing pathway. As expected, at late logarithmic phase, deletion of $git3^+$ increased expression of this reporter, while the $gpa2^{R176H}$ mutation reduced its expression (Figure 2B). Consistently, culturing WT cells in low glucose conditions also increased $fbp1$ - $lacZ$ expression (Figure 2B).

Since chronological aging in yeast is linked to the accumulation of ROS [21,30,37], we next measured the levels of ROS in $\Delta git3$ and $gpa2^{R176H}$ cells. As expected, deletion of the glucose receptor reduced ROS levels, while the constitutive activation of the glucose-signalling pathway increased ROS levels (Figure 2C). Although these results suggest that glucose signalling regulates aging independently of glucose utilization, it is possible that loss of the glucose-signalling pathway reduces glucose metabolism in this mutant. Indeed, the PKA pathway is known to control glucose intake via the regulation of hexose transporters responsible for glucose import in *S. cerevisiae* [38,39]. We thus measured glucose consumption and found that mutations affecting the glucose-signalling pathway did not change the rate of glucose consumption (Figure S3). In conclusion, these results suggest that the glucose-signalling pathway controls chronological aging independently of glucose intake and utilization.

Calorie restriction and disabled glucose signalling increase respiration.

Experimentally, the intervention referred as calorie restriction (CR) is achieved by reducing the calorie intake of an organism and represents the most effective way to increase life span [3]. This phenomenon has been verified in almost all species studied, from yeast to mammals [7,40] including non-human primates [41]. CR improves general health and delays the inception of many late-onset diseases in a variety of organisms [42].

In *S. cerevisiae*, calorie restriction is implemented by culturing the cells on low glucose concentrations [5,15,43]. Above, we showed that culturing *S. pombe* in low glucose decreases glucose signalling, and demonstrated that mutations affecting this signalling pathway increase the life span of *S. pombe* when cultured on high glucose concentration.

Increased respiration correlates with longevity in yeast [17,20], and mammals [4]. In yeast, low glucose availability leads to a switch of the pyruvate metabolism from fermentation toward mitochondrial tricarboxylic acid cycle and respiration [26,44]. To determine if mutations in the glucose-signalling pathway affect respiration in *S. pombe*, we measured the oxygen consumption of long-lived $\Delta git3$ and short-lived $gpa2^{R176H}$ cells. In high glucose, we observed that $\Delta git3$ cells display a higher level of oxygen consumption as compared to that of WT (Figure 3A). The effect of respiration on the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) was determined using the DiOC₆ dye and showed that the $\Delta\psi_m$ in stationary phase cells was higher in $\Delta git3$ compared to WT cells (Figure S4). Interestingly, WT cells cultured in 0.2% glucose exhibited a higher level of oxygen consumption than the $\Delta git3$ mutant in 2% glucose (Figure 3A), and an increased

mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in early exponential phase (Figure S4). This could explain why CR is slightly more efficient than the *git3*⁺ deletion in extending CLS (Figure 2A). Higher respiration was concomitant with a better growth on respiration medium (glycerol 3%) of both, WT cells previously grown on CR conditions and Δ *git3* cells grown on either normal or CR conditions (Figure 3B). In addition to glucose repression, the participation of the PKA/cAMP-mediated signalling pathway in mitochondrial functions has been suggested in budding yeast [45,46]. Our data and the observation that *pka1*⁺ deletion increased respiration as well (*not shown*) support the involvement of Git3/PKA in the regulation of mitochondrial functions in fission yeast.

To investigate if Git3/PKA is the only pathway regulating the metabolic switch toward mitochondrial respiration during CR, we subjected Δ *git3* cells to CR and measured respiration. We observed an increase in respiration when Δ *git3* mutation was combined to CR compared to Δ *git3* cells in 2% glucose (Figure 3A and C). Hence, CR can increase respiration by mechanisms independent of the glucose receptor Git3.

On the other hand, we observed that the activated Gpa2^{R176H}p prevents the full activation of respiration induced by CR (Figure 3D). These results are supported by the observation that *gpa2*^{R176H} cells did not grow on respiration medium (glycerol) (Figure 3B). Moreover, as oxygen consumption of WT and Δ *git3* cells was 30% higher than *gpa2*^{R176H} cells in CR, we observed that the $\Delta\psi_m$ of Δ *git3* and WT cells in stationary phase remained higher than *gpa2*^{R176H} cells (Figure S4). Altogether these data suggest that CR and reduced glucose signalling are not equivalent, and that Git3/PKA is involved in the control of respiration.

Calorie restriction and disabled glucose signalling increase stress resistance.

Guarente and colleagues proposed that in yeast, CR increases life span by increasing respiration but not oxidative stress resistance [17]. However, another study from Kaeberlein and collaborators contradicted these data. They showed that reducing glucose levels increased replicative life span in respiratory-deficient yeast [47]. We showed above that both CR and the $\Delta git3$ mutation increase respiration, while the $gpa2^{R176H}$ mutation decreased the effect of CR on respiration. Combining CR and the $\Delta git3$ mutation did not increase respiration over the values with CR alone. However, the survival of $\Delta git3$ cells was higher on CR than that of WT cells (Figure 4A). On the other hand, CR did not increase the respiration rate of the strain expressing activated Gpa2^{R176H}p as this intervention did in WT cells (Figure 3D), and this defect could partially explain its short life span (Figure 4B).

To investigate further whether the additive effect of CR and loss of Git3p signalling involves respiration, cells were cultured in 20 μ M of antimycin A, an inhibitor of complex III of the mitochondrial electron transport chain, that creates a leakage of electrons [48] and increases ROS production. Glucose restriction and $git3^+$ deletion together increased longevity in this high-ROS context (Figure S5). This suggests that low glucose signalling cooperates with other effects of CR acting downstream of ROS production, perhaps stimulating ROS defense mechanisms. Together, the data suggests that CR and reduced glucose signalling are not equivalent and these manipulations can actually cooperate to increase life span by a mechanism different than an increase in respiration.

To investigate whether resistance to oxidative stress could explain the longevity effects of CR and *git3*⁺ deletion, we next study the effects of several pro-oxidants molecules on WT and mutants *S. pombe* cells grown at high or low glucose concentrations. First, CR and, to a lesser extent, loss of the Git3p GPCR increased hydrogen peroxide and menadione resistance (Figure 4C). Moreover, CR strengthened the already high stress resistance of Δ *git3* cells (Figure 4C). On the other hand, the resistance to both hydrogen peroxide and menadione treatment in *gpa2*^{R176H} cells was significantly lower than in WT (Figure 4D). This stress sensitivity could also explain the very short CLS of this mutant in both high and low glucose.

We also measured the levels of cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) and mitochondrial Mn-SOD (SOD2) by quantitative PCR (Figure 4E). The importance of these two enzymes for long-term survival was demonstrated in budding yeast cultured in high glucose concentration [49]. No significant differences of expression were seen, neither in SOD2 (Figure 4E) nor in glutathione peroxidase (Gpx1, *data not shown*) for all the mutants and growth conditions tested. Interestingly, WT cells on CR showed no increased expression of SOD1 or SOD2 despite their very high oxidative stress resistance (Figure 2C). On the other hand, the deletion of glucose receptor increased significantly SOD1 expression. This correlates with the gain of oxidative stress resistance of this strain (Figure 4C). An unexpected three to six time rise of SOD1 transcript was observed in the *gpa2*^{R176H} mutant, even if this strain displayed a very weak oxidative stress resistance. This could be the consequence of a feedback mechanism attributable to the very high production of ROS in this strain (Figure 2C). Although further studies on the mechanisms of stress resistance will be necessary, our data clearly shows that glucose signalling regulates SOD1 expression in *S. pombe*. Since SOD1 is not regulated by CR, it may be part of the mechanism by which the *git3*⁺ deletion cooperates with CR to increase the resistance to oxidative stress and life span.

Loss of hexokinase 2 activity decreases glucose metabolism, increases glucose signalling and promotes aging

In yeast, hexokinase 2 is responsible for channeling glucose into metabolic pathways by catalyzing phosphorylation of this sugar. It also has a function in glucose signalling in *S. cerevisiae* by promoting the down-regulation of glucose-repressed genes [50,51]. Mutants of hexokinase do not influence CLS but increase replicative life span in *S. cerevisiae* [17,43]. In fission yeast, the glucose phosphorylation activity is provided by two hexokinases (Hxk1p and Hxk2p), but the main enzymatic activity is due to hexokinase 2 [50]. Loss of Hxk1p has no significant phenotype (*data not shown*) and loss of Hxk2p dramatically decreases the growth rate in glucose [50]. The double knockout of both *hxk1*⁺ and *hxk2*⁺ is not viable on glucose [50]. To determine if hexokinase affects CLS in *S. pombe*, we first measured the life span of an *S. pombe* Δ *hxk2* deletion strain. Unlike in *S. cerevisiae*, we observed a significant decrease in CLS in this strain (Figure 5A).

We have shown above that glucose signalling mediates pro-aging effects in *S. pombe*. Therefore, we reasoned that defective glucose utilization in the Δ *hxk2* strain could result in an accumulation of intracellular glucose followed by the inhibition of glucose import. Moreover in *S. cerevisiae*, glucose can be re-exported in the extracellular medium by the *hxt* hexose transporter [52]. In turn, the high extracellular glucose concentration would lead to increase the duration of glucose signalling. To test this hypothesis, we first measured the glucose concentration in the medium during the growth of both wild-type and Δ *hxk2* cells. We found that glucose levels remained high in the Δ *hxk2* culture as compared to WT, and that this strain has a very slow growth rate (Figure 5B). Congruently with this observation, at early stationary phase Δ *hxk2* cells exhibited increased glucose signalling in comparison with control cells, as represented by the drop of *fbp1-lacZ* reporter expression (Figure 5C). In budding yeast, hexokinase activity has been involved in glucose-signalling

pathways during exponential phase [53]. Our results do not contradict, but support those observations since the $\Delta h x k 2$ mutant has a defect in glucose signalling in exponential phase when compared to wild type, as indicated by elevated *fbp1-lacZ* expression (*data not shown*). However, the $\Delta h x k 2$ mutant reaches stationary phase with glucose in the medium and its short life span was completely rescued when cultured in 0.2% glucose. As expected, culturing $\Delta h x k 2$ cells in low glucose resulted in a two-fold increase in β -galactosidase activity indicating an increase in *fbp1-lacZ* reporter expression. This shows a reduction in signalling through the Git3/PKA pathway (Figure 5A and 5C). Taken together, the results are consistent with the model that an increase in glucose signalling via the Git3/PKA pathway accelerates aging in $\Delta h x k 2$ mutants.

Glucose GPCR Git3p promotes aging in absence of glucose metabolism

The strain $\Delta h x k 2$ still has the hexokinase 1 activity permitting glucose metabolism (Figure 5B) [50]. To confirm the importance of the pro-aging effect of glucose signalling isolated from the effect of glucose utilization as energy source, we constructed a double knockout of both hexokinases in fission yeast (*hxk1⁺* and *hxk2⁺*). These two mutations should prevent glucose from entering glycolysis and the pentose phosphate pathway. However, so far attempts to obtain this double mutant has been unsuccessful [50]. It was concluded that $\Delta h x k 1 \Delta h x k 2$ strain is not viable on glucose. To circumvent this problem, we complemented $\Delta h x k 2$ with a plasmid expressing Hxk2p (pREP41_ *hxk2⁺*) and crossed it with a $\Delta h x k 1$ strain. After sporulation of the diploid, we selected for offspring containing both $\Delta h x k 1$ and $\Delta h x k 2$ deletions and the plasmid pREP41_ *hxk2⁺*. Then we allowed the strain to lose the *hxk2⁺* plasmid in a medium containing only glycerol as carbon source and picked clones without plasmid. Because we obtained viable double mutants, we concluded

that hexokinase activity and possibly glucose phosphorylation was required for sporulation but not for survival in *S. pombe*. Using the same approach, the triple knockout, $\Delta h x k 1 \Delta h x k 2 \Delta g i t 3$ was created.

These mutants $\Delta h x k 1 \Delta h x k 2$ and $\Delta h x k 1 \Delta h x k 2 \Delta g i t 3$ could not grow when switched on plates with only glucose as carbon source. After at least ten days of incubation however, in some plates we observed for both strains clones that grew on glucose at a frequency between 10^{-6} to 10^{-7} (*data not shown*). The appearance of such clones was attributed to genetic reversion due to the nature of hexokinase 2 knockout that was created by insertion of a marker rather than complete suppression of the open reading frame [50].

Mutants $\Delta h x k 1 \Delta h x k 2$ and $\Delta h x k 1 \Delta h x k 2 \Delta g i t 3$ were grown in glycerol as a carbon source for around two divisions with a doubling time of around ten hours. At this point, they were spotted on plates containing glycerol plus glucose (Figure 6A). The double mutant $\Delta h x k 1 \Delta h x k 2$ did not grow on glycerol with 2% glucose, but it did on glycerol with 0.2% glucose. This result is consistent with the idea that the absence of hexokinase activity leads to a sustained and toxic glucose signalling. In agreement, the impaired growth of the double hexokinase mutant on glycerol plus glucose 2% was completely restored by a deletion in the glucose receptor $g i t 3^{+}$ (Figure 6A).

To assess whether the increase in glucose signalling of the double hexokinase knockout decreases the viability in stationary phase (chronological aging), we added 2% glucose to liquid cultures at late exponential phase ($O D_{595}$ 5-6). Then, viability was evaluated as a function of time by counting the number of living cells per mL (Figure 6B). After glucose addition, cultures with and without glucose needed two-day incubation to reach saturation corresponding to $O D_{595}$ 13 to 16. The $\Delta h x k 1 \Delta h x k 2$ double deletion mutant

exposed to 2% glucose displayed striking loss of viability 24 hours after glucose addition in comparison to cultures with no added glucose (Figure 6B). This loss of viability was prevented by CR (0.2% glucose) or by deletion of *git3*⁺ (Figure 6B). To further characterize the loss of viability induced by glucose in double hexokinase knockout strains, we stained yeast cells with Phloxin B, a dye accumulated by dead cells. We found a high proportion of stained cells (30%) at 18 hours after glucose addition in comparison to 5% in control cells (Figure 6C). Notably, Phloxin B stained cells were longer and displayed oversized vacuoles, a typical phenotype of aging in yeast (Figure 6C). ROS production was evaluated 36 hours after glucose addition by flow cytometry with DHE staining. A considerable number of DHE stained $\Delta h x k 1 \Delta h x k 2$ cells was observed in the culture with 2% glucose (Figure 6C). Again, Phloxin B staining and the increase in ROS were prevented by CR (glucose 0.2%) or deletion of *git3*⁺ (Figures 6B and C).

Our results show that glucose signalling via the Git3p GPCR is required for the pro-aging effects of glucose in *S. pombe* and is sufficient to mediate detrimental effects even in the absence of glucose consumption.

Discussion

Excessive glucose signalling has been associated with humans diseases such as diabetes, as well as with the less understood process of aging [54]. Several mechanisms have been proposed for the harmful effects of glucose. Glucose can be directly toxic to cell components because it can promote non-enzymatic glycosylation and the accumulation of advanced glycation end products (AGE) which impair cellular functions [55,56]. Excess glucose metabolism can also be deleterious because glucose oxidation increases the source of electrons to the mitochondrial respiratory chain in the form of NADH. In cells with a very active glucose metabolism, excess electrons can promote the generation of deleterious ROS if there is no matching increase in the efficiency of electron transport [54,57]. Glucose and/or nutrient-signalling pathways also control life span in various species including yeast [15]. The data raise the question about the relative contribution of signalling and metabolism to the regulation of life span [58].

Here we examined this question in *S. pombe* using mutants of the Git3/PKA glucose-signalling pathway. In this pathway, PKA kinase is activated by glucose signalling through the Git3p G protein-coupled receptor (GPCR), which results in the $G\alpha$ subunit

(Gpa2p)-mediated activation of adenylate cyclase [29] as represented in Figure 7. This, in turn, produces a linear increase in cAMP levels. The cAMP is bound by the Cgs1 regulatory subunit of Pka1 kinase, activating PKA. The consequence is a re-localization of PKA to the nucleus followed by the inhibition of the Rst2 transcription factor, an increase in stress sensitivity and a decrease in cell survival [21,33,59]. We previously demonstrated the importance of cAMP/PKA pathway in regulating *S. pombe* aging by showing that knocking out the only catalytic subunit of the PKA complex results in increased chronological life span as well as enhanced stress resistance [21]. However, other nutrient-signalling pathways may activate PKA complex in yeast, so the specific role of glucose signalling in the longevity of *S. pombe* was unknown.

We show here that low glucose levels increase CLS in *S. pombe*, a typical CR response. Also, mutants with a defective Git3/PKA pathway have an increased life span, a normal glucose consumption rate, and only a slightly reduced growth rate. The reverse is also true. High glucose concentration, acting through the Git3/PKA pathway, promotes aging and decreases stress defense and respiration. Likewise a constitutively active G α subunit, normally coupled to the Git3p GPCR, mimics the effects of high glucose even in low glucose.

Further support for a role of glucose signalling in the control of CLS in *S. pombe* was obtained by studying hexokinase deletion strains. These mutants die prematurely in stationary phase concomitant with prolonged stimulation of Git3/PKA signalling. Since cells without hexokinase cannot metabolize glucose, these results suggest that sustained glucose signalling, caused by the excess of extracellular glucose that remains in the medium of hexokinase mutants, promotes aging in *S. pombe*. The loss of Git3p GPCR blocks the detrimental effects of glucose in double hexokinase mutant. This suggests that glucose exerts a strong pro-aging effect via the Git3/PKA signalling pathway. Notably, the

premature death of double hexokinase mutant due to high glucose is concomitant with an accumulation of ROS.

It is remarkable that the effect of deleting hexokinases differs between *S. pombe* and *S. cerevisiae*. In the budding yeast, deletion of all major hexokinases (glucokinase, hexokinase 1 and 2) impairs cAMP production and activation of the PKA pathway [60]. Conflicting with these data, we show that in *S. pombe*, hexokinase mutants die prematurely due to sustained signalling through this pathway. Careful examination of our results also reveals that hexokinase mutants have a defective PKA pathway during the exponential phase of the cultures. However, these mutants in *S. pombe* enter stationary phase with high concentrations of glucose in the medium and a continual activity of the Git3/PKA pathway that is responsible for their premature aging. In contrast, hexokinase mutants in *S. cerevisiae* have longer RLS and a normal CLS [8,43]. This apparent discrepancy could be the result of particular differences in the glucose-signalling pathways and energy metabolism between *S. pombe* and *S. cerevisiae*. For instance, the regulation of glycolysis is different between these two yeasts. *S. cerevisiae* growth on glucose is sensitive to trehalose biosynthesis whereas *S. pombe* is not [61].

Despite the very significant role of Git3/PKA pathway in the pro-aging effect observed in the double hexokinase mutant, our work showed that the signal from the Git3p GPCR dependent pathway is not the only regulator of all the effects on aging due to glucose. First, in minimal medium completed (SDC), lowering glucose concentration had no effect on longevity (*data not shown*). Nevertheless, glucose decreased longevity when *S. pombe* were grown in synthetic medium based on yeast nitrogen base [26]. Other nutrient limitation is suspected to affect PKA-regulated processes. For instance, conjugation efficiency is controlled in both Git3/PKA cAMP-dependent manner and in a cAMP/PKA independent manner sensitive to medium composition [62]. This PKA-independent nutrient

sensing could mimic the effect of glucose restriction in rich medium and may explain why the life span of *S. pombe* grown in SDC is not affected by glucose. This explanation is consistent with the fact that the respiration rate in 2% glucose is higher in synthetic medium than in rich medium (complex medium) [26]. Another indication that the signal from the Git3/PKA pathway is not the only one to control the rate of aging is provided by the glucose receptor mutant ($\Delta git3$). This deletion strain still responds to CR with a higher oxidative stress resistance, lower ROS levels and an increased survival (Figure 4C, 2C and 4A). In agreement, studies in *Caenorhabditis elegans* [63], *Drosophila* [64] and mice show that disabling the insulin/IGF-1 signalling pathway can cooperate with CR to increase longevity [65-72]. What are the other possible mechanisms by which glucose could accelerate aging in *S. pombe*?

In budding yeast, glucose activates the glucose repression pathway, which is regulated by the AMP-activated protein kinase (AMPK) Snf1p complex [53,73]. So the Git3/PKA-independent effect of glucose could be explained by the activation of AMPK complex which affects aging in yeast and metazoans [74,75]. Our *S. pombe* hexokinase deletion mutants are expected to be defective in this pathway [53,76] but they still age prematurely when grown in high glucose concentrations, suggesting that glucose repression is not involved in the pro-aging effects of glucose. Conversely, we could not discard the possibility that some pro-aging effects of glucose are mediated by the non-enzymatic glycosylation of proteins by glucose. Nevertheless, altogether our data point toward a regulation of longevity primarily via the glucose signalling through Git3/PKA pathway, raising the question about the underlying mechanisms. Although further work is required to discover the mechanisms by which glucose signalling accelerates aging in *S. pombe*, our current evidence points to the mitochondria as the target of glucose signals. First, CR (low glucose) in wild type yeast enhances respiration and mitochondrial membrane potential, prevents ROS production and improves oxidative stress defense. Second, $\Delta git3$ cells have a similar phenotype and, in addition this strain displays a higher expression of cytosolic

superoxide dismutase in stationary phase. These could explain the additional longevity of $\Delta git3$ cultured under CR conditions (Figure 7).

In yeast, the cAMP/PKA glucose sensing pathway possibly represents the ancestor pathway of insulin/IGF-1 signalling in multicellular eukaryotes. This pathway signals the presence of glucose, the preferred energy source. It also controls stress resistance, growth rate and sexual development, modifies mitochondrial metabolism, and ultimately controls life span as we have shown in this study. Similar to our observations for the Git3/PKA pathway in fission yeast, a decrease in the insulin/IGF-1 signal increases longevity as a function of CR in mammals. The extent to which dietary restriction may actually be effective in humans is still unknown. Our results also show that CR and loss of the Git3p GPCR cooperate to increase life span. This suggests that if this pathway is conserved in higher organisms, its inhibition may lead to an anti-aging treatment not relying on strict diets with a limited caloric content as used in animal research. Interestingly, inhibition of cAMP synthesis by the knockout of the type 5 adenylyl cyclase (AC5) gene induced Raf/MEK/ERK-dependent stress resistance and lengthened life span in mice [77]. The effect of reducing glucose signalling in *S. pombe* also results in a decreased cAMP synthesis in response to glucose, because Git3p, via Gpa2 α p, activates adenylate cyclase [32]. Since CR and inhibition of glucose signalling cooperate to extend life span in *S. pombe*, it would be interesting to combine agents that reduce cAMP synthesis or reduce PKA activity with CR in mammals.

In conclusion, our work with *S. pombe* highlights the importance of glucose-signalling pathways and oxidative stress resistance in aging. Given the importance of glucose as a central metabolite, it is surprising that the pathway for glucose sensing existing in *S. pombe* has not been found yet in mammals. Whether a glucose receptor contributes to these signalling pathways in metazoans remains to be demonstrated. Our data together with

the interesting phenotype of the AC5 KO mice provide the rationale for further inquiry into glucose sensing pathways in mammals.

Materials and Methods

Ethics Statement

This study was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki.

Media and Yeast strains

MM refers to Edinburgh Minimal Medium [78] complemented by adenine, uracil, leucine and/or histidine 75 mg.L^{-1} (A,U,L,H). SMC refers to synthetic medium complemented and is composed of MM plus adenine, uracil, leucine and/or histidine 444 mg L^{-1} (A,U,L,H). Its composition is described in a previous study [21]. The same medium with glycerol 3% ethanol 0.2% for carbon source was named SMC glycerol. Mating and sporulation were carried out on MEA plates (bacto malt extract 3%, glucose 0.4%, pH 5.5, supplemented by adenine, histidine, uracil, leucine 225 mg.L^{-1} each). Yeast extract complete medium (YEC), was made of yeast extract 5 g.L^{-1} (BD, Difco) supplemented

with 222 mg.L⁻¹ of adenine, uracil, leucine and histidine, and glucose 2% unless otherwise specified. All cultures were incubated at 30°C in a rotating incubator shaker at 250 rpm (New Brunswick instrument).

Growth curves represent the average of three independent cultures. Morphological analysis of wild type cells in YEC glucose 0.05%, 0.2%, 0.5% or 2% was done in 10 mL cultures in 50 mL conic tubes with air-permeable cap grown overnight. Early log phase refers to OD₅₉₅ 0.5.

The strains used in this work are all described in supplementary Table 1. Wild type refers to strain SP14000, except for Figure 2B, 5C, S4 in which it refers to FWP87. The *gpa2*^{R176H} (RWP1) [32] Δ *git3* deletion (CHP984) [28], Δ *hxx1* and Δ *hxx2* deletions (CJM387, CJM389) [50] alleles were previously described.

The double Δ *hxx1* Δ *hxx2* mutant was constructed as follows. Δ *hxx2* (CJM389) was transformed with a plasmid bearing the *hxx2*⁺ ORF, previously amplified by PCR and inserted into the *Sall* site of pREP41 (pREP41_Hxx2). PCR primers sequences will be provided upon request. The Δ *hxx2* pREP41_Hxx2 strain (SP14405) was mated with Δ *hxx1* (CJM387). Corresponding diploids were sporulated in MES media and spores *hxx1::ura4*⁺ *hxx2::his3*⁺ harbouring the pREP41_Hxx2 plasmid were selected on MMA media. Haploids were grown to saturation in liquid SMC supplemented with adenine and leucine 222 mg.L⁻¹ and with glycerol 3%, ethanol 0.2% as carbon sources. Then, they were diluted in the same fresh medium and cultured a second time to saturation in order to force cells to lose pREP41_Hxx2 plasmid. At this point, clones without plasmids were selected on plates SMC AL glycerol. The loss of pREP41_Hxx2 plasmid was validated by verifying that these clones Δ *hxx1* Δ *hxx2* (SP14483 and SP14493) cannot grow without leucine, the marker on the pREP41 plasmid. In addition, these clones cannot grow on SMC AL glucose 2%. The triple mutant Δ *hxx1* Δ *hxx2* Δ *git3* was obtained by first constructing a Δ *hxx1* Δ *git3* double knockout (SP14373) after mating the single mutants Δ *hxx1* (SP14313) and Δ *git3* (SP14105). The resulting Δ *hxx1* Δ *git3* strain was crossed with Δ *hxx2* pREP41_Hxx2

(SP14405) and the haploid strain $\Delta h x k 1 \Delta h x k 2 \Delta g i t 3$ without plasmid was isolated as described previously for $\Delta h x k 1 \Delta h x k 2$.

Three independent cultures of each double hexokinase mutant $\Delta h x k 1 \Delta h x k 2$ and $\Delta h x k 1 \Delta h x k 2 \Delta g i t 3$, were started in 75 mL (250 mL flask) YEC glycerol and incubated 24 hours. At OD₅₉₅ 0.6, 0.1 mL were harvested, washed in sterile water and serial diluted to be plated as drop test on solid YEC glycerol 3% ethanol 0.2% glucose 2% or 0.2% or no glucose. Plates were incubated 8 days at 30°C. The same 75 mL cultures were grown until OD₅₉₅ 5 to 6 and split in 3 times 25 mL cultures, one left with glycerol only, one complemented with glucose 2%, one with glucose 0.2%. These 18 cultures were then studied as described below.

Reversion of the growth defect in glucose of $\Delta h x k 1 \Delta h x k 2$ mutants.

The frequency of cells able to recover the ability to grow on glucose in $\Delta h x k 1 \Delta h x k 2$ mutants was measured by plating serial dilution of 100 μ L of a saturated culture of SP14383 and SP14393 on SMC AL glycerol and on SMC AL glucose and by counting colonies forming units. The average of the ratios of six independent clones of SP14383 and SP14393 was 1.6×10^{-6} . Because of the very low frequency of this event and the long time revertants take to grow and reach a significant number, we consider that these revertants did not influence our data.

Chronological life span assays and survival

The protocol for CLS measurement by CFU counting has been described previously [21] except that the first estimation of the number of living cells was delayed. Cells that reached maximal density were harvested, serial diluted and plated 24 hours and 48 hours after the optical density was stable and maximal; the higher number of living cells from

these two samples was considered as the beginning of CLS curve (i.e., survival 100%). Error bars represent standard deviation calculated from four cultures separated from a single initial culture at the end of exponential phase. Each assay was repeated at least three times. All CLS analysis were performed in YEC AULH 222 mg L⁻¹ except in Figure 1E where the medium is SMC AUL 444 mg.L⁻¹ glycerol 3%. For antimycine A treatment, cultures were started at OD₅₉₅ 0.2 with 20 µg.mL⁻¹ antimycine A (solubilized in ethanol 100%) and CLS was measured as described above, except that cells entered stationary phase at a lower OD.

Number of living cells per mL was calculated by plating dilutions of sample of the cultures as described above accepted that solid YEC glycerol was used. The concentration presented (living cells / mL) with standard deviation represents the average of three independent cultures. Survival analysis by Phloxin B staining was done according to a previous publication [21], with the exception that the percentage of stained cell was obtained by counting under microscope after background subtraction. At least 500 cells were counted for each condition.

***In vivo* staining of ROS by DHR 123 and DHE**

Epifluorescence microscopy analyses were performed using an inverted Nikon Eclipse E800 microscope equipped with a Nikon_60 DIC H (1.4 NA) lens and a Photometrics CoolSNAP fx CCD camera. Images were acquired using a motion-picture camera CCD CoolSnapFX 12 (Photometrics, Tucson, AZ, USA) bit and analysed with UIC Metamorph software (Molecular Devices Corporation, Downington, PA, USA). The percent of ROS-positive cells was measured with dihydrorodhamine 123 (DHR 123, Sigma) following a previously described protocol [21]. The fluorescence of this dye is activated by peroxy nitrite and peroxide in the presence of peroxidase [79]. A total of 500 to 700 cells per culture were counted to determine the percentage of positively stained cells and standard deviations were calculated using three independent experiments. Staining by

dihydroethidium (DHE, Sigma) is more specific to superoxide production [80] and was achieved as followed. 1.4×10^7 cells were collected and resuspended in 0.1 mL 1x PBS with DHE 50 μ M and incubated 10 minutes at 30°C. The DHE solution was removed, cells were resuspended in 20 μ L 1x PBS and deposited on a microscope slide with a thin layer of agarose 1%. Counting was done the same way than for DHR123 using a Cy3 filter. Flow cytometry analysis was performed following the protocol detailed in [21] excepted for cells grown in glycerol. They were sonicated 15 seconds with a Sonicator Dismembrator Fisher Scientific Model 100 set to 12 watts. FACS analysis was done using FL1 filter for DiOC₆ dye and FL3 filter for DHE dye.

Oxygen and glucose consumption assays

Oxygen consumption was measured in cultures grown to cell concentrations between OD₅₉₅ 0.8 and 1.5. Cells were cultured in YEC to a given OD, and then the culture was diluted in its own medium if OD₅₉₅ was greater than 1.5, or concentrated in its own medium by centrifugation if OD₅₉₅ was less than 0.8. The goal was to measure the respiration of cultures with similar concentrations and in the exact medium in which the samples were taken. 10 mL of culture, sometimes diluted or concentrated, was incubated with gentle agitation at 30°C and 5 mL was loaded in the measurement chamber at 30°C with agitation. The oxygen consumption was followed with a Clark electrode YSI model 53 oxygen monitor until all oxygen was consumed in the chamber. The calibration of the Clark electrode for the maximum oxygen concentration (100%) was done on the air. The consumption was linear, the measure was recorded with a tracer Linear1100 and the slope was calculated for each sample. The result corresponding to the rate of respiration was normalized on the OD₅₉₅ of the cells in the chamber and expressed in %O₂.min⁻¹.OD⁻¹.

Glucose concentration was measured on the supernatants of cultures at different ODs following the protocol given in Quantichrom™ Glucose Assay Kit from BioAssay Systems®. The results presented are the averages of three independent cultures.

β-Galactosidase assays

β-galactosidase activity, expressed from the *fbp1-lacZ* reporter, was determined as previously described [36] except that cultures were grown in YEC to late exponential phase (OD₅₉₅ 9 in glucose 2 %, and OD₅₉₅ 2 in glucose 0.2%). CHP1229 was grown to only OD₅₉₅ 5.5 corresponding to the end of its exponential phase.

Oxidative stress survival and re-growth on glycerol plate

Cells were cultured in YEC glucose 2% or 0.2% to stationary phase, and harvested 24 hours thereafter. Cultures were diluted to OD₅₉₅ 0.5 to 0.8 in water and submitted to various oxidative shocks at 30°C. These include 1M H₂O₂ for 120 minutes; 0.75M Menadione for 180 min; 0.5M H₂O₂ for 30 min or 0.3M Menadione for 90 minutes. Then, cells were washed twice with 1 mL water and serially diluted tenfold four times. Each dilution was spotted on YEC plates and incubated five days at 30°C. For re-growth on glycerol plates, cells were grown in YEC glucose 2% to OD₅₉₅ 0.5 and washed twice in water. Cells were serially diluted as described above and spotted on SMC AULH glycerol 3%.

Mitochondrial membrane potential analysis by flow cytometry

Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) was measured with DiOC6 (Molecular Probes). Yeast strains were grown over-night in 10 mL YEC using 50 mL tubes with half screw cap to allow gas exchange. Early exponential phase refers to cells harvested at OD₅₉₅ from 0.7 to 1. Late exponential phase refers to cultures at OD₅₉₅ 2.1 to 2.4 in glucose 0.2% and OD₅₉₅ 4 to 5 for cultures in 2% glucose. Stationary phase refers to cultures let 24 hours in the incubators after saturation, corresponding to OD₅₉₅ 2.4 to 2.7 in 0.2% glucose and OD₅₉₅ 6 to 7 in 2% glucose. Then, 1.4×10^7 cells were collected, concentrated in 0.1 mL of their own medium and incubated in DiOC₆ 0.175 μ M 15 minutes at 30°C. Next, 50 μ L of this volume was diluted in 0.95 mL of 1x PBS and flow cytometry analysis was carried out as described above.

Real time quantitative PCR

Total RNA were reverse transcribed in a final volume of 100 μ L using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with random primers (Applied Biosystems, Foster City, CA) as described by the manufacturer. Reverse transcribed samples were stored at -20°C. A reference RNA (Human reference total RNA, Stratagene, Ca) was also transcribed in cDNA. Gene expression level was determined using primer and probe sets provided upon request. PCR reactions for 384 well plate formats were performed using 2 μ L of cDNA samples (50 ng), 5 μ L of the Express qPCR SuperMix (Invitrogen), 2 μ M of each primer and 1 μ M of the probe in a total volume of 10 μ L. The ABI PRISM[®] 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) was used to detect the amplification level and was programmed FAST with an initial step of 3 minutes at 95°C, followed by 45 cycles of 5 seconds at 95°C and 30 seconds at 60°C. All reactions were run in triplicate and the average values were used for quantification. The relative quantification of target genes was determined using the $\Delta\Delta$ CT method. Briefly, the Ct (threshold cycle) values of target genes were normalized independently to endogenous control genes (Δ CT = Ct_{target} - Ct

endogenous) and compared with a calibrator (WT 2% glucose sample C): $\Delta\Delta CT = \Delta Ct_{\text{Sample}} - \Delta Ct_{\text{Calibrator}}$. Relative expression (RQ) was calculated using the Sequence Detection System (SDS) 2.2.2 software (Applied Biosystems) and the formula is $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$. All gene expression (RQ) represents the average of three RQ from three independent experiments. Standard deviations were calculated with these three RQ. Two endogenous control genes were used: *Top1⁺* and SPBC887.02; both selected to be highly and constitutively expressed during stationary phase. Similar results were obtained with both of them. Results showed were calculated with *Top1⁺*.

RNA extraction

5 mL of stationary phase culture (day 1) was resuspended in 300 μL guanidinium isothiocyanate Solution (Guanidinium Isothiocyanate 4 M, Sodium Citrate 25 mM, pH 7.0, β -Mercaptoethanol 1 M) in 2 mL screw cap tubes. 0.3 mL of RNase-free beads was added and vortexed 4 times 30 seconds with Bead Beater. All the homogenate was transferred to a 2 mL Phase Lock Tube (PLG) (Qiagen). 26 μL Sodium Acetate 2 M (pH 4.0) was added to the sample, cap the PLG tube and mix briefly. 260 μL water-saturated phenol was added to the sample, cap the PLG tube, and mix thoroughly. 75 μL Chloroform: Isoamyl Alcohol (49:1) was added to the sample in the same PLG 2ml tube and mix thoroughly by repeated gentle inversion. Incubate on ice for 15 minutes, and centrifuge at 13,000 rpm for 5 minutes in a microcentrifuge. The aqueous phase was transferred to a new pre-spin PLG 2ml tube, 250 μL Phenol-Chloroform-Isoamyl Alcohol (50:49:1) was added and mixed thoroughly by repeated gentle inversion and centrifuge. In the same PLG tube, 250 μL Phenol-Chloroform-Isoamyl Alcohol (50:49:1) was added, then mixed and centrifuged. The resultant aqueous phase was collected; an equal volume of 100% Isopropanol was added, and mixed by repeated inversion. The solution was centrifuged at 13 000 rpm for 20 min at 4°C. The resultant supernatant was discarded and the pellet was washed 4 times with 200 μL 80% ethanol, using 2 minutes centrifugation to re-pellet the sample if necessary. The

final wash was discarded and the pellet dried at room temperature. Finally, the pellet was dissolved in 100 μ L RNase-free water and stored at -70°C . RNA integrity was checked on 1.5% agarose gel electrophoresis with RNA loading buffer (Qiagen).

Accession numbers

The code in parenthesis refers to pombe genome project nomenclature

git3⁺ (SPCC1753.02c); *gpa2*⁺/*git8*⁺ (SPAC23H3.13c); *hxl1*⁺ (SPAC24H6.04); *hxl2*⁺ (SPAC4F8.07c); *fbp1*⁺ (SPBC1198.14c); *sod1*⁺ (SPAC821.10c); *sod2*⁺ (SPAC1486.01); *gpx1*⁺ (SPBC32F12.03c); *top1*⁺ (SPBC1703.14c); *unnamed a chloride channel* (SPBC1703.14c)

Acknowledgments

We thank Dr Carlos Gancedo for providing strains. We also wish to thank the members of the Rokeach lab, H el ene Barb es, Perrine Roux, Frank Gallardo for helpful discussions; Serge S en echal, Rapha elle Lambert, Maury Lopez for technical supports.

Figures

Figure 1. Pro-aging effects of glucose in *S. pombe*.

(A) Chronological life span of a wild type strain measured at different glucose concentrations in YEC by colony forming unit (CFU) counting. Percent on the graphs refers to the concentration of glucose. Survival (Y axis) is expressed as the ratio of the number of colonies at a given time-point on the number of colonies at the beginning of stationary phase (100%).

(B) Morphology of wild type cells at glucose 2% and 0.2% observed under microscope by Nomarski at early exponential phase and stationary phase (day 8).

(C) ROS measurements by DHR 123 staining in WT cells grown in 2 % and 0.2 % glucose. Yeast cells were stained at days 1 and 8 of the stationary phase, and analysed under microscope.

(D) Quantitation of ROS-positive cells in WT cells grown in 2 % and 0.2 % glucose. Yeast cells were stained at days 1, 4 and 8 of the stationary phase and counted under microscope. Data shown are mean \pm standard deviation of the mean of three independent samples assayed. *, $p < 0.02$; **, $p < 0.01$, Student test, 2% glucose versus 0.2% glucose at a given day.

(E) Chronological life span of wild type grown in SDC medium supplemented with glucose 2% or glycerol 3%.

Figure 1

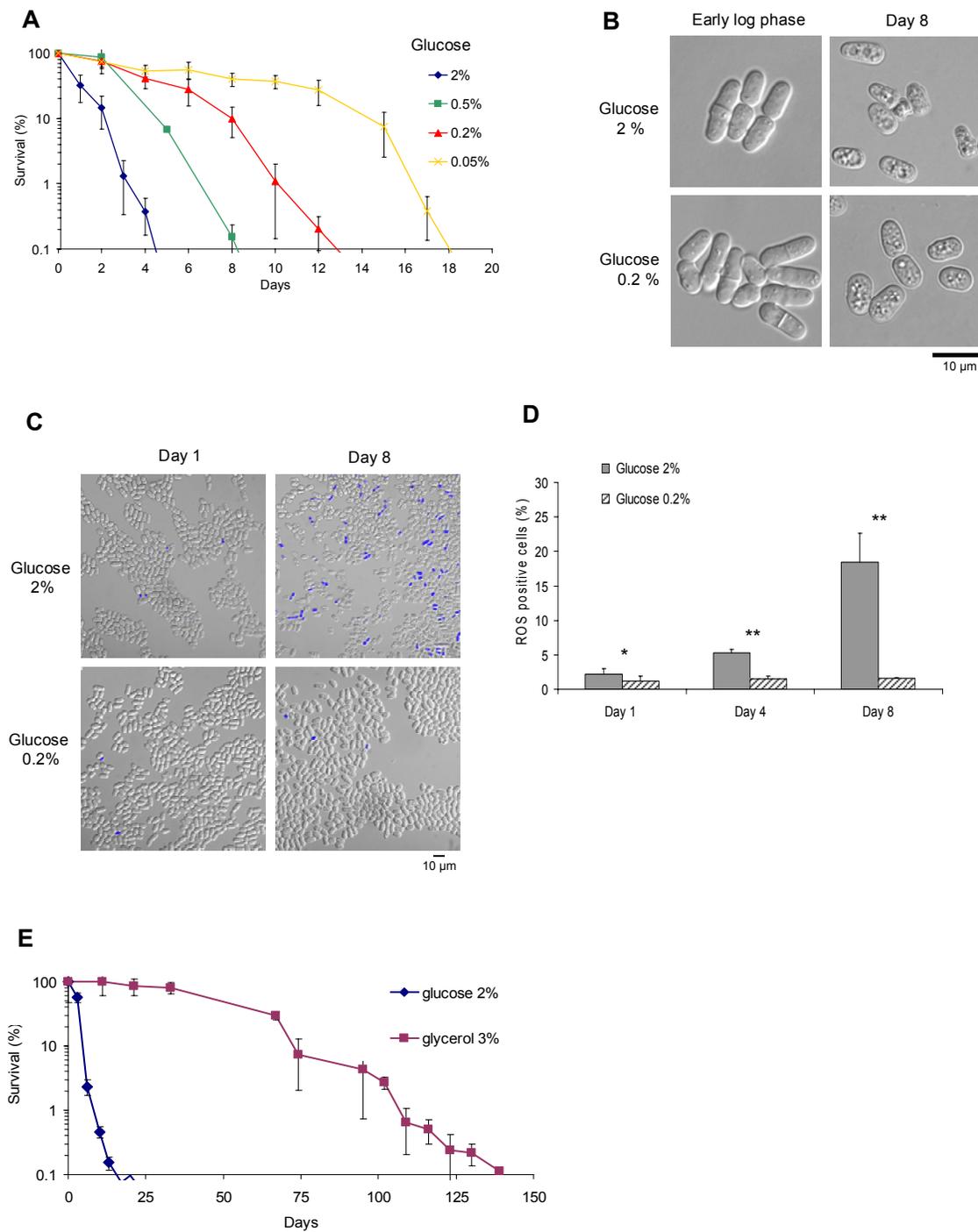


Figure 2. Reduction of CLS due to glucose requires signalling via the glucose receptor and G protein.

(A) CLS of constitutively activated G protein mutant *gpa2*^{R176H} and deletion of glucose receptor Git3p (Δ *git3*) in 2% glucose compared to wild type in 2% and 0.2% glucose. On the graphs, 2% and 0.2% refers to the concentration of glucose at the start of the culture.

(B) β -Galactosidase activity of strain with *fbp1-lacZ* reporter whose expression is repressed by signalling via the Git3/PKA pathway. Cells were collected at late exponential phase and β -Gal activity was measured.

(C) Accumulation of ROS-positive cells at day 4 of stationary phase in Δ *git3* and *gpa2*^{R176H} grown in 2% and 0.2% glucose. Data shown are mean \pm standard deviation of the mean of three independent samples assayed. •, $p < 0.1$; *, $p < 0.02$; **, $p < 0.01$, student test, WT versus mutant at the same glucose concentration.

Figure 2

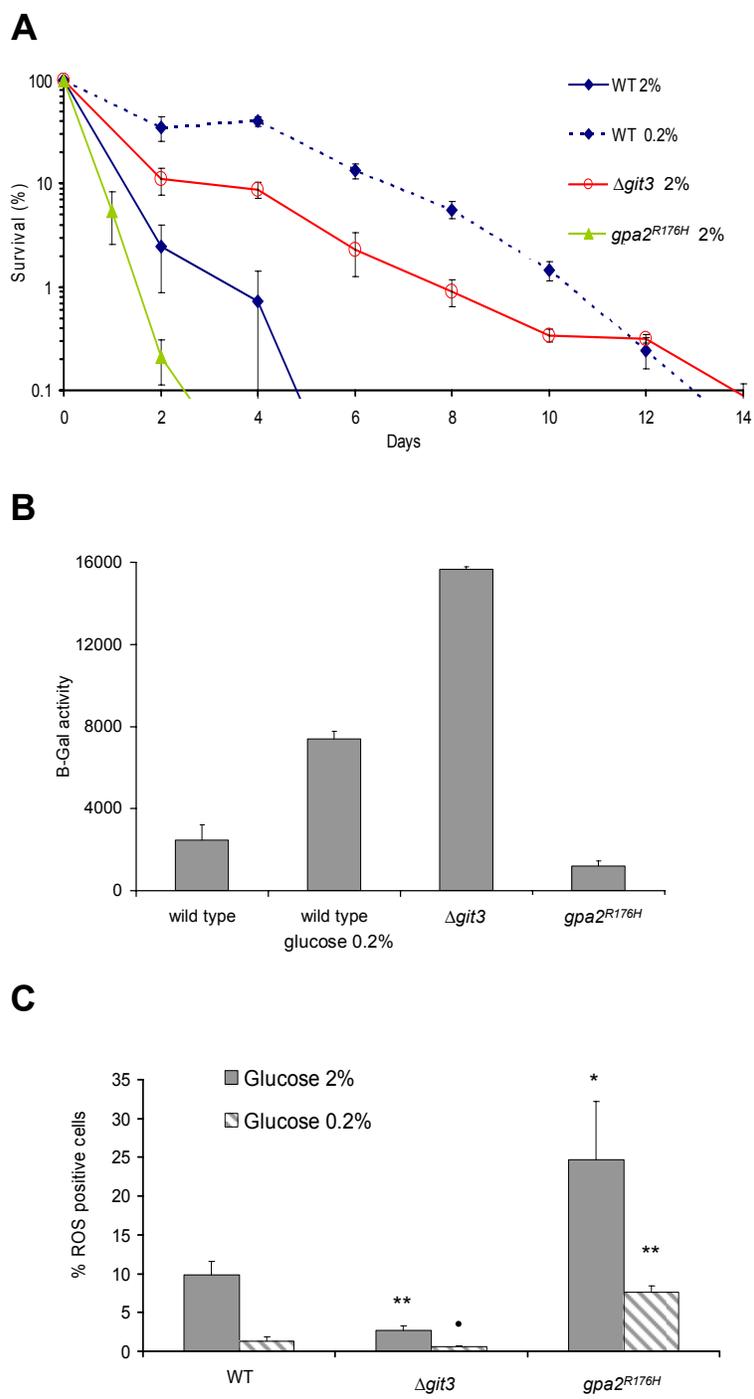


Figure 3. Respiration rate is increased in both CR and in strains with defects in glucose signalling.

(A) Oxygen consumption measured using a Clark electrode for WT in low and high glucose, and for glucose receptor deleted strain $\Delta git3$. O_{wt} , O_{git3} represents the average of the oxygen consumption in exponential phase (calculated with $OD_{595} < 7$ at 2% glucose and $OD_{595} < 2.1$ at 0.2% glucose).

(B) Growth of WT, $\Delta git3$ and $gpa2^{R176H}$ switched from fermentative glucose medium to respiratory glycerol medium.

(C) Oxygen consumption of $\Delta git3$ at 0.2% glucose as compared to wild type.

(D) Oxygen consumption for constitutively active $G\alpha$ subunit ($gpa2^{R176H}$) in low and high glucose as compared to WT. O_{wt} , O_{Gpa2^*} represents the average of the oxygen consumption in exponential phase (calculated with $OD_{595} < 7$ at 2% glucose and $OD_{595} < 2.1$ at 0.2% glucose).

Figure 3

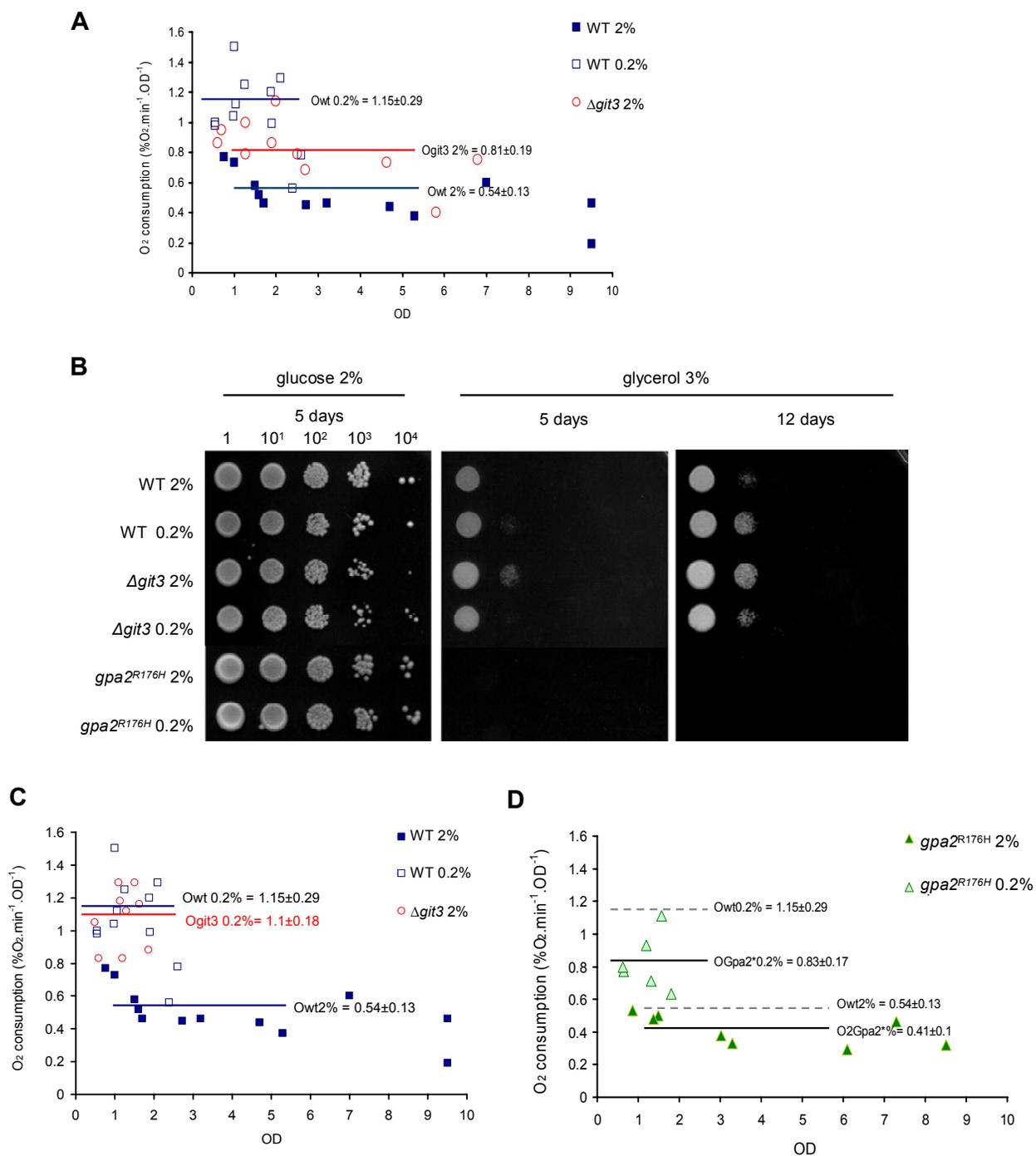


Figure 4. Correlation between longevity and stress resistance of WT *S. pombe* in CR or in mutants of the glucose-signalling pathway.

Longer chronological life span correlates with higher mitochondrial respiration and increased oxygen stress resistance, except with Gpa^{R176H} strain where loss of survival correlates only with weaker oxidative stress resistance.

(A) CLS of $\Delta git3$ grown in 2% and 0.2% glucose as compared to wild type.

(B) Chronological life span of $gpa2^{R176H}$ grown in 2% and 0.2% glucose.

(C) Oxidative stress resistance measured in WT, $\Delta git3$ and $gpa2^{R176H}$ after short treatment of H_2O_2 and menadione. Cells were collected at day 1 of stationary phase and submitted to oxidative stressors before plating.

(D) Oxidative stress resistance measured in WT and $gpa2^{R176H}$ at weak dose of H_2O_2 and menadione.

(E) Transcript levels of cytosolic and mitochondrial superoxide dismutase (SOD1 and 2) normalized to wild type cells as measured by quantitative RT-PCR. Total RNAs were isolated in cells collected at day one of stationary phase. The transcript levels were normalized on two constitutively expressed genes. Standard deviations were calculated on three independent experiments; student test was done comparing with wild type at glucose 2%. *, $p < 0.01$

Figure 4

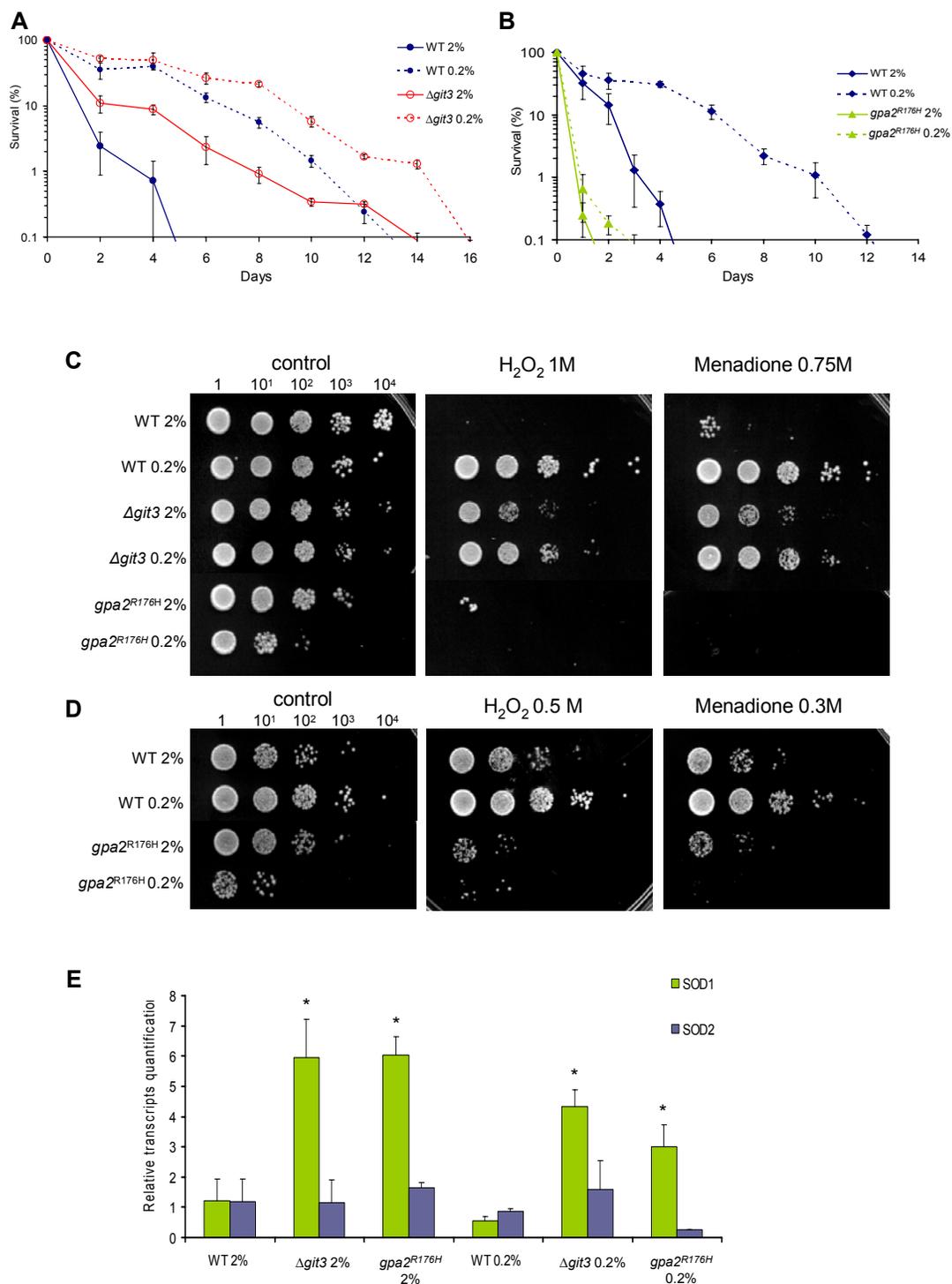


Figure 5. Hexokinase 2 mutant has a decreased survival and an increased glucose signalling in stationary phase.

Impairing glucose metabolism strongly decreases CLS and increases Git3/PKA signalling in late exponential phase cells. This pro-aging effect is lost when less glucose is provided.

(A) CLS of WT and $\Delta h x k 2$ in low and high glucose concentration.

(B) Glucose consumption according to growth in WT and $\Delta h x k 2$ cultured in 2% and 0.2% glucose.

(C) β -Galactosidase activity of $\Delta h x k 2$ with *fbp1-lacZ* reporter. Cells were collected at late exponential phase and β -galactosidase activity was measured.

Figure 5

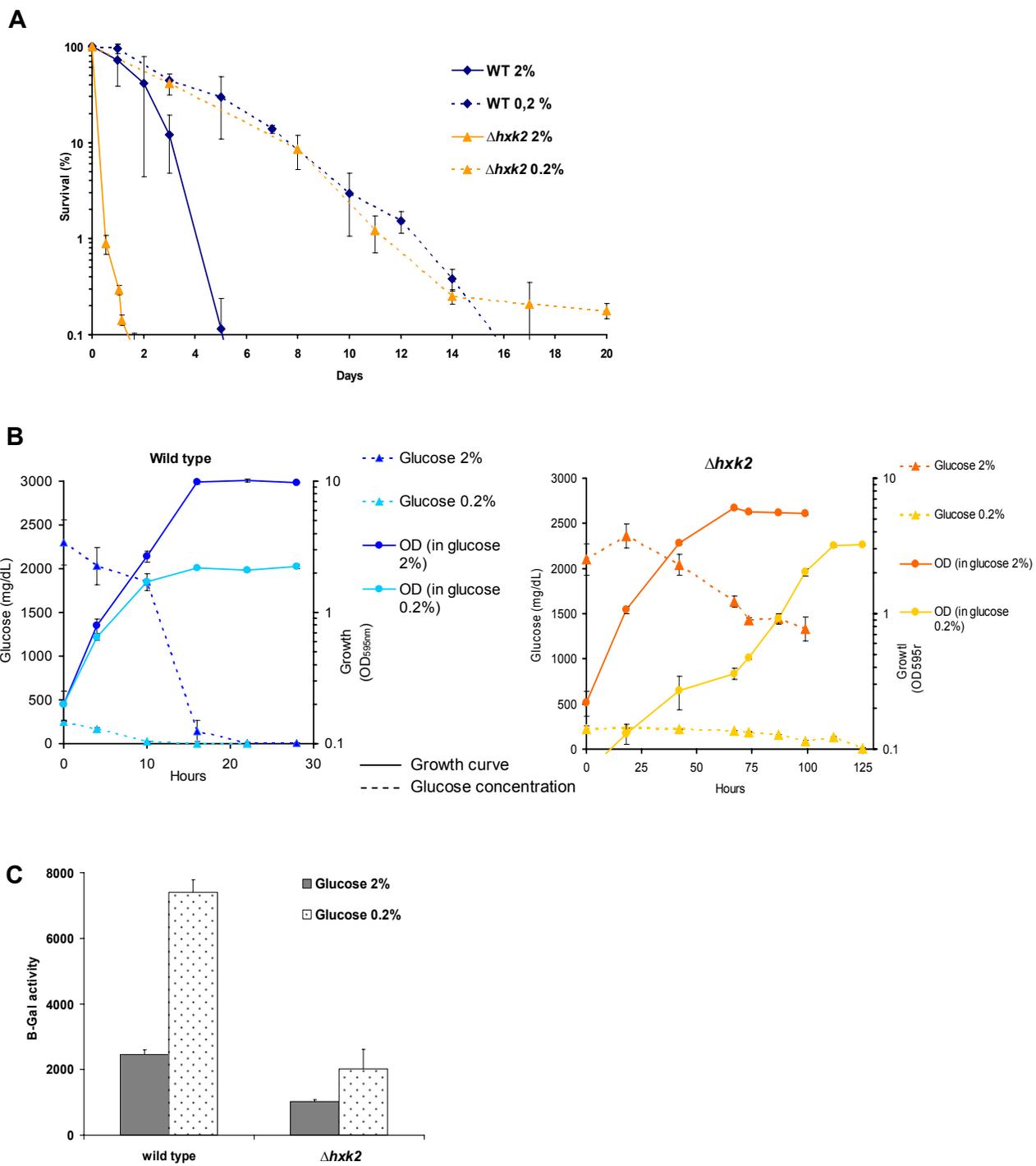


Figure 6. Git3p-dependent glucose signalling promotes aging in the absence of glucose metabolism.

(A) Survival of $\Delta hxk1 \Delta hxk2$ and $\Delta hxk1 \Delta hxk2 \Delta git3$ cells shifted from liquid culture with glycerol to solid media with glycerol, without or with glucose 0.2% or 2%. The growth of double hexokinase mutant on respiratory media plus glucose 2% is possible only with deleted Git3p-mediated signalling. 1 to 10^4 represents the factors of dilution.

(B) Quantification of living cells of $\Delta hxk1 \Delta hxk2$ and $\Delta hxk1 \Delta hxk2 \Delta git3$ grown in respiratory media supplemented with glucose. The number of living cells per mL is calculated as the number of colony forming units on solid glycerol medium per mL of culture. Averages and standard deviations were calculated on three independent cultures. Left panel, $\Delta hxk1 \Delta hxk2$; right panel, $\Delta hxk1 \Delta hxk2 \Delta git3$.

(C) Microscopy analysis of double hexokinase mutants with vital dye Phloxin B applied 18 hours after glucose addition. The percentage under each picture represents the ratio of fluorescent cells counted under microscope on 500 cellules.

(D) ROS production estimated by flow cytometry using DHE staining. This assay was carried out 36 hours after glucose addition. Left panel, increase of DHE staining was observed only in $\Delta hxk1 \Delta hxk2$ with glucose 2%, corresponding to premature aged cells. Right panel, summary of flow cytometry results of DHE-fluorescing cells (M2 population). In $\Delta hxk1 \Delta hxk2$, 90% of the cells displayed about a 3 times greater fluorescence intensity between no glucose and glucose 2%. Three independent cultures were analysed for averages and standard deviations.

Figure 6

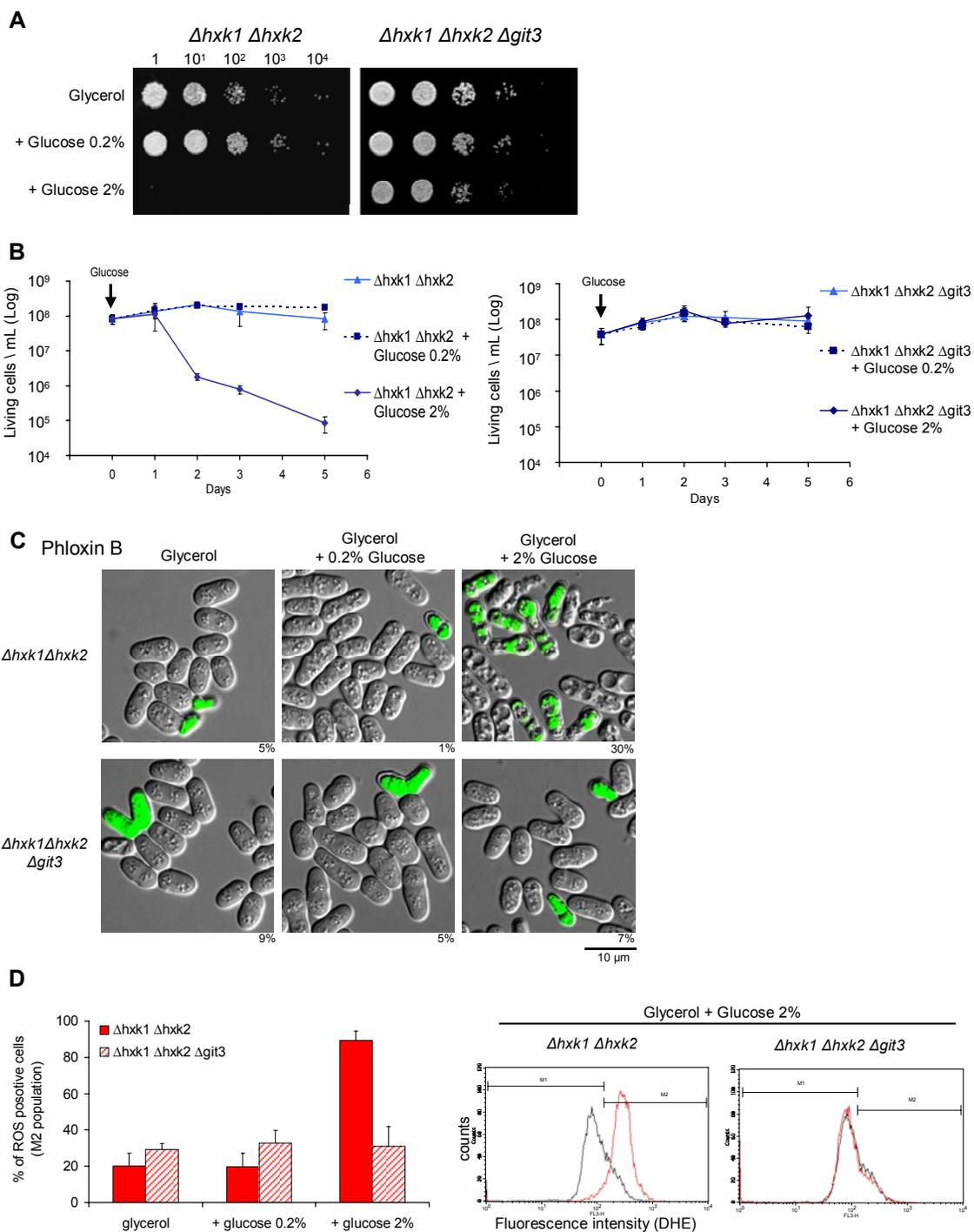
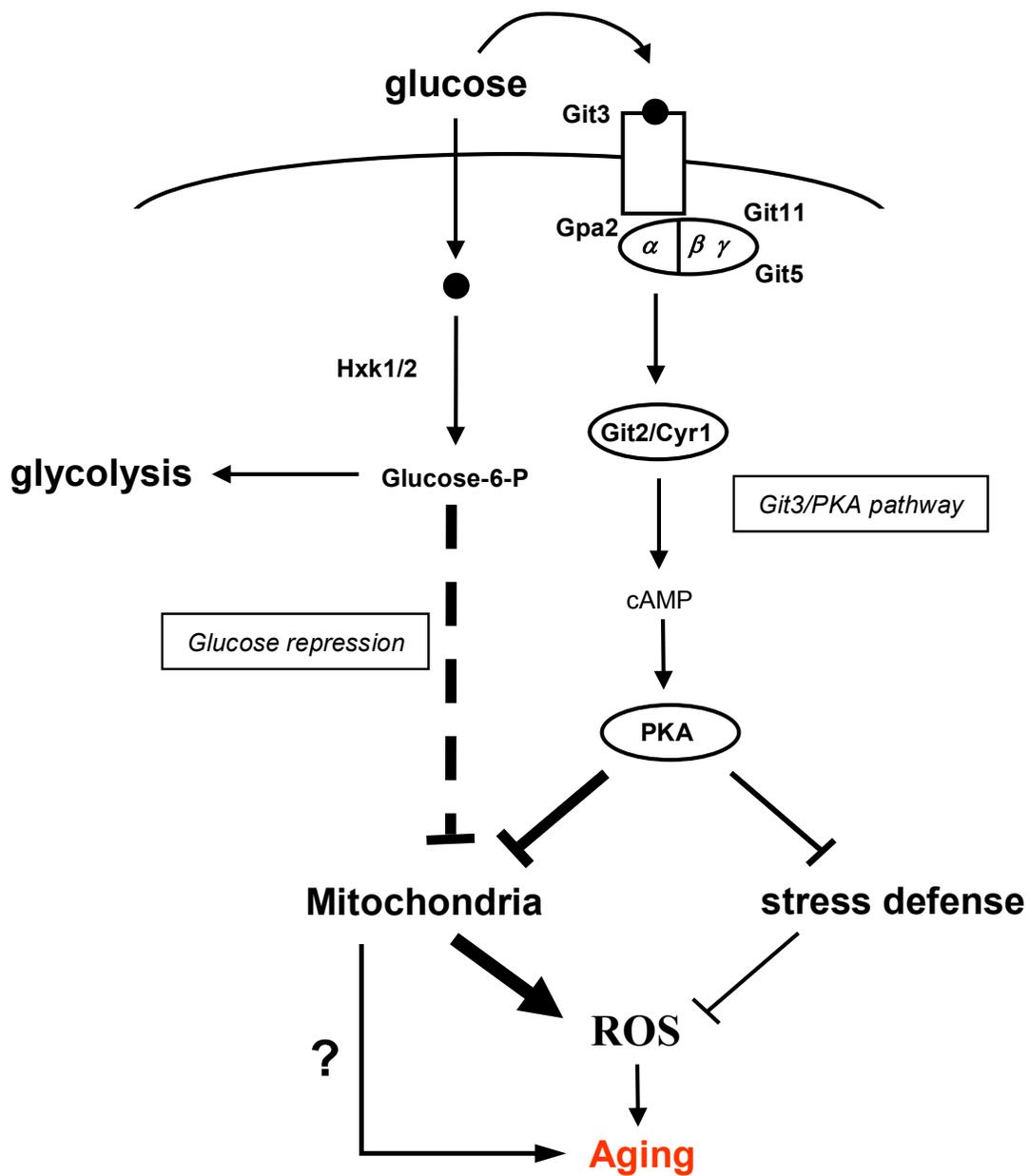


Figure 7. A glucose-signalling pathway involved in fission yeast longevity.

Glucose availability is sensed through two major pathways in fission yeast, the Git3/PKA pathway and the glucose repression pathway. Each of these pathways regulates mitochondrial functions. In the present study, we underlined the importance of Git3/PKA dependent signalling in longevity versus the glucose repression pathway and the metabolic effect of glycolysis. Git3/PKA signal inhibits mitochondrial respiration, oxidative stress response and promotes ROS formation and pro-aging phenotypes. Discontinuous line represents functions inferred by homology with *S. cerevisiae*. Question mark represents the possible role of mitochondria in aging besides ROS production.

Figure 7



Supporting informations

Figure S1. Growth curves of wild type in different concentration of glucose.

The cells were grown in YES AULH and ODs were calculated on the average of three independent cultures.

Figure S1

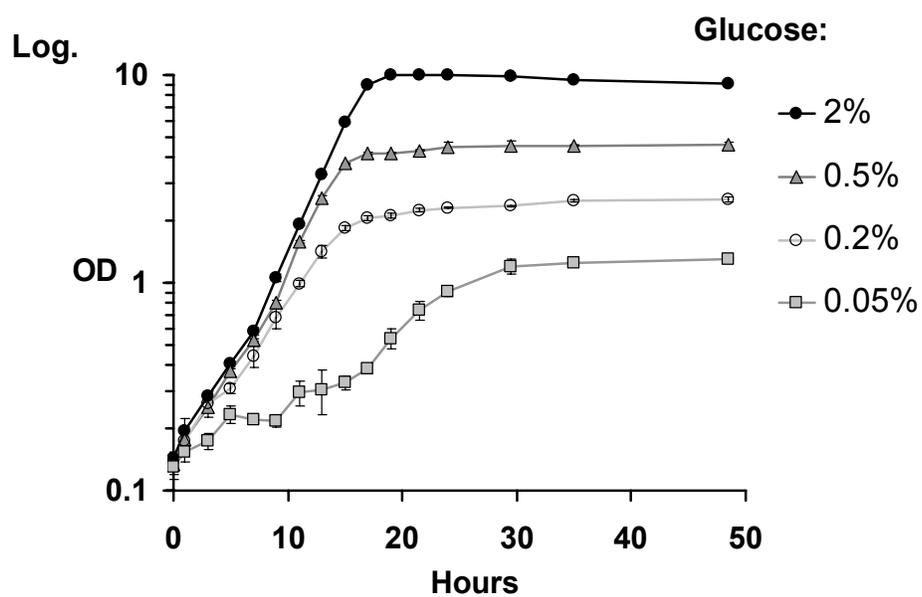
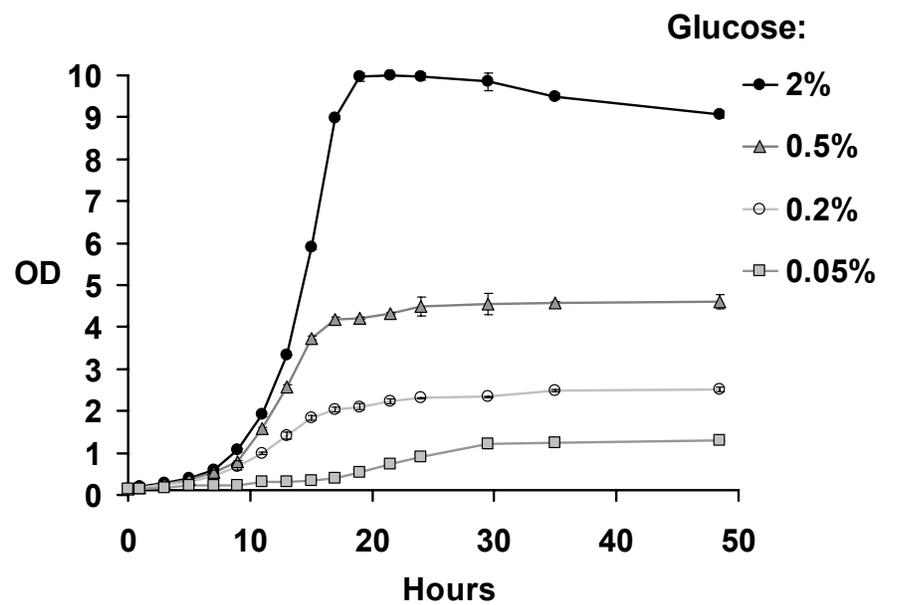


Figure S2. Dihydrorhodamine 123 (DHR 123) and dihydroethidium (DHE) *in vivo* staining of reactive oxygen species.

This control experiment was carried out in order to verify that DHR 123 and DHE were consistently specific of yeast cells that produce high quantity of ROS, alive or recently dead. Cells killed by amphotericin B treatment are not stained showing that dead cells are not systematically positive.

(A) Comparison between the quantification of ROS-positive cells by DHR 123 or DHE. Cultures were stained at day 2 and 5 of the stationary phase and positive cells were counted under microscope (see Materials and Methods). Data shown are mean \pm standard deviation of three independent samples assayed. *, $p < 0.01$, Student test, 2% glucose versus 0.2% glucose.

(B) DHR 123 and DHE did not stain WT cells killed with amphotericin B. Cells were grown to stationary phase, treated or not with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of amphotericin B during 16 hours (h), incubated in water during 24h and analysed by fluorescence microscopy. Percents indicate the amount of ROS-positive cells as compared to the total number of cells.

(C) Survival of WT cells after treatment with amphotericin B. Cells were grown to stationary phase, treated with 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of amphotericin B during 16 h, incubated in water during 24 h, serially-diluted (10^1 to 10^4) and spotted on YEC glucose 2% plates. Growth was monitored during 5 days at 30°C.

(D) Morphological comparison of ROS-positive and ROS-negative WT cells stained by DHR 123 or DHE. White arrows indicate marked cells that appear dead, black arrows indicate marked cells that appear alive and stars indicate unmarked cells that appear dead.

Figure S2

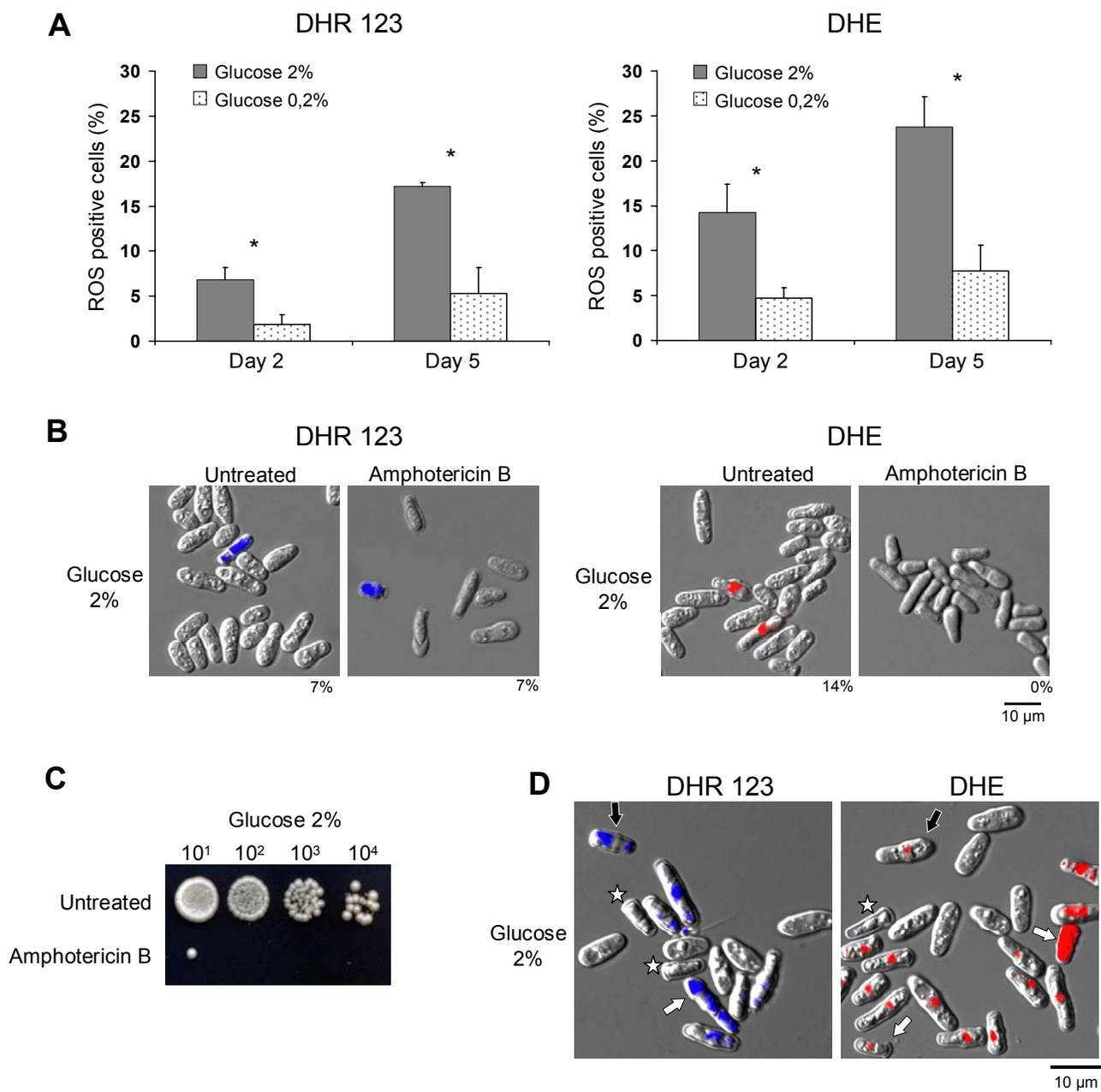


Figure S3. Glucose consumption according to growth of *gpa2*^{R176H} and Δ *git3* yeasts grown in 2% and 0.2% glucose.

Figure S3

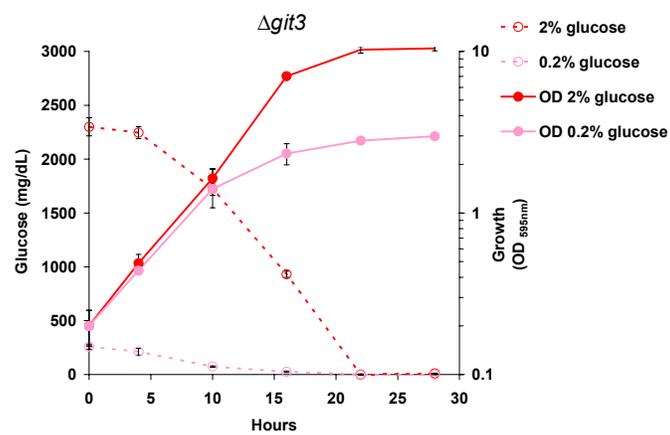
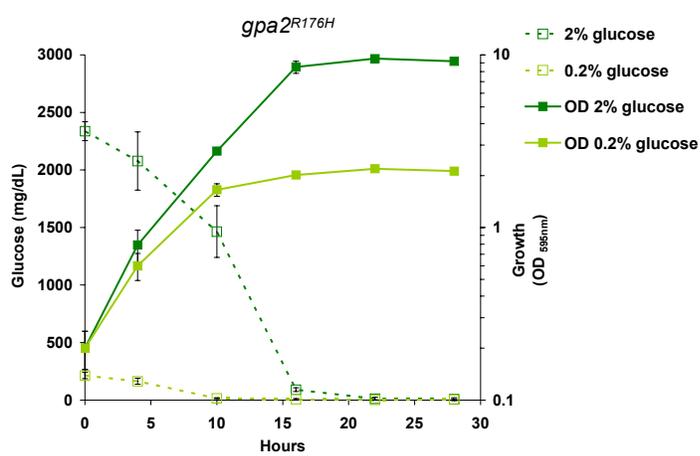


Figure S4. Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) analysis by Flow cytometry on cells stained with DiOC₆.

Exp: exponential; Stat: stationary. Black arrows show dead cells. See Materials and Methods for details. DiOC₆ is known to stain mitochondria in fission yeast [81]. The intensity of DiOC₆ fluorescence is increasing with mitochondrial membrane potential, as shown in *S. cerevisiae* [82].

Figure S4

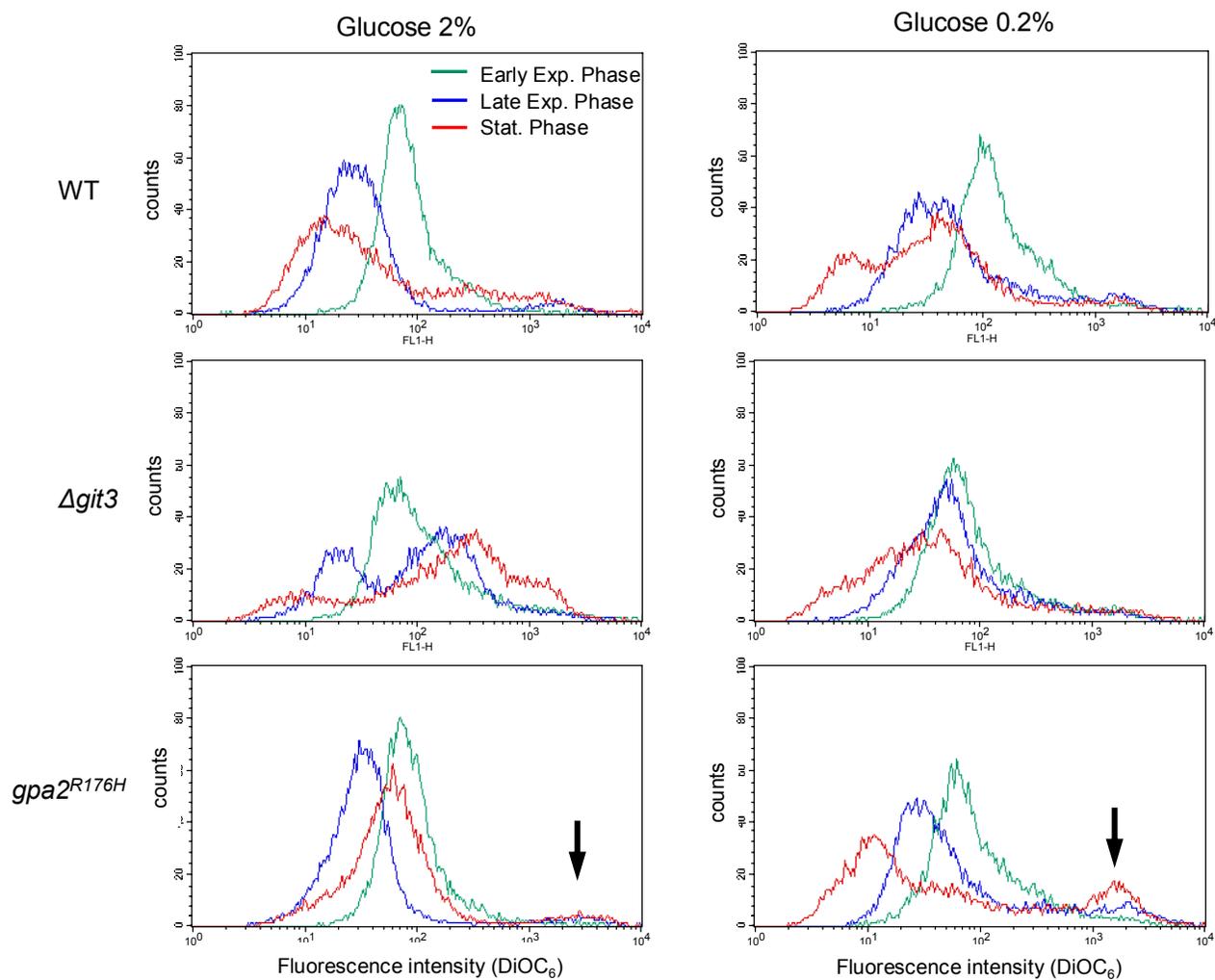


Figure S5. Chronological life span of WT and Δ git3 grown in 2% and 0.2% glucose with 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ antimycine A (AA). Vector corresponds to ethanol to a final concentration to 0.1%.

Figure S5

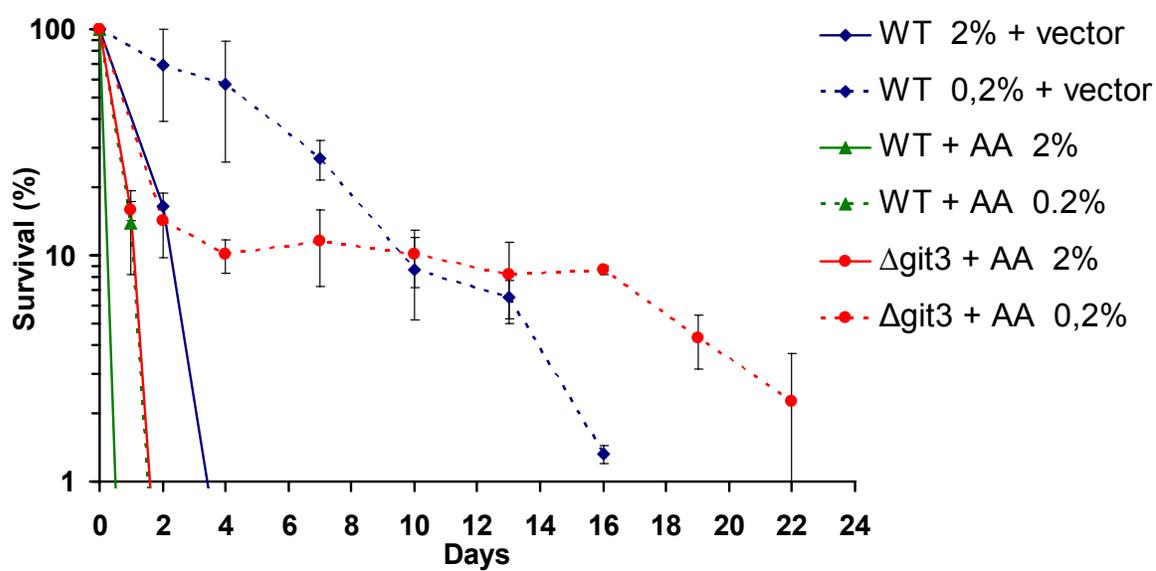
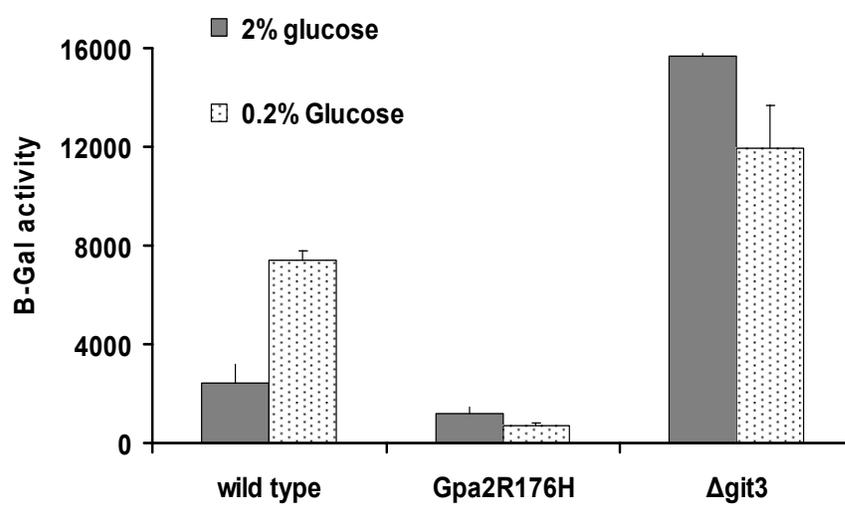


Figure S6. β -Galactosidase activity of Δ git3 and gpa2R176H with fbp1-lacZ reporter both grown in 2% and 0.2% glucose. Cells were collected at late exponential phase and β -Galactosidase activity was measured.

Figure S6



Supplementary Table 1. Strains used in this study presented with their genotypes and the laboratory where they were created. * refers to strains created for this study.

Strain	Genotype	Origin
SP14000 (WT)	<i>h⁻ ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 leu1-32</i>	Lab. stock
FWP87	<i>h⁺ leu1-32 ura4::fbp1-lacZ fbp1::ura4⁺</i>	C. Hoffman
CHP984	<i>h⁺ git3::Kan^R</i>	C. Hoffman
RWP26	<i>h⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4::fbp1-lacZ git3::Kan^R</i>	C. Hoffman
RWP1	<i>h⁻ ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 ura4::fbp1-lacZ gpa2-R176H</i>	C. Hoffman
RWP36	<i>h⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4::fbp1-lacZ gpa2-R176H</i>	C. Hoffman
CJM387	<i>h⁻ ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 his3-S18 hxk1::ura4⁺</i>	C. Gancedo
CJM389	<i>h⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 his3-D2 hxk2::his3⁺</i>	C. Gancedo
CHP1229	<i>h⁺ ade6⁻ leu1-32 ura4::fbp1-lacZ his3⁻ hxk2::his3⁺</i>	C Hoffman*
SP14383	<i>h⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 his3⁻ hxk1::ura4⁺ hxk2::his3⁺</i>	Lab stock*
SP14405	<i>h⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 his3⁻ hxk1::ura4⁺ hxk2::his3⁺ pREP41_hxk2⁺</i>	Lab stock*
SP14393	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 his3⁻ hxk1::ura4⁺ hxk2::his3⁺ git3::Kan^R</i>	Lab stock*
SP14412	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 his3⁻ hxk1::ura4⁺ hxk2::his3⁺ git3::Kan^R pREP41_hxk2⁺</i>	Lab stock*
SP14373	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 his3-S18 hxk1::ura4⁺ git3::Kan^R</i>	Lab stock*

References

1. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, et al. (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404: 787-790.
2. Eva Kassi AGP (2008) Could glucose be a proaging factor? *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12: 1194-1198.
3. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA (1935) The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *J Nutr* 10: 63-79.
4. Guarente L (2008) Mitochondria—A Nexus for Aging, Calorie Restriction, and Sirtuins? *Cell* 132: 171-176.
5. Jiang JC, Jaruga E, Repnevskaya MV, Jazwinski SM (2000) An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. *FASEB J*: 00-0242fje.
6. Kaeberlein M, Powers RW, III, Steffen KK, Westman EA, Hu D, et al. (2005) Regulation of Yeast Replicative Life Span by TOR and Sch9 in Response to Nutrients. *Science* 310: 1193-1196.
7. Kennedy B, Steffen K, Kaeberlein M (2007) Ruminations on dietary restriction and aging. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 64: 1323-1328.

8. Lin S-J, Defossez P-A, Guarente L (2000) Requirement of NAD and SIR2 for Life-Span Extension by Calorie Restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289: 2126-2128.
9. Medvedik O, Lamming DW, Kim KD, Sinclair DA (2007) MSN2 and MSN4 Link Calorie Restriction and TOR to Sirtuin-Mediated Lifespan Extension in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biology* 5: e261.
10. Reverter-Branchat G, Cabiscol E, Tamarit J, Ros J (2004) Oxidative Damage to Specific Proteins in Replicative and Chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*: Common Targets And Prevention By Calorie Restriction. *J Biol Chem* 279: 31983-31989.
11. Kaeberlein M, Kirkland KT, Fields S, Kennedy BK (2005) Genes determining yeast replicative life span in a long-lived genetic background. *Mech Ageing Dev* 126: 491-504.
12. Fabrizio P, Pozza F, Pletcher SD, Gendron CM, Longo VD (2001) Regulation of Longevity and Stress Resistance by Sch9 in Yeast. *Science* 292: 288-290.
13. Longo VD (2003) The Ras and Sch9 pathways regulate stress resistance and longevity. *Experimental Gerontology* 38: 807-811.
14. Fabrizio P, Gattazzo C, Battistella L, Wei M, Cheng C, et al. (2005) Sir2 blocks extreme life-span extension. *Cell* 123: 655-667.
15. Wei M, Fabrizio P, Hu J, Ge H, Cheng C, et al. (2008) Life Span Extension by Calorie Restriction Depends on Rim15 and Transcription Factors Downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS Genetics* 4: e13.
16. Dilova I, Easlson E, Lin S (2007) Calorie restriction and the nutrient sensing signaling pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 64: 752-767.
17. Lin S-J, Kaeberlein M, Andalis AA, Sturtz LA, Defossez P-A, et al. (2002) Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 418: 344-348.

18. Bonawitz ND, Chatenay-Lapointe M, Pan Y, Shadel GS (2007) Reduced TOR Signaling Extends Chronological Life Span via Increased Respiration and Upregulation of Mitochondrial Gene Expression. *Cell Metabolism* 5: 265-277.
19. Barros MH, Bandy B, Tahara EB, Kowaltowski AJ (2004) Higher Respiratory Activity Decreases Mitochondrial Reactive Oxygen Release and Increases Life Span in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279: 49883-49888.
20. Piper PW, Harris NL, MacLean M (2006) Preadaptation to efficient respiratory maintenance is essential both for maximal longevity and the retention of replicative potential in chronologically ageing yeast. *Mechanisms of Ageing and Development* 127: 733-740.
21. Roux AE, Quissac A, Chartrand P, Ferbeyre G, Rokeach LA (2006) Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2. *Aging Cell* 5: 345-357.
22. Van Urk H, Voll WSL, Scheffers WA, Van Dijken JP (1990) Transient-State Analysis of Metabolic Fluxes in Crabtree-Positive and Crabtree-Negative Yeasts. *Appl Environ Microbiol* 56: 281-287.
23. Chu Z, Li J, Eshaghi M, Karuturi RK, Lin K, et al. (2007) Adaptive expression responses in the Pol-gamma null strain of *S. pombe* depleted of mitochondrial genome. *BMC Genomics* 8: 323.
24. Schäfer B, Wolf K (2003) Mitochondrial Genetics in a petite-negative yeast. In: Richard E, editor. *The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe*. Springer. pp. 415-419.
25. de Jong-Gubbels P, Pvan Dijken J, Pronk JT (1996) Metabolic fluxes in chemostat cultures of *Schizosaccharomyces pombe* grown on mixtures of glucose and ethanol. *Microbiology* 142 (Pt 6): 1399-1407.
26. Zuin A, Gabrielli N, Calvo IA, Garcia-Santamarina S, Hoe KL, et al. (2008) Mitochondrial dysfunction increases oxidative stress and decreases chronological life span in fission yeast. *PLoS ONE* 3: e2842.

27. Chiron S, Gaisne M, Guillou E, Belenguer P, Clark-Walker GD, et al. (2007) Studying Mitochondria in an Attractive Model: *Schizosaccharomyces pombe*. *Mitochondria*. pp. 91-105.
28. Welton RM, Hoffman CS (2000) Glucose Monitoring in Fission Yeast via the *gpa2* G, the *git5* G and the *git3* Putative Glucose Receptor. *Genetics* 156: 513-521.
29. Hoffman CS (2005) Glucose sensing via the protein kinase A pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Soc Trans* 33: 257-260.
30. Hlavata L, Nachin L, Jezek P, Nystrom T (2008) Elevated Ras/protein kinase A activity in *Saccharomyces cerevisiae* reduces proliferation rate and lifespan by two different reactive oxygen species-dependent routes. *Aging Cell* 7: 148-157.
31. Zuin A, Gabrielli N, Calvo IA, Garc a-Santamarina S, Hoe K-L, et al. (2008) Mitochondrial Dysfunction Increases Oxidative Stress and Decreases Chronological Life Span in Fission Yeast. *PLoS ONE* 3: e2842.
32. Isshiki T, Mochizuki N, Maeda T, Yamamoto M (1992) Characterization of a fission yeast gene, *gpa2*, that encodes a G alpha subunit involved in the monitoring of nutrition. *Genes Dev* 6: 2455-2462.
33. Higuchi T, Watanabe Y, Yamamoto M (2002) Protein Kinase A Regulates Sexual Development and Gluconeogenesis through Phosphorylation of the Zn Finger Transcriptional Activator Rst2p in Fission Yeast. *Mol Cell Biol* 22: 1-11.
34. Hoffman CS, Winston F (1991) Glucose repression of transcription of the *Schizosaccharomyces pombe* *fbp1* gene occurs by a cAMP signaling pathway. *Genes Dev* 5: 561-571.
35. Hoffman CS, Winston F (1990) Isolation and Characterization of Mutants Constitutive for Expression of the *fbp1* Gene of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 124: 807-816.
36. Nocero M, Isshiki T, Yamamoto M, Hoffman CS (1994) Glucose Repression of *fbp1* Transcription in *Schizosaccharomyces pombe* Is Partially Regulated by Adenylate Cyclase Activation by a G Protein Subunit Encoded by *gpa2* (*git8*). *Genetics* 138: 39-45.

37. Fabrizio P, Longo VD (2003) The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* 2: 73-81.
38. Kim J-H, Johnston M (2006) Two Glucose-sensing Pathways Converge on Rgt1 to Regulate Expression of Glucose Transporter Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281: 26144-26149.
39. Ozcan S, Johnston M (1999) Function and Regulation of Yeast Hexose Transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 554-569.
40. Cooper TM, Mockett RJ, Sohal BH, Sohal RS, Orr WC (2004) Effect of caloric restriction on life span of the housefly, *Musca domestica*. *FASEB J*: 03-1464fje.
41. Mattison JA, Lane MA, Roth GS, Ingram DK (2003) Calorie restriction in rhesus monkeys. *Experimental Gerontology* 38: 35-46.
42. Koubova J, Guarente L (2003) How does calorie restriction work? *Genes Dev* 17: 313-321.
43. Smith JDL, McClure JM, Matecic M, Smith JS (2007) Calorie restriction extends the chronological lifespan of *Saccharomyces cerevisiae* independently of the Sirtuins. *Aging Cell* 6: 649-662.
44. Pronk JT, Yde Steensma H, Van Dijken JP (1996) Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12: 1607-1633.
45. Chen J, Powers T (2006) Coordinate regulation of multiple and distinct biosynthetic pathways by TOR and PKA kinases in *S. cerevisiae*. *Current Genetics* 49: 281-293.
46. Wang Y, Pierce M, Schneper L, Uml, Idal CG, et al. (2004) Ras and Gpa2 Mediate One Branch of a Redundant Glucose Signaling Pathway in Yeast. *PLoS Biology* 2: e128.
47. Kaerberlein M, Hu D, Kerr EO, Tsuchiya M, Westman EA, et al. (2005) Increased Life Span due to Calorie Restriction in Respiratory-Deficient Yeast. *PLoS Genetics* 1: e69.
48. Campo ML, Kinnally KW, Tedeschi H (1992) The effect of antimycin A on mouse liver inner mitochondrial membrane channel activity. *J Biol Chem* 267: 8123-8127.

49. Longo VD, Gralla EB, Valentine JS (1996) Superoxide Dismutase Activity Is Essential for Stationary Phase Survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271: 12275-12280.
50. Petit T, Blazquez MA, Gancedo C (1996) *Schizosaccharomyces pombe* possesses an unusual and a conventional hexokinase: biochemical and molecular characterization of both hexokinases. *FEBS Letters* 378: 185-189.
51. Moreno F, Herrero P (2002) The hexokinase 2-dependent glucose signal transduction pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* 26: 83-90.
52. Jansen MLA, De Winde JH, Pronk JT (2002) Hxt-Carrier-Mediated Glucose Efflux upon Exposure of *Saccharomyces cerevisiae* to Excess Maltose. *Appl Environ Microbiol* 68: 4259-4265.
53. Santangelo GM (2006) Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 253-282.
54. Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813-820.
55. Brownlee MDM (1995) Advanced Protein Glycosylation in Diabetes and Aging. *Annual Review of Medicine* 46: 223-234.
56. Schmidt AM, Yan SD, Stern DM (1995) The dark side of glucose. *Nat Med* 1: 1002-1004.
57. Yu T, Robotham JL, Yoon Y (2006) Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2653-2658.
58. Speakman JR, Talbot DA, Selman C, Snart S, McLaren JS, et al. (2004) Uncoupled and surviving: individual mice with high metabolism have greater mitochondrial uncoupling and live longer. *Aging Cell* 3: 87-95.
59. Matsuo Y, McInnis B, Marcus S (2008) Regulation of the Subcellular Localization of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase in Response to Physiological Stresses and Sexual Differentiation in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell* 7: 1450-1459.

60. Rolland F, Wanke V, Cauwenberg L, Ma P, Boles E, et al. (2001) The role of hexose transport and phosphorylation in cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 1: 33-45.
61. Bonini BM, Van Dijck P, Thevelein JM (2003) Uncoupling of the glucose growth defect and the deregulation of glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae* *tps1* mutants expressing trehalose-6-phosphate-insensitive hexokinase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1606: 83-93.
62. Stiefel J, Wang L, Kelly DA, Janoo RTK, Seitz J, et al. (2004) Suppressors of an Adenylate Cyclase Deletion in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell* 3: 610-619.
63. Houthoofd K, Braeckman BP, Johnson TE, Vanfleteren JR (2003) Life extension via dietary restriction is independent of the Ins/IGF-1 signalling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology* 38: 947-954.
64. Min K-J, Yamamoto R, Buch S, Pankratz M, Tatar M (2008) *Drosophila* lifespan control by dietary restriction independent of insulin-like signaling. *Aging Cell* 7: 199-206.
65. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R (1993) A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366: 461-464.
66. Tatar M, Kopelman A, Epstein D, Tu MP, Yin CM, et al. (2001) A Mutant *Drosophila* Insulin Receptor Homolog That Extends Life-Span and Impairs Neuroendocrine Function. *Science* 292: 107-110.
67. Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloën A, et al. (2003) IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421: 182-187.
68. Piper MDW, Selman C, McElwee JJ, Partridge L (2008) Separating cause from effect: how does insulin/IGF signalling control lifespan in worms, flies and mice? *Journal of Internal Medicine* 263: 179-191.

69. Tatar M, Bartke A, Antebi A (2003) The Endocrine Regulation of Aging by Insulin-like Signals. *Science* 299: 1346-1351.
70. Wang MC, Bohmann D, Jasper H (2005) JNK Extends Life Span and Limits Growth by Antagonizing Cellular and Organism-Wide Responses to Insulin Signaling. *Cell* 121: 115-125.
71. Broughton SJ, Piper MDW, Ikeya T, Bass TM, Jacobson J, et al. (2005) Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 3105-3110.
72. Taguchi A, Wartschow LM, White MF (2007) Brain IRS2 Signaling Coordinates Life Span and Nutrient Homeostasis. *Science* 317: 369-372.
73. Townley R, Shapiro L (2007) Crystal Structures of the Adenylate Sensor from Fission Yeast AMP-Activated Protein Kinase. *Science* 315: 1726-1729.
74. Ashrafi K, Lin SS, Manchester JK, Gordon JI (2000) Sip2p and its partner Snf1p kinase affect aging in *S. cerevisiae*. *Genes Dev* 14: 1872-1885.
75. Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, et al. (2007) Glucose Restriction Extends *Caenorhabditis elegans* Life Span by Inducing Mitochondrial Respiration and Increasing Oxidative Stress. *Cell Metabolism* 6: 280-293.
76. Entian KD, Mecke D (1982) Genetic evidence for a role of hexokinase isozyme PII in carbon catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 257: 870-874.
77. Yan L, Vatner DE, O'Connor JP, Ivessa A, Ge H, et al. (2007) Type 5 Adenylyl Cyclase Disruption Increases Longevity and Protects Against Stress. *Cell* 130: 247-258.
78. Moreno S, Klar A, Nurse P (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* 194: 795-823.
79. Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB (2004) Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R431-444.

80. Tarpey MM, Fridovich I (2001) Methods of Detection of Vascular Reactive Species: Nitric Oxide, Superoxide, Hydrogen Peroxide, and Peroxynitrite. *Circ Res* 89: 224-236.
81. Pevala V, Kolarov J, Polcic P (2007) Alterations in mitochondrial morphology of *Schizosaccharomyces pombe* induced by cell-death promoting agents. *Folia Microbiol* 52: 381-390.
82. Wang X, Zuo X, Kucejova B, Chen XJ (2008) Reduced cytosolic protein synthesis suppresses mitochondrial degeneration. *Nat Cell Biol* 10: 1090-1097.

Discussion

Les voies Git3/PKA et Sck2 régulent le vieillissement

Mes travaux ont montré que les voies de signalisation des nutriments dépendantes des sérines thréonines kinases Pka1p et Sck2p avaient des effets d'accélération du vieillissement chronologique chez la levure à fission (Figure 14). Nous avons montré que les marqueurs de la mort par vieillissement en phase stationnaire sont la synthèse de ROS, le déclenchement de l'apoptose et la perte de résistance au stress oxydatif et thermique. D'autre part, l'effet pro-vieillessement de la kinase Pka1p est activé suite à la détection de la présence de glucose par le récepteur à sept domaines transmembranaire Git3p couplé à la protéine G α , Gpa2p. Nous avons montré que cet effet pro-vieillessement n'est pas relié au métabolisme de la source de carbone mais à sa signalisation puisque le même effet peut être obtenu dans des mutants d'hexokinases incapables de consommer le glucose. Enfin, nos études suggèrent qu'une régulation mitochondriale est à la source de la perte soudaine de viabilité induite par le signal de glucose via Git3/PKA.

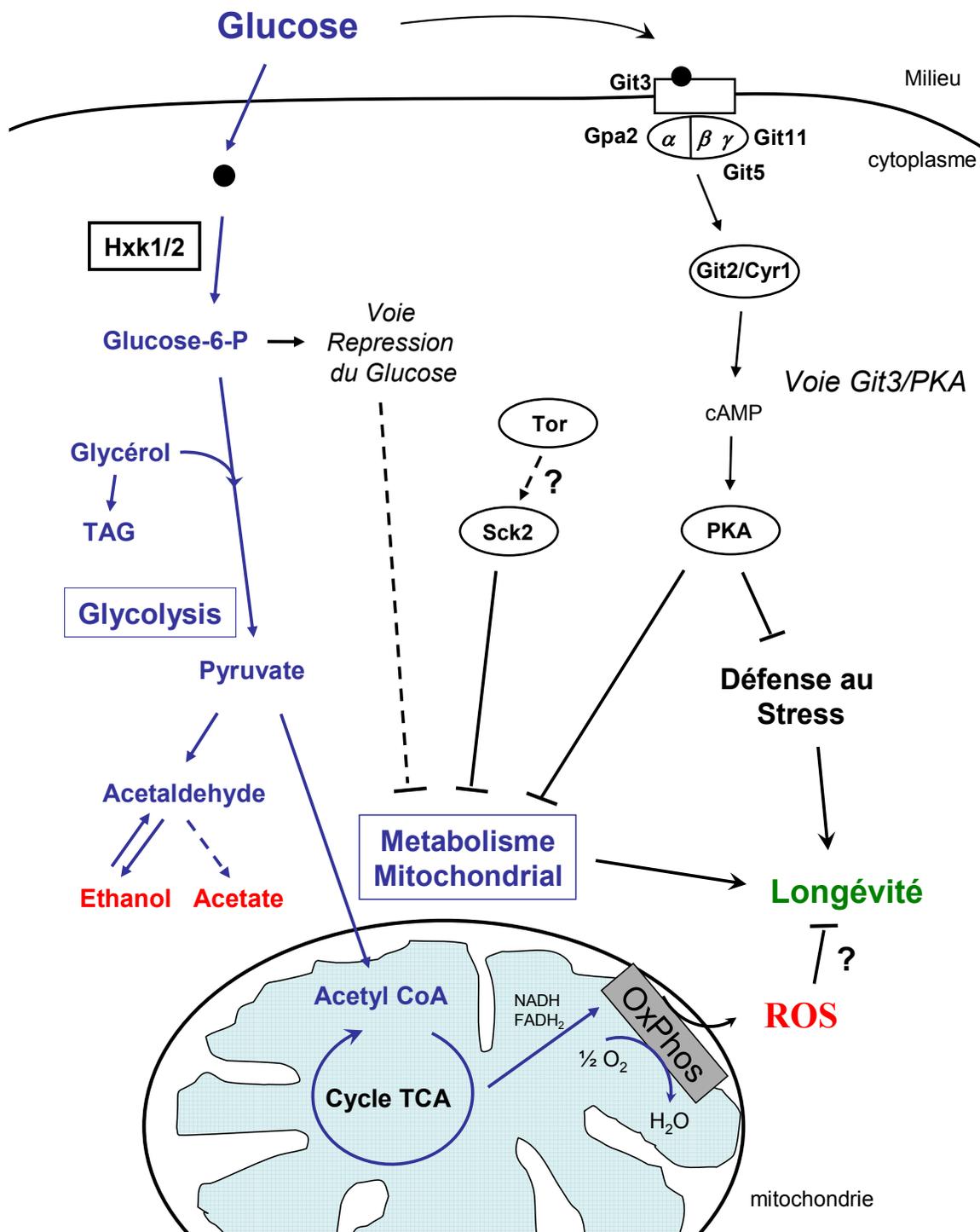
Mes données montrent une conservation de la fonction des voies PKA/AMPc et Sch9/Sck2 sur la longévité entre *S. cerevisiae* et *S. pombe*, deux espèces pourtant phylogénétiquement éloignées. Ceci suggère que cette fonction de contrôle du vieillissement par ces voies est conservée chez les levures en général.

La régulation de la durée de vie se fait donc à travers la signalisation des nutriments. Cependant, quelles fonctions en aval agissent sur la longévité ?

Figure 14 : Modèle récapitulatif de l'effet des voies de signalisation des nutriments et du glucose sur le vieillissement de *S. pombe*.

Les flèches bleues renvoient à des réactions métaboliques, les flèches noires à des mécanismes de signalisation transmis par des protéines. Les termes en rouge réfèrent à des métabolites dont l'accumulation corrèle avec le vieillissement. Les traits en pointillés réfèrent à des effets attribués par homologie avec *S. cerevisiae*. TAG : triacylglycerol

Figure 14



Les métabolites du pyruvate

Chez *S. cerevisiae*, en fin de glycolyse, le pyruvate est soit transformé en acétaldéhyde soit en acétyl-coA (Flores et al., 2000) (Figure 12). Cet embranchement métabolique semble être primordial dans la régulation de la longévité. La signalisation du glucose régule le métabolisme dans la levure à bourgeonnement (Thevelein et de Winde, 1999), cependant c'est un domaine qui manque encore cruellement de données (Pronk et al., 1996) ; les mécanismes de régulation du métabolisme des levures en général ne sont pas bien connus. Mes résultats chez *S. Pombe* montrent que la signalisation du glucose, en plus de réguler la survie à long terme, contrôle aussi le métabolisme à travers la respiration mitochondriale (Article 2, Figure 3).

Chez la levure à bourgeonnement, il existe plus de données sur la régulation du métabolisme. Deux complexes enzymatiques sont déterminants pour le devenir du pyruvate (Pronk et al., 1996). Celui des pyruvates décarboxylases catalyse la décarboxylation du pyruvate en acétaldéhyde pour produire ensuite l'éthanol. Leur expression est activée par la présence de glucose chez *S. cerevisiae* (Hohmann et Cederberg, 1990; Pronk et al., 1996). L'autre complexe qui envoie le pyruvate dans le cycle de Krebs est celui des enzymes de la pyruvate déshydrogénase (Pronk et al., 1996). La régulation de l'expression et de l'activité de ce complexe est mal connue, toutefois, elle est sous le contrôle d'éléments de réponse à Gcn4p chez *S. cerevisiae*. Or, ce facteur de transcription est sous le contrôle de Tor1p qui est connu pour raccourcir la durée de vie répllicative (Powers et al., 2006; Steffen et al., 2008).

On distingue deux voies métaboliques (voir Figure 12) :

a. Le métabolisme mitochondrial

En faible quantité de glucose, le pyruvate serait majoritairement dirigé vers la mitochondrie pour être transformé en acétyl-coA qui entre dans le cycle des acides carboxyliques (Pronk et al., 1996). Ceci est suggéré par l'augmentation de la respiration mitochondriale par la chaîne PhosOx. Dans cette condition la longévité augmente. Ceci a été observé dans les cultures de *S. pombe* en glycérol ou en faible concentration de glucose (Article 2, Figure 1).

Une étude récente a montré que la surexpression des composants E2 (Lat1) et E3 (Lpd1) du complexe pyruvate déshydrogénase produisant l'acétyl-coA mitochondrial allonge la DVC. De la même manière la surexpression de E2 (Lat1) augmente la DVR (Easlon et al., 2007). Une autre étude a rapporté que le complexe de la pyruvate déshydrogénase est une cible majeure étant endommagée par oxydation à la fois lors du vieillissement chronologique et répliatif (Reverter-Branchat et al., 2004). Ces résultats pointent vers l'importance d'une régulation métabolique par la redirection du pyruvate vers la mitochondrie dans la longévité en restriction de glucose. Ils suggèrent aussi que la signalisation des nutriments peut influencer la longévité en agissant sur un autre point de contrôle puisque Easlon *et al* ont souligné que la perte de Lat1p n'empêchait pas l'augmentation de DVR par délétion de *SCH9*.

b. Le métabolisme cytosolique

En grande disponibilité de glucose, le pyruvate réagit avec la pyruvate carboxylase pour donner de l'acétaldéhyde (et CO₂) qui est ensuite métabolisé soit en acide acétique soit en éthanol (Boubekeur et al., 2001; Flores et al., 2000; Mizuno et al., 2006). La toxicité de l'acétaldéhyde et de l'éthanol est bien établie (Lieber, 2005). Il a déjà été proposé que l'accumulation d'éthanol était responsable de la mort en phase stationnaire des levures (Fabrizio et al., 2005; Reverter-Branchat et al., 2007). Mon criblage a isolé l'alcool déshydrogénase *adh1*⁺ qui catalyse l'interconversion entre éthanol et aldéhyde suggérant que le métabolisme de l'éthanol est un facteur limitant de la longévité de *S. pombe* aussi (détaillé plus bas). Il est toutefois difficile de conclure si l'éthanol induit directement les dommages par dénaturation des protéines provoquant le vieillissement ou s'il intervient dans une signalisation qui modifie le métabolisme. De plus, les autres organismes ne produisant pas d'éthanol dans leur métabolisme vieillissent aussi.

Récemment un article a proposé que l'acide acétique soit la cause du vieillissement chronologique chez la levure à bourgeonnement (Burtner et al., 2009). L'équipe du Dr Kaeberlein a montré que l'acide acétique s'accumule dans le milieu lors de la fermentation du glucose et qu'il serait suffisant pour raccourcir la DVC. Lorsque l'acide acétique est retiré du milieu par lavage, les cellules survivent mieux. Le même effet est obtenu par neutralisation du pH, la forme basique résultante (anion acétate) ne pouvant pas entrer dans les levures. En faible concentration de glucose, l'acide acétique ne s'accumule pas dans le milieu et les cellules vivent plus longtemps. Comme pour l'éthanol, il n'a pas été montré si l'effet toxique était direct (modification des macromolécules) ou indirect (sur le métabolisme). Il est connu que l'acétate induit l'apoptose chez les levures (voir introduction). Nous pouvons aussi spéculer que la présence d'acide acétique est requise pour la toxicité de l'éthanol en milieu acide puisque l'estérification des fonctions acides par

l'éthanol nécessite une catalyse qui n'a lieu qu'à pH acide; ce dernier qui fournit des protons nécessaires à la formation des intermédiaires de la réaction.

Le métabolisme des glucides

Deux conditions nutritives allongent la durée de vie de la levure de fission. Elles sont toutes deux assimilables à une restriction calorique. La culture en faible concentration de glucose allonge significativement la longévité. L'utilisation du glycérol comme source de carbone l'étend de manière considérable (Article 2, Figure 1A et 1E). La culture en glycérol peut être assimilée à celle en faible concentration de glucose dans le sens où, dans les deux cas, la signalisation du glucose est faible. D'autre part, ces deux conditions de culture augmentent la respiration mitochondriale (Zuin et al., 2008).

a. Le glycérol

Le glycérol subit une série de 3 réactions avant d'être métabolisé en glycéraldéhyde-3-phosphate. Il entre alors dans la glycolyse, au niveau du 4^{ème} intermédiaire métabolique après la première étape, la transformation du glucose en glucose-6-phosphate. Tout le reste du catabolisme du glycérol en pyruvate pourrait donc être identique à celui du glucose (Figure 12). Or, les caractéristiques phénotypiques des cellules qui poussent en glycérol sont très différentes de celles des cellules qui poussent en glucose : vitesse de croissance ralentie, niveau de respiration augmenté, plus grande résistance au stress ([Article 2](#)) et (Zuin et al., 2008). Il convient donc de se demander comment elles influencent la longévité.

Il est connu chez la levure à fission que le glycérol n'est pas fermenté en éthanol et accélère la respiration alors que le glucose en quantité suffisante est fermenté et maintient un niveau de respiration basal plus élevé que dans la levure à bourgeonnement (Heslot et al., 1970; Van Urk et al., 1990). Il y a donc une régulation du métabolisme qui envoie le pyruvate formé par le glucose plutôt vers la fermentation alcoolique et le pyruvate formé par le glycérol plutôt vers le cycle de Krebs comme chez la levure à bourgeonnement. Au regard de cette caractéristique, plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'effet pro-longévité lors de la culture en glycérol.

(i) L'absence de catabolites de l'acétaldéhyde (éthanol et acétate) qui provoqueraient une mort prématurée lors de la pousse en glucose en est une. Cependant, ces molécules ne peuvent pas expliquer à elles seules la perte de longévité des levures. En effet, chez la levure *S. cerevisiae*, les cellules ont été lavées et incubées en phase stationnaire dans l'eau, un milieu dépourvu de ces métabolites. Cette manipulation augmente la durée de vie suggérant que l'éthanol et l'acétate raccourciraient bien la DVC (Wei et al., 2008). Toutefois, dans une telle condition, on peut encore doubler la longévité par des manipulations génétiques des voies de signalisation montrant qu'il y a d'autres facteurs agissant sur la DVC.

(ii) L'effet de régulateur osmotique, de cryo-protecteur et de chaperonne chimique du glycérol pourrait protéger les levures de l'effet du vieillissement et expliquer l'effet de ralentissement extrême du vieillissement (Brisson et al., 2001; Flores et al., 2000).

(iii) L'absence totale de signalisation du glucose lors de la culture en glycérol pourrait être en partie à l'origine de la longévité exceptionnelle des cellules nourries avec cette source de carbone. Les preuves en faveur de cette hypothèse sont les suivantes. Le

double mutant des hexokinases cultivé en glycérol perd sa viabilité lorsque l'on restaure la signalisation du glucose dépendante de Git3/PKA (Article 2, Figure 6A et B). Une deuxième preuve dans le sens de ce modèle est qu'une souche avec la mutation *gpa2^{R176H}* ayant une signalisation constitutive du glucose par Git3/Gpa2/PKA ne pousse pas sur glycérol (Article 2, Figure 3B). Les facteurs pro-vieillessement qui accompagnent la signalisation du glucose peuvent être multiples. Comme décrit plus tôt, le métabolisme du pyruvate est régulé par la signalisation du glucose. Donc le premier facteur pourrait être les métabolites de l'acétaldéhyde. Mais d'autres facteurs doivent exister puisque les mutants de signalisation vivent plus longtemps quand ils sont lavés et vieillissent dans l'eau.

b. Le glucose

La restriction calorique par diminution de la disponibilité en glucose allonge la DVC en fonction de la dose (Article 2, Figure 1). Au vu des connaissances actuelles, plusieurs facteurs pro-vieillessement peuvent être associés à la culture en glucose.

(i) On peut spéculer que les cellules sauvages meurent de l'accumulation d'éthanol ou d'acétate dépendante de la concentration de glucose disponible qui est le substrat indirect pour la synthèse de ces métabolites.

(ii) Les voies de signalisation du glucose Git3/PKA pourraient aussi expliquer cet effet dans le sauvage. En effet, le mutant *gpa2^{R176H}* meurt prématurément, même en faible concentration de glucose (0.2%). Son phénotype est associé à celui du sauvage en forte concentration de glucose : faible respiration, forte production de ROS et faible résistance au stress oxydatif.

Rôle de la signalisation par Git3/PKA dans la restriction en glucose

Comment discriminer entre les possibilités présentées ci-dessus : baisse de la signalisation ou accumulation d'un intermédiaire métabolique toxique pour expliquer le gain de longévité en faible concentration de glucose ?

Quelques indices pointent vers une fonction reliée à la signalisation. D'abord le mutant *gpa2^{R176H}* en 0.2% glucose dispose de dix fois moins de substrat pour synthétiser des métabolites toxiques. Or, il meurt aussi vite qu'en 2% glucose. Ceci laisse penser que ni l'éthanol ni l'acétate ne sont responsables de sa courte DVC. Dans ce mutant, la DVC raccourcie apparaît donc être due plutôt à la présence anormalement élevée de ROS qu'à celle des métabolites de l'acétaldéhyde. D'un autre côté, l'implication d'un effet de cette signalisation est suggérée par le double mutant $\Delta h x k 1 \Delta h x k 2$. Il a été cultivé en glycérol jusqu'en fin de phase exponentielle. A ce stade, nous avons ajouté du glucose. La conséquence est la mort très rapide de la population (Article 2, Figure 6B). Dans ces conditions, au moment de l'ajout du glucose, une très faible quantité de substrat carboné (venant du glycérol restant) est utilisée, comme le témoigne le taux de croissance très faible. Si une accumulation d'éthanol ou d'acétate débutait suite à une modification du métabolisme par ajout du glucose, son niveau expliquerait difficilement la chute brutale de la survie. En conclusion, la production de ROS subséquente à la signalisation du glucose semble être responsable du vieillissement prématuré dans le cas des mutants *gpa2^{R176H}* et $\Delta h x k 1 \Delta h x k 2$. Ceci suggère que le même processus pourrait expliquer la mort des levures sauvages en forte concentration de glucose.

Toutefois, il existe aussi des divergences entre le phénotype de longévité associé à la perte de signalisation du glucose par la voie Git3/PKA et la pousse en faible concentration de glucose des levures sauvages. Premièrement, la hausse de respiration dans $\Delta git3$ en 2% glucose n'est pas aussi importante que le sauvage en 0.2% glucose (article 2, figure 3). Le même constat est fait pour le gain de résistance au stress (article 2, figure 4). Enfin, la délétion du récepteur Git3p n'empêche pas l'allongement de la durée de vie par restriction de glucose. Ces résultats ensemble montrent que la régulation de DVC par le glucose ne passe pas seulement par la signalisation Git3/PKA.

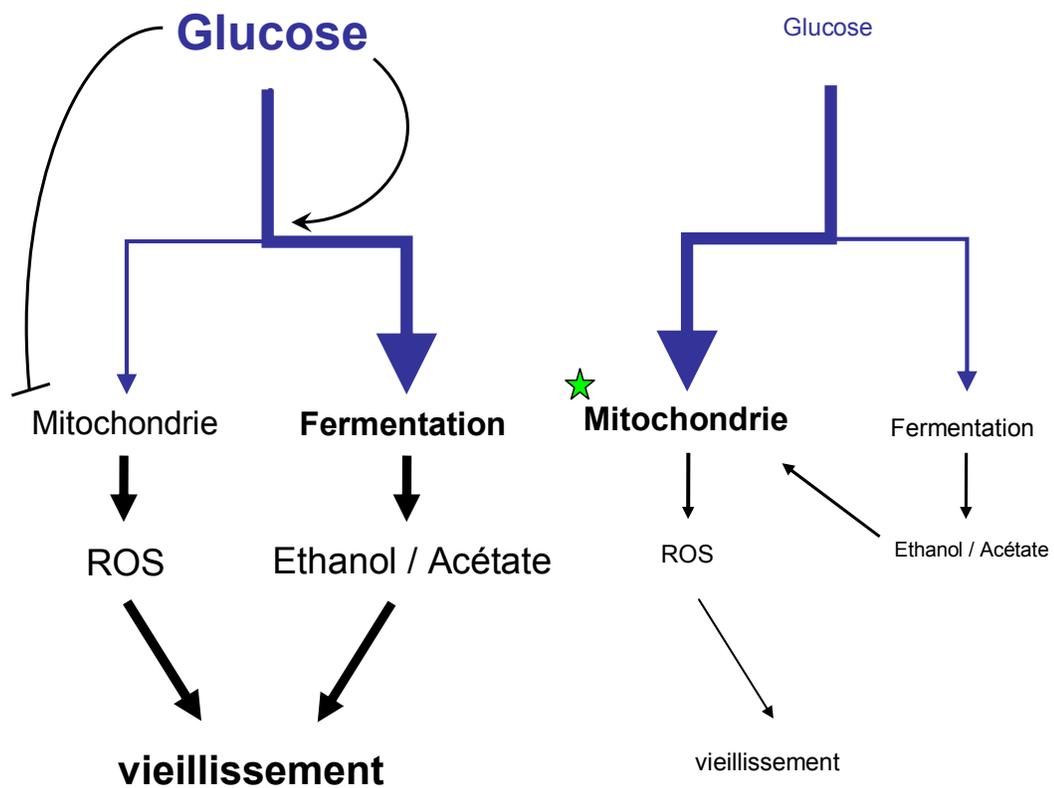
Le signal du glucose par Git3/PKA et Sck2 influencerait la longévité à travers une régulation mitochondriale impliquant la chaîne de respiration

La théorie des radicaux libres (ou théorie du stress oxydatif) postule que le vieillissement est la conséquence de l'accumulation de dommages provoqués par les ROS provenant de la respiration mitochondriale. Notre travail dans la levure à fission a montré une correspondance systématique entre la forte accumulation de ROS et la mort en phase stationnaire (Article 1 et 2) dans le sauvage et dans les mutants de signalisation par Git3/PKA. Cette observation suggère un lien étroit entre l'augmentation de la longévité par perte de la signalisation du glucose et la régulation de l'activité mitochondriale.

Nous avons observé que le signal du glucose était corrélé à une baisse de la respiration mitochondriale. Inversement la perte de ce signal augmente la respiration (Article 2, Figure 3). Cet effet est connu et a été documenté comme « effet Crabtree » (Van Urk et al., 1990). Nous avons montré que ce signal venait en partie du récepteur Git3p. Il semble que cette régulation de l'activité mitochondriale est primordiale pour l'effet anti-vieillesse en absence de glucose. En effet, dans une espèce de levure qui n'a pas la

capacité de moduler son activité mitochondriale en fonction du glucose comme *Kluyveromyces lactis*, la disponibilité en glucose n'affecte pas la longévité (Oliveira et al., 2008). Ce genre de levure est appelée Crabtree négative. Ce cas fait lieu d'exception car la majorité des espèces étudiées ont une durée de vie dépendante de la disponibilité en calorie dans la diète (Kennedy et al., 2007; Mair et Dillin, 2008). Le résultat de cette étude appuie l'hypothèse qu'une régulation mitochondriale est nécessaire à un allongement de la longévité en condition de limitation de glucose comme le propose le modèle de la Figure 15.

Figure 15 : Modèle proposant que le gain de longévité associé à la faible teneur en glucose passe par une régulation des fonctions mitochondriales.



-  Cheminement des métabolites du glucose
-  Action des mécanismes de signalisation du glucose
-  Mitochondrie en respiration active

Dans deux mutants différents, nous avons observé une perte de la modulation de la longévité par le glucose comme dans le cas de *Kluiveromyces lactis*.

(1) La mutation $gpa2^{R176H}$ provoque une mort prématurée en phase stationnaire quelle que soit la concentration de glucose, normale ou restreinte (Article 2 Figure 4). Cette mutation induit une activation constitutive de la voie même en absence de glucose (Article 2, Figure S6). Elle induit aussi une perte partielle de la régulation mitochondriale et sa culture en milieu pro-respiratoire est létale.

(2) La délétion du récepteur du glucose $git3^+$ dans le double mutant des hexokinases $\Delta h x k 1 \Delta h x k 2$ devient insensible à la présence de glucose. *A contrario*, dans ce mutant, si le récepteur est actif, le glucose tue autour de 99% des cellules en 24 heures, ce qui est corrélé à une forte production de ROS dans toutes les cellules (Article 2, Figure 6).

Cette perte de la régulation de la longévité par le glucose dans ces mutants est-elle liée à la mitochondrie ? Dans le cas du mutant $gpa2^{R176H}$, la respiration mitochondriale est plus faible et l'accumulation de ROS est accélérée. Dans celui du mutant $\Delta h x k 1 \Delta h x k 2 \Delta g i t 3$ où on observe un effet inverse de survie indépendante du glucose, la synthèse de ROS est basse et stable. A l'inverse de ce qui est observable dans $\Delta h x k 1 \Delta h x k 2$ en présence de glucose, où la production de ROS s'emballe. D'autre part, le rôle du récepteur Git3p sur la régulation mitochondriale est suggéré par la hausse de sa respiration par rapport au sauvage en présence de forte concentration de glucose. Ensemble, ces données suggèrent que l'effet pro-vieillesse de la signalisation du glucose par Git3/PKA passe par une modulation d'une fonction mitochondriale et possiblement de la chaîne de PhosOx étant donné qu'elle est le siège de la respiration et de la production des superoxydes à l'origine des ROS.

L'hypothèse du rôle de la mitochondrie dans l'allongement de DVC en absence de signal Git3/PKA est appuyée par plusieurs autres études :

(1) Dans *S. cerevisiae*, l'équipe du Dr Nyström a mis en évidence deux voies différentes contrôlant la synthèse de ROS, incluant celle de Ras2/PKA, homologue à Git3/PKA.

(2) Dans *S. cerevisiae*, la kinase Tor1p inhibe la respiration et la traduction mitochondriale qui comprend la synthèse de nombreuses protéines des complexes de la chaîne de respiration (Bonawitz et al., 2007). De plus, la délétion de *TOR1* augmente la durée de vie indépendamment de Sod2p et ceci est concomitant avec une plus faible synthèse de radicaux libres. Les auteurs proposent que le renouvellement des protéines de la chaîne PhosOx inhibé par Tor1p induise un transfert d'électron plus efficace lors de la respiration mitochondriale, limitant ainsi la synthèse de ROS. La ressemblance du phénotype entre *tor1Δ* de *S. cerevisiae* et *Δgit3* de *S. pombe* est frappante : augmentation de respiration, de résistance au stress oxydatif, de DVC, d'expression de *SOD2* et baisse des ROS. Il se pourrait donc que comme pour *tor1Δ*, il existe une régulation de la chaîne de respiration dans *Δgit3*.

(3) L'effet de la délétion de composants des complexes respiratoires dans *S. pombe* a les mêmes effets qu'une signalisation constitutive par Git3/PKA (*gpa2^{R176H}*). Comme dans ce mutant, les délétions de l'ubiquinone, du cytochrome c ou des intermédiaires de leur biosynthèse entraîne une mort prématurée en phase stationnaire, une baisse de la respiration et un arrêt de croissance en milieu avec glycérol (Risa et al., 2008; Zuin et al.,

2008). La faible DVC de ces mutants peut être restaurée en milieu dépourvu d'oxygène (Zuin et al., 2008), appuyant l'importance du rôle de la synthèse des ROS dans la perte de viabilité à long terme.

Il serait intéressant de tester la DVC du mutant *gpa2*^{R176H} en condition d'anaérobiose, ou la perte de viabilité par ajout de glucose dans la souche $\Delta h x k 1 \Delta h x k 2$ dans la même condition. D'autre part, l'étude de la synthèse, la stabilité ou l'assemblage de la chaîne de respiration dans ces mutants pourraient apporter une explication de la modification de longévité dans ces conditions.

L'analyse du profil d'expression en phase stationnaire du mutant de délétion du gène *sck2*⁺ apporte une indication de plus sur le rôle d'une régulation mitochondriale de la chaîne de PhosOx pour la longévité. Avant tout, de manière surprenante, nous n'avons pas observé d'augmentation de résistance au stress en phase stationnaire dans cette souche par rapport à la souche sauvage. Ensuite, la mesure de son expression à échelle génomique a confirmé que la transcription des gènes de résistance au stress avait un niveau normal, voire inférieur à la souche sauvage (Tableau 3). L'analyse de ces puces à ADN a révélé que dans ce mutant, tous les gènes codés par l'ADN mitochondrial étaient surexprimés d'un facteur 3 à 15 (Tableau 3). Cette observation corrobore les résultats obtenus avec le mutant *tor1* Δ de *S. cerevisiae* où l'augmentation de longévité corrèle avec une augmentation d'expression des gènes mitochondriaux. Ce résultat de puce à ADN suggère que l'augmentation de longévité de la délétion de la kinase Sck2 pourrait être liée à une régulation de la chaîne de PhosOx mitochondriale. De plus, il a été montré que SCH9, l'homologue de *sck2*⁺, est une cible de la kinase Tor1p dans la levure à bourgeonnement (Urban et al., 2007). Ceci porte à croire que dans notre modèle, la kinase Sck2p agit dans la même voie que les complexes TORC1 ou TORC2 (Figure 14).

En résumé, notre étude avec les résultats présentés dans l'article 2 suggère que la signalisation des sources de carbone agit sur la DVC par une régulation mitochondriale (Figure 15). Néanmoins, n'ayant pas mesuré les niveaux d'éthanol ni d'acétate, on ne peut exclure un rôle de ces intermédiaires du métabolisme comme responsable de la mort prématurée en phase stationnaire à cause du glucose. Il a été montré dans *S. cerevisiae* qu'un traitement du milieu avec un tampon citrate phosphate à pH 6 suffisait pour augmenter la survie d'une souche sauvage poussée dans 2% glucose au même niveau qu'une souche dans 0.05% glucose (Burtner et al., 2009). Pour vérifier l'effet de l'acide acétique dans mon modèle, il faudrait mesurer la DVC de levure sauvage dans 2% glucose dans un milieu tamponné à pH 6. D'autre part, il serait intéressant de voir si le mutant *gpa2*^{R176H} a une durée de vie raccourcie dans un tel milieu.

Tableau 3 : Résultat du profil d'expression des gènes de résistance au stress et des gènes codés par l'ADN mitochondrial dans la souche Δ sck2 par rapport à la souche sauvage. Résultats obtenus par analyse comparative de puces ADN entre ces 2 souches. Le ratio montre une moyenne de deux mesures avec échanges de marqueurs Cy3-Cy5.

gènes de résistance au stress

gène	ratio*
pap1	0.4
sty1	0.4
tpx1	0.3
sod1	0.1
sod2	0.9
ctt1	1.2
trr1	0.7
gsh2	0.61
pgr1	0.2
alo1	0.1
gst2	0.02
hsp9	0.2
hsp16	0.3
hsp90	1.2

gènes de l'ADN mitochondrial

gène	ratio*
cox1	15.0
cox1/1b	4.3
cox2	3.3
atp6	5.7
atp8	1.8
atp9	1.5
rps3	1.8
cox3	6.2
cob	4.8
cobI	10.6

* ratio de l'intensité de la sonde du mutant $\Delta sck2$ sur celle de la levure sauvage sur la puce à ADN correspondant à des valeurs d'expression

La résistance au stress oxydatif

L'augmentation de longévité associée à la respiration peut être assimilée à un phénomène d'hormèse venant d'une augmentation de la réponse au stress oxydatif concomitante avec l'augmentation de production de ROS due à l'accélération de la respiration. La résistance au stress oxydatif a toujours été corrélée à la longévité dans notre modèle, de la même manière qu'une faible quantité de ROS. La mutation *gpa2^{R176H}* activant la voie constitutivement baisse la résistance au stress oxydatif exogène, alors que la perte du récepteur l'augmente. Ceci est concomitant, respectivement, avec une faible respiration dans le premier cas et à une forte dans le second. Dans les mutants de la chaîne de respiration de *S. pombe* décrits plus tôt, la chute de respiration et de DVC est aussi associée à une baisse de la résistance au stress oxydatif (Zuin et al., 2008). Le dérèglement de la chaîne de respiration induit une sensibilité au stress oxydatif. Deux possibilités prévalent :

(i) L'effet d'additivité des stress. Les ROS libérés de manière intrinsèque suite à la perte d'un composant de la chaîne de respiration, ou à sa non régulation pourrait s'ajouter à ceux apportés dans les essais au H₂O₂ et baisser le pouvoir de résistance. L'augmentation de résistance n'impliquerait donc pas nécessairement une hausse de réponse active mais proviendrait d'un plus faible niveau de stress intrinsèque.

(ii) Le bon fonctionnement de la chaîne PhosOx pourrait être requis pour une meilleure induction de la réponse au stress par les enzymes anti-oxydantes.

Les résultats dans la levure sauvage en restriction calorique favorisent l'additivité des stress plutôt que celle de l'effet de la réponse active au stress oxydatif. En effet, la restriction de glucose augmente considérablement la résistance au peroxyde d'hydrogène. Or, ni *sod1*⁺ ni *sod2*⁺ ni *gpx1*⁺ ne sont surexprimés en début de phase stationnaire dans ces conditions. Ainsi l'effet de résistance accrue pourrait venir d'un très faible niveau de stress endogène.

Dans le mutant de délétion de *git3*⁺, seule la protéine Sod1p est produite environ 6 fois plus que dans les échantillons de la levure sauvage. Il est donc difficile de conclure si dans cette souche la baisse de ROS est due à la réponse au stress ou à la régulation mitochondriale. Dans le mutant *gpa2*^{R176H}, une activation de la réponse contre le stress est déclenchée à travers l'expression de *sod1*⁺ (article 2 figure 4) et *tpx1*⁺ (non montré). Il est connu dans la levure de fission que H₂O₂ enclenche la réponse au stress médiée par Sty1p (Morigasaki et al., 2008; Veal et al., 2004) ; l'accumulation de ROS mesurée dans ce mutant serait la cause de cette réponse. Ici, cette surexpression de *sod2*⁺ ne suffit pas à contenir l'accumulation de ROS. Les résultats dans *S. cerevisiae* suggèrent que la protéine Sod2 est requise dans l'allongement de la DVC par perte des voies de Sch9 ou Ras2 (Fabrizio et al., 2003). Cependant, la perte de Sod2 n'a qu'un effet mitigé sur l'allongement de vie par délétion de l'adénylate cyclase Cyr1 (Fabrizio et al., 2003). De plus, la surexpression simultanée de *SOD1* et *SOD2* n'augmente que très peu la DVC (Fabrizio et al., 2004b). Dans le mutant de délétion de *TOR1*, *SOD2* est surexprimé. Toutefois, le gain de longévité ne vient pas de cette enzyme puisque la double délétion *tor1Δ sod2Δ* a une longue DVC (Bonawitz et al., 2007). Ensemble ces données suggèrent que le déclenchement de la réponse au stress oxydatif par les superoxydes dismutases n'est pas nécessairement la cause de l'allongement de la durée de vie de $\Delta git3$.

Pour expliquer les effets de longévité dans le mutant $\Delta git3$, il est difficile de discriminer entre régulation de la chaîne de respiration et augmentation de la réponse au stress puisque la mutation agit sur ces deux phénomènes.

Apoptose, ROS et vieillissement

L'apoptose est déclenchée par le vieillissement chronologique de la levure *S. cerevisiae* (Herker et al., 2004). Dans l'article 1, nous avons confirmé que ce phénomène était conservé chez *S. pombe*. Il a été proposé que l'augmentation des ROS constitue le signal à l'origine de la mort programmée. Cependant, les preuves sont indirectes, et il est encore difficile de dire si c'est l'acide acétique ou un autre signal comme les dommages à l'ADN n'en serait pas responsable (Eisenberg et al., 2007; Herker et al., 2004).

D'un autre côté, cette observation du déclenchement apoptotique peut apporter un doute sur l'implication directe des ROS dans le vieillissement. Certes les ROS allument le programme apoptotique, mais l'apoptose peut aussi provoquer leur synthèse (Madeo et al., 2004). Ainsi, l'accumulation de ROS observée pourrait ne pas être la cause mais la conséquence de la mort. En effet, il est connu que lors de l'apoptose, la libération du cytochrome c succède à une synthèse de ROS (Madeo et al., 2004).

La mesure de la synthèse de ROS en utilisant un marqueur très sensible, le Dihydroethidium (DHE), a mis en évidence une production en début de phase logarithmique et dépendante de la concentration de glucose : une grande concentration induisant une forte synthèse (Figure supplémentaire 6). La phase logarithmique n'est pas une période de croissance associée au déclenchement d'apoptose (Article 1, Figure 6). Ce

résultat suggère que la synthèse de ROS précède l'entrée en apoptose qui advient plus tard en phase stationnaire.

Ensemble, mes données ont permis de vérifier que la mort programmée de levure est enclenchée au cours du vieillissement chronologique. De plus, elles semblent montrer qu'elle serait signalée par la synthèse des ROS.

Implication de la voie SAPK et de la cascade MAP Kinase Wis4/Wis1/Sty1 dans la longévité chronologique

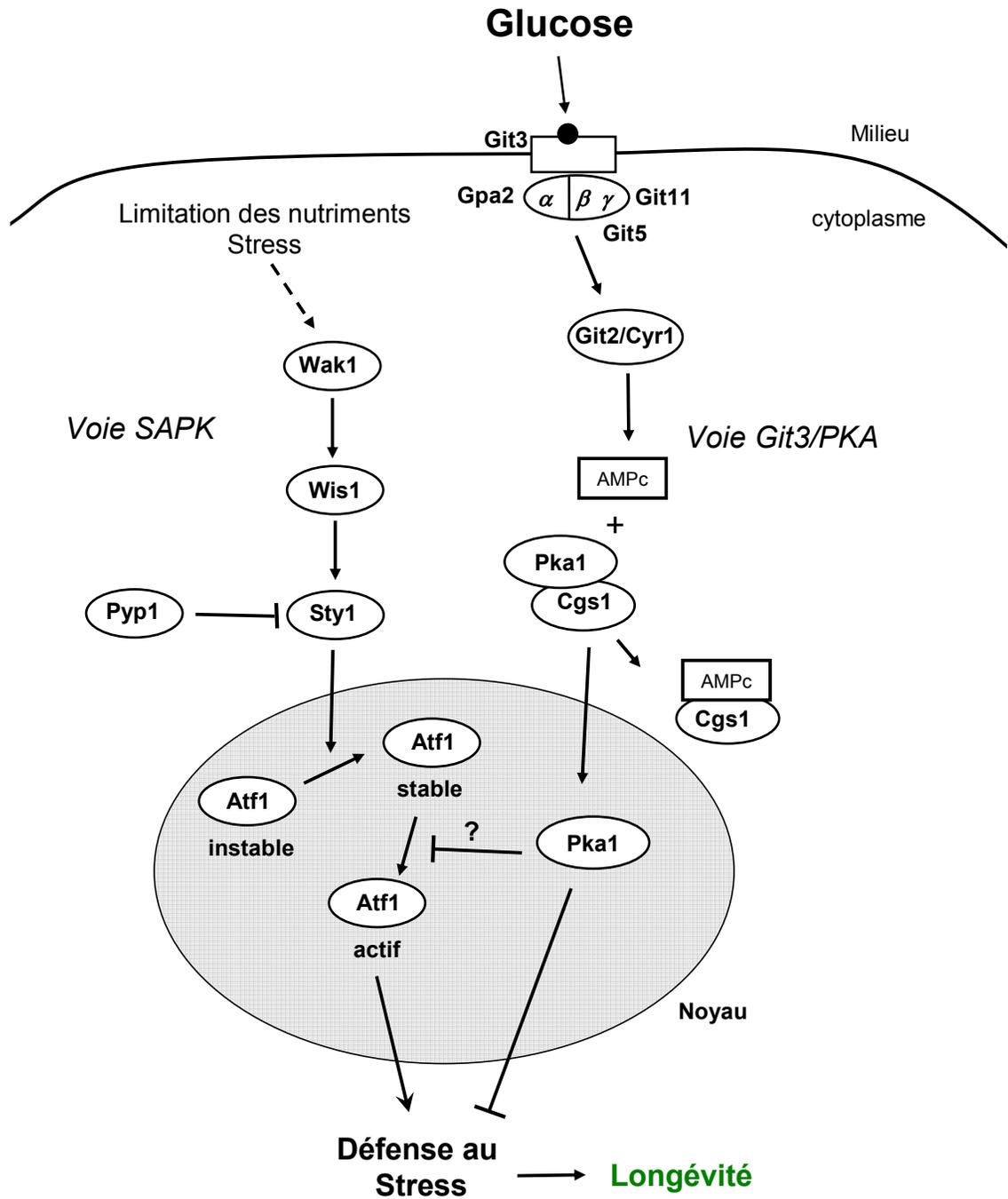
Wis1p est la MAPK kinase de la voie SAPK régulant la réponse à divers stress (voir Introduction, Figure 13). Elle est phosphorylée par la MAPKK kinase Wak1p/Wis4p et active Sty1p/Spc1p lorsqu'elle est phosphorylée. Lorsque les résidus sérines cibles sont remplacés par des acides aspartiques qui imitent des phosphorylations (souche *wis1DD*), une phosphorylation constitutive de Sty1p est observée (Shiozaki et al., 1998). Le même effet peut être atteint par délétion *pyp1*⁺, dont le gène code la tyrosine phosphatase de Sty1p (Shiozaki et al., 1998). Ces deux mutations (*wis1DD* et Δ *pyp1*) provoquent aussi une morphologie cellulaire plus petite et plus ronde, un phénotype similaire aux souches Δ *git3* et Δ *pka1*, deux mutants de DVC rallongée (Résultats Articles 1 et 2). D'autre part la perte du facteur de transcription Atf1p, régulé par la kinase Sty1 est létal en phase stationnaire (Lawrence et al., 2007; Takeda et al., 1995). Tous ces éléments suggèrent un rôle probable de la voie SAPK dans la régulation de la longévité par la voie PKA/AMPC.

La cascade Wis4p/Wis1p/Sty1p agit sur la demi-vie du complexe Atf1p/Pcr1p. La souche *wis1DD* présente une quantité de facteur de transcription Atf1p supérieure à la

souche sauvage en condition basale (Lawrence et al., 2007). Or la présence de ce facteur de transcription est obligatoire pour la réponse à divers stress (osmotique et oxydatif), ainsi que pour la viabilité en phase stationnaire (Lawrence et al., 2007). De la même manière la mutation des sites de phosphorylation d'Atf1p (*atf1-11M*) empêche son accumulation sans modifier sa transcription (Lawrence et al., 2007). Ensemble ces résultats montrent que la demi-vie du complexe Atf1p/Pcr1p est dépendante de son niveau de phosphorylation par l'activation de la voie Wis4p/Wis1p/Sty1p.

Afin de connaître l'effet de la stabilité d'Atf1p sur la survie en phase stationnaire, nous avons testé l'effet du mutant constitutif *wis1DD* et de l'absence de la phosphatase Pyp1p sur la DVC en milieu riche (schéma en figure 16). Ces mutations n'ont eu aucun effet sur la survie en phase stationnaire en concentration normal de glucose (Annexe Figure 1) ni en condition de restriction de glucose (données non présentées). Ceci est cohérent avec l'observation que la réponse au stress osmotique et oxydative dans le mutant instable *atf1-11M* (non phosphorylable) n'est pas perdue et que la synthèse des protéines de réponse au stress comme Gpx1p ou Hsp9p est intacte (Lawrence et al., 2007). La voie de signalisation MAP kinase Wis4p/Wis1p/Sty1p n'influence pas la longévité chronologique mais le facteur de transcription en aval Atf1p pourrait malgré cela être impliqué. La kinase PKA pourrait agir sur la longévité à travers une autre régulation du facteur de transcription Atf1p.

Figure 16 : La voie SAPK en amont d'Atf1 n'agit pas sur la durée de vie



Les effecteurs en aval de la voie Git3/PKA

Une étude récente a décrit le gène *ecl1*⁺ qui, cloné sur un plasmide de surexpression, augmente la DVC dans la levure de fission (Ohtsuka et al., 2008). L'effet de ce plasmide sur la DVC est additif avec celle subséquente à la mutation $\Delta pka1$ et ne l'est pas avec celle de la souche $\Delta sck2$ suggérant qu'il agit en aval de Pka1p. La fonction d'Ecl1p est inconnue, elle est localisée dans le noyau en phase exponentielle, et sa surexpression a été associée à une meilleure résistance au stress oxydatif.

Afin d'isoler des facteurs en aval de l'activation de l'adénylate cyclase Git2p par Gpa2p, nous avons réalisé un criblage de banque. La banque consiste en une population de plasmides surexprimant des ADNc (Annexe figure 2). Elle a été transformée dans le mutant *gpa2*^{R176H}. Le criblage a consisté en la sélection de clones satisfaisant deux conditions: (1) La restauration de la pousse en glycérol (Annexe figure 3). (2) L'allongement de la DVC (Annexe, Figure 4A). De plus amples détails sur ce criblage sont écrits dans la partie Résultats de l'Annexe. Les quatre séquences codantes isolées sont résumées dans le Tableau 4. L'effet de la surexpression de ces séquences sur la longévité a été vérifié par reclonage dans un nouveau plasmide et test de longévité (Annexe, Figure 4B). Leurs fonctions sont décrites en suivant.

Tableau 4 : Résultat du criblage de surexpression d'ADNc pour restauration du phénotype du mutant *gpa2^{R176H}* .

<i>Gène</i>	<i>Nombre de clones</i> [•]	<i>Séquence</i>	<i>Fonction</i>
cka1	1	ok	Ser/Thr caséine kinase
psp1/moc1/ sds23	3	ok	Phosphorylée en phase stationnaire. Homologue de SDS23 du complexe promoteur de l'anaphase
rpb10	1	ok	Sous-unité des ARN polymérase
adh1	1	inversée	Alcool déshydrogénase
rps4-1	1	108 nt manquant en 5'*	Sous-unité 40S ribosomal
rps26-1	1	1 nt manquant en 5'*	Sous-unité 40S ribosomal
rpl32	1	20 nt manquant en 5'*	Sous-unité 60S ribosomal

[•]: Nombre de clones parmi les 14 testés ayant permis de trouver une même séquence

* : Lors du séquençage, ADNc dépourvus d'ATG

Le protocole est décrit dans la partie Résultats en Annexe.

a. Psp1

Ce premier gène isolé dans notre criblage est le mieux documenté. La protéine Psp1p est une cible potentielle de la kinase Pka1p. D'abord cette protéine est phosphorylée en phase stationnaire (Yakura et al., 2006). Ensuite, Psp1p est délocalisé du noyau en présence d'AMPc, ce qui coïncide avec l'entrée de Pka1p dans le noyau (Matsuo et al., 2008; Yakura et al., 2006). Un scénario vraisemblable serait que Pka1p régule la localisation de Psp1p via une protéine régulatrice inconnue. La phosphorylation de ce partenaire de Psp1p conduirait à sa sortie du noyau et à sa fonction pro-longévité. Selon nos résultats présentés en Annexe Figure 5A, Psp1p restaure partiellement la courte durée de vie de *gpa2^{R176H}* suggérant qu'il agit bien en aval de cette voie mais que sa régulation par la voie git3/PKA n'est pas responsable seule de l'effet pro-vieillesse de cette voie. D'autre part, Psp1p est requis pour la régulation positive de la respiration en faible quantité de glucose puisque la perte de cette protéine se traduit par une baisse du taux de respiration en faible concentration de glucose (Annexe, Figure 5C).

D'autres études ont montré que Psp1p était impliquée dans la protéolyse médiée par le cyclosome ou complexe promoteur de l'anaphase (APC) (Figure 17) (Yanagida et al., 1999) qui permet le passage de la métaphase à l'anaphase lors de la division cellulaire. La kinase Pka1p de *S. pombe* est connue pour inhiber cette progression selon un mécanisme encore inconnu (Yanagida et al., 1999). Pka1p et Psp1p sont donc deux régulateurs antagonistes de l'activité de l'APC. Pka1p pourrait donc réguler négativement Psp1p qui active l'APC, par exemple en l'excluant du noyau comme il a été montré en forte concentration d'AMPc (Yakura et al., 2006). Aussi, l'APC pourrait être engagé dans une autre fonction que la régulation du cycle cellulaire. Par exemple, il a déjà été prouvé que ce complexe contrôle la polarité cellulaire lors du développement dans *C. elegans* ; il est aussi

présent dans des cellules post-mitotiques comme des neurones (Harper et al., 2002). Un rôle dans le contrôle de la longévité a déjà été attribué à l'APC. Dans la levure *S. cerevisiae*, la surexpression de composants de l'APC augmentent sensiblement la durée de vie répllicative et leur présence est requis pour l'augmentation de DVR par les mutations simultanée de *MIG1* et *MIG2*, deux régulateurs transcriptionnels de la voie de répression du glucose (Harkness et al., 2004). La délétion d'*APC5* empêche la survie en phase stationnaire. Toutes ces données suggèrent que Psp1 serait un régulateur de l'activité du cyclosome inhibé par Pka1 et requis pour la survie à long terme des levures.

b. Adh1

Le rôle de l'alcool déshydrogénase dans la DVC est connu et a déjà était discuté dans la partie « Les métabolites du pyruvate » de la discussion.

c. Rpb10

Rpb10 est une petite sous-unité commune aux ARN polymérases I, II et III de la levure à fission, elle fonctionnerait dans l'assemblage et l'intégrité de ces complexes (Proshkin et Shpakovski, 2004). Elle est essentielle et très conservée chez les eucaryotes. Aucune mutation des ARN polymérases n'a été reliée à une augmentation de longévité. Cependant, des travaux récents chez la levure et le nématode ont montré qu'une baisse de la traduction globale allongeait la durée de vie, ceci peut être atteint en ciblant une des protéines de la petite ou de la grande sous-unité ribosomale (Kaeberlein et

Kennedy, 2007). La surexpression d'une protéine de l'ARN polymérase pourrait avoir un effet semblable sur la traduction globale.

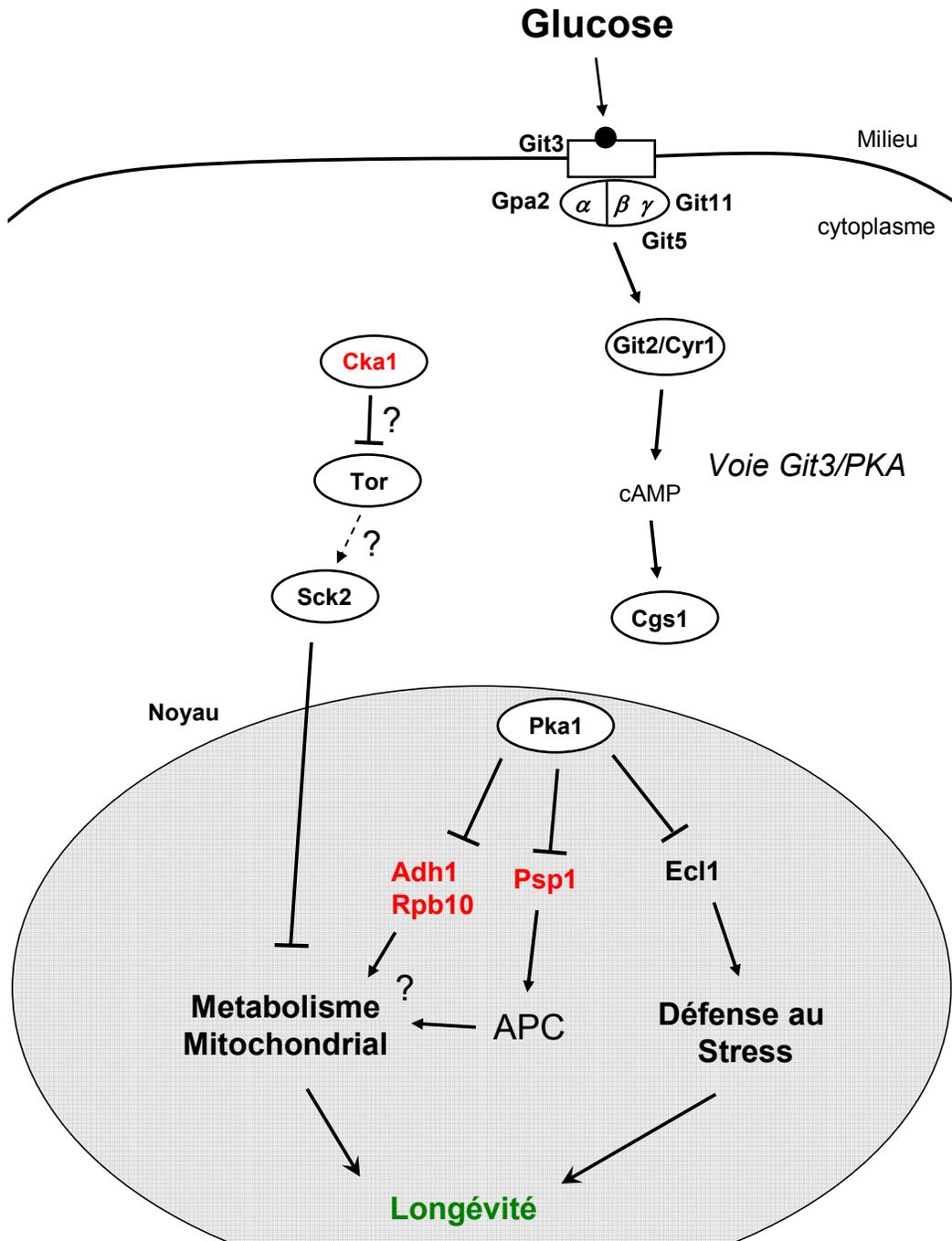
d. Cka1

cka1⁺ code pour la sous unité catalytique de la caséine kinase, orthologue de la sous-unité alpha de la caséine kinase II de mammifère (Roussou et Draetta, 1994). Sa fonction est essentielle dans la levure mais reste méconnue. Cependant, de manière intéressante, cette protéine a été co-précipitée avec les deux complexes TORC1 et TORC2 de *S. pombe* (Hayashi et al., 2007). La suppression de *tor1*⁺ augmentant la durée de vie dans la levure à bourgeonnement, on peut spéculer que Cka1p a un rôle de régulateur négatif de sur les activités de Tor1 et/ou Tor2 puisque sa surexpression a le même effet que la délétion de TOR1 de *S. cerevisiae* (Figure 17).

Figure 17 : Fonctions possibles agissant en aval de la voie Git3/PKA et Sck2.

En rouge sont représentés les gènes isolés dans le criblage de surexpression. Ecl1 réfère à une protéine qui agit positivement sur la longévité selon un mécanisme inconnu et qui est en amont de Pka1 (Ohtsuka et al., 2008).

Figure 17



Les programmes pro-vieillessement des eucaryotes unicellulaires, un avantage évolutif ?

Les résultats de mes travaux appuient la théorie proposant que le stress oxydant soit à l'origine du vieillissement. La levure *Schizosaccharomyces pombe* produirait elle-même la grande majorité des toxines qui endommagent ses composants qu'ils soient lipidiques, protéiques ou nucléiques. Ces toxines, les radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ROS) proviennent de la respiration. Mon étude avec d'autres suggèrent qu'il existe une régulation fine de la mitochondrie qui permet de limiter de manière très efficace son effet pro-vieillessement. Cette régulation est gouvernée notamment par la quantité de glucose disponible dans le milieu. Ces observations suggèrent avant tout que la longévité est un phénomène flexible et activement dirigé par la cellule de levure. Il existerait donc un programme génétique déterminant les fonctions agissant sur la durée de vie. La réalité d'un tel programme amène la question de la finalité de l'allongement de la durée de vie d'une levure.

Généralement on propose que l'allongement de la durée de vie permet aux levures de résister aux périodes sans nutriments. En abondance de nourriture, les levures entrent à nouveau en multiplication et raccourcissent leur durée de vie. Or si les levures ont la capacité de vivre plus longtemps, pourquoi auraient-elles des fonctions pro-vieillessement comme la voie de signalisation du glucose Git3/PKA chez *S. pombe* ?

Le vieillissement peut être vu comme un avantage sélectif pour l'espèce. Cette théorie développée par les scientifiques travaillant sur les levures et les bactéries est appelée théorie du vieillissement (ou de la mort) altruiste et programmée (Buttner et al., 2006; Lewis, 2000; Longo et al., 2005). Elle a le mérite d'expliquer l'existence de la mort

programmée (apoptose) dans les organismes unicellulaires. La mort prématurée d'un individu cellulaire peut bénéficier à la population. Cette idée est appuyée par deux observations expérimentales :

(1) La culture du mélange d'un mutant à durée de vie prolongée par perte d'une protéine pro-apoptotique (*Yca1p*) et d'une souche sauvage qui entre plus vite en apoptose a été réalisée (Herker et al., 2004). Dans un premier temps, la souche anti-apoptotique prend le dessus en terme de nombre de représentants mais à plus long terme et après plusieurs générations, elle disparaît totalement au dépend de la souche sauvage. La raison est mal comprise mais pourrait être que dans la souche *yca1Δ* de longévité accrue, l'apparition d'une sous-population d'individus mieux adaptés par apparition de mutation soit défavorisée par rapport aux cellules sauvages.

(3) Ce type de repousse de mutants spontanées mieux adaptées au manque de nutriments en phase stationnaire a été décrite par le laboratoire Longo. Elle est plus efficace dans les souches à courte durée de vie qu'à longue durée de vie (Fabrizio et al., 2004a). Aussi cette étude montre que les souches qui forment plus facilement des clones qui se réadaptent mieux en phase stationnaire ont accumulé plus de mutations. Ce genre de souche est obtenue par exemple par inhibition de la défense contre les radicaux libres après mutation des gènes *SOD1* et *CTT1*. Inversement, leur surexpression empêche l'apparition de mutations et de clones mieux adaptés.

Ensemble ces données montrent que la mort prématurée apporte un avantage sélectif au groupe. Il n'est pas encore clair si c'est par un mécanisme de diminution de compétition entre cellules jeunes et vieilles, pour les nutriments par exemple, ou bien si les facteurs pro-

vieillesse sont aussi ceux qui déterminent la réadaptation par accumulation de mutations. Dans ce deuxième cas, le vieillissement pourrait être un effet secondaire à des mécanismes pro-évolutifs indispensables à la création d'individus différents dont les plus aptes seraient gardés par l'environnement comme le stipule la théorie Darwinienne.

Il peut apparaître maladroit de comparer la durée de vie d'une levure à celle d'un organisme métazoaire, la première vivant quelques jours et l'autre plusieurs années. Les animaux sont l'œuvre d'une organisation complexe de cellules et de tissus qui requiert une longue période de développement. L'apparition même des espèces de grande taille a forcément été concomitante avec une augmentation de la durée de vie. Le facteur limitant à cette évolution de la taille semble être l'énergie comme le propose la théorie du soma disponible. Cette année, des paléontologues ont apporté un indice intéressant allant dans le sens de cette idée. Les périodes d'augmentation les plus importantes des tailles des fossiles correspondent à celles de hausse d'oxygène dans l'atmosphère (Payne et al., 2009).

Malgré tout, une cellule unique de mammifère, par exemple, vit en moyenne beaucoup plus longtemps que celle d'une levure. Ceci suggère donc que les programmes de survie à long terme ne sont pas les mêmes entre les levures et les cellules d'animaux complexes. Cependant, les recherches récentes tendent à montrer le contraire. Des gènes de fonctions similaires, voire des orthologues, régulent la durée de vie d'espèces aussi lointaines que des levures et des souris : ceux des voies de dosage des nutriments, de la réponse au stress ou de la croissance cellulaire (Longo et Finch, 2003). Cette observation est une preuve forte qu'un programme universel, évolutivement sélectionné, régit le vieillissement cellulaire. Les programmes du vieillissement altruiste des organismes unicellulaires ancestraux pourraient avoir été conservés au cours de l'évolution (Mitteldorf,

2006) mais régulés différemment de manière à permettre une durée de vie plus longue, indispensable au développement des organismes complexes.

Conclusions et extrapolation aux eucaryotes multicellulaires

Mon travail a permis de mettre au point un nouveau modèle unicellulaire d'étude du vieillissement des cellules eucaryotes avec la levure *Schizosaccharomyces pombe*. La première étape de cette thèse a montré que les voies de détection des nutriments par les sérine/thréonine kinases Pka1 et Sck2 contrôlent le vieillissement chronologique de ces cellules. Or ces gènes sont les orthologues de gènes déjà connus pour agir dans le contrôle de la longévité de levure. D'autre part, les homologues de ces gènes chez les invertébrés et chez les mammifères sont les kinases PKA (*pka1*⁺) et Akt/PKB et S6K1 (*sck2*⁺). Or, comme décrit précédemment (introduction III, 4.), ces gènes, ou des gènes dont les produits agissent dans la même voie, sont connus pour agir sur la longévité dans ces espèces. Donc, ces premiers résultats renforcent la fiabilité de l'utilisation du vieillissement chronologique de levure pour la compréhension du vieillissement des cellules des eucaryotes multicellulaires.

Par la suite, nous avons poussé plus loin l'étude de l'effet pro-vieillescence du glucose en étudiant le rôle de sa signalisation par le récepteur membranaire Git3 couplé à la protéine G (Gpa2) en amont de la kinase Pka1. La perte de ce signal par la délétion de Git3 imite partiellement l'effet d'augmentation de longévité suite à la baisse de la concentration en glucose dans le milieu. Par ailleurs, l'effet létal du signal du glucose est maintenu en absence de tout métabolisme du glucose suite à la mutation des hexokinases, premières enzymes de la glycolyse. Ensemble, ces résultats suggèrent que la signalisation du sucre est

prédominante sur son métabolisme pour son effet pro-vieillessement. Nous avons observé qu'à la fois la suppression de cette signalisation et la baisse de sucre disponible accroissent la longévité en corrélation avec une augmentation de la résistance au stress, de l'activité mitochondriale et une chute de la production de ROS. Enfin, le criblage d'une banque de surexpression d'ADNc a permis d'identifier plusieurs gènes qui seraient responsables ou partiellement responsables d'un effet anti-vieillessement inhibé par Git3/PKA.

En ce qui concerne les invertébrés, une étude a déjà souligné l'effet pro-vieillessement du glucose chez le vers et propose que l'effet est lié à la respiration mitochondriale et au stress oxydatif (Schulz et al., 2007). Chez les mammifères, comme la souris et le rat, la signalisation de l'insuline (hormone glycémique) et des hormones liées à l'insuline comme IGF régulent aussi la durée de vie (Longo et Finch, 2003; Vijg et Campisi, 2008). Enfin, chez les humains un régime à fort indice glycémique augmente l'incidence du diabète de type 2 et des affections cardiovasculaires (Aston, 2006; Venn et Green, 2007), deux maladies dont le vieillissement est le principal facteur déclencheur (Everitt et Le Couteur, 2007; Kenyon, 2005). L'âge avancé est aussi la première cause d'apparition de nombreuses autres maladies comme les cancers, les maladies cardiovasculaires et métaboliques ou les maladies neurodégénératives tels que les syndromes d'Alzheimer et de Parkinson. Les homologues chez les humains des protéines impliquées dans les mécanismes du vieillissement chez les levures et les invertébrés représentent autant de cible pour traiter ou prévenir ces affections comme le suggèrent déjà plusieurs études (Milne et al., 2007; Pinkston et al., 2006; Raffaghello et al., 2008). La recherche sur les mécanismes moléculaires du vieillissement représente une approche originale pour la compréhension des fonctions cellulaires affectées dans ces pathologies ; elle représente aussi un nouvel élan pour mieux cerner les conditions à réunir pour prévenir les maladies et maintenir une bonne santé générale le plus longtemps.

Reste que pour ceux qui voient la recherche scientifique comme un nouveau Graal pour atteindre l'immortalité, il va leur falloir patienter longtemps encore car le vieillissement est inscrit dans nos gènes et pourrait être une partie indispensable de notre constitution. Et en attendant, démystifier la mort peut se faire en chantant Jacques Brel,

Ou terminer sa course
La nuit de ses cents ans
Vieillard tonitruant
Soulevant par quelques femmes
Clouant à la Grande Ourse
Cracher sa dernière dent
En chantant "Amsterdam"
Mourir cela n'est rien
Mourir la belle affaire
Mais vieillir... ah vieillir !

« Vieillir », Album : *Brel*. Année : 1977

Bibliographie

- Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M., and Nystrom, T. (2003). Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science* 299, 1751-1753.
- Allen, C., Buttner, S., Aragon, A. D., Thomas, J. A., Meirelles, O., Jaetao, J. E., Benn, D., Ruby, S. W., Veenhuis, M., Madeo, F., and Werner-Washburne, M. (2006). Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures. *J Cell Biol* 174, 89-100.
- Amodeo, G. A., Rudolph, M. J., and Tong, L. (2007). Crystal structure of the heterotrimer core of *Saccharomyces cerevisiae* AMPK homologue SNF1. *Nature* 449, 492-495.
- Anderson, R. M., Bitterman, K. J., Wood, J. G., Medvedik, O., and Sinclair, D. A. (2003a). Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 423, 181-185.
- Anderson, R. M., Latorre-Esteves, M., Neves, A. R., Lavu, S., Medvedik, O., Taylor, C., Howitz, K. T., Santos, H., and Sinclair, D. A. (2003b). Yeast Life-Span Extension by Calorie Restriction Is Independent of NAD Fluctuation. *Science* 302, 2124-2126.
- Anderson, R. M., Shanmuganayagan, D., and Weindruch, R. (2008). Caloric Restriction and Aging: Studies in Mice and Monkeys. *Toxicol Pathol*, 0192623308329476.
- Arantes-Oliveira, N., Berman, J. R., and Kenyon, C. (2003). Healthy Animals with Extreme Longevity. *Science* 302, 611-.
- Aravind, L., Watanabe, H., Lipman, D. J., and Koonin, E. V. (2000). Lineage-specific loss and divergence of functionally linked genes in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 11319-11324.
- Ashrafi, K., Sinclair, D., Gordon, J. I., and Guarente, L. (1999). Passage through stationary phase advances replicative aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 9100-9105.
- Aston, L. M. (2006). Glycaemic index and metabolic disease risk. *Proc Nutr Soc* 65, 125-134.

- Avila, M., Velasco, J., Smulson, M., Dritschilo, A., Castro, R., and Notario, V. (1994). Functional expression of human poly(ADP-ribose) polymerase in *Schizosaccharomyces pombe* results in mitotic delay at G1, increased mutation rate, and sensitization to radiation. *Yeast* 10, 1003-1017.
- Barker, M., and Walmsley, R. (1999). Replicative ageing in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 15, 1511-1518.
- Barker, M. G., Brimage, L. J. E., and Smart, K. A. (1999). Effect of Cu,Zn superoxide dismutase disruption mutation on replicative senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* 177, 199-204.
- Barros, M. H., Bandy, B., Tahara, E. B., and Kowaltowski, A. J. (2004). Higher Respiratory Activity Decreases Mitochondrial Reactive Oxygen Release and Increases Life Span in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279, 49883-49888.
- Berlett, B. S., and Stadtman, E. R. (1997). Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *J Biol Chem* 272, 20313-20316.
- Bertram, P. G., Choi, J. H., Carvalho, J., Chan, T.-F., Ai, W., and Zheng, X. F. S. (2002). Convergence of TOR-Nitrogen and Snf1-Glucose Signaling Pathways onto Gln3. *Mol Cell Biol* 22, 1246-1252.
- Binstock, R. H. (2004). Anti-Aging Medicine: The History: Anti-Aging Medicine and Research: A Realm of Conflict and Profound Societal Implications. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 59, B523-533.
- Blagosklonny, M. V. (2008). Aging: ROS or TOR. *Cell cycle* 7, 3344 - 3354.
- Bonawitz, N. D., Chatenay-Lapointe, M., Pan, Y., and Shadel, G. S. (2007). Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression. *Cell Metab* 5, 265-277.
- Bonawitz, N. D., Rodeheffer, M. S., and Shadel, G. S. (2006). Defective Mitochondrial Gene Expression Results in Reactive Oxygen Species-Mediated Inhibition of Respiration and Reduction of Yeast Life Span. *Mol Cell Biol* 26, 4818-4829.
- Boubekeur, S., Camougrand, N., Bunoust, O., Rigoulet, M., and Guérin, B. (2001). Participation of acetaldehyde dehydrogenases in ethanol and pyruvate metabolism of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* 268, 5057-5065.

Boy-Marcotte, E., Perrot, M., Bussereau, F., Boucherie, H., and Jacquet, M. (1998). Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* *180*, 1044 - 1052.

Brauer, M. J., Saldanha, A. J., Dolinski, K., and Botstein, D. (2005). Homeostatic Adjustment and Metabolic Remodeling in Glucose-limited Yeast Cultures. *Mol Biol Cell* *16*, 2503-2517.

Brisson, D., Vohl, M.-C., St-Pierre, J., Hudson, T. J., and Gaudet, D. (2001). Glycerol: a neglected variable in metabolic processes? *BioEssays* *23*, 534-542.

Brys, K., Vanfleteren, J. R., and Braeckman, B. P. (2007). Testing the rate-of-living/oxidative damage theory of aging in the nematode model *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology* *42*, 845-851.

Burtner, C. R., Murakami, C. J., Kennedy, B. K., and Kaerberlein, M. (2009). A molecular mechanism of chronological aging in yeast. *Cell cycle* *8*, 1-15.

Buttner, S., Eisenberg, T., Herker, E., Carmona-Gutierrez, D., Kroemer, G., and Madeo, F. (2006). Why yeast cells can undergo apoptosis: death in times of peace, love, and war. *J Cell Biol* *175*, 521-525.

Cameroni, E., Hulo, N., Roosen, J., Winderickx, J., and De Virgilio, C. (2004). The Novel Yeast PAS Kinase Rim15 Orchestrates G0-Associated Antioxidant Defense Mechanisms *Cell cycle* *3*.

Campo, M. L., Kinnally, K. W., and Tedeschi, H. (1992). The effect of antimycin A on mouse liver inner mitochondrial membrane channel activity. *J Biol Chem* *267*, 8123-8127.

Carmona-Gutierrez, D., and Madeo, F. (2006). Yeast Unravels Epigenetic Apoptosis Control: Deadly Chat within a Histone Tail. *Molecular Cell* *24*, 167-169.

Caspari, T. (1997). Onset of gluconate-H⁺ symport in *Schizosaccharomyces pombe* is regulated by the kinases Wis1 and Pka1, and requires the *gti1+* gene product. *J Cell Sci* *110*, 2599-2608.

Chen, D., Toone, W. M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., and Bahler, J. (2003). Global Transcriptional Responses of Fission Yeast to Environmental Stress. *Mol Biol Cell* *14*, 214-229.

Chen, J., and Powers, T. (2006). Coordinate regulation of multiple and distinct biosynthetic pathways by TOR and PKA kinases in *S. cerevisiae*. *Current Genetics* *49*, 281-293.

- Chen, J., Sun, J., and Jazwinski, S. (1990). Prolongation of the yeast life span by the v-Ha-RAS oncogene. *Molecular Microbiology* 4, 2081-2086.
- Cheng, C., Fabrizio, P., Ge, H., Longo, V., and Li, L. (2007). Inference of transcription modification in long-live yeast strains from their expression profiles. *BMC Genomics* 8, 219.
- Chiron, S., Gaisne, M., Guillou, E., Belenguer, P., Clark-Walker, G. D., and Bonnefoy, N. (2007). Studying Mitochondria in an Attractive Model: *Schizosaccharomyces pombe*, In *Mitochondria*, pp. 91-105.
- Chu, Z., Li, J., Eshaghi, M., Karuturi, R. K., Lin, K., and Liu, J. (2007). Adaptive expression responses in the Pol-gamma null strain of *S. pombe* depleted of mitochondrial genome. *BMC Genomics* 8, 323.
- Chung, K.-S., Won, M., Lee, S.-B., Jang, Y.-J., Hoe, K.-L., Kim, D.-U., Lee, J.-W., Kim, K.-W., and Yoo, H.-S. (2001). Isolation of a Novel Gene from *Schizosaccharomyces pombe*: *stm1+* Encoding a Seven-transmembrane Loop Protein That May Couple with the Heterotrimeric Galpha 2 Protein, Gpa2. *J Biol Chem* 276, 40190-40201.
- Consortium international (1997). The Yeast Genome Directory. *Nature* 387, 1-105.
- Couzin, J. (2004). SCIENTIFIC COMMUNITY: Aging Research's Family Feud. *Science* 303, 1276-1279.
- Crichton, P. G., Affourtit, C., and Moore, A. L. (2007). Identification of a mitochondrial alcohol dehydrogenase in *Schizosaccharomyces pombe*: new insights into energy metabolism. *Biochem J* 401, 459-464.
- de Grey, A. D. N. J. (2008). Consolidating the Mission to Defeat Aging: A Big Step Forward. *Rejuvenation Research* 11, 1061-1063.
- Degols, G., Shiozaki, K., and Russell, P. (1996). Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 16, 2870-2877.
- Dell'Agnello, C., Leo, S., Agostino, A., Szabadkai, G., Tiveron, C., Zulian, A., Prella, A., Roubertoux, P., Rizzuto, R., and Zeviani, M. (2007). Increased longevity and refractoriness to Ca²⁺-dependent neurodegeneration in Surf1 knockout mice. *Hum Mol Genet* 16, 431-444.

- Dillin, A., Hsu, A.-L., Arantes-Oliveira, N., Lehrer-Graiwer, J., Hsin, H., Fraser, A. G., Kamath, R. S., Ahringer, J., and Kenyon, C. (2002). Rates of Behavior and Aging Specified by Mitochondrial Function During Development. *Science* 298, 2398-2401.
- Dilova, I., Easlon, E., and Lin, S. (2007). Calorie restriction and the nutrient sensing signaling pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 64, 752-767.
- Doonan, R., McElwee, J. J., Matthijssens, F., Walker, G. A., Houthoofd, K., Back, P., Matscheski, A., Vanfleteren, J. R., and Gems, D. (2008). Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans*. *Genes & Development* 22, 3236-3241.
- Dragan, C.-A., Blank, L. M., and Bureik, M. (2006). Increased TCA cycle activity and reduced oxygen consumption during cytochrome P450-dependent biotransformation in fission yeast. *Yeast* 23, 779-794.
- Du, L., Yu, Y., Chen, J., Liu, Y., Xia, Y., Chen, Q., and Liu, X. (2007). Arsenic induces caspase- and mitochondria-mediated apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 7, 860-865.
- Easlon, E., Tsang, F., Dilova, I., Wang, C., Lu, S.-P., Skinner, C., and Lin, S.-J. (2007). The Dihydrolipoamide Acetyltransferase Is a Novel Metabolic Longevity Factor and Is Required for Calorie Restriction-mediated Life Span Extension. *J Biol Chem* 282, 6161-6171.
- Editorial *Cell journal* (2005). Aging Research Comes of Age. *Cell* 120, 435-435.
- Eisenberg, T., Büttner, S., Kroemer, G., and Madeo, F. (2007). The mitochondrial pathway in yeast apoptosis. *Apoptosis* 12, 1011-1023.
- Elbe, R. (1992). A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *biotechniques* 13, 19-19.
- Epstein, C. B., Waddle, J. A., Hale, W. I. V., Dave, V., Thornton, J., Macatee, T. L., Garner, H. R., and Butow, R. A. (2001). Genome-wide Responses to Mitochondrial Dysfunction. *Mol Biol Cell* 12, 297-308.
- Erjavec, N., Cvijovic, M., Klipp, E., and Nystrom, T. (2008). Selective benefits of damage partitioning in unicellular systems and its effects on aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 18764-18769.

- Erjavec, N., Larsson, L., Grantham, J., and Nystrom, T. (2007). Accelerated aging and failure to segregate damaged proteins in Sir2 mutants can be suppressed by overproducing the protein aggregation-remodeling factor Hsp104p. *Genes Dev* 21, 2410-2421.
- Esser, K., and Keller, W. (1976). Genes inhibiting senescence in the ascomycete *Podospira anserina*. *Mol Gen Genet* 144, 107-110.
- Everitt, A. V., and Le Couteur, D. G. (2007). Life Extension by Calorie Restriction in Humans. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1114, 428-433.
- Fabrizio, P., Battistella, L., Vardavas, R., Gattazzo, C., Liou, L.-L., Diaspro, A., Dossen, J. W., Gralla, E. B., and Longo, V. D. (2004a). Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 166, 1055-1067.
- Fabrizio, P., Gattazzo, C., Battistella, L., Wei, M., Cheng, C., McGrew, K., and Longo, V. D. (2005). Sir2 Blocks Extreme Life-Span Extension. *Cell* 123, 655-667.
- Fabrizio, P., Liou, L. L., Moy, V. N., Diaspro, A., SelverstoneValentine, J., Gralla, E. B., and Longo, V. D. (2003). SOD2 functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast. *Genetics* 163, 35 - 46.
- Fabrizio, P., and Longo, V. D. (2003). The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* 2, 73-81.
- Fabrizio, P., Pletcher, S. D., Minois, N., Vaupel, J. W., and Longo, V. D. (2004b). Chronological aging-independent replicative life span regulation by Msn2/Msn4 and Sod2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 557, 136 - 142.
- Fabrizio, P., Pozza, F., Pletcher, S. D., Gendron, C. M., and Longo, V. D. (2001). Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* 292, 288 - 290.
- Favre, C., Aguilar, P. S., and Carrillo, M. C. (2008). Oxidative stress and chronological aging in glycogen-phosphorylase-deleted yeast. *Free Radical Biology and Medicine* 45, 1446-1456.
- Felkai, S., Ewbank, J. J., Lemieux, J., Labbe, J. C., Brown, G. G., and Hekimi, S. (1999). CLK-1 controls respiration, behavior and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 18, 1783-1792.
- Ferbeyre, G., and Lowe, S. W. (2002). Ageing: The price of tumour suppression? *Nature* 415, 26-27.

Fernández, J., Soto, T., Franco, A., Vicente-Soler, J., Cansado, J., and Gacto, M. (1998). Enhancement of Neutral Trehalase Activity by Oxidative Stress in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Fungal Genetics and Biology* 25, 79-86.

Fernández, J., Soto, T., Vicente-Soler, J., Cansado, J., and Gacto, M. (1997). Heat-shock response in *Schizosaccharomyces pombe* cells lacking cyclic AMP-dependent phosphorylation. *Current Genetics* 31, 112-118.

Flores, C.-L., Rodríguez, C., Petit, T., and Gancedo, C. (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 507-529.

Forsburg, S. (1995). PombeNet at The Forsburg Lab. <http://www-rcf.usc.edu/~forsburg/index.html>.

Forsburg, S. (2005). The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: models for cell biology research. *Gravit Space Biol Bull* 18, 3-9.

Francis, B., White, K., and Thorsness, P. (2007). Mutations in the Atp1p and Atp3p subunits of yeast ATP synthase differentially affect respiration and fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 39, 127-144.

Fu, X.-H., Meng, F.-L., Hu, Y., and Zhou, J.-Q. (2008). *Candida albicans* a distinctive fungal model for cellular aging study. *Aging Cell* 7, 746-757.

Fujita, M., and Yamamoto, M. (1998). *S. pombe* *sck2+*, a second homologue of *S. cerevisiae* SCH9 in fission yeast, encodes a putative protein kinase closely related to PKA in function. *Current Genetics* 33, 248-254.

Fujita, Y., Mita, S., Ohtsuka, H., and Aiba, H. (2007). Identification of a Fatty Acyl-CoA Synthetase Gene, *lcf2+*, Which Affects Viability after Entry into the Stationary Phase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71, 3041-3047.

Gems, D., and Partridge, L. (2008). Stress-Response Hormesis and Aging: "That which Does Not Kill Us Makes Us Stronger". *Cell Metabolism* 7, 200-203.

Goldar, M. M., Nishie, T., Ishikura, Y., Fukuda, T., Takegawa, K., and Kawamukai, M. (2005). Functional Conservation between Fission Yeast *moc1/sds23* and Its Two Orthologs, Budding Yeast *SDS23* and *SDS24*, and Phenotypic Differences in Their Disruptants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69, 1422-1426.

- Gomes, P., Sampaio-Marques, B., Ludovico, P., Rodrigues, F., and Leão, C. (2007). Low auxotrophy-complementing amino acid concentrations reduce yeast chronological life span. *Mechanisms of Ageing and Development* *128*, 383-391.
- Gorner, W., Durchschlag, E., Martinez-Pastor, M. T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., Ruis, H., and Schuller, C. (1998). Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev* *12*, 586 - 597.
- Gourlay, C. W., Carpp, L. N., Timpson, P., Winder, S. J., and Ayscough, K. R. (2004). A role for the actin cytoskeleton in cell death and aging in yeast. *J Cell Biol* *164*, 803-809.
- Greer, E. L., Dowlatshahi, D., Banko, M. R., Villen, J., Hoang, K., Blanchard, D., Gygi, S. P., and Brunet, A. (2007). An AMPK-FOXO Pathway Mediates Longevity Induced by a Novel Method of Dietary Restriction in *C. elegans*. *Current Biology* *17*, 1646-1656.
- Grifantini, K. (2008). Understanding Pathways of Calorie Restriction: A Way To Prevent Cancer? *J Natl Cancer Inst* *100*, 619-621.
- Guerin, R., Arseneault, G., Dumont, S., and Rokeach, L. A. (2008). Calnexin Is Involved in Apoptosis Induced by Endoplasmic Reticulum Stress in the Fission Yeast. *Mol Biol Cell* *19*, 4404-4420.
- Haffter, P., and Fox, T. D. (1992). Nuclear Mutations in the Petite-Negative Yeast *Schizosaccharomyces pombe* Allow Growth of Cells Lacking Mitochondrial DNA. *Genetics* *131*, 255-260.
- Hansen, M., Chandra, A., Mitic, L. L., Onken, B., Driscoll, M., and Kenyon, C. (2008). A Role for Autophagy in the Extension of Lifespan by Dietary Restriction in *C. elegans*. *PLoS Genet* *4*, e24.
- Hao, Z., Furunobu, A., Nagata, A., and Okayama, H. (1997). A zinc finger protein required for stationary phase viability in fission yeast. *J Cell Sci* *110*, 2557-2566.
- Harkness, T. A. A., Shea, K. A., Legrand, C., Brahmania, M., and Davies, G. F. (2004). A Functional Analysis Reveals Dependence on the Anaphase-Promoting Complex for Prolonged Life Span in Yeast. *Genetics* *168*, 759-774.
- Harman, D. (1956). A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* *11*, 298-300.
- Harper, J. W., Burton, J. L., and Solomon, M. J. (2002). The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes & Development* *16*, 2179-2206.

- Harris, N., Bachler, M., Costa, V., Mollapour, M., Moradas-Ferreira, P., and Piper, P. W. (2005). Overexpressed Sod1p acts either to reduce or to increase the lifespans and stress resistance of yeast, depending on whether it is Cu²⁺-deficient or an active Cu,Zn-superoxide dismutase. *Aging Cell* 4, 41-52.
- Harris, N., Costa, V., MacLean, M., Mollapour, M., Moradas-Ferreira, P., and Piper, P. W. (2003). Mnsod overexpression extends the yeast chronological (G0) life span but acts independently of Sir2p histone deacetylase to shorten the replicative life span of dividing cells. *Free Radical Biology and Medicine* 34, 1599-1606.
- Harris, N., MacLean, M., Hatzianthis, K., Panaretou, B., and Piper, P. (2001). Increasing *Saccharomyces cerevisiae* stress resistance, through the overactivation of the heat shock response resulting from defects in the Hsp90 chaperone, does not extend replicative life span but can be associated with slower chronological ageing of nondividing cells. *Molecular Genetics and Genomics* 265, 258-263.
- Hauptmann, P., and Lehle, L. (2008). Kex1 Protease Is Involved in Yeast Cell Death Induced by Defective N-Glycosylation, Acetic Acid, and Chronological Aging. *J Biol Chem* 283, 19151-19163.
- Hayashi, T., Hatanaka, M., Nagao, K., Nakaseko, Y., Kanoh, J., Kokubu, A., Ebe, M., and Yanagida, M. (2007). Rapamycin sensitivity of the *Schizosaccharomyces pombe tor2* mutant and organization of two highly phosphorylated TOR complexes by specific and common subunits. *Genes to Cells* 12, 1357-1370.
- Heiland, S., Radovanovic, N., Hofer, M., Winderickx, J., and Lichtenberg, H. (2000). Multiple Hexose Transporters of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* 182, 2153-2162.
- Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K. A., Maldener, C., Frohlich, K.-U., Wissing, S., Buttner, S., Fehr, M., Sigrist, S., and Madeo, F. (2004). Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 164, 501-507.
- Herman, P. K. (2002). Stationary phase in yeast. *Current Opinion in Microbiology* 5, 602-607.
- Heslot, H., Goffeau, A., and Louis, C. (1970). Respiratory Metabolism of a "Petite Negative" Yeast *Schizosaccharomyces pombe* 972h. *J Bacteriol* 104, 473-481.
- Hoffman, C., and Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Genes*, 267-272.

Hoffman, C. S. (2005a). Except in Every Detail: Comparing and Contrasting G-Protein Signaling in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell* 4, 495-503.

Hoffman, C. S. (2005b). Glucose sensing via the protein kinase A pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Soc Trans* 33, 257-260.

Hohmann, S., and Cederberg, H. (1990). Autoregulation may control the expression of yeast pyruvate decarboxylase structural genes *PDC1* and *PDC5*. *European Journal of Biochemistry* 188, 615-621.

Ivey, F. D., and Hoffman, C. S. (2005). Direct activation of fission yeast adenylate cyclase by the Gpa2 Galpha of the glucose signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 6108-6113.

Jakubowski, W., Bilinski, T., and Bartosz, G. (2000). Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Biology and Medicine* 28, 659-664.

Jara, M., Vivancos, A. P., Calvo, I. A., Moldon, A., Sanso, M., and Hidalgo, E. (2007). The Peroxiredoxin Tpx1 Is Essential as a H₂O₂ Scavenger during Aerobic Growth in Fission Yeast. *Mol Biol Cell* 18, 2288-2295.

Jazwinski, S., Chen, J., and Sun, J. (1993). A single gene change can extend yeast life span: the role of Ras in cellular senescence. *Adv Exp Med Biol* 330, 45-53.

Jazwinski, S. M. (1990). Aging and senescence of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 4, 337-343.

Jazwinski, S. M. (2005). Rtg2 protein: At the nexus of yeast longevity and aging. *FEMS Yeast Research* 5, 1253-1259.

Jiang, J. C., Jaruga, E., Repnevskaya, M. V., and Jazwinski, S. M. (2000). An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. *FASEB J*, 00-0242fje.

Jin, M., Fujita, M., Culley, B. M., Apolinario, E., Yamamoto, M., Maundrell, K., and Hoffman, C. S. (1995). *sck1*, a High Copy Number Suppressor of Defects in the cAMP-Dependent Protein Kinase Pathway in Fission Yeast, Encodes a Protein Homologous to the *Saccharomyces cerevisiae* SCH9 Kinase. *Genetics* 140, 457-467.

Kaeberlein, M., Burtner, C. R., and Kennedy, B. K. (2007). Recent Developments in Yeast Aging. *PLoS Genetics* 3, e84.

- Kaeberlein, M., Hu, D., Kerr, E. O., Tsuchiya, M., Westman, E. A., Dang, N., Fields, S., and Kennedy, B. K. (2005a). Increased Life Span due to Calorie Restriction in Respiratory-Deficient Yeast. *PLoS Genetics* *1*, e69.
- Kaeberlein, M., and Kennedy, B. K. (2005). Large-scale identification in yeast of conserved ageing genes. *Mechanisms of Ageing and Development* *126*, 17-21.
- Kaeberlein, M., and Kennedy, B. K. (2007). Protein translation, 2007. *Aging Cell* *6*, 731-734.
- Kaeberlein, M., and Kennedy, B. K. (2008). Protein translation, 2008. *Aging Cell* *7*, 777-782.
- Kaeberlein, M., Kirkland, K. T., Fields, S., and Kennedy, B. K. (2005b). Genes determining yeast replicative life span in a long-lived genetic background. *Mechanisms of Ageing and Development* *126*, 491-504.
- Kaeberlein, M., Powers, R. W., III, Steffen, K. K., Westman, E. A., Hu, D., Dang, N., Kerr, E. O., Kirkland, K. T., Fields, S., and Kennedy, B. K. (2005c). Regulation of Yeast Replicative Life Span by TOR and Sch9 in Response to Nutrients. *Science* *310*, 1193-1196.
- Kawamukai, M. (1999). Isolation of a novel gene, *moc2*, encoding a putative RNA helicase as a suppressor of sterile strains in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* *1446*, 93-101.
- Kennedy, B., Steffen, K., and Kaeberlein, M. (2007). Ruminations on dietary restriction and aging. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* *64*, 1323-1328.
- Kennedy, B. K., Austriaco, N. R., Jr., and Guarente, L. (1994). Daughter cells of *Saccharomyces cerevisiae* from old mothers display a reduced life span. *J Cell Biol* *127*, 1985-1993.
- Kennedy, B. K., Austriaco, N. R., Zhang, J., and Guarente, L. (1995). Mutation in the silencing gene *S/R4* can delay aging in *S. cerevisiae*. *Cell* *80*, 485-496.
- Kenyon, C. (2005). The Plasticity of Aging: Insights from Long-Lived Mutants. *Cell* *120*, 449-460.
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., and Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* *366*, 461-464.

- Kim, S., Ohkuni, K., Couplan, E., and Jazwinski, S. (2004). The histone acetyltransferase GCN5 modulates the retrograde response and genome stability determining yeast longevity. *Biogerontology* 5, 305-316.
- Kirchman, P. A., Kim, S., Lai, C.-Y., and Jazwinski, S. M. (1999). Interorganelle Signaling Is a Determinant of Longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 152, 179-190.
- Kirkwood, T. B. (2005). Understanding the odd science of aging. *Cell* 120, 437-447.
- Kunitomo, H., Higuchi, T., Iino, Y., and Yamamoto, M. (2000). A Zinc-Finger Protein, Rst2p, Regulates Transcription of the Fission Yeast *ste11+* Gene, Which Encodes a Pivotal Transcription Factor for Sexual Development. *Mol Biol Cell* 11, 3205-3217.
- La Génèse (5)24-27, chapitre 5, versets 25-27, Ancien Testament de la Bible
- Lamming, D. W., Latorre-Esteves, M., Medvedik, O., Wong, S. N., Tsang, F. A., Wang, C., Lin, S.-J., and Sinclair, D. A. (2005). HST2 Mediates SIR2-Independent Life-Span Extension by Calorie Restriction. *Science* 309, 1861-1864.
- Landry, S., and Hoffman, C. S. (2001). The *git5* G-beta and *git11* G-gamma Form an Atypical G-beta-gamma Dimer Acting in the Fission Yeast Glucose/cAMP Pathway. *Genetics* 157, 1159-1168.
- Laun, P., Rinnerthaler, M., Bogengruber, E., Heeren, G., and Breitenbach, M. (2006). Yeast as a model for chronological and reproductive aging - A comparison. *Experimental Gerontology* 41, 1208-1212.
- Lavoie, H., and Whiteway, M. (2008). Increased Respiration in the *sch9(delta)* Mutant Is Required for Increasing Chronological Life Span but Not Replicative Life Span. *Eukaryotic Cell* 7, 1127-1135.
- Lawrence, C. L., Maekawa, H., Worthington, J. L., Reiter, W., Wilkinson, C. R. M., and Jones, N. (2007). Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* Atf1 Protein Levels by Sty1-mediated Phosphorylation and Heterodimerization with Pcr1. *J Biol Chem* 282, 5160-5170.
- Lee, J., Dawes, I. W., and Roe, J.-H. (1997). Isolation, Expression, and Regulation of the *pgr1+* Gene Encoding Glutathione Reductase Absolutely Required for the Growth of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 272, 23042-23049.
- Lewis, K. (2000). Programmed Death in Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 503-514.

- Li, W., Sun, L., Liang, Q., Wang, J., Mo, W., and Zhou, B. (2006). Yeast AMID Homologue Ndi1p Displays Respiration-restricted Apoptotic Activity and Is Involved in Chronological Aging. *Mol Biol Cell* *17*, 1802-1811.
- Li, Y., Xu, W., McBurney, M. W., and Longo, V. D. (2008). SirT1 Inhibition Reduces IGF-1/IRS-2/Ras/ERK1/2 Signaling and Protects Neurons. *Cell Metabolism* *8*, 38-48.
- Lieber, C. S. (2005). Metabolism of Alcohol. *Clinics in liver disease* *9*, 1-35.
- Lim, H., Kim, S., Park, E., and Lim, C. (2007). Overexpression of a metacaspase gene stimulates cell growth and stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Can J Microbiol* *53*, 1016-1023.
- Lin, S.-J., Defossez, P.-A., and Guarente, L. (2000). Requirement of NAD and SIR2 for Life-Span Extension by Calorie Restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* *289*, 2126-2128.
- Lin, S.-J., and Guarente, L. (2003). Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Current Opinion in Cell Biology* *15*, 241-246.
- Lin, S.-J., Kaeberlein, M., Andalis, A. A., Sturtz, L. A., Defossez, P.-A., Culotta, V. C., Fink, G. R., and Guarente, L. (2002). Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* *418*, 344-348.
- Liu, X., Jiang, N., Hughes, B., Bigras, E., Shoubridge, E., and Hekimi, S. (2005). Evolutionary conservation of the clk-1-dependent mechanism of longevity: loss of mclk1 increases cellular fitness and lifespan in mice. *Genes & Development* *19*, 2424-2434.
- Longo, V. D., and Finch, C. E. (2003). Evolutionary Medicine: From Dwarf Model Systems to Healthy Centenarians? *Science* *299*, 1342-1346.
- Longo, V. D., Gralla, E. B., and Valentine, J. S. (1996). Superoxide Dismutase Activity Is Essential for Stationary Phase Survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *271*, 12275-12280.
- Longo, V. D., Mitteldorf, J., and Skulachev, V. P. (2005). Programmed and altruistic ageing. *Nat Rev Genet* *6*, 866-872.
- Lorenz, M. C., and Fink, G. R. (2002). Life and Death in a Macrophage: Role of the Glyoxylate Cycle in Virulence. *Eukaryotic Cell* *1*, 657-662.

- Low, C. P., Liew, L. P., Pervaiz, S., and Yang, H. (2005). Apoptosis and lipopoptosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Research* 5, 1199-1206.
- Low, C. P., Shui, G., Liew, L. P., Buttner, S., Madeo, F., Dawes, I. W., Wenk, M. R., and Yang, H. (2008). Caspase-dependent and -independent lipotoxic cell-death pathways in fission yeast. *J Cell Sci* 121, 2671-2684.
- Low, C. P., and Yang, H. (2008). Programmed cell death in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1783, 1335-1349.
- Lum, P. Y., Edwards, S., and Wright, R. (1996). Molecular, functional and evolutionary characterization of the gene encoding HMG-CoA reductase in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 12, 1107-1124.
- MacLean, M. J., Aamodt, R., Harris, N., Alseth, I., Seeberg, E., Bjørås, M., and Piper, P. W. (2003). Base excision repair activities required for yeast to attain a full chronological life span. *Aging Cell* 2, 93-104.
- Madeo, F., Frohlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S. J., Wolf, D. H., and Frohlich, K.-U. (1999). Oxygen Stress: A Regulator of Apoptosis in Yeast. *J Cell Biol* 145, 757-767.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lächelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S. J., Wesselborg, S., and Fröhlich, K.-U. (2002). A Caspase-Related Protease Regulates Apoptosis in Yeast. *Mol Cell* 9, 911-917.
- Madeo, F., Herker, E., Wissing, S., Jungwirth, H., Eisenberg, T., and Fröhlich, K.-U. (2004). Apoptosis in yeast. *Current Opinion in Microbiology* 7, 655-660.
- Madia, F., Gattazzo, C., Fabrizio, P., and Longo, V. D. (2007). A simple model system for age-dependent DNA damage and cancer. *Mechanisms of Ageing and Development* 128, 45-49.
- Madia, F., Gattazzo, C., Wei, M., Fabrizio, P., Burhans, W. C., Weinberger, M., Galbani, A., Smith, J. R., Nguyen, C., Huey, S., *et al.* (2008). Longevity mutation in SCH9 prevents recombination errors and premature genomic instability in a Werner/Bloom model system. *J Cell Biol* 180, 67-81.
- Maeda, T., Watanabe, Y., Kunitomo, H., and Yamamoto, M. (1994). Cloning of the *pkal* gene encoding the catalytic subunit of the cAMP- dependent protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 269, 9632-9637.

Mair, W., and Dillin, A. (2008). Aging and survival: The genetics of life span extension by dietary restriction. *Annual Review of Biochemistry* 77, 727-754.

Mair, W., Piper, M. D. W., and Partridge, L. (2005). Calories Do Not Explain Extension of Life Span by Dietary Restriction in *Drosophila*. *PLoS Biology* 3, e223.

Maris Kuningas, S. P. M. D. v. H. B. J. Z. P. E. S. R. G. J. W. (2008). Genes encoding longevity: from model organisms to humans. *Aging Cell* 7, 270-280.

Marques, M., Mojzita, D., Amorim, M. A., Almeida, T., Hohmann, S., Moradas-Ferreira, P., and Costa, V. (2006). The Pep4p vacuolar proteinase contributes to the turnover of oxidized proteins but PEP4 overexpression is not sufficient to increase chronological lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 152, 3595-3605.

Matsuo, Y., Fisher, E., Patton-Vogt, J., and Marcus, S. (2007). Functional Characterization of the Fission Yeast Phosphatidylserine Synthase Gene, *pps1*, Reveals Novel Cellular Functions for Phosphatidylserine. *Eukaryotic Cell* 6, 2092-2101.

Matsuo, Y., McInnis, B., and Marcus, S. (2008). Regulation of the Subcellular Localization of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase in Response to Physiological Stresses and Sexual Differentiation in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell* 7, 1450-1459.

Mazzoni, C., Herker, E., Palermo, V., Jungwirth, H., Eisenberg, T., Madeo, F., and Falcone, C. (2005). Yeast caspase 1 links messenger RNA stability to apoptosis in yeast. *EMBO reports* 6, 1076-1081.

McCay, C. M., Crowell, M. F., and Maynard, L. A. (1935). The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *J Nutr* 10, 63-79.

Medawar, P. B. (1952). *An Unsolved Problem of Biology* (London).

Medvedik, O., Lamming, D. W., Kim, K. D., and Sinclair, D. A. (2007). MSN2 and MSN4 Link Calorie Restriction and TOR to Sirtuin-Mediated Lifespan Extension in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biology* 5, e261.

Migliaccio, E., Giorgio, M., Mele, S., Pelicci, G., Reboldi, P., Pandolfi, P. P., Lanfrancone, L., and Pelicci, P. G. (1999). The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* 402, 309-313.

Milne, J. C., Lambert, P. D., Schenk, S., Carney, D. P., Smith, J. J., Gagne, D. J., Jin, L., Boss, O., Perni, R. B., Vu, C. B., *et al.* (2007). Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* 450, 712-716.

Mitteldorf, J. (2006). How Evolutionary Thinking Affects People's Ideas About Aging Interventions. *Rejuvenation Research* 9, 346-350.

Mizuno, A., Tabei, H., and Iwahuti, M. (2006). Characterization of low-acetic-acid-producing yeast isolated from 2-deoxyglucose-resistant mutants and its application to high-gravity brewing. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101, 31-37.

Morigasaki, S., Shimada, K., Ikner, A., Yanagida, M., and Shiozaki, K. (2008). Glycolytic Enzyme GAPDH Promotes Peroxide Stress Signaling through Multistep Phosphorelay to a MAPK Cascade. *Mol Cell* 30, 108-113.

Mortimer, R. K., and Johnston, J. R. (1959). Life span of individual yeast cells. *Nature* 183, 1751 - 1752.

Muller, F. L., Lustgarten, M. S., Jang, Y., Richardson, A., and Van Remmen, H. (2007). Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology and Medicine* 43, 477-503.

Munkres, K., and Minssen, M. (1976). Ageing of *Neurospora crassa*. I. Evidence for the free radical theory of ageing from studies of a natural-death mutant. *Mech Ageing Dev* 5, 79-98.

Munkres, K. D., and Furtek, C. A. (1984). Linkage of conidial longevity determinant genes in *Neurospora crassa*. *Mechanisms of Ageing and Development* 25, 63-77.

Neely, L. A., and Hoffman, C. S. (2000). Protein Kinase A and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Antagonistically Regulate Fission Yeast *fbp1* Transcription by Employing Different Modes of Action at Two Upstream Activation Sites. *Mol Cell Biol* 20, 6426-6434.

Neiman, A. M. (2005). Ascospore Formation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 69, 565-584.

Oberdoerffer, P., Michan, S., McVay, M., Mostoslavsky, R., Vann, J., Park, S.-K., Hartlerode, A., Stegmuller, J., Hafner, A., Loerch, P., *et al.* (2008). SIRT1 Redistribution on Chromatin Promotes Genomic Stability but Alters Gene Expression during Aging. *Cell* 135, 907-918.

Obrig, T. G., and Gottlieb, D. (1970). In Vitro Protein Synthesis and Aging in *Rhizoctonia solani*. *J Bacteriol* 101, 755-762.

- Ohtsuka, H., Mita, S., Ogawa, Y., Azuma, K., Ito, H., and Aiba, H. (2008). A novel gene, *ecf1*⁺, extends the chronological lifespan in fission yeast. *FEMS Yeast Research* 8, 520-530.
- Oliveira, G., Tahara, E., Gombert, A., Barros, M., and Kowaltowski, A. (2008). Increased aerobic metabolism is essential for the beneficial effects of caloric restriction on yeast life span. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 40, 381-388.
- Orentreich, N., Matias, J. R., DeFelice, A., and Zimmerman, J. A. (1993). Low Methionine Ingestion by Rats Extends Life Span. *J Nutr* 123, 269-274.
- Oshiro, T., Aiba, H., and Mizuno, T. (2003). A defect in a fatty acyl-CoA synthetase gene, *lcf1*⁺, results in a decrease in viability after entry into the stationary phase in fission yeast. *Molecular Genetics and Genomics* 269, 437-442.
- Osiewacz, H. D. (1997). Genetic regulation of aging. *Journal of Molecular Medicine* 75, 715-727.
- Osório, H., Silles, E., Maia, R., Peleteiro, B., Moradas-Ferreira, P., Günther Sillero, M. A., and Sillero, A. (2005). Influence of chronological aging on the survival and nucleotide content of *Saccharomyces cerevisiae* cells grown in different conditions: occurrence of a high concentration of UDP-*N*-acetylglucosamine in stationary cells grown in 2% glucose. *FEMS Yeast Research* 5, 387-398.
- Otsubo, Y., and Yamamoto, M. (2008). TOR Signaling in Fission Yeast. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 43, 277 - 283.
- Palková, Z., and Váchová, L. e. (2006). Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiology Reviews* 30, 806-824.
- Paredes, V., Franco, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Gacto, M., and Cansado, J. (2003). Different roles for the stress-activated protein kinase pathway in the regulation of trehalose metabolism in *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology* 149, 1745-1752.
- Parodi, A. J. (1999). Reglucosylation of glycoproteins and quality control of glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum of yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1426, 287-295.
- Payne, J. L., Boyer, A. G., Brown, J. H., Finnegan, S., Kowalewski, M., Krause, R. A., Lyons, S. K., McClain, C. R., McShea, D. W., Novack-Gottshall, P. M., *et al.* (2009). Two-phase increase in the maximum size of life over 3.5 billion years reflects biological innovation and environmental opportunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 24-27.

- Paz, I., and Choder, M. (2001). Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-Dependent Translation Is Not Essential for Survival of Starved Yeast Cells. *J Bacteriol* *183*, 4477-4483.
- Peck, V. M., Fuge, E. K., Padilla, P. A., Gomez, M. A., and Werner-Washburne, M. (1997). Yeast *bcy1* mutants with stationary phase-specific defects. *Current Genetics* *32*, 83-92.
- Perrone, G. G., Tan, S.-X., and Dawes, I. W. (2008). Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1783*, 1354-1368.
- Petit, T., Blazquez, M. A., and Gancedo, C. (1996). *Schizosaccharomyces pombe* possesses an unusual and a conventional hexokinase: biochemical and molecular characterization of both hexokinases. *FEBS Letters* *378*, 185-189.
- Pinkston, J. M., Garigan, D., Hansen, M., and Kenyon, C. (2006). Mutations That Increase the Life Span of *C. elegans* Inhibit Tumor Growth. *Science* *313*, 971-975.
- Piper, M. D. W., and Bartke, A. (2008). Diet and Aging. *Cell Metabolism* *8*, 99-104.
- Piper, P. W. (2006). Long-lived yeast as a model for ageing research. *Yeast* *23*, 215-226.
- Piper, P. W., Harris, N. L., and MacLean, M. (2006). Preadaptation to efficient respiratory maintenance is essential both for maximal longevity and the retention of replicative potential in chronologically ageing yeast. *Mechanisms of Ageing and Development* *127*, 733-740.
- Plyte, S. E., Feoktistova, A., Burke, J. D., Woodgett, J. R., and Gould, K. L. (1996). *Schizosaccharomyces pombe* *skp1+* encodes a protein kinase related to mammalian glycogen synthase kinase 3 and complements a *cdc14* cytokinesis mutant [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 1997 Mar;17(3):1756]. *Mol Cell Biol* *16*, 179-191.
- Powers, R. W., Kaeberlein, M., Caldwell, S. D., Kennedy, B. K., and Fields, S. (2006). Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes & Development* *20*, 174-184.
- Powers, T. (2007). TOR Signaling and S6 Kinase 1: Yeast Catches Up. *Ageing Res Rev* *6*, 1-2.
- Pronk, J. T., Steensma, H. Y., and Van Dijken, J. P. (1996). Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *12*, 1607-1633.

- Proshkin, S. A., and Shpakovski, G. V. (2004). Heterologous overexpression and purification of four common subunits of nuclear RNA polymerases I, II and III of *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Chromatography B* *800*, 121-126.
- Qin, H., and Lu, M. (2006). Natural variation in replicative and chronological life spans of *Saccharomyces cerevisiae*. *Experimental Gerontology* *41*, 448-456.
- Raffaghello, L., Lee, C., Safdie, F. M., Wei, M., Madia, F., Bianchi, G., and Longo, V. D. (2008). Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 8215-8220.
- Reverter-Branchat, G., Cabiscol, E., Tamarit, J., and Ros, J. (2004). Oxidative Damage to Specific Proteins in Replicative and Chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*: COMMON TARGETS AND PREVENTION BY CALORIE RESTRICTION. *J Biol Chem* *279*, 31983-31989.
- Reverter-Branchat, G., Cabiscol, E., Tamarit, J., Sorolla, M. A., Angeles de la Torre, M., and Ros, J. (2007). Chronological and replicative life-span extension in *Saccharomyces cerevisiae* by increased dosage of alcohol dehydrogenase 1. *Microbiology* *153*, 3667-3676.
- Risa, M., Ryoichi, S., Yoshihisa, O., and Makoto, K. (2008). Comparison of a *coq7* deletion mutant with other respiration-defective mutants in fission yeast. *FEBS Journal* *275*, 5309-5324.
- Rohde, J. R., Bastidas, R., Puria, R., and Cardenas, M. E. (2008). Nutritional control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Opinion in Microbiology* *11*, 153-160.
- Rollanda, F., Winderickx, J., and Thevelein, J. M. (2002). Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research* *2*, 183-201.
- Roosen, J., Engelen, K., Marchal, K., Mathys, J., Griffioen, G., Cameroni, E., Thevelein, J. M., De Virgilio, C., De Moor, B., and Winderickx, J. (2005a). PKA and Sch9 control a molecular switch important for the proper adaptation to nutrient availability. *Molecular Microbiology* *55*, 862-880.
- Roosen, J., Engelen, K., Marchal, K., Mathys, J., Griffioen, G., Cameroni, E., Thevelein, J. M., De Virgilio, C., De Moor, B., and Winderickx, J. (2005b). PKA and Sch9 control a molecular switch important for the proper adaptation to nutrient availability. *Mol Microbiol* *55*, 862 - 880.

- Roussou, I., and Draetta, G. (1994). The *Schizosaccharomyces pombe* casein kinase II alpha and beta subunits: evolutionary conservation and positive role of the beta subunit. *Mol Cell Biol* *14*, 576-586.
- Ruckenstuhl, C., Büttner, S., Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Kroemer, G., Sigrist, S. J., Frühlich, K.-U., and Madeo, F. (2009). The Warburg Effect Suppresses Oxidative Stress Induced Apoptosis in a Yeast Model for Cancer. *PLoS ONE* *4*, e4592.
- Samokhvalov, V., Ignatov, V., and Kondrashova, M. (2004). Inhibition of Krebs cycle and activation of glyoxylate cycle in the course of chronological aging of *Saccharomyces cerevisiae*. Compensatory role of succinate oxidation. *Biochimie* *86*, 39-46.
- Santangelo, G. M. (2006). Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* *70*, 253-282.
- Scheckhuber, C., and Osiewacz, H. (2008). *Podospora anserina* : a model organism to study mechanisms of healthy ageing. *Molecular Genetics and Genomics* *280*, 365-374.
- Schüller, H.-J. (2003). Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* *43*, 139-160.
- Schulz, T. J., Zarse, K., Voigt, A., Urban, N., Birringer, M., and Ristow, M. (2007). Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab* *6*, 280-293.
- Serres, M. (2001). In *Hominescence* (Paris: Livre de poche), pp. 18.
- Shäfer, B., and Wolf, K. (2003). Mitochondrial Genetics in a petite-negative yeast, In *The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe*, E. Richard, ed. (Springer), pp. 415-419.
- Shanley, D. P., and Kirkwood, T. B. (2000). Calorie Restriction And Aging : A Life-History Analysis. *Evolution* *54*, 740-750.
- Sharp, Z. D., and Bartke, A. (2005). Evidence for down-regulation of phosphoinositide 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR)-dependent translation regulatory signaling pathways in Ames dwarf mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* *60*, 293-300.
- Shieh, J. C., Wilkinson, M. G., Buck, V., Morgan, B. A., Makino, K., and Millar, J. B. (1997). The *Mcs4* response regulator coordinately controls the stress-activated *Wak1-Wis1-Sty1* MAP kinase pathway and fission yeast cell cycle. *Genes Dev* *11*, 1008-1022.

Shiozaki, K., Shiozaki, M., and Russell, P. (1998). Heat Stress Activates Fission Yeast Spc1/StyI MAPK by a MEKK-Independent Mechanism. *Mol Biol Cell* 9, 1339-1349.

Sinclair, D. A., and Guarente, L. (1997). Extrachromosomal rDNA Circles A Cause of Aging in Yeast. *Cell* 91, 1033-1042.

Sipiczki, M. (2000). Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biology* 1, reviews1011.1011 - reviews1011.1014.

Smith, A., Ward, M. P., and Garrett, S. (1998). Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J* 17, 3556 - 3564.

Smith, E. D., Kennedy, B. K., and Kaerberlein, M. (2007). Genome-wide identification of conserved longevity genes in yeast and worms. *Mechanisms of Ageing and Development* 128, 106-111.

Smith Jr, D. L., McClure, J. M., Matecic, M., and Smith, J. S. (2007). Calorie restriction extends the chronological lifespan of *Saccharomyces cerevisiae* independently of the Sirtuins. *Aging Cell* 6, 649-662.

Sohal, R., and Orr, W. (1992). Relationship between Antioxidants, Prooxidants, and the Aging Process. *Annals of the New York Academy of Sciences* 663, 74-84.

Soskic, V., Groebe, K., and Schratzenholz, A. (2008). Nonenzymatic posttranslational protein modifications in ageing. *Experimental Gerontology* 43, 247-257.

Soto, T., Fernandez, J., Cansado, J., Vicente-Soler, J., and Gacto, M. (1997). Protein kinase Sck1 is involved in trehalase activation by glucose and nitrogen source in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology* 143 (Pt 7), 2457-2463.

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.

Steinkraus, K. A., Kaerberlein, M., and Kennedy, B. K. (2008). Replicative Aging in Yeast: The Means to the End. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 24, 29-54.

Stepanyan, Z., Hughes, B., Cliche, D. O., Camp, D., and Hekimi, S. (2006). Genetic and molecular characterization of CLK-1/mCLK1, a conserved determinant of the rate of aging. *Experimental Gerontology* 41, 940-951.

- Stettler, S., Warbrick, E., Prochnik, S., Mackie, S., and Fantes, P. (1996). The *wis1* signal transduction pathway is required for expression of cAMP-repressed genes in fission yeast. *J Cell Sci* *109*, 1927-1935.
- Stevenson, C. B., Fox, A. N., and Kennell, J. C. (2000). Senescence associated with the over-replication of a mitochondrial retroplasmid in *Neurospora crassa*. *Molecular and General Genetics MGG* *263*, 433-444.
- Sugimoto, A., Iino, Y., Maeda, T., Watanabe, Y., and Yamamoto, M. (1991). *Schizosaccharomyces pombe* *stel1+* encodes a transcription factor with an HMG motif that is a critical regulator of sexual development. *Genes & Development* *5*, 1990-1999.
- Sun, J., Kale, S. P., Childress, A. M., Pinswasdi, C., and Jazwinski, S. M. (1994). Divergent roles of RAS1 and RAS2 in yeast longevity. *J Biol Chem* *269*, 18638-18645.
- Tahara, E. B., Barros, M. H., Oliveira, G. A., Netto, L. E. S., and Kowaltowski, A. J. (2007). Dihydrolipoyl dehydrogenase as a source of reactive oxygen species inhibited by caloric restriction and involved in *Saccharomyces cerevisiae* aging. *FASEB J* *21*, 274-283.
- Takeda, T., Toda, T., Kominami, K., Kohnosu, A., Yanagida, M., and Jones, N. (1995). *Schizosaccharomyces pombe* *atf1+* encodes a transcription factor required for sexual development and entry into stationary phase. *EMBO J* *14*, 6193-6208.
- Tang, Y., and McLeod, M. (2004). In Vivo Activation of Protein Kinase A in *Schizosaccharomyces pombe* Requires Threonine Phosphorylation at Its Activation Loop and Is Dependent on PDK1. *Genetics* *168*, 1843-1853.
- Thevelein, J. M., and de Winde, J. H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP, protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* *33*, 904-918.
- Tomás-Loba, A., Flores, I., Fernández-Marcos, P. J., Cayuela, M. L., Maraver, A., Tejera, A., Borrás, C., Matheu, A., Klatt, P., Flores, J. M., *et al.* (2008). Telomerase Reverse Transcriptase Delays Aging in Cancer-Resistant Mice. *Cell* *135*, 609-622.
- Toone, W. M., Kuge, S., Samuels, M., Morgan, B. A., Toda, T., and Jones, N. (1998). Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase *Sty1/Spc1*. *Genes & Development* *12*, 1453-1463.

Trancíková, A., Weisová, P., Kissová, I., Zeman, I., and Kolarov, J. (2004). Production of reactive oxygen species and loss of viability in yeast mitochondrial mutants: protective effect of Bcl-x_L. *FEMS Yeast Research* 5, 149-156.

Trifunovic, A., Hansson, A., Wredenberg, A., Rovio, A. T., Dufour, E., Khvorostov, I., Spelbrink, J. N., Wibom, R., Jacobs, H. T., and Larsson, N.-G. r. (2005). Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 17993-17998.

Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J. N., Rovio, A. T., Bruder, C. E., Bohlooly-Y, M., Gidlof, S., Oldfors, A., Wibom, R., *et al.* (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429, 417-423.

Tsuchiya, M., Dang, N., Kerr, E. O., Hu, D., Steffen, K. K., Oakes, J. A., Kennedy, B. K., and Kaerberlein, M. (2006). Sirtuin-independent effects of nicotinamide on lifespan extension from calorie restriction in yeast. *Aging Cell* 5, 505-514.

Tyner, S. D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., Lu, X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C., *et al.* (2002). p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 415, 45-53.

Urban, J., Souldard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Wanke, V., Anrather, D., Ammerer, G., Riezman, H., *et al.* (2007). Sch9 Is a Major Target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell* 26, 663-674.

Vachova, L., and Palkova, Z. (2005). Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *J Cell Biol* 169, 711-717.

Van Urk, H., Voll, W. S. L., Scheffers, W. A., and Van Dijken, J. P. (1990). Transient-State Analysis of Metabolic Fluxes in Crabtree-Positive and Crabtree-Negative Yeasts. *Appl Environ Microbiol* 56, 281-287.

Vanfleteren, J. R., and Braeckman, B. P. (1999). Mechanisms of life span determination in *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiology of aging* 20, 487-502.

Veal, E. A., Findlay, V. J., Day, A. M., Bozonet, S. M., Evans, J. M., Quinn, J., and Morgan, B. A. (2004). A 2-Cys Peroxiredoxin Regulates Peroxide-Induced Oxidation and Activation of a Stress-Activated MAP Kinase. *Mol Cell* 15, 129-139.

Venn, B. J., and Green, T. J. (2007). Glycemic index and glycemic load: measurement issues and their effect on diet-disease relationships. *Eur J Clin Nutr* 61 *Suppl 1*, S122-131.

- Vijg, J., and Campisi, J. (2008). Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature* 454, 1065-1071.
- Vivancos, A., Jara, M., Zuin, A., Sansó, M., and Hidalgo, E. (2006). Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H₂O₂ levels, different response pathways. *Molecular Genetics and Genomics* 276, 495-502.
- Voss, P. (2004). CRON site web.
- Walker, G., Houthoofd, K., Vanfleteren, J. R., and Gems, D. (2005). Dietary restriction in *C. elegans*: From rate-of-living effects to nutrient sensing pathways. *Mechanisms of Ageing and Development* 126, 929-937.
- Wallace, D. C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annual Review of Genetics* 39, 359-407.
- Wallace, M. A., Liou, L.-L., Martins, J., Clement, M. H. S., Bailey, S., Longo, V. D., Valentine, J. S., and Gralla, E. B. (2004). Superoxide Inhibits 4Fe-4S Cluster Enzymes Involved in Amino Acid Biosynthesis: CROSS-COMPARTMENT PROTECTION BY CuZn-SUPEROXIDE DISMUTASE. *J Biol Chem* 279, 32055-32062.
- Wang, L., Griffiths, K., Jr., Zhang, Y. H., Ivey, F. D., and Hoffman, C. S. (2005). *Schizosaccharomyces pombe* Adenylate Cyclase Suppressor Mutations Suggest a Role for cAMP Phosphodiesterase Regulation in Feedback Control of Glucose/cAMP Signaling. *Genetics* 171, 1523-1533.
- Wang, Y., Pierce, M., Schneper, L., uuml, ldal, C. G., ouml, ccedil, Zhang, X., Tavazoie, S., and Broach, J. R. (2004). Ras and Gpa2 Mediate One Branch of a Redundant Glucose Signaling Pathway in Yeast. *PLoS Biology* 2, e128.
- Warbrick, E., and Fantes, P. A. (1991). The *wis1* protein kinase is a dosage-dependent regulator of mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* 10, 4291-4299.
- Wei, M., Fabrizio, P., Hu, J., Ge, H., Cheng, C., Li, L., and Longo, V. D. (2008). Life Span Extension by Calorie Restriction Depends on Rim15 and Transcription Factors Downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS Genetics* 4, e13.
- Weisman, R., and Choder, M. (2001). The Fission Yeast TOR Homolog, *tor1+*, Is Required for the Response to Starvation and Other Stresses via a Conserved Serine. *J Biol Chem* 276, 7027-7032.

- Weismann, A. (1889). Essays upon heredity and kindred biological problems, In (Oxford), pp. 55.
- Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G. C., and Singer, R. A. (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 57, 383-401.
- Xue, Y., Battle, M., and Hirsch, J. P. (1998). GPR1 encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p Galpha subunit and functions in a Ras-independent pathway. *EMBO J* 17, 1996-2007.
- Yakura, M., Ishikura, Y., Adachi, Y., and Kawamukai, M. (2006). Involvement of Moc1 in Sexual Development and Survival of *Schizosaccharomyces pombe*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70, 1740-1749.
- Yan, L., Vatner, D. E., O'Connor, J. P., Ivessa, A., Ge, H., Chen, W., Hirotani, S., Ishikawa, Y., Sadoshima, J., and Vatner, S. F. (2007). Type 5 Adenylyl Cyclase Disruption Increases Longevity and Protects Against Stress. *Cell* 130, 247-258.
- Yanagida, M., Yamashita, Y. M., Tatebe, H., Ishii, K., Kumada, K., and Nakaseko, Y. (1999). Control of metaphase-anaphase progression by proteolysis: cyclosome function regulated by the protein kinase A pathway, ubiquitination and localization. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 354, 1559-1570.
- Zhang, Q., Chieu, H. K., Low, C. P., Zhang, S., Heng, C. K., and Yang, H. (2003). *Schizosaccharomyces pombe* Cells Deficient in Triacylglycerols Synthesis Undergo Apoptosis upon Entry into the Stationary Phase. *J Biol Chem* 278, 47145-47155.
- Zuin, A., Gabrielli, N., Calvo, I. A., Garca-Santamarina, S., Hoe, K.-L., Kim, D. U., Park, H.-O., Hayles, J., and Hidalgo, E. (2008). Mitochondrial Dysfunction Increases Oxidative Stress and Decreases Chronological Life Span in Fission Yeast. *PLoS ONE* 3, e2842.

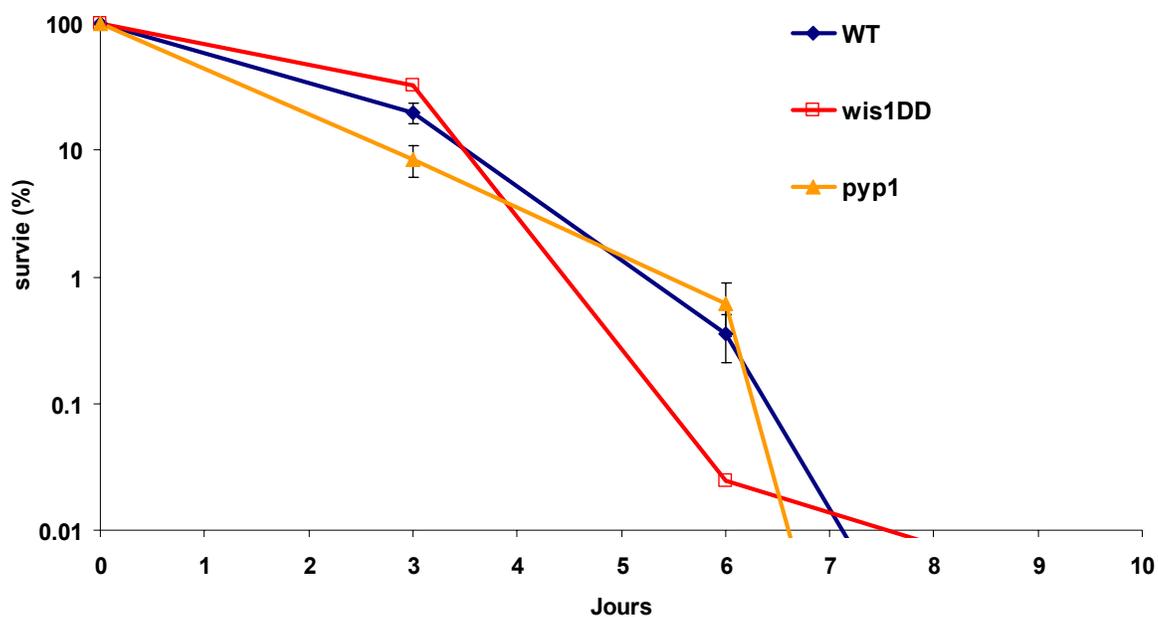
Annexes

Résultats

Effet des mutants constitutifs de la voie Wis1/Sty1 sur la longévité chronologique

Les mutants *wis1DD* et $\Delta pyp1$ sont deux souches provoquant une phosphorylation constitutive de la kinase Sty1p (Lawrence et al., 2007; Shiozaki et al., 1998). Une conséquence connue est la phosphorylation par Sty1p et la stabilisation du facteur de transcription Atf1p responsable de la réponse à de nombreux stress qui est aussi requis pour la survie à long terme (Lawrence et al., 2007; Takeda et al., 1995). Nous avons mesuré la DVC de ces deux mutants en milieu riche (Annexe, Figure 1). Aucune différence avec la souche de référence n'a pu être observée. La signification de ce résultat est développée dans la Discussion.

Annexe Figure 1 : Essai de longévité des mutants *wis1DD* et Δ *pyp1* de la voie *Wis4/Wis1/Sty1*. Les chiffres représentés sont des moyennes de trois cultures en milieu YEC.



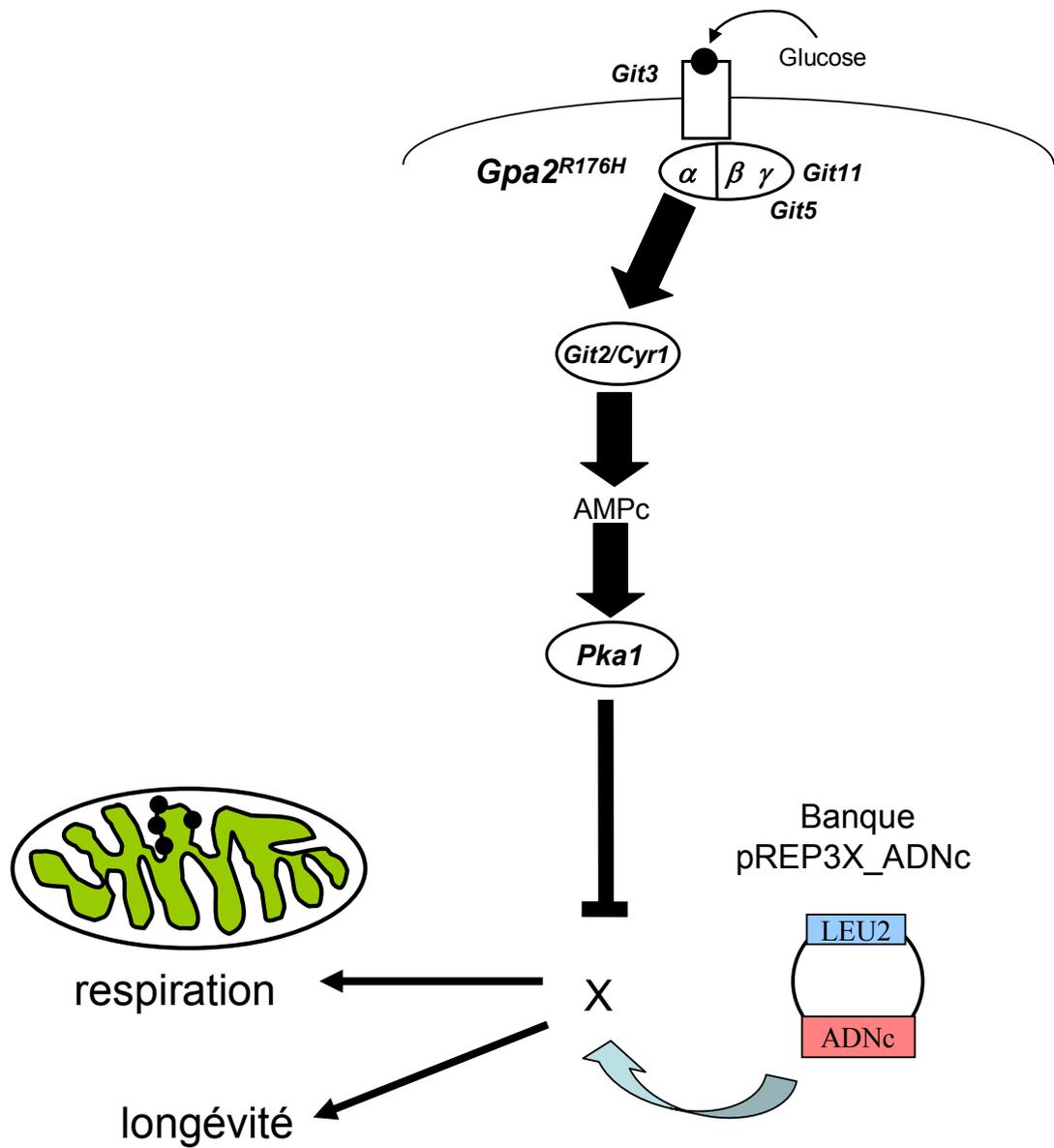
Criblage de surexpression pour isoler des effecteurs en aval de la voie Git3/PKA agissant sur la régulation de la respiration et de la longévité

Comme les deux articles présentés dans ce manuscrit l'ont montré, la voie PKA dépendante de l'AMPC contrôle la durée de vie de *S. pombe*. Pour trouver des effecteurs en aval de cette voie Git3/PKA agissant sur la DVC, un criblage de surexpression a été réalisé (Annexe, Figure 2).

Le mutant *gpa2*^{R176H} a une longévité réduite et ne pousse pas avec du glycérol comme source de carbone, un milieu nécessitant une hausse de la respiration. Le criblage visait à trouver des ADNc qui, surexprimés de manière constitutive sous le contrôle d'un promoteur fort (*nmt1* dans pREP3X), restaurent deux phénotypes du mutant *gpa2*^{R176H}, soit la pousse en milieu respiratoire et la survie en phase stationnaire (Annexe, Figure 2). La première étape a consisté en la transformation de ce mutant par une banque de surexpression (Annexe, Figure 3). Les clones obtenus ont été soumis à un transfert de milieu avec du glucose 2% vers un milieu forçant la respiration qui contient du glycérol 2% éthanol 0.1%. Un contrôle, la souche *gpa2*^{R176H} non transformée a permis de vérifier qu'aucune cellule mutante ne survivait à ce transfert. Cependant, plusieurs milliers de transformants ont poussé après passage en glycérol (Annexe, Figure 3). 100 de ces clones ont été gardés et testés pour leur durée de vie en phase stationnaire selon deux essais indépendants. Le premier par test de goutte, le second par comptage des unités formant des colonies (CFU) (voir partie matériels et méthodes plus bas).

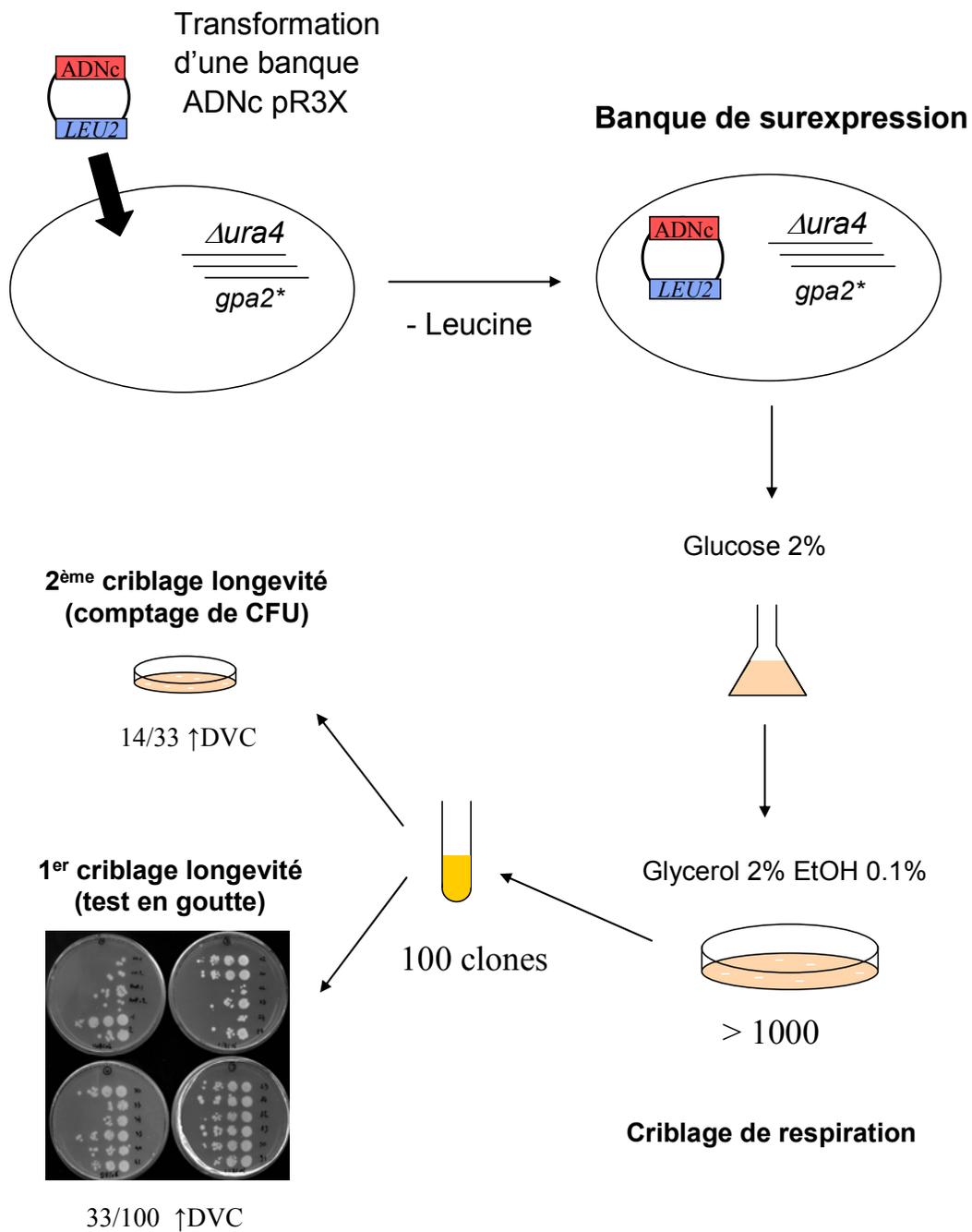
Le 1^{er} test de longévité en goutte a été réalisé sur les 100 souchesensemencées dans 4 mL. Elles ont été cultivées à saturation jusqu'au début de la phase stationnaire puis déposées en goutte sur boîte après dilution, ceci pour connaître le nombre approximatif de cellules vivantes totales. La même opération a été répétée après 21 jours pour estimer la DVC (Annexe, Figure 4A). Leur survie était comparée à la souche contrôle *gpa2*^{R176H} et à la souche sauvage. Étonnamment, sur 100 clones, 53 avaient une durée de vie au moins 100 fois supérieure aux souches de référence (Annexe, Figure 4A).

Annexe Figure 2 : modèle pour le criblage de banque de surexpression dans le mutant *gpa2^{R176H}*



Annexe Figure 3 : Etapes du protocole de criblage de banque.

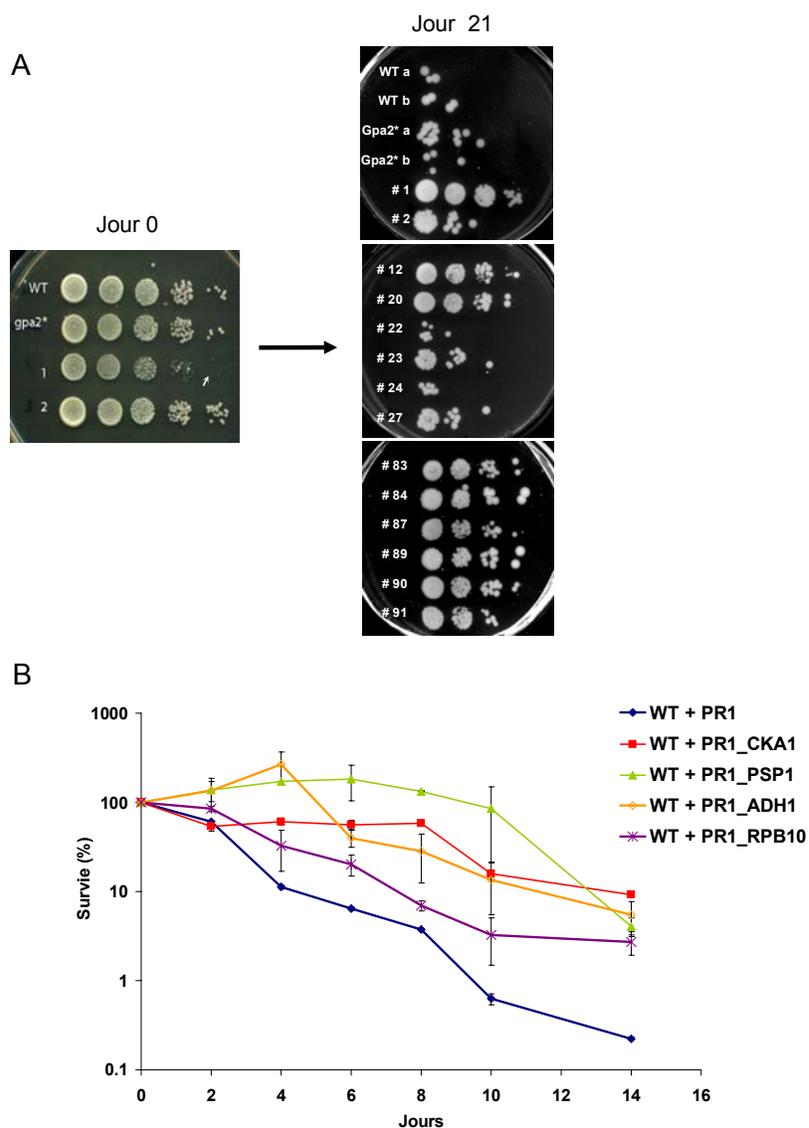
($gpa2^*$ réfère à $gpa2^{R176H}$)



Le 2^{ème} test de longévité a été fait par comptage des CFU pour gagner en précision. 32 souches furent sélectionnées parmi les 51 à longévité accrue du premier test. Le second test a été mené de la même manière que le premier à la différence que la longévité était mesurée par étalage sur boîte de pétrie et comptage des CFU. Sur 32 cultures, 18 avaient une durée de vie trop proche de celle du contrôle et ont donc été mises de côté. Les 14 restantes avaient une durée de vie significativement supérieure aux contrôles. Dans ces dernières, après isolement du plasmide pREP3X, les ADNc ont été séquencés par PCR.

Sept gènes ont été identifiés, ils sont résumés dans le *Tableau 2*. Parmi eux, 3 gènes ont une phase de lecture entière et dans l'orientation attendue (*ckal*⁺, *psp1*⁺, *rpb10*⁺) ; un est entier mais dans l'orientation inverse (*adh1*⁺) et trois sont dans la bonne orientation mais sont tronqués de manière à ne plus avoir d'ATG (*rps4-1*⁺, *rps26-1*⁺, *rpl32*⁺). Nous avons décidé d'étudier seulement les gènes dont les séquences trouvées avaient un cadre ouvert de lecture entier ; ceci excluait donc les 3 gènes ribosomiaux. Afin de vérifier l'effet de la surexpression des gènes choisis, ils ont été amplifiés sur l'ADN génomique et clonés dans le plasmide pREP1. Les plasmides résultants ont été transformés dans des cellules sauvages. Les souches obtenues ont été testées pour leur longévité (Figure 4B). Les quatre mutants de surexpression des gènes *ckal*⁺, *psp1*⁺, *rpb10*⁺ et *adh1*⁺ ont une DVC significativement plus longue que le contrôle sauvage. L'augmentation de survie de la souche avec le plasmide de surexpression d'*adh1*⁺ est toutefois discutable puisqu'il semble que cette souche a tardé à entrer en phase stationnaire et que sa pente de mortalité est similaire à celle des cellules sauvages.

Annexe Figure 4 : Tests de longévité appliqués pendant le criblage. A, résultat représentatif de la première étape de criblage de longévité sur 100 candidats réalisée par test de goutte sur des cultures de 21 jours. B, essai de longévité de 4 souches ayant un fond génétique sauvage et transformées avec les plasmides portant les séquences identifiées lors du criblage et reclonees à partir de leur amplification sur une matrice génomique.



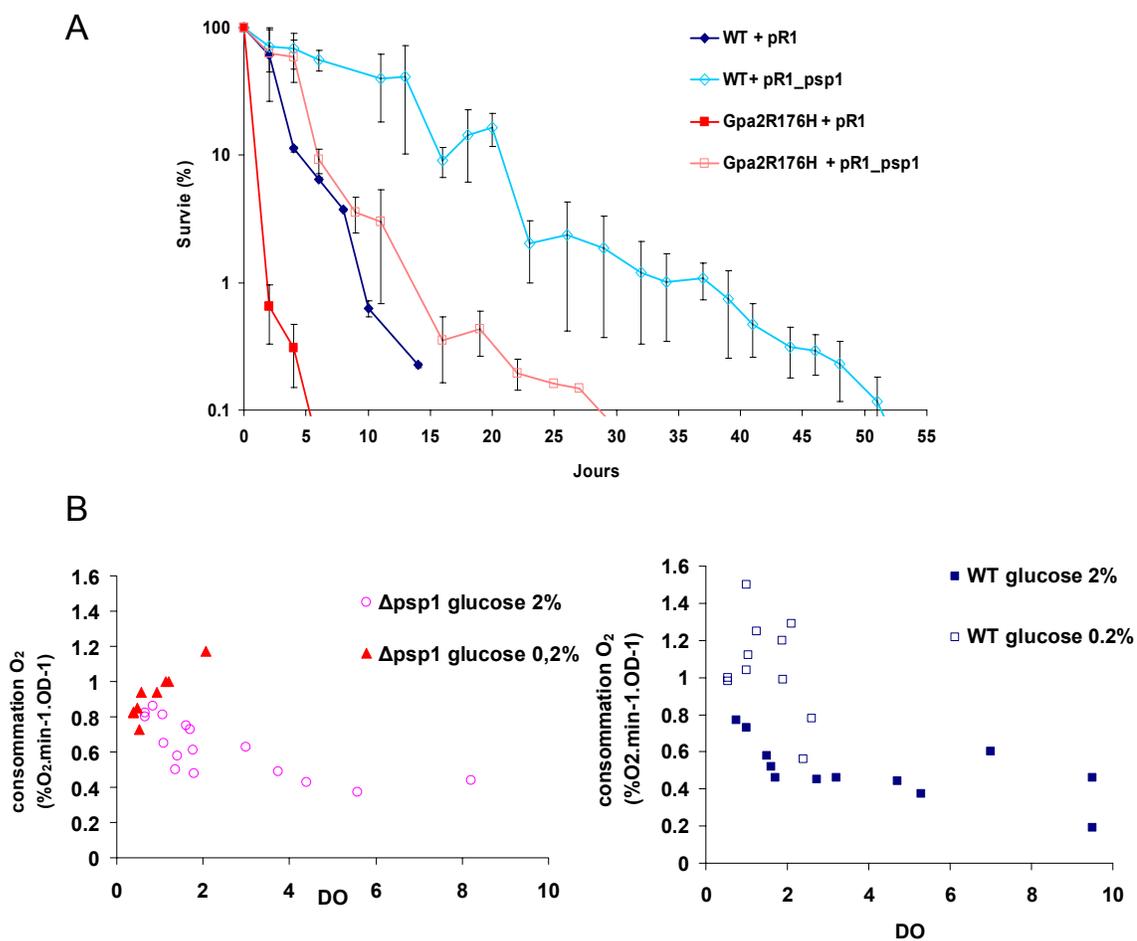
Caractérisation de la longévité des mutants du gène *psp1*⁺

Nous avons choisi de se pencher sur le gène dont l'augmentation de longévité était la plus significative par surexpression. Le gène est *psp1*⁺/*moc1*⁺/*sds23*⁺ a déjà été étudié chez *S. pombe* mais sa fonction reste inconnue. Il a été isolé précédemment dans la levure à fission lors d'un autre criblage de surexpression qui permettait la récupération de la fertilité d'une souche stérile surexprimant l'adénylate cyclase *cyr1*⁺ (Kawamukai, 1999). Le nom *moc1*⁺ lui a été donné en conséquence pour *multicopy suppressor of overexpressed cyr1*⁺. Le mutant *gpa2*^{R176H} a un phénotype similaire à la surexpression de *cyr1*⁺ car ils induisent tous deux une synthèse anormale d'AMPc (Ivey et Hoffman, 2005; Kawamukai, 1999). On en conclut donc que la surexpression de *psp1*⁺/*moc1*⁺ agit en aval de la signalisation par l'AMPc sur plusieurs fonctions : développement sexuel, longévité et respiration. Le fait que nous ayons isolé un gène déjà trouvé lors d'un criblage similaire permet valider notre approche.

La délétion de *psp1*⁺ entraîne une sensibilité à la température, une tolérance au sel, un allongement des cellules et une stérilité (Goldar et al., 2005). Par la suite, il a été montré que cette protéine était requise pour la survie en phase stationnaire en milieu riche avec 3% glucose et qu'elle était phosphorylée en phase stationnaire et en absence de nutriments azotés (Yakura et al., 2006). De plus, elle est localisée dans le cytoplasme et le noyau en absence de nutriments azotés et est exclue totalement du noyau dans les mêmes conditions avec des souches ayant une suraccumulation d'AMPc par surexpression de *cyr1*⁺ ou par perte de phosphodiesterase (Yakura et al., 2006). Ces résultats appuient donc le rôle du gène *psp1*⁺ en tant que régulateur positif de la durée de vie chronologique régulé par la voie Git3/PKA.

Ceci fut vérifié par surexpression de ce gène dans un fond génétique sauvage (Figure 5A). La survie de la souche sauvage est très significativement augmentée par la surexpression de Psp1p. Par ailleurs, la survie de *gpa2^{R176H}* est largement restaurée par ce plasmide, ceci vérifie le résultat du criblage et suggère que *psp1⁺* est une cible régulant la longévité en aval de cette voie. Toutefois, la DVC atteinte après transformation par ce plasmide est plus courte dans le mutant que dans la souche sauvage (Figure 5A). Ceci montre que la perte de viabilité par la mutation *gpa2^{R176H}* ne provient pas seulement d'une perte de régulation de l'expression de ce gène et que la voie Git3/PKA agit sur d'autres cibles influençant la longévité.

Annexe Figure 5 : Caractérisation de la fonction du gène *pspI*⁺. A, effet du plasmide de surexpression de *pspI*⁺ dans la souche sauvage et dans mutant *gpa2*^{R176H} dans un milieu SDC. B, mesure de la respiration dans Δ *pspI* et dans la souche sauvage.



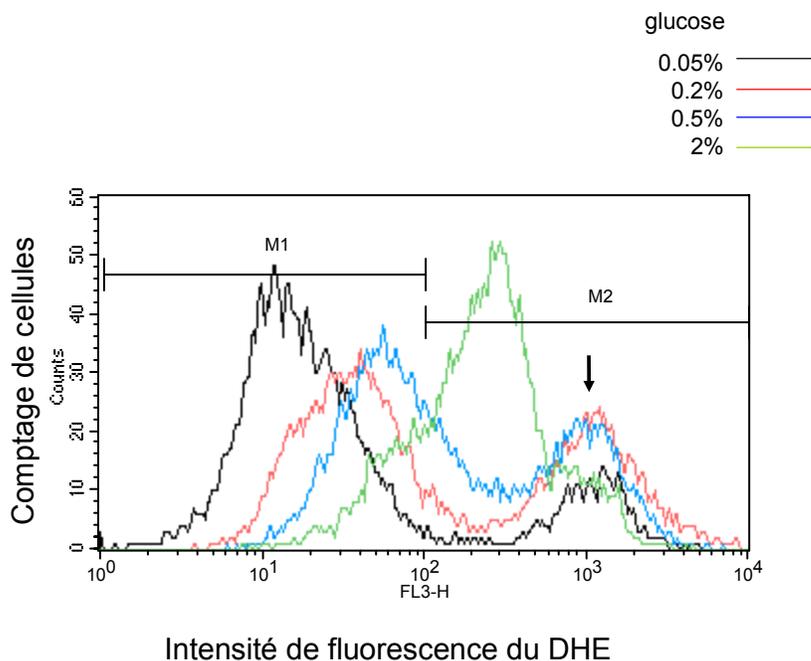
Etude de profil d'expression du mutant $\Delta sck2$

Le mutant de délétion du gène *sck2*⁺ a un vieillissement ralenti. Etonnamment, sa résistance au stress en phase stationnaire est équivalente aux cellules sauvages (Article 1, Figure 7). Pour avoir une idée des fonctions cellulaires qui lui confèrent sa durée de vie prolongée, nous avons réalisé une analyse de son profil d'expression en phase stationnaire. Les résultats sont résumés dans le Tableau 4 et décrit dans la Discussion.

Mesure de la quantité de ROS pendant la phase logarithmique.

L'utilisation de marqueur fluorescent DHE plus sensible que le DHR123 précédemment utilisé a permis de mesurer l'accumulation de ROS pendant la phase exponentielle, une période de faible accumulation de ROS. Cette mesure par cytométrie en flux a permis de mettre en évidence des différences à différente concentration de glucose comme le montre la Figure 6 de cette annexe.

Annexe Figure 6 : Comptage des cellules en fonction de leur intensité de fluorescence du DHE en phase logarithmique. La flèche représente des cellules mortes.



Matériels et méthodes supplémentaires

Criblage génétique

La souche RWP1 (ou SP14140, voir *Supplemental Table 1* dans l'article 2) portant la mutation *gpa2*^{R176H} a été transformée par une banque de plasmide pREP3X d'ADNc par la méthode du PEG-lithium acétate (Elbe, 1992). Cette banque a été construite par Dr Chris Norbury, Oxford university. La transformation a permis d'obtenir 200 000 transformants par mL (stock référence 14203). La banque de clones de *S. pombe* obtenue a alors été cultivée en milieu EMM AU jusqu'à une densité optique de 1 puis culotée, lavée, reprise dans de l'eau et étalée en plusieurs dilutions sur des boîtes de Pétrie contenant du EMM AU avec glycérol 2% et éthanol 0.1%. Après 15 jours, des milliers de clones ont poussés mais pas dans le contrôle de la souche RWP1 non transformée. Parmi ces clones, 100 candidats ont été repiqués sur EMM AU glucose 2%. De ces boîtes, 100 pré-cultures liquides ont été lancées en MMC AU_{4x} (voir article 1) et une fois à DO environ 3-6, elles ont servi à partir 100 cultures dans 4 mL de MMC AU_{4x} 2% glucose (DO de 0.3) ; des échantillons de ces cultures ont aussi été stockées à - 80°C. Les cultures ont été incubées 48 heures, diluées d'un facteur 10¹ à 10⁵ et étalées sur boîte pour vérifier que leurs densités cellulaires étaient toutes similaires en début de phase stationnaire. Puis elles ont été laissées à 30°C avec agitation pendant 21 jours. A ce stade, elles ont été diluées d'un facteur 1 à 10⁴ et 100µL de chaque dilution ont été déposés en goutte sur milieu YE pour estimer la survie (Figure 1). A partir de là, les 32 clones ayant la plus longue DVC furent sélectionnés et relancés en

culture liquide pour un second test de longévité plus précis à partir de la souche de départ préalablement stockée. De la même manière que précédemment, des pré-cultures et des cultures de 4mL dans du MMC AU_{4x} ont été faites. Après 7 jours et 14 jours en phase stationnaire, des échantillons étaient prélevés et étalés pour évaluer la survie par rapport au 1^{er} jour par comptage de colonie, comme décrit dans l'article 1 de cette thèse. Parmi ces 32 souches testées, 14 ont été gardées pour identification. Les plasmides ont été isolés et transformés dans *Escherichia coli* par la méthode décrite dans (Hoffman et Winston, 1987) puis séquencés.

Notons que lors des essais de longévité des souches surexprimant les ADNc avec le plasmide pREP3X, nous avons observé que pendant la phase stationnaire beaucoup de cellules de la population perdaient le plasmide sans mourir. Le marqueur *LEU2* du plasmide était pourtant requis puisque la souche est auxotrophe pour la leucine (*leu1-32*). D'autre part, il n'y avait pas de leucine dans le milieu. Une explication serait d'abord que les cellules en phase stationnaire sont en état hypo-métabolique végétatif, elles ne se divisent plus et ont une traduction 300 fois inférieure à la normale, ce qui les rendrait moins dépendante de la leucine. De plus, il se peut que les cellules mortes libèrent de la leucine utilisable sans la voie de biosynthèse de cet acide aminé.

Clonage des gènes isolés dans le criblage et mesure de la DVC

Afin de vérifier l'implication des gènes isolés dans le criblage, ils ont été clonés dans un nouveau vecteur à partir de leur amplification par PCR avec l'ADN génomique comme matrice. L'utilisation de sites de restriction dans les amorces a permis leur insertion dans la plasmide pREP1. Le gène *adh1*⁺ a été inséré entre les sites *NdeI* et *BamHI* ; *cka1*⁺ entre *XbaI* et *BamHI* ; *psp1*⁺ entre *NdeI* et *XbaI* et *rpb10*⁺ entre *XbaI* et *BamHI*. Les plasmides obtenus ont été transformés dans la souche sauvage (SP14000) et le mutant

gpa2^{R176H} (SP14201). Leur survie a été évaluée selon le protocole de mesure de la durée de vie par comptage de CFU décrit dans l'article 1. Le résultat présenté est une moyenne de deux cultures.

Mesure de l'accumulation des ROS en phase exponentielle

Le protocole de mesure est le même que celui décrit dans le matériels et méthodes de l'article 2. Des cultures de 10 mL ont été cultivées jusqu'à une DO 0,3 dans des tubes 50 mL Starsted à bouchons à vis partiellement fermés (aération faible).

Puces à ADN de la souche Δ *sck2*

Les ARN totaux de la souche sauvage SP14077 et de la souche Δ *sck2* SP14087 ont été isolés au 5^{ème} jour de phase stationnaire (après que la DO cesse de croître) selon le protocole à base d'isothiocyanate de guanidium décrit dans l'article 2. Deux extractions d'ARN par souche, depuis deux cultures indépendantes, ont permis d'obtenir au moins 200µg par échantillon. La pureté et l'intégrité des ARN ont été vérifiées par bioanalyser Agilent par la plateforme de Génome Québec à l'Université de Mc Gill, Montréal. Alors, les ARN ont été envoyés au laboratoire du Dr. Jurg Bähler dans l'éthanol pur pour réaliser deux expériences de comparaison de profil global d'expression entre la souche sauvage et la souche Δ *sck2*. Entre les deux expériences, les fluorophores de Cy3-dCTP et Cy5-dCTP ont été intervertis pour se départir des différences d'hybridation dues aux marqueurs. Le protocole consiste en une transcription inverse des ARN en présence de dCTP marqué puis hybridation sur puce à sondes d'ADN représentant la totalité des cadres ouverts de lectures du génome, et de la lecture des puces. Il est décrit dans une étude précédente de ce laboratoire (Chen et al., 2003). Les résultats présentés sont des ratios d'intensité de

fluorescence des sondes pour gènes choisis entre dans la souche mutante et la sauvage. Le chiffre donné est une moyenne des deux expériences.

Références supplémentaires

Chen, D., Toone, W. M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., and Bahler, J. (2003). Global Transcriptional Responses of Fission Yeast to Environmental Stress. *Mol Biol Cell* *14*, 214-229.

Elbe, R. (1992). A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *biotechniques* *13*, 19-19.

Goldar, M. M., Nishie, T., Ishikura, Y., Fukuda, T., Takegawa, K., and Kawamukai, M. (2005). Functional Conservation between Fission Yeast *moc1/sds23* and Its Two Orthologs, Budding Yeast *SDS23* and *SDS24*, and Phenotypic Differences in Their Disruptants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* *69*, 1422-1426.

Hoffman, C., and Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Genes*, 267-272.

Ivey, F. D., and Hoffman, C. S. (2005). Direct activation of fission yeast adenylate cyclase by the Gpa2 Galpha of the glucose signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 6108-6113.

Kawamukai, M. (1999). Isolation of a novel gene, *moc2*, encoding a putative RNA helicase as a suppressor of sterile strains in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* *1446*, 93-101.

Lawrence, C. L., Maekawa, H., Worthington, J. L., Reiter, W., Wilkinson, C. R. M., and Jones, N. (2007). Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* Atf1 Protein Levels by Sty1-mediated Phosphorylation and Heterodimerization with Pcr1. *J Biol Chem* 282, 5160-5170.

Shiozaki, K., Shiozaki, M., and Russell, P. (1998). Heat Stress Activates Fission Yeast Spc1/StyI MAPK by a MEKK-Independent Mechanism. *Mol Biol Cell* 9, 1339-1349.

Takeda, T., Toda, T., Kominami, K., Kohnosu, A., Yanagida, M., and Jones, N. (1995). *Schizosaccharomyces pombe atf1⁺* encodes a transcription factor required for sexual development and entry into stationary phase. *EMBO J* 14, 6193-6208.

Yakura, M., Ishikura, Y., Adachi, Y., and Kawamukai, M. (2006). Involvement of Moc1 in Sexual Development and Survival of *Schizosaccharomyces pombe*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70, 1740-1749.

Liste des contributions de l'auteur à d'autres articles que ceux inclus dans cette thèse

Scientifiques

- **Roux AE**, Chartrand P, Ferbeyre G, Rokeach LA. "Fission yeast and the other emergent yeast models to unravel cellular aging in eukaryotes" *Journal of Gerontology, en rédaction*
- Moiseeva O ,Bourdeau V, **Roux A**, Deschênes-Simard O X, Ferbeyre G. "Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence" *Mol Cell Biol*, (2009) *online ahead of print on 15 June 2009*
- Turcotte C, **Roux AE**, Beaugard PB, Guérin R, Sénéchal P, and Rokeach LA "The calnexin independent state does not compensate for all calnexin functions in *Schizosaccharomyces pombe*" (2007) *FEMS Yeast Res*; Mar;7(2):196-208

Vulgarisations

- **Roux AE**, "Évolution rapide des espèces, la preuve par le lézard" (2009) *Le Panoptique*; mars, (www.lepanoptique.com)
- **Roux AE**, " Le SIDA ne tue plus, mais on en meurt encore. Entretien avec le Dr Bruno Spire " (2008) *Le Panoptique*; Octobre
- **Roux AE**, "la longévité dans l'assiette" (2008) *Le Panoptique*; Avril
- **Roux AE**, "Le cholestérol est-il un faux coupable ?" (2007) *Le Panoptique*; Décembre
- **Roux AE**, "Quand la Science se lance en quête du Graal" (2006) *Dire*; Octobre

Annexe: Accord des coauteurs (Article 1)

Identification de l'étudiant et du programme

Antoine Roux

Ph.D. Biochimie

Description de l'article

Roux AE, Quissac A, Chartrand P, Ferbeyre G and Rokeach LA "Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2" (2006) *Aging Cell* 5,345–357

Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article mentionné ci-dessus, je consens à ce que Antoine Roux inclus cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : « Le vieillissement chronologique de *Schizosaccharomyces pombe*, implication des voies de détection du glucose. »

Aurélie Quissac

Signature

Date

Pascal Chartrand

Signature

Date

Gerardo Ferbeyre

Signature

Date

Luis A. Rokeach

Signature

Date

Annexe: Accord des coauteurs (Article 2)

Identification de l'étudiant et du programme

Antoine Roux

Ph.D. Biochimie

Description de l'article

Antoine E. Roux, Alexandre Leroux, Manal A. Alaamery, Charles S. Hoffman, Pascal Chartrand, Gerardo Ferbeyre, and Luis A. Rokeach "Pro-aging effects of glucose signalling through a G protein-coupled glucose receptor in fission yeast " (2009) *Plos Genetics*, e1000408

Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article mentionné ci-dessus, je consens à ce que Antoine Roux inclus cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : « Le vieillissement chronologique de *Schizosaccharomyces pombe*, implication des voies de détection du glucose. »

Alexandre Leroux

Signature

Date

Manal A. Alaamery

Signature

Date

Charles S. Hoffman

Signature

Date

Pascal Chartrand

Signature

Date

Gerardo Ferbeyre

Signature

Date

Luis A. Rokeach

Signature

Date